



специализированный учебно-научный центр (факультет) — школа-интернат имени А.Н. Колмогорова Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова



Сравнение эффективности методов очистки лабораторного оборудования

Ученик 10Н класса
СУНЦ МГУ им. Колмогорова
Михейкин Максим Евгеньевич

Научные руководители:

Чистяков В. В., студент 3 курса Биологического факультета

Гавриш Г. Е., студент 3 курса факультета Биотехнологии и

Биоинформатики

2017

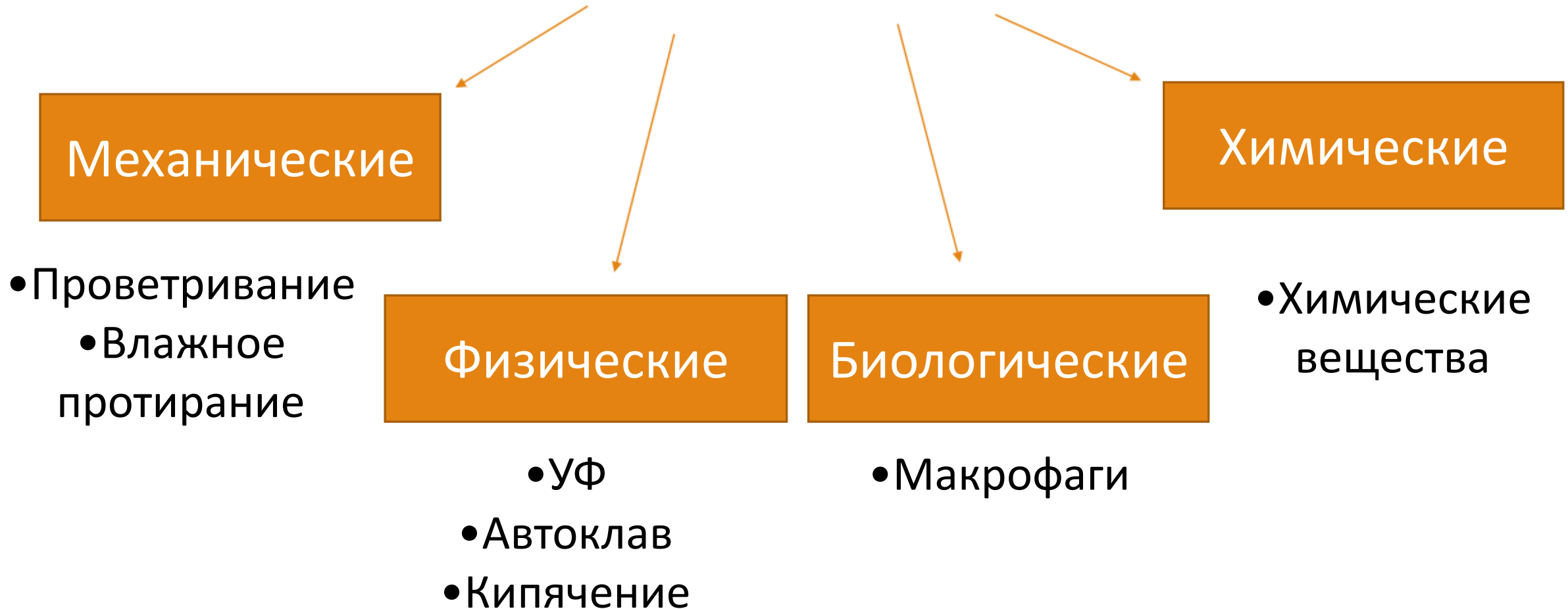
Москва 2018

- Очистка лабораторного инструмента является важной частью работы современного исследователя.
- Но возникает вопрос: насколько эффективны стандартные методы очистки?



<http://medioll.ru/media/1121.jpg>

Основные виды методов очистки



Методы идентификации бактерий

Морфологический

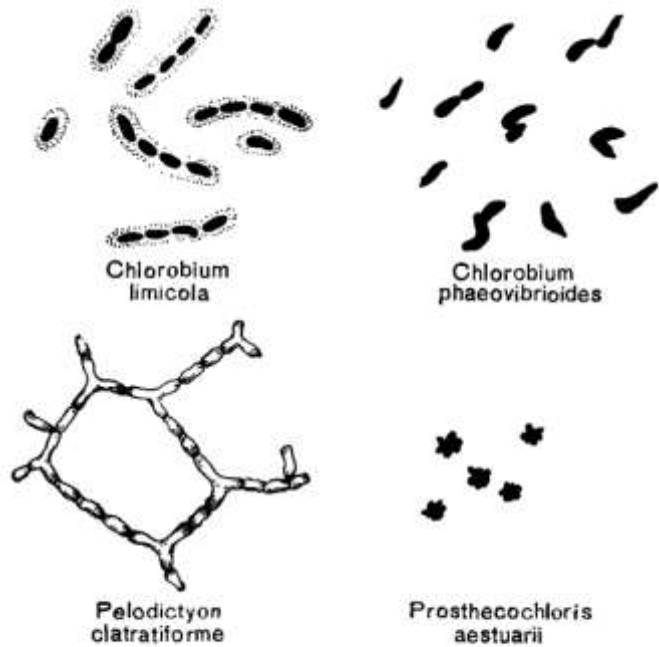
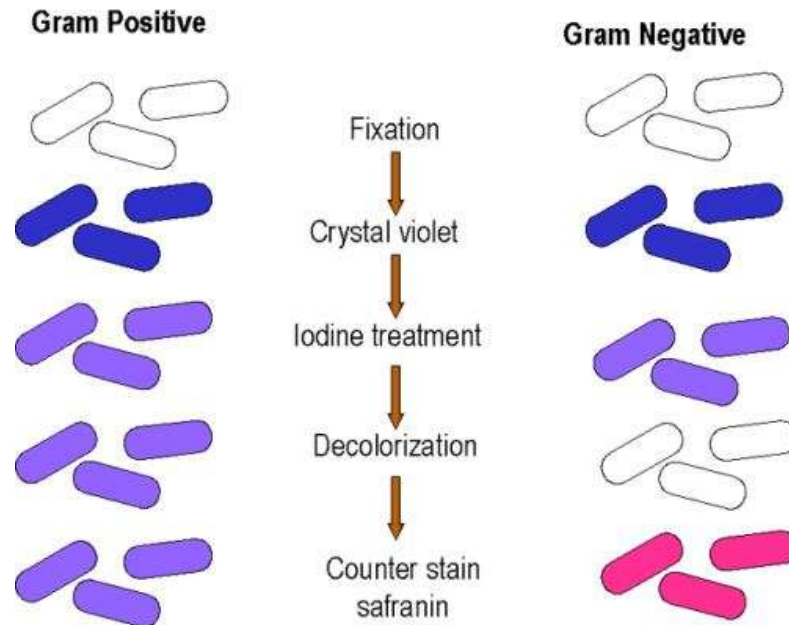
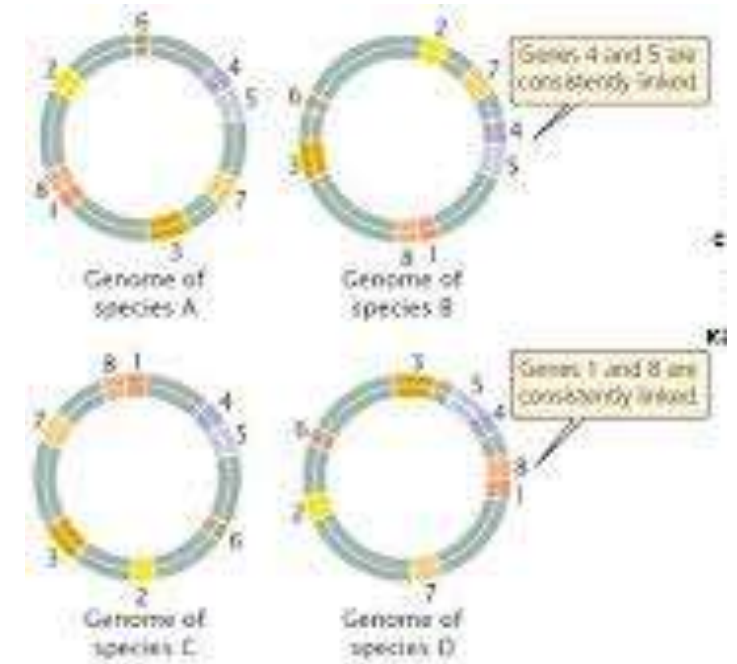


Рис. 122. Морфология разных представителей пурпурных бактерий.

Химико-биологический



Филогенетический



Причины выбора гена 16s рРНК

Высокая консервативность



Точность

Спонтанные мутации



Мера эволюционного
расстояния

Большие базы данных



Большое разнообразие
возможных результатов

Цели

- 1) Экспериментальное сравнение эффективности методов дезинфекции лабораторных инструментов.
- 2) Спроектировать универсальные праймеры на ген 16s rRNA

Задачи

- 1) Подготовить неспециализированную школьную лабораторию для проведения экспериментов с ДНК
- 2) Провести серию экспериментов по дезинфекции лабораторных инструментов различными веществами и методами.
 - 2.1) Экспериментально установить степень загрязненности поверхности инструментов после очистки различными методами.
 - 2.2) Провести ПЦР и визуализировать результаты эксперимента с помощью электрофореза

- 3) Анализ генов 16s рРНК

3.1) Составить базу данных прокариот

3.2) Сделать множественное выравнивание генов 16s рРНК

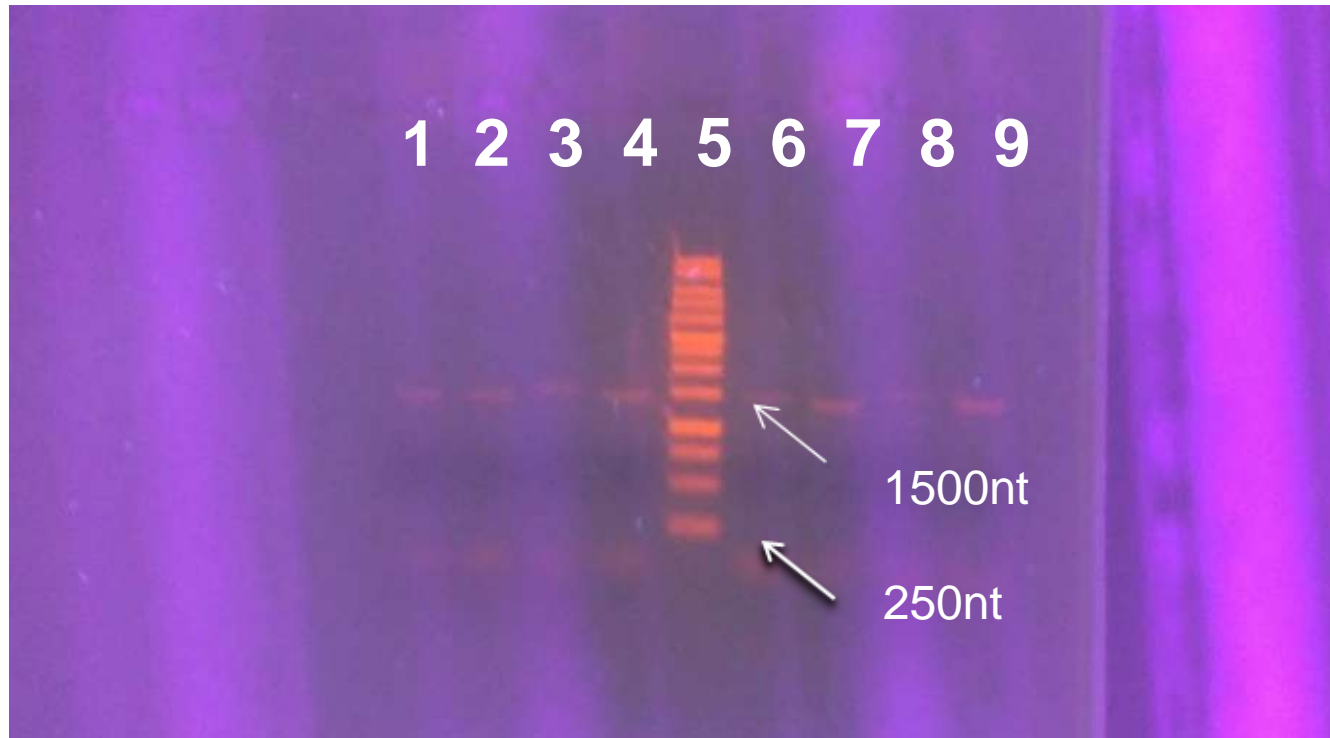
3.3) На основе выравнивания предложить праймеры, и определить их эффективность

3.4) Определить эффективность праймеров ранее использованных в работе

Методы и материалы

- ПЦР
- Электрофорез в агарозном геле
- Биоинформатических анализ генов 16s rRNA для проектирования праймеров

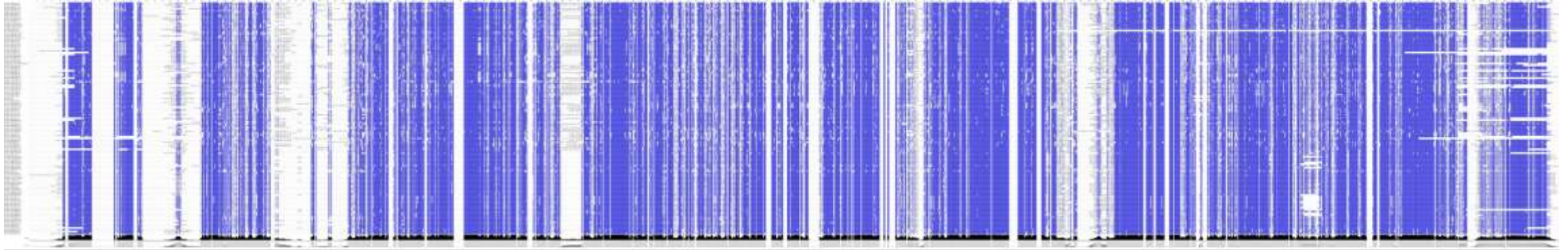
Результаты



- 1) Спирт с поджиганием
- 2) Положительный контроль
- 3) Окунание в спирт
- 4) УФ 7 сек
- 5) Маркеры длины ДНК (1 kb)
- 6) Протирка спиртом
- 7) Отрицательный контроль
- 8)УФ 7 сек
- 9) *M.luteus*

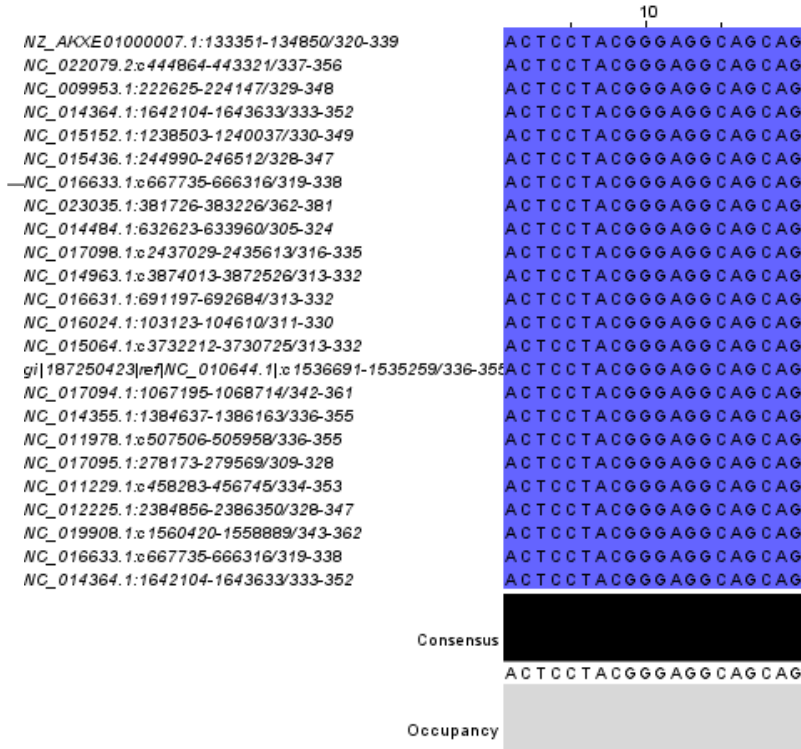
•Проектирование праймеров:

В электрофорезе было много шмера, а значит ранее использованные праймеры отжигаются неспецифично. Поэтому мы решили спроектировать собственные праймеры

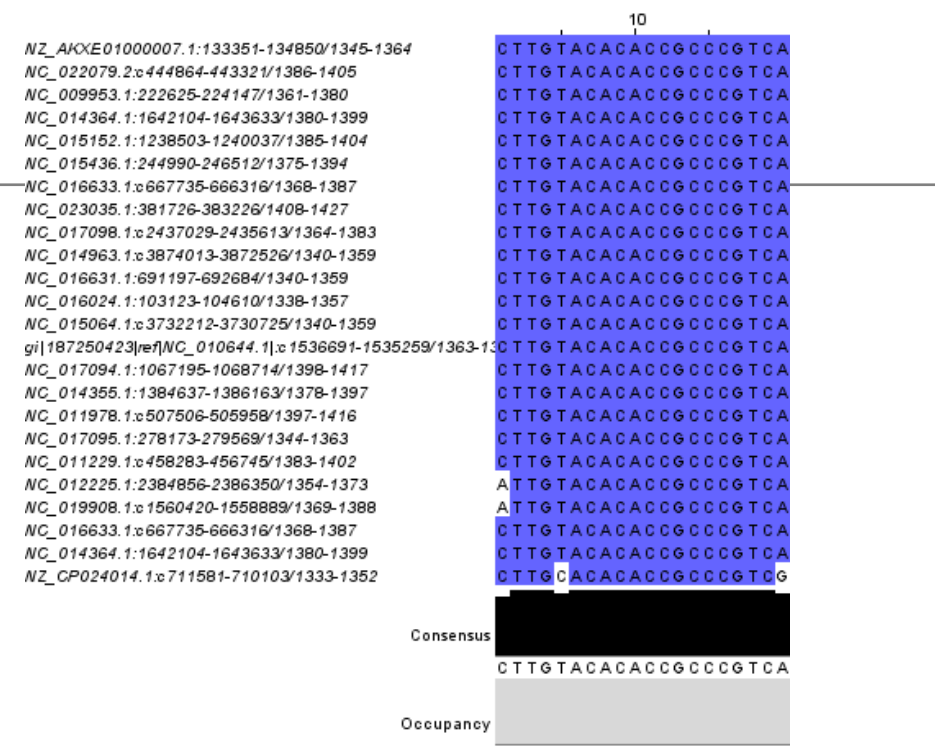


Выравнивание для для генов всех бактерий из нашей базы данных

Прямой праймер



Обратный праймер



- Прямой 5'-ACTCCTACGGGAGGGCAGC-3'
- Обратный 5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAG-3'

•Критерии подбора праймеров

- 1) Длина 18-25nt (оптимально 20nt)
- 2) GC ~ 40-60%
- 3) Нежелательно много GC подряд (GGGCCCCCGGC)
- 4) Плохо, если на 3' конце больше 3 GC
- 5) Отсутствие вторичных структур (шпилек и дуплексов)

Сравнение праймеров

- | | |
|------------------------------|---------------------------|
| •1 пара: $T_m = 60$ градусов | % CG пар= 55 (F) и 42 (R) |
| •2 пара: $T_m = 54$ градуса | % CG пар= 55 (F) и 55 (R) |
| •Наши: $T_m = 64$ градуса | % CG пар= 66 (F) и 60 (R) |
-



Расположение генов 16s rRNA на геноме *E.coli*

Выводы

- 1) В условиях школьной лаборатории нельзя добиться условий стерильности от инородной ДНК. Значит, выполнение нашей цели , требующих особой стерильности здесь невозможно
- 2) Были предложены универсальные праймеры на часть гена 16s rRNA
Прямой 5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC-3'
Обратный 5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AG-3'

ССЫЛКИ

Литература

1. Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Корнеев Е.А., Руководство к практическим занятиям по микробиологии (малый практикум) - Ульяновск, 2003; 103 с.
2. Коноплева В.И. [и др.]., Методические указания для студентов к лабораторным занятиям по дисциплине «Микробиология, вирусология –микробиология полости рта» / –Рязань: ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, 2013. – 125с.
3. Лаврентьева Л. В., Авдеев С. М., Соснин Э. А., Величевская К. Ю. Бактерицидное действие ультрафиолетового излучения эксимерных и эксиплексных ламп на чистые культуры микроорганизмов // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2008. №2 (3).
4. Шестопалов Н.В., Пантелеева Л.Г., Соколова Н.Ф., Абрамова И.М., Лукичев С.П. Федеральные клинические рекомендации по выбору химических средств дезинфекции и стерилизации для использования в медицинских организациях – М., 2015. – 67 с.
5. Chitra Sanjeev Juwarkar, Cleaning and Sterilisation of Anaesthetic Equipment // Indian J Anaesth . 2013 Sep-Oct; 57(5): 541–550.
- Jill E. Clarridge, III, Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases // Clin Microbiol Rev . 2004 Oct; 17(4): 840–862
6. J Gen Physiol, A STUDY OF THE BACTERICIDAL ACTION OF ULTRA VIOLET LIGHT : III. THE ABSORPTION OF ULTRA VIOLET LIGHT BY BACTERIA// 1930 Sep 20;14(1):31-42.
7. Rutala W.A., Weber D.J. Infection control: the role of disinfection and sterilization // J. Hosp. Infect.– 1999. – № 43, Suppl. – P. 43-55.

Спасибо за внимание

Отдельная благодарность моим коллегам Серебряковой Светлане, Муравьевой Ольге и Таубинской Марии за помощь в проведении исследования

Михейкин Максим
max.mih23@gmail.com