**Микробиология с основами биотехнологии** БХ 3курс 27.04.–02.05.2020

**Лабораторное занятие №5** **«***Окраска нуклеоида бактерий»*

Перечень изучаемых вопросов:

1 Особенности генетического аппарата бактерий: *повторить теоретический материал.*

2 Методика обнаружения бактериальной ДНК: *ознакомиться с содержанием работы №20 (см ниже), законспектировать, рассмотреть фото микроорганизмов.*

***Лабораторная работа 20***

**Окраска нуклеоида бактерий**

*Нуклеоид* бактерий располагается в центральной зоне клетки в виде двунитчатой ДНК, замкнутой в кольцо и плотно уложенной наподобие клубка. Чаще в бактериальной клетке содержится одна хромосома, представленная кольцевой молекулой ДНК. При нарушении деления в ней может находиться 4 и более хромосом. На электронограммах ультратонких срезов бактерий нуклеоид имеет вид светлых зон с фибриллярными, нитевидными структурами ДНК, связанной определенными участками с цитоплазматической мембраной или мезосомой, участвующими в репликации хромосомы. Нуклеоид выявляется и в световом микроскопе после окраски специфическими для ДНК методами по Фельгену или по Романовскому–Гимзе.

В цитоплазме бактериальных клеток помимо кольцевой ДНК содержится много РНК, которая окрашивается ядерными красителями так же, как и ДНК. Поэтому предлагаемый метод обнаружения бактериальной ДНК настроен на устранение РНК цитоплазмы гидролизом мазка в соляной кислоте и последующей окраске ДНК.

**Материалы и оборудование:** молодые культуры микроорганизмов – *Saccharomyces cerevisiae, Bacillus subtilis, Azotobacter chroococcum*, 1 % раствор формалина, 40 % формалин, 0,1–1 % раствор фуксина, предметные стекла, спиртовка, чашка Петри с обрезками стекла, термометр, промывалки, водяная баня, стакан 50–100 мл с 1 н соляной кислотой.

**Ход работы**

1. Из суточной культуры микробов приготавливают суспензию и наносят мазок на предметное стекло.

2. Мазок высушивают на воздухе и фиксируют парами 40 % формалина и высушивают в течение нескольких секунд (или парами 2 % раствора осмиевой кислоты в течение 2–3 минут). Для фиксации мазка на дно чашки Петри наносят 2–3 капли фиксатора, а предметное стекло помещают на обрезки стекла мазком вниз.

3. Мазок подвергают гидролизу в 1 % растворе соляной кислоте при температуре +60 ºС (2–3 минуты) и немедленно тщательно промывают мазок водой.

Гидролиз мазка проводят, погружая препарат в небольшой химический стакан с соляной кислотой, помещенный в водяную баню.

4. Затем мазок заливают 1 % раствором формалина на 1,5 минуты и вновь промывают водой.

5. Мазок окрашивают 0,1–1 % водным раствором основного фуксина на 1–2 минуты, промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют, пользуясь объективом ×90 (с иммерсией).

|  |  |
| --- | --- |
| https://present5.com/presentation/44902644_167471859/image-32.jpg | https://cs5.pikabu.ru/post_img/big/2015/04/27/11/1430158630_1874759948.jpg |

А Б

Рисунок – *Bacillus subtilis*

В препарате на розовом фоне цитоплазмы выделяется нуклеоид, окрашенный в ярко-малиновый цвет в виде образования неопределенной формы по центру клетки (А) либо в виде двух тел, лежащих ближе к полосам (Б).

**ИСТОЧНИКИ:**

1. Лабораторные занятия по микробиологии: методические указания для студентов науч.-пед. и пед. специальностей / авт.-сост.: В.И. Бойко, Н.В. Шкуратова, Ю.В. Бондарь. ; Брест. гос. ун-т имени А.С. Пушкина. – Брест : БрГУ, 2013. – 51 с.
2. Микробиология: учебно-методический комплекс / сост.: Н.В. Шкуратова, В.И. Бойко; Брест. гос. ун-т имени А.С. Пушкина. – Брест: БрГУ, 2015. – 163 с.