

실험 1. 대장균 배양 및 그람 염색

2학년 7반 1조

강샷별, 강진주, 고미진, 고은선,
김다운, 김봄, 김세현

차례

(1) 배지 만들기 실험

(2) 도말 평판법 실험

(3) 그람 염색법 실험



(1) 배지 만들기 실험

(1) 배지만들기 실험기구 및 재료

■ LB액체배지 만들기

- 삼각플라스크, 비닐 랩, 효모 추출 분말

■ LA액체배지 만들기

- LB배지에 앰피실린 용액을 첨가.

■ LA고체배지 만들기

- LA액체 배지에 아가로오즈 첨가.
알코올 램프, 페트리 접시

(1) 배지 만들기

- LA고체 배지 만들기 실험방법 및 절차

- 삼각 플라스크에 100ml의 증류수를 넣고 효모 추출분말 2.5g, 아가로오즈 분말 1.5g을 넣고 비닐 랩으로 씌운 뒤 전자레인지로 가열한다.

(1) 배지 만들기

- LA고체 배지 만들기 실험방법 및 절차

- 굳기 전에 앰피실린을 첨가한다.
- 페트리 접시에 붓고 멸균을 위해 알코올 램프 주위에서 실링해 놓는다.

(2) 도말 평판법 실험

(2) 도말 평판법

- 가설

- $\frac{1}{2}$ 희석한 대장균 배양액을 배양한 배지의 콜로니의 양은 원액 100%인 대장균 배양액을 배양한 배지에 생성된 콜로니 양의 약 $\frac{1}{2}$ 일 것이다.

(2) 도말 평판법

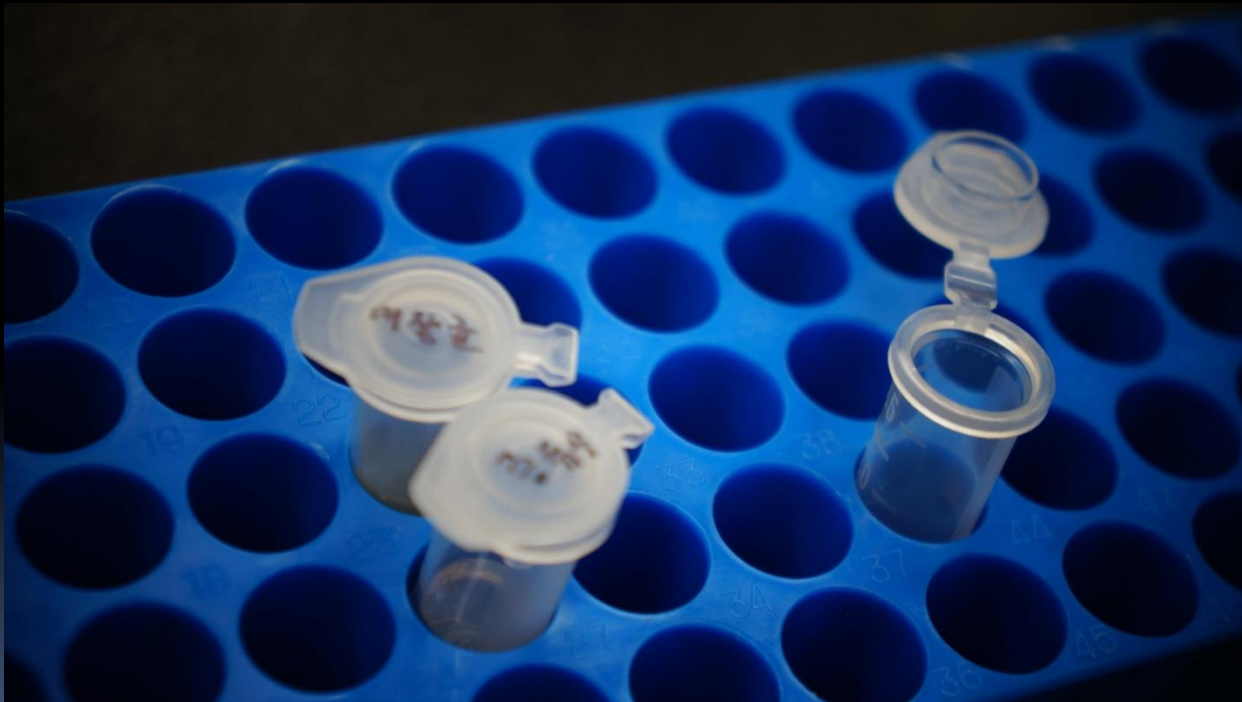
- 실험기구 및 재료

- 비커, 삼각 유리봉, 마이크로 피펫 20~200 μl , 피펫 팁, 알코올 램프, 장갑, 유성펜, 앰피실린 첨가한 LB 고체 배지, 대장균 배양액

(2) 도말 평판법

- 실험방법 및 절차

- 앰피실린을 첨가한 LB 고체 배지에 접종할 대장균의 이름을 각각 적는다.



(2) 도말 평판법

- 실험방법 및 절차
 - 각각의 통에 유성 펜으로 날짜와 대장균 배양액 농도 등을 적는다.



(2) 도말 평판법

- 실험방법 및 절차

- 95% 에탄올이 담겨있는 비커에 삼각유리 봉을 담근다.
- 마이크로 피펫 20~200 μl 과 멸균된 피펫팁을 이용하여 원액 30 μl 와 물 30 μl 로 1/2 희석한 대장균 액을 만든다.



(2) 도말 평판법

- 실험방법 및 절차

- 대장균 배양액 원액 $30\mu\text{l}$ 와 $1/2$ 희석액 $30\mu\text{l}$ 를 LB 고체 배지 중앙에 각각 떨어뜨린다.



(2) 도말 평판법

- 실험방법 및 절차

- 비커로부터 삼각 유리봉을 꺼내 알코올 램프 불꽃을 통과 시키고 10~15초 식힌 후 배지 표면에 대고 주입된 배양액이 배지 표면에 골고루 퍼지도록 가볍게 밀어준다.



(2) 도말 평판법

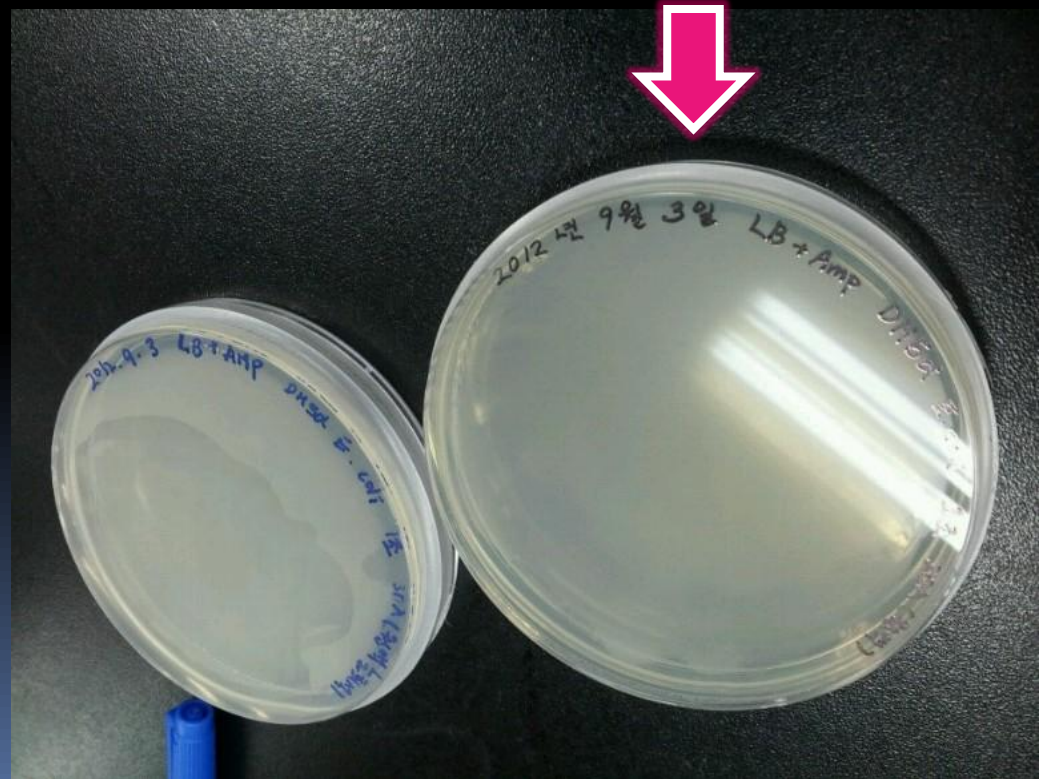
- 실험방법 및 절차

- 도말이 끝나면 페트리 접시의 뚜껑을 닫고 파라핀 테이프로 실링하여 뒤집은 상태로 37°C에서 1일간 배양한다.



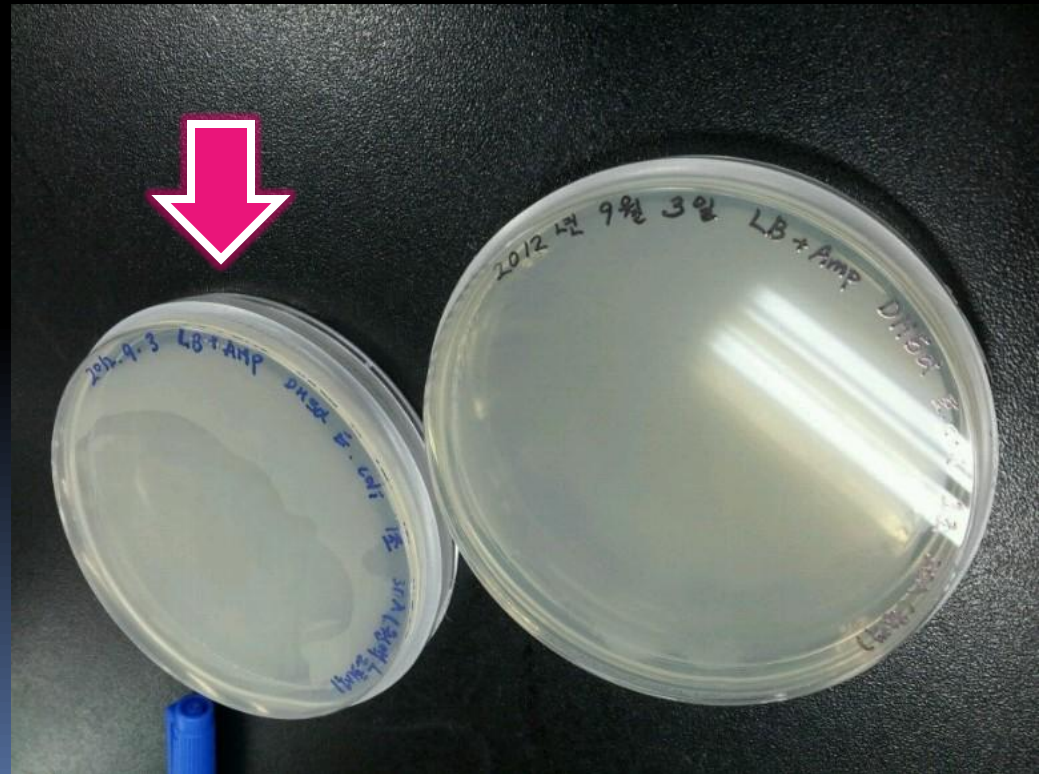
(2) 도말 평판법 - 결과

- 1일간 배양한 뒤 다시 관찰해 보았는데 원액 100%의 대장균 배양액은 콜로니 관찰이 어려웠다.



(2) 도말 평판법 - 결과

- 반면, $\frac{1}{2}$ 로 희석한 대장균 배양액의 콜로니는 두드러지게 나타났다.



(2) 도말 평판법

- 결론

- 처음에 우리 조가 생각했던 가설과는 다르게 $\frac{1}{2}$ 로 희석한 대장균 배양액의 콜로니가 더 두드러지게 나타났고, 원액 100%의 대장균 배양액은 삼각 유리병으로 꼼꼼히 밀지 못한 탓에 콜로니 관찰이 어려웠다.

(3) 그람 염색법 실험

(3) 그람 염색법 -가설

- 그람 양성세균은 크리스탈 바이올렛 염색약에 염색되어 보라색을 띠는 것이고,
그람 음성세균은 사프라닌 염색약에 염색되어 붉은색을 나타낼 것이다.

(3) 그람 염색법

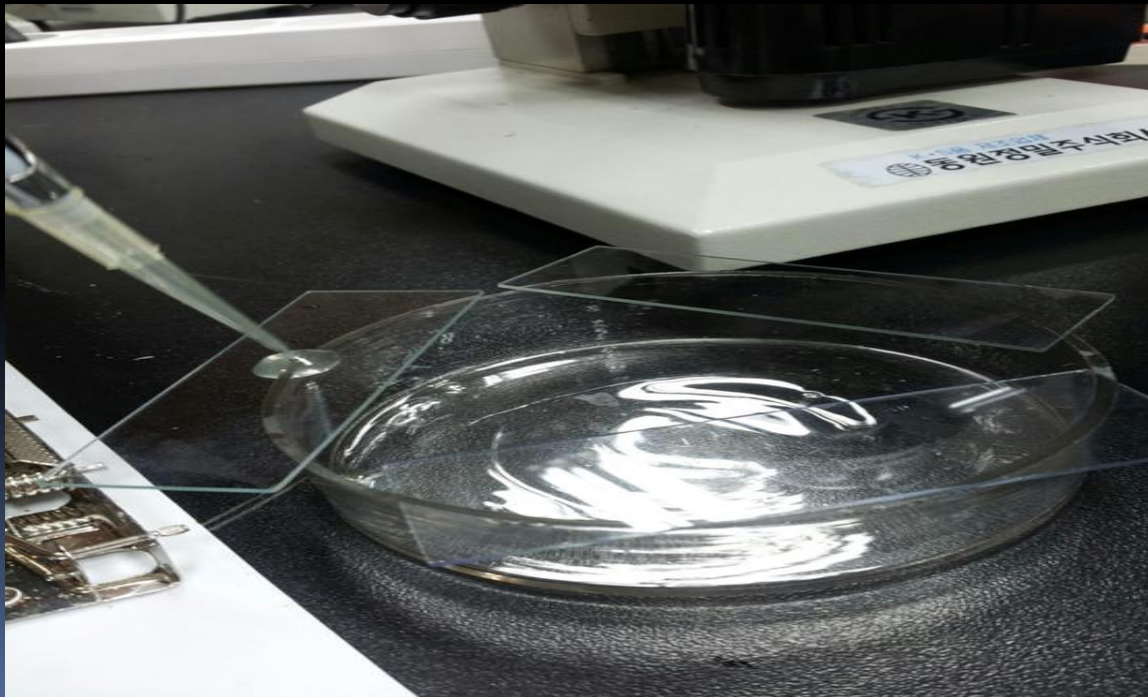
- 실험기구 및 재료

- 대장균 배양액, 슬라이드 글라스, 커버글라스, 대장균, 알코올 램프, 크리스탈 바이올렛 염색약, Lugol PVP용액, 탈색 용액, 사프라닌 염색약, 초 시계, 마이크로 피펫 20~200 μl , 장갑, 현미경

(3) 그람 염색법

- 실험방법 및 절차

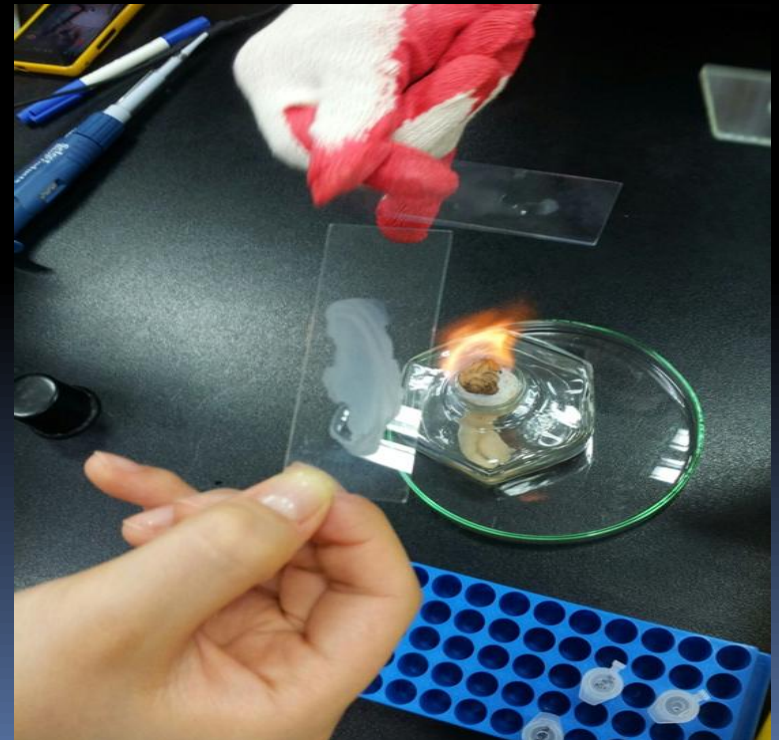
- 슬라이드 글라스 위에 대장균을 $500 \mu\text{l}$ 정도의 대장균 배양액을 떨어뜨린 후, 얇게 펴 바른다.



(3) 그람 염색법

- 실험방법 및 절차

- 알코올 램프를 켜서 슬라이드 글라스를 불 위에 가볍게 스치며 말려 대장균을 고정시킨다.



(3) 그람 염색법

- 실험방법 및 절차

- 크리스탈 바이올렛 염색약을 몇 방울 떨어 뜨리고 1분간 기다린 후 물로 씻어낸다.



(3) 그람 염색법

- 실험방법 및 절차

- Lugol PVP용액을 떨어뜨리고 1분간 기다린 후 즉시 물로 씻어낸다.



(3) 그람 염색법

- 실험방법 및 절차

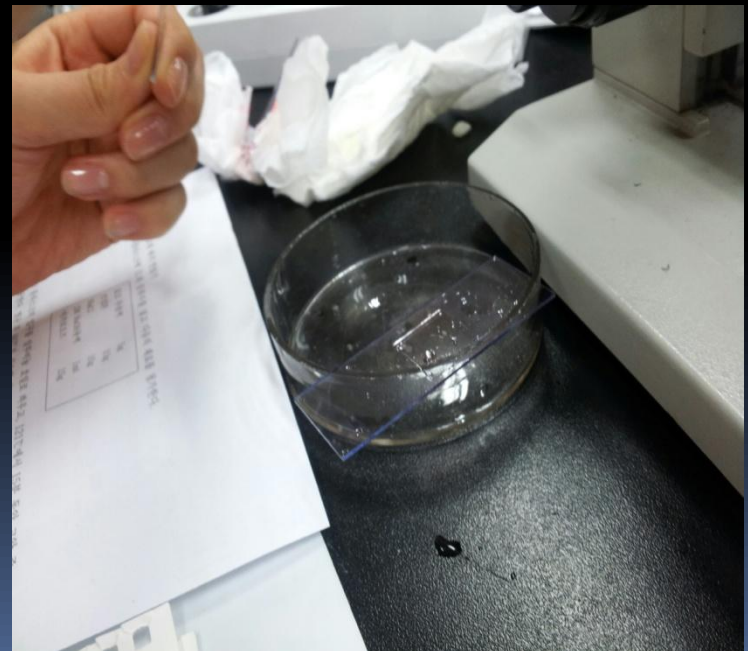
- 색이 나타나자마자 (30~60초 정도) 탈색 용액을 떨어뜨려 탈색시킨 후, 즉시 물로 씻어낸다.



(3) 그람 염색법

- 실험방법 및 절차

- 사프라닌 염색약을 떨어뜨리고 30-60초 정도 기다린 후 즉시 물로 씻어낸다.
- 말린 후 관찰한다.



(3) 그람 염색법 - 결과

- 그람 음성 세균인 대장균은 크리스탈 바이올렛 염색약에 염색되지 않아서 탈색에 염색되어 빨간색

현미경
관찰사진
40x10 배



(3) 그람 염색법

- 결론

- 우리 조가 실험한 대장균은 사프라닌 염색약에 염색되어 붉은색을 나타내어 그람음성세균으로 밝혀졌다.

따라서 그람음성세균은 붉은색으로 염색 될 것이라는 가설이 참임을 검증할 수 있는 실험이었다.

עב
ר