

Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение  
Бобровский образовательный центр  
«Лидер» имени А. В. Гордеева

**Проект по теме:**  
**«Выделение плазмидной ДНК из спороносных бактерий рода *Bacillus*».**

Выполнил: обучающийся  
10 класса «А»  
Рябов Андрей.  
Руководители:  
учитель биологии  
Терновых Оксана Михайловна  
МБОУ БОЦ «Лидер» им. А.В. Гордеева

Воронежская область, город Бобров 2021 г.

## Оглавление

Введение: .....	3
Актуальность: .....	3
Цель проекта: научиться выделять плазмидную ДНК бактерий рода <i>Bacillus</i> для электрофоретического анализа. ....	3
Задачи проекта: .....	3
Проблема проекта: .....	4
Необходимое оборудование и реактивы: .....	4
I. Практическая часть. Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток.....	5
1. Выращивание культуры [3,4,6,7]. ....	5
2. Окрашивание и микроскопия [3-15]:.....	6
2.1 Нанесение культуры: .....	6
2.2 Окрашивание: .....	6
2.3 Фиксация физическим методом:.....	7
2.4 Оптическая микроскопия:.....	7
2.5 Анализ: .....	7
3. Выделение плазмид. ....	7
3.1 Осаждение клеток [1-2]. ....	7
3.2 Разрушение клеточной стенки бактерий [5,6,7,10]. ....	7
3.3 Денатурация геномной ДНК и белков [1,2]. ....	7
3.4 Смена pH раствора [5]. ....	8
3.5 Центрифугирование [3-15] .....	8
3.6 Амплификация плазмидной ДНК .....	8
3.7 Осаждение плазмидной ДНК [1,2] .....	8
Электрофорез [1-15] .....	8
4.1 Подготавливали к электрофорезу образцы исследуемой ДНК. ....	8
4.2 Осторожно внесли в лунки исследуемую и маркерную ДНК.....	8
4.3 Провели электрофорез. ....	8
4.4 Просмотрели гель в УФ-свете на трансиллюминаторе.....	8
Практическая значимость: .....	9
Список литературы: .....	9
Приложения: .....	10

**Введение:**

Плазмиды, представляют собой, как правило, небольшие кольцевые молекулы ДНК, которые являются удобными объектами молекулярной биологии, позволяющими решать комплекс задач фундаментального и прикладного характера. В частности, они могут успешно использоваться при изучении молекулярных механизмов основных биологических процессов: репликации, рекомбинации, репарации, транскрипции, трансляции, регуляции экспрессии генов и др. В практическом отношении плазмиды с успехом применяются при конструировании векторов для транспозонного мутагенеза и молекулярного клонирования в биотехнологических целях [16].

(приложение 1)

Настоящая работа посвящена выделению плазмид бактерий рода *Bacillus*, поскольку отдельные представители этой таксономической группы микроорганизмов достаточно хорошо охарактеризованы в генетическом и биохимическом отношении и имеют практическую значимость [17].

**Актуальность:**

Выделение внехромосомных генетических элементов, являющихся частью генетического аппарата и определяющих ряд важнейших этапов жизнедеятельности бактериальной клетки-хозяина необходима для работы и изучения плазмид. Размножая плазмиды в бактериальных клетках, можно вырабатывать огромные количества нужного белка. Например, именно таким образом в настоящее время получают инсулин. Также плазмиды рассматривают как перспективный инструмент для генной терапии, поскольку на них могут синтезироваться белки, которых недостаёт в клетках пациента. На плаزمидах в клетки можно доставлять гены, кодирующие такие инструменты для редактирования генома, как нуклеазы. Так же плазмиды, дающие бактериям возможность разрушать труднорастворимые субстраты, могут быть использованы в биоремедиации (Биоремедиация — комплекс методов очистки вод, грунтов и атмосферы с использованием метаболического потенциала биологических объектов — растений, грибов, насекомых, червей и других организмов.). Ещё плазмиды находят широкое применение в создании вакцин и новых лекарственных препаратов, а также увеличении продуктивности организмов, синтезирующих биологически активные вещества [16].

**Цель проекта:** научиться выделять плазмидную ДНК бактерий рода *Bacillus* для электрофоретического анализа.

**Задачи проекта:**

- 1) Изучить основные источники литературы и Интернет-ресурсы по теме, а также выбрать подходящую методику выделения плазмидной ДНК.
- 2) Вырастить колонию бактерий рода *Bacillus*, следуя четким указаниям методики эксперимента.
- 3) Выделить плазмидную ДНК бактерий рода *Bacillus*

для электрофоретического анализа, следуя четким указаниям методики эксперимента

4) Провести электрофоретический анализ выделенной плазмидной ДНК.

**Проблема проекта:**

Плазмидная ДНК имеет маленький размер, поэтому её сложно выделить и увидеть.

**Необходимое оборудование и реактивы:**

1. Колбы Эрленмейера стеклянные.
2. Дистиллированная вода.
3. Мясо говядины.
4. Орбитальный шейкер-инкубатор с двигающейся платформой.
5. Стеклянные палочки.
6. Резиновые пробки, для стеклянных колб.
7. Пластиковая пипетка Пастера.
8. Бактериологическая петля.
9. Спиртовка стеклянная.
10. Спирт этиловый, 96% концентрации ( $C_2H_5OH$ ).
11. Кастрюля металлическая.
12. Электрическая печь.
13. Анилиновые красители:
  - а) метиленовый синий — сухой кристаллический порошок, синего цвета;
  - б) раствор Люголя — жидкость;
  - в) сафранин — сухой кристаллический порошок, красного цвета.
14. Световой тринокулярный микроскоп.
15. Иммерсионное (кедровое) масло.
16. Веб-камера — для получения фотоснимков.
17. Смесь Никифорова.
18. Лизоцим.
19. Фенол ( $C_6H_6O$ ).
20. Гидроксид натрия ( $NaOH$ ).
21. Ацетат натрия ( $CH_3COONa$ ).
22. Уксусная кислота ( $CH_3COOH$ ).
23. Центрифуга.
24. Электрофорез.
25. Стерильные чашки Петри.
26. Маркер по стеклу.
27. Аналитические весы.
28. Дистиллированная вода.
29. Стеклянные палочки.
30. Сушильный шкаф.
31. Термостат.
32. Химический стакан.
33. Полусинтетический МПА.

## **I. Практическая часть. Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток.**

На первом этапе мы получили нужные бактерии, для этого в стеклянную колбу налили холодную дистиллированную воду 300 мл, добавили кусочки свежего (сырого) мяса говядины заранее приобретенное в магазине. Сверху горловину колбы закрыли резиновой пробкой и поставили на сутки (24 часа) в орбитальный шейкер-инкубатор с двигающейся платформой (температурный режим +40<sup>0</sup>С) [1-15].

### **1. Выращивание культуры [3,4,6,7].**

На следующем этапе навески пептона мясного ферментативного 0,5 г и агар-агар микробиологического 0,75 г поместили в химический стакан, объемом 100 см<sup>3</sup>, и растворили в 50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Среду довели до кипения на электрической плитке постоянно перемешивая стеклянной палочкой и разлили через воронку (не охлаждая) в четыре пробирки. (приложение 2).

Пробирки закрыли ватно-марлевыми пробками, обернули пергаментом и стерилизовали в автоклаве при 121 °С в течение 15 мин.

После автоклавирования расплавленную питательную среду МПА (50–55 °С) перенесли в ламинарный бокс и разлили в стерильные чашки Петри (приложение 3).

Затем средуюстудили и перевернутые чашки Петри поместили в инкубатор-термостат. Инкубацию провели в термостате при 37 °С в течение 48 часов (приложение 4).

Далее мы провели культивирование бактерий методом посева (приложение 5).

Посевы проводили над пламенем спиртовки, чтобы теплый воздух препятствовал осаждению микроорганизмов из окружающего воздуха и отчасти их уничтожал (приложение 6).

### **Последовательность выполнения работы:**

1. В правую руку взяли бактериологическую петлю, и простерилизовали её в пламени спиртовки, прокаливая докрасна при этом петлю держали почти вертикально. (приложение 7);

2. В левую руку брали пробирку с культурой микроорганизмов (ближе к себе);

3. Не выпуская бактериологической петли из правой руки, мизинцем и безымянным пальцем прижимали наружные концы ватных пробок к ладони и вынимали пробку из пробирки .

4. Слегка обжигали в пламени спиртовки края открытой пробирки.

5. Ввели в пробирку с культурой микроорганизмов петлю. Чтобы не повредить клетки микроорганизмов, петлю вначале охладили, прикасаясь к внутренней поверхности пробирки или к питательной среде, свободной от клеток микроорганизмов, и только после этого отбирали небольшое количество микробной массы.(приложение 8)

6. Отобранный исследуемый материал наносили петлей в верхнюю часть твердой среды в чашке Петри аккуратно, зигзагообразно по поверхности чашки(метод истощающего штриха)(приложение 9)
7. Обжигали ватную пробку и края пробирки одновременно в пламени и закрыли её.
8. Обжигали петлю в пламени;
9. После посева чашки перевернули вверх дном и поставили в термостат при температуре 37°C ;
10. Инкубировали посевы в термостате в течение 2 дней. В результате на поверхности среды выросли колонии микроорганизмов. (приложение 10).

## 2. **Окрашивание и микроскопия**[3-15]:

### 2.1 *Нанесение культуры:*

Бактериологическую петлю профламбировали в пламени огня спиртовки и слегка остудили затем погрузили в чашку Петри, захватывали выросшую колонию бактерий и аккуратно нанесли на поверхность предметного стекла, предварительно извлеченного из спирта этилового 96%-ой концентрации и профламбированного (уничтожение всех видов микробов) в верхней части пламени огня (приложение 11).

### 2.2 *Окрашивание:*

На «мостике» стеклянной кюветки предметному стеклу дали слегка остыть от жара, затем на высохшую бактериальную культуру клали ровный квадратик белой фильтровальной бумаги и приступили к окрашиванию по методу известного датского микробиолога Ганс Кристиана Грама. Для этой цели использовали три вида красителей и одно химическое соединение (приложение 12, 13):

- метиленовый синий — 2 мин (краситель);
- раствор Люголя — 2 мин (краситель);
- 96%-й  $C_2H_5OH$  — 30 сек (химическое соединение);
- дистиллированная вода;
- сафранин — 2 мин (краситель).

Используя краситель - метиленовый синий пропитали белую фильтровальную бумагу так, чтобы она прилипла к высохшей культуре и окрасила его в синий цвет. Наличие достаточной дозировки красителя проверяли, поднятием предметного стекла выше уровня глаз исследуемого и наблюдали снизу-вверх, чтобы нижняя часть белой фильтровальной бумаги окрасилась в синий цвет. Держали краситель 2 мин. По истечению времени пинцетом снимали с предметного стекла окрашенную фильтровальную бумагу, удаляли или стряхивали в кюветку лишний краситель.

Второй краситель — раствор Люголя (1 г — йод кристаллический; 2 г — йодистый калий; 300 мл — дистиллированной воды). Держали 2 мин.

Наносили третий химический компонент — 96%-й этиловый спирт (этанол,  $C_2H_5OH$ ), в количестве нескольких капель на 30 сек.

Затем препарат обильно промывали дистиллированной водой до полного смывания с предметного стекла двух первоначальных красителей, но с сохранением их на самой окрашенной культуре.

Наносили — Сафранин на 2 мин, излишнее количество удаляли.

Затем ещё раз обильно промыли исходную культуру дистиллированной водой и приступили к процессу фиксации — закреплению препарата на поверхности предметного стекла.

### *2.3 Фиксация физическим методом:*

С помощью открытого пламени огня горячей спиртовки, препарат высушили над огнем (приложение 14);

### *2.4 Оптическая микроскопия:*

С помощью оптической иммерсионной системы провели исследование микромира свежего мяса. Благодаря окраске по методу Грамамы обнаружили гнилостные бактерии (приложение 15, 16);

### *2.5 Анализ:*

При окраске по Граму все микроорганизмы окрашиваются в два разных цвета — грамположительные или Гр<sup>+</sup> (синий цвет) и грамотрицательные, Гр<sup>-</sup> (красный цвет). В нашем случае бактерии грамотрицательные, Гр<sup>-</sup> так как окрасились в красный цвет (приложение 16).

Краткое описание бактерий рода *Bacillus*:

1. Размер — крупные.
2. Форма — палочковидная.
3. Спора — присутствует (спорообразующие).
4. Дыхание — анаэробы (не дышат кислородом воздуха).

## **3. Выделение плазмид.**

### **3.1 Осаждение клеток [1-2].**

Отбрали 1.5 мл культуры перенесли в эппендорф, центрифугировали 1-2 мин при 13000 об/мин, надосадочную жидкость слили, снова добавили 1.5 мл культуры и центрифугировали. Удалили дозатором всю надосадочную жидкость (приложение 17).

### **3.2 Разрушение клеточной стенки бактерий [5,6,7,10].**

Для разрушения клеточной стенки бактерий внесли 50 мкл лизоцима с концентрацией 20 мг/мл, а также рибонуклеазу для разрушения РНК, инкубировали 60 мин при 37°C, осторожно перемешивая, суспензия стала более прозрачной и коричневой (приложение 18).

### **3.3 Денатурация геномной ДНК и белков [1,2].**

Клетки перенесли в ледяную баню и внесли 400 мкл свежеприготовленного раствора (80% фенола, 19% H<sub>2</sub>O и 1% NaOH). Осторожно перемешали переворачивая пробирку до получения прозрачного и вязкого раствора. На данной стадии происходит лизис клеток и геномная ДНК оказывается в растворе в расплетенном виде, что и обуславливает вязкость раствора. На

данном этапе важно не повредить ее интенсивным встряхиванием (приложение 19).

### **3.4 Смена рН раствора [5].**

Добавили 300 мкл охлажденного раствора 3 М ацетата калия (натрия) (29 гр ацетата калия (натрия)); 11 мл ледяной уксусной кислоты и 60 мл воды). Осторожно перемешали переворачиванием и инкубировали при температуре - 20<sup>0</sup>С в течение 30 мин. На данной стадии происходит смена рН раствора в кислую область и геномная ДНК выпала в осадок в виде белых хлопьев. Плазмидная ДНК ввиду своего малого размера в осадок не выпала (приложение 20).

### **3.5 Центрифугирование [3-15]**

Смесь центрифугировали при 12 тыс. об/мин в течение 15 мин для удаления геномной ДНК. Перенесли надосадочную жидкость в чистый эппендорф. (приложение 21)

### **3.6 Амплификация плазмидной ДНК**

Для того, чтобы увеличить плазмидную ДНК в количестве мы провели амплификацию методом ПЦР. Для этого в эппендорф с плазмидной ДНК добавили MgSO<sub>4</sub>, праймер, dNTP, деионизированную воду, буфер, ДНК полимеразу и поставили в ДНК амплификатор на 1 час. [1-2] (приложение 22)

### **3.7 Осаждение плазмидной ДНК [1,2]**

Добавили 600 мкл. 96% этанола, перемешали и центрифугировали в течение 10 мин при 12 тыс. об/мин. Надосадок вылили. Осадок промыли 96% этанолом (500 мкл. внесли в эппендорф и затем вылили), высушили при 65<sup>0</sup>С в твердотельном термостате и ресуспендировали в 20 мкл. деионизированной воды (приложение 23).

### **Электрофорез [1-15]**

(приложении 24).

4.1 Подготавливали к электрофорезу образцы исследуемой ДНК.

Для этого смешивали их с глицерином (5:1).

4.2 Осторожно внесли в лунки исследуемую и маркерную ДНК.

Для повышения точности определения размера маркерную ДНК нанесли по обе стороны от исследуемой.

4.3 Провели электрофорез.

Провели электрофорез при градиенте напряженности 1 – 10В на 1 см геля.

4.4 Просмотрели гель в УФ-свете на трансиллюминаторе и фотографировали (приложении 24).

### **Выводы:**

- 1) Изучены основные источники литературы и интернет-ресурсы по теме, а также выбрана подходящая методика выделения плазмидной ДНК.
- 2) Выращена колония бактерий рода *Bacillus*, следуя четким указаниям методики эксперимента.

3) Выделена плазмидная ДНК бактерий рода *Bacillus* для электрофоретического анализа, следуя четким указаниям методики эксперимента.

4) Проведен электрофоретический анализ выделенной плазмидной ДНК, следуя четким указаниям методики эксперимента.

**Практическая значимость:**

Данная работа позволяет углубить знания в области клеточной инженерии и получить практические навыки по выделению плазмидной ДНК, а также распространить полученный опыт на уроках биологии и курсах внеурочной деятельности.

**Список литературы:**

1. Аленушкина А.В. Медицинская микробиология: Учебное пособие - Ростов н/Д.: Феникс, 2003. – 480с.

2. Аникеев В.В. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / В.В. Аникеев, К.А. Лукомская. – Москва : Просвещение, 1983. – 128 с.

3. Асонов Н.Р. Микробиология: учебник. - М. : Колос : Колос-Пресс, 2002. – 351 с.

4. Бухарин, О.В. Механизмы выживания бактерий / О.В. Бухарин, А.Л. Гинцбург, Ю.М. Романова и др. – М.: Медицина, 2005. – 367с.

5. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология: учебник. - М.: Академия, 2006. – 461 с.

6. Девис Р., Ботстайн Д., Рот Дж. Генетика бактерий. М.: Мир, 1984. С. 88–94.

7. Калганова Т.Н. Практикум по микробиологии и биотехнологии: лабораторные работы / Т.Н. Калганова. – Южно-Сахалинск: СахГУ, 2011. – с. 56.

8. Клиническая лабораторная аналитика. Том 4. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории / под ред. В.В. Меньшикова. М.: Агат-Мед, 2003. - 816с.

9. Лысак В.В. Микробиология. – Минск: БГУ, 2007. – 429с.

10. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. - С. 9-25

11. Микроорганизмы: вирусы, бактерии, грибы : учеб. пособие. – Санкт-Петербург : изд-во «ЭЛБИ-СПб», 2003. – 147 с. - 98–106.

12. Нетрусов А.И. Общая микробиология : учебник для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – Москва : Академия, 2007. – 220 с.

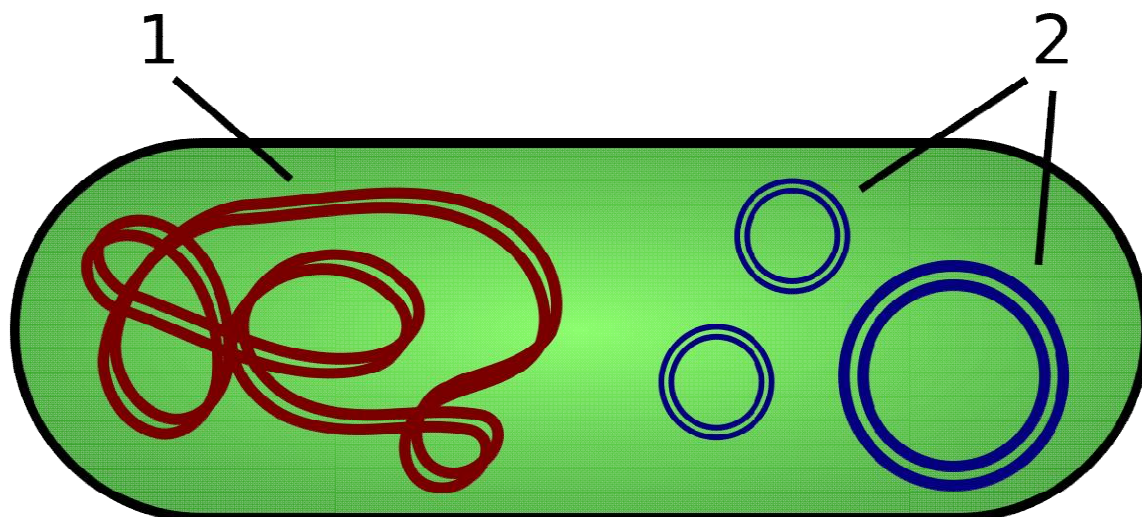
14. Пыльцев М.А. Введение в молекулярную медицину / М.А. Пыльцев // М.: Медицина. – 2004. – 496 с.

15. Фирсов Н.Н. Микробиология: словарь терминов. - М. : Дрофа, 2005. – 255 с.

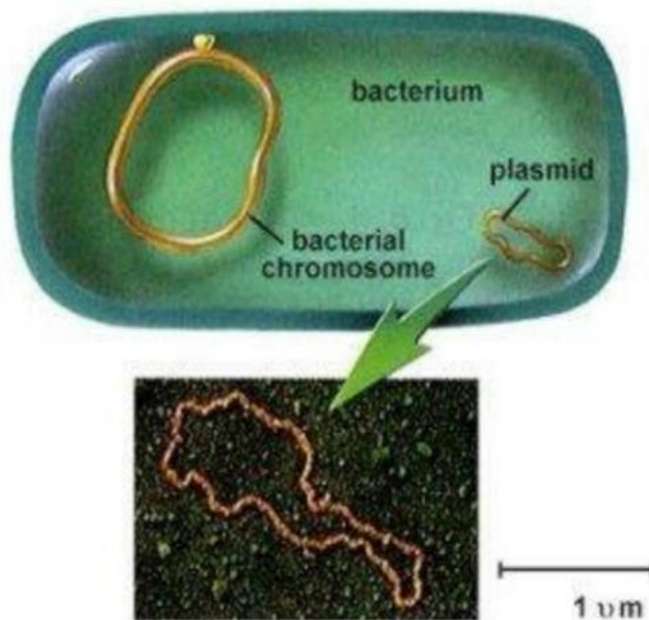
16. URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%BB%D0%B0%D0%B7%D0%BC%D0%B8%D0%B4%D1%8B>

Приложения:

Приложение 1 (плазмидная ДНК) [16]

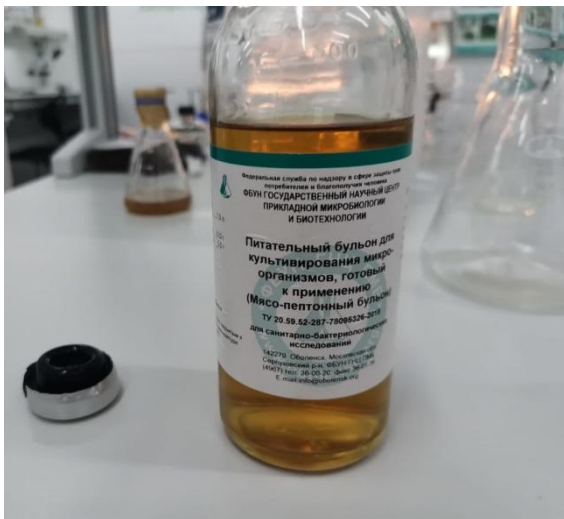


- 1- Геномная ДНК
- 2- Плазмидная ДНК

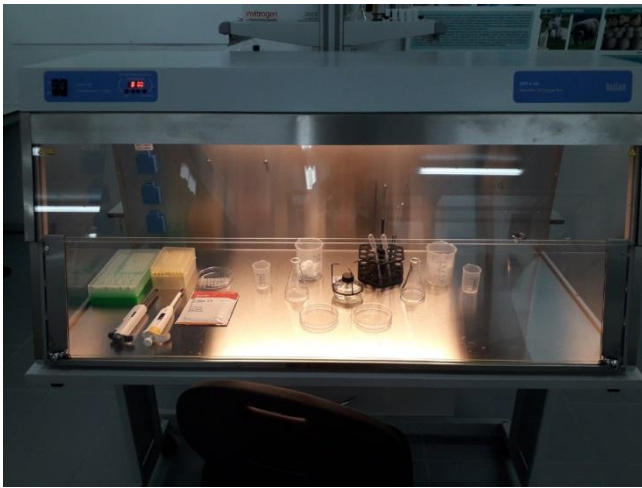


Приложение 2

Приготовление питательной среды



Приложение 3 (ламинарный бокс)



Приложение 4 (шейкер-инкубатор)



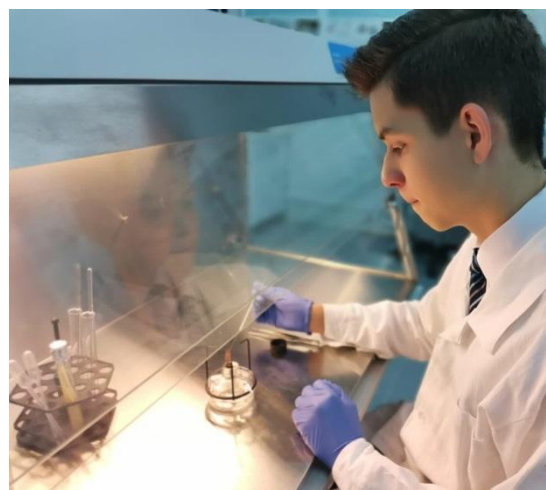
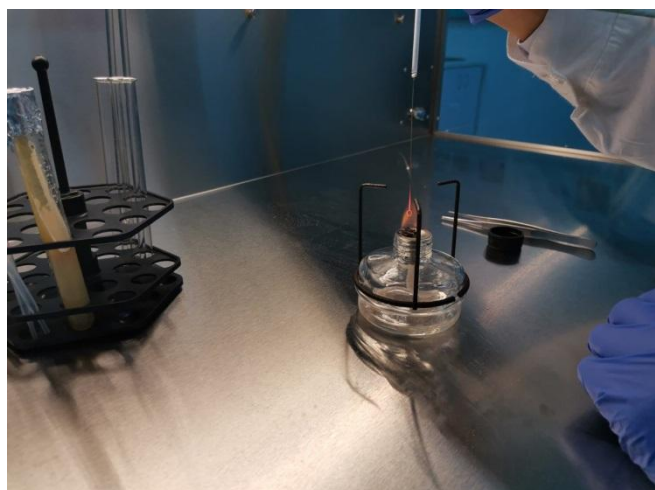
Приложение 5 (культивирование бактерий методом посева)



Приложение 6 (посев над пламенем спиртовки)



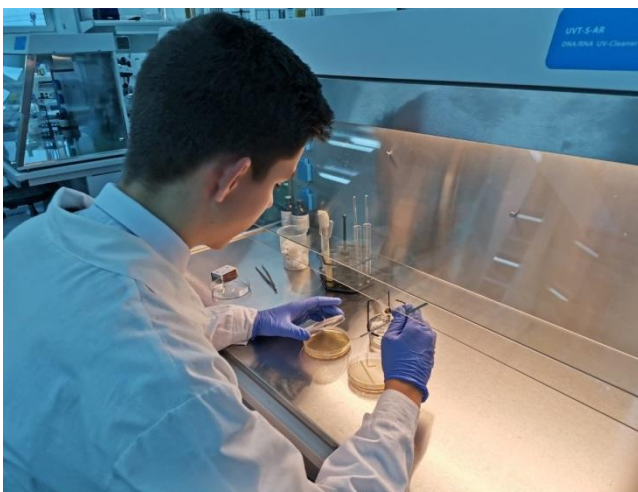
Приложение 7 (фламбирование бактериологической петли)



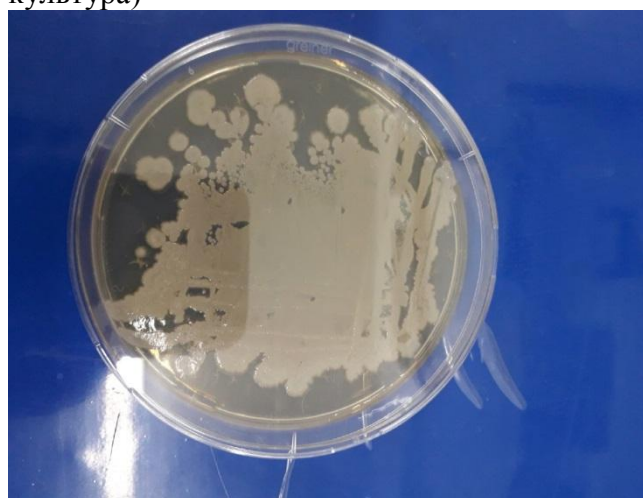
Приложение 8 (взятие микробной культуры)



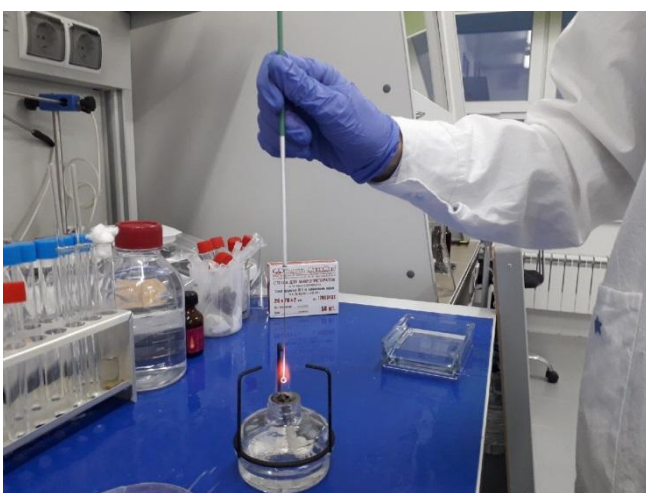
Приложение 9 (посев)



Приложение 10 (выросшая бактериальная культура)



Приложение 11 (нанесение культуры на предметное стекло)

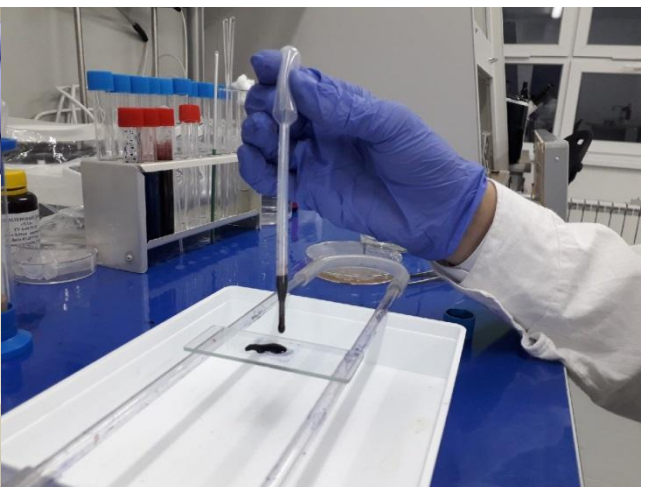




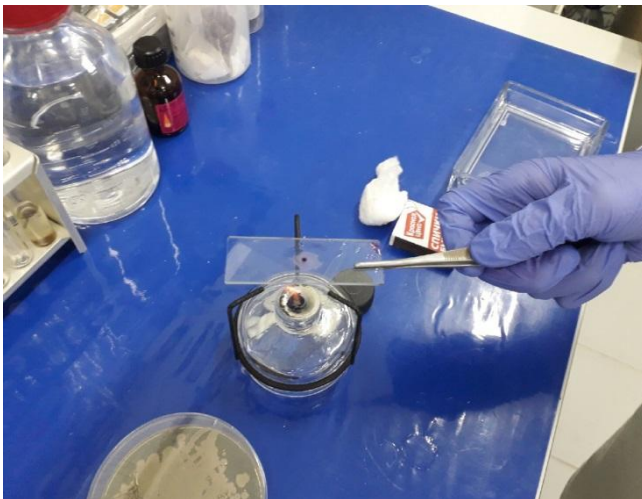
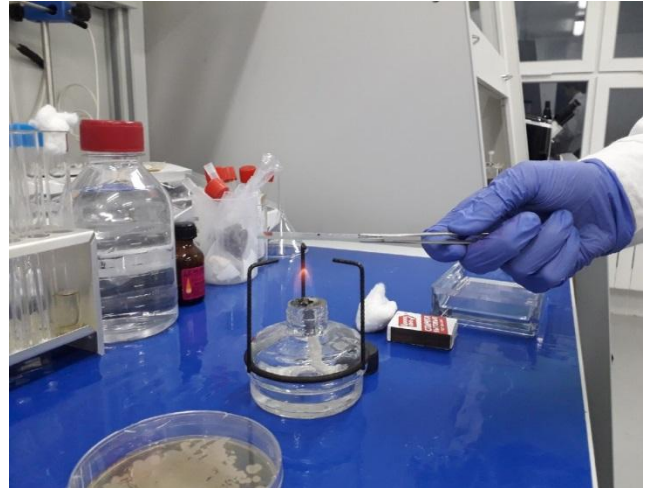
Приложение 12 (анилиновые красители)



Приложение 13 (окрашивание)



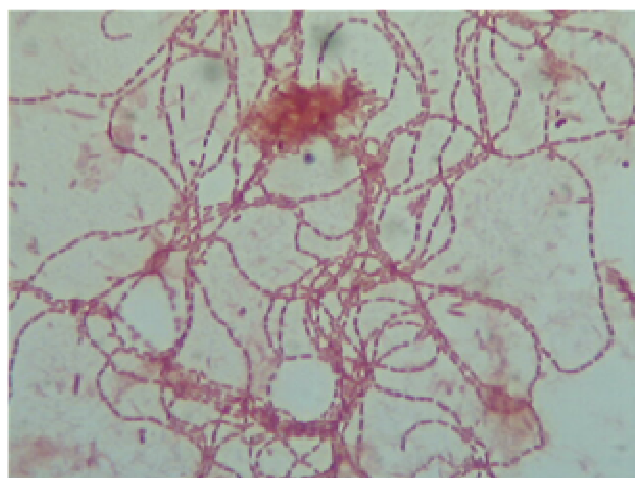
Приложение 14 (фиксация)

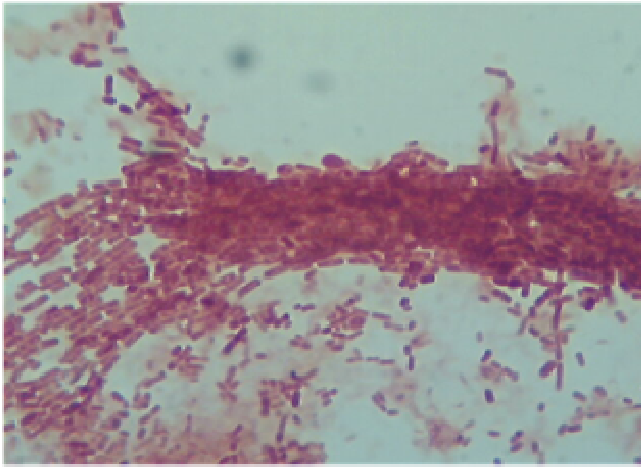


Приложение 15 (микроскопия)

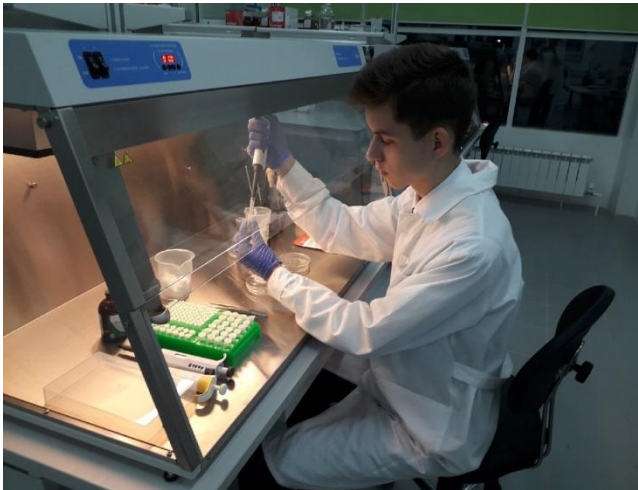


Приложение 16 (анализ)

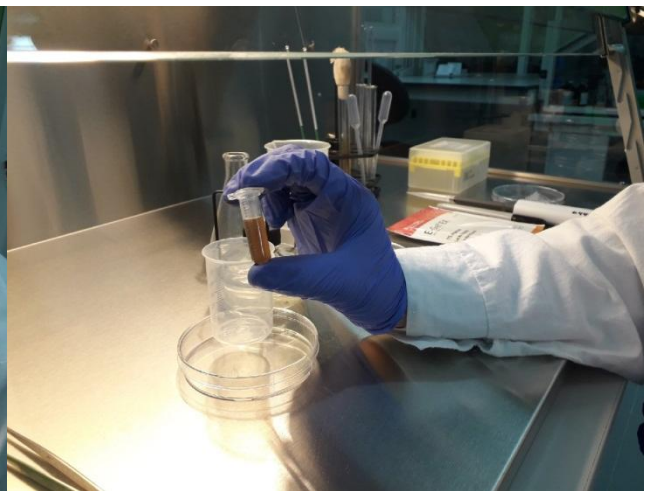
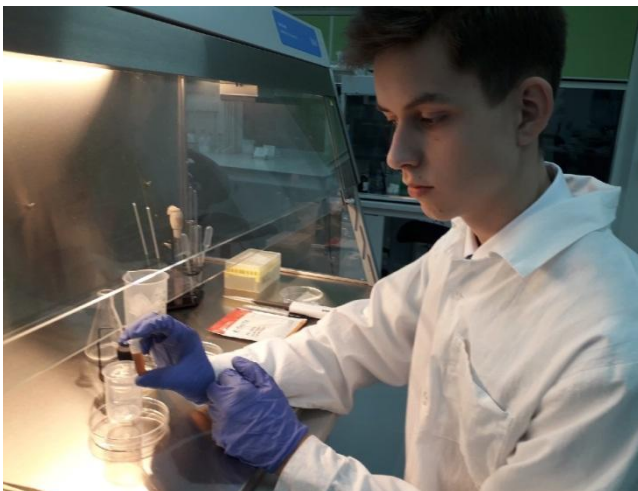




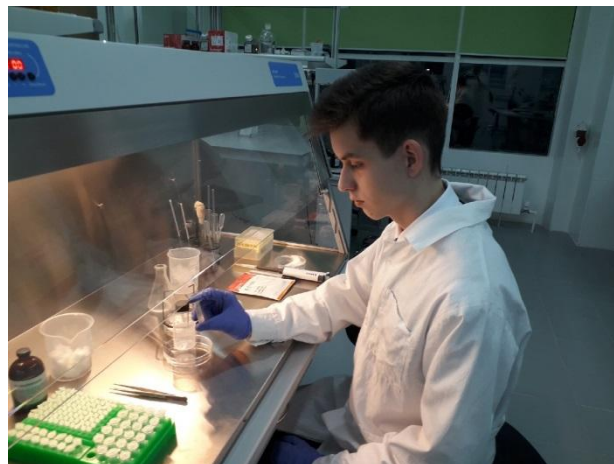
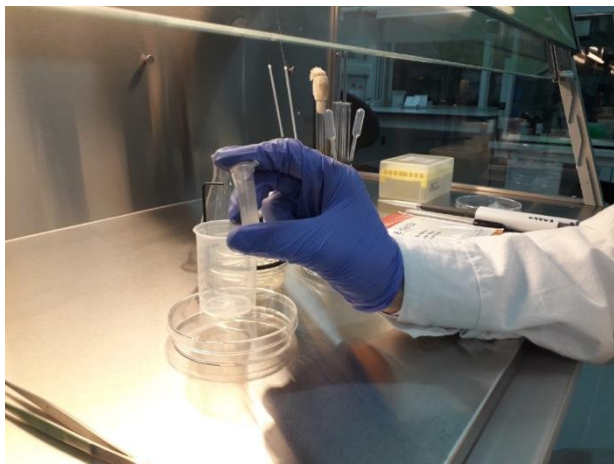
Приложение 17 (осаждение клеток)



Приложение 18 (разрушение клеточной стенки бактерий)

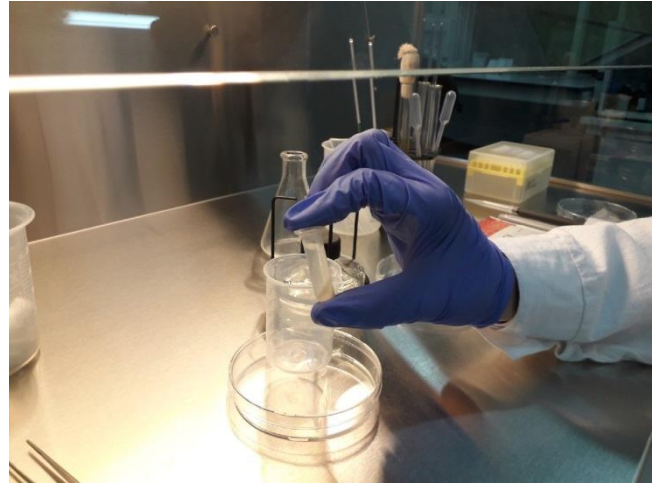


Приложение 19 (денатурация геномной ДНК и белков)



Приложение 20 (смена pH раствора)

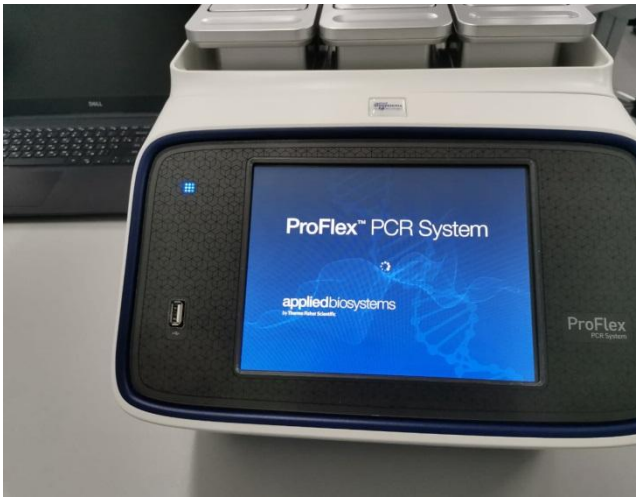




Приложение 21 (центрифугирование)







## Приложение 23 (осаждение плазмидной ДНК)



## Приложение 24 (электрофорез)

