



2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto „Žmogiškųjų išteklių plėtra“
4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų plėtra“

Projekto sutarties numeris: **ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261**

Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymo(si) metodai ir naujausios technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

MIKROBIOLOGIJA

Laboratorinis darbas.

Mikroorganizmų identifikavimas molekulinės biologijos metodais

Darbo tikslas – paruošti mėginius mikroorganizmų DNR sekos nustatymui

Darbo užduotys:

1. Ampiflikuoti mikroorganizmų 16S ribosominę DNR;
2. Įvertinti reakcijos rezultatą atlikus horizontalią DNR elektroforezę;

Mikroorganizmus galima identifikuoti nustatant eilę jų biocheminių savybių. Tam reikia gauti grynas mikroorganizmų kultūras, jas auginti įvairiomis sąlygomis. Ankstesniuose šio ciklo laboratoriniuose darbuose išmokote nustatyti kai kuriuos mikroorganizmų požymius – fermentų išskyrimą, kvėpavimo būdą, nitrato redukciją ir kt. Tiriamos mikroorganizmų kultūros priklausomybė vienai ar kitai mikroorganizmų grupei nustatoma pagal savybių visumą.

Dabar vis plačiau naudojami greitesni identifikavimo būdai, paremti mikroorganizmų makromolekulių analize. Pvz., DNR Sekos nustatymas ne tik leidžia tiksliai identifikuoti mikroorganizmus, bet ir nustatyti jų filogenetinius ryšius su kitomis rūšimis. Be to, šiuo būdu galima tirti ir tuos mikroorganizmus, kurių neįmanoma kultivuoti, o tokių yra dauguma (manoma, kad netgi 97proc. visų bakterijų rūšių).

Norint nustatyti DNR seką, reikia padauginti (ampiflikuoti) tam tikrą DNR fragmentą. Tai daroma panaudojant polimerazinę grandininę reakciją. Analizuojama 16S ribosominę RNR koduojanti

DNR seka. Dalis 16S rRNR geno sekos yra universali visoms bakterijoms (todėl buvo galima sukurti universalius pradmenis), kitos dalys yra unikalios.

Darbo priemonės:

Spiritinė lempelė

Mikrobiologinė kilpelė arba adata

Tiriamos bakterijų kultūros

Stalinė centrifuga

Fiziologinis tirpalas

Termocikleris

Automatinės pipetės su keičiamais antgaliais (0,5-10 mikrolitrų tūrio)

PCR mėgintuvėliai

Polimerazinės grandininės reakcijos mišinys (buferis, polimerazė ir kt.)

Universalūs bakteriniai pradmenys

DNR ampifikacija:

DNR padauginama polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) būdu.

Darbo eiga:

1. Suskaičiuokite reikalingą bendrą PGR reakcijos mišinio tūrį bei atskirų komponentų tūrius. (Tai priklauso nuo turimų mėginių kiekio ir reakcijos komponentų tirpalų koncentracijų);
2. Paimkite 1ml šviežios bakterijų kultūros ir ją nucentrifuguokite ependorf tipo mėgintuvėlyje, naudodami stalinę centrifugą; nuosėdas nuplaukite fiziologiniu tirpalu (resuspenduokite ir vėl nucentrifuguokite). Resuspenduokite 1ml fiziologinio tirpalo ir paruoškite keletą skiedimų;
3. Paruoškite reikiamo tūrio PGR reakcijos rinkinį. Jame turi būti: buferis, dezoksinukleotidai, du pradmenys, DNR polimerazė (polimerazė įdedama po ląstelių suardymo); galima naudoti gamintojo paruoštą buferį (jame yra visi komponentai išskyrus pradmenis).
4. Išpilstykite PGR mišinį į kelis mėgintuvėlius, įdėkite į juos bakterijų suspensijos; bendras vieno mėgintuvėlio tūris 20-50 mikrolitrų; į vieną mėgintuvėlį vietoj bakterijų suspensijos įdėkite atitinkamą tūrį sterilaus vandens (neigiama kontrolė);

- Įdėkite mėgintuvėlius į termociklerį; suardykite ląsteles kaitindami mėgintuvėlius 98°C 10min; atvėsinkite, įdėkite į kiekvieną mėgintuvėlį polimerazės.
- Paleiskite PGR programą. Mėgintuvėliuose esanti DNR denatūruojama 1,5min 94°C, po to vyksta pradmenų sukibimas su DNR (55°C, 1min), po to DNR sintezė (72°C, 1min). Toks ciklas kartojamas 25 kartus. Pasibaigus paskutiniam ciklui 7min skiriama sintezės pabaigai (72°C), paskui mėginiai atvėsunami iki 4°C. Visas procesas užtrunka apie 2val.

Dabar mėgintuvėliuose yra ampiflikuota DNR. Ji sekvenuojama (tai galima atlikti nusiuntus į komercinę laboratoriją). Nustatyta DNR seka lyginama su DNR sekomis esančiomis duomenų bazėse, pvz., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Ampiflikuotą DNR galima pamatyti atlikus DNR elektroforezę.

Dėmesio. Ruošdami reakcijų mišinius dirbkite su guminėmis pirštinėmis, specialiai tam pritaikytoje vietoje, kad tikimybė užteršti reakcijos mišinius būtų minimali.

Elektroforezė

Darbo priemonės:

Horizontalios elektroforezės sistema

Transiluminatorius

Agarozė

TAE (triso, acto rūgšties EDTA buferis)

Etidžio bromido dažai

Elektroforezės dažai

DNR dydžio žymuo

- Paruoškite 1,6proc. agarozės gelį TAE buferyje. Išlydykite jį mikrobangėje.
- Atvėsinkite gelį maždaug iki 50°C, įpilkite į gelio formą (neturi susidaryti burbulai). Įdėkite šukas takeliams. Palaukite kol gelis sustings (15-20min);
- Užpildykite TAE buferiu elektroforezės kamerą, įdėkite į ją sustingusį gelį, atsargiai išėmę šukas. Gelis turi būti apsemtas.

4. Sumaišykite DNR mėginius su dažais ir suleiskite mėginius į šulinėlius agarozės gelyje; Vieną šulinėlį paskirkite DNR dydžio žymeniui;
5. prijunkite elektrodus prie nuolatinio srovės šaltinio ir paleiskite elektroforezės procesą (įtampa 100 -120V);
6. Apie elektroforezės eigą galima spręsti pagal elektroforezės dažų judėjimą geliu. Pasibaigus forezei, išjunkite srovės šaltinį, atjunkite elektrodus, išimkite gelį ir dažykite jį etidžio bromido tirpale (koncentracija - 1 mikrogramas mililitre);
7. Nuplaukite gelį kranu vandeniu, padėkite ant transiliuminatoriaus ir įjunkite ultravioletinę šviesą; Nustatykite ar visuose takeliuose yra DNR juostos, nustatykite jų dydį (pagal DNR dydžio žymenį); nufotografuokite vaizdą.

Dėmesio. Naudokite gumines pirštines dirbdami su etidžio bromidu, tai galimas mutagenas. Etidžio bromido atliekų negalima pilti į kriauklę, reikia tam naudoti specialų indą. Nežiūrėkite į įjungtą transiliuminatorių be nuo UV spindulių saugančio skydo.

Literatūra:

Ian L. Pepper, Charles P. Gerba. Environmental Microbiology, 2004.
Michael T. Madigan ir kt. Brock Biology of Microorganisms, 2008.