

ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова Минздравсоцразвития
России.

Анализ генной экспрессии на модели *Mycoplasma gallisepticum*.

Отчет о выполнении летней лабораторной практики.
Лаборатория протеомного анализа НИИ ФХМ.

Выполнил: студент 482 «Б» группы
отделения биохимии МБФ
Киселев Иван.

2011 г.

Оглавлени
е



Оглавление.

- [Информация о докладчике.](#)
- [Введение](#)
- [Морфология микоплазм.](#)
- [Культуральные особенности.](#)
- [Особенности культивирования микоплазм. Микоплазменная среда.](#)
- [Методики.](#)
- [Постановка цветового теста.](#)
- [Выделение РНК из культуры.](#)
- [Выделение геномной ДНК из культуры.](#)
- [Реакция обратной транскрипции.](#)
- [ПЦР в реальном времени.](#)
- [Результаты реакции.](#)
- [Электрофорез молекул ДНК в агарозном геле.](#)
- [Получение кинетики роста культуры в периодической среде.](#)
- [Приложение.](#)
- [Использованная литература.](#)
- [Источники изображений.](#)

Информация о докладчике.



- Киселев Иван Сергеевич – студент медико-биологического факультета **ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова Минздравсоцразвития России.** Отделение – биохимия, 481 группа.
- e-mail: kiselev.ivan.1991@yandex.ru

Работа выполнялась на базе лаборатории протеомного анализа НИИ физико-химической медицины (Москва, ул. Малая Пироговская, 1а).

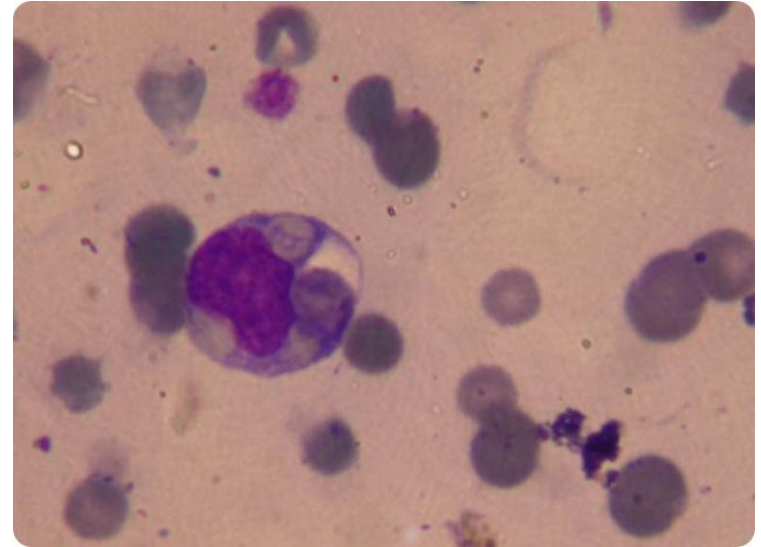


Оглавлени
е



Введение.

- Микоплазмы — самые мелкие из известных организмов с клеточной структурой, составляют класс Mollicutes и относятся к прокариотам.

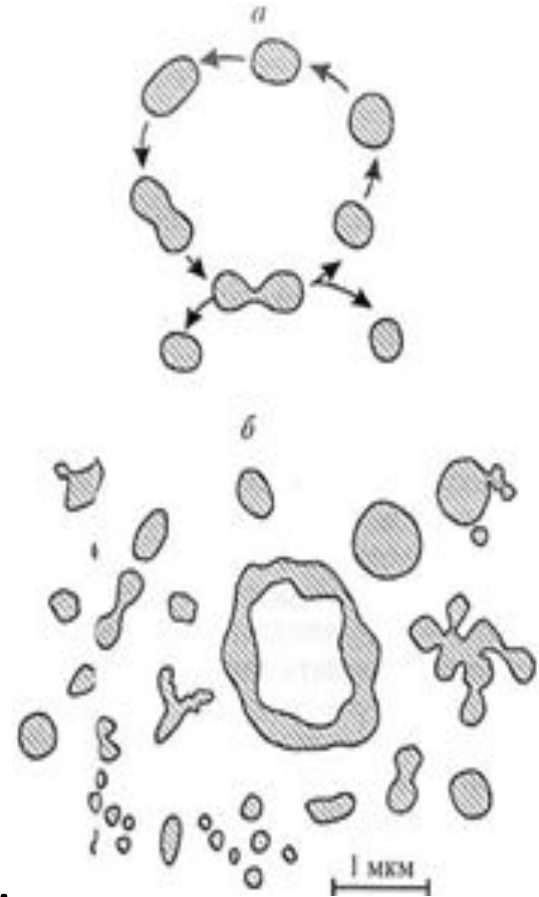


- Научный интерес представляет ответ клетки микоплазмы на шоковое воздействие. Его можно проследить по изменению уровня экспрессии тех или иных генов по сравнению с нормой.



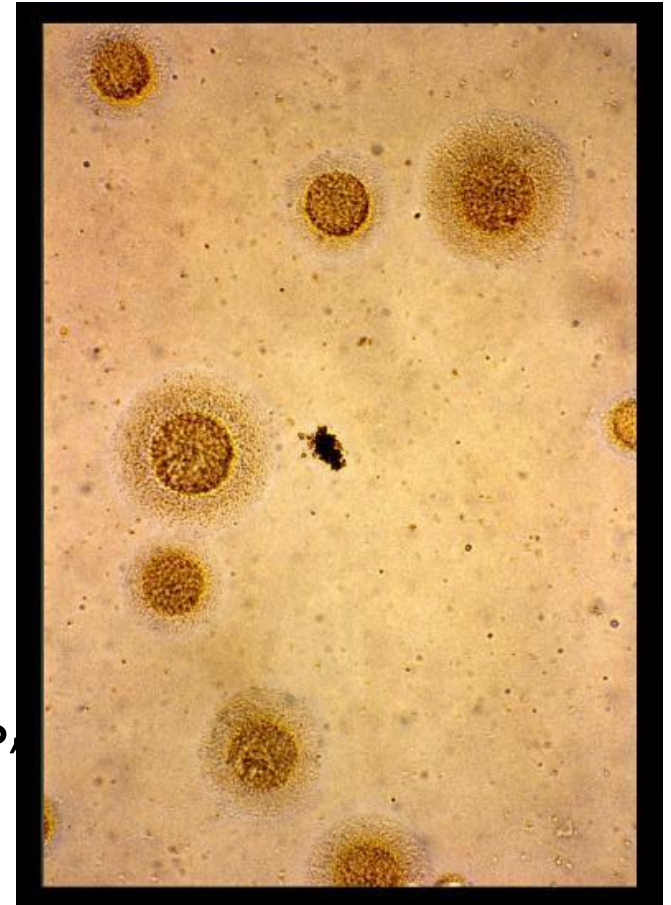
Морфология микоплазм.

- Клетки микоплазм не ограничены клеточной стенкой, но обладают более стабильной плазматической мембраной, модифицированной холестерином.
- Клетки одной и той же микоплазмы могут быть сферической (или вытянутой) формы 0,3 - 0,8 мкм в диаметре, могут образовывать длинные (до 100 мкм), иногда ветвящиеся тяжи. Коккоидные структуры иногда образуют кольцо.



Культуральные особенности.

- Культивирование микоплазм требует приготовления сложных питательных сред, в состав которых входят дополнительные факторы роста.
- Микоплазмы не чувствительны к β -лактамным антибиотикам. Следовательно, рост посторонних бактерий можно достаточно легко подавлять.
- Колонии микоплазм при росте на плотной среде напоминают яичницу глазунью — непрозрачная центральная часть, погруженная в среду, и просвечивающая периферия в виде круга.



Особенности культивирования микоплазм. Микоплазменная среда.

Для приготовления 1л среды:

Триптоза (г)	NaCl (г)	Tris (г)	KCl (г)	HCl (мл)	H ₂ O (л)
20	5	3	1,3	1,4 мл	1

Добавить агар до 0,4% (на жидкую среду).

Автоклавировать 20 минут при 1,2 атм и 121°C.

После автоклавирования добавить:

Дрожжевой диализат (мл)	Лошадиная сыворотка (мл)	Глюкоза 40% (мл)	Пеницилин (г)	Индикатор (мл)
50	100	25	1	1

Для выращивания в подготовленную среду вносят старую культуру (10% от объема подготовленной среды). Микоплазма растет одни сутки при 37°C. Далее культуру можно использовать в работе или пересевать на новую среду.

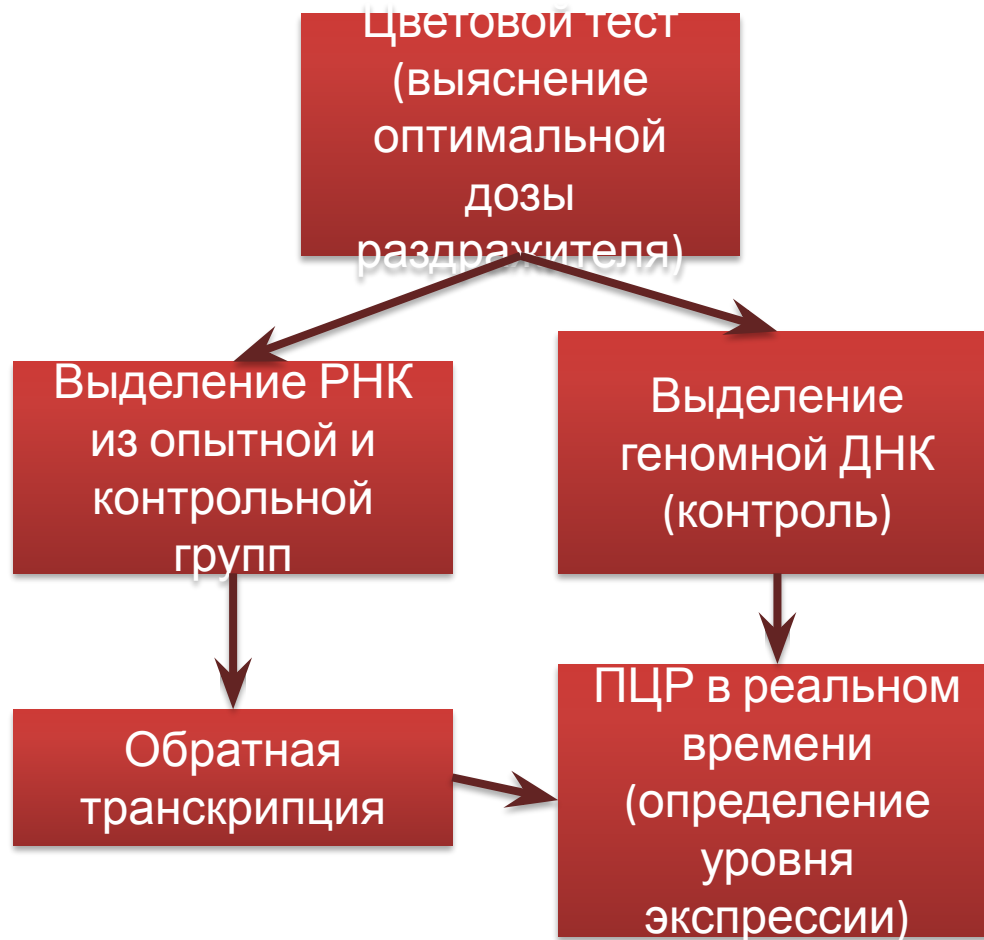


Назад

Оглавлени
е



Методики.



Дополнительно:

Электрофорез ДНК в агарозном геле

Получение кинетики роста культуры на основе измерения количества ДНК.



Оглавление



Постановка цветового теста.

- Готовят образцы: контроль и образцы, подвергнутые действию раздражителя в возрастающих количествах.
- Бактерии засевают в ряды пробирок так, что в каждой последующей пробирке культура разводится в 10 раз. Среда подкрашена индикатором, обесцвечивающимся при закислении.
- Оценивают скорость роста по обесцвечиванию индикатора.
- Выбирают два ряда, имеющих сходную с контролем скорость роста и подвергнутых действию раздражителя в максимальном объеме.
- Повторяют тест с более мелкой градацией объемов раздражителя.
- Выбирают ряд с максимально близкой к контролю скоростью роста и максимально большим объемом раздражителя.



Выделение РНК из культуры.

- В пробирку вносят культуральную жидкость, добавляют TRIzol LS. Встряхивают пробирку.
- Вносят хлороформ. Тщательно встряхивают.
- Инкубируют 15 минут при комнатной температуре и центрифугируют.
- Отбирают супернатант, осаждают РНК и отмывают в этаноле.
- Ресуспендируют в дистиллированной воде.



Выделение геномной ДНК из культуры.

- В пробирку вносят культуральную жидкость и центрифугируют.
- Отбирают супернатант. Ресуспендируют осадок в СТАВ-буфере (см. приложение).
- Инкубируют 10 минут при 60°C
- Вносят в пробирку хлороформ. Тщательно перемешивают и центрифугируют.
- Отбирают супернатант, осаждают ДНК и отмывают в этаноле.
- Ресуспендируют в дистиллированной воде.



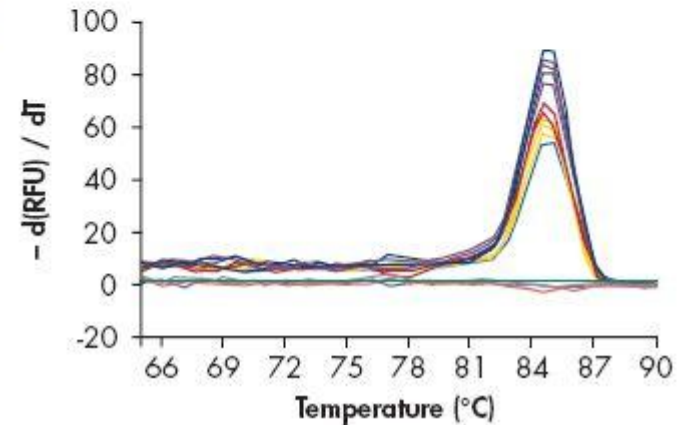
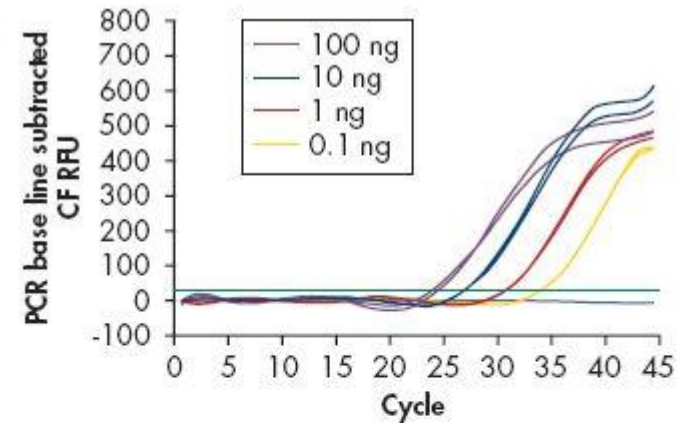
Реакция обратной транскрипции.

- К раствору РНК приливают реакционную смесь для разрушения ДНК (см. приложение).
- Инкубировать 1,5 часа.
- К смеси добавить случайные праймеров (последовательность из шести случайных нуклеотидов).
- Инкубируют образец 5 минут при 80°C
- Переносят пробирку в лед для отжига праймеров на молекулах РНК.
- Вносят реакционную смесь для обратной транскрипции (см. приложение).
- Инкубируют 45 минут при 42°C.



ПЦР в реальном времени.

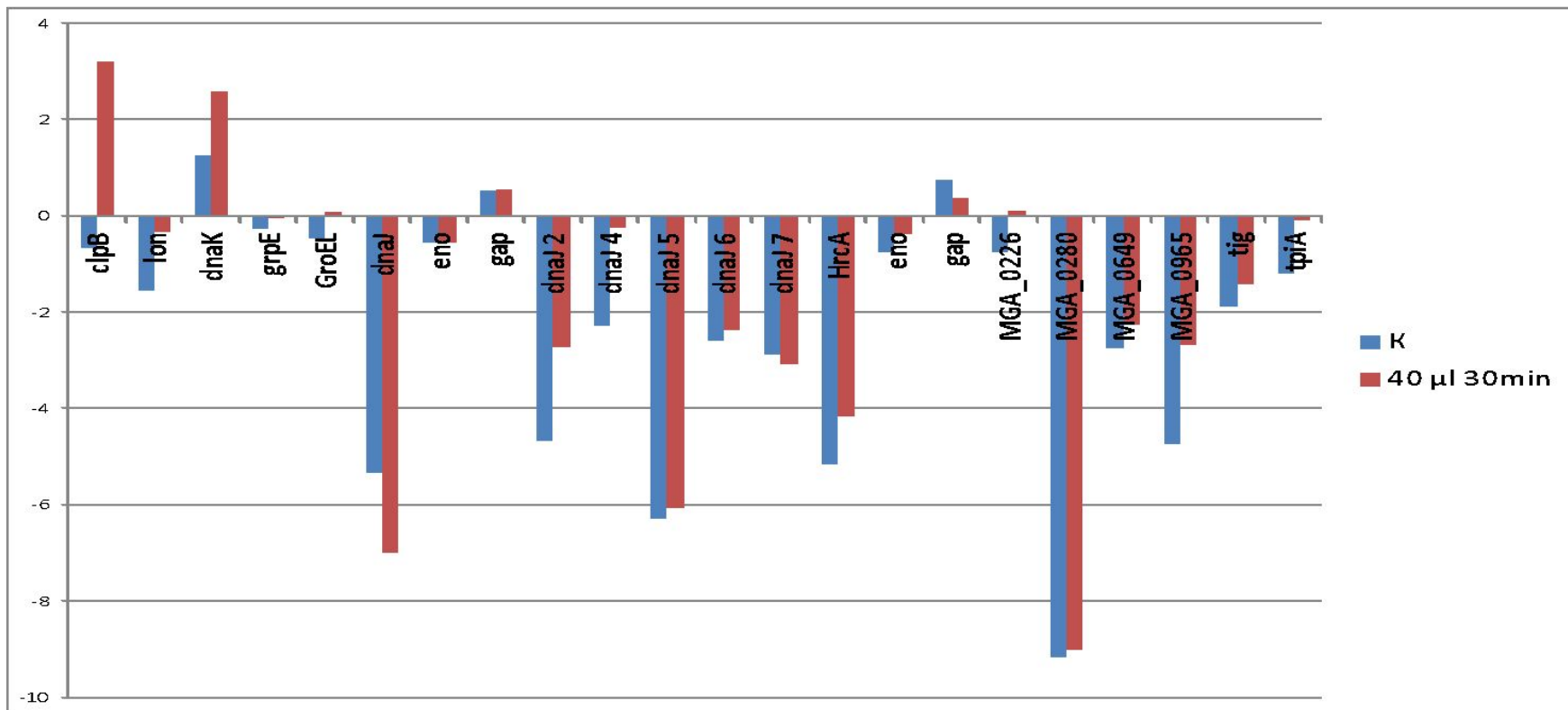
- Готовят реакционную смесь для ПЦР в реальном времени (см. приложение). A
- В пробирки или ячейки 96-луночной плашки для ПЦР вносят праймер.
- В каждую пробирку или ячейку с праймером вносят реакционную смесь и образец. B
- Регистрируют кривую изменения интенсивности флуоресценции интерколирующего красителя (SYBR green).



Результаты реакции.

Представление данных :

- Были выбраны гены, интенсивность экспрессии которых слабо зависит от воздействия раздражающего агента (*gap*, *eno*).
- Получено среднее арифметическое результатов прибора для этих генов.
- Вычислена разница между этим значением и результатом для каждого из проверяемых генов. Полученные разности (в количествах циклов) использовались для построения



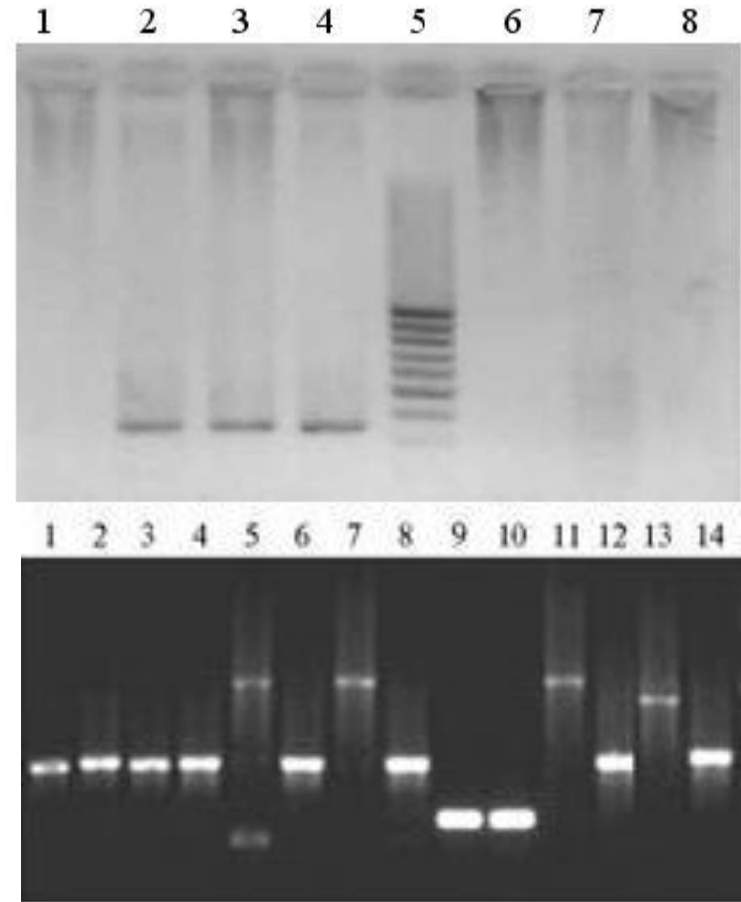
Оглавлени

е

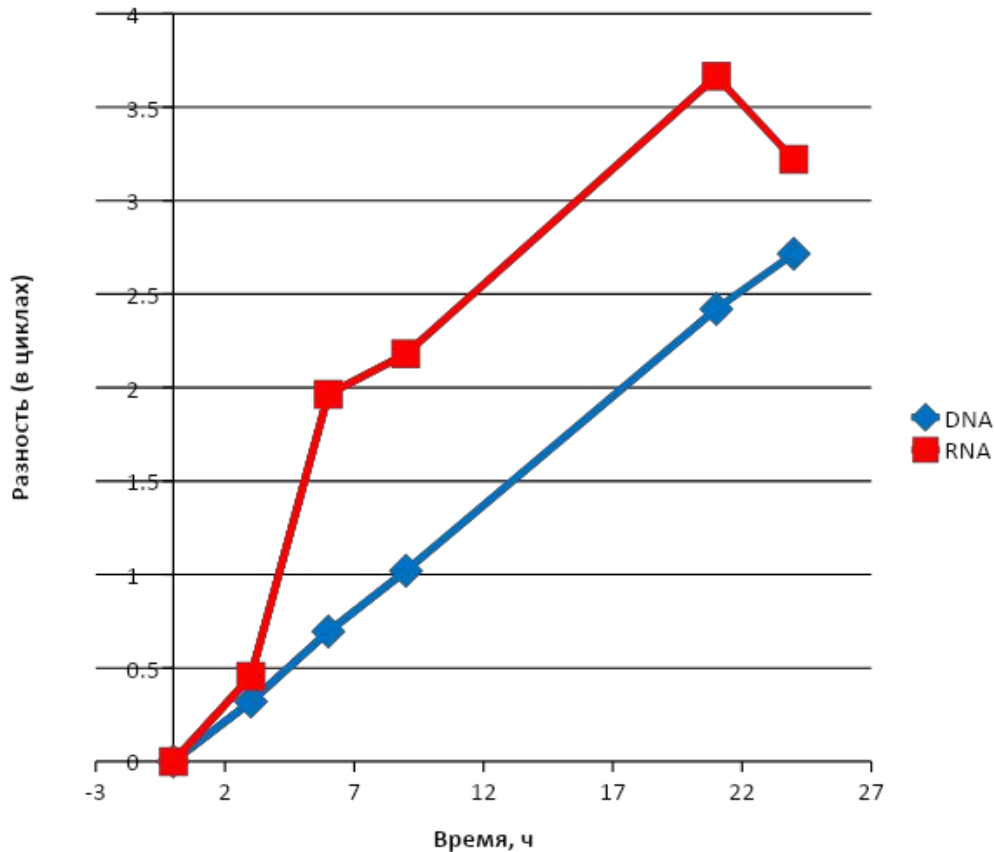


Электрофорез молекул ДНК в агарозном геле.

- Готовят гель: ТАЕ-буфер, 1-1,5% агарозы (по массе) и бромистый этидий. Разогревают до гомогенизации раствора. Заливают форму.
- Смешивают образцы с буфером на основе глицерина.
- Наносят образцы на гель и устанавливают напряжение из расчета около 10V на каждый сантиметр геля.
- За ходом фореа следят по смещению пятна красителя относительно начальной точки.



Получение кинетики роста культуры в периодической среде.



Для получения кинетики роста культуры использовались замеры уровня экспрессии гена 16S рибосомальной РНК. Измерение проводилось с помощью реакции ПЦР. В качестве матрицы использовалась геномная ДНК и ДНК синтезированная с РНК в ходе реакции обратной транскрипции.



Приложение.

СТАВ-буфер	СТАВ (г)	NaCl (г)	Tris 1M pH 8,0 (мл)	EDTA 0,5M (мл)
На 100 мл.	2	8,18	10	4
Реакционная смесь для разрушения ДНК (на 10 мг осадка).				
ДНКаза 50 у/μl (мкл)	Вода (мкл)	Буфер x10 (мкл)	Ингибитор РНКаз 40 у/μl (мкл)	
0,4	19,6	10	2	

Реакционная смесь для обратной транскрипции(на 100 мкл

RT буфер x5 (мкл)	дНТФ x10 (мкл)	Ревертаза 200 у/μl (мкл)	Ингибитор РНКаз 40 у/μl (мкл)	Вода
40	40	5	2	5

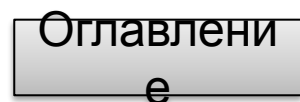
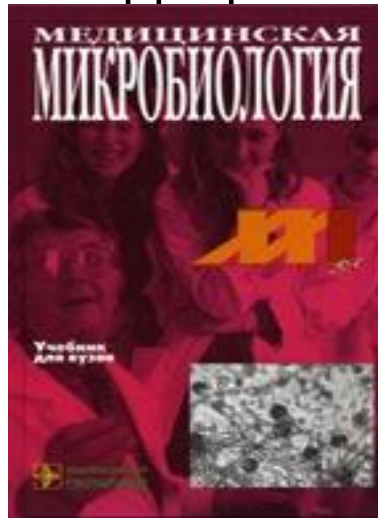
Реакционная смесь для ПЦР.

Буфер x10 (мкл)	дНТФ x10 (мкл)	Тaq-полимераза 5 у/μl (мкл)	Вода (мкл)	SYBR x0,5 (мкл)	Конечный объем (мкл)
300	200	15	500	5	1020



Использованная литература.

- Лабораторные методики, полученные от руководителя.
- <http://ru.wikipedia.org/>
- Микробиология. Воробьев А.В., Быков А.С. 2003 г.
- Медицинская микробиология. Поздеев О.К. 2004 г.



Источники изображений.

- <http://www.tophealth.ru/c/192/ATEROSKLEROZA-RESPUBLIKANSKIY-TSENTR-pri-NII-FHM-RO-SZDRAVSOTSRAZVITIYA-RF.html>
- <http://koroleni.livejournal.com/163817.html>
- <http://immunar.ru/nauka/osobennosti-mikoplazmoza/>
- http://www.dntpasteur.ru/metodic5_1_2_1.php
- <http://www.medclub.ru/disease/mycoplasmosis.html>
- <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/10296028>
- <http://www.cellular-products.com/Molecular-biochemical-reagent/Nucleic-acid-Separation-and-Purification/Trizol-Reagent/>
- www.qiagen.com/images/catalog/2349.jpg&w=370&h=464&ei=zPFLT5qPFafe4QTs1v
- <http://www.nsau.edu.ru/images/vetfac/images/ebooks/pages/2004/155.htm>
- <http://www.agrobiology.ru/6-2010krivtsov.html>
- <http://www.booksmed.com/mikrobiologiya/page/4/>
- <http://www.booka.ru/books/13900/about>
- <http://ru.wikipedia.org/>

