

8η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ

ΙΟΙ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Οι ιοί διαφέρουν από τους άλλους παθογόνους παράγοντες, διότι έχουν πολύ μικρότερο μέγεθος, δεν έχουν κυτταρική οργάνωση και αποτελούν υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα. Επίσης, δεν είναι δυνατόν να καλλιεργηθούν στα συνήθη υλικά. Παρά τις ιδιαιτερότητες αυτές και τις προφανείς δυσκολίες που παρουσιάζει η μελέτη τους στο εργαστήριο, μπορούμε εύκολα να διαπιστώσουμε τις επιδράσεις τους στα κύτταρα τα οποία παρασιτούν. Οι ιοί προσβάλλουν όλους τους τύπους κυττάρων, τόσο ευκαρυωτικών όσο και προκαρυωτικών. Η εξάρτηση τους από κυτταρικούς οργανισμούς οφείλεται στην αδυναμία τους να συνθέτουν τα ένζυμα τα οποία χρειάζονται για τις βιοσυνθετικές τους λειτουργίες. Όντας μέσα στα κύτταρα όμως, είναι σε θέση να χρησιμοποιούν τα ένζυμα του ξενιστή τους. Οι ιοί περιέχουν μόνο DNA ή μόνο RNA ως γενετικό υλικό. Ουδέποτε συνυπάρχουν τα δύο αυτά νουκλεοξέα στον ίδιο ιό.

Η μελέτη των ιών που παρασιτούν φυτά και ζώα είναι χρονοβόρα και προϋποθέτει εξειδικευμένες τεχνικές ιστοκαλλιεργειών. Αντίθετα, οι ιοί που παρασιτούν βακτήρια μπορούν να μελετηθούν σχετικά εύκολα εφαρμόζοντας συνήθεις βακτηριολογικές τεχνικές. Αυτός είναι ο λόγος που προτιμήθηκαν οι ιοί των βακτηρίων στην εργαστηριακή αυτή άσκηση. Έπειτα, οι βασικές αρχές που διέπουν τη μελέτη των ιών των βακτηρίων ισχύουν και για τους ιούς των ευκαρυωτικών κυττάρων.

Οι ιοί που παρασιτούν βακτήρια ονομάζονται βακτηριοφάγοι ή φάγοι. Υπάρχουν φάγοι διαφόρων μεγεθών και σχημάτων. Οι απλούστεροι περιέχουν μονά νημάτια DNA. Οι περισσότεροι μοιάζουν με γυρίνους, έχουν δηλαδή κεφάλι και ουρά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι T φάγοι που προσβάλλουν κύτταρα του *Escherichia coli*. Το κεφάλι μπορεί να είναι σφαιρικό, ωοειδές ή πολυεδρικό και είναι πρωτεϊνικής φύσεως. Σχηματίζει μία προστατευτική θήκη του DNA. Η ουρά είναι κοίλη και λειτουργεί σαν δίαυλος μεταφοράς του DNA από το καψίδιο στο κυτταρόπλασμα του βακτηριακού κυττάρου. Το ακραίο μέρος της ουράς έχει τη δυνατότητα να προσφύεται σε εξειδικευμένες δεκτικές θέσεις οι οποίες βρίσκονται στην επιφάνεια του φάγο-ευαίσθητου βακτηρίου. Μόλις η ουρά προσκολληθεί στο κύτταρο πέπτει τη μουρβίνη στο σημείο επαφής, διαπερνά το τοίχωμα και λειτουργώντας σαν σύριγγα εγχύει το DNA μέσα στο κύτταρο.

Με την είσοδο του φαγικού γονιδιώματος μέσα στο βακτηριακό κύτταρο δύο τινά μπορούν να συμβούν: λύση ή λυσιγονία. Στην περίπτωση της λύσης ο βακτηριακός μεταβολισμός αλλάζει και αναγκάζεται να προσαρμοστεί προς την κατεύθυνση του σχηματισμού φαγικού DNA και πρωτεϊνών, δηλαδή των υλικών που είναι απαραίτητα για τη δημιουργία ώριμων φαγικών τεμαχιδίων. Μετά την κατανάλωση των κυτταρικών υλικών, το κύτταρο λύεται και ελευθερώνονται τα φαγικά σωματίδια (virions) τα οποία με τη σειρά τους προσβάλλουν νέα βακτηριακά κύτταρα.

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Οι φάγοι που προκαλούν λύση των κυττάρων που προσβάλλουν χαρακτηρίζονται ως τοξικοί (virulent), ενώ όσοι δεν προκαλούν χαρακτηρίζονται ως ήπιοι (temperate). Οι ήπιοι φάγοι αναπτύσσουν μία ιδιότυπη σχέση με το βακτηριακό κύτταρο η οποία είναι γνωστή ως λυσιγόνος σχέση ή λυσιγονία (lysogeny). Στα κύτταρα αυτά το DNA του φάγου ενσωματώνεται στο βακτηριακό χρωματόσωμα (προφάγος). Τα λυσιγόνα βακτήρια πολλαπλασιάζονται κανονικά αλλά οι καλλιέργειες τους περιέχουν πάντα κάποιους φάγους. Κατά διαστήματα όμως σε ορισμένα κύτταρα η λυσιγόνος σχέση διαταράσσεται, ο προφάγος γίνεται τοξικός, οπότε ακολουθεί ο λυτικός κύκλος που προαναφέρθηκε και η απελευθέρωση φαγικών ιοειδών.

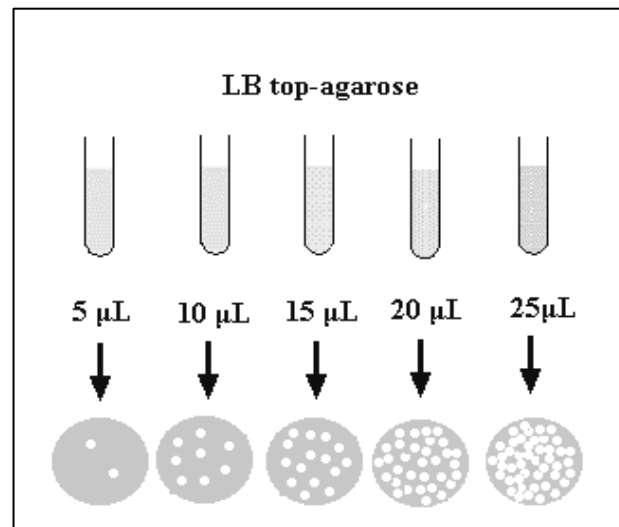
Η τοξική δράση των φάγων γίνεται ορατή αν αναμείξουμε βακτηριακά κύτταρα με φάγους και καλλιεργήσουμε το μείγμα σε θρεπτικό άγαρ. Μετά την επώαση, στην επιφάνεια του υλικού αναπτύσσεται ένα ομοιόμορφο βακτηριακό στρώμα εκτός από τα σημεία εκείνα όπου είχαν εναποτεθεί φαγικά τεμεχίδια ή μολυσμένα βακτηριακά κύτταρα. Οι περιοχές αυτές είναι διαυγείς και καλούνται πλάκες (plaques). Με την μέθοδο αυτή μπορεί να γίνει εκτίμηση του πληθυσμού φαγικών σωματιδίων σ' ένα αιώρημα. Οι πιο καλά μελετημένοι φάγοι είναι αυτοί που παρασιτούν το *Escherichia coli*. Οι φάγοι αυτοί χαρακτηρίζονται συνολικά ως κολιφάγοι.

Υλικά και μέθοδος :

- Υγρή καλλιέργεια *Escherichia coli*
 - 1 erpendorf με 500 μL SM
 - Αποστειρωμένες πιπέτες Pasteur
 - Αποστειρωμένοι σωλήνες (προθερμασμένοι στους 37°C)
 - Τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα LB (προθερμασμένα στους 37°C)
 - LB top-agarose (5ml)
1. Με τη βοήθεια μίας πιπέτας Pasteur παρέλαβε μία φαγική πλάκα από το τρυβλίο με τους φάγους.
 2. Μετέφερε την πλάκα στο erpendorf που περιέχει 500 μL SM. Τοποθέτησε το για 20 λεπτά στους 37°C αφού ανακινήσεις το περιεχόμενο.
 3. Μετέφερε 5, 10, 15, 20 ή 25 μL σε δεύτερο erpendorf που περιέχει 200μL καλλιέργειας *Escherichia coli*. Επώασε στους 37°C για 20 λεπτά.
 4. Μετέφερε την καλλιέργεια στους προθερμασμένους σωλήνες.
 5. Πρόσθεσε στους σωλήνες περίπου 5ml LB top-agarose και ανακίνησε.
 6. Άδειασε ασηπτικά το περιεχόμενο των σωλήνων στο τρυβλίο LB και άπλωσέ το με κυκλικές κινήσεις σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου. Το βήμα αυτό πρέπει να γίνει γρήγορα για να μην πήξει η LB top-agarose.
 7. Όταν στερεοποιηθεί η αγαρόζη τοποθέτησε τα τρυβλία αναστραμμένα σε επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 37°C για 24 ώρες.

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΣΗΜΕΙΩΣΗ

Το διάλυμα SM περιέχει (100 ml) : 10mM Tris-HCl pH 7.5
10mM MgSO₄ · 7H₂O

Το θρεπτικό υπόστρωμα LB περιέχει (ανά λίτρο) :

NaCl	10 g
Τρυπτόνη	10 g
Εκχύλισμα ζύμης	5 g