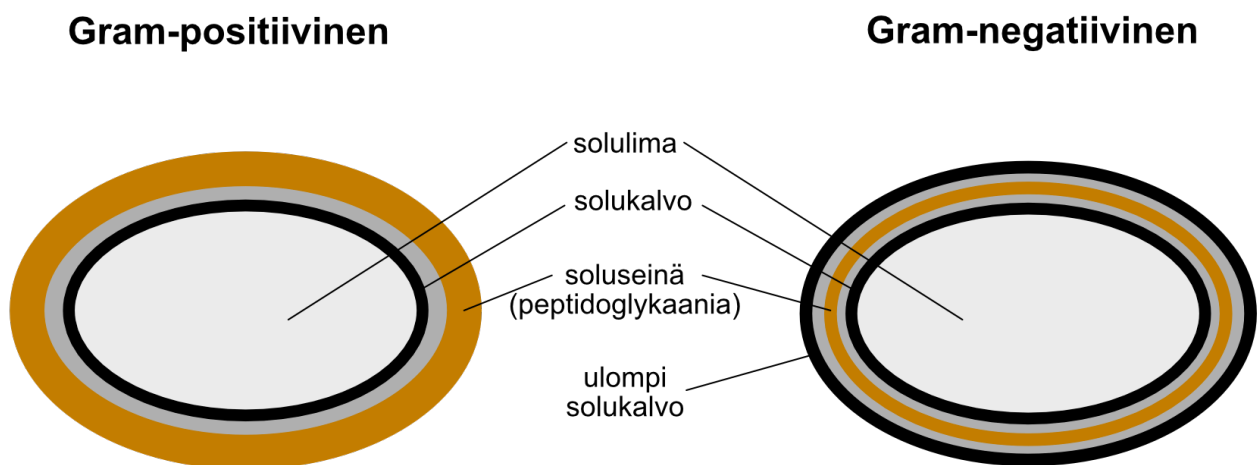


GRAM-VÄRJÄYS

TAUSTAA

Työn tarkoituksena on perehtyä erääseen yleisimmistä bakteerien luokitteluperusteista eli gram-värijäykseen. Ennen työtä otetaan sopiva bakteerinäyte esimerkiksi iholta tai hengitysteistä. Bakteereja kasvatetaan yön yli ja maljoilta valitaan bakteeripesäkkeitä lähempään tarkasteluun.

Bakteerit voidaan jaotella niiden soluseinän rakenteen perusteella gram-positiivisiin ja gram-negatiivisiin. Gram-positiivisten bakteerien soluseinässä on monta päällekkäistä kerrosta peptidoglykaania. Sen sijaan gram-negatiivisilla peptidoglykaania on vain yksi kerros, mutta sen ulkopuolella on vielä toinen solukalvo (kuva 1).



Kuva 1: Gram-positiivisten ja -negatiivisten bakteerien soluseinän rakenne.

Gram-värijäys on erittäin yleinen mikrobiologinen menetelmä bakteerien luokittelemiseksi. Gram-värijäyksessä bakteerit värjäytyvät niiden solurakenteen mukaisesti. Värijäyksessä bakteerit käsitellään kristallivioletti –väriaineella, joka muodostaa soluissa pysyvän muodon, kun sitä käsitellään jodilla (Lugolin liuoksella). Tämän jälkeen väri poistetaan alkoholin avulla. Gram-positiivisilla soluilla on paksumpi soluseinä, joten ne pidättävät väriainekompleksin soluissaan. Näin ne värjäytyvät violeteiksi. Gram-negatiivisilla on taas ohuempi soluseinä, joten värinpoistossa violetti väri katoaa. Lopuksi kaikki solut kuitenkin värjätään punaisella safraniinilla, joten gram-negatiiviset värjäytyvät punaisiksi (kuva 2).

POHDITTAVAKSI ENNEN TYÖTÄ

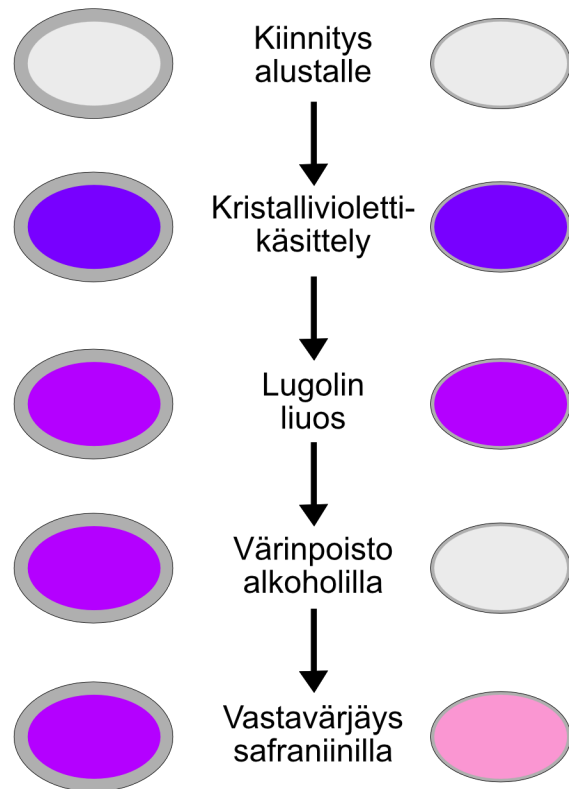
- Millä tavoilla bakteereita voidaan luokitella?
- Miksi bakteereilla on soluseinä?
- Millä muilla eliöillä on soluseinä ja miten se eroaa bakteerien soluseinästä?
- Miksi bakteereita käsiteltäessä on kiinnitettävä huomiota aseptiseen (=puhtaaseen) työskentelyyn?

TARVIKKEET

- Tutkittavaa bakteeria
- Kristalliviolettiliuos (1%)
- Lugolin liuos
- Safraniiniliuos (2 %)
- Etanoliliuos (96 %)
- Aluslaseja (objektilaseja)
- Bunsenlamppu
- Petriمالjoja
- Siirrostussilmukoita
- Mikroskooppeja
- (Immersioöljyä)

Gram-positiivinen

Gram-negatiivinen



Kuva 2: Gram-positiivisten ja -negatiivisten bakteerien värjättyminen gram-värjäyksessä.

TYÖTURVALLISUUS

Työssä käsitellään mikrobeja, joten työtakkia ja suojahanskoja on käytettävä koko työn ajan. Juominen ja syöminen ei ole sallittua laboratoriossa! Muista pestä kätesi, kun poistut laboratoriosta.

Mikrobit voidaan hävittää autoklavoimalla tai viemällä ne tappoliuokseen. Kaikki mikrobeja sisältävä jäte kerätään erikseen talteen ja tapetaan ennen hävittämistä.

Työskentele varovaisesti kaasuliekin kanssa! Sammuta liekki aina, kun et tarvitse sitä.

TYÖOHJE

- Tee bakteerimaljalla olevasta bakteeripesäkkeestä levityspreparaatti: Pipetoi pisara vettä aluslasille ja siirrä siihen siirrostussilmukalla hieman valitsemaasi bakteeripesäkettä. Kuivaa lasi pöydällä, tarvittaessa kuuman lampun alla.
- Mikrobit kiinnitetään aluslasille viemällä lasi nopeasti mikrobipuoli ylöspäin muutamana kerran liekin lävitse. Älä kuitenkaan kuumenna mikrobeja liikaa!
- Värijää näytettä 1 minuutin ajan kristallivioletilla.
- Huuhto näyte varovasti juoksevan veden alla tai vesiastiassa.
- Peitä näyte Lugolin liuksella yhden minuutin ajaksi.
- Huuhtelee näyte varovasti juoksevassa vedessä tai vesiastiassa. Valuta liika vesi pois.
- Huuhto näytettä 96 % etanolissa hitaasti liikuttamalla, kunnes väriä ei enää liukene (noin minuutin ajan).
- Huuhtelee näyte varovasti juoksevassa vedessä tai vesiastiassa. Valuta liika vesi pois.
- Peitä näyte 15 sekunniksi safraniinilla.
- Huuhtelee näyte varovasti juoksevassa vedessä tai vesiastiassa.
- Kuivaa näyte varovasti paperilla (älä hankaa bakteereja pois lasilta).
- Tarkastelee bakteereja mikroskoopilla. Jos käytät 1000 x suurennosta, muista käyttää myös immersioöljyä! Puhdista objektiivi hyvin öljyn lisäämisen jälkeen tarkoitukseen sopivalla puhdistusaineella. Muista merkitä lasiin myös nimesi ja mitä se sisältää.

POHDITTAVAKSI TYÖN JÄLKEEN

- Voiko Gram-värijäyksen jälkeen päätellä bakteerien todellisen koon tai muodon?
- Oliko tuloksesi selkeä? Mistä mahdolliset ongelmat voisivat johtua?
- Mitä tarkoitetaan mikrobin puhtasviljelmällä?
- Ota selvää, ovatko taudinaiheuttajat pääasiassa gram-positiivisia vai –negatiivisia. Mikä tähän voisi olla syy?
- Voidaanko kaikki bakteerit luokitella gram-positiivisiksi tai –negatiivisiksi?
- Miksi gram-negatiivisilla on vielä ulompi solukalvo?
- Miten ihmisen immuunijärjestelmä tunnistaa bakteerien soluseinät?