

# השפעת היחס המולרי על יעילות ליגציה

מגישים: מיה נתיב, שחר שוסטר ועמית טל  
בהנחיית: ד"ר שירי רבינוביץ'

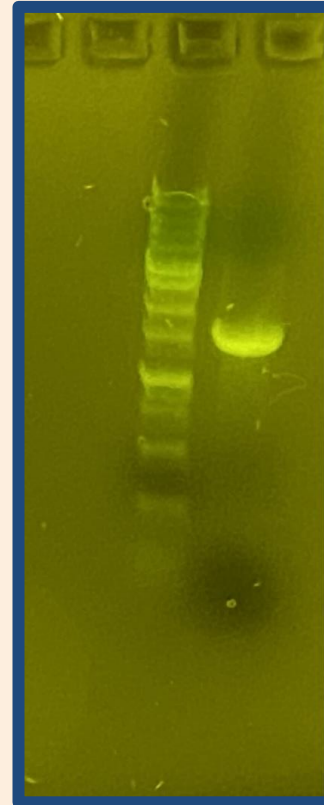


## מבוא

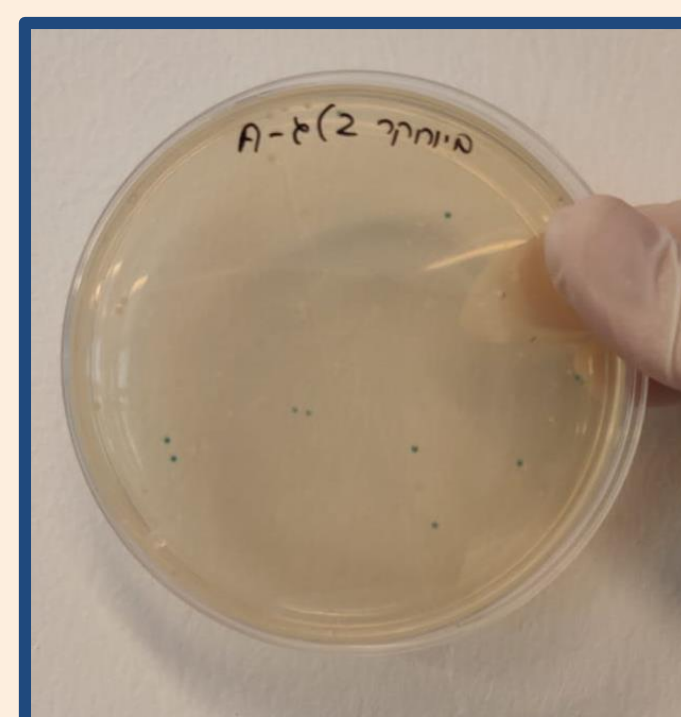
שיבוט מולקולרי הוא מונח המתייחס להקניית תכונות חדשות לאורגניזם על ידי הכנסת רצף גנטי לתוכו באופן מלאכותי, בשיטות של הנדסה גנטית. בשיבוט מולקולרי מוחדר רצף של DNA אל תוך פלסמיד (DNA מעגלי) המשמש כוקטור להעברת חומר גנטי ומאפשר סלקציה לטובת תאים המכילים אותו ע"י הקניית עמידות לאנטיביוטיקה בנוסף לגן המשובט. הגן המשובט מאוחה לפלסמיד ע"י האנזים ליגאז המאחה את הקשר הפוספודיאסטרי בין שני נוקלאוטידים סמוכים בגדיל DNA. אנזים זה חיוני בכל היצורים החיים לתיקון נזקים ב-DNA ומשמש בהנדסה גנטית לחיבור מקטעים. בפרוייקט זה השתמשנו בפלסמיד מסוג pGEM המיועד לשיבוט מקטעי PCR ע"י TA ligation ובעל גן מדווח בעזרתו ניתן לראות וויזואלית שכאשר נכנס מחדר לפלסמיד יתקבלו מושבות לבנות וכאשר לא נכנס יתקבלו מושבות כחולות. מטרת פרוייקט זה היא כיוול התנאים המיטביים לקבלת ליגציה יעילה, קרי, אחוז מושבות לבנות גבוה. ישנם גורמים רבים המשפיעים על קצב הליגציה כגון ריכוז האנזים, ריכוז הסובטרט, טמפרטורה ועוד. שאלת החקר העיקרית שלנו עוסקת בהשפעת היחס המולרי על יעילות הליגציה. היחס המולרי הוא ריכוז המחדר לפלסמיד בתגובת הליגציה. שאלת החקר השנייה שלנו עוסקת בהשפעת ריכוז האנזים על יעילות הליגציה.

## תוצאו

**PCR** להגברת הגן *Amilase* הוגבר מגנום של חיידק בצילוס באמצעות PCR תוצר ה PCR הורץ בג'ל אלקטרופורזה. התקבל תוצר יחיד בגודל המצופה



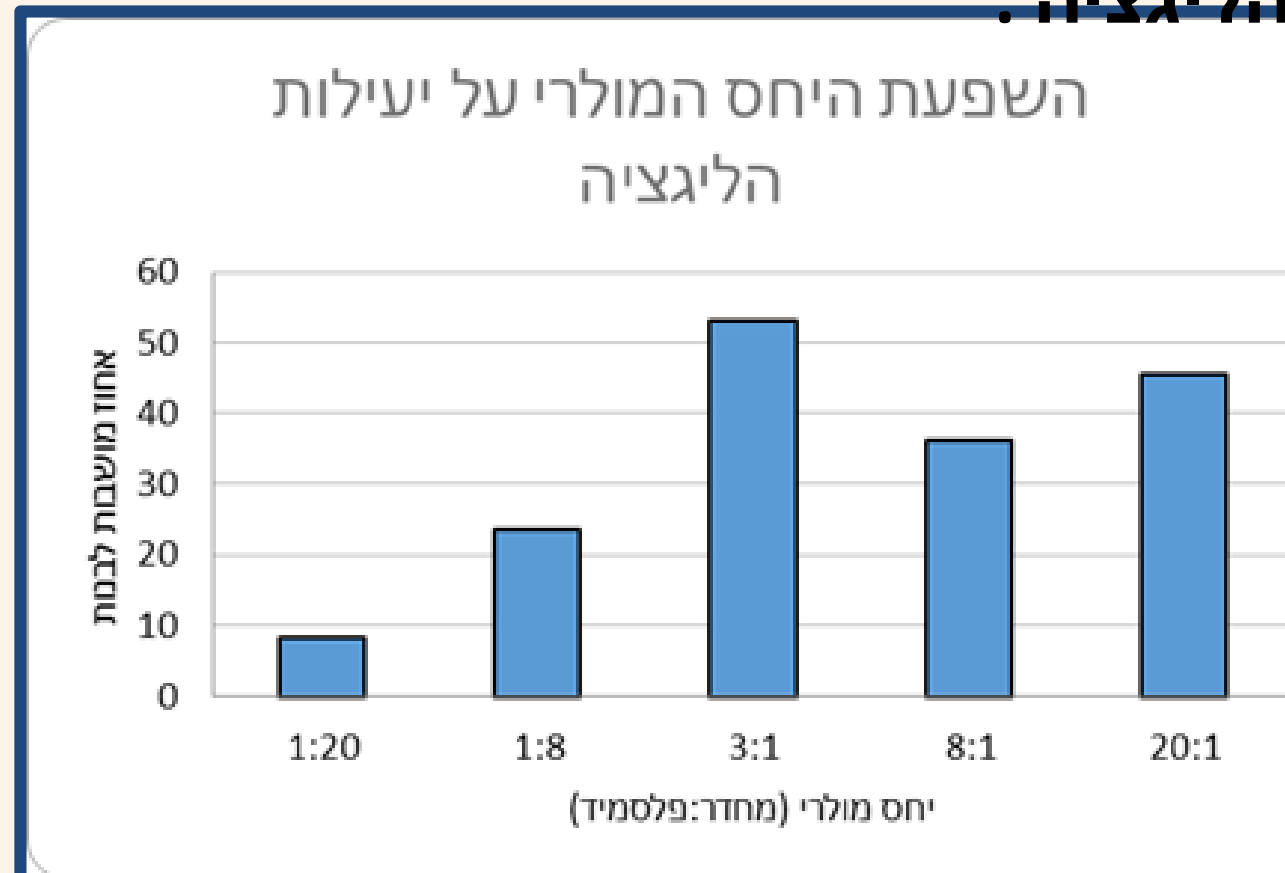
חיידקים לאחר טרנספורמציה עם פלסמיד שעבר ליגציה עם תוצר ה PCR על צלחת LB. ניתן לראות מושבות כחולות שמייצגות חיידקים המכילים פלסמיד ללא מחדר ומושבות לבנות שמייצגות חיידקים המכילים פלסמיד עם מחדר.



מספר המושבות שהתקבלו על גבי צלחות הביקורת.

ביקורת	מושבות לבנות	מושבות כולל	אחוז מושבות לבנות
ביקורת שלילית בלי מחדר	0	24	0
ביקורת שלילית בלי אנזים	4	23	17.39
ביקורת חיובית	14	40	35

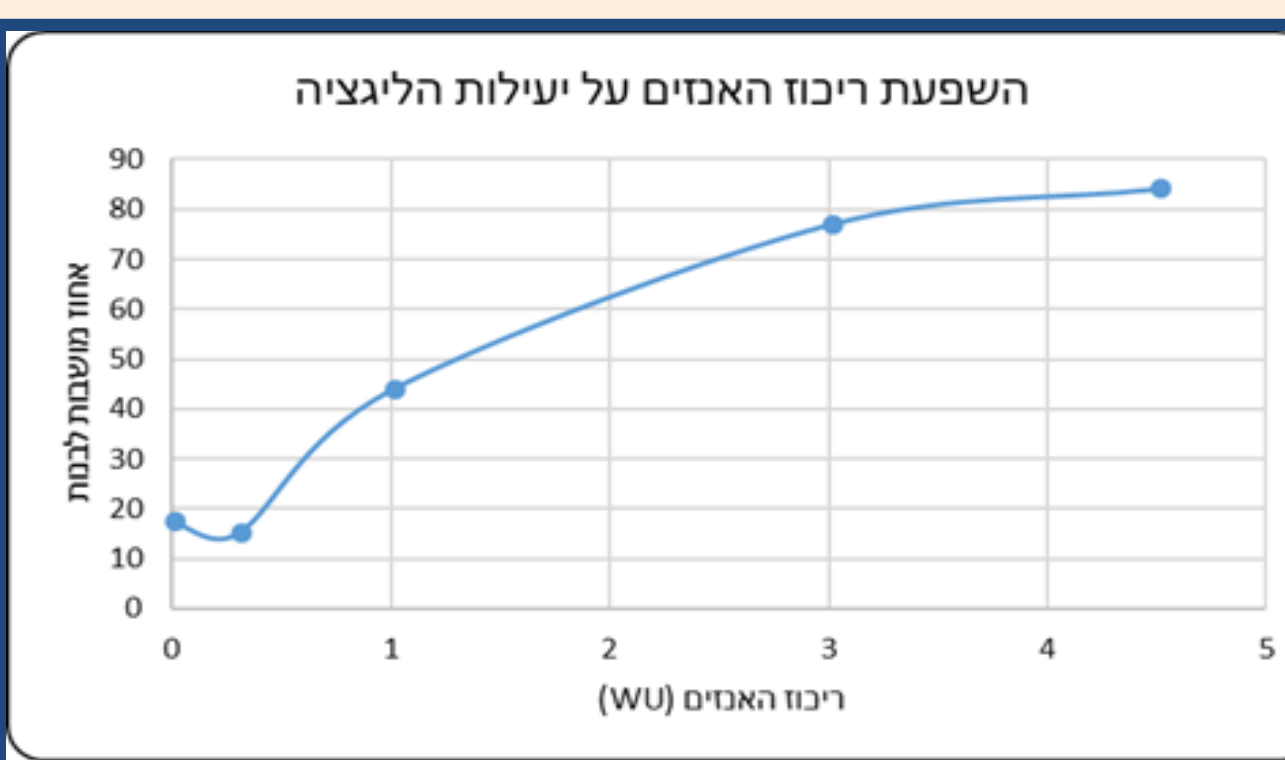
## שאלת חקר ראשונה - השפעת היחס המולרי על יעילות הליגציה



סוג טיפול	ממוצע	סטיית תקן
1:20	8.28	1.52
1:8	23.65	8.28
3:1	53.00	12.08
8:1	36.25	16.19
20:1	45.56	47.18

בוצעה ליגציה בחמישה יחסים מולרים שונים וחושב אחוז המושבות הלבנות מתוך כלל המושבות שגדלו על הצלחת. הנתונים מציגים ממוצע של 3 החזרות לכל טיפול.

## שאלת חקר שנייה - השפעת ריכוז אנזים על יעילות הליגציה



סוג טיפול	ממוצע	סטיית תקן
0.3	15.18	8.22
1	43.83	8.13
3	76.87	9.78
4.5	84.05	4.00

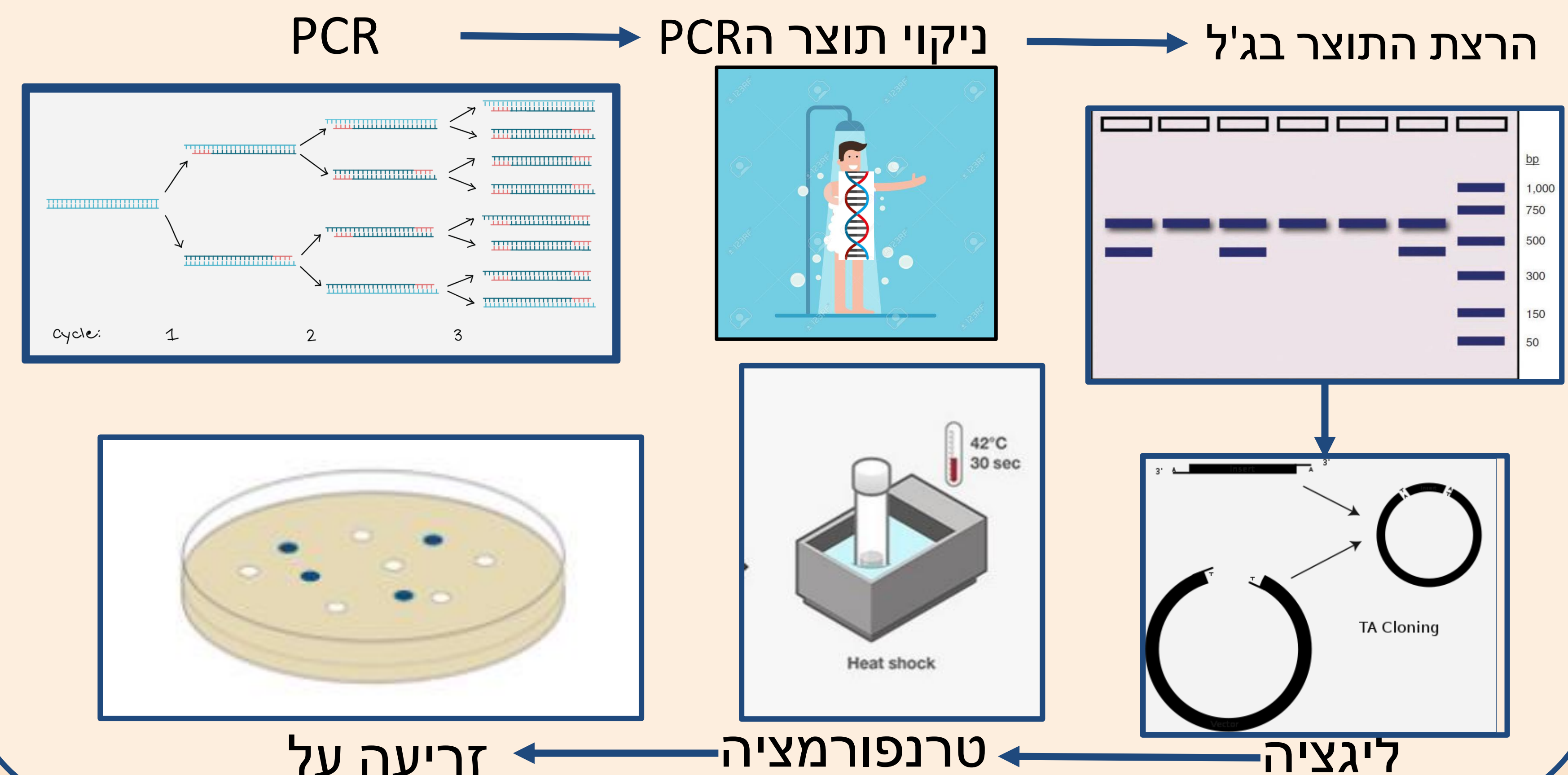
בוצעה ליגציה בחמישה ריכוזי אנזים שונים וחושב אחוז המושבות הלבנות מתוך כלל המושבות שגדלו על הצלחת. הנתונים מציגים ממוצע של 3 החזרות לכל טיפול.

## מסקנות

עבור שאילת החקר המרכזית, השפעת היחס המולרי על יעילות הליגציה, התוצאות שהתקבלו בניסוי קובעות כי היחס המולרי שהביא לליגציה היעילה ביותר הוא יחס של 3:1 בין פלסמיד למחדר. תוצאות אלו תואמות להשערתנו וכן תואמות להמלצת החברה.

עבור שאלת החקר השנייה, השפעת ריכוז האנזים על יעילות הליגציה, עפ"י התוצאות שהתקבלו בניסוי ניתן לראות כי ככל שריכוז האנזים עולה, כך יעילות הליגציה עולה עד לריכוז של 3.5WU ומריכוז זה ומעלה יעילות הליגציה לא משתנה. תוצאות אלו תואמות לגרף קלאסי של השפעת ריכוז אנזים על הפעילות שלו, אשר בו בהתחלה נראה יחס ישר עולה ולאחר מכן נכנס לישורת קבועה כאשר ריכוז הסובסטרט מתחיל להוות גורם מגביל. בניסוי זה ותחת התנאים בהם עבדנו ניתן לראות כי

## מהלך העבודה



## ביבליוגרפיה

מאמר מתורגם ומעובד ע"י ד"ר שירי רבינוביץ'  
Gregory J.S. Lohman, Stanley Tabor, and Nicole M. Nichols.  
*Molecular Biology* 3.14.1-3.14.7,  
April 2011

הנדסה גנטית - איך ולמה?  
מתוך: <http://www.amalnet.k12.il/sites/>