

Муниципальное образовательное учреждение средняя школа
№ 124 Красноармейского района Волгограда

Областной конкурс юных исследователей окружающей среды

Номинация «Прикладная клеточная биология, биотехнология,
генетика и селекция»

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ТРАНСФОРМАЦИИ В МИКРОБИОЛОГИИ

Выполнили: **Бунеев Эльдар,**
Живков Виталий,
учащиеся 11 класса МОУ
СШ № 124, кружок
«Экологический следопыт»
Естественнонаучный РРЦ
Волгоградской области

Руководитель: *Подгузов Н.А.*,
учитель биологии МОУ СШ
№ 124,

Волгоград - 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1. Аналитический обзор литературы.	3
1.1. Из истории развития микробиологии.	3
1.2. Этапы развития трансформации у бактерий	4
2. ЭКСПЕРЕМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.	5
2.1. Генетическая трансформация.	5
2.2. Теоретические моменты содержания эксперимента.	6
2.3. Подготовка к эксперименту.	7
2.4. Ход работы.	7
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	12
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.	13
ПРИЛОЖЕНИЕ.	14

Введение.

Как свидетельствуют аналитические прогнозы, одними из самых прогрессирующих технологий нового тысячелетия будут биотехнологии. В них главными машинами служат живые микроскопические существа (бактерии, дрожжи, лучистые и плесневые грибы) и геновая инженерия. Опираясь на это, современная микробиология революционизирует медицинскую науку. С помощью микроорганизмов она создает новые предпосылки для открытия и производства лекарств, разработки новых видов и методов лечения, вакцин и диагностических методов в медицине. Биотехнологии находят свое применение и в других современных отраслях, таких, как в сельское хозяйство и экология. Кроме того, генные технологии основаны на методах микробиологии, молекулярной биологии и генетики, связанные с целенаправленным конструированием новых, не существующих в природе сочетаний генов. Способность измененной (рекомбинантной) ДНК управлять синтезом ферментов расширяет область применений микроорганизмов в биотехнологии. Появляется возможность производить многие ферменты при сравнительно их невысокой себестоимости [6].

К сожалению, тот материал о генетике, который находится в учебниках заметно устарел от новых тенденций и технологий в биологическом микромере. Кроме того, многие процессы и события, происходящие в современной генетике и микро- и молекулярной биологии, не заметны для человеческого глаза. И то, что невозможно увидеть, часто представляет проблему для тех, кто только начинает ее изучать.

Но существует решение этой проблемы: ген выделенный из биолюминисцентной медузы, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (Green fluorescent protein, GFP). После трансформации бактерии начинают экспрессировать полученный от медузы ген и производить GFP, в результате чего приобретают возможность светиться ярко-зеленым светом под ультрафиолетом [2,8]. Это позволяет визуально отслеживать выделенные таким образом штаммы бактерий.

Процессам идентификации в микробиологии и посвящена наша работа.

Целью работы является - трансформация бактерий геномом, кодирующим зеленый флуоресцентный белок (GFP).

При этом нами были поставлены следующие **задачи**:

- Познакомиться с литературой по биотехнологии и основами микробиологии;
- Освоить методику по трансформации бактерий Плазмидой pGLO;
- Ознакомить учащихся школы с современными достижениями молекулярной и микробиологии и возможностях использования их в биотехнологии.

Актуальность и практическая значимость данной работы заключается в том, что при микробиологических исследованиях часто очень трудно отличить одну колонию бактерий от других не только по виду, но даже и по классу. Необходимы сильные микроскопы, владение большими знаниями по классификации бактерий и пр. С помощью же такого идентификатора, как Плазмидой pGLO можно быстро и точно выделять или обнаруживать помеченную колонию бактерий, не используя микроскопы, другое сложное оборудование. И использовать как индикатор в различных микробиологических исследованиях.

Ожидаемые результаты: после трансформации, поскольку Плазида pGLO содержит ген GFP и ген устойчивости к антибиотику бактерии, в которые включили он был включен будут расти на среде с антибиотиком и светиться зеленым цветом в лучах УФ.

Методика – трансформация бактерий Плазмидой pGLO [4].

1. Аналитический обзор литературы.

1.1. Из истории развития микробиологии.

Люди используют микробиологические технологии уже несколько тысяч лет - пекут дрожжевой хлеб, производят спиртные напитки и кисломолочные продукты, занимаются

пивоварением. До сих пор производство пива остается одной из самых распространенных и масштабных микробиологических технологий: во всем мире производится около 1011 л пива в год. Опытным путем, эмпирически, люди придумали способы хранения и переработки ряда продуктов с помощью ферментации (брожения) - производство сыра, уксуса, соевого соуса, простейших лекарств, переработку отходов. Но наши предки не имели представления о процессах, лежащих в основе этих технологий.

В конце XIX в. благодаря трудам Л. Пастера было установлено, что процессы брожения осуществляют микроорганизмы. Его исследования послужили основой для создания в конце XIX и начале XX века промышленного бродильного производства органических растворителей: ацетона, бутанола и изопропанола [1]. Эти микробиологические технологии оказались неожиданным решением чрезвычайно острой проблемы, возникшей перед новыми отраслями химической промышленности - производством синтетического каучука, синтетических волокон, быстросохнущих лаков. Синтезировать эти вещества химическим путем долгое время не удавалось. Только в начале XX века появились микробиологические технологии получения некоторых органических кислот для пищевой промышленности и не только для пищевой. Так, в 20-е годы под руководством В.Н. Шапошникова был создан метод бактериального производства молочной кислоты, крайне необходимой для ослабленных и рахитичных детей[1].

В конце XIX века впервые была реализована микробиологическая технология, которая в настоящее время стала наиболее крупномасштабной в системе экологии окружающей среды - биологическая очистка сточных вод.

Важнейшим этапом в развитии микробиологических технологий, производящих ценные соединения, стала организация в конце 30-х - начале 40-х гг. XX века производства антибиотиков. Стимулом послужило открытие А. Флемингом хемотерапевтической активности пенициллина и его работы с Х. Флори и Э. Чейном по совершенствованию препарата и способа его получения. В настоящее время производство антибиотиков занимает среди микробиологических технологий первое место по объему продукции (~ на 2 млрд. фунтов стерлингов в год) [2].

Во второй половине XX века широкое распространение получило микробиологическое производство белка и аминокислот. В наибольших количествах - глютамата натрия (широко известного усилителя вкуса) и лизина, используемого в качестве пищевой добавки. В конце XX века основным поставщиком этой продукции на мировой рынок стали японские фирмы. С середины XX века с помощью микробиологических технологий получают витаминные препараты и ферменты для пищевой промышленности, медицины и сельского хозяйства. Микробиологические превращения стероидов используются в производстве кортизона, гидрокортизона и других глюкокортикостероидов, используемых для лечения заболеваний крови, при аддисоновой болезни, аллергических и аутоиммунных заболеваний, иммуносупрессий и пр., а также для производства половых гормонов, применяемых при гинекологических и андрологических заболеваниях и как пероральные противозачаточные средства [3].

Настоящий переворот - «экспансия микробиологических технологий» - наступил благодаря разработкам родившейся во второй половине XX века генной инженерии - конструированию микробиологической ДНК с встраиванием генов, кодирующих продукцию требующихся соединений. Таким путем был получен ряд ценных медицинских препаратов: интерферон, инсулин, гормон роста человека, вакцина против гепатита В. (см. т приложение 2)

1.2. Этапы развития трансформации у бактерий

В классическом определении трансформация бактерий заключается в переносе ДНК, выделенной из одних клеток, в другие. Для трансформации не требуется непосредственного контакта между двумя клетками. Способность ДНК проникать в клетку-реципиент зависит как от природы самой ДНК, так и от физиологического

состояния клетки-реципиента. Трансформирующей ДНК могут быть только высокомолекулярные двухцепочечные фрагменты, при этом проникать в бактериальную клетку может ДНК, выделенная из разных биологических источников, но включаться в геном - только ДНК с определенной степенью гомологичности. После того как экзогенный фрагмент ДНК, проникший в клетку, нашел гомологичный фрагмент ДНК клетки-реципиента, между ними происходит генетический обмен аналогично тому, как это имеет место на последнем этапе конъюгации [9].

Первый заслуживающий доверия случай наследственного изменения, возникшего в результате приобретения чужеродного генетического материала, был обнаружен у бактерии *Pneumococcus* — возбудителя пневмонии. Трансформация у *Pneumococcus* была открыта Гриффитом (Griffith) в 1928 г., а в 1944 г. Эвери, Мак-Леод и Мак-Карти (Avery, MacLeod, McCarty)* получили её *in vitro*. Все основные факты, связанные с этими открытиями, в настоящее время широко известны и будут здесь изложены кратко. Штаммы *Pneumococcus* различаются по свойствам клеточной поверхности, которая может быть гладкой или шероховатой, и степени вирулентности, связанной с типом поверхности. Эти различия наследуются. Если выращивать один штамм бактерий на стерильном экстракте, содержащем ДНК другого штамма, то некоторые дочерние клетки первого штамма приобретают свойства клеточной поверхности и вирулентность, характерные для второго штамма. Эти изменения передаются по наследству. Наследственные признаки штамма-донора передаются штамму-реципиенту через ДНК донора в стерильной ростовой среде (Avery et al., 1944*) [7].

Наследственные трансформации, вызываемые стерильными экстрактами, обнаружены и у бактерий других родов (*Haemophilus* и *Streptococcus*) и по другим признакам — по устойчивости к пенициллину и стрептомицину [9].

Трансформация у бактерий — явление, наблюдаемое в лаборатории. Её природный аналог — это трансдукция. Бактериальные вирусы, или фаги, в природных условиях иногда переносят генетический материал из одной бактериальной клетки в другую. Такой перенос бактериального генетического материала фагами называют трансдукцией.

Процесс трансдукции протекает следующим образом. Фаг заражает одну бактериальную клетку и размножается в ней за счет ДНК хозяина. Затем одна из дочерних фаговых частиц заражает другую бактериальную клетку и вносит при этом генетический материал первой клетки-хозяина во вторую клетку-хозяина. Наиболее успешно трансдукцию осуществляют умеренные фаги, которые не вызывают полного разрушения бактерий-хозяев. Трансдуцированные бактерии продолжают при этом свое существование и воспроизводят свои измененные признаки [5].

Генетическая трансформация используется во многих областях биотехнологии: в сельском хозяйстве для введения генов устойчивости к морозам, вредителям или гниению в растения, при восстановлении почв, когда в бактерии помещают ген, позволяющий им разлагать нефтяные пятна, наконец, в медицине, когда наследственные заболевания, вызванные дефектными генами, начинают лечить с помощью генной терапии, то есть трансформации больных клеток здоровыми генами.

2. Экспериментальная часть.

2.1. Генетическая трансформация

Ген — это часть ДНК, который содержит в себе инструкции как сделать определенный белок (кодирует белок). Этот белок наделяет организм каким-либо признаком. Генетическая трансформация буквально означает «изменение, вызванное генами» и выражается в помещении нового гена в организм, для того, чтобы изменить признаки этого организма.

У нас уже был опыт работы по молекулярной генетике: мы проводили опыты по выделению ДНК из слизистой оболочки рта. Кроме того, в рамках Областного

экологического форума мы проводили мастер класс по этой методике для участников форума: детей и педагогов (фото, Приложение 2.).

В данной работе мы трансформировали бактерии геном, кодирующим зеленый флуоресцентный белок (Green Fluorescent Protein, GFP). Этот ген исходно выделен из биолюминисцентного организма – медузы *Aequorea victoria*. Благодаря зеленому флуоресцентному белку, медуза флуоресцирует и светится в темноте. Пройдя через процедуру трансформации, бактерии экспрессируют приобретенный ген медузы и производят белок, благодаря которому начинают светиться ярко-зеленым под ультрафиолетом [8].

Мы использовали методику перемещения генов из одного организма в другой с помощью плазмид. Плазмиды –это маленькие кольцевые молекулы ДНК, которые часто содержатся в клетках бактерий в дополнение к их основным хромосомам. Плазмиды обычно дают бактериям какие-то полезные для выживания признаки. В природе плазмиды быстро передаются от одной бактерии к другой, благодаря чему бактерии обмениваются «полезными» признаками и приспосабливаются к новой среде обитания [4]. Например, возрастающая устойчивость бактерий к антибиотикам во многом связана с перемещением плазмид.

Плаزمида pGLO кодирует гены зеленого флуоресцентного белка и белка, дающего устойчивость к антибиотику ампициллину – бета-лактамазы. pGLO также содержит специальную систему регуляции работы генов, которая контролирует экспрессию GFP в трансформированных клетках. Ген GFP можно «включить», добавив в питательную среду, на которой растут клетки, сахар арабинозу. Отбор трансформированных клеток, получивших плазмиду, осуществляется с помощью выращивания на чашках, содержащих ампициллин. Трансформированные клетки будут белыми на чашках, не содержащих арабинозу и будут зелеными под УФ-светом на чашках с арабинозой [4].

2.2. Теоретические моменты содержания эксперимента.

Питательная среда. Жидкая и агаризованная среда LB (Лурия-Бертани) сделана из дрожжевого экстракта и гидролизата мясных субпродуктов и представляет собой смесь углеводов, аминокислот, нуклеотидов, солей и витаминов, необходимых для роста бактерий. Агар, который производится из водорослей, расплавляется при нагревании, а когда остывает, образует твердый гель, напоминающий желе. Он функционирует в качестве подложки, на которой растут бактерии

Отбор на устойчивость к антибиотикам. Плазмида pGLO, содержащая ген зеленого флуоресцентного белка, также содержит ген бета-лактамазы, фермента, дающего бактериям устойчивость к антибиотику ампициллину. Бета-лактамаза производится и выбрасывается наружу бактериями, содержащими плазмиду. Секретированная бета-лактамаза инактивирует ампициллин, что позволяет только трансформированным клеткам расти в его присутствии

Трансформационный раствор. Считается, что двувалентные катионы (Ca^{2+}) в составе трансформационного раствора (50 mM $CaCl_2$, pH 6.1) нейтрализуют взаимно отталкивающие отрицательные заряды фосфатных групп ДНК и фосфолипидов клеточной мембраны, что позволяет ДНК легче входить в клетки.

Тепловой шок. Тепловой шок повышает проницаемость клеточной мембраны для ДНК. Точный механизм этого явления не известен, однако для каждого используемого штамма бактерий и условий трансформации подбирается оптимальное время теплового шока.

Период восстановления. 10-минутный период восстановления, следующий за добавлением среды LB, необходим клеткам, чтобы оправиться от шока и начать экспрессировать ген устойчивости к ампициллину, бета-лактамазу, необходимый для того, чтобы трансформированные клетки смогли выживать на чашках с антибиотиком.

Можно инкубировать клетки дольше, от часа до 16 ч при 37°C или при комнатной температуре; это более чем в 10 раз увеличит эффективность трансформации. Не забывайте периодически перемешивать клетки в пробирке, чтобы они не оседали на дно.

2.3. Подготовка к эксперименту.

Оборудование:

Стартовая чашка E. coli (LB)
 Залитые чашки (1 LB, 2 LB/amp, 1 LB/amp/ara)
 Микробиологические петли
 Среда LB (аликвота), Раствор плазмиды pGLO
 Раствор для трансформации (аликвота)
 Пипетки, микроцентрифужные пробирки
 Контейнер со льдом/снегом
 Микроцентрифужные пробирки
 Плавающий штатив для микроцентрифужных пробирок
 Установленная на 42°C водяная баня с термометром
 Микропипетки на 2-20 мкл и наконечники к ним
 УФ-лампа

Меры безопасности выполнялись в соответствии с нормами (Приложение 1)

Последовательность работы

Что нужно сделать	Когда
Залить чашки с агаром	За 3-7 дней до начала работы
Растворить E. Coli. Посеять «стартовые» чашки. Растворить плазмидную ДНК pGLO	За 24-36 часов
Приготовить аликвоты растворов Приготовить рабочее место	Перед экспериментом

2.4. Ход работы.

Чашки с агаризованной средой заливались за три дня до начала использования. Метод приготовления агара (см. Приложение 2., рис.1)

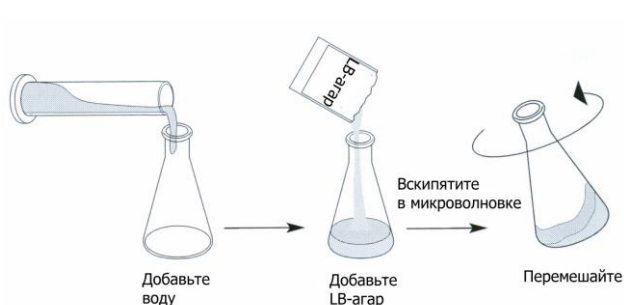


Рис.1



Рис.2

Далее приготавливали растворы арабинозу и ампициллин. Стерильными пипеткой добавляли по 3 мл трансформационного раствора прямо во флакон с ампициллином и арабинозой (рис.2).

Ампициллин это антибиотик, ингибирующий рост бактерий, которые могут быть занесены в культуру из окружающей среды.

Арабиноза это сахар, индуцирующий производство зеленого флуоресцентного белка в клонированных клетках.

Приготовили и подписали чашки Петри нестираемым фломастером

4 чашки «LB» для

4 «LB/amp»

2– «LB/amp/ara». и оставляли до остывания.

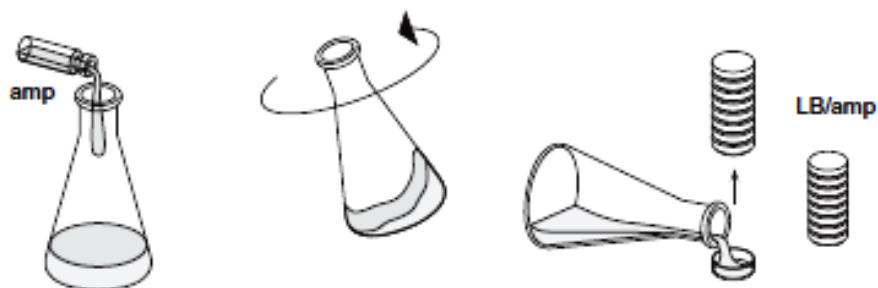


Рис.3

Заливали LB-агаром в 4 чашки подписанные «LB» (рис.3). Затем, добавляли раствор ампициллина к оставшемуся агару. Перемешивали и заливали таким же образом, как описано выше, 4 чашек ,подписанных «LB/amp»

Наконец, добавляли раствор арабинозы к агару, уже содержащему ампициллин. Перемешивали и заливали в оставшиеся 4 чашек, обозначенных «LB/amp/ara».

Оставляли чашки Петри до высыхания при комнатной температуре.

Далее, приготавливали лиофилизированный штамм бактерий *E. coli* HB101. (рис.4)

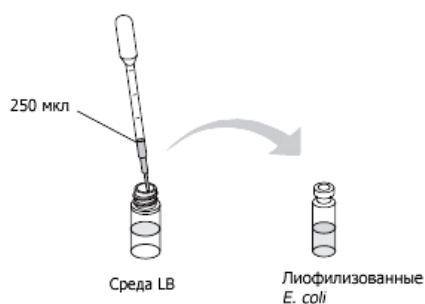


Рис.4



Рис. 5.

На следующие сутки рассеивали бактерии штрихом по «стартовым» чашкам.

Используя полученную на предыдущем шаге бактериальную суспензию, засеивали 2 «LB» чашки штрихом. Цель рассеивания штрихом – развести бактериальную суспензию до отдельных клеток, которые дадут отдельные колонии на чашке.

Первый штрих, нанесенный в углу чашки разбавляет клетки. Проводили несколько штрихов в той же части чашки. Стараясь не повредить поверхность агара. Для следующих штрихов использовали как можно большую поверхность чашки. Последовательно поворачивали чашку под углом 45° и делали последующие штрихи (рис.5).

Переворачивали чашки и оставляли на 2 дня .на столе при комнатной температуре.

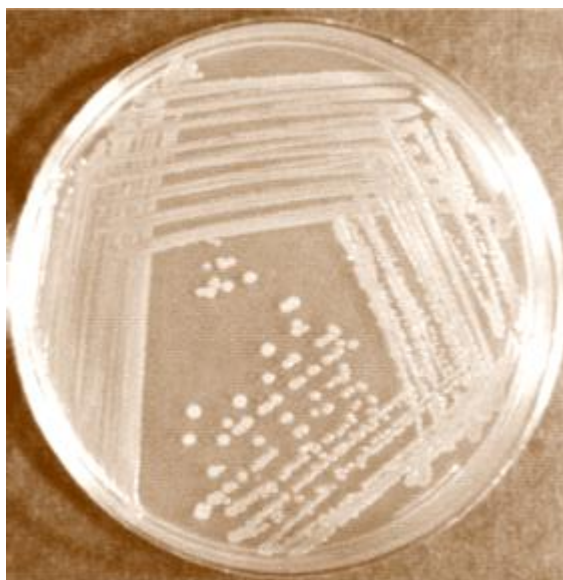


Рис.6. Колонии бактерии *E. Coli* на питательной среде LB.

За это время бактерии *E. coli* образовали желтовато-белые колонии круглой формы с гладкими краями (рис.6).

После того, как колонии образовались, мы приготовили раствор плазмиды pGLO (250 мкл трансформационного раствора добавляли во флакон с сухой плазмидой). Рассматривая раствор плазмиды pGLO под ультрафиолетом, видели зеленое свечение, что говорит о наличии флуоресцентного белка (Приложение 6.)

Непосредственно перед началом главного этапа работы приготавливали порции растворов для трансформации: по 1 мл растворов CaCl₂ и LB.

Две микроцентрифужны пробирки надписывали - на одной +pGLO, на другой -pGLO, Чистой одноразовой пипеткой добавляли по 250 мкл раствора для трансформации (CaCl₂) в каждую пробирку. Пробирки в крошенный лед или снег.

С помощью стерильной петли, брали одну колонию с нашей «стартовой» чашки. и погружали петлю в трансформационный раствор пробирку «+pGLO». Покручивали петлю, чтобы вся колония равномерно размешалась в буфере. Далее ставили пробирку обратно на лед. Затем брали новую петлю и повторяли процедуру для пробирки «-pGLO» (рис.7).

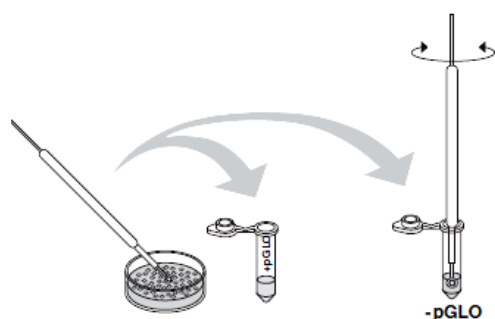


Рис.7

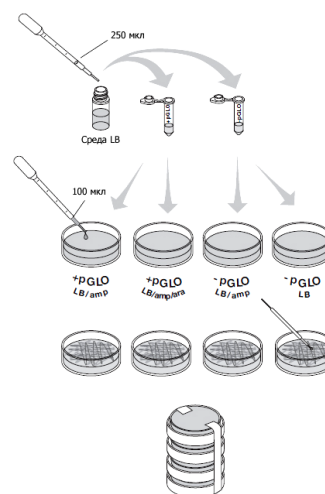


Рис.8

С помощью микропипетки, добавляли 10 мкл раствора плазмиды в пробирку «+pGLO». В пробирку «-pGLO» плазмиду не добавляли. Охлаждали пробирки на льду в течение 10 минут.

За это время приготавливали четыре чашки с надписями:

«+pGLO LB /amp»

«+pGLO LB /amp/ara»

«-pGLO LB /amp»

«-pGLO LB»

Следующая операция – это тепловой шок. Пробирки быстро переносили из льда на нагретую до 42°C водяную баню на 50 секунд и потом обратно на лед (0°C), подержав пробирки на льду две минуты.

Далее мы добавили по 250 мкл питательной среды LB в каждую из пробирок +pGLO и –pGLO и используя новые стерильные пипетки для каждой пробирки, наносили полученную суспензию по 100 мкл на каждую чашку:

из пробирки +pGLO на чашки «+pGLO LB /amp» и «+pGLO LB /amp/ara»,

а из пробирки –pGLO на чашки «-pGLO LB /amp» и «-pGLO LB» Полученные образцы – чашки Петри оставляли на столе (рис.8).

Через сутки смотрели результаты нашего эксперимента.:

- На обеих чашках с плазмидой pGLO (LB/amp/ara и LB/amp) были множественные колонии (~70).
- На чашке LB/amp/(-)pGLO колоний не обнаружено.
- На чашке LB/(-)pGLO был практически сплошной слой бактерий.

Бактерии на чашках (+)pGLO LB/amp и (-)pGLO/LB были белыми или светло желтого оттенка. В лучах под ультрафиолетом не светились а окрашивались в фиолетовые тона.

Бактерии на чашке (+)pGLO LB/amp/ara также были белыми или слегка зеленоватыми при обычном освещении, но светились ярко-зеленым под ультрафиолетом.

Посчитав число колоний на каждой чашке (число отдельных точек) получили следующие результаты:

Чашка	Наблюдения
+pGLO, LB/amp	Много колоний трансформированных бактерий. (~75). Колонии белые
+pGLO, LB/amp/ara	Много колоний трансформированных бактерий. (~75). Колонии кажутся белыми при обычном освещении, но светятся ярко-зеленым под УФ
-pGLO, LB/amp	Нет роста бактерий
-pGLO, LB	Сплошной желтовато-белый слой бактерий, количество колоний посчитать невозможно.

В результате трансформации у E. coli Какие изменились признаки. Эти признаки и результаты наблюдений, позволяют подвести итоги данного эксперимента:

Признак	Анализ наблюдений
Цвет	Колонии на чашке LB/amp/ara светятся зеленым под ультрафиолетом
Устойчивость к ампициллину	Трансформированные клетки могут расти в присутствии ампициллина

Если генетически трансформированные клетки приобрели устойчивость к антибиотику ампициллину, то можно предположить о генах, находящихся на плазмиде Исходя из наших результатов, мы можем заключить, что наблюдаемые нами изменения являются

следствием проведенной нами процедуры - трансформации бактерии *E.coli* Плазмидой pGLO.

Выводы.

Сравнивая опыт (+pGLO) с контролем (-pGLO) можно сделать следующие выводы:

- Бактерии не получившие плазмиду, растут на среде LB без антибиотика.
- Если бактерии растут на среде с ампициллином, значит, они устойчивы к нему. Плазида содержит ген устойчивости к ампициллину, это ген *bla*, кодирующий белок бета-лактамазу, разрушающий ампициллин.
- Если колонии не растут, значит, эти бактерии чувствительны к ампициллину. Клетки, которые не получили плазмиду (-pGLO) не могут расти на ампициллине, тогда как, клетки, содержащие плазмиду (+pGLO) могут расти на чашках LB/amp. Таким образом, плазида придает клеткам устойчивость к ампициллину.
- Подтверждение происшедшей трансформации является зеленый флуоресцентный белок (GFP), который стал вырабатываться бактериями в результате успешной трансформации.

Заключение.

Часто внешние признаки организма являются проявлением взаимодействия генов с конкретными условиями окружающей среды. Так сахар арабиноза, присутствующий в наших опытах, необходим для того, чтобы включить экспрессию гена зеленого флуоресцентного белка. Ультрафиолет необходим, чтобы зеленый флуоресцентный белок в клетках бактерий начал светиться. Эти факторы могут использоваться в других исследовательских работах, когда необходимо выделить группу бактерий с определенными признаками. И таким способом идентификации может служить трансформация плазмиды pGLO нужным штамм бактерий.

Корме полученных результатов наша работа показала нам и учащимся школы, каких успехов достигла современная биотехнология, ее возможности в различных областях микробиологии, молекулярной биологии, генетики и непосредственно в реализации этих достижений в медицине, сельском хозяйстве, экологии и других отраслях.

Благодаря данной работы мы освоили новый современные методы экспериментальной биологии, которые в дальнейшем можем использовать в других исследованиях и учебе.

В области биотехнологии в университетах готовят специалистов по следующим направлениям: биохимия и биотехнология, агробиотехнология (сельскохозяйственная биотехнология), биоинженерия, биомедицина, биоинформатика, биология и химия. Обогатив знания и освоив современные методики, в дальнейшем можно с успехом как в академической сфере, занимаясь фундаментальными исследованиями, так и на биотехнологических предприятиях. Биотехнология сегодня - не отдельный сектор, а универсальная технологическая платформа со множеством приложений во многих современных отраслях науки и техники.

Выражаем благодарность Лапиной Анне Васильевне, к.б.н., сотруднику кафедры микробной экологии Венского университета, бывшему м.н.с. института молекулярной генетики РАН за консультации в ходе проведения работы и предоставлении необходимых реактивов.

Используемая литература:

1. Ассонов Н.Р. Микробиология. – М.: Колос, 2007.
2. Биотехнология. Учебное пособие под редакцией А.В. Катлинского. Издательство «Академия» 2008 <http://www.twirpx.com/files/biology/microbiology>
3. Карпенков С. Концепции современного естествознания: Учебник для вузов. М., Академический проспект. 2000.
4. Методика трансформации бактерий Плазмидой рGLO. Издательство лаборатории Института молекулярной генетики РАН. 2011г.
5. Теппер Е.З. Шильникова В.К. Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии Учебное пособие для ВУЗов. "Дрофа" 2004 г. <http://bio-x.ru/books/praktikum-po-mikrobiologii-tepper>
6. Юрченко В.А. Микробиологические технологии – экологическая альтернатива химизации сельского хозяйства. // Надежда планеты, 2001, №3, с. 3-5.

Данные Интернет:

7. <http://www.twirpx.com/files/biology/microbiology> Курс лекции по предмету Микробиология ДОС «Методы выделения чистых культур и определение (идентификация) вида бактерий».
8. http://www.novustrend.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1433&catid=117&Itemid=29 Биотехнология: современные аспекты. Крысько Д. й, доктор медицинских наук.
9. <http://theoryandpractice.ru/presenters/4605-konstantin-severinov> Лекции Константина Северинова, доктора биологических наук, заведующего лабораторией Института молекулярной генетики РАН, профессора Университета Ратгерса в США «Реформа науки как путь к спасению или имитация деятельности», «Новые направления преподавания биологии» «Наследственность у бактерий: от Ламарка к Дарвину и обратно».

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1.

ВОПРОСЫ БЕЗОПАСНОСТИ

Штамм *Escherichia coli* HB101 K-12 входящий в состав этого набора это не патогенный микроорганизм (в отличие от штамма *E. coli* H157:07 иногда вызывающего пищевые отравления). HB101 K-12 генетически модифицирован так, чтобы расти только на специальной обогащенной среде. Тем не менее, обращение с этим штаммом требует соблюдения стандартных микробиологических процедур. Эти процедуры включают в себя следующее: раз в день или при разлитии биологического материала все рабочие поверхности обеззараживаются; все зараженные жидкие или твердые отходы обеззараживаются перед утилизацией; все ученики и преподаватели должны мыть руки после каждого контакта с содержащего бактерии материалом и перед выходом из лаборатории. Все процедуры должны выполняться аккуратно, чтобы не вызывать возникновения аэрозолей. Для пользования пипеткой должны применяться механические устройства, набирать растворы ртом запрещено. Запрещено есть, пить, курить и пользоваться косметикой в рабочем помещении. Рекомендуется использование защитных очков и перчаток.

При отсутствии автоклава, все растворы и принадлежности (петли и пипетки), входившие в контакт с бактериями, помещаются по меньшей мере на 20 мин в 10% раствор хлорки для стерилизации. Ванночка с таким раствором должна стоять в каждом рабочем помещении. Все использованные петли и пипетки должны быть собраны для стерилизации. Для стерилизации чашек Петри они покрываются сверху 10% раствором хлорки и выдерживаются как минимум час, после этого жидкость выливается в канализацию, а чашки заворачиваются и далее рассматриваются как обычный мусор. При работе с раствором хлорки рекомендуется использование защитных очков.

Ампициллин может вызывать аллергические реакции или раздражение глаз, дыхательных путей и кожи. В случае попадания в глаза, немедленно промойте их большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью. Используйте подходящие средства защиты. Ампициллин является антибиотиком семейства пенициллина, если у кого-то есть аллергия на пенициллин или на другой пенициллиновый антибиотик, он должен избегать контакта с ампициллином.

Более подробную информацию и данные по безопасности (MSDS) для компонентов набора можно узнать на сайте компании www.bio-rad.com. Используйте ваши местные законы и нормативы для правильной утилизации отходов.

УФ лампа

Ультрафиолетовое излучение может вызывать ожоги глаз и кожи. Коротковолновое УФ-излучение более опасно, чем длинноволновое. Используйте длинноволновую УФ лампу для этой работы. Если возможно, используйте защитные очки, не пропускающие УФ (обычное кварцевое стекло также задерживает УФ).

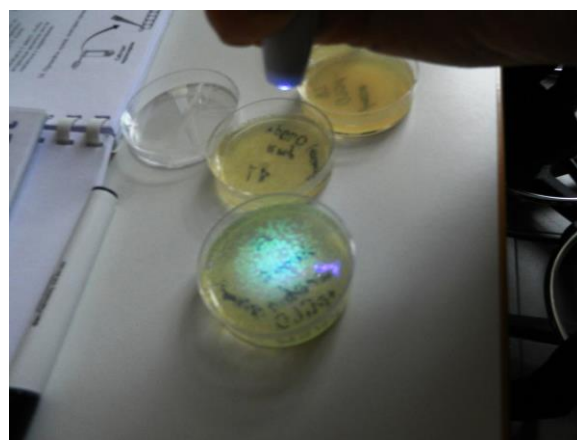
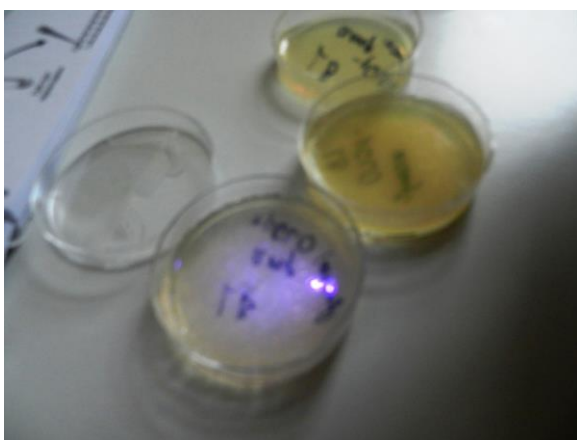
Приложение 2

Фотографии 1-2 Во время проведения работы.



Фото 3-5. Колонии бактерий в луча УФ

1. - pglo
2. +pglo



ПРИЛОЖЕНИЕ 3. СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Агар Полисахарид, добываемый из водорослей. При добавлении в питательную среду делает ее плотной как желе и она может служить опорой для роста бактерий.

Арабиноза Сахар, который бактерии используют в качестве одного из источников пищи

Бактериальная библиотека Совокупность клеток *E. coli*, трансформированных рекомбинантными векторами, несущими в качестве вставок все возможные гены некоторого организма.

Бета-лактамаза Белок, дающий устойчивость к антибиотику ампициллину. Производится и секретируется бактериями, содержащими плазмиду с геном bla. Бета-лактамаза расщепляет ампициллин, содержащийся в среде, и позволяет получившим плазмиду клеткам расти.

Библиотека ДНК ДНК, выделенная из клетки любого организма, может быть порезана на куски, а эти куски все вместе помещены в плазмиды, так что одна плазида содержит один кусочек исходной ДНК. Таким образом, создается популяция рекомбинантных плазмид. Далее эти плазмиды помещаются в бактерии, причем внутрь каждой клетки попадает одна-единственная плазида, которая потом многократно копируется. Таким образом, все клетки содержат одинаковую ДНК вектора, но разные ДНК «вставок». Если исходная ДНК была порезана на 1000 кусков, образовалось 1000 рекомбинантных молекул и 1000 трансформированных клеток, каждая из которых содержит 1 кусочек исходной ДНК. Такой набор клеток называется библиотекой ДНК. Интересующие нас участки могут быть найдены в библиотеке с помощью соответствующих проб (комплементарных молекул ДНК)

Биотехнология Применение биологических знаний к окружающему миру, манипулирование живыми организмами и изменение свойств на генетическом уровне для получения полезных продуктов.

Вектор Молекула ДНК, способная автономно реплицироваться (воспроизводиться) в клетках-хозяевах, в которую были встроены чужеродные фрагменты ДНК (например, плазида)

Генетическая инженерия Манипулирование генетическим материалом организма путем введения или удаления отдельных генов.

Зеленый флуоресцентный белок (Green Fluorescent protein, GFP) GFP был первоначально выделен из медузы *Aequorea victoria*. Ген зеленого флуоресцентного белка был выделен и клонирован. GFP обладает уникальной пространственной структурой, позволяющей ему флуоресцировать (поглощать ультрафиолет и испускать поглощенную энергию в виде яркого зеленого света)

Клонирование Когда одна клетка митотически (без участия полового процесса) делится, она дает начало генетически идентичной (клональной) популяции клеток. Клонирование – процесс создания такой популяции. Для клонирования отдельного гена соответствующую ДНК вводят в плазмиду, которой трансформируют бактерии. Для того, чтобы отобрать трансформированные бактерии, в плазмиды вводят ген устойчивости к антибиотику, например ампициллину, в присутствии которого погибают все бактерии, не имеющие клонируемой плазмиды. Размножаясь, бактерии многократно увеличивают количество ДНК.

Колония Потомство одной бактерии, генетически идентичные бактериальные клетки, выросшие на чашке. Так как все клетки в составе колонии генетически идентичны, все они являются клонами.

Отбор на устойчивость к антибиотикам Плазида, используемая для того, чтобы перенести нужный ген в бактерию, также содержит ген бета-лактамазы, дающий устойчивость к антибиотику ампициллину. Белок бета-лактамаза производится и

секретируется наружу получившими плазмиду бактериями. Этот фермент расщепляет присутствующий в среде LB/amp ампициллин и позволяет бактериям расти. Таким образом, несмотря на то, что очень небольшой процент бактерий принимает в себя плазмидную ДНК в процессе трансформации, на среде с антибиотиком выживают только они, остальные погибают.

Питательная среда Жидкая и агаризованная среда LB (Лурия-Бертани) сделана из дрожжевого экстракта и гидролизата мясных субпродуктов и представляет собой смесь углеводов, аминокислот, нуклеотидов, солей и витаминов, необходимых для роста бактерий. Агар, который производится из водорослей, расплавляется при нагревании, а когда остывает, образует твердый гель, напоминающий желе. Он функционирует в качестве подложки, на которой растут бактерии.

Плазида Кольцевая молекула ДНК, способная автономно реплицироваться, содержащая один или несколько генов устойчивости к антибиотикам.

Плазида pGLO Плазида, содержащая ген зеленого флуоресцентного белка и ген устойчивости к ампициллину (бета-лактамазу)

Посев Процесс, когда вы проводите петлей по агару или опускаете ее в жидкую среду, чтобы перенести туда бактерий.

Регуляция работы генов Работа генов у всех живых организмов тщательно регулируется, чтобы оптимально приспособлять обмен веществ к постоянно меняющимся условиям окружающей среды и не допускать излишнего производства ненужных в данный момент белков. Хорошими примерами являются гены, отвечающие за поглощение и переработку пищи. Например, сахар арабиноза может быть использована бактериями в качестве источника энергии и углерода. Если арабинозы в окружающей среде нет, ферменты, отвечающие за ее переработку в клетке не производятся, соответствующие гены молчат. Белки, необходимые для катаболизма арабинозы начинают синтезироваться только при наличии этого сахара в среде. Когда она «съедается» и заканчивается, гены вновь выключаются. См. приложение D для более детального описания того, как арабиноза регулирует экспрессию зеленого флуоресцентного белка.

Скрининг Процесс идентификации нужных бактерий в библиотеке

Техника стерильной работы Техника работы, при которой минимизирована вероятность заражения образцов бактериями из окружающей среды. (См. Приложение B)

Технология рекомбинантной ДНК Процесс разрезания и сшивания разных молекул ДНК друг с другом, с целью выделения нужных генов или их изменения.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

ТЕХНИКА СТЕРИЛЬНОЙ РАБОТЫ

Выполняя любые микробиологические эксперименты, важно не занести бактерий из внешней среды. Так как бактерии находятся везде – на кончиках пальцев, на поверхности стола, в воздухе и т.п. важно минимизировать контакт образцов с окружающей средой. Когда ученики работают с петлями, пипетками или чашками Петри, вы должны подчеркнуть, что к кончику петли, носику пипетки или поверхности чашки нельзя прикасаться ни при каких обстоятельствах. Несмотря на то, что небольшое загрязнение вряд ли сильно повлияет на этот эксперимент, привычка к чистой работе в будущем пригодится ученикам. Использование стерильной техники это так же и вопрос человеческого здоровья и гигиены.

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

ОСНОВНЫЕ КОНЦЕПЦИИ И ТЕРМИНОЛОГИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Исследования живого мира показали, что все живые организмы передают точную схему своего строения потомству. Самая маленькая единица живого, способная к самовоспроизводству, это клетка. Например, многие бактерии способны существовать как отдельные клетки. Химические молекулы, из которых состоят клетки вместе выполняют согласованную работу.

Клетки могут быть выращены в культуре и собраны

Клетки могут быть отобраны из природы и выращены в специальных условиях в лаборатории. Для роста клеток им нужна определенная среда и питательные вещества. Бактерии и дрожжи очень просто вырастить в культуре. Клетки растений и животных тоже можно вырастить, но это сложнее сделать. После того как культура клеток выросла, клетки можно собирать и изучать.

Клонирование

Когда одна клетка делится митотически, все ее потомство генетически идентично. Такая популяция клеток называется «клональной». Процесс создания клональной популяции называется «клонированием». Цель посева бактерий на агар – вырастить отдельные колонии клеток, каждая из которых происходит из одной единственной клетки.

Внутри клетки

Каждая молекула внутри клетки выполняет свою функцию. Например, ДНК сохраняет информацию (как жесткий диск компьютера), а белки это «рабочие лошадки» клетки. Для того, чтобы изучать какой-то тип молекул, мы выращиваем клональную популяцию определенного типа клеток, разрушаем их, и упорядочиваем содержимое. Например, мы можем сравнительно легко отделить все белки от всех молекул ДНК.

Выделить один интересующий нас белок из всех остальных клеточных белков также возможно. У каждого белка свои уникальные физические и химические свойства, которые позволяют отделить его от других. Например, можно разделять белки по размеру, заряду, гидрофобности и т.д.

Специализированные молекулы для специальных функций

Мы более детально рассмотрим три основных вида молекул, находящихся в клетке: ДНК, РНК и белки. У каждой из этих молекул есть своя функция. Молекулы ДНК похожи на ящики картотеки, в которых хранится информация. РНК помогают достать и выполнить заложенные в ДНК инструкции. Белки выполняют большинство рутинных химических операций внутри и зачастую вне клетки.

ДНК: универсальное хранилище биологической информации

Главная «программа», управляющая каждым живым организмом, заложена в его дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК). Информации, заложенной в ДНК, достаточно для выполнения любой функции, которую клетка потенциально способна выполнить.

Молекулы ДНК это очень длинные цепи, составленные из повторяющихся единиц. Каждая такая единица (нуклеотид) содержит одно из четырех возможных «оснований»

АДЕНИН («А»)
ТИМИН («Т»)

ЦИТОЗИН («Ц»)
ГУАНИН («Г»)

Нуклеотиды («звенья» цепи) соединены друг с другом «голова к хвосту», а основания торчат в сторону. Информация закодирована в виде последовательности «букв» А, Т, Г, Ц вдоль цепи ДНК.