


МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Тульский государственный университет»

Институт Естественных наук
Кафедра «Биотехнологий»

Утверждено на заседании кафедры
«Биотехнологий»
«30» января 2023 г., протокол № 6

Заведующий кафедрой


_____ О.Н. Понаморева

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по выполнению лабораторных работ
по дисциплине (модулю)
«Биодеградация ксенобиотиков»**

**основной профессиональной образовательной программы
высшего образования – программы бакалавриата**

по направлению подготовки
19.03.01 Биотехнология

с направленностью
Экобиотехнология

Форма(ы) обучения: очная, заочная

Идентификационный номер образовательной программы: 190301-01-23

Тула 2023 год

Разработчик(и) методических указаний

Акатова Е.В., доцент, к.б.н.

(ФИО, должность, ученая степень, ученое звание)



(подпись)

Содержание

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1	2
ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СТЕРИЛИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И	2
ПОСУДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ ДЕГРАДИРУЮЩИХ КСЕНОБИОТИКИ	2
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2	11
ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ- ДЕСТРУКТОРОВ	11
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3	14
ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ.....	14
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4.	21
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТЕЙ ФЕРМЕНТОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ДЕГРАДАЦИИ НАФТАЛИНА	21
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5.	25
ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКОГО ПУТИ ДЕГРАДЦИИ НАФТАЛИНА.....	25
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6.	28
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТЕЙ ФЕРМЕНТОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ДЕГРАДАЦИИ КАПРОЛАКТАМА	28
Количественное определение белка по методу Лоури	31
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7	32
ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК.....	32
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8.	35
ВЫДЕЛЕНИЕ ТОТАЛЬНОЙ ДНК.....	35
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9.	37
ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ПРЕПАРАТОВ ПЛАЗМИДНОЙ И ТОТАЛЬНОЙ ДНК. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ	37

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СТЕРИЛИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И ПОСУДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ ДЕГРАДИРУЮЩИХ КСЕНОБИОТИКИ

Цель работы: Ознакомиться с требованиями, предъявляемыми к питательным средам, с различными классификациями и химическим составом питательных сред, правилами их приготовления и целью использования. Ознакомиться с различными способами стерилизации питательных сред, посуды, инструментов, с устройством парового стерилизатора и принципом его работы.

Оборудование, материалы: Паровой стерилизатор; сушильный шкаф; посуда: чашки Петри; пипетки на 1 мл, пробирки, плоскодонные конические или круглодонные колбы разного объема; штатив для пробирок; ватно-марлевые пробки; пергаментная бумага; ножницы; вата, нитки, марля, агар-агар; NH_4Cl , Na_2SO_4 , MgCl_2 , CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, HCl , ZnO , $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl} \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , K_2HPO_4 , триптон, дрожжевой экстракт и NaCl .

1.1 КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1.1.1 Питательные среды

Разнообразные питательные вещества, в которых нуждаются микроорганизмы и которые используются ими для синтеза основных компонентов клетки, роста, размножения и для получения энергии называются *питательными веществами*, а среда, содержащая питательные вещества, является *питательной средой*.

По типу питания микроорганизмы, которые встречаются в пищевых продуктах, относятся к *хемоорганогетеротрофам*. Это значит, что органические вещества, содержащиеся в питательной среде, являются источником углерода, энергии и электронов. Потребности микроорганизмов в тех или иных органических веществах зависят от их видовой принадлежности, и, следовательно, от наличия в клетках и активности соответствующих ферментных систем.

В качестве *источника углерода* микроорганизмы используют углеводы, органические и аминокислоты, спирты, липиды и т.д. Как правило, лучше усваиваются низкомолекулярные органические соединения. Высокомолекулярные органические вещества могут быть использованы для питания только теми микроорганизмами, которые способны синтезировать соответствующие гидролитические экзоферменты. Органические вещества и вода являются также основными источниками водорода и кислорода.

Источником азота для хемоорганогетеротрофов могут быть различные органические и минеральные соединения: белковые вещества, пептоны, аминокислоты, соли аммония, нитраты.

В среде обязательно должны присутствовать *макроэлементы* (P, S, Ca, Mg, K, Fe, Na, Cl), которые вносятся в питательную среду в виде катионов питательных солей.

Микроэлементы чаще всего нет необходимости специально вносить в среду, так как большинство микроэлементов является примесью солей макроэлементов или попадают в среду с частицами пыли, из стеклянной посуды или в составе водопроводной воды.

Для многих микроорганизмов нужны в малых дозах *факторы роста*. Факторы роста обязательно вносят в среды для культивирования *ауксотрофных микроорганизмов* (микроорганизмов, которые не способны синтезировать сами те или иные органические вещества, которые необходимы для роста и развития), а также добавляют в питательные среды в малых количествах для ускорения роста микроорганизмов, способных эти вещества синтезировать самостоятельно. К факторам роста относятся отдельные аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, жирные кислоты, витамины и др., а также природные субстраты, содержащие эти соединения (морковный сок, кукурузный экстракт, автолизат дрожжей, гидролизаты растительного сырья и т.д.).

Питательные среды имеют исключительное значение в микробиологии. Правильный подбор питательной среды обеспечивает возможность выделения микроорганизмов из мест обитания, получения накопительных и чистых культур, изучения их морфологии и биохимических особенностей, способствует быстрой и правильной диагностике инфекционных заболеваний, дает возможность для количественного учета микроорганизмов в различных объектах (в пищевых продуктах, в воздухе, в воде, почве). С помощью питательных сред получают также биомассу полезных для народного хозяйства микроорганизмов и биологически активные целевые продукты.

Требования, предъявляемые к питательным средам

1. *В среде должны быть все необходимые для роста и развития химические элементы;*
2. *Среда должна быть сбалансирована по химическому составу.* Это значит, что соотношение химических элементов питательной среды и главным образом соотношение органогенных элементов - C:N должно примерно соответствовать этому соотношению в клетке;
3. *Среды должны иметь достаточную влажность,* обеспечивающую возможность диффузии питательных веществ в клетку. Для грибов эта влажность обеспечивается содержанием влаги в субстрате не менее 12 %, для бактерий – не менее 20 %.

4. *Среда должна иметь определенное значение pH среды.* Среди микроорганизмов различают *ацидофилы* (кислотолюбивые микроорганизмы), *алкалофилы* (щелочелюбивые микроорганизмы) и *нейтрофилы* (лучше всего растут в нейтральной среде с pH около 7,0). К ацидофилам относятся грибы и дрожжи. Большинство бактерий – нейтрофилы, для которых активная кислотность среды около 4 ед. pH является губительной. Следует помнить, что при стерилизации среды и в процессе культивирования микроорганизмов, кислотность среды может сильно изменяться. Во избежание изменения pH в среду добавляют буферные системы (например: фосфатный буфер), CaCO_3 (для нейтрализации образующихся в результате культивирования органических кислот), вещества органической природы, обладающие буферными свойствами (например: аминокислоты, полипептиды, белки) и др.;
5. *Среды должны быть изотоничными* для микробной клетки, т. е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки.
6. *Среды должны обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом (rh_2)*, определяющим насыщение ее кислородом. По шкале от 0 до 41 этим индексом можно обозначить любую степень аэробности: насыщенный кислородом раствор обозначают $rh_2=41$, насыщенный водородом $rh_2=0$. облигатные анаэробы размножаются при rh_2 не выше 5, аэробы – не ниже 10.
7. *Среды должны быть стерильными*, что обеспечивает рост чистых культур микроорганизмов.

Классификация питательных сред

По *консистенции* питательные среды делятся на жидкие, плотные и сыпучие.

Жидкие среды применяются для накопления биомассы или продуктов обмена микроорганизмов, для обновления долго хранящихся культур, для поддержания и хранения тех чистых культур, которые плохо растут на плотных средах.

Плотные среды необходимы для выделения и описания культуральных свойств чистых культур микроорганизмов, так как на них можно получить изолированные колонии (*колония* - популяция микроорганизмов, выросших из одной клетки). Плотные питательные среды используются также для количественного учета микроорганизмов в пищевых продуктах, других объектах внешней среды и для хранения чистых культур.

Плотные среды готовятся из жидких путем добавления гелеобразующих веществ: агар-агара, желатина, геля кремнекислого (силикагеля).

Лучшим гелеобразующим веществом является *агар-агар*, получаемый из водорослей. Это сложный полисахарид, который образует гель с точкой плавления 96-100 °С и температурой застывания около 40 °С. Поэтому на агаризованных средах можно культивировать почти все микроорганизмы.

Кроме того, агар-агар очень редко используется микроорганизмами в качестве питательного субстрата. Для уплотнения жидкой среды в нее вносят в зависимости от степени очистки от 1,5 до 2,5 % агар-агара.

В отличие от агар-агара *желатин* – это вещество белковой природы, которое получается из костей и хрящей животных при их вываривании, поэтому многие микроорганизмы используют желатин в качестве питательного субстрата и к концу культивирования среда с желатином разжижается. Ограниченное использование желатина в качестве уплотнителя для плотных питательных сред связано также с тем, что по сравнению с агар-агаром он образует менее прочный гель, который плавится при 23-25 °С и застывает при 20 °С, в то время как большинство микроорганизмов развивается при температуре от 25 до 37 °С.

Если требуется получить плотные среды, не содержащие органических компонентов, или синтетические среды с определенным количественным и качественным составом, то в качестве уплотнителя применяют кремневокислый гель. Получают его путем смешивания равных объемов соляной кислоты с удельной массой 1,1 и жидкого стекла (Na_2SiO_3 или K_2SiO_3) с последующей разливкой по 25-30 мл в чашки Петри и выдержкой 1-2 ч.

Сыпучие среды применяют в основном в промышленной микробиологии. К таким средам относятся разваренное пшено, отруби, кварцевый песок, смоченный питательным раствором. Такие среды используются для культивирования аэробных микроорганизмов.

По *происхождению и составу* питательные среды делятся на натуральные (естественные), синтетические (искусственные) и полусинтетические.

Натуральные среды готовятся из продуктов животного и растительного происхождения. Они содержат все ингредиенты, необходимые для роста и развития микроорганизмов. Основным недостатком этих сред является то, что они имеют сложный и непостоянный состав. Натуральные среды используют для выращивания микроорганизмов, накопления биомассы, хранения чистых культур, но они мало пригодны для изучения обменных процессов микроорганизмов. Такими средами являются отвары злаков, трав, овощные и фруктовые соки, различные экстракты, мясной бульон, автолизат дрожжей, молоко, молочная сыворотка, гидролизаты из растительного сырья и т.д. Наиболее часто применяемыми натуральными питательными средами являются мясопептонный агар (МПА) и мясопептонный бульон (МПБ), предназначенные для культивирования бактерий, а также не охмеленное пивное сусло и сусло-агар, используемые для выращивания и накопления биомассы грибов и дрожжей.

Синтетические среды имеют в своем составе химически чистые органические и неорганические соединения в строго указанных концентрациях. По набору компонентов синтетические питательные среды могут быть сложными (среды для выращивания молочнокислых бактерий) и

довольно простыми. Такие среды применяются для исследования обмена веществ, выяснения закономерностей роста или биосинтеза какого-либо метаболита и т.д. Наиболее часто в практической работе используют синтетическую среду Чапека для выращивания грибов и среду Ридер для дрожжей. Состав этих сред приведен в приложении 2. Основным недостатком синтетических сред является то, что на таких средах микроорганизмы очень долго растут.

Полусинтетические среды в своем составе содержат химически чистые органические и неорганические вещества, (как и в синтетических средах) и вещества растительного или животного происхождения в качестве факторов роста для ускорения роста и развития микроорганизмов. Цель использования полусинтетических сред та же, что и синтетических. Так как натуральные компоненты вносятся в небольших количествах, то их химический состав не учитывается при изучении обменных процессов тех или иных микроорганизмов.

По назначению среды делятся на универсальные (основные), избирательные (накопительные, элективные) и дифференциально-диагностические.

Универсальные среды используются для выращивания многих видов микроорганизмов. К универсальным средам, используемым для выращивания бактерий, относятся мясопептонный агар и бульон (МПА, МПБ), среда для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (среда для определения КМАФАнМ). Грибы и дрожжи хорошо растут на не охмеленном пивном сусле, сусло-агаре (СА), среде Сабуро.

Избирательные среды обеспечивают развитие только определенных микроорганизмов или группы родственных видов и непригодны для роста других. В такие среды, как правило, добавляют вещества, избирательно подавляющие развитие сопутствующей микрофлоры. Избирательные среды применяют для выделения определенных микроорганизмов из мест их естественного обитания и для получения накопительных культур. В качестве накопительных питательных используют, например жидкие среды Кесслера (используется для накопления бактерий группы кишечной палочки), Мюллера и Кауфмана (для выявления сальмонелл). Элективными средами могут быть плотные питательные среды, такие как молочно-солевой агар (МСА) и желточно-солевой агар (ЖСА) – для выявления и количественного учета в пищевых продуктах коагулазоположительных стафилококков, кровяной агар – для выявления гемолитических стрептококков, агар с гидролизированным молоком и мелом – для количественного учета молочнокислых бактерий.

Дифференциально-диагностические среды используются для определения видовой принадлежности исследуемого микроба, основываясь на особенностях его обмена веществ. Состав этих сред позволяет четко выделить наиболее характерные свойства изучаемого микроорганизма.

Примером таких сред является плотная среда Эндо, применяемая для определения бактерий группы кишечной палочки, в состав которой входит лактоза, насыщенный спиртовой раствор фуксина, обесцвеченного перед добавлением в среду 10 % водным раствором сульфата натрия (образуется бесцветная фуксин-сернистая кислота. Кишечная палочка на такой среде ферментирует лактозу с образованием альдегидов, вследствие чего бесцветная фуксин-сернистая кислота переходит в фуксин-сернистое соединение с образованием фуксина, который окрашивает колонии кишечной палочки в красный цвет с металлическим блеском.

1.1.2 Методы стерилизации питательных сред, посуды, инвентаря

Стерилизацией или обеспложиванием (*sterilis* – бесплодный) называется полное уничтожение микроорганизмов в питательных средах, посуде и других объектах.

Стерилизация должна обеспечивать уничтожение всей микрофлоры, патогенной и непатогенной, присутствующей в данном объекте. Она не должна приводить к порче материала или изменению его физического или химического состояния. Поэтому в зависимости от физических свойств стерилизуемых объектов и цели стерилизации применяют различные методы обеспложивания: горячие (влажная, дробная, сухая стерилизация) и холодные (механическая стерилизация, ионизация, стерилизация ультразвуком, ультрафиолетовыми лучами). Основное значение имеет тепловое воздействие на объект.

Методы, основанные на термической обработке стерилизуемых объектов

Губительное действие высокой температуры обусловливается повреждением коллоидного состояния плазмы, денатурацией белка с последующей коагуляцией его, а также нарушением ферментных систем микроорганизмов.

Различают влажные и сухие способы тепловой стерилизации.

Влажные способы используются, главным образом, для стерилизации питательных сред. К таким способам относятся стерилизация паром под давлением, стерилизация текучим паром (дробная стерилизация) и тиндализация.

Стерилизация паром под давлением – самый эффективный в бактериологической практике способ стерилизации питательных сред и посуды, так как с его помощью быстро достигается полное и надежное обеспложивание. Этот способ стерилизации основан на том, что образующийся при кипячении воды пар не выходит наружу, а скапливаясь в замкнутом пространстве, повышает давление. При создании избыточного давления возрастает температура кипения воды и температура пара. Стерилизацию паром под давлением осуществляют в паровых

стерилизаторах, принцип работы и устройство которого описаны в разделе 1.1.3.

Стерилизация текущим паром используется для сред, которые нельзя нагревать выше температуры 100 °С. Стерилизация проводится при 100 °С (температура парообразования) по 30...60 минут в течение 3 дней с промежутками в 18-20 часов, во время которых материал выдерживается в термостате или при комнатной температуре. Поэтому этот способ называют еще дробной стерилизацией. В основу способа дробной стерилизации положен следующий принцип: при нагревании до 100 °С в течение 30...60 минут погибают все вегетативные клетки, а споры остаются жизнеспособными. В промежутке между стерилизацией споры прорастают в вегетативные клетки. Через сутки проводят повторную стерилизацию. Обычно после третьей стерилизации достигается полное обеспложивание объекта. Стерилизацию текущим паром осуществляют в аппаратах Коха или текучепаровых аппаратах (кипятильниках Коха).

Тиндализация – это дробная стерилизация при низкой температуре – 56...58 °С. Применяют этот способ при стерилизации сред, которые нельзя нагревать до 100 °С. Такие среды подвергают нагреванию в течение 5...6 дней подряд по 1 часу ежедневно (в 1-й день – в течение 2 часов). В промежутках между прогреванием стерилизуемая жидкость хранится в термостате. При этом оставшиеся в живых споры прорастают в вегетативные клетки, которые погибают при последующем нагревании. Тиндализацию проводят в специальных приборах с терморегулятором или на водяных банях.

Сухие способы. При работе в микробиологической лаборатории из сухих способов термической стерилизации используются следующие:

Прокаливание на огне (фламбирование) очень быстрый и надежный способ стерилизации бактериологических петлей, препаровальных игл перед посевами. Этим способом можно стерилизовать также мелкие металлические предметы (пинцеты, скальпели) и предметные стекла. Осуществляют прокаливание над пламенем горелки.

Стерилизация сухим жаром (сухим нагретым воздухом) используется для стерилизации микробиологической посуды (пипеток, чашек Петри), песка. Осуществляют стерилизацию сухим жаром при температуре 150-170 °С в течение 1...1,5 часов в печах Пастера или в сушильных шкафах.

Методы холодной стерилизации

Механическая стерилизация (фильтрование). Этот способ применяется для стерилизации сред в тех случаях, когда их нельзя подвергать нагреванию. При механической стерилизации стерилизуемые жидкости фильтруют через специальные фильтровальные приборы, которые имеют настолько мелкие поры, что на своей поверхности задерживают взвешенные в жидкости частицы, в том числе и микробы. Для фильтрации в микробиологической практике применяют различные фильтровальные

приборы (фильтры Зейтца, свечи Шамберлана, Мандлера, Беркефельда и др.).

Химическая стерилизация. Этот вид стерилизации в практике приготовления питательных сред имеет ограниченное применение. В лабораторной практике используют некоторые химические вещества, такие как толуол, хлороформ, эфир и другие, для предупреждения бактериального загрязнения питательных сред. Для освобождения от консерванта среду нагревают на водяной бане при 56 °С.

Химическая стерилизация используется также для дезинфекции оборудования, помещений, использованной посуды и отработанного микробиологического материала. В качестве дезинфицирующих веществ широкое применение нашли химические соединения, содержащие активный хлор (хлорамин, хлорная известь).

Стерилизация ультрафиолетовыми лучами. Этот способ стерилизации используется для стерилизации воздуха в микробиологическом боксе и в лаборатории перед проведением микробиологических исследований. Стерилизацию ультрафиолетовыми лучами проводят с помощью бактерицидных ламп.

1.1.3 Устройство парового стерилизатора и принцип его работы

Устройство стерилизатора

Основными частями стерилизатора являются: *стерилизационная камера* -служит для размещения стерилизуемых объектов; *парогенератор* – служит для выработки пара (в парогенераторе находятся нагревательные элементы - тэны, используемые для нагрева воды и получения пара, и датчики уровня, которые нужны для предотвращения выхода из строя нагревательных элементов); *система трубопроводов* – для соединения сборочных единиц стерилизатора; *электрошкаф* – для управления электрической системой стерилизатора; *манометр электроконтактный* – для наблюдения за давлением в парогенераторе и поддержания его работы в автоматическом режиме; *моновacuумметр* – для наблюдения за давлением и разряжением в стерилизационной камере; *клапан предохранительный* - для сброса пара при превышении давления в парогенераторе; *колонка водоуказательная* (водомерная трубка) – для наблюдения за уровнем жидкости в парогенераторе; *вентили* – для управления работой стерилизатора.

Принцип действия пневмогидравлической и электрической систем парового стерилизатора

Закljučается в следующем:

Вода поступает по водопроводу в парогенератор. Контроль за уровнем жидкости в парогенераторе осуществляют с помощью водомерной трубки. После включения стерилизатора, начинают нагреваться тэны, благодаря чему вода нагревается до рабочей температуры. В результате образуется пар. При

достижении в парогенераторе давления пара 0,11 МПа открывается вентиль «Пар в камеру» и вентиль «Слив конденсата». Происходит продувка и прогрев стерилизационной камеры, после чего вентиль «Слив конденсата» закрывается. При достижении в стерилизационной камере рабочего давления (контролируется электроконтактным манометром) происходит отчет времени стерилизации. В процессе стерилизации происходит автоматическое включение и отключение стерилизатора с помощью электроконтактного манометра. Контроль за давлением в стерилизационной камере осуществляется моновакуумметром. После проведения стерилизации аппарат отключают от сети и перекрывают вентиль «Пар в камеру». Далее, по мере падения давления в стерилизационной камере до 0,06 МПа (контроль осуществляется по моновакуумметру) открывается вентиль «Вакуум». В стерилизационной камере создается разряжение. Происходит процесс сушки стерилизуемого материала. По истечении сушки открывается вентиль «Воздух в камеру». При этом происходит выравнивание давления в стерилизационной камере с атмосферным давлением.

1.2 ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1.2.1 Приготовление посуды для проведения микробиологического анализа

Для проведения микробиологического анализа используют чашки Петри, которые герметично упаковываются в пергаментную бумагу и стерилизуются. Пипетки на 1 см³ закрывают ватными тампонами и также заворачивают в бумагу. Колбы закрывают ватно-марлевыми пробками и сверху делают колпачки из пергаментной бумаги.

Стерилизация посуды осуществляется в автоклаве при избыточном давлении 0,1 МПа в течение 30-40 минут.

1.2.2 Приготовление питательных сред из отдельных компонентов

Приготовить ниже перечисленные жидкие и агаризованные среды. Для агаризации сред добавить агар-агар в жидкую среду из расчета 20г на 1л среды.

СРЕДА ЭВАНСА

1. Приготовить по 50 мл каждого раствора:
5 М р-р NH₄Cl, 0,1 М р-р Na₂SO₄, 62 мМ р-р MgCl₂, 1 мМ р-р CaCl₂, 0,005 мМ р-р (NH₄)₆Mo₇O₂₄
2. Приготовить 50 мл раствора микроэлементов состава: 0,5 мл HCl, до 50 мл H₂O дист. + 0,0205 г ZnO + 0,27 г FeCl₃ * 6H₂O + 0,1 г MnCl₂ * 4H₂O + 0,0085 г CuCl * 2H₂O + 0,024 г CoCl₂ * 6H₂O + 0,003 г H₃BO₃

3. Взвесить 8,71 г K_2HPO_4 растворить в 800мл дист. воды, довести рН до 7,00, добавить по 1 мл каждого из растворов из пункта 1 и микроэлементов. Довести объем до 1л.

СРЕДА LB (ЛУРИЯ-БЕРТАНИ)

1. Взвесить 10г триптона, 5г дрожжевого экстракта и 10 г NaCl, растворить в 800 мл дист. воды и довести рН до 7,5. Довести объем до 1л дист. водой.

Контрольные вопросы

1. *Что такое питательные среды?*
2. *Какие требования предъявляются к питательным средам?*
3. *Каким образом готовятся плотные питательные среды и для чего они используются?*
4. *Почему в качестве уплотнителя для питательных сред лучше использовать агар-агар, а не желатин?*
5. *На какие группы делятся питательные среды по происхождению и составу?*
6. *Что такое синтетические среды и в каких случаях они применяются?*
7. *Для каких целей используются универсальные, избирательные и дифференциально-диагностические среды?*
8. *Приведите примеры универсальных, избирательных и дифференциально-диагностических питательных сред.*
9. *Что такое стерилизация? Какие методы стерилизации Вам известны?*
10. *Какими способами можно стерилизовать посуду?*
11. *Какими из известных Вам способов можно стерилизовать питательные среды?*
12. *Как готовятся питательные среды и посуда для стерилизации?*
13. *Каково устройство и принцип работы парового стерилизатора?*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2 ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ

Цель работы: Ознакомиться с требованиями, предъявляемыми к отбору проб почв для бактериологического анализа, а также с возможными методами получения накопительных культур микроорганизмов-деструкторов.

Оборудование и материалы: Колбы качалочные; ватно-марлевые пробки; NH_4Cl , Na_2SO_4 , MgCl_2 , CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, HCl , ZnO , $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl} \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , K_2HPO_4 , толуол.

Краткое теоретическое положение

В условиях естественного обитания чистые бактериальные культуры встречаются довольно редко. Тем не менее основная часть современных представлений о свойствах бактерий, а также их взаимоотношениях получена при изучении чистых культур. Поэтому часто возникает необходимость выделить в виде чистых культур различные виды бактерий, которые сосуществуют в естественных условиях. Накопление представляет собой основной этап процесса, который позволяет получить чистые культуры. Оно также дает возможность оценить различные воздействия факторов окружающей среды на смешанную микробную популяцию, благодаря которым может происходить отбор микроорганизмов, способных взаимодействовать со специфическими субстратами (или расщеплять их) или способных хорошо расти в необычных условиях.

Выделение чистой культуры данного микроорганизма будет успешным, если он присутствует в смешанной популяции в достаточно высокой пропорции. Микроорганизм легко выделить, если он количественно преобладает в смешанной популяции. Разработанные методы накопления имеют целью добиться увеличения относительного количества данного организма благодаря созданию лучших условий для его роста и выживания по сравнению с другими или путем пространственного отделения его от других членов популяции. К *физическим методам*, которые могут быть использованы в данном случае, следует отнести регуляцию роста температурой, тепловую обработку, ультразвуковую обработку и ультрафиолетовое облучение, приводящие к гибели или подавлению роста других организмов, присутствующих в популяции. Можно также использовать преимущества в некоторых физических свойствах изучаемого микроорганизма, таких, как его размеры и подвижность; это позволяет в значительной мере отделить данный организм от других в популяции. В *химических методах* используют токсичные вещества, которые убивают или подавляют рост оставшейся части популяции, не влияя на выделяемый микроорганизм. Кроме того, эти вещества могут быть источниками питания, используемыми преимущественно отдельными бактериями в смешанной популяции. *Биологические методы* включают использование специфических хозяев для выделяемого организма, а также преимуществ некоторых патогенных свойств микроорганизма (например, его инвазивность), которыми не обладают другие представители популяции. Во многих случаях для получения максимального эффекта накопления сочетают физические, химические и биологические методы.

Как правило, накопительные культуры получают в закрытых системах, т. е. микроорганизмы выращивают в обычных периодических (стационарных) условиях в колбах или пробирках, где концентрация питательных веществ и продуктов метаболизма постоянно изменяется в процессе их роста. Для получения накопительных культур используются также открытые системы. Например, с помощью хемостата можно обеспечить постоянство окружающей среды для бактерий, непрерывно подавая питательные вещества в концентрации, лимитирующей рост, и удаляя продукты метаболизма. Изменяя скорость разбавления среды в хемостате, можно контролировать концентрацию питательных веществ, лимитирующих рост. В свою очередь это может избирательно влиять на скорость роста различных организмов в смешанной бактериальной культуре, в результате чего один или другой организм смешанной популяции начинает количественно преобладать.

Отбор проб для выделения микроорганизмов-деструкторов

Отбор проб осуществляется согласно ГОСТ 17.4.4.01-83 "Общие требования к отбору проб почвы"; ГОСТ 17.4.4.02-84 "Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа".

Пробы почвы, предназначенные для бактериологического анализа, в целях предотвращения их вторичного загрязнения следует отбирать с соблюдением правил асептики: отбирают стерильными инструментами, перемешивают на стерильной поверхности, помещая в стерильную тару. Время от отбора проб до начала их исследования не должно превышать 1 суток.

Часто проводят точечный отбор проб. Точечные пробы отбирают на пробной площадке из одного или нескольких слоев или горизонтов методом конверта. Выкапывается шурф 0,3 м x 0,3 м и глубиной 0,2 м. Поверхность одной из стенок шурфа очищают *стерильным ножом*. Затем из этой стенки вырезают почвенный образец, размер которого обусловлен заданной навеской, так, если необходимо отобрать 200 г почвы, размер образца 20 см x 3 см x 3 см, 500 г - 20 см x 5 см x 3 см.

Из нескольких точечных проб можно составить объединенную пробу путем смешивания точечных проб, отобранных на одной пробной площадке.

Отбор проб для выделения микроорганизмов-деструкторов лучше проводить с территорий загрязненных тем или иным ксенобиотиком.

Отобранные пробы необходимо пронумеровать и зарегистрировать в журнале, указав следующие данные: порядковый номер и место взятия пробы, рельеф местности, тип почвы, целевое назначение территории, вид загрязнения, дату отбора.

Пробы должны иметь этикетку с указанием места и даты отбора пробы, номера почвенного разреза, почвенной разности, горизонта и глубины взятия пробы, фамилии исследователя.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

Для получения накопительных культур бактерий, окисляющих толуол, используют 100 мл стерильной неорганической среды Эванса (см. лабораторную работу 1) в закрытых ватными пробками колбах. Среду инокулируют небольшим количеством влажной почвы (1), Колбы инкубируют 1—3 нед при 25—30 °С в закрытой камере, содержащей стакан с водой, насыщенной толуолом. Отдельные колонии получают, делая посев выросшей культуры штрихом на твердую среду и инкубируя чашки при 25—30 °С в атмосфере, содержащей толуол.

Контрольные вопросы

1. *Какие культуры называются накопительные?*
2. *Какими методами можно создать накопительную культуру?*
3. *Перечислите физические факторы, которыми можно варьировать при получении накопительной культуры?*
4. *Как проводят отбор проб для бактериологического анализа?*
5. *Где лучше отбирать пробы почв для выделения деструкторов нафталина?*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3 ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ- ДЕСТРУКТОРОВ.

Цель работы: Ознакомиться с методами получения накопительных и чистых культур микроорганизмов. Освоить технику посева микроорганизмов на плотные и жидкие питательные среды.

Оборудование и материалы: Спиртовка; бактериологическая петля; пробирки с жидкими средами Эванса и LB; чашки Петри с агаризованными средами Эванса и LB; бактерии деструкторы нафталина и капролактама. Нафталин и капролактама.

КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Понятие о чистой и накопительной культуре микроорганизмов

Культивирование – выращивание микроорганизмов на питательных средах. При культивировании на питательных средах вырастают культуры микроорганизмов. *Рост культуры* – физиологический процесс, в результате

которого увеличивается *биомасса* – масса клеточного вещества данного микроорганизма.

Чистой культурой микроорганизма называют культуру микроорганизмов одного вида, представленную потомством одной клетки. Для выделения чистой культуры используют, как правило, плотные питательные среды, на которых каждая клетка вырастает в виде *изолированной колонии* – потомства микроорганизмов, образовавшееся из одной клетки.

Выделение чистой культуры микроба является основой бактериологической работы, так как чаще всего исследуемый материал содержит смесь различных видов микробов. Чистые культуры нужны для изучения свойств микроорганизмов и установления их видовой принадлежности. Кроме того, чистые культуры микроорганизмов (дрожжей, микроскопических грибов, молочнокислых, уксуснокислых, пропионовокислых и других бактерий) обладают промышленно ценными свойствами и нужны для получения различных продуктов и веществ, нашедших применение в пищевой промышленности и других отраслях народного хозяйства.

Перед выделением чистой культуры из различных объектов окружающей среды (пищевого продукта, с поверхности плодов и овощей, из почвы, воды и др.), в которых находится множество микроорганизмов, вначале получают накопительные культуры, проводя культивирование в *элективных условиях* - условиях, способствующих развитию одной культуры и ограничивающих развитие сопутствующих микроорганизмов. Обеспечить элективные условия для микроорганизмов можно только в том случае, если известны особенности обмена веществ выделяемого микроорганизма. Так как различные микроорганизмы используют различные источники питания, то элективные условия легче всего обеспечить, подбирая определенный состав питательных сред. Можно создать элективные условия, обеспечивая соответствующую температуру, рН, освещение и др.

Накопительные культуры состоят преимущественно из клеток микроорганизмов одного вида. Для получения накопительных культур используют жидкие накопительные питательные среды, различные методы обработки материала, содержащего смесь микробов, а также учитывают другие особенности выделяемых из объекта микроорганизмов.

Для выделения чистых и накопительных культур из различных объектов в лабораториях используют методы посева и пересева. *Посевом* называется внесение части исследуемого материала в стерильную питательную среду, *пересевом* – перенос части выросшей на питательной среде культуры микроорганизмов на другую свежую питательную среду.

Методы выделения накопительных культур микроорганизмов

К таким методам относятся методы обогащения, метод нагревания исследуемого материала для выделения спорообразующих бактерий, метод выделения подвижных форм бактерий (метод Шукевича) и др.

Методы обогащения

Их часто применяют для выделения чистых культур микроорганизмов (например, бактерий группы кишечной палочки (БГКП), сальмонелл и др.) из материалов, в которых мало выделяемых микроорганизмов, но содержится большое количество сопутствующей микрофлоры. Для увеличения численности выделяемого вида микроорганизмов вначале делают посев исследуемого материала в накопительные питательные среды, которые содержат вещества, стимулирующие его рост и угнетающие или задерживающие размножение сопутствующей микрофлоры. Например, для выделения сальмонелл проводят посев в среды обогащения Кауфмана, Мюллера и др., для выделения БГКП – на среду Кесслера. При выделении культур молочнокислых бактерий из почвы, сырого молока или растений посевы делают на стерильное обезжиренное молоко, содержащее 5 % этилового спирта для подавления роста гнилостных бактерий.

Метод нагревания

Применяют для выделения чистых культур споровых форм бактерий (бацилл, клостридий). В этом случае перед посевом исследуемый материал прогревают на водяной бане при температуре 75...85 °С в течение 20...30 мин. Вегетативные формы погибают во время прогревания, а споры микробов остаются живыми и при последующих посевах на плотную среду прорастают, формируя колонии.

Метод выделения подвижных форм бактерий (метод Шукевича)

Заключается в посеве исследуемого материала в конденсационную воду скошенного мясopептонного агарa. При размножении подвижные формы микроорганизмов из конденсационной воды распространяются на агаре, как бы вползая на его поверхность.

Методы выделения анаэробных микроорганизмов

Основаны на выращивании микроорганизмов в средах с низкой концентрацией кислорода или в безкислородной среде, что достигается:

- посевом исследуемого материала в среды, содержащие редуцирующие и легко окисляемые вещества (антиоксиданты). В качестве таких веществ чаще всего используют тиогликолят натрия, солянокислый цистеин, кусочки животных и растительных тканей;
- посевом исследуемого материала в глубину плотных питательных сред. Посев делается уколом препаровальной иглой в пробирку со столбиком плотной среды или в расплавленную плотную или полужидкую питательную среду с последующим перемешиванием;
- механическим удалением воздуха из сосудов при выращивании анаэробных микроорганизмов (создают вакуум);
- культивированием анаэробных микроорганизмов в жидких средах под слоем масла;

- культивированием анаэробных микроорганизмов в атмосфере инертного газа, диоксида углерода, азота.

Методы выделения чистых культур микроорганизмов

Метод Пастера (метод предельных разведений)

Заключается в том, что из исследуемого материала делают ряд последовательных разведений в жидкой питательной среде. Для этого каплю посевного материала вносят в пробирку со стерильной жидкой средой, из нее каплю переносят в следующую пробирку и так засевают до 8...10 пробирок. С каждым разведением количество микробных клеток, попадающих в среду, будет уменьшаться и можно получить такое разведение, в котором во всей пробирке со средой будет находиться только одна микробная клетка, из которой разовьется чистая культура микроорганизма. Так как в жидких средах микробы растут диффузно, т.е. легко распределяются во всей среде, то изолировать одну микробную клетку от другой трудно. Таким образом, метод Пастера не всегда обеспечивает получение чистой культуры. Поэтому в настоящее время этот метод используется, главным образом, для предварительного уменьшения концентрации микроорганизмов в материале перед посевом его в плотную среду для получения изолированных колоний.

Методы механического разделения микроорганизмов с использованием плотных питательных сред

К таким методам относятся метод Коха и метод Дригальского.

Метод Коха (метод глубинного посева)

Исследуемый материал вносят бактериологической петлей или пастеровской пипеткой в пробирку с расплавленной плотной питательной средой. Равномерно размешивают содержимое пробирки, вращая ее между ладонями. Каплю разведенного материала переносят во вторую пробирку, из второй – в третью и т.д. Содержимое каждой пробирки, начиная с первой, выливают в стерильные чашки Петри. После застывания среды в чашках, их помещают в термостат для культивирования.

Для выделения анаэробных микроорганизмов по методу Коха необходимо ограничить доступ кислорода к культуре. С этой целью поверхность глубинного посева в чашке Петри заливают стерильной смесью парафина и вазелина (1:1). Можно также оставлять посевной материал, тщательно перемешанный с агаризованной средой, непосредственно в пробирке. Ватную пробку при этом заменяют резиновой или заливают поверхность агара смесью парафина и вазелинового масла. Чтобы извлечь выросшие колонии анаэробных микроорганизмов, пробирки слегка нагревают, быстро вращая над пламенем горелки. Агар, прилегающий к стенкам, расплавляется, и столбик легко выскальзывает в подготовленную чашку Петри. Далее столбик с агаром разрезают стерильным скальпелем,

колонии извлекают стерильной петлей или стерильной капиллярной рубкой и переносят в жидкую среду.

Метод Дригальского основан на механическом разделении микробных клеток на поверхности плотной питательной среды в чашках Петри. Каждая микробная клетка, фиксируясь в определенном месте, начинает размножаться, образуя колонию.

Для посева по методу Дригальского используют несколько чашек Петри, залитых плотной питательной средой. На поверхность среды вносят каплю исследуемого материала. Затем с помощью стерильного шпателя эту каплю распределяют по всей питательной среде (посев газоном).

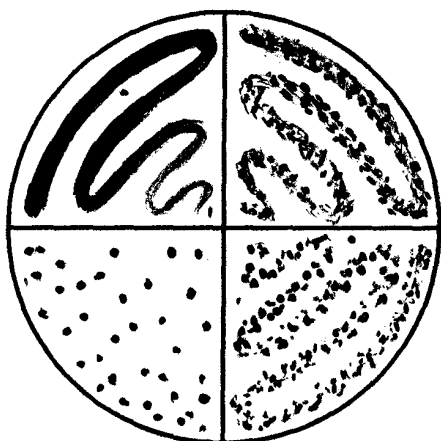


Рис. 1. Метод посева истончающим штрихом

Посев также можно проводить штрихом (рис.1), используя бактериологическую петлю. Этим же шпателью или петлей осуществляют посев во вторую, третью и т.д. чашки. Как правило, в первой чашке после культивирования посева появляется рост микробов в виде сплошного налета, в последующих чашках содержание микроорганизмов снижается и образуются изолированные колонии, из которых отсевом можно легко выделить чистую культуру.

Таким образом, в первых секторах получается сплошной рост, а вдоль последующих штрихов вырастут обособленные колонии, представляющие собой потомство одной клетки.

В целях экономии сред и посуды можно пользоваться одной чашкой, разделив ее на сектора, и последовательно засеивать их штрихом (*метод истончающего штриха*). Для этого материал берут петлей и проводят ею ряд параллельных штрихов сначала по поверхности первого сектора, а затем последовательно оставшимися на петле клетками засеивают все другие сектора. При каждом последующем штрихе происходит уменьшение количества засеиваемых клеток.

Метод выделения чистых культур с помощью химических веществ используется при изолировании культур микроорганизмов, устойчивых к определенным химическим веществам. Например, с помощью этого метода

можно выделить чистую культуру туберкулезных микобактерий, устойчивых к действию кислот, щелочей и спирта. В этом случае исследуемый материал перед посевом заливают 15 % раствором кислоты или антиформинном и выдерживают в термостате в течение 3...4 часов. После воздействия кислоты или щелочи клетки туберкулезной палочки остаются живыми, а все другие микроорганизмы, содержащиеся в исследуемом материале, погибают. После нейтрализации кислоты или щелочи обработанный материал высевает на плотную среду и получают изолированные колонии возбудителя туберкулеза.

Биологические методы выделения чистых культур патогенных микроорганизмов основаны на заражении исследуемым материалом лабораторных животных, восприимчивых к данному виду возбудителя. Если патогенный микроорганизм содержится в исследуемом объекте, то лабораторное животное заболевает и погибает. После вскрытия павшего животного из внутренних органов делают посевы на специальные среды, на которых вырастают чистые культуры выделяемых микробов.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

На занятии студенты знакомятся с методами выделения чистых и накопительных культур микроорганизмов. Осваивают технику посева исследуемого материала в чашку Петри и в пробирки с жидкой питательной средой.

При выполнении работы необходимо:

1. Для посева бактерий до отдельных колоний бактерии сделать посев штрихом в чашку Петри с агаризованной средой Эванса с добавлением субстратов и средой LB по методу истощающего штриха. Далее чашки помещают в термостат с температурой 28 °С для культивирования в течение 1...2 суток.

Техника посева и пересева микроорганизмов на питательные среды

Посевы и пересевы микроорганизмов на питательные среды проводят около пламени горелки (но не в пламени), по возможности быстро, чтобы не загрязнить культуры посторонними микроорганизмами. Нельзя делать резких движений, ходить, кашлять и т.п. около работающего с чистой культурой, так как движение воздуха увеличивает опасность случайного заражения культуры и среды. Поэтому посевы и пересевы микроорганизмов следует проводить в боксе.

1. Посев на плотные среды в чашки Петри

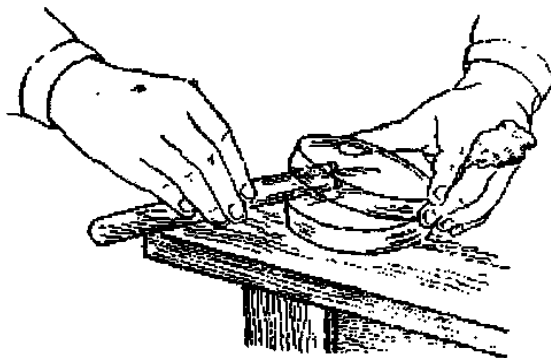


Рис. 2 Правила разливания питательной среды в чашки Петри

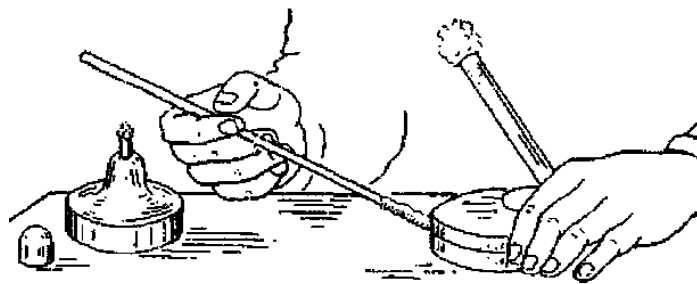


Рис. 3 Посев на агар в чашки Петри шпателем Дригальского

Посев в чашки Петри производят следующим образом: плотную питательную среду в пробирках или колбах расплавляют на кипящей водяной бане, охлаждают до 48-50 °С и, соблюдая правила асептики, разливают ровным слоем толщиной 3 – 5 мм в стерильные чашки (рис. 2). Посев делают стеклянным шпателем Дригальского (рис. 3) или петлей в виде параллельных или зигзагообразных (метод истощающего посева) штрихов.

2. Посев в жидкую питательную среду

Посев в жидкую среду можно производить бактериологической петлей или пипеткой вблизи пламени горелки. Обе пробирки держат в слегка наклонном положении, чтобы не замочить ватно-марлевые пробки. Петлю с микробным материалом опускают непосредственно в стерильную среду и ополаскивают. При внесении клеток, взятых петлей из плотной среды, материал тщательно растирают по стенке пробирки у верхнего края жидкой среды, все время смывая его средой. Культуры выращивают на качалке 1...2 суток.

Контрольные вопросы

1. Что такое «чистые культуры» микроорганизмов и для чего их выделяют из объектов окружающей среды?
2. Каким образом создаются элективные условия при выделении накопительных культур микроорганизмов?
3. Какие микроорганизмы можно выделить методом нагревания?
4. Как можно выделить накопительные культуры подвижных форм бактерий?

5. *Каким образом можно выделить накопительную культуру анаэробных бактерий?*
6. *Охарактеризуйте методы выделения чистых культур микроорганизмов, основанные на их механическом разделении.*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТЕЙ ФЕРМЕНТОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ДЕГРАДАЦИИ НАФТАЛИНА

Цель: Определить активность ферментов нафталин деградирующих микроорганизмов

Материалы и оборудование

Штамм-деструктор нафталина *Pseudomonas putida* BS3701 (pBS1141), ультразвуковой дезинтегратор, спектрофотометр, центрифуга, pH-метр, компьютер

Растворы

50мМ KH_2PO_4 pH 7,0 буфер; 50мМ KH_2PO_4 pH 7,5 буфер; 1М трис-HCl pH 8,0 буфер; 20мМ раствор НАДН; 20мМ раствор салицилата натрия; 0,1М раствор катехола; 20мМ спиртовой раствор нафталина; 0,5 М ЭДТА pH 8,0

Основные положения

Определение активностей ферментов проводят в бесклеточных экстрактах. Культуры выращивают на минимальной среде Эванса с нафталином, фенантроном, салицилатом, 1-гидрокси-2-нафтоатом, протокатехатом или сукцинатом, в качестве источника углерода. Бактерии, используемые в экспериментах по изучению индукции ферментов, выращивают в минеральной среде, содержащей 1 г/л сукцината или глутамат натрия. Салицилат и 1-гидрокси-2-нафтоат (в концентрации 0.1 г/л) добавляют в начале экспоненциальной фазы роста клеток, после чего клетки выращивают еще в течение двух часов.

1. Приготовление бесклеточных экстрактов с помощью ультразвукового дезинтегратора

Бактериальные клетки выращивают до логарифмической фазы роста, осаждают центрифугированием (5000 об/мин, 0°C, 10мин), отмывают охлажденным 0,05 М фосфатным буфером pH 7,0 (дважды) и ресуспендируют в этом же буфере до плотности 0,2 ($\lambda=490$ нм, толщина кюветы 1 см). Клетки разрушают на ультразвуковом дезинтеграторе MSE150 в течение 1,5 минут при 0°C. Обломки клеток удаляют центрифугированием (15000 об/мин, 10 мин, 0°C).

2. Определение активностей ферментов

Супернатант немедленно используют в качестве бесклеточного экстракта для определения активностей ферментов.

В реакционную смесь с конечным объемом 3 мл вносят 100 мкл экстракта. Определение активностей проводят при 30°C, начиная реакцию внесением клеточного экстракта или субстрата, на UV-160A спектрофотометре (Shimadzu, Япония) или UVIKON-спектрофотометре 810P (Kontron Instruments, Германия).

Активность фермента нафталиндиоксигеназы определяют спектрофотометрически по уменьшению экстинкции NADH реакционной смеси, содержащей 100 мкМ НАДН и 100 мкМ нафталин (спиртовой раствор), бесклеточный экстракт и 0.05 М фосфатный буфер pH 7.5, учитывая эндогенное потребление НАДН бесклеточным экстрактом ($\lambda=340$ нм, $\epsilon=6.220 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Удельную активность фермента выражают в микромолях потребленного НАДН в минуту на мг белка, учитывая эндогенное окисление НАДН.

Активность фермента салицилатгидроксилазы определяют спектрофотометрически по уменьшению экстинкции НАДН реакционной смеси, содержащий 100 мкМ NADH и 100 мкМ салицилат, бесклеточный экстракт и 0.05 М фосфатный буфер pH 7.5, учитывая эндогенное потребление НАДН бесклеточным экстрактом ($\lambda=340$ нм, $\epsilon=6.220 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для салицилата). Удельную активность фермента выражают в микромолях потребленного НАДН в минуту на мг белка, учитывая эндогенное окисление НАДН.

Активность катехол-2,3-диоксигеназы определяют по скорости образования α -оксимуконного полуальдегида в реакционной смеси, содержащей 0.5 мМ катехола, бесклеточный экстракт и 0.05 М Трис-HCl буфер [pH 7.5] ($\lambda=375$ нм, $\epsilon=33.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). При высоких скоростях реакции бесклеточный экстракт разводят буфером в 10 раз. При наличии активности катехол 1,2-оксигеназы (K12O) этот фермент инактивируют нагреванием клеток или бесклеточного экстракта при 55°C в течение 10 минут. Удельную активность фермента выражают в микромолях образовавшегося α -оксимуконного полуальдегида в минуту на мг белка.

Активность катехол-1,2-диоксигеназы определяют по скорости образования *цис-цис*-муконата в реакционной смеси, содержащей 5 мМ Na ЭДТА, 1 мМ катехола, бесклеточный экстракт, 0.05 М фосфатный буфер [pH 7.0] ($\lambda=260$ нм, $\epsilon=16.9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Добавление ЭДТА необходимо для ингибирования муконлактонизирующего фермента. Предварительно клетки обрабатывают H_2O_2 (30 мМ) для инактивации катехол 2,3-оксигеназы (K23O). Удельную активность фермента выражают в микромолях превращенного в *цис-цис*-муконат катехола в минуту на мг белка.

Активность гентизат-1,2-диоксигеназы определяют по скорости образования малеил-пирувата в реакционной смеси, содержащей 100 мкМ гентизат, 3 мкМ сульфат железа (II), бесклеточный экстракт и 0.1 М фосфатный буфер [pH 7.4] до конечного объема 3 мл ($\lambda=334$ нм, $\epsilon=10.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Объем реактивов в кювете для измерения активности ферментов

<i>Нафталиндиоксигеназа</i>	λ 340 нм
50 мМ КН ₂ РО ₄ буфер [рН 7.5]	2900 мкл
бесклеточный экстракт	100 мкл
20 мМ раствор НАДН	15 мкл
20 мМ спиртовой раствор нафталина	15 мкл
<i>Салицилатгидроксилаза</i>	λ 340 нм
50 мМ КН ₂ РО ₄ буфер [рН 7.5]	2900 мкл
бесклеточный экстракт	100 мкл
20 мМ раствор НАДН	15 мкл
20 мМ раствор салицилата натрия	15 мкл
<i>Катехол-1,2-диоксигеназа</i>	λ 260 нм
50 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 7,0) буфер	2900 мкл
бесклеточный экстракт	100 мкл
0.5 М ЭДТА	30 мкл
0.1 М раствор катехола	30 мкл
<i>Катехол-2,3-диоксигеназа</i>	λ 375 нм
50 мМ трис-НСl буфер [рН 7,5]*	2900 мкл
бесклеточный экстракт	100 мкл
0.1 М раствор катехола	15 мкл

Прим. * – для приготовления трис-НСl буфера трис(оксиметил)аминометан растворяют в бидистиллированной воде и доводят рН соляной кислотой

4. Определение концентрации белка в бесклеточных экстрактах по методу Бредфорда

Для получения реагента-красителя кумасси бриллиантовый синий G-250 (100 мг) растворяют в 50 мл 95% этанола. Добавляют 100 мл 85% (масса/объем) фосфорной кислоты. Доводят водой до 1 л.

Используют образец (разбавленный в случае необходимости), содержащий 10-100 мкг белка в 0.1 мл. Добавляют 5.0 мл реагента-красителя и хорошо перемешивают. Не ранее, чем через 5 мин, и не позднее, чем через 1 час, измеряют показание оптической плотности при 595 нм относительно чистого реагента. Для микроанализа используют образец, содержащий 1-10 мкг белка в 0.1 мл, добавляют 1.0 мл раствора красителя, смешивают и определяют поглощение при 595 нм, как описано выше. Концентрацию белка находят по градуировочному графику, построенному с помощью белка (бычий сывороточный альбумин). Могут быть небольшие отклонения от линейности.

5. Определение концентрации белка спектрофотометрически

Метод не так точен, как метод Бредфорда, но очень прост и используется как прикидочный. Используя UV-160А спектрофотометр (Shimadzu, Япония) задаем параметры двух длин волн: 280 и 260 нм. В кювету с 2900 мкл фосфатного буфера вносим 100 мкл бесклеточного экстракта. Контрольная кювета - 3000 мкл фосфатного буфера. Затем по формуле рассчитываем концентрацию белка в мг.

$C \text{ (мг общего белка /мл)} = (1,55 \times E_{\lambda 280} - 0,76 \times E_{\lambda 260}) \times \text{разведение (30 раз)}$

6. Расчет активности ферментов

Удельную активность ферментов выражают в микромолях потребленного субстрата (кофактора) (или образующегося продукта (кофактора)) в минуту на 1 мг общего бактериального белка. Значения удельных активностей ферментов рассчитывают, используя компьютерную программу «Enzyme» (ИБФМ, Россия) или стандартную формулу.

Формула для определения активности фермента

$$\frac{\Delta E}{\Delta t} \times \frac{1}{\varepsilon \cdot d} \times \frac{V_1}{V_2} \times 10^3 = \frac{\text{мкМ}}{\text{мин} \cdot \text{л}}$$

ΔE – изменение оптической плотности раствора,

Δt – время измерения (1 мин)

ε – коэффициент экстинкции субстрата

d – расстояние, проходимое лучем

V_1 – объем реакционной смеси (3000 мкл)

V_2 – объем клеточного экстракта (100 мкл)

Наиболее принятой единицей активности является стандартная единица (Ед). Под ней понимают то количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкМ субстрата в минуту при оптимальных условиях для данного фермента (температура, рН). Существует также понятие *удельной активности*, которая выражается числом единиц активности фермента, приходящихся на 1 мг белка в ферментативном препарате (Ед/мг).

Методика

1. Вырастить культуру микроорганизма (250 мл) в минеральной среде, содержащей нафталин или салицилат в качестве источника углерода, до середины логарифмической фазы роста.
2. Клетки осадить центрифугированием.
3. Клетки дважды отмыть 50 мМ фосфатным буфером рН7.0 от среды.
4. К осадку добавить 1 мл 50 мМ фосфатного буфера, клетки аккуратно ресуспендировать.
5. Разрушить клетки с помощью ультразвукового дезинтегратора.
6. Отделить разрушенные клетки центрифугированием на 10000 g в течение 20 минут.
7. Супернатант (надосадочная жидкость) перенести в чистую пробирку. Поместить пробирку в лед.
8. Измерить активности ферментов на спектрофотометре, как описано выше.

9. Оценить концентрацию белка в бесклеточном экстракте, используя спектрофотометрический метод.
10. Определить концентрацию белка (метод Бредфорда)*
11. Рассчитать удельную активность ферментов.

Примечание

*Чтобы точно оценить концентрацию белка, используя метод Бредфорда, исследуемый образец должен содержать от 100 мкг до 1 мг белка в 1 мл. В случае, когда в образце по результатам спектрофотометрического метода концентрация выше указанной – делайте разведения.

Контрольные вопросы

1. Почему измерение производится при длинах волн 340нм, 375нм, 260нм, 334нм?
2. Каков физический смысл коэффициента молярной экстинкции?
3. Каков принцип действия ультразвукового дезинтегратора? Какие еще методы разрушения бактериальных клеток существуют?
4. Какими методами определяют концентрацию белка?
5. Как рассчитать активность фермента?
6. В каких единицах измеряется активность ферментов? Каков их физический смысл?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКОГО ПУТИ ДЕГРАДАЦИИ НАФТАЛИНА

Цель: Изучить возможные пути деградации нафталина и установить путь деградации по результатам активности ферментов

Основные положения

Нафталин – часто используется как структурная модель деградации ПАУ, поэтому бактериальная деградация нафталина хорошо изучена.

Известен ряд микроорганизмов, полностью утилизирующих нафталин: бактерии рода *Pseudomonas*, *Bacillus thermoleovorans*, *Ralstonia* sp. U2, бактерии рода *Sphingomonas*, бактерии рода *Rhodococcus*.

Начальным этапом разложения нафталина у большинства микроорганизмов является диоксигенирование в 1,2-положении (рис. 4) (характерно для микроорганизмов рода *Pseudomonas*). У микроорганизма *Bacillus thermoleovorans* найден альтернативный путь трансформации нафталина через 2,3-дигидрокси нафталин.

Первоначально трансформация нафталина микроорганизмами осуществляется до салицилата (рис. 5). Первой реакцией в метаболизме нафталина является окисление исходного субстрата до нафталин цис-1,2-дигидродиола, катализируемое многокомпонентной нафталин диоксигеназой.

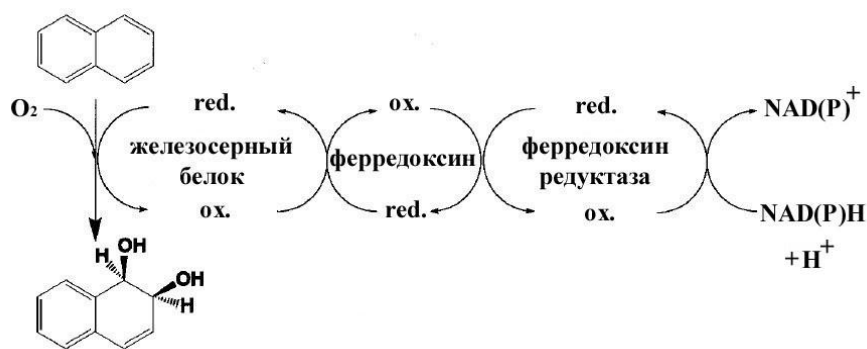


Рис. 4. Механизм работы нафталин-диоксигеназы

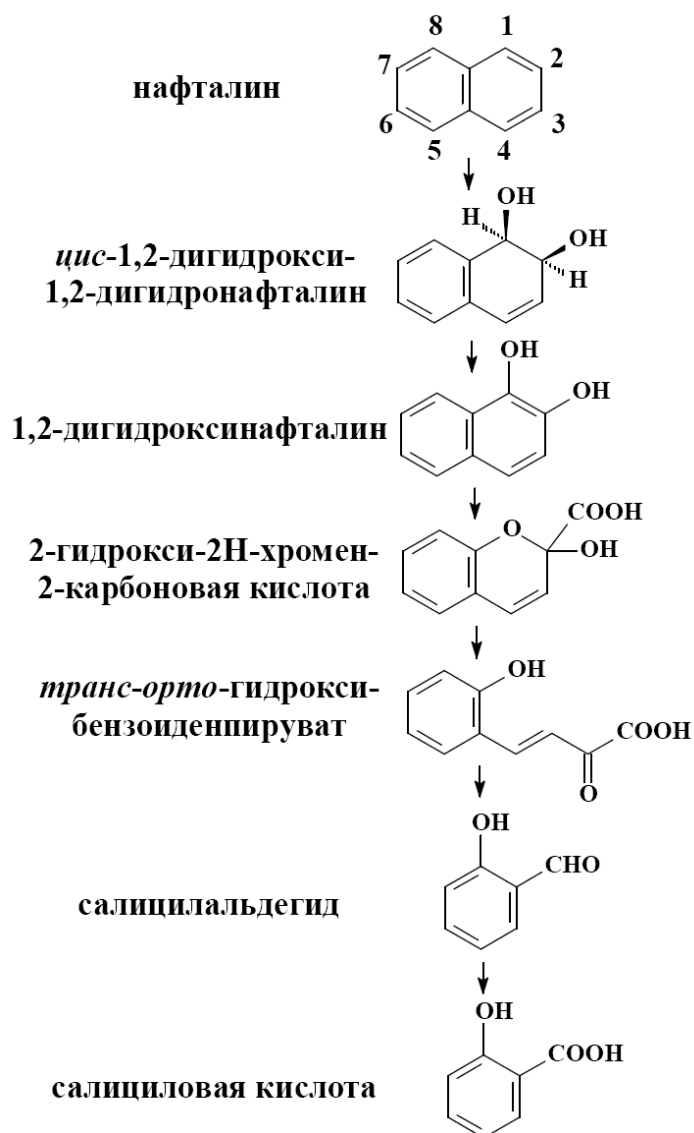


Рис. 5. Путь деградации нафталина до салициловой кислоты.

Салицилат, образующийся в ходе трансформации микроорганизмами нафталина, фенантрена и антрацена в дальнейшем может превращаться в катехол посредством салицилат гидроксилазы либо в гентизат с помощью салицилат-5-гидроксилазы (рис. 6).

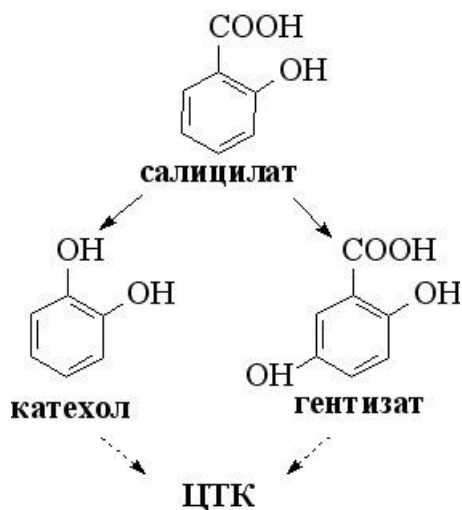


Рис. 6. Два пути деградации салициловой кислоты.

Последующее разложение катехола может протекать по *орто*-пути, который инициируется интрадиольной катехол 1,2-диоксигеназой с образованием *цис,цис*-муконата, и по *мета*-пути, осуществляемому экстрадиольной катехол 2,3-диоксигеназой с образованием 2-гидроксимуконного полуальдегида (рис. 7). Образовавшиеся продукты метаболизируются через ЦТК.

Дальнейшее разложение гентионата катализируется гентионат 1,2-диоксигеназой с образованием малеилпирувата.

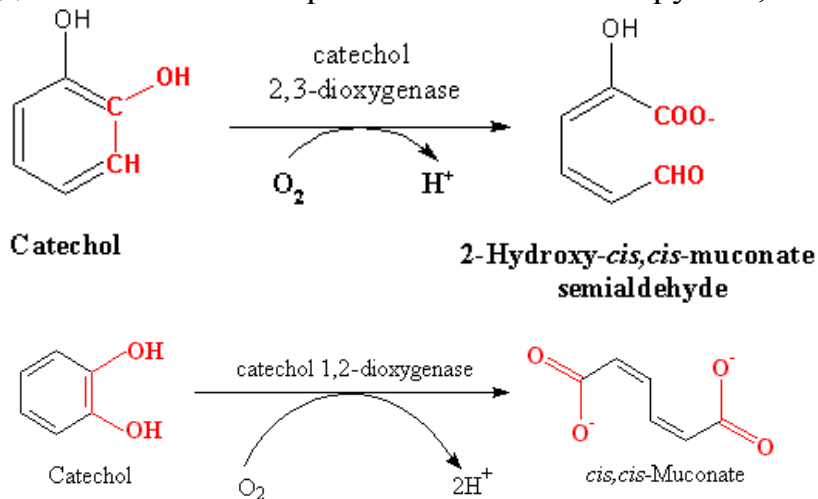


Рис. 7. Два пути деградации катехола

Задание

На основании данных полученных в предыдущей лабораторной работе по активности ферментов напишите полный путь распада нафталина, который осуществляет изучаемый микроорганизм.

Контрольные вопросы

1. *Какие этапы распада нафталина до основных метаболитов можно выделить?*
2. *Какие продукты могут образоваться при распаде салицилата?*
3. *Какими путями распадается катехол?*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТЕЙ ФЕРМЕНТОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ДЕГРАДАЦИИ КАПРОЛАКТАМА

Цель: Определить активность трансферазы – одного из ферментов деградации капролактама.

Основные положения

К соединениям, загрязняющим окружающую среду, относятся полиамидные волокна и пластики, капроновые волокна и нити, обратимость процесса получения, которых приводит к тому, что продукты полимеризации мономера капролактама всегда содержат определённое количество отходов - низкомолекулярных фракций олигомеров, как циклических, так и линейных. Также загрязняющими окружающую среду соединениями являются не только отходы производства капролактама, но и сами полимеры, получаемые на данном производстве.

В процессе полимеризации капролактама образуются побочные продукты, в том числе олигомеры капролактама и, в частности, линейные и циклические димеры.

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что при длительном воздействии относительно небольших доз капролактама на организм человека мишенями могут быть нервная система, система крови, репродуктивная функция.

К настоящему времени известен широкий круг микроорганизмов-деструкторов капролактама: *Absidia*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Byssochlamys*, *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* и др. [11-14,16, 22].

Некоторые из перечисленных микроорганизмов способны утилизировать капролактама как единственный источник углерода и энергии, другие требуют дополнительных источников углерода (например, глюкозу), используя капролактама только как источник азота, третьи - только как источник углерода.

Путь деградации капролактама представлен на рис 8.

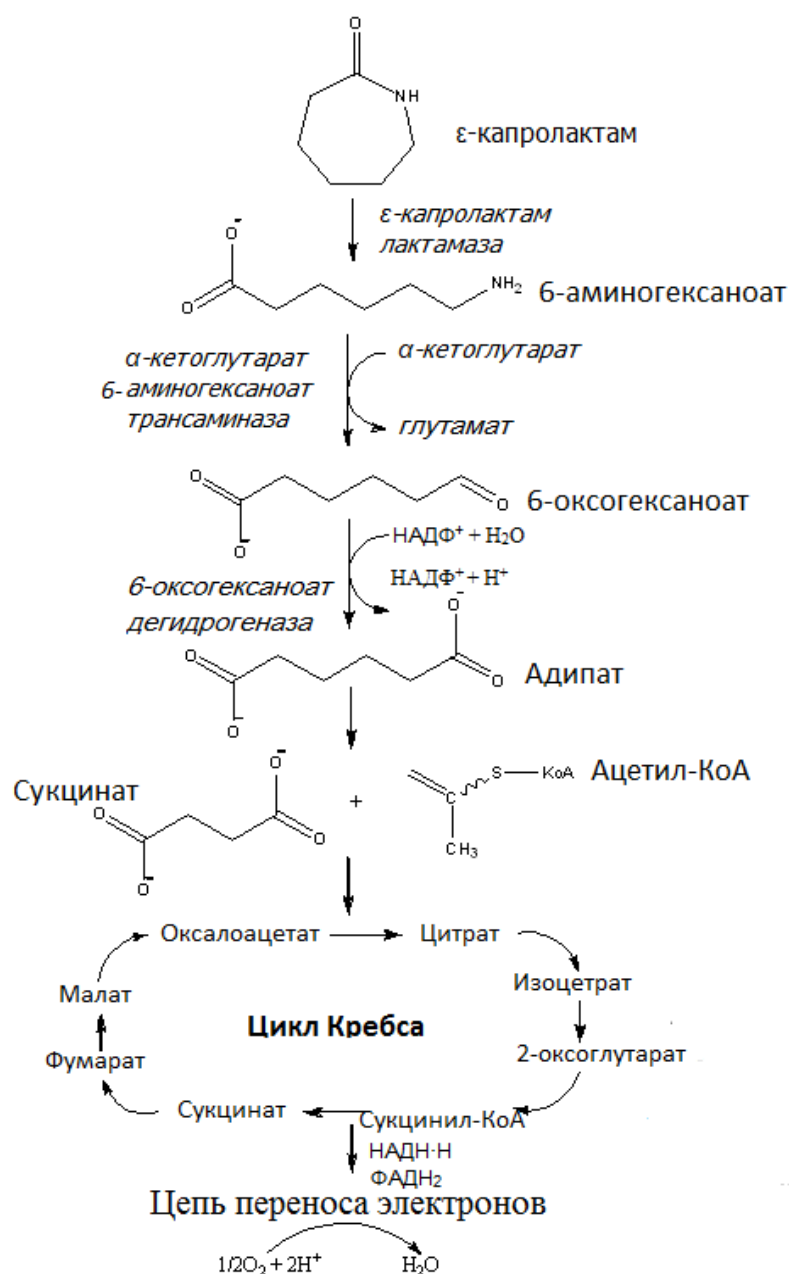


Рис. 8. Путь биодegradации ϵ -капролактама

Второй этап катаболизма ϵ -капролактама и начало деструкции ϵ -аминокапроната сопряжены с глутаматдегидрогеназным шунтовым механизмом (рис.9).

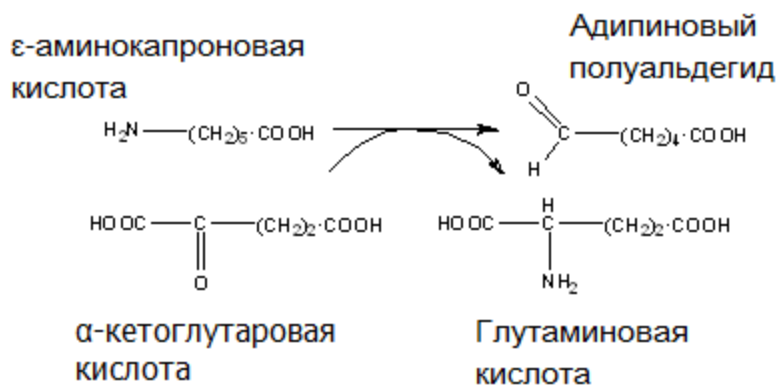


Рис. 9 Реакция переаминирования ε-аминокапроновой кислоты с α-кетоглутаровой

Материалы и оборудование

Орбитальная термостатируемая качалка, центрифуга для больших объемов, весы для уравнивания, микроцентрифуга, миксер, автоматические пипетки, стеклянные пробирки, пробирки Eppendorf, сермостат ТС-1/80 СПУ, электрическая плитка, металлическая кастрюля для водяной бани, спектрофотометр, рН-метр, ультразвуком на аппарате УЗГ13-01/22

Компоненты среды Эванса: $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, растворы: 5 М NH_4Cl ; 0,1 М Na_2SO_4 ; 1 мМ CaCl_2 ; 62 мМ MgCl_2 ; 0,005 мМ; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$;; Микроэлементы (2,0 г $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,41 г ZnO ; 5,4 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,17 г $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,48 г $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,06 г H_3BO_3 ; 10 мл HCl , 990 мл воды).

Реактивы: α-кетоглутарат (αКГ), ε-аминокапроновая кислота (εАКК), реактив МБТГ (3-метил-2-бензотиазолинон-2- гидрозон), безводный FeCl_3 , ацетон х\ч, раствор HCl (0,1 Н), раствор NaOH (0,1 Н), 20% трихлоруксусная кислота (ТХУ), физраствор.

Методика

1. Приготовить 100 мл среды Эванса добавить 0,1 г капролактама и простерилизовать автоклавированием.
2. Вырастить микроорганизмы деструкторы-капролактама на среде Эванса с капролактамом до середины экспоненциальной фазы роста (2-3 суток).
3. Получение ферментного препарата.
Биомассу собирают центрифугированием 8000 об/мин 7 мин. Дважды промывают физраствором.

Биомассу разбивают при охлаждении ультразвуком на аппарате УЗГ13-01/22 (режим: 12 циклов по 10 сек с перерывами 20 сек), центрифугируют (10-20 мин при 16000 об/мин при 4°C), надосадочную жидкость собирают, а осадок выбрасывают.

4. Измерение содержание белка в бесклеточном экстракте.

5. Определение концентрации белка спектрофотометрически

Метод не так точен, как метод Бредфорда, но очень прост и используется как прикидочный. Используя UV-160А спектрофотометр (Shimadzu, Япония) задаем параметры двух длин волн: 280 и 260 нм. В кювету с 2900 мкл фосфатного буфера вносим 100 мкл бесклеточного экстракта. Контрольная кювета - 3000 мкл фосфатного буфера. Затем по формуле рассчитываем концентрацию белка в мг.

$C \text{ (мг общего белка /мл)} = (1,55 \times E_{\lambda 280} - 0,76 \times E_{\lambda 260}) \times \text{разведение}$
(30 раз)

Количественное определение белка по методу Лоури

Приборы и реактивы:

1. Стандартный раствор БСА (бычий сывороточный альбумин),
2. Реактив А (2% раствор карбоната натрия в 0,1н растворе гидроксида натрия),
3. Реактив В (0,5% раствор сульфата меди в 1% растворе цитрата натрия),
4. Реактив Фолина,
5. Спектрофотометр или фотоэлектроколориметр.

Перед определением смешивают 50 мл реактива А и 1 мл реактива В – раствор С, реактив Фолина разбавляют в 2 раза.

Для приготовления градуировочного графика применяли стандартный раствор белка БСА с концентрацией 200мкг/мл, готовят растворы белка с концентрацией 10, 50, 100, 160, 200 мкг/мл.

Одновременно ставят пробирку с пробой неизвестной концентрации.

В каждую пробирку добавляют 5 мл реактива С, перемешивают. Через 10 минут добавляют 0,5мл разведенного в 2 раза реактива Фолина, тщательно перемешивают и помещают в термостат при 37°C на 30 минут для развития окраски. Фотометрируют на спектрофотометре при длине волны 750 нм.

6. Экспресс-метод определения трансаминазной активности

1. Смешать субстраты αКГ и εАКК в соотношении 1 ÷ 1 по 1,5 мл. На рН-метре довести до рН 8,6 посредством титрования раствора 0,1 Н НСl и 0,1 Н NaOH.

2. Распределить по 3-м стеклянным пробиркам приготовленного субстрата по 0,2 мл.

3. Добавить фермент, полученный ранее, по 0,1 мл.

4. Поставить пробирки с приготовленным раствором в термостат при температуре 37°C. Через 20 минут в первую пробирку добавляют 0,1 мл 20% ТХУ. Опыт повторяют через каждые 10 мин со следующими пробирками (Всего 60 мин).

5. Реакционную смесь перенести в 3 пробирки Eppendorf.

6. Центрифугирование в течении 10 минут при 4000 об\мин.

7. В 3 чистые пробирки Eppendorf добавить по 0,25 мл реактива МБТГ (См. приложение).

8. Из опытных пробирок, после центрифугирования, отнять по 0,025 - 0,05 мл надосадочной жидкости и прилить в пробирки Eppendorf с МБТГ.

9. Через 20 – 25 минут, после выпадения осадка, пробирки поместить в пустой термостойкий химический стакан. Поставить стакан с пробирками на кипящую водяную баню на 3 минуты.

10. После кипящей водяной бани пробирки охлаждают в воде до 20⁰С.

11. Содержимое пробирок Eppendorf перенести в 3 стеклянные пробирки.

12. В каждую пробирку добавить предварительно приготовленный раствор безводного FeCl₃ по 0,5 мл и встряхнуть.

13. Через 5 минут после FeCl₃ быстро прилить в каждую пробирку по 2 мл ацетона х\ч и встряхнуть.

14. Измеряют оптическую плотность при длине волны 660 нм

15. Строят графики зависимости оптической плотности от времени реакции.

16. Расчёт удельной трансаминазной активности (U_{уд}) проводили по формуле:

$$U_{уд} \left(\frac{\text{ммоль}}{\text{мин} * \text{мг} \text{ фермента}} \right) = \frac{V_{общ}(\text{л}) * \Delta E}{\varepsilon(\text{л} * \text{ммоль}^{-1} * \text{см}^{-1}) * l(\text{см}) * \Delta t(\text{мин}) * V_{образца}(\text{л}) * C_{фер}(\text{мг} / \text{л})}$$

где ΔE – изменение оптической плотности раствора; Δt – время измерения (мин); ε – коэффициент экстинкции субстрата (50 л*ммоль⁻¹см⁻¹ – для мономера и димера 6-аминокапроновой кислоты; 6,22 л*ммоль⁻¹см⁻¹ – для метилового эфира адипинового полуальдегида); l – ширина кюветы (1 см); V_{общ} – объем реакционной смеси (2,8*10⁻³ л – для определения трансаминазной активности; 10⁻³ л – для определение дегидрогеназой активности); V_{образца} – объем бесклеточного экстракта (0,1*10⁻³л - для определения трансаминазной активности; 10⁻⁴ л - для определение дегидрогеназой активности); C_{фер} – концентрация фермента (мг/л, полученная по методу Лоури)

Контрольные вопросы

1. **Какие метаболиты образуются при деградации капролактама?**
2. **На какой стадии деградации капролактама работает трансаминатза?**
3. **Напишите реакцию, которую катализируется трансаминаза?**

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7 ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

Цель Выделить плазмидную ДНК из штаммов-деструкторов нафталина и капролактама.

Основные положения

Для выделения плазмидной ДНК пользуются многими методами. Все они включают три основных этапа: рост бактерий и амплификацию плазмиды; сбор бактерий и их лизис; очистку плазмидной ДНК.

В методах очистки так или иначе используют два основных различия между хромосомной ДНК и плазмидной ДНК: 1) хромосома по размеру много больше ДНК плазмид 2) основная масса хромосомной ДНК выделяется из клеток в виде фрагментированных линейных молекул, тогда как большинство плазмидной ДНК экстрагируется в виде ковалентно замкнутых кольцевых молекул.

Большинство методов очистки включают осаждения, при которых из препарата удаляются преимущественно длинные цепи хромосомной ДНК, случайно захваченные обломками лизированных клеток. Методики основаны также на использовании свойств кольцевой замкнутой ДНК. Каждая из комплементарных цепей плазмидной ДНК представляет собой ковалентно замкнутое кольцо, поэтому цепи нельзя отделить друг от друга (не разорвав одну из них) в тех условиях, при которых происходит разрыв большинства водородных связей в хромосомной ДНК, например при нагревании или при выдерживании в умеренно щелочных растворах (до pH 12,5). При охлаждении или возвращении к нейтральному pH замкнутые кольцевые молекулы вновь принимают нативную конформацию, тогда как хромосомная ДНК остается денатурированной.

Плазмидная ДНК ведет себя отлично от хромосомной ДНК также и при равновесном центрифугировании в градиентах растворов хлористого цезия, содержащих какой-нибудь интеркалирующий (встраивающийся вмежду нуклеотидами) краситель в насыщающей концентрации, например бромистый этидий или диодистый пропидий. Ковалентно замкнутые кольцевые ДНК связывают меньше такого красителя, чем линейная ДНК, и потому в градиентах хлористого цезия, содержащих интеркалирующий агент, оказываются в зонах с более высокой плотностью. Эту методику используют, если необходима высокая степень очистки плазмидной ДНК. Однако по мере развития методов работы с рекомбинантными ДНК для многих целей оказалось уже необязательным проводить очистку больших количеств плазмидной ДНК до такой степени, чтобы препарат был гомогенным. Например, расщепление рестриктирующими эндонуклеазами, лигирование, трансформация и даже секвенирование ДНК можно проводить теперь, используя относительно малоочищенные препараты плазмидной ДНК, полученные из небольших объемов культуры (около 10 мл). Плазмидную ДНК выделяют из больших объемов культуры лишь в тех случаях, когда нужны значительные ее количества (например, в опытах по гибридизации для отбора специфических мРНК или когда нужно пометить 5'-концы фрагментов ДНК с помощью полинуклеотидкиназы).

Вообще говоря, чем меньше плазмида, тем лучше достигаемые результаты. С увеличением молекулярной массы плазмиды ее свойства становятся все ближе к свойствам ДНК хозяина. Выделение плазмид, размер которых превышает 25 т.п.н., сильно затрудняется и выход оказывается невысоким.

**Выделение малокопийной плазмидной ДНК (размером до 250 т.п.н.)
из 50 мл труднолизируемых бактериальных культур**
Материалы и оборудование

Орбитальная термостатируемая качалка, центрифуга для больших объемов, весы для уравнивания, микроцентрифуга, миксер, автоматические пипетки

Растворы

Отмывочный раствор: 50мМ EDTA pH8, 1М NaCl, (0.02% деоксихолат, 0.05% лаурил саркозин)

Растворы №1: 50мМ EDTA pH8 с лизоцимом (5-10 мг/мл)

Растворы №2: 1% SDS, 0.2М NaOH

Растворы №3: 3М ацетат калия pH4.8 (охлажденный в холодильнике)

Растворы №4: фенол насыщенный 1М трисHCl pH=8.0

Растворы №5: хлороформ

Растворы №6: 10мМ трисHCl, 1мМ EDTA pH=8.0 (TE)

Методика

1. Выращиваем культуру клеток в 50 мл подходящей среды в течение 12-16 часов.
2. Осаждаем 50 мл культуры в 50 мл центрифужной пробирке на центрифуге в течение 10 мин при 10 000 об/мин (угловой ротор) при температуре 4-10°C
3. (Осадок замораживаем/оттаиваем с -20°C на +37°C)
4. В оттаявший осадок добавляем 20 мл отмывочного раствора и тщательно ресуспендируем на миксере
5. Центрифугируем 10 мин 10 000 об/мин, сливаем супернатант.
6. Осадок тщательно ресуспендируем в 3 мл р-ра №1
7. Выдерживаем в термостате при 37°C 10-15 мин
8. Добавляем 3 мл р-ра №2, аккуратно (осторожно) перемешиваем и выдерживаем в термостате при 37°C 10-15 мин (до полного лизиса клеток, раствор должен стать совершенно прозрачным)
9. Добавляем 3 мл р-ра №3, аккуратно (осторожно) перемешиваем до тех пор, пока не образуется занимающий почти весь объем раствора белый комочек, состоящий из хромосомной ДНК и белков. Ставим охлаждаться на лед на 15 мин

- 10.Центрифугируем 20 мин 10 000 об/мин. Должен образоваться плотный белый осадок
- 11.Супернатант через двойную марлю сливаем в новую 50 мл пробирку.
- 12.Затем добавляем 5 мл хлороформа и тщательно перемешиваем на миксере
- 13.Центрифугируем 20 мин.
- 14.8 мл верхней водной фазы (с помощью обрезанного синего носика) аккуратно (стараясь не захватить интерфазу) отбираем в новую пробирку и добавляем туда 6 мл изопропанола. Тщательно перемешиваем и ставим на лед на 5 мин.
- 15.Центрифугируем 20 мин.
- 16.Выливаем супернатант, отбираем оставшуюся водную фазу, осадок подсушиваем.
- 17.Осадок тщательно ресуспендируем в 500 мкл ТЕ, переносим в микропробирку типа «эппендорф».
- 18.Добавляем 250 мкл фенола, перемешиваем на миксере, затем добавляем 250 мкл хлороформа и тщательно перемешиваем на миксере до образования равномерной белой мути.
- 19.Центрифугируем 5 мин.
- 20.Супернатант отбираем в новую микропробирку, добавляем 50 мкл р-ра №3 и равный объём изопропанола (или двойной объём этанола).
- 21.Центрифугируем 5 мин.
- 22.Осадок промываем 70% спиртом и ресуспендируем в 50 мкл ТЕ.
- 23.Наносим на агарозный гель 5-10 мкл препарата с краской для нанесения.

Контрольные вопросы

1. *Что такое плазмиды?*
- 2 *В чем различия плазмидной ДНК и хромосомной?*
3. *Для чего используют NaCl в отмывочном растворе?*
4. *Каков принцип действия растворов №1, 2 и 3?*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8. ВЫДЕЛЕНИЕ ТОТАЛЬНОЙ ДНК

Цель Выделение totalной ДНК из штаммов деструкторов нафталина и капролактама

Основные положения

Процедура выделения ДНК из клеток часто является исходным этапом в молекулярно-биологических исследованиях. Среди множества известных методов выделения ДНК на практике используют наиболее надежные и воспроизводимые. Клетку необходимо разрушить тем или иным способом, а высвободившиеся нуклеиновые кислоты очистить от других клеточных компонентов. При этом важно защитить ДНК от действия клеточных нуклеаз и попытаться максимально сохранить ее целостность.

Плазматическая мембрана клетки разрушается действием детергента додецилсульфата натрия (SDS) или лизоцима. Белки денатурируют и удаляют из бактериального лизата путем обработки фенолом. Низкомолекулярные вещества теряются при высаживании ДНК из раствора этанолом. Добавление хелатирующего реагента – этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) к полученному препарату ДНК предотвращает воздействие клеточных нуклеаз на нуклеиновые кислоты за счет связывания двухвалентных катионов Mg^{2+} .

Выделение тотальной ДНК из 1,5 мл культуры бактериальных клеток

Материалы и оборудование

Орбитальная термостатируемая качалка, микроцентрифуга, миксер, автоматические пипетки

Растворы

Растворы №1: 50мМ EDTA pH=8.0 с лизоцимом (5-10 мг/мл)

Растворы №2: фенол насыщенный 1М трисHCl pH=8.0

Растворы №3: хлороформ

TE: 10мМ трисHCl, 1мМ EDTA pH=8.0

Методика

1. Выращиваем культуру бактериальных клеток в 5 мл соответствующей среды в течение 12-16 часов.
2. В микроцентрифужной пробирке объемом 1.5 или 2 мл осаждаем 1.5 мл культуры при максимальных оборотах (12000 об/мин) на центрифуге типа «Эппендорф» в течение 1 мин.
3. В 500 мкл раствора №1 рессуспендируем пипетированием осадок клеток до равномерной плотности и ставим в термостат (37°C 10 мин).
4. Добавляем к полученной суспензии клеток 200 мкл раствора №2 и интенсивно перемешиваем на миксере.
5. Добавляем 200 мкл раствора №3 и активно перемешиваем на миксере до появления равномерной белой мути
6. Центрифугируем 5 мин при 12000 об/мин.
7. Отбираем 500 мкл супернатанта в новую пробирку
8. Добавляем 200 мкл раствора №2 и интенсивно перемешиваем на миксере до появления равномерной белой мути.
9. Добавляем 200 мкл раствора №3 и тщательно перемешиваем на вортексе до появления равномерной белой мути
10. Центрифугируем 5 мин.
11. Отбираем 400 мкл супернатанта в новую пробирку
12. Добавляем 400 мкл изопропанола, перемешиваем на миксере
13. Центрифугируем 5 мин, затем тщательно сливаем супернатант
14. Осадок рессуспендируем в 100 мкл буфера TE
15. Наносим на агарозный гель 5-10 мкл препарата с краской для нанесения

Контрольные вопросы

- 1. В чем принципиальные различия в выделении плазмидной и тотальной ДНК?**
- 2. Зачем в процессе выделения тотальной ДНК добавляют изопропанол?**
- 3. Кратко опишите другие методы выделения тотальной ДНК?**

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9. ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ПРЕПАРАТОВ ПЛАЗМИДНОЙ И ТОТАЛЬНОЙ ДНК. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

Цель Визуализация препаратов плазмидной и тотальной ДНК полученных в предыдущих лабораторных работах

Основные положения

Электрофорез в агарозном геле — стандартный метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК. С помощью этой простой техники можно быстро разделить такие смеси фрагментов ДНК, которые не могут быть разделены другими способами, например центрифугированием в градиенте плотности. Кроме того, при разделении в геле прямо следят за положением ДНК, так как полосы ДНК в геле можно окрашивать флуоресцирующим и интеркалирующим в ДНК красителем — бромистым этидием в низкой концентрации. Просматривая прокрашенный гель в ультрафиолетовом свете, можно заметить даже 1 нг ДНК.

Скорость миграции ДНК через агарозный гель при электрофорезе определяется пятью главными параметрами, рассмотренными ниже.

Размер молекул ДНК. Молекулы линейной двухцепочечной ДНК перемещаются в геле предположительно одним концом вперед со скоростями, обратно пропорциональными десятичному логарифму их молекулярных масс (Рис. 10).

Концентрация агарозы. Фрагменты ДНК данного размера перемещаются в геле, содержащем разные концентрации агарозы, с разными скоростями. Между логарифмом электрофоретической подвижности ДНК μ и концентрацией геля τ существует прямая зависимость, описываемая уравнением

$$\lg \mu = \lg \mu_0 - K_{\tau} \tau,$$

где μ_0 — свободная электрофоретическая подвижность, K_{τ} называется коэффициентом замедления и зависит от свойств геля, а также от величины и формы движущихся молекул.

Таким образом, применяя гели разных концентраций, можно разделить большой набор фрагментов ДНК, различающихся по размеру.

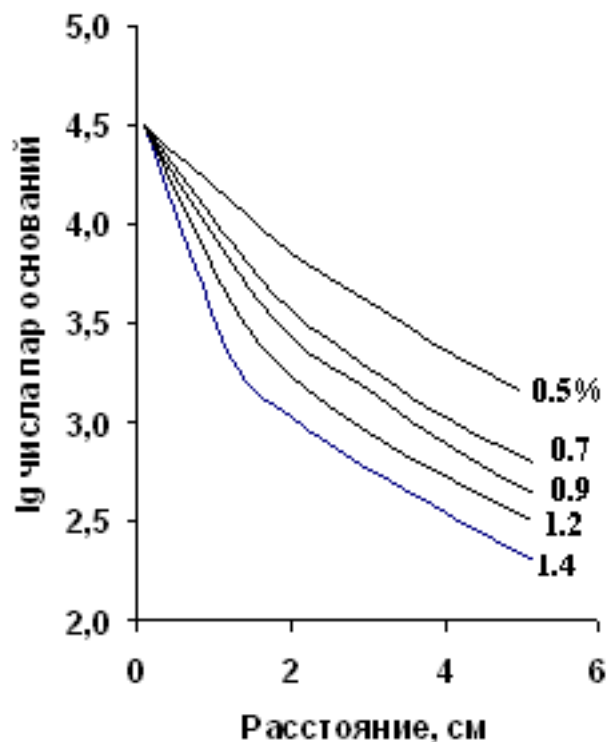


Рис.10. Зависимость скорости движения фрагментов ДНК при электрофорезе в геле от их размеров.

Таблица 1

Зависимость области эффективного разделения линейных молекул ДНК от концентрации агарозы в геле

Количество агарозы в геле, %	Область эффективного разделения линейных молекул ДНК, т.п.н.
0,3	60-5
0,6	20-1
0,7	10-0,8
0,9	7-0,5
1,2	6-0,4
1,5	4-0,2
2,0	3-0,1

Конформация ДНК. ДНК, имеющие одинаковую молекулярную массу, но разные конформации, например кольцевая неповрежденная (форма I), кольцевая с одноцепочечным разрывом (форма II) и линейная (форма III), движутся в агарозном геле с разными скоростями. Относительная подвижность трех указанных форм зависит главным образом от концентрации агарозы в геле, а также и от таких факторов, как сила тока, ионная сила буфера или плотность сверхспиральных витков в форме I. В одних условиях форма I перемещается быстрее, а в других - медленнее, чем

форма III. Чтобы однозначно определить конформацию ДНК, необходимо провести ее электрофорез в присутствии возрастающих концентраций бромистого этидия. С увеличением концентрации красителя число его молекул связанных с ДНК растет. При этом отрицательные сверхспиральные витки в молекулах формы I постепенно исчезают, а скорость движения ДНК в геле уменьшается. При некоторой критической концентрации свободных молекул красителя, когда в ДНК больше не остается сверхспиральных витков, скорость движения формы I достигает минимальной величины. Последующее добавление новой порции бромистого этидия приводит к образованию положительных сверхспиральных витков, в результате чего подвижность формы I начинает быстро возрастать. Подвижности формы II и формы III в описанных условиях снижаются, хотя и по-разному, вследствие нейтрализации зарядов и увеличения жесткости молекул ДНК под влиянием бромистого этидия. Для большинства препаратов ДНК, находящейся в форме I, критическая концентрация бромистого этидия находится в области 0,1—0,5 мкг/мл.

Напряженность электрического поля. При низких напряженностях скорость перемещения фрагментов линейной ДНК пропорциональна приложенному напряжению. Однако с увеличением напряженности электрического поля подвижность фрагментов ДНК с высокой молекулярной массой дифференциально возрастает. Следовательно, с увеличением напряженности область эффективного разделения ДНК в агарозном геле снижается. Максимальное разделение фрагментов происходит при напряженности, не превышающей 5В/ см.

Состав оснований и температура. Электрофоретическое поведение ДНК в агарозных гелях (в отличие от поведения в полиакриламидных гелях) слабо зависит от состава оснований ДНК или температуры геля. В агарозных гелях в области температур от 4 до 30 °С изменения относительной электрофоретической подвижности фрагментов ДНК разного размера не наблюдается. Обычно электрофорез в агарозных гелях ведут при комнатной температуре. Однако следует отметить, что гели, содержащие менее 0,5% агарозы, очень мягкие, поэтому с ними лучше работать при 4°С — в этих условиях они становятся более плотными.

Приспособления для проведения электрофореза в геле

За годы, прошедших после изобретения электрофореза в агарозном геле, было предложено множество конструкций электрофорезных аппаратов. В настоящее время чаще всего используют гели в виде горизонтальных пластинок. Эта система имеет по крайней мере четыре преимущества: 1) можно применять низкие концентрации агарозы в связи с тем, что весь гель поддерживается снизу; 2) можно готовить гели в виде пластинок самых разных размеров; 3) хранение и разливание гелей, а также последующие манипуляции с ними достаточно просты; 4) для постановки электрофореза в гелях можно применять прочные и недорогие аппараты.

При проведении электрофореза в горизонтальном геле используются разнообразные кюветы. Большинство из них представляет собой модификации прибора, предложенного Шефнером, в котором гель размещается на отдельной стеклянной пластинке. Пластинку устанавливают на платформе таким образом, что гель находится под самой поверхностью электрофорезного буфера. Сопротивление геля проходящему электрическому току мало отличается от сопротивления буфера, поэтому по гелю проходит значительная доля тока.

Буферы

Для электрофореза обычно применяют буферы, содержащие трис-ацетат, трис-борат или трис-фосфат в концентрации 50 мМ и имеющие рН 7,5—7,8 (Табл. 2). Чаще всего их готовят в виде концентрированных растворов и хранят при комнатной температуре.

Исторически сложилось так, что чаще других используют трис-ацетат, хотя его буферная емкость довольно низка, и при продолжительных электрофорезах он истощается (анод становится щелочным, а катод — кислотным). В связи с этим обстоятельством рекомендуется предусмотреть возможность рециркуляции буфера между катодным и анодным резервуарами.

Таблица 2.

Буферы, используемые при электрофорезе

Буфер	Рабочие растворы	Концентрированные растворы (на 1л)
Трис-ацетат (ТАЕ)	0,04 М трис-ацетат 0,002 М ЭДТА	(50X): 242 г триса, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты, 100 мл 0,5 М ЭДТА, рН 8,0
Трис-фосфат (ТРЕ)	0,08 М трис-фосфат 0,008 М ЭДТА	(10X): 108 г триса, 15,5 мл 85%-ной фосфорной кислоты (1,679 мкг/мл), 40 мл 0,5 М ЭДТА, рН 8,0
Трис-борат (ТВЕ)	0,089 М трис-борат 0,089 М борная кислота, 0,002 М ЭДТА	(5x): 54 г триса, 27,5 г борной кислоты, 20 мл 0,5 М ЭДТА, рН 8,0

Трис-фосфатный и трис-боратный буферы обеспечивают хорошее разделение фрагментов ДНК в равной степени и имеют значительно более высокую буферную емкость, чем трис-ацетатный. Рециркуляция этих буферов необязательна. Дополнительное, хотя и не особенно важное преимущество трис-фосфата состоит в том, что гели, приготовленные на нем,

растворимы в хаотропных агентах, таких, как перхлорат натрия или йодид калия. Это свойство лежит в основе метода (теперь мало используемого) выделения фрагментов ДНК из гелей.

Материалы и оборудование

Образец плазмидной ДНК, камера для электрофореза, источник постоянного тока, трансиллюминатор, автоматические пипетки, планшеты

Растворы

Концентрированный трис-боратный буфер (ТБЕ):

трис(оксиметил)аминометан – 108 г/л; борная кислота - 55 г/л; 0,5 М ЭДТА (рН 8) – 40 мл/л реактива

Агарозный гель: агароза для электрофореза – 8 г/л; концентрированный ТБЕ-буфер – 5мл/л; бромистый этидий – 1 г/л

Методика

1. Приготовить агарозный гель (0,8 %), дать ему остыть до 40-50°C, и затем залить гель в планшеты с соответствующей гребенкой.
2. После застывания геля вынуть гребенку.
3. Планшеты поместить в камеру для электрофореза.
4. Залить буфер.
5. Смешать 10 мкл раствора ДНК с 1-2 мкл красителя.
6. Нанести в лунки геля препарат ДНК с краской для нанесения.
7. Электрофорез проводить в 0.5× буфере ТБЕ при напряжении 100 В в течение 0,5 - 4 часов в зависимости от размера ДНК.
8. Вынуть плашку и просмотреть в УФ-свете при 365 нм.
9. Сфотографировать гель цифровой фотокамерой и сохранить.

Контрольные вопросы

1. **Дайте определение понятию «электрофорез», какие виды электрофоретических процессов существуют?**
2. **Как зависит выбор концентрации агарозного геля от размера ДНК?**
3. **Как подбирают условия проведения электрофореза?**
4. **Какие бывают конформации ДНК и как их определяют?**
5. **Какие буферы используют для проведения электрофореза? Каково преимущества каждого из них?**
6. **Какие красители и используют при проведении электрофореза?**
7. **Каковы преимущества горизонтальных систем для проведения электрофореза?**

Библиографический список.

Основная

1. И.Ф. Пунтус, Л.И. Ахметов, А.Е. Флонов, И.А. Нечева, Т.В. Рогова. Генетические методы биотехнологии защиты окружающей среды. Учебно-методическое пособие. Тула: Изд-во ТулГУ, 2008, 123с.

Дополнительная

1. Т.Маниатис, Э.Фрич, Дж.Сэмбрук «Молекулярное клонирование», М.: «МИР», 1984.
2. Р.И.Салганик (отв.редактор) «Методы молекулярной генетики и генной инженерии», Новосибирск «НАУКА», 1990.
3. Л.А.Остреман «Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование», М.: «НАУКА», 1981.
4. Т.Маниатис, Э.Фрич, Дж. Сэмбрук «Молекулярное клонирование», М.: «МИР», 1984.
5. Миллер Дж. 1976. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир. С.392-398.