

# פרויקט החקר בביולוגיה

## שאלות המחקר:

- מהי השפעת ריכוז הפלסמיד על יעילות הטרנספורמציה בחיידקים?
- מהי השפעת זמן הלם הקור על יעילות הטרנספורמציה בחיידקים?

מגישים: שוהם כהן, קים שגב ובן שלזינגר

**כפר הנוער ויצו קנדה נהלל**

כיתה: י"ב

שם המורה: ד"ר שירי רבינוביץ'

תאריך הגשה: 18/4

## תוכן עניינים:

3-5.....	מבוא.....
6-14.....	מערך החקר, שיטות וחומרים.....
15-18.....	תוצאות.....
19-22.....	דיון ומסקנות.....
23-26.....	נספח 1- ניסוי מקדים.....
27-28.....	ביבליוגרפיה.....

## מבוא

החיידקים הינם יצורים חד תאיים פרוקאריוטים, חסרי גרעין הקיימים כבר מיליוני שנים. ישנם סוגים רבים של חיידקים, והם ממוינים על פי הצורה של דופן התא שלהם. חיידקי נקד (Coccus) הינם בעלי צורה עגולה כמו כדור. דוגמה לחיידקי נקד הם חיידקי סטרפטוקוקוס. חיידקי מתג (Bacillus) הינם חיידקים בעלי צורת מקל ולרוב יהיו מאוגדים בשרשרות. חיידקים סלילוניים (Spiral) הינם חיידקים בעלי צורת סליל. (ויקיפדיה, 2019)

החיידקים משמשים מאז שנות השבעים של המאה ה-20 ככלים בשיבוט מולקולרי, חיידק *E. coli* הוא אחד ממיני החיידקים החיים במעי התחתון של בעלי חיים הומאותרמיים, המשתייך למשפחת *Enterobacteriaceae*. אינם פתוגניים, זן מסוים של חיידקי *E. coli* בשם - Dh5a הונדסו לכדי כך שיוכלו להיות חדירים יותר לפלסמידים בתהליך הטרינספורמציה בשיבוט המולקולרי, כך שהם מצוינים לשיבוט מולקולרי. (ויקיפדיה, 2020)

שיבוט מולקולרי הוא החדרת מקטע DNA של יצור אחד לתוך DNA של יצור אחר, בשיטות של הנדסה גנטית. השיבוט אפשרי משום שה-DNA אוניברסלי לכל עולם החי והצומח. לעיתים קרובות משבטים גנים אל תוך חיידקים. כדי להחדיר גן לחיידק משתמשים בנשא, במקרה זה הנשא הוא פלסמיד שהינו קטע DNA דו גדילי מעגלי חוץ כרומוזומלי הנמצא בחלק מהחיידקים. הפלסמיד המצוי בחיידקים משתכפל באופן עצמאי בתא החיידק ללא תלות במחזור השכפול של ה-DNA בתא החיידק. מטרתו העיקרית של הפלסמיד היא העברת חומר גנטי בין חיידקים, כלומר הפלסמיד העובר בין החיידקים מקנה תכונות חדשות לחיידק אליו הוא מועבר. (ויקיפדיה, 2020)

בטבע באופן טבעי קיימות שלוש דרכים להעברת חומר תורשתי בין חיידקים. קוניוגציה, תהליך של העברה גנטית בה החומר התורשתי מועבר מחיידק אחד לחיידק אחר על ידי מגע ישיר שנוצר באמצעות גשר ציטופלסמתי. דרך נוספת היא העברת חומר גנטי באמצעות בקטריופאגים שבעזרתם יכול DNA לעבור מחיידק לחיידק. מעבר זה נקרא טרינסדוקציה. טרינספורמציה היא העברת חומר תורשתי מחיידק אחד לאחר, ללא מגע ביניהם. במסגרת התהליך ה-DNA יוצא לסביבה, וממנה נכנס אל חיידק אחר. היום במעבדה על מנת להעביר חומר תורשתי בין חיידקים משתמשים בטרנספורמציה. (Maral Rahimzadeh et al)

דוגמא להעברת חומר תורשתי היא הקניית עמידות לאנטיביוטיקה לחיידק אחר. הפלסמיד יכול להקנות עמידות לסוג אנטיביוטיקה שלא הייתה קיימת בחיידק אליו הוא נכנס ע"י הכנסת גן המקודד לחלבון המקנה עמידות לאנטיביוטיקה. כיום חוקרים רבים מנצלים את התכונות האלו של הפלסמיד על מנת להשתמש בו בשיבוט מולקולרי כנשא להעברת חומר גנטי הרצוי לשבט. (ארז גרטי, 2010)

על מנת לבצע שיבוט מולקולרי דרושים להתבצע כמה שלבים עיקריים: בשלב הראשון יש להגביר את המקטע המבוקש באמצעות מכשיר ה-PCR המשמש לשכפול מקטעי DNA. בשלב הבא להכין את הפלסמיד אותו רוצים להחדיר לחיידק על ידי חיתוך ה-DNA הרצוי לשיבוט בעזרת אנזימי הגבלה ליצירת קצוות דביקים. לאחר מכן יש לחתוך את הפלסמיד באותם אנזימי הגבלה ליצירת אותם קצוות דביקים. לאחר החיתוך מוסיפים למבחנה את הפלסמיד ואת ה-DNA

הרצוי לשיבוט ביחד עם האנזים ליגאז שמטרתו לזרז את החיבור בין ה-DNA לפלסמיד בכך שהוא מזרז את יצירת הקשרים הפוספודיאסטרים בין הסוכר בנוקליאוטידים. עתה חלק מהפלסמידים יהיו רקומביננטים (פלסמידים המכילים את המקטע החדש) וחלק יסגרו על עצמם ולא יקבלו את המקטע החדש. (עמלנט, אין תאריך)

בשלב השני יש להחדיר את הפלסמידים לתאי חיידקים על מנת שה-DNA שאותו רוצים לשבט יתרבה. על מנת להחדיר את הפלסמידים לחיידקים ניתן להשתמש בשתי שיטות: האחת היא אלקטרופרציה- מתן שוק חשמלי על מנת להעלות את חדירות קרום התא. השיטה השנייה היא מתן הלם חום וקור לחיידקים, כלומר חשיפה להלם חום לזמן קצר ולאחר מכן חשיפה לקרח למספר דקות. כתוצאה מהלמי החום נוצרים חורים בממברנות של החיידקים אשר דרכן נכנס המקטע ומשתלב בגנום חיידק. בנוסף יש צורך לבצע הלם הקור משום שתפקידו להאט את הפעולה של ה- $CaCl_2$  על מנת שהתאים לא ייהרסו. בהלמי החום והקור ניתן להשתמש בטמפרטורות שונות. ההבדלים בטמפרטורות השונות יובילו לתוצאות שונות בכמות כניסת הפלסמידים. יתרה מכך זמני הלמי החום והקור משפיעים גם כן על תוצאות הטרנספורמציה. (עמלנט, אין תאריך) (ויקיפדיה, 2015)

בשלב השלישי יש לגדל את החיידקים על צלחות. בצלחות אלו יהיו מספר סימנים כמו סמן ברירה- שילוב האנטיביוטיקה במצע הגידול על מנת לברור את החיידקים המכילים עמידות לאנטיביוטיקה שאלו הם החיידקים שעברו טרנספורמציה. סמן נוסף הוא גן מדווח שתפקידו להגיב עם גן הנמצא אצל החיידק, באמצעות התגובה ניתן לברור אלו מהחיידקים מכילים גן זה כלומר את החיידקים אליהם הוחדר הפלסמיד עם המקטע החדש. GFP הוא גן מדווח. יצורים בהם נמצא גן זה זוהרים תחת אור אולטרה סגול. באמצעות הגן המדווח GFP נוכל לחשב את יעילות הטרנספורמציה. הגן GFP הוא המחדר שאותו רצינו להכניס לפלסמיד. במידה והגן GFP נכנס אל הפלסמיד, והפלסמיד נכנס אל החיידק, החיידק יואר כאשר יאירו עליו, מושבות החיידקים שזוהרו מכילות את הפלסמידים עם המחדר. ולפיכך נוכל לדעת לכמה חיידקים נכנס הפלסמיד עם המחדר ובעקבות זאת לחשב את יעילות הטרנספורמציה. (עמלנט, אין תאריך)

את מידת הצלחת הטרנספורמציה ניתן למדוד על פי יעילות הטרנספורמציה. יעילות הטרנספורמציה (TE) נמדדת על ידי שכלול הגורמים הבאים אל תוך נוסחה אחת –

$${}^{(2)}TE = \frac{1000ng * No' of colonies}{ng of DNA plated}$$

יעילות הטרנספורמציה יכולה להשתנות על ידי שינוי הגורמים בניסוי כמו ריכוז הפלסמידים, משך הלם הקור וחום, טמפרטורת הלם החום ועוד המשפיעים על הצלחת הליגציה ו/או הטרנספורמציה וכתוצאה מכך על מספר המושבות. התוצאה שתצא הינה מידה יחסית ליעילות הטרנספורמציה. (Weng-Tat CHAN et al)

במחקר זה נבדקו השפעתם של שני גורמים עיקריים על יעילות טרנספורמציה, הראשון הינו כמות הפלסמיד שהוחדר לחיידקים, בניסוי הוחדרו כמויות שונות של DNA אל החיידקים על מנת לבדוק את הכמות המיטבית ביותר ליעילות טרנספורמציה. הגורם השני שנבדק הינו השפעת משך

הלם הקור על יעילות הטרנספורמציה, בניסוי נוסה טווח רחב של זמנים על מנת למצוא את משך הלם הקור האופטימלי ליעילות טרנספורמציה גבוהה.

מטרת המחקר הינה לקבוע את כמות הפלסמידים האופטימלית ואת משך הלם הקור האופטימלי ליעילות טרנספורמציה גבוהה. תרומת עבודת החקר לידע הביולוגי וכיוון המחקר מבחינת הבנת התופעה והתהליך הנחקר היא מציאת כמות הפלסמיד האופטימלית לשיבוט מוצלח עם חיידקי E.coli מסוג Dh5α ומציאת משך הלם הקור האופטימלי לשיבוט מוצלח עם חיידקים אלו.

שאלת המחקר המרכזית בעבודתנו היא מהי השפעת כמות הפלסמיד על יעילות הטרנספורמציה בחיידקים?

אנו משערים כי ככל שכמות הפלסמידים תהיה גבוהה יותר כך יעילות הטרנספורמציה תגדל, עד לגבול בו כמות הפלסמידים תהיה גבוהה מדי ויעילות הטרנספורמציה תפחת. הבסיס הביולוגי להשערותינו הוא שהחדרת פלסמיד לחיידק דרך קרומי התא בטרנספורמציה מלאכותית נעשית באמצעות מתן הלם חום קצר לחיידק שעבר שטיפה ב-  $\text{CaCl}_2$  (חיידקים קומפטנטים). נוכחות יוני הקלציום משפרת את יכולת החיידק לקלוט את ה-DNA הזר, בעוד מתן הלם החום גורם לממברנת החיידק להיות פחות צמיגה ויוצר נקבים זעירים דרכם הפלסמיד יכול להיכנס אל תוך ציטופלזמת החיידק. כמות פלסמיד נמוכה מדי לא תאפשר מעבר של מספיק מולקולות DNA לתוך החיידק, בעוד כמות פלסמיד גבוהה מדי עלולה להיות טוקסי לתאי החיידק.

שאלת המחקר השנייה בעבודתנו היא מהי השפעת משך זמן הלם הקור על יעילות הטרנספורמציה בחיידקים? אנו משערים כי בזמן האופטימלי שהוא שתי דקות של משך הלם הקור יעילות הטרנספורמציה בחיידקים תהיה הגבוהה ביותר. הבסיס הביולוגי להשערותינו הוא שבספרות מופיעות מספר המלצות למשך זמן מתן הלם הקור, החל מדקה אחת ועד 10 דקות. המנגנון לא לחלוטין ברור אבל יש קונצנזוס שמתן הלם הקור משפר את יעילות הטרנספורמציה. במתן הלם קור קצר, הטמפרטורה לא תספיק להשפיע, ובמתן הלם קור לזמן ארוך אין השפעה לזמן ארוך יותר.

הקשר בין שאלת החקר המרכזית (שאלת החקר הראשונה) לשאלת החקר השנייה הוא שזמן הלם הקור הוא גורם משפיע נוסף על יעילות הטרנספורמציה בחיידקים.

## מערך החקר, כולל שיטות וחומרים

### מערך החקר:

שאלה חקר ראשונה- מהי השפעת כמות הפלסמיד על יעילות הטרנספורמציה בחיידקים?

הניסוי בוצע בבית הספר ויצו נהלל במעבדת הביוטכנולוגיה בתאריך 25.9.19. ביצוע המדידות נעשה בתאריך ה- 26.9.19.

האורגניזם הנבדק הוא חיידק E.coli מסוג Dh5a.

משתנה תלוי: יעילות הטרנספורמציה.

דרך מדידת המשתנה התלוי ואופן עיבוד התוצאות: בוצעה ספירת מושבות חיידקים בכל צלחת וספירת מושבות זורחות ב-uv, לאחר מכן בוצע ממוצע לכל טיפול המכיל 3 חזרות והכנסה

לנוסחה הבאה על מנת לחשב את יעילות הטרנספורמציה:  $\frac{\text{מספר מושבות בצלחת} \times (\text{CFU}) \times 1000 \text{ ng DNA}}{\text{נוגורם (ng) בפועל}}$

משתנה בלתי תלוי: כמות הפלסמיד.

אופן שינוי המשתנה הבלתי תלוי: מיהול הפלסמידים עם מים.

קבוצות הטיפול של המשתנה הבלתי תלוי:

1 ng (1)

10 ng (2)

100 ng (3)

250 ng (4)

500 ng (5)

0 ng - בקרה ללא פלסמיד.

0ng - בקרה ללא פלסמיד.

טווח זה נבדק משום שרצינו לראות השפעה של כמויות שונות של פלסמידים על יעילות הטרנספורמציה בחיידקים בטווח רחב החורג מהטווח המפורסם כאופטימלי (0.1ng-10ng) אך במחקרים שקראנו השתמשו ב-0.1ng). כלומר, בכמויות גבוהות יותר ונמוכות יותר מהטווח.

גורמים קבועים: זמן הלם חום וקור, טמפרטורת הלם חום וקור, נפח LB, ריכוז האנטיביוטיקה, סוג הפלסמידים. היה חשוב לשמור על גורמים אלה קבועים על מנת לבדוק שהגורם הבלתי תלוי הוא היחיד שמשפיע ולא קיים גורם אחר שהשפיע על תוצאות הניסוי.

בקרות:

-בקרה חיובית: צלחת בלי אנטיביוטיקה, עם חיידקים שעברו טיפול בהלם חום ולאחריו הלם קור, ללא פלסמידים. הציפייה היא לגידול אופטימלי, משום שחיידקים שעברו טיפול זה ללא פלסמידים יוכלו לגדול ללא מניעה על מצע ללא אנטיביוטיקה מאחר והמצע אינו בורר.

-בקרה שלילית: צלחת עם אנטיביוטיקה, עם חיידקים שעברו טיפול בהלם חום ולאחר הלם קור ללא פלסמידים. הציפייה היא שלא יגדל כלום. לפלסמידים גן עמידות לאנטיביוטיקה ומעניקים עמידות לחיידקים המכילים אותם. חיידקים ללא פלסמידים לא יוכלו לגדול על מצע המכיל אנטיביוטיקה. זוהי בקרה חיצונית ללא הגורם הבלתי תלוי.

החשיבות לבקרות אלו היא בדיקה שהאנטיביוטיקה היא אכן בוררת את החיידקים המכילים פלסמיד עם גן לעמידות לאנטיביוטיקה, ובנוסף להראות שללא פלסמידים החיידקים לא יגדלו על מצע מזון שמכיל אנטיביוטיקה משום שאין להם את הגן המכיל עמידות. בנוסף החשיבות לבקרות אלו היא, בדיקה שאין זיהום של פלסמידים אחרים בעלי עמידות או חיידקים בעלי עמידות.

מספר חזרות: 3 חזרות לכל טיפול, כלומר מכל טיפול ייזרעו 3 צלחות.

#### תנאי ביצוע הניסוי עפ"י תוצאות הניסוי המקדים –

ע"פ תוצאות הניסוי המקדים (ראה נספח) הוחלט להשתמש בתנאים הבאים: זריעה של 100uL חיידקים מתוך מדיום הגידול אשר גודלו במשך שעתיים ללא מיהול.

שאלת חקר שנייה – מהי השפעת משך זמן הלם קור על יעילות הטרנספורמציה בחיידקים?

הניסוי בוצע בבית הספר ויצו נהלל במעבדת הביוטכנולוגיה בתאריך 25.9.19. ביצוע המדידות נעשה בתאריך ה- 26.9.19.

האורגניזם הנבדק הוא חיידק E.coli מסוג Dh5a.

משתנה תלוי: יעילות הטרנספורמציה

דרך מדידת המשתנה התלוי ואופן עיבוד התוצאות: בוצעה ספירת מושבות חיידקים בכל צלחת וספירת מושבות מאירים ב-uv, לאחר מכן בוצע ממוצע לכל טיפול המכיל 3 חזרות והכנסה

לנוסחה הבאה על מנת לחשב את יעילות הטרנספורמציה:  $\frac{\text{מספר מושבות בצלחת} (CFU) * DNA * 1000ng}{\text{נוגרים } (ng) \text{ בפועל}}$

המשתנה הבלתי תלוי: משך זמן הלם הקור.

אופן שינוי המשתנה הבלתי תלוי: מדידת זמן שהייה שונה באמבט הקרח.

קבוצות הטיפול של המשתנה הבלתי תלוי :

- (1) 20 שניות
- (2) 1 דק'
- (3) 7 דק'
- (4) 10 דק'
- (5) 20 דק'
- (6) 0 דק' – בקרה שלילית
- (7) 2 דק' – בקרה חיובית

טווח זה נבדק משום שרצינו לראות את השפעת משך זמן הלם הקור על יעילות הטרנספורמציה בזמנים הארוכים והקצרים מהזמן האופטימלי (1דק' - 10דק') ובזמנים הנמצאים בטווח הזמנים האופטימלי.

גורמים קבועים : זמן הלם חום, טמפ' הלם החום והקור, נפח LB קבוע, ריכוז הפלסמידים, ריכוז האנטיביוטיקה, סוג הפלסמידים. היה חשוב לשמור על גורמים אלה קבועים על מנת לבדוק שהגורם המשפיע הוא היחיד שמשפיע ולא קיים גורם אחר שהשפיע על תוצאות הניסוי.

בקרות :

- בקרה חיובית : צלחת ללא אנטיביוטיקה עם חיידקים שעברו הלם חום והלם קור במשך הזמן האופטימלי, ללא הוספת פלסמידים. הציפייה היא לגידול אופטימלי, משום שחיידקים שעברו טיפול ללא פלסמידים יוכלו לגדול ללא מניעה על מצע ללא אנטיביוטיקה מאחר והמצע אינו בורר, בנוסף משך הלם הקור הוא האופטימלי ולכן הציפייה היא לגידול אופטימלי.

- בקרה שלילית : צלחת עם אנטיביוטיקה עם חיידקים שעברו טרנספורמציה עם פלסמיד, עם הלם חום אך ללא הלם קור כלל. מטרת הלם הקור היא להאט את הפעולה של ה-  $\text{CaCl}_2$  על מנת שהתאים לא ייהרסו. ולכן ציפינו שכמעט ולא יגדלו מושבות עקב הרס של תאי החיידקים על ידי ה-  $\text{CaCl}_2$ . המושבות שכן יגדלו הן מושבות המכילות פלסמידים המקנים עמידות לאנטיביוטיקה. זוהי בקרה חיובית, ללא הגורם הבלתי תלוי.

לבקרות אלו מספר חשיבויות : החשיבות לבקרה השלילית היא בכדי להוכיח שמשך זמן הלם הקור הוא הגורם היחיד המשפיע על יעילות הטרנספורמציה בניסוי זה. החשיבות לבקרה החיובית היא לבדוק שהאנטיביוטיקה היא אכן זאת שהורגת את החיידקים ושלא נוכחות החיידקים יוכלו לגדול ללא בעיה, כלומר לבדוק שאין גורם אחר היכול לשבש את תוצאות הניסוי בכך שימית את החיידקים.

מספר חזרות : 3 חזרות לכל טיפול, כלומר מכל טיפול ייזרעו 3 צלחות.



## תנאי ביצוע הניסוי עפ"י תוצאות הניסוי המקדים –

ע"פ תוצאות הניסוי המקדים (ראה נספח) הוחלט להשתמש בתנאים הבאים : זריעה של 100ul חיידקים מתוך מדיום הגידול אשר גודלו במשך שעתיים ללא מיהול. ושימוש ב10ng פלסמיד.

### חומרים

- מבחנה עם 2 מ"ל חיידקים קומפטנטים לטרנספורמציה בheat block.
- מבחנה עם 5ml תמיסת  $\text{CaCl}_2$  בריכוז 0.1M.
- פלסמיד pGFP – 5ul בריכוז 10ng/mu.
- פלסמיד pGFP – 5ul בריכוז 70ng/mu.
- 10 מ"ל LB סטרילי.
- 33 צלחות LB עם אמפיצילין-  $100\mu\text{g/ml}$
- 6 צלחות LB אגר ללא אנטיביוטיקה

### כלים:

- כהליה
- סל קרח
- Heat block בטמפרטורה של 42 מעלות צלזיוס
- אינקובטור לגידול צלחות בטמפרטורה של 37 מעלות צלזיוס
- צנטריפוגה למבחנות אפנדורף
- פיפטורים 5ml ,1000ul ,100ul ,10ul
- טיפים מתאימים
- מקל דריגלסקי סטרילי לזריעה
- כלי "פסולת" עם שקית לפסולת ביולוגית
- שטפן עם 70% אתנול

## שיטות-טרנספורמציה

### חלק א – הכנת חיידקים קומפטנטים

תחילה יש לחטא את סביבת העבודה באמצעות אלכוהול 70%.

הוכן אמבט קרח על ידי כתישת קרח עד לגריסתו אשר הושם בקערה שטוחה ורחבה. לאמבט הקרח הוכנסו 2 מבחנות עם 1.5ul תרחיף חיידקים של חיידקי E.Coli במצע מזון נוזלי (LB). המבחנות הודגרו באמבט הקרח למשך עשר דקות. בזמן ההדגרה הוכנו 12 מבחנות אפנדורף אשר סומנו במספר ואות אנגלית 1A-1G (המספר-מסמל את שאלת החקר הראשונה והאות האנגלית מסמלת את סוג הטיפול) והוכנסו לאמבט הקרח אף הן. במקביל, גם תמיסת  $CaCl_2$  הוכנסה לאמבט הקרח.

לאחר מכן החיידקים שוקעו באמצעות צנטריפוגה למשך 3 דקות ב-2000 RPM. בתום זמן הצנטריפוגה הוצאו מבחנות החיידקים בעדינות ו1ml מהנוזל העליון הוצא באמצעות פיפטור וטיפ סטרילי מכל מבחנה והועבר לכלי המסומן כפסולת. הנוזל הנותר (0.5ml), עבר פיפטציה על מנת להרחיף את החיידקים מחדש בתוכו לקבלת תרחיף מרוכז של חיידקים. בעזרת פיפטור סטרילית בנפח 5ml הועברו בעדינות 5ml מתמיסת ה- $CaCl_2$  למבחנות החיידקים והן נסגרו ועורבבו קלות. מבחנות אלו הוכנסו לאמבט הקרח להדגרה במשך 20 דקות.

### חלק ב – טרנספורמציה

בתום זמן האינקובציה, הנוזל שבמבחנות תרחיף החיידקים טולטל בעדינות וחולק לסט מבחנות האפנדורף שהוכן וסומן מראש עבור הטרנספורמציה עבור שתי שאלות החקר 1A-1G, 2A-2G, 0.5ml לכל מבחנה. מבחנות אלה נסגרו והוכנסו להדגרה באמבט הקרח.

שאלת החקר הראשונה- מהי השפעת כמות הפלסמיד על יעילות הטרנספורמציה בחיידקים:

#### **טבלה מספר 1- כמות סופית של פלסמיד בכל מבחנה**

מספר מבחנה	כמות סופית של פלסמיד (ng\ ul)
1A	1
1B	10
1C	100
1D	250
1E	500
1F – בקרה שלילית	0
1G – בקרה חיובית	0

בשאלה זו, בזמן ההדגרה באמבט הקרח הוכן סט נוסף של מבחנות אפנדורף אשר בהן הוכנו כמויות שונות של פלסמיד באופן הבא- מספר (המציין את שאלת החקר הראשונה (1), אות אנגלית (המציינת את סוג הטיפול A-G) והאות p (המציינת נוכחות פלסמיד), (ראה תמונה מספר 1- הכנת המיהולים), (ראה טבלה מספר 2):

**הכנת הטיפולים השונים- טבלה מספר 2:**

שם המבחנה	1Ap	1Bp	1Cp	1Dp	1Ep	1Fp	1Gp
כמות סופית של פלסמיד (ng)	1	10	100	250	500	0	0
פלסמיד (70ng/ul)	-----	-----	1.4	3.6	7.1	-----	-----
פלסמיד (10ng/ul)	*1	1	-----	-----	-----	-----	-----
מים (ul)	7	7	6.6	4.4	0.9	8	8
נפח סופי	8	8	8	8	8	8	8

\*במבחנה A1 הוסף 9ul DDW ו- 1ul פלסמיד בריכוז 10ng/ul, על מנת למהול את הריכוז המקורי ולהגיע לכמות הרצויה.



תמונה מספר 1- הכנת המיהולים השונים של הפלסמידים

לכל מבחנה (1A – 1G) הוסף פלסמיד בכמות המתאימה (ראה טבלה מספר 1), 12 מבחנות אלו עורבבו והוכנסו לאמבט הקרח למשך 20 דקות.

לאחר ההדגרה בקרח מבחנות 1A-1G עברו הלם חום בטמפרטורה של 42 מעלות למשך דקה, והוכנסו לשתי דקות בקרח, לכל מבחנה הוכנס LB 1ml, ולאחר מכן כל מבחנה עברה פיפטציה והודגרה בטלטול ב37 מעלות צלזיוס למשך שעה.

שאלת החקר השנייה "השפעת משך זמן הלם הקור על יעילות הטרנספורמציה בחיידקים":  
 בשאלה זו, לכל אחת ממבחנות 2A-2G הוסף פלסמיד בריכוז 70 (ng/ ul). מבחנות 2A-2G עברו הלם חום בטמפרטורה של 42 מעלות למשך דקה והועברו לקרח למשכי זמן שונים כמפורט בטבלה. (ראה טבלה מספר 3)

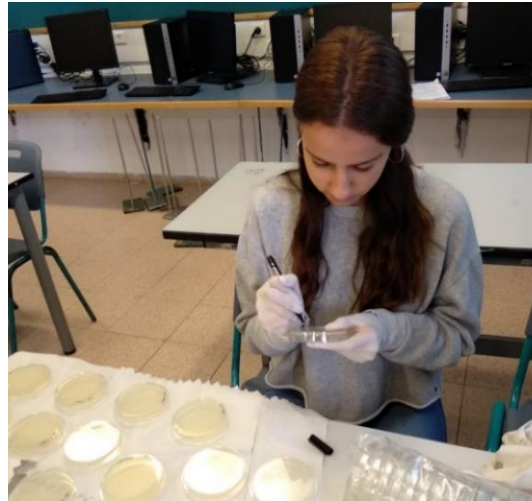
#### טבלה מספר 3- זמן הלם הקור בכל מבחנה

מספר מבחנה	זמן הלם קור (דק')
2A	1/3
2B	1
2C	7
2D	10
2E	20
2F – בקרה שלילית	0
2G – בקרה חיובית	2

בתום זמן הדגרת מבחנות 2A-2G בקרח לכל מבחנה הוסף 1ml LB ולאחר מכן כל מבחנה עברה פיפטציה והודגרה בטלטול ב37 מעלות למשך שעה.

#### חלק ג- זריעת החיידקים על הצלחות

צלחות הזריעה סומנו מראש באופן הבא: סוג האנטיביוטיקה (AMP או ללא), שם תלמידי הקבוצה, מספר (שאלת חקר ראשונה (1) או שניה (2)), אות אנגלית (סוג הטיפול A-G) ואות עברית (מספר חזרה א-ג). לדוגמה- צלחת המסומנת כ "ב1B" AMP- מדובר בצלחת המכילה AMP השייכת לשאלת חקר ראשונה, טיפול B חזרה מס' 2. (ראה תמונה מספר 2)



תמונה מספר 2- סימון צלחות הזריעה

בתום ההדגרה נזרעו מכל מבחנה 3 צלחות באופן הבא : באמצעות טיפ סטרילי הועבר מכל מבחנה 200 ul חיידקים לצלחות הסלקציה בהתאמה (ממבחנה 1A הועברו 200 ul חיידקים לצלחות 1A א 1A ב 1A ג). בזריעה על פני הצלחות, הצלחת הוחזקה בזווית של 45 מעלות כאשר מכסה הצלחת פתוח למחצה בסמוך לכוהליה על מנת לאפשר כניסת אויר מינימלית מהסביבה. התערובת פוזרה על הצלחות בעזרת מקל דריגלסקי , בתנועה סיבובית למשך כעשרים שניות. מקל הדריגלסקי חוטא בכוהל והועבר באש באמצעות הכוהליה על מנת לשמור על סטריליות בין זריעה לזריעה בטיפולים השונים. (ראה תמונה מספר 3)

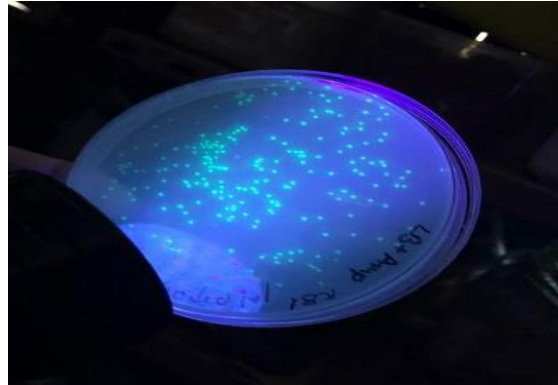


תמונה מספר 3- זריעת החיידקים בעזרת מקל דריגלסקי

לאחר שבכל הצלחות נזרעו חיידקים הוכנסו הצלחות לאינקובטור ב37 מעלות כאשר הן הפוכות לפרק זמן של 18 שעות.

## חלק ד- בדיקת הצלחות

בתום ההדגרה בכל צלחת נספרו מספר המושבות שצמחו ותועדו בטבלה שהוכנה מראש, לאחר מכן כל צלחת הוארה במנורת UV נספרו מספר המושבות הזוהרות. (ראה תמונה מספר 4)



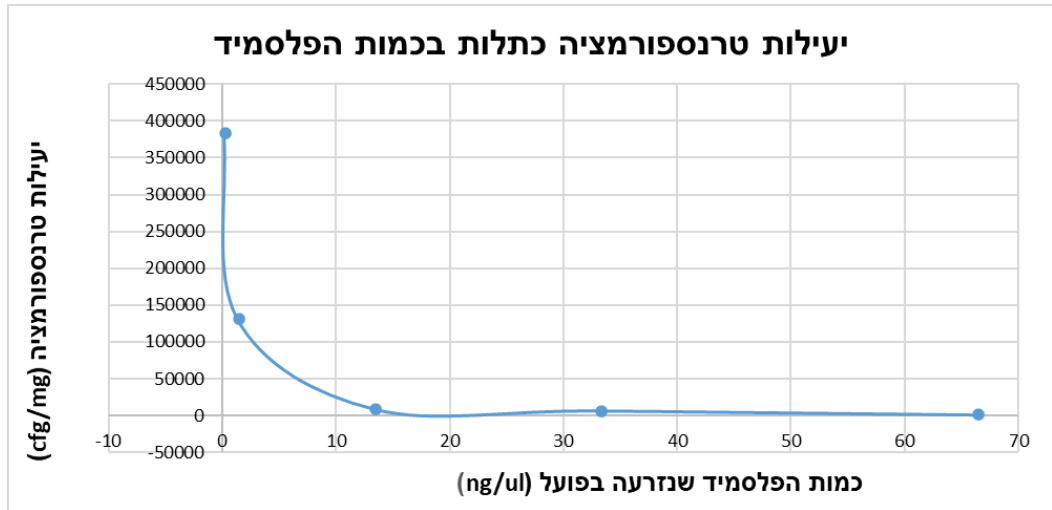
תמונה מספר 4- הארת המושבות באור UV ומספורן

## תוצאות

שאלת חקר הראשונה - השפעת כמות הפלסמיד על יעילות הטרנספורמציה בחיידקים :

**טבלה מספר 4- השפעת כמות הפלסמיד על יעילות הטרנספורמציה בחיידקי E.coli**

מספר הניסוי	סוג הטיפול	מספר החזרה	נוכחות אמפיצילין בצלחת	כמות פלסמיד בטרנספורמציה (ng)	כמות הפלסמיד שנזרעה בפועל (ng/ul)	מספר מושבות	מספר מושבות זוהרות	ממוצע מושבות	יעילות טרנספורמציה (cfu/ug)	סטיית תקן
14.64	A	א	כן	1	0.1	36	36	38.33	4*10 <sup>5</sup>	
		ב				54	54			
		ג				25	25			
22.74	B	א	כן	10	1.3	196	196	170.67	1*10 <sup>5</sup>	
		ב				152	152			
		ג				164	164			
23.54	C	א	כן	100	13.3	117	117	118.67	9*10 <sup>3</sup>	
		ב				143	143			
		ג				96	96			
65.36	D	א	כן	250	33.2	172	172	213.67	6*10 <sup>3</sup>	
		ב				289	289			
		ג				180	180			
33.55	E	א	כן	500	66.3	83	83	61.67	9*10 <sup>2</sup>	
		ב				23	23			
		ג				79	79			
0	F- ביקורת שלילית	א	כן	0	0	0	0	0	0	
		ב				0	0			
		ג				0	0			
0	G- ביקורת חיובית	א	לא	0	0	דשא	0	דשא	לא רלוונטי	
		ב				דשא	0			
		ג				דשא	0			



גרף מספר 1- יעילות הטרנספורמציה כתלות בכמות הפלסמיד

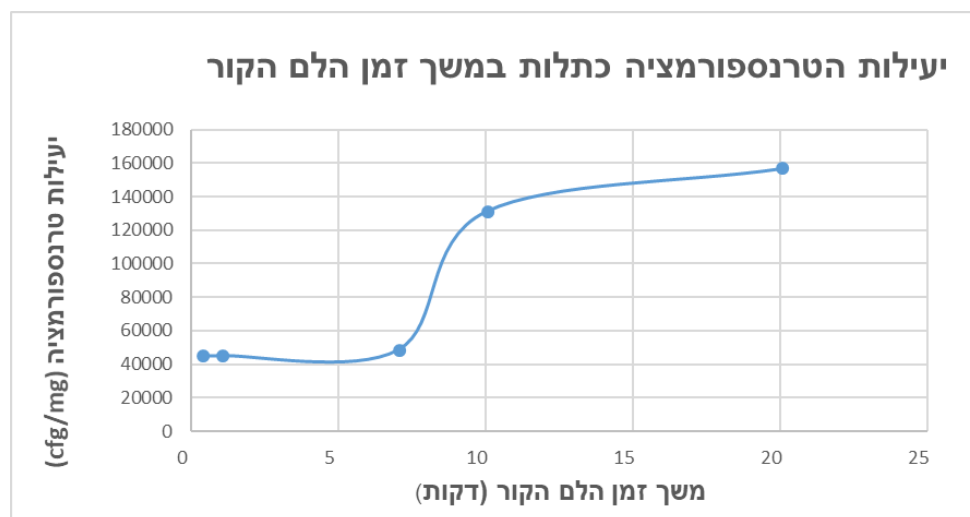
ניתן לראות שככל שכמות הפלסמיד שנזרעה בפועל גבוהה יותר כך יעילות הטרנספורמציה נמוכה יותר. התקיימה טרנספורמציה בטווח של 0-14 כמות פלסמיד שנזרע בפועל (ng/ul) מכמות של 14ng/ul פלסמיד שנזרע בפועל הטרנספורמציה לא עבדה.



שאלת החקר השנייה- השפעת משך זמן הים קור על יעילות הטרנספורמציה בחיידקים :

**טבלה מספר 5- השפעת משך הים הקור על יעילות הטרנספורמציה בחיידקי E.coli**

מספר הניסוי	סוג הטיפול	מספר החזרה	נוכחות אמפיצילין בצלחת	כמות הפלסמיד שנזרעה בפועל (ng/ul)	משך זמן הים קור (דקות)	מספר מושבות	מספר מושבות ממוצע	יעילות טרנספורמציה (cfu/ug)	סטיית תקן
25.11	A	א	כן	1.2	1/3	51	53.67	4*10 <sup>4</sup>	
		ב				80			
		ג				30			
31.43	B	א	כן	1.2	1	60	54	5*10 <sup>4</sup>	
		ב				82			
		ג				20			
5.57	C	א	כן	1.2	7	52	58	4*10 <sup>4</sup>	
		ב				59			
		ג				63			
36.07	D	א	כן	1.2	10	160	157.33	1*10 <sup>5</sup>	
		ב				192			
		ג				120			
21.17	E	א	כן	1.2	20	172	188	2*10 <sup>5</sup>	
		ב				180			
		ג				212			
4.51	F- ביקורת שלילית	א	כן	1.2	0	137	132.33	1*10 <sup>5</sup>	
		ב				132			
		ג				128			
0	G- ביקורת חיובית	א	לא	0	2	0	דשא	לא רלוונטי	
		ב				0			
		ג				0			



גרף מספר 2- יעילות הטרנספורמציה כתלות במשך זמן הים הקור

ניתן לראות שככל שמשך זמן הים הקור ארוך יותר כך יעילות הטרנספורמציה גבוהה יותר. במשך זמן הים קור של 0-7 דקות לא קיימת עלייה ניכרת ביעילות הטרנספורמציה, במשך זמן הים הקור של 7-10 דקות קיימת עלייה חדה ביעילות הטרנספורמציה. בנוסף, קיימת רוויה בנקודה מסוימת (בה במשך זמן הים הקור הוא 10 דקות)- מנקודה זו והלאה יעילות הטרנספורמציה אינה עולה כפי שעלתה לפני נקודה זו.

## דיון ומסקנות

### שאלת החקר הראשונה- מהי השפעת כמות הפלסמיד על יעילות הטרנספורמציה בחיידקים?

בשאלת החקר הראשונה בדקנו מהי השפעת כמות הפלסמיד על יעילות הטרנספורמציה בחיידקים. לפיכך ביצענו טרנספורמציה לחיידקי E.coli מסוג Dh5α בכמויות שונות, בטווח של 1-500ng של הפלסמיד pGFP, ונמדדה יעילות הטרנספורמציה על פי כמות המושבות שגדלו בצלחת ובאמצעות הנוסחה

$$\frac{\text{מספר מושבות בצלחת} \times \text{DNA} \times 1000 \text{ ng}}{\text{נוגרים (ng) בפועל}}$$

השערתנו הייתה שככל שכמות הפלסמידים תהיה גבוהה יותר כך יעילות הטרנספורמציה תגדל בהתאם עד לגבול מסוים עד לגבול בו כמות הפלסמידים תהייה גבוהה מדי ויעילות הטרנספורמציה תפחת.

בניגוד להשערתנו, על פי התוצאות, ובגבולות הטווח שנבדק בניסוי זה, ניתן לראות קשר ישיר בין כמות הפלסמיד ליעילות הטרנספורמציה: ככל שכמות הפלסמיד גבוהה יותר כך יעילות הטרנספורמציה נמוכה יותר. טרנספורמציה יעילה ( $1 \times 10^5$  -  $4 \times 10^5$  cfu/ug) התקיימה בטווח של 0.1-13.3 ng/μl כמות פלסמיד שנזרעה בפועל (1-100ng פלסמיד בטרנספורמציה), ומעל כמות זו, יעילות הטרנספורמציה הייתה נמוכה משמעותית ( $6 \times 10^3$  cfu/ug) ופחות מכך. אנו מגדירים טרנספורמציה כיעילה, החל ממבחנה C בה כמות הפלסמיד בטרנספורמציה היא 100ng ויעילות הטרנספורמציה היא  $1 \times 10^5$  cfu/ug ומעלה, משום שמתחת לערך זה יעילות הטרנספורמציה נשארת כמעט זהה ( $6 \times 10^3$  -  $9 \times 10^2$  cfu/ug). (ראה טבלה מספר 4 וגרף מספר 1 בפרק התוצאות המאושרים את מסקנותינו)

החדרת הפלסמיד לחיידק דרך קרומי התא בטרנספורמציה מלאכותית נעשתה באמצעות מתן הלם חום קצר לחיידק שעבר שטיפה ב-  $\text{CaCl}_2$  (חיידקים קומפטנטים). נוכחות יוני הקלציום משפרת את יכולת החיידק לקלוט את ה-DNA הזר, בעוד מתן הלם החום גורם לממברנת החיידק להיות פחות צמיגה ויוצר נקבים זעירים דרכם הפלסמיד יכול להיכנס אל תוך ציטופלזמת החיידק.

כמות פלסמיד נמוכה מדי לא תאפשר מעבר של מספיק מולקולות DNA לתוך החיידק, בעוד שכמות פלסמיד גבוהה מדי עלולה להיות רעילה לתאי החיידק. על פי תוצאותינו ניתן להסיק כי כמות הפלסמיד המאפשרת את יעילות הטרנספורמציה הטובה ביותר היא 0.1ng פלסמיד שנזרע בפועל (שווה ערך לטרנספורמציה עם 1ng פלסמיד), וכי ירידה משמעותית ביעילות התרחשה החל מכמות של 33.2ng/μl פלסמיד שנזרע בפועל (שווה ערך לטרנספורמציה עם 250ng פלסמיד), ניתן להסיק כי החל מכמות זו, כמות הפלסמיד הינה כבר רעילה לתאי החיידק ולכן ניתן לראות ירידה משמעותית ביעילות הטרנספורמציה. מסקנתנו נתמכת בתוצאותיהם של מחקרים אחרים כגון מחקריהם של Chan et al. ו-Rahmizadeh et al. בהם השתמשו בכמות של 0.1ng פלסמיד לקבלת טרנספורמציה יעילה. ניתן לראות בנתון זה כתמיכה במסקנתנו משום שיעילות הטרנספורמציה הגבוהה ביותר בניסוינו התרחשה בכמות הקטנה ביותר של הפלסמיד (1ng).

במחקרנו ערכנו 3 חזרות לכל טיפול, כלומר מכל טיפול נזרעו 3 צלחות. מטרת חזרות אלה היא לוודא שלא היה שינוי משמעותי בין החזרות שישפיע על התוצאות ובכך להגביר את מהימנות תוצאות המחקר. על מנת להציג את התוצאות באופן המדויק ביותר, ביצענו ממוצע של תוצאות החזרות וחישבנו את סטיית התקן לכל טיפול. לחלק מהטיפולים סטיית התקן הייתה נמוכה יחסית, לדוגמה: בטיפול A בו התקבלה סטיית תקן של 14.64, ניתן להניח כי סטיית תקן זו הייתה אקראית מכיוון שיכול להיות שגורמים שונים שלא היו אמורים לקרות השפיעו אך ברמה נמוכה ולכן הסטייה לא הייתה גבוהה, כמו טעויות אנוש, חוסר דיוק של הפיפטור, זיהום ועוד. לעומת זאת, בטיפול D, סטיית התקן הייתה גבוהה מאוד-65.36, סטייה זאת היא משמעותית מכיוון ששינוי אקראי לא היה מוביל לסטייה כזאת משמעותית. לכן, יכול להיות שהייתה טעות אנוש גדולה (כמו הוספת  $\text{CaCl}_2$  בכמות גדולה יותר) אשר השפיעה מאוד, או זיהום גדול בצלחת ספציפית, מה שיגרום להשפעה גדולה על תוצאות הניסוי ובהתאם לסטיית תקן גבוהה.

כאשר מבצעים ניסוי, חשוב לשמור על כל הגורמים העשויים להשפיע על הגורם התלוי, כקבועים, פרט לגורם הבלתי תלוי הנבדק. וזאת בכדי לוודא שהגורם המשפיע, הוא היחיד שמשפיע ולא קיים גורם אחר שהשפיע על תוצאות הניסוי. במחקרנו שמרנו על גורמים קבועים לאורך כל מהלך הניסוי ובכל הטיפולים. ניתן לראות זאת על פי תוצאות טיפול F, שהינו טיפול בקרה ללא הגורם הבלתי תלוי, כלומר, ללא פלסמיד כלל, ואכן בטיפול זה לא התקבלו מושבות כלל. ניתן להסיק מכך כי שללא פלסמידים החיידקים לא יגדלו על מצע מזון שמכיל אנטיביוטיקה משום שאין להם את הגן המכיל עמידות. בנוסף לבקרה זו יש חשיבות והיא, בדיקה שאין זיהום של פלסמידים אחרים בעלי עמידות או חיידקים בעלי עמידות.

הגורם הקבוע "ריכוז האנטיביוטיקה בצלחת" נשמר קבוע בכל הטיפולים, פרט לטיפול הבקרה החיובית G, אשר בו השתמשנו בצלחת ללא אנטיביוטיקה כלל. זאת מכיוון שרצינו לתת תנאים מיטביים להצלחת הטרנספורמציה בכדי לוודא שהשיטה עובדת ואין בעיה בשיטה עצמה או במגיבים.

לדעתנו מסקנתנו תקפה גם לטווחי מדידה אחרים עד לגבול מסוים. בשימוש בפלסמיד בכמויות גדולות יותר מכמות הפלסמיד שנבדקה, יעילות הטרנספורמציה תמשיך להיות נמוכה מאוד, מאחר וכבר הגענו לטווח בו הכמות כבר רעילה לתאים ושימוש בכמות פלסמיד נמוכה 1ng תתקבל טרנספורמציה יעילה יותר, עד לגבול מסוים, בו יעילות הטרנספורמציה תרד עקב כמות פלסמיד מעטה מדי. בנוסף, איננו יכולים לדעת בוודאות האם מסקנתנו תקפה בצורה מלאה גם ליצורים אחרים משום שמנגנוניהם שונים משל החיידקים בהם נעשה שימוש במחקרנו, חיידקי E.coli מסוג Dh5a, אך ניתן להסיק על בסיס הרקע הביולוגי שמסקנתנו תהיה תקפה גם אצל חיידקים אחרים.

הכיוון שנבחר להמשך המחקר הוא מציאת כמות הפלסמיד אשר תניב יעילות טרנספורמציה מיטבית. כמויות הפלסמיד שנרצה לבדוק הן 0.01-10ng פלסמיד משום שבמאמרים שקראנו השתמשו ב-0.1ng פלסמיד, ואילו בניסוינו יעילות הטרנספורמציה הגבוהה ביותר הייתה ב-1ng פלסמיד, לכן נרצה לבדוק בטווח זה וגם מעבר לטווח זה. שאלת החקר שלנו נותרה זהה, אך הטווח השתנה- מהי השפעת כמות הפלסמיד על יעילות טרנספורמציה?

בחרנו להמשיך את מחקרנו בכיוון זה כך שבמחקרים נוספים יוכלו להשתמש בכמות המיטבית למתן טרנספורמציה יעילה ועל כן תוצאות מחקריהם יהיו מיטביות.

### **שאלת החקר השנייה- מהי השפעת משך הלב הקור על יעילות הטרנספורמציה בחיידקים?**

בשאלת החקר השנייה בדקנו מהי השפעת משך זמן הלב הקור על יעילות הטרנספורמציה בחיידקים. לפיכך ביצענו טרנספורמציה עם פלסמיד מסוג pGFP אשר הוחדר ל חיידקי E.coli מסוג Dh5a, עם משכי זמן שונים של הלב קור בטווח של 0-20 דקות.

משך הזמן האופטימלי למתן הלב קור, על פי ניסיונה של מנחת העבודה, הוא 2 דקות ולפיכך השערנו הייתה כי בזמן זה יעילות הטרנספורמציה בחיידקים תהיה הגבוהה ביותר. תוצאות הניסוי הפריכו את השערה זו משום שהראו כי הטרנספורמציה היעילה ביותר (כ-  $2 \cdot 10^5$  cfu/ug) התרחשה כאשר משך זמן הלב הקור היה 20 דקות.

בזמנים קצרים מ- 10 דקות התקבלה יעילות טרנספורמציה נמוכה (כ-  $4 \cdot 10^4$  cfu/ug) ובזמנים הלב קור ארוכים מ- 10 דקות ועד 20 דקות (משך הזמן הארוך ביותר אותו בדקנו) אין שינוי משמעותי ביעילות הטרנספורמציה (כ-  $1 \cdot 10^5$  -  $2 \cdot 10^5$  cfu/ug). (ראה טבלה מספר 5 וגרף מספר 2 בפרק התוצאות המאוששים את מסקנתנו)

בספרות מופיעות מספר המלצות למשך זמן מתן הלב הקור, החל מדקה אחת ועד 10 דקות. המנגנון לא לחלוטין ברור אבל יש קונצנזוס שמתן הלב הקור משפר את יעילות הטרנספורמציה. ללא הלב קור, או במתן הלב קור קצר, הטמפרטורה לא תספיק להשפיע, ויעילות הטרנספורמציה תפגע. מצד שני, החל מזמן הלב קור מסוים ואילך אשר בו מתקבלת יעילות טרנספורמציה טובה, כבר לא ניתן לראות השפעה על יעילות הטרנספורמציה, שנותרת באותה הרמה. תוצאותינו נתמכות על ידי מחקרים אחרים. במאמרו של Singh et al, מוכחת השפעת הלב הקור על יעילות הטרנספורמציה. בניסוי במאמר זה בוצעה טרנספורמציה, כאשר בטיפול מסוג אחד החיידקים הודגרו בטמפרטורת חדר לאחר הלב החום, ובטיפול שני החיידקים הודגרו בקרח לאחר הלב הקור. תוצאות הטרנספורמציה לאחר ההדגרה בקרח הייתה יעילה כמעט פי שתיים בהשוואה לקבוצה הראשונה והדבר מוכיח את חשיבות הלב הקור. (Mahipal Singh et al)

במחקרנו ערכנו 3 חזרות לכל טיפול, כלומר מכל טיפול נזרעו 3 צלחות. מטרת חזרות אלה היא לוודא שלא היה שינוי משמעותי בין החזרות שישפיע על התוצאות ובכך להגביר את מהימנות תוצאות המחקר.

בכדי לתת תוקף מתמטי למהימנות התוצאות, בוצע ממוצע לתוצאות כל החזרות וחושבה סטיית התקן לכל טיפול. אף על פי שהניסוי נעשה באופן המדויק ככל האפשר עם האמצעים שהיו לנו, 3 חזרות לכל טיפול זו אינה כמות שמאפשרת דיוק מספק. לחלק מן הטיפולים אשר בוצעו (C,F,G) אחוז סטיית התקן היה נמוך לכן אנו מסיקים כי סטיית התקן הייתה אקראית, דבר אשר מבוסס על כך שיכול להיות שגורמים שונים שלא היו אמורים לקרות כמו טעויות אנוש, חוסר דיוק של הפיפטר, זיהום, השפיעו אך ברמה נמוכה ולכן הסטייה לא הייתה גבוהה. לעומת זאת בשאר הטיפולים אחוז הסטייה היה גדול יותר (E,D,B,A) וניתן להסיק מכך שסטיית התקן נבעה מהבדלים משמעותיים כמו למשל טעות אנוש גדולה (כמו הוספת  $CaCl_2$  בכמות גדולה יותר) אשר

השפיעה מאוד, או זיהום גדול בצלחת ספציפית, מה שיגרום להשפעה גדולה על תוצאות הניסוי ובהתאם לסטיית תקן גבוהה.

גם בשאלת חקר זו כל הגורמים הקבועים האפשריים נשמרו בקפדנות. כאשר הגורמים הקבועים נשמרים, ניתן לבדוק באמצעות בקרה שלילית, ללא הגורם הבלתי תלוי, אם הגורם הני"ל אכן היחידי שמשפיע על תוצאות הניסוי. בביקורת השלילית (צלחת עם אנטיביוטיקה עם חיידקים שעברו טרנספורמציה עם פלסמיד, עם הלם חום אך ללא הלם קור כלל) אשר בה צפינו כי לא יתפתחו מושבות כלל, התפתחו בכל זאת מושבות, ביעילות טרנספורמציה טובה, ומקבילה ליעילות שהתקבלה ב-10 דקות הלם קור. ניתן להסביר זאת בכמה דרכים: ייתכן שישנו גורם משפיע נוסף שלא נשמר קבוע, ייתכן שקרתה טעות אנוש (טעות במהלך הניסוי וכו'). אופציה נוספת היא כי גם ללא הלם קור מתבצעת טרנספורמציה, אך זמן הלם קור ארוך (למעלה מ-10 דקות) מיעיל את תהליך הטרנספורמציה. יש צורך בביצוע מחקרים נוספים בכדי להסיק מסקנה בנושא זה.

הגורם הקבוע "ריכוז האנטיביוטיקה בצלחת" נשמר קבוע בכל הטיפולים, פרט לטיפול הבקרה החיובית G, אשר בו השתמשנו בצלחת ללא אנטיביוטיקה כלל. זאת מכיוון שרצינו לתת תנאים מיטביים להצלחת הטרנספורמציה בכדי לוודא שהשיטה עובדת ואין בעיה בשיטה עצמה או במגיבים. החשיבות לבקרה זו היא לבדוק שהאנטיביוטיקה היא אכן זאת שהורגת את החיידקים ושלא נוכחותה החיידקים יגדלו, כלומר לבדוק שאין גורם אחר היכול לשבש את תוצאות הניסוי בכך שימית את החיידקים. תוצאות בקרה זו מאשרות כי השיטה עובדת.

לדעתנו מסקנתנו תקפה גם לטווחי מדידה רחבים יותר. אנו מצפים ליעילות טרנספורמציה גבוהה יותר בזמנים של מעל ל-20 דקות, משום שלמרות שהשינוי ביעילות הטרנספורמציה בזמנים של 10-20 דקות לא היה גבוה עדיין הייתה עלייה ביעילות הטרנספורמציה. אם משך זמן הלם הקור יהיה קצר מדי לא תתבצע טרנספורמציה כלל או במידה חלקית. בנוסף, איננו יכולים לדעת בוודאות האם מסקנתנו תקפה בצורה מלאה גם ליצורים אחרים משום שמנגנוניהם שונים משל החיידקים בהם נעשה שימוש במחקרנו, חיידקי E.coli מסוג Dh5a, אך ניתן להסיק על בסיס הרקע הביולוגי שמסקנתנו תהיה תקפה גם אצל חיידקים אחרים.

כיוון ההמשך שלנו למחקר זה היא לבדוק את השפעת משך זמן הלם הקור בטווחים בהן יעילות הטרנספורמציה הייתה הגבוהה ביותר (15-7 דקות), בכך ניתן יהיה לדעת מהו הזמן האופטימאלי של הלם קור למתן הטרנספורמציה היעילה ביותר. הלם הקור מיעיל את תהליך הטרנספורמציה, לכן בשילוב עם התוצאות מהניסוי שקיימנו, ניתן להסיק מהו משך זמן ההשהיה האופטימלי הנמוך ביותר בקור כדי לחסוך זמן ולקבל יעילות טרנספורמציה אופטימלית. שאלת החקר שלנו תהיה: מהו השפעת משך הזמן של הלם הקור על יעילות הטרנספורמציה?

בחרנו להמשיך את המחקר בכיוון זה בכדי לשפר את כיוול תנאי הטרנספורמציה האופטימלית ובכך לתרום לעולם המדע.

לסיכום, יש לנו הסתייגויות על מערך הניסוי. אם ניתן היה לבצע ניסוי זה בשנית היינו מציעים לבצע מספר גדול יותר של חזרות בכל טיפול, כך שגם אם התבצעו טעויות גדולות הם לא ישפיעו על תוצאות הניסוי.

## נספח ניסוי מקדים

על מנת לקבוע מהם התנאים המיטביים לביצוע הניסוי העיקרי, בוצע ניסוי מקדים אשר כלל בתוכו מספר שאלות חקר:

- בניסוי שלנו, נדרש להשתמש בחיידקים כאשר הם בשלב המעריכי שלהם, כלומר השלב בו החיידקים ממשיכים להתרבות בקצב קבוע ולפני שהחיידקים מגיעים לשלב הגידול היציב, בו קצב ההתרבות מתחיל לרדת. לכן, כדי להתחיל את הניסוי שלנו עם החיידקים בשלב זה עלינו לבדוק את משך הזמן האופטימלי לגידול החיידקים לפני הטרנספורמציה.
- בניסוי החקר רצינו להשתמש בכמות (ng) פלסמיד קטנה יחסית על מנת לחסוך בחומרים אך עם זאת האופטימאלית למתן תוצאות טרנספורמציה אופטימליות. לכן, נבדקה מהי השפעת כמות הפלסמיד בטרנספורמציה על מספר המושבות.
- בכדי לקבוע את יעילות הטרנספורמציה יש לזרוע את החיידקים כך שהמושבות המתקבלות על פני הצלחת הן בטווח של 100-200. לפיכך, בדקנו מהי כמות החיידקים שיש לזרוע על מנת לקבל תוצאות אלו.

שאלות החקר של הניסוי המקדים הן:

(1) מהי השפעת זמן גידול החיידקים לפני הטרנספורמציה על מספר המושבות?

המשתנה התלוי- מספר המושבות החיות.

דרך מדידת המשתנה התלוי- מספר המושבות החיות (CFU) שגדלו בצלחת.

המשתנה הבלתי תלוי- משך זמן גידול החיידקים לפני הטרנספורמציה.

אופן שינוי המשתנה הבלתי תלוי- גידול החיידקים באינקובטור למשכי זמן שונים.

מספר הטיפולים- 3.

טווח הערכים הנבדקים- Overnight, שעתיים בבוקר, Overnight ומיהול פי 31 בבוקר וגידול

במשך שעתיים נוספות.

יחידות מדידת המשתנה הבלתי תלוי- שעות.

(2) מהי השפעת כמות הפלסמיד (ng) בתהליך הטרנספורמציה על מספר המושבות?

המשתנה התלוי- מספר המושבות החיות.

דרך מדידת המשתנה התלוי- מספר המושבות החיות (CFU) שגדלו בצלחת.

המשתנה הבלתי תלוי- כמות הפלסמיד שהוסף בכל תהליך טרנספורמציה.

אופן שינוי המשתנה הבלתי תלוי- הוספת כמות שונה של פלסמיד לכל טרנספורמציה.

מספר הטיפולים- 2.

טווח הערכים הנבדקים- 10ng ו- 140ng.

יחידות מדידת המשתנה הבלתי תלוי- ng.

3) מהי השפעת נפח החיידקים ( $\mu\text{l}$ ) הנזרעים על מספר המושבות בצלחת?

המשתנה התלוי - מספר המושבות החיות.

דרך מדידת המשתנה התלוי - מספר המושבות החיות (CFU) שגדלו בצלחת.

המשתנה הבלתי תלוי - נפח החיידקים שנזרעו בכל צלחת.

אופן שינוי המשתנה הבלתי תלוי - זריעת נפח שונה של חיידקים בכל צלחת.

מספר הטיפולים - 3.

טווח הערכים הנבדקים - עבור כל אחד מהתנאים של שאלות החקר 1 ו-2 נזרעו שתי צלחות בשני תנאי טיפול שונים:  $100\mu\text{l}$  ו- rest (כלומר זריעת שאר החומר שנשאר במבחנה לאחר זריעת ה-  $100\mu\text{l}$ ). טיפול נוסף (טיפול 3) בוצע במבחנה בה גודלו החיידקים Overnight וטרנספורמציה עם  $10\text{ng}$  פלסמיד, בו נלקח נפח של  $100\mu\text{l}$  מהמבחנה בשלב הזריעה, נמהל פי 10 ונזרע על צלחת.

יחידות מדידת המשתנה הבלתי תלוי -  $\mu\text{l}$ .

האורגניזם הנבדק:

חיידקי E.coli מזן Dh5 $\alpha$ .

גורמים קבועים:

- שמירה על מצע מזון זהה בו גודלו ועליו נזרעו החיידקים בכל הטיפולים. גורם זה נשמר קבוע בכך שכל החיידקים גודלו תחילה במבחנות במצע מזון נוזלי מסוג LB ולאחר מכן נזרעו על צלחות המכילות LB + אמפיצילין.
- שמירה על זמן התאוששות זהה לאחר הטרנספורמציה בכל הטיפולים של כל ניסוי. גורם זה נשמר קבוע בכך שבכל טיפול מבחנות החיידקים נכנסו לאינקובטור לזמן התאוששות שאורכו שעה.
- שמירה על טמפרטורה זהה בכל הטיפולים במהלך כל תהליך בניסוי. גורם זה נשמר קבוע בעזרת האינקובטור. בנוסף הלם החום והלם הקור בוצעו בטמפרטורה קבועה עבור כל הטיפולים.

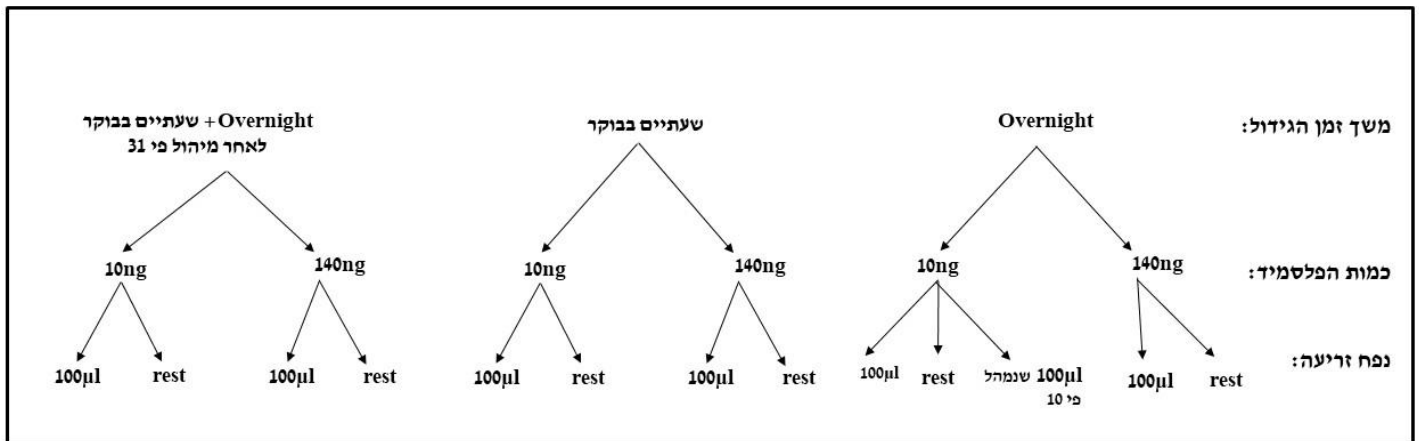
בקרות:

בכל שאלת חקר בוצעה בקרה מסוג בקרה פנימית השוואית, אשר במסגרתה נעשית השוואה בין הטיפולים השונים.



מהלך הניסוי:

החיידקים גודלו בשלוש מבחנות שונות, למשך שלושה משכי זמן שונים: overnight, שתיים בבוקר, overnight ומיהול פי 31 בבוקר (2 מ"ל חיידקים גודלו במבחנה, מתוכם נלקח 100µl ממדיום הגידול עם החיידקים והועבר ל-3 מ"ל מדיום חדש) וגידול במשך שתיים נוספות. לאחר מכן, החיידקים שבכל מבחנה הועברו לשתי מבחנות שונות אשר לאחת מהן הוסף 10ng פלסמיד ולשנייה 140ng. בשלב הבא בוצעה הטרינספורמציה ולאחריה החיידקים עברו זמן התאוששות ולאחר מכן נזרעו נפחים שונים של חיידקים על צלחות בהן מצע מזון מוצק מסוג LB ואמפיצילין. הנפחים שנזרעו הם 100µl ו-rest. בתום שלב זה המושבות שעל הצלחות גודלו למשך לילה שלם וכלל המושבות שהתפתחו בכל צלחת לאחר הגידול נספרו. (ראה תמונה מספר 1).



תמונה מספר 1 - דיאגרמת הניסוי

## תוצאות:

### טבלה מספר 1- תוצאות הניסוי המקדים

מספר מושבות (cfu)	מיהול זריעה ( $\mu$ l)	כמות פלסמיד (ng)	תנאי גידול
205	100	10	Overnight
888	rest	10	Overnight
22	100 מהול פי 10	10	Overnight
282	100	140	Overnight
המון (לא דשא)	rest	140	Overnight
150	100	10	גידול בבוקר למשך שעתיים
864	rest	10	גידול בבוקר למשך שעתיים
206	100	140	גידול בבוקר למשך שעתיים
668	rest	140	גידול בבוקר למשך שעתיים
712	100	10	מיהול בבוקר + Overnight וגידול לשעתיים
המון (לא דשא)	rest	10	מיהול בבוקר + Overnight וגידול לשעתיים
534	100	140	מיהול בבוקר + Overnight וגידול לשעתיים
2000	rest	140	מיהול בבוקר + Overnight וגידול לשעתיים

## מסקנות:

על פי הבדיקות המקדימות ניתן להסיק שגידול החיידקים בבוקר למשך שעתיים הינו מספיק לקבלת מושבות שעברו טרנספורמציה בצורה טובה. הוסק גם כי למרות שבחלק מהטיפולים היו רק 10ng פלסמיד וגדלו פחות מושבות (בהשוואה לטיפולים בהם היה 140ng), כמות המושבות שהתפתחו הייתה מספיק גדולה ויותר נוחה לספירה, לכן החלטנו כי כמות של 10ng בניסוי שלנו תביא לחיסכון בחומרים, ליעילות הניסוי ולתוצאות מיטביות. במושבות בהן נזרע נפח ה- rest התקבלו יותר מושבות מאשר הצלחות בהן נזרע נפח של 100 $\mu$ l אך בחלק מן הצלחות בהן נזרע ה- rest מספר המושבות שגדלו היה גדול והיה קשה לספירה, לכן הוסק שעל מנת לקבל תוצאות הניתנות לעיבוד כדאי להשתמש במיהול של 100 $\mu$ l.

## ביבליוגרפיה

- 1) אלקטרופורזיה. Wikipedia, the free encyclopedia (9 דצמבר 2015).  
<https://he.wikipedia.org/wiki/%D7%90%D7%9C%D7%A7%D7%98%D7%A8%D7%95%D7%A4%D7%95%D7%A8%D7%A6%D7%99%D7%94>
- 2) בקטריופאג'. Wikipedia, the free encyclopedia (28 נובמבר 2019)  
<https://he.wikipedia.org/wiki/%D7%91%D7%A7%D7%98%D7%A8%D7%99%D7%95%D7%A4%D7%90%D7%92%27#%D7%98%D7%A8%D7%A0%D7%A1%D7%93%D7%95%D7%A7%D7%A6%D7%99%D7%94>
- 3) גרטי, א'. (16 אוגוסט 2010). *הפלטמיד כאמצעי להנדסה גנטית*. אוחזר מתוך מכון דוידסון :  
<https://davidson.weizmann.ac.il/online/maagarmada/technology/%D7%94%D7%A4%D7%9C%D7%A1%D7%9E%D7%99%D7%93-%D7%9B%D7%90%D7%9E%D7%A6%D7%A2%D7%99-%D7%9C%D7%94%D7%A0%D7%93%D7%A1%D7%94-%D7%92%D7%A0%D7%98%D7%99%D7%AA>
- 4) חיידקים. Wikipedia, the free encyclopedia (21 נובמבר 2019).  
<https://he.wikipedia.org/wiki/%D7%97%D7%99%D7%99%D7%93%D7%A7%D7%99%D7%9D>
- 5) טרנספורמציה (גנטיקה). Wikipedia, the free encyclopedia (21 מאי 2019).  
[https://he.wikipedia.org/wiki/%D7%98%D7%A8%D7%A0%D7%A1%D7%A4%D7%95%D7%A8%D7%9E%D7%A6%D7%99%D7%94\\_\(%D7%92%D7%A0%D7%98%D7%99%D7%A7%D7%94\)](https://he.wikipedia.org/wiki/%D7%98%D7%A8%D7%A0%D7%A1%D7%A4%D7%95%D7%A8%D7%9E%D7%A6%D7%99%D7%94_(%D7%92%D7%A0%D7%98%D7%99%D7%A7%D7%94))
- 6) קונוגזיה. Wikipedia, the free encyclopedia (2 ינואר 2018).  
<https://he.wikipedia.org/wiki/%D7%A7%D7%95%D7%A0%D7%99%D7%95%D7%92%D7%A6%D7%99%D7%94>
- 7) שיבוט. Wikipedia, the free encyclopedia (22 אוקטובר 2019).  
<https://he.wikipedia.org/wiki/%D7%A9%D7%99%D7%91%D7%95%D7%98>
- 8) שיבוט דנ"א בעזרת נשאים. אוחזר מתוך גנטיקה מולקולרית והנדסה גנטית. עמלנט (אין תאריך).  
<http://www.amalnet.k12.il/sites/genetic/articles.asp?url=gar0060.htm>
- 9) *FAQ: How should I calculate the transformation efficiency of NEB 5-alpha Competent E. coli (Subcloning Efficiency)*. (אין תאריך).  
<https://international.neb.com/faqs/2011/07/24/how-should-i-calculate-the-transformation-efficiency-of-neb-5-alpha-competent-i-e-coli-i-subcloni>
- 10) Lohman, G., Tabor, S., Nichols, N. (April 2016). **DNA Ligases**. *Current Protocols in Molecular Biology* 3.14.1-3.14.7.

<https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471142727.mb0314s94>

- 11) Singh, M., Ma, X., Amoah, E., Yadav, A. (January 2010). **Plasmid DNA Transformation in Escherichia Coli: Effect of Heat Shock Temperature, Duration, and Cold Incubation of CaCl<sub>2</sub> Treated Cells.** *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*. ISSN 0973-2691. Volume 6 Number 4

<https://www.researchgate.net/publication/216199837> Plasmid DNA transformation in Escherichia Coli effect of heat shock temperature duration and cold incubation of CaCl<sub>2</sub> treated cells

- 12) Rahimzadeh, M., Sadeghizadeh, M., Najafi, F., Arab, S., Mobasheri, H. (December 5<sup>th</sup> 2016). **Impact of heat shock step on bacterial transformation efficiency.** *Molecular Biology Research Communications* 5(4): 257-261.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5326489/>

- 13) Chan, W., Verma, C., Lane, D., Gan, S. (December 12<sup>th</sup> 2013). **A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of Escherichia coli** 12; 33(6).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24229075>