

חיידקים ביוסנסאריים- גזובה לז חיידקים אלינויים סביבתיים – נאכחג לצהלים ולינויי אלפרטורה.

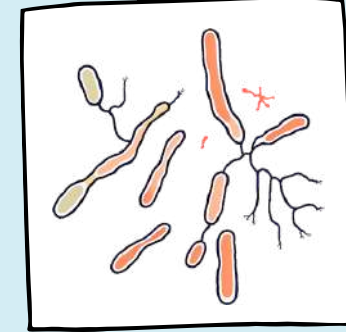


סיפור מסגרת לתוך עבודת ביוחקר

דמיינו עולם בו ישנה סכנת חיים בכל לגימה של מים, עולם בו כל לגימה עלולה להיות האחרונה. בשנים האחרונות מתעורר חשש עמוק בתחום ההגנה הן מפני מעשי טרור מכוונים, והן מפני ההשפעה של זיהום סביבתי. זיהום מים מחייב באופן מיידי מציאת דרכים לגילוי רעלים בסביבה.

ישנן מספר שיטות ניטור לזיהוי חומרים מזיקים, המרכזיות שבהן: כימית וביולוגית. ניטור כימי כולל איסוף דגימות מים ומדידת גורמים כמו pH, חמצן מומס וכד' (מערכת פורטל מים נט, 2023). ניטור ביולוגי הוא כלי למדידת חשיפה לכימיקלים סביבתיים באמצעות מדידת ריכוזים של חומרים ושל תוצרי הפירוק שלהם, וכן של סמנים ביולוגיים ברמה התאית או המולקולרית. את שיטת הניטור הביולוגית ניתן לחלק לשתי קבוצות. האחת שימוש במרכיבים ביולוגיים, כמו נוגדנים ואנזימים. התגובה הזו ייחודית לחומר או לחומרים מסוימים, שהמרכיבים הביולוגיים מסוגלים להיקשר אליהם. השנייה היא שימוש ביצור חי. בשיטה זו נבדקת ההשפעה הרעילה של החומר על האורגניזם שבא איתו במגע (דוידוב, ואחרים, 2000). **בעבודה זו נשתמש בשיטת ניטור ביולוגית על ידי שימוש בחיישן ביולוגי המכיל חיידקים מהונדסים.** הדרך הנפוצה לשימוש בחיידקים לניטור וזיהוי חומרים מזיקים היא לחשוף אותם לדגימה, ולבדוק האם היא גורמת למותם. בגישה לפיה נפעל בעבודת החקר, לא נחכה עד שפעילות החיידק תפחת, אלא נגלה את נוכחות הרעל כבר בשלב בו הוא חודר לתא. **התהליך הנחקר נסמך על היכולת לעקוב אחרי הפעלה של מערכות תגובה טבעיות לתנאים אשר עלולים להזיק לתא החיידק (מצבי עקה) בעקבות החשיפה לחומרים רעילים.**

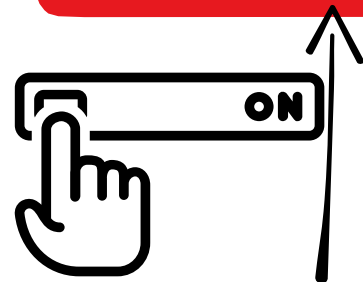
יצירת חיידקים ביוסנסורים



בהאיך לז הנדסה גנטית:

אכור בקרה *grpE*

האן האבני- *lacZ*



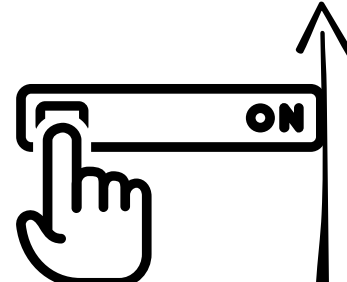
חנאי עקה: חום או חשיפה לרעלנים שונים.

מקודד לאזנים בטאגלקטוזידאז

האבון בטאגלקטוזידאז ביידיקי *E. coli*

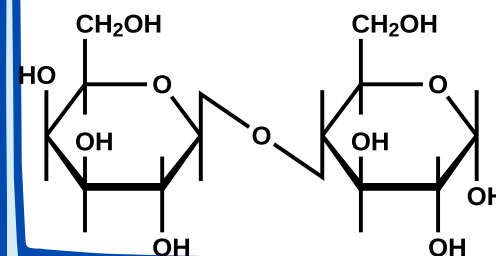
אכור בקרה של אופרון האקטופ

האן האבני- *lacZ*



קישור לקטוז לדכאן

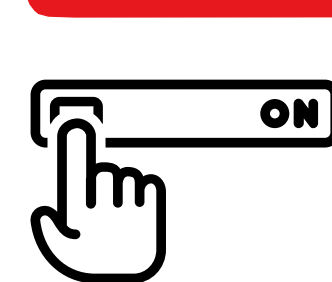
מקודד לאזנים בטאגלקטוזידאז



האבון *grpE* ביידיקי *E. coli*

אכור בקרה *grpE*

האן האבני לחלבון- *grpE*



חנאי עקה: חום או חשיפה לרעלנים שונים.

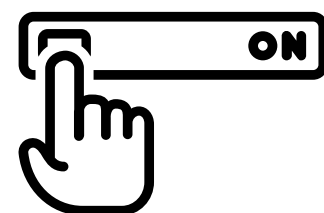
פועל להפעלת חלבוני בקרה חרמית וחלבונים שקשורים לתיקון DNA



בהזיק לא הניסה זנאי:

אלור בקרה grpE

פאן האני- lacZ



חשפה לאתנוול

מקודד לאזנים בטאגלקטוזידאז



mRNA



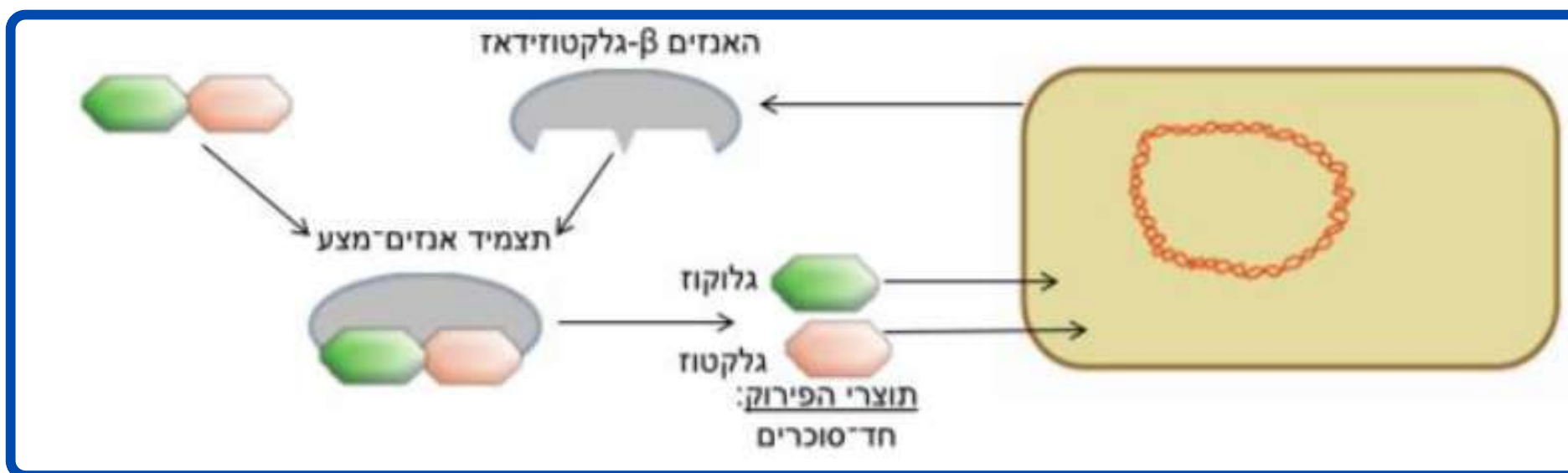
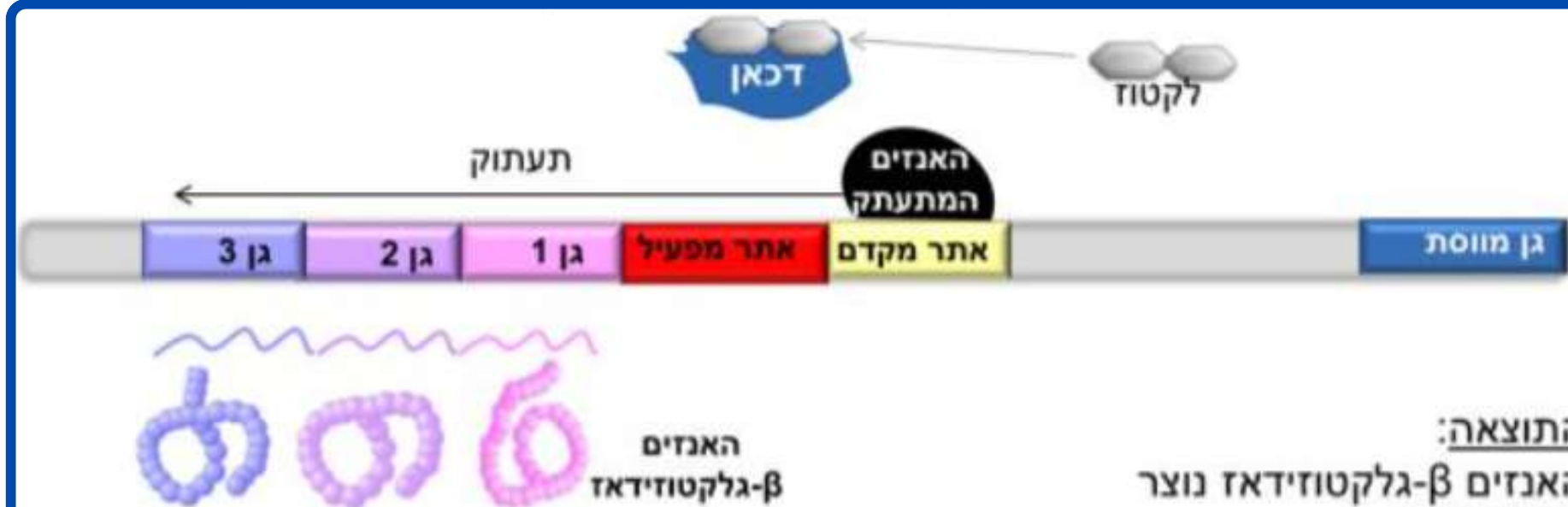
האזנים ב-גלקטוזידאז



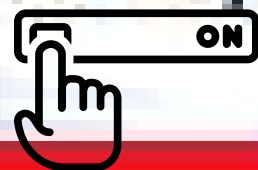
x-gal

החומר הזה הוא אנלוג ללקטוז. תאבת הפירוק שלו יתרת זכא כחול.

אופרון האקטאז



איבור בקרה $grpE$



כען $lacZ$ - $lact$

למידת הביטוי של הזן - מאפשרת לנו זכירת

את רמת הנזק שנגרם ל-DNA

מטרה



להדגים בצורה פשוטה
הנדסה גנטית- הלכה
למעשה בכתה



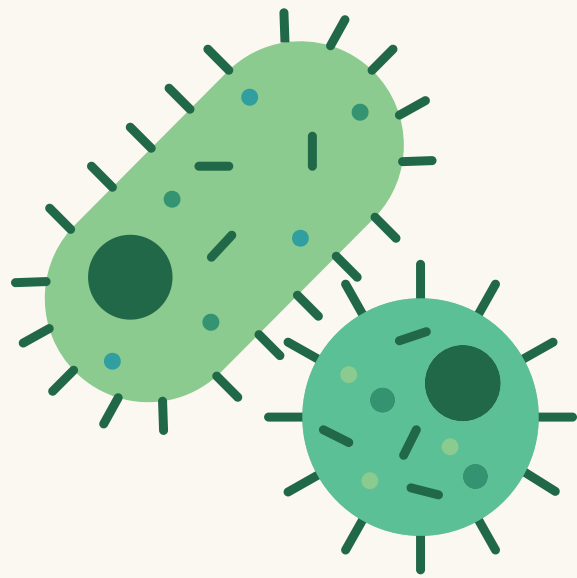
להכיר שיטת מדידה
שיכולה לשמש לניטור
מים, המתבססת על
הנדסה גנטית



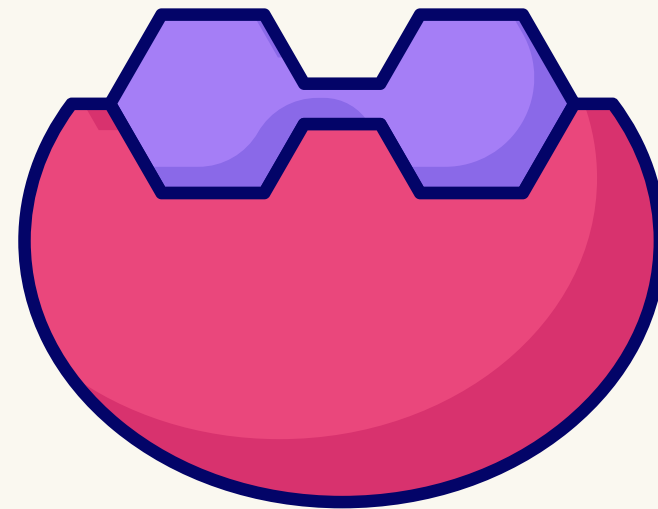
לראות את השפעה של
מצב עקה על ביטוי גנים
במערכת מהונדסת
גנטית.

קישור אתגכנית הילחודים

ליקר-כילולזיה

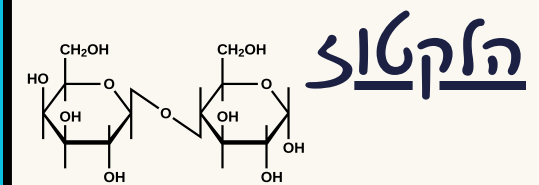


אנזלמים



כקרת זנים

כפרוקריוטים- אופרן



DNA-ל זלכון





ליצור כפול בכיתה

האכה זלעלע ככטה

ניסוי ז

מטרת הניסוי: מדידה ההשפעה של ריכוזים שונים של אתנול על ביטוי החלבון β -galactosidase – בריכוזים נמוכים של אתנול לא נראה שינוי בזמן הניסוי. בריכוזים גבוהים יותר נראה תגובה הולכת ומתחזקת. בריכוז אתנול שגורם למות החיידקים, לא נראה את היווצרות הצבע הכחול. מהלך הניסוי

- התלמידים יקבלו תרחיף של החיידקים המהונדסים בתמיסת LB.
- העברה של 10 מ"ל תרחיף חיידקים לכוס כימית והוספה של 50 מיקרוליטר X-GAL.
- הכנת ריכוזים שונים של אתנול על ידי מיהול בתמיסת LB, לפי טבלה

טבלה 1. נפח התמיסות במבחנות				
מבחנה	נפח חיידקים ב-LB (מיקרוליטר)	נפח אתנול 100% (מיקרוליטר)	נפח LB (מיקרוליטר)	ריכוז אתנול (%)
1	1000	0	1000	0
2	1000	100	900	5
3	1000	200	800	10
4	1000	400	600	20
5	1000	600	400	30
6	1000	800	200	40
7	1000	1000	0	50



תוצאת ניסוי 1 לאחר חצי שעה

זריעה של חיידקים על צלחת זקביעת החיות (ויטאליט)

- לאחר סיום התגובה האנזימטית ה, מחלקים צלחת LB עם עמידות לאמפיצילין באמצעות עט סימון ל - 8 גזרות.
- מסמנים כל גזרה במספר מבחנה (1, 2...).
- מכל מבחנה מוצאים 5 מיקרוליטר חיידקים וזורעים זריעת "נחש" בכל אחת מהגזרות, לפי מספר המבחנה.
- בגזרה השמינית זורעים חיידקים מהתרחיף (ללא הסובסטרנט).
- מגדלים את החיידקים בטמפרטורת חדר למשך יומיים שלושה.

צלחת חיידקים לאחר 6 ימים בטמפרטורת החדר.



ביוסנסור $grpE-lacZ$ מנתח

ניתוח קולורימטרי מתקדם לכימות ביטוי גנים

מערכת מדעית לניתוח יחסי של עוצמת הצבע הכחול במבחנות ביוסנסור

הרקע המדעי



ניתוח כמותי

המערכת מבצעת ניתוח יחסי בסקלה 0-10, כאשר
הבקרה=0 והטיפול הכחול ביותר=10, עם חישוב
 ΔE במרחב CIELAB



מנגנון הפעולה

חשיפה לגורם עקה גורמת לעקה חלבונית,
מפעילה את $grpE$, מביאה לביטוי β -galactosidase
שמפרק X-gal ומשחרר צבע כחול



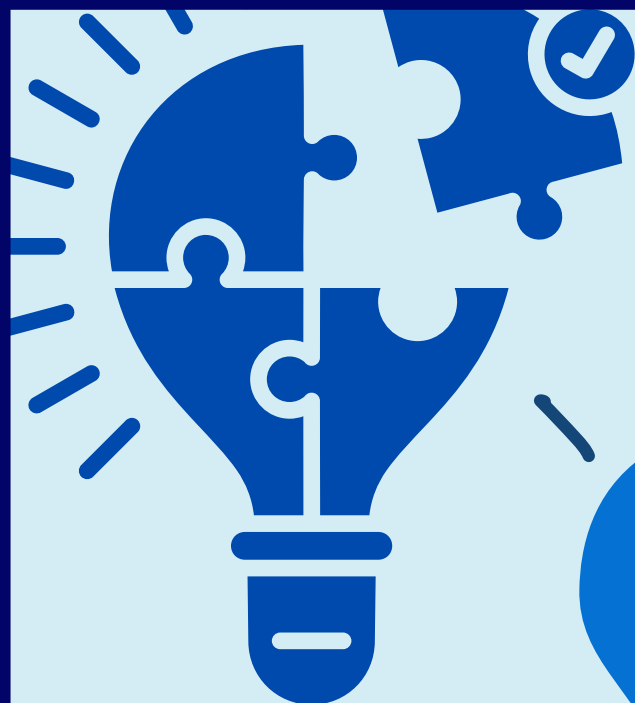
המערכת הביולוגית

חיידקי E.coli מהונדסים עם פלסמיד MC1403,
שבו גן הדיווח $lacZ$ נמצא תחת בקרת הפרומוטור
 $grpE$ המגיב לעקות חלבוניות



דיוק מדעי

ניתוח קולורימטרי דיגיטלי מתקדם עם מדידת גוון,
רוויה ובהירות, המבטיח תוצאות מדויקות וניתנות
לשחזור



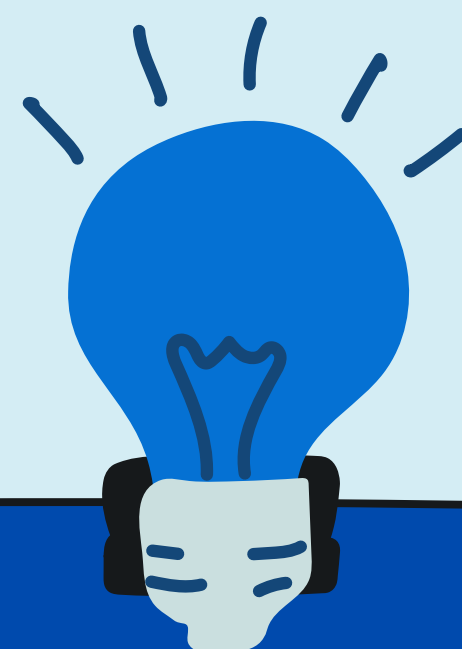
רעיונות נוספים לעבודת ביוחקר



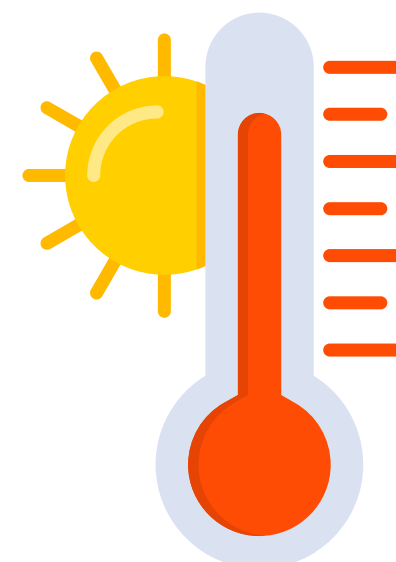
יש להקפיד לעבוד על פי
הנחיות הבטיחות במוצר
למכשיר



השפעה של חומרים גנוקסיים
אחרים: כלו לי חמץ

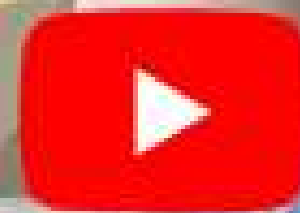


השפעת טמפרטורה



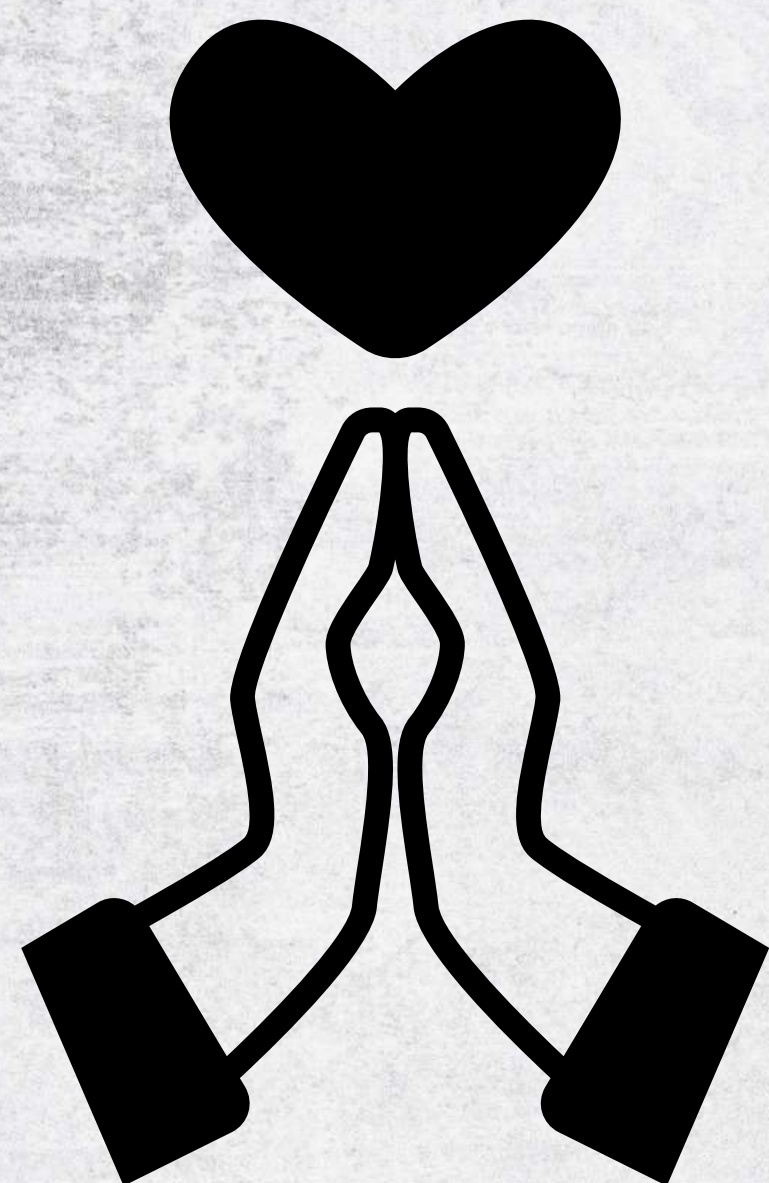
ביוחקר ברשת הכפר הירוק

Shachaf Rasin



הוספנו 100 מיקרוליטר של X-GAL לבוס הכימית

Watch on  YouTube



גודה אל הקלבה

לאוו



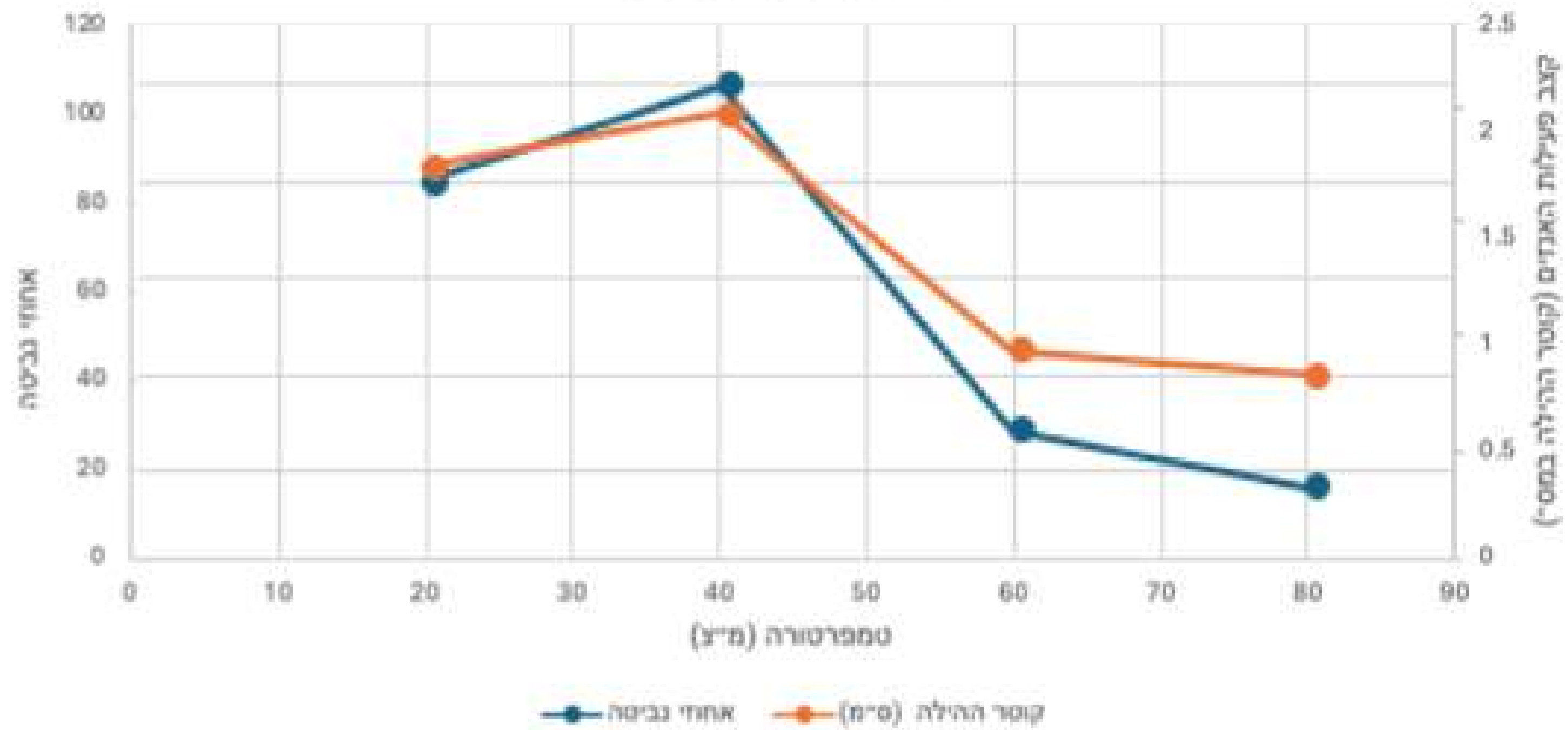


זיהוי חלבוני עקה (HSP70) בנבטים באמצעות שיטת ELISA

(Enzyme-Linked Immuno sorbent Assay)



השפעת טמפ בטיפול המקדים על קצב הנביטה ועל קצב פעילות האנזים עמילאז בזרעי חיטה





גורמי עקה

עקות פיזיקליות

גורמים פיזיים שמשנים את
תנאי הסביבה ומפרים את
האיזון הפיזיולוגי של התא

עקות ביוטיות

גורמים חיים הגורמים לתגובה
חיסונית או נזק לרקמות

עקות סביבתיות־כימיות

גורמים כימיים לא ביולוגיים, המשנים את
ההרכב הכימי של סביבת הצמח או גורמים
לרעילות

עקות פיזיולוגיות־מטבוליות

עקות שמקורן בתוך הצמח עצמו או
בתהליכי החיים של

תגובת הצמח לעקה

שינויים בתנאי הסביבה החורגים מהטווח האופטימלי להתפתחות האורגניזמים, גורמים למצבי עקה (Stress)

מצבי עקה גורמים לשיבוש תהליכים ביוכימיים ופיזיולוגיים בתא, בין היתר עקב פגיעה בחלבונים חיוניים.

מופעלים מנגנוני הגנה, ובראשם עלייה בביטוי חלבוני עקה (Stress proteins)

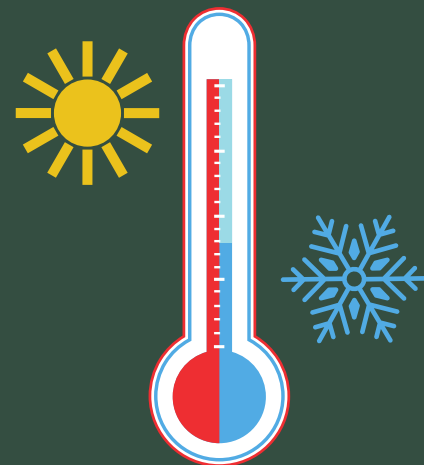
רמות מוגברות של חלבוני עקה משמשות סמן ביולוגי אמין להתרחשות עקה ברקמה.

שמירה על יציבות חלבונים אחרים, מפחיתים הצטברות של חלבונים פגומים, ומכוונים חלבונים בלתי־תקינים לפירוק.

חשיפה לעקה והכנת המיצוי

2

חשיפת הנבטים לתנאי
עקה למשך שעה



1

הנבטה במשך 5 ימים
בתאנים אופטימליים



4

סירכוז והפרדת הנוזל
העליון המכיל חלבונים



3

הכנת מיצוי הנבטים
בבופר מיצוי



אלייזה בלתי ישירה



שלב ראשון:
קישור האנטיגן
לפלטה

(הוספת מיצוי מנבטים-
כל החלבונים שנמצאים
במיצוי נקשרים לבארית)



שלב שני:
קישור חלבון
ממסך



שלב שלישי:
קישור נוגדן
ראשוני לאנטיגן

(נוגדן ספציפי לחלבון
(HSP70



שלב רביעי:
קישור נוגדן
שניוני שקשור
אליו אנדים



שלב חמישי:
הוספת מצע
לאזנים הקשור
לנוגדן השניוני

A 12x8 grid with columns numbered 1 to 12 and rows labeled A to H. A red circle highlights the cell at column 5, row B. Red arrows point to this cell from the top, left, and bottom-left directions.

השפעת טיפול מקדים - טמפרטורה

השפעת טיפול מקדים - מלח



קורא פלטות אלייזה

משקל: 900 גרם
גובה: 5 ס"מ
רוחב: 9 ס"מ
אורך: 14.5 ס"מ



מערכת ניתוח ELISA

ניתוח HSV מתקדם לעוצמת צבע בבאריות



העלה תמונת צלחת ELISA

גרור ושחרר תמונה או לחץ לבחירה

בחר תמונה מהמחשב

בקורות רשת

מיקום רשת



מרווחים



גודל באריות



זום תמונה



בחירת באריות לניתוח

לוח בחירה ויזואלי:

בחירת שורות:



בחירת עמודות:



בחירת סווחים:



באריות לבדיקה:

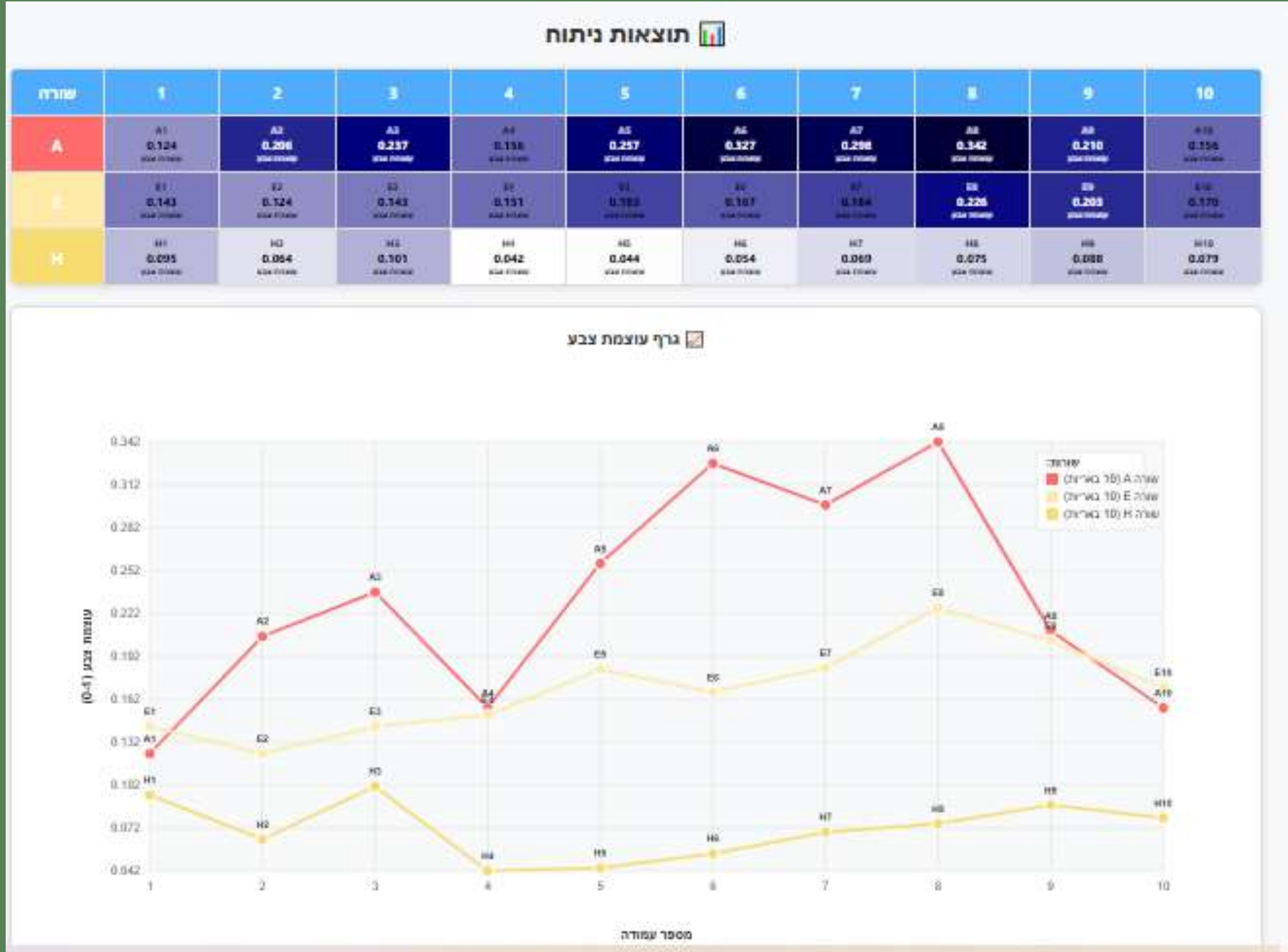
A9	A8	A7	A6	A5	A4	A3	A2	A1
E8	E7	E6	E5	E4	E3	E2	E1	A10
H7	H6	H5	H4	H3	H2	H1	E10	E9
						H10	H9	H8

נקח הכל

בחר הכל

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12

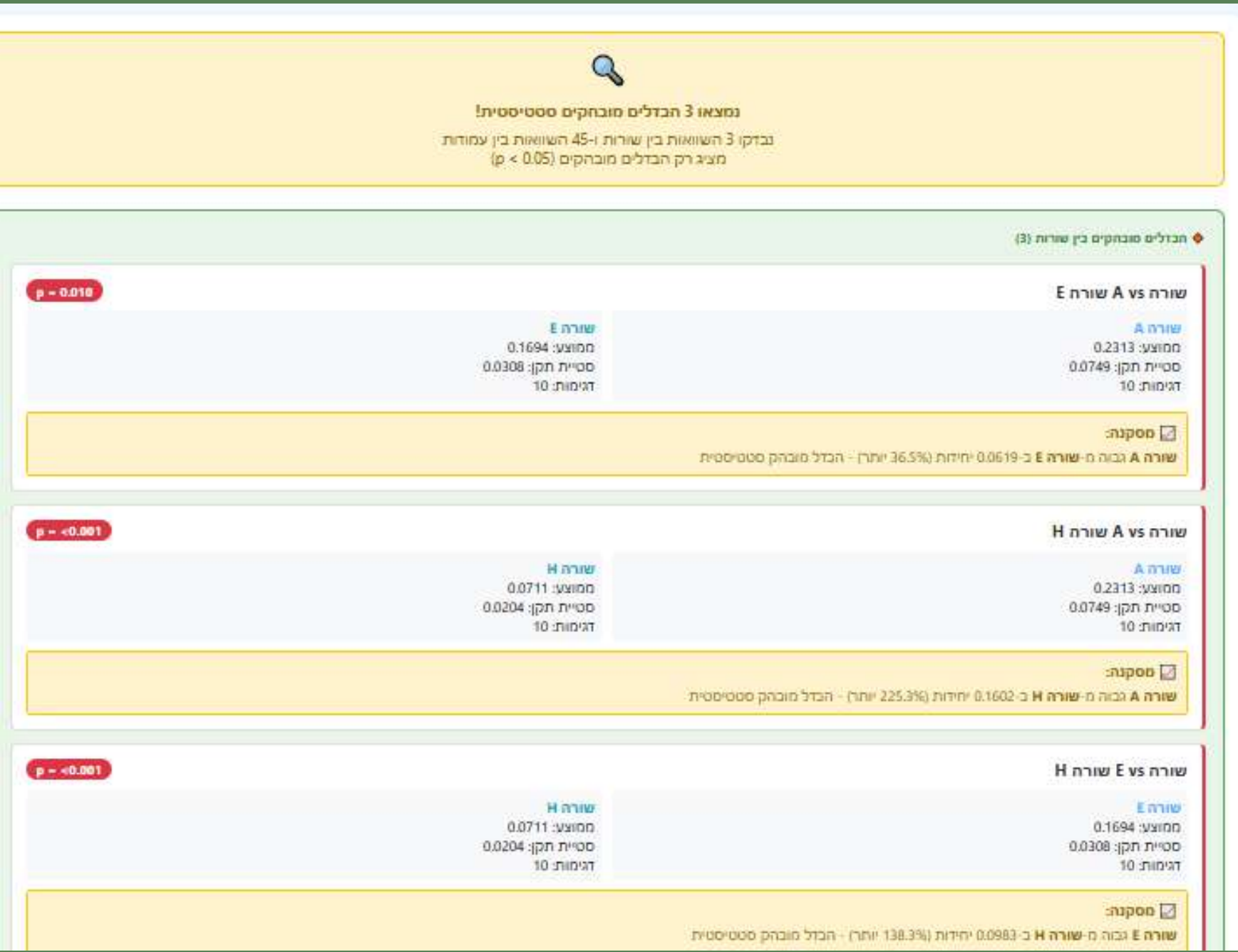




ערך מספרי לכל בארית ותצוגה גרפית



השוואה בין התוצאות ובדיקת מובהקות סטטיסטית





ניסויים נוספים...

חיידקי קרקע

אגרובקטריום

עיכוב התרבות חיידקים עלי ידי בקטריופאג'ים