

דף לתלמיד 15.4.25

השפעת ריכוז אתנול על ביטוי החלבון β -galactosidase בחיידקים ביוסנסוריים

מבוא

בעשורים האחרונים, העלייה ברמות הזיהום הסביבתי מהווה איום משמעותי על בריאות האדם ועל המערכות האקולוגיות. כתוצאה מכך, קיים צורך גובר בפיתוח שיטות רגישות, מהירות וחסכוניות לזיהוי מזהמים סביבתיים. אחת הגישות החדשניות לניטור מזהמים במי שתייה כוללת שימוש בביוסנסורים—חיידקים שעברו הנדסה גנטית כך שהם מגיבים לנוכחות מזהמים באמצעות תגובה אנזימטית. תגובה זו מפרקת מצע מסוים, מה שמוביל ליצירת תרכובת בעלת צבע ייחודי, המספקת אינדיקציה חזותית לנוכחות הזיהום.

מרכיב מרכזי בגישה זו הוא הגן $lacZ$ המקודד לאנזים β -galactosidase. באופן טבעי $lacZ$ הוא חלק מהאופרון הלקטוז (lac operon) בחיידק *Escherichia coli*. אופרון הלקטוז מקודד לאנזים לקטאז המסייע לחיידקים לנצל לקטוז על ידי פירוקו לשני חד סוכרים גלוקוז וגלקטוז. האנזים β -galactosidase מסוגל לפרק גם את החומר X-gal, זהו סובסטרט מלאכותי הדומה ללקטוז. בעוד ש X-gal עצמו חסר צבע, פירוקו על ידי β -galactosidase מוביל לשחרור מולקולת אינדול, היוצרת צבע כחול. שינוי הצבע מהווה מדד אמין לפעילות הגן $lacZ$ ולכן משמש לחקר ביטוי גנים ותפקוד אנזימטי במחקר המדעי.

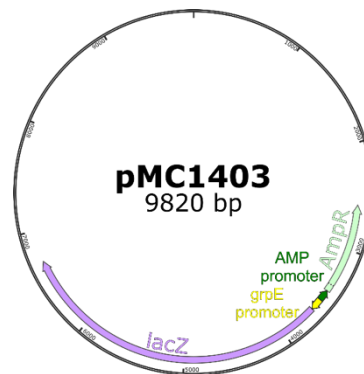
חלבון נוסף הקיים בחיידקים הוא החלבון $grpE$. חלבון זה מקודד על ידי הגן $grpE$ ממלא תפקיד מרכזי בתגובת החיידקים לעקה. חלבון זה הוא חלק ממערכת השפרונים $DnaK$ המסייעת לחיידקים לשרוד בתנאים קיצוניים על ידי סיוע בקיפול נכון של חלבונים ומניעת הצטברות של חלבונים מקופלים באופן שגוי בתנאי עקה. באופן ספציפי $GrpE$, פועל כגורם חילוף נוקלאוטידים המווסת את הפעילות התלויה ב-ATP של $DnaK$ חלבון עקת חום בחיידקים תפקיד זה חיוני להסתגלות החיידקים לגורמי עקה סביבתיים, כולל חום גבוה, רעלים ועקה חמצונית.

מחקרה של פרופ' אליאורה רון והחיידקים הביוסנסוריים המהונדסים

פרופ' אליאורה רון מאוניברסיטת תל אביב, פיתחה חיידקי *E. coli* מהונדסים גנטית שישמשו כביוסנסורים. חיידקים אלה חסרים את הגן $lacZ$ הטבעי, דבר המבטיח שכל ביטוי של β -galactosidase נובע אך ורק ממערכת רגולטורית שהוחדרה באופן יזום. לצורך כך, פלסמיד מהונדס המכיל את הגן $lacZ$ הוחדר לחיידקים. בנוסף, פרופ' רון שילבה אלמנט גנטי רגיש לעקה שהוא הפרומוטור ל $grpE$ המגיב לתנאי עקה סביבתיים, כגון ריכוז מלח גבוהים או חשיפה לאתנול. פרופ' רון ניצלה את מנגנון הבקרה הרגיש לעקה של $grpE$ כדי ליצור מערכת ביוסנסורית המקשרת בין עקה סביבתית לשינוי צבע מדיד. על ידי חיבור הפרומוטור $grpE$ לגן $lacZ$ היא אפשרה לחיידקים לבטא את האנזים β -galactosidase רק כאשר הם נחשפים לתנאי עקה. כך, הפעלת $lacZ$ מובילה ליצור האנזים β -galactosidase והצבע הכחול המתקבל כתוצאה מפירוק X-gal משמשים כאינדיקטור ישיר לנוכחות עקה סביבתית.

שליבים ביצירת החיידקים הביוסנסוריים המהונדסים

1. תכנון הפלסמיד (ראה איור 1): יצירת פלסמיד מעגלי המכיל:
הפרומוטור *grpE* (מסומן בצהוב), המחובר לגן *lacZ* (מסומן בסגול).
גן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה (מסומן בירוק) המאפשר סלקציה של חיידקים המכילים את הפלסמיד.
2. טרנספורמציה של הפלסמיד: החדרת הפלסמיד לחיידקי *E. coli* חסרי הגן *lacZ* הטבעי.
3. גידול החיידקים: גידול החיידקים שעברו טרנספורמציה במצע המכיל אנטיביוטיקה כדי להבטיח שרק התאים שנושאים את הפלסמיד ישרדו.



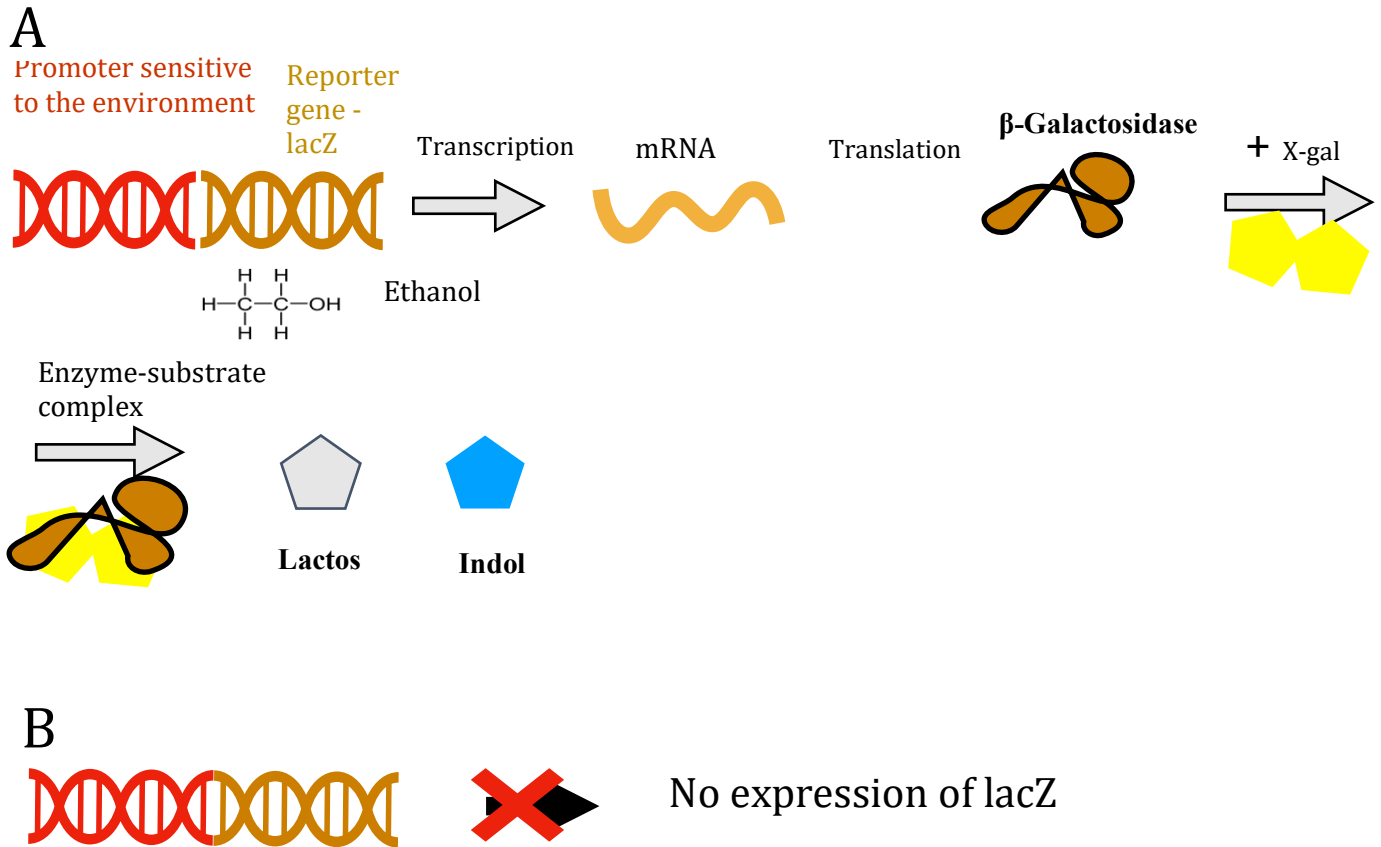
איור 1: מפת הפלסמיד (pMC1403) שהוכנס לחיידק.

סיכום: בעקבות חשיפה למצבי עקה, מופעל אתר הבקרה *grpE*, מתרחש תהליך תעתוק של הגן *lacZ* המתורגם לאנזים β -galactosidase. האנזים מזרז את פירוק ה-x-gal ובעקבות כך משתחררת מולקולת אינדול בעלת צבע כחול, וגורמת לשינוי צבע תרחיף החיידקים לכחול.

שאלות

1. מדוע החוקרים השתמשו בחיידקים שאינם מבטאים באופן טבעי את האנזים β -galactosidase?
2. אם חיידקים מהונדסים אלה ייחשפו לדלק, בנוכחות X-gal ניתן יהיה לראות צבע כחול. תאר את התהליך שמוביל להיווצרות הצבע הכחול

איור 2: מודל השפעת תנאי הסביבה על ביטוי הגן lac-Z בחיידקים מהונדסים



A בתנאי עקה:

אם החיידקים נחשפים לגורם עקה (כגון אתנול), הפרומוטור *grpE* מופעל. כתוצאה מכך, מתרחש תעתוק של mRNA של *lacZ* אשר לאחר מכן מתורגם לאנזים β -galactosidase. כאשר מוסיפים X-gal למצע הגידול, האנזים מפרק אותו ויוצר תרכובת כחולה שניתן למדוד.

B בתנאים רגילים:

אם אין גורמי עקה בסביבה, הפרומוטור *grpE* נותר בלתי פעיל, ולכן *lacZ* אינו מבוטא. כתוצאה מכך, גם אם X-gal נוסף למצע, לא מתרחשת פעילות אנזימטית ולא נצפה שינוי צבע.

חלק א': השפעת ריכוזים שונים של אתנול על ביטוי החלבון β -galactosidase:

חומרים וציוד:

- מבחנות מעוקרות
 - מיקרופיפטורים: בנפח של 100 – 1000 מיקרוליטר ובנפח של 20 – 200 מיקרוליטר.
 - טיפים מעוקרים
 - כלי ובו תמיסת אתנול בריכוז 70% ומעט צמר גפן או נייר מגבת – לחיטוי סביבת העבודה
 - מבחנה ובה 10 מ"ל תרחיף חיידקים מהונדסים
 - מבחנת אפנדורף עטופה ברדיד אלומיניום ובה החומר X-gal
 - מבחנה מסומנת "אתנול 100%" ובה 7 מ"ל אתנול בריכוז 100%
 - מבחנה מסומנת "LB" ובה 7 מ"ל מצע LB נוזלי.
 - כפפות, וחלוקים.
 - כלי לאיסוף פסולת ביולוגית קבוצתי וכלי לאיסוף פסולת ביולוגית כתתי.
- בניסוי זה נשתמש במיקרופיפטורים להעברת התמיסות. יש להקפיד להשתמש במיקרופיפטור מתאים לנפח הנדרש ובטיפים מתאימים.
- נפח של 20 עד 200 מיקרוליטר נעביר בעזרת מיקרופיפטור המיועד לנפח של 20-200.
- נפח מעל 200 מיקרוליטר נעביר בעזרת מיקרופיפטור המיועד לנפח של 100-1000.

לידיעתכם: אתנול הוא ממס שומנים וגורם לשינויים במבנה המרחבי של חלבונים.

מהלך הניסוי

- א. לבשו חלוקים, עטו כפפות.
- ב. נקו את שולחן העבודה ואת המיקרופיפטורים באתנול בריכוז 70%.
- ג. העבירו 50 מיקרוליטר של הסובסטרט X-gal ממבחנת האפנדורף למבחנה המכילה 10 מ"ל תרחיף חיידקים.
- ד. באמצעות טוש סימון, סמנו 7 מבחנות ריקות בספרות 1 – 7.
- ה. העבירו לכל אחת מהמבחנות 1-7 את התמיסות הבאות: תרחיף חיידקים עם הסובסטרט X-gal (שהכנתם בסעיף ג'), מצע LB נוזלי ואתנול, בהתאם לנפחים הרשומים בטבלה 1.

טבלה 1: מערך הניסוי

מספר מבחנה	נפח חיידקים מהונדסים בתרחיף + X-gal (הכנתם בסעיף ד) (מיקרוליטר)	נפח LB (מיקרוליטר)	נפח אתנול 100% (מיקרוליטר)	ריכוז אתנול (אחוזים)
1	1000	1000	0	
2	1000	900	100	
3	1000	800	200	
4	1000	600	400	
5	1000	400	600	
6	1000	200	800	
7	1000	0	1000	

- הניחו את המבחנות בכך המבחנות לפי סדר עולה 1 – 7 וצלמו את התוצאות.
- רשמו את הזמן _____ והמתינו 30 דקות. בכל 5 - 10 דקות בדקו את התוצאות וצלמו אותן.
- במהלך ההמתנה הכינו טבלה שתסכם את מערך הניסוי ותוצאותיו. הוסיפו 5 עמודות אחת לחישוב ריכוז האתנול בתמיסה והנוספות לרישום התוצאות בזמן 0 דקות, בזמן 10, 20 ו-30 דקות.
- כעבור 30 דקות הוציאו את הכן ובו המבחנות מן האינקובטור. עליכם לקבוע את דרגת הצבע שהתקבלה בכל אחת מן המבחנות. ניתן לעשות זאת באמצעות יצירת סולם צבעים באופן שרירותי או בעזרת ספקטרופוטומטר.

חלק ב: זריעה של החיידקים על צלחות לקביעת הוויטאליות (חיות) של החיידקים בכל אחד

מהטיפול:

זריעת החיידקים תאפשר לקבוע אם בטיפולים מסוימים היעדר הצבע כחול או מעיד על חוסר ביטוי של הגן או שהוא תוצאה של מות החיידקים כתוצאה מהחשיפה לאתנול.

ציוד לזריעת חיידקים:

- כפפות חד פעמיות
- צלחת פטרי עם מצע נוטריינט אגר ואמפיצלין
- מחט זריעה
- עט סימון עמיד למים
- כוהלייה
- מבחנות 1-7
- סרט פאראפילם
- פח לפסולת ביולוגית
- כלי עם אלכוהול 70% לחיטוי משטחים

הכנת הצלחות:

- בעזרת עט סימון רשמו על הצד התחתון של הצלחת (לא על המכסה!) שם ותאריך
- ציירו על התחתית קווים שיחלקו את הצלחת ל-8 חלקים שווים
- מספרו את החלקים מ-1 עד 8 על גבי תחתית הצלחת (ניתן לזרע על צלחת אחת חיידקים ממספר טיפולים שונים (ראו תמונה 2)).
- טבלו את מחט הזריעה במבחנה 1, ובצעו זריעת בידוד (צורת נחש) בשמינית הצלחת הממוספרת בספרה 1.
- חזרו על הפעולה עבור כל מבחנה, יש להשתמש במט זריעה חדשה (אם משתמשים במחט רב פעמית יש לחטא את המחט באש לפני כל טבילה במבחנה).

שאלות:

1. התקבלה תגובות צבע גם בחיידקים שלא נחשפו לאתנול, צבע בדרגה נמוכה. הציעו הסבר אפשרי לתופעה זו.
2. הסבירו את התוצאות שהתקבלו בכל אחת מן המבחנות 1 – 7 כעבור 30 דקות.
3. הסבירו מדוע יש הבדלים בתוצאות שהתקבלו כעבור 10 דקות וכעבור 30 דקות.