

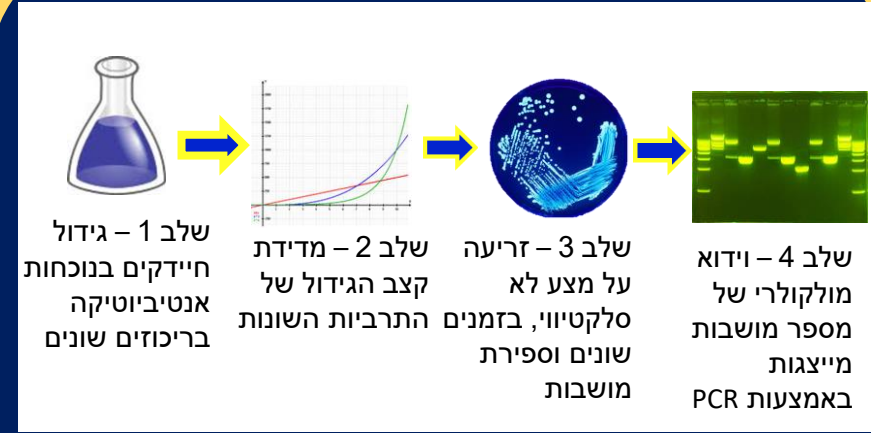
מי איבד את הפלסמיד...?

שמות המגישות: נטע מנדלוביץ' ודורון שלזינגר | שם המורה: ד"ר יעריט פרידמן | שם ביה"ס: כפר הנוער ויצו קנדה – נהלל ע"ש חנה מייזל שוחט

מבוא: גידול וחלוקה של תאים הינו תהליך דורש אנרגיה. בתהליך חלוקה של תאי חיידקים, המכילים פלסמידים בנוסף לכרומוזום החיידקי, נדרשת אנרגיה נוספת על מנת לשכפל את הפלסמידים לפני החלוקה. מכיוון שפלסמידים לרוב נושאים את גן העמידות לאנטיביוטיקות שונות, הרי שהמחיר האנרגטי שהחיידק משלם על שכפול הפלסמיד בסביבה סלקטיבית, המכילה את האנטיביוטיקה, הוא מחיר "מוצדק" כיוון שמאפשר את קיומו של החיידק במצע. לעומת זאת, בתנאים בהם הגידול נעשה במצע לא סלקטיבי (ללא אנטיביוטיקה), הרי שאין צורך בשמירת הפלסמיד ולכן המחיר האנרגטי על תהליך שכפולו הוא גבוה. לפיכך חיידקים, בדומה לתאים סרטניים, פתחו מנגנונים תאיים ל"זריקה" של דנ"א / תרופות באמצעות חלבון מיוחד הממוקם בקרום התא ומשתמש באנרגיה לשם סילוק פעיל מהציטופלזמה החוצה (משאבה). עדויות למנגנוני איבוד פלסמידים בחיידקים נחקרו, אולם עד כה לא ידוע האם חיידקים נוטים לאבד את הפלסמיד בשלב הלוגריתמי או בשלב סטציונרי, לפיכך בעבודה זו נבדקה יעילות איבוד הפלסמיד בשלבים השונים של גידול התרבית.

שאלת חקר: מהי השפעת ריכוז האנטיביוטיקה על קצב איבוד הפלסמיד בחיידקי E.Coli במצע לא סלקטיבי?

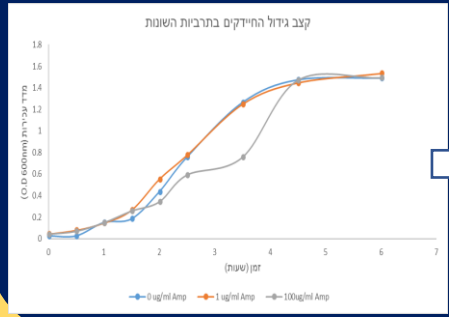
מהלך העבודה:



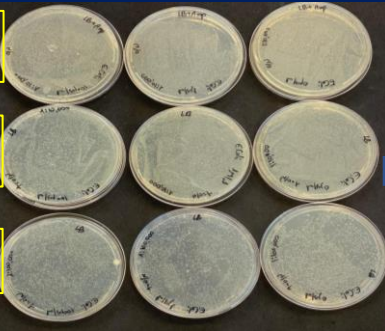
תחילה, גודלו 3 תרביות שונות של חיידקי E.Coli בריכוזי אנטיביוטיקה שונים (0ug/ml, 1ug/ml, 100ug/ml) למשך 12 שעות (שלב 1), קצב הגידול של החיידקים נמדד בזמנים שונים לאורך הגידול, באמצעות מדידת עכירות בספקטרופוטומטר (שלב 2), החיידקים נזרעו על צלחות שאינן מכילות אנטיביוטיקה ב-2 זמנים שונים (4 שעות ו-12 שעות, שלב 3) וגודלו למשך הלילה ליצירת מושבות, לבסוף בוצע PCR באמצעות פריימרים הספציפיים לפלסמיד על מדגם מושבות (שלב 4), על מנת לוודא את נוכחות הפלסמיד בחיידקים שגדלו.

תוצאות:

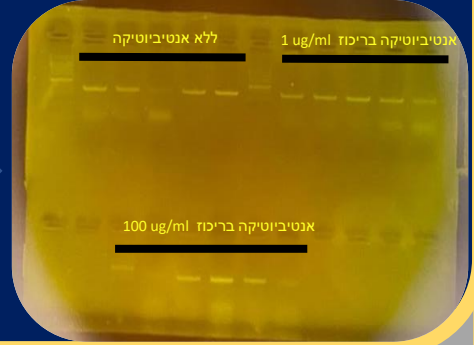
תצוגה גרפית של קצב הגידול של התרביות השונות - התוצאות מעידות כי הטיפול השונים בהם נעשה שימוש בעבודה זו לא פגעו בקצב גידול החיידקים בתרבית.



- צלחות LB+Amp, בריכוז 1:10,000
- צלחות LB, בריכוז 1:10,000
- צלחות LB, בריכוז 1:100,000



איפיון מולקולרי של 5 מושבות נבחרות - התוצאות מעידות כי תחת כל תנאי הניסוי החיידקים ככל הנראה לא איבדו את הפלסמיד. העדר תוצר PCR עבור חיידקים בתרבית שגודלה בנוכחות אנטיביוטיקה נובע ככל הנראה מטעות אנוש.



מסקנות:

לאחר ביצוע הניסוי והתבוננות בתוצאות, ניתן להסיק א הדברים הבאים: 1. הוספת ריכוזים שונים של האנטיביוטיקה אמפיצילין למדיום הגידול אינה פוגעת בקצב גידול החיידקים (תוצאות מדידת העכירות) או בחיות התאים (תוצאות זריעה חיה). 2. הבדיקה המולקולרית מעידה כי החיידקים ככל הנראה לא איבדו את הפלסמידים, גם בהעדר לחץ סלקטיבי במדיום הגידול.