

דף למורה 15.4.25

השפעת ריכוז אתנול על ביטוי החלבון β -galactosidase בחיידקים ביוסנסוריים

מטרות הניסוי

- בפעילות זו נבדוק את השפעת ריכוז האתנול (ניסוי 1) על עוצמת הביטוי של גן מבני זה (Lac Z) המקודד לאנזים המפרק לקטוז.
- ללמוד על השימוש בחיידקים ביוסנסורים הרגישים למזהמים שונים ולתנאי עקה: חיידקים מהונדסים גנטית, להם הוחדרו פלסמידים ובהם רצפי DNA של חיישן ומערכת דיווח. החיישן רגיש למזהמים ורגיש לשינוי בתנאי הסביבה.
- החיישן הוא רצף DNA של **אזור בקרה** (אתר מקדם / פרומוטור) המבקר את התעתוק של גנים הקשורים במנגנון התיקון של DNA בתאים. במצבי עקה או בחשיפה למזהמים, חלה עליה בביטוי של הגנים המעורבים בתגובה לנזקי DNA.
- הגן המדווח** הוא **גן מבני** שניתן להבחין בתוצר של ביטוי הגן. ביטוי הגן תלוי בהפעלה של אתר הבקרה.

אוכלוסיית היעד:

תלמידי כיתות י"א – י"ב.

קישור לתוכנית הלימודים:

נושאי ליבה: מ-DNA לחלבון, אנזימים, אקולוגיה
נושאי הרחבה: בקרת ביטוי גנים והנדסה גנטית, מיקרוביולוגיה

תכנים ומיומנויות הנדרשים בניסוי

• ידע קודם • תאים פרוקריוטים • נדרש • אנזימים • גנטיקה: ברמת נושא הליבה: מדנ"א לחלבון. • בקרת ביטוי גנים בפרוקריוטים (ברמה בסיסית). לדוגמה: אופרון הלקטוז • הנדסה גנטית ופלסמידים • אקולוגיה: זיהום סביבתי	
• <u>שימוש במיקרופיטור.</u> • מעבדה • הכנת תמיסות בריכוזים שונים. • נדרשות • בניית סולם צבעים באמצעות שימוש ביישומונים לעריכת לוח צבעים. • זריעה וגידול של חיידקים.	

רקע תאורטי

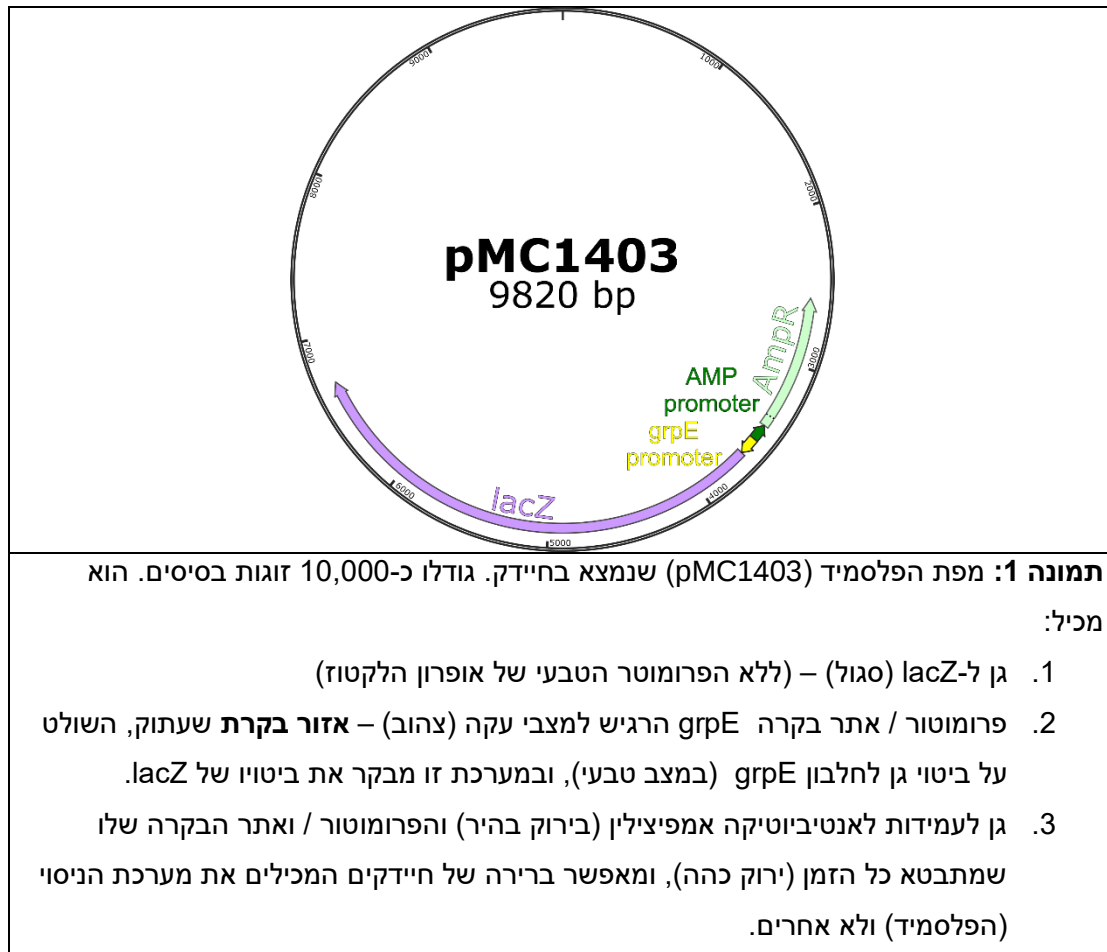
בעשורים האחרונים, העלייה ברמות הזיהום הסביבתי מהווה איום משמעותי על בריאות האדם ועל המערכות האקולוגיות. כתוצאה מכך, קיים צורך גובר בפיתוח שיטות רגישות, מהירות וחסכוניות לזיהוי מזהמים סביבתיים. אחת הגישות החדשניות לניטור מזהמים במי שתייה כוללת שימוש בביוסנסורים—חיידקים שעברו הנדסה גנטית כך שהם מגיבים 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

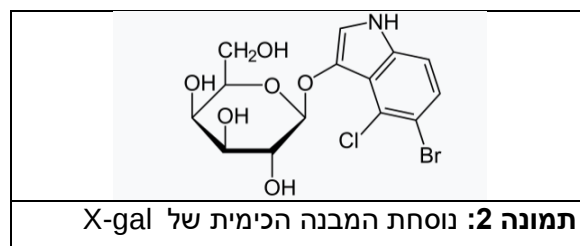
פרופ' אליאורה רון מאוניברסיטת תל אביב, פיתחה חיידקי *E. coli* מהונדסים גנטית שישמשו כביוסנסורים. חיידקים אלה חסרים את הגן $lacZ$ הטבעי, דבר המבטיח שכל ביטוי של β -galactosidase נובע אך ורק ממערכת רגולטורית שהוחדרה באופן יזום. לצורך כך, פלסמיד מהונדס המכיל את הגן $lacZ$ הוחדר לחיידקים. בנוסף, פרופ' רון 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.



שיטת המדידה

עוצמת הצבע הכחול של התמיסה.

ככל שמידת הפגיעה גבוהה יותר (עד גבול מסוים) מידת הביטוי של הגן עולה, ולכן נוצר יותר β -galactosidase המפרק את המצע X-gal, נוצר יותר אינדול ועוצמת הצבע הכחול עולה. מעל מידת פגיעה מסוימת, החיידקים מתים ולכן לא נוצר צבע כחול.



חשוב לשים לב:

לפרומוטור יש פעילות בדרגה נמוכה (=בזאלית) גם ללא חשיפה לעקה [ביטוי הגן לא עובר מאפס (היעדר ביטוי) למאה (ביטוי מקסימלי)]. כלומר לחיידקים בתרחיף שלא מבטאים את הגן לאנזים β -galactosidase יהיה צבע כחול בדרגה נמוכה. נצפה לראות תוצאות בטווח של תכלת בהיר מול תכלת כהה בתנאי עקה.

ניסוי 1: השפעת ריכוזים שונים של אתנול על מידת ביטוי החלבון β -galactosidase:

מהלך הניסוי מפורט בקובץ לתלמיד.

- במהלך המדידות ניתן להשתמש בלוח צבעים מוכן או להכין אותו בעזרת בינה מלאכותית AI או בעזרת יישומונים.



יצירת סולם צבעים בשני שלבים:

1. יצירת סולם צבעים על ידי שימוש באפליקציות

שלב ראשון: דגימת הצבעים במבחנות באמצעות האתר: ColorPick Eyedropper

<https://imagecolorpicker.com/>

- העלו תמונה של התוצאות של הטיפולים השונים במבחנות לאתר על ידי לחיצה על "Upload an image" או גרירת התמונה לאזור המיועד.
- לאחר שהתמונה עלתה, השתמשו בכלי הטפטפת כדי לבחור את הצבע הרצוי מכל מבחנה.
- ג. כשתבחרו צבע, תוכלו לראות את ערכי ה-RGB שלו. לדוגמה: R: 255, G: 128, B: 0.
- ד. רשמו את ערכי ה-RGB עבור כל מבחנה, כולל מבחנת הייחוס (החידקים בתרחיף ללא אתנול וללא x-gal).

שלב שני: מדידת המרחק בין הצבעים / מדידת עוצמת הצבע / מדידת דרגת הצבע:

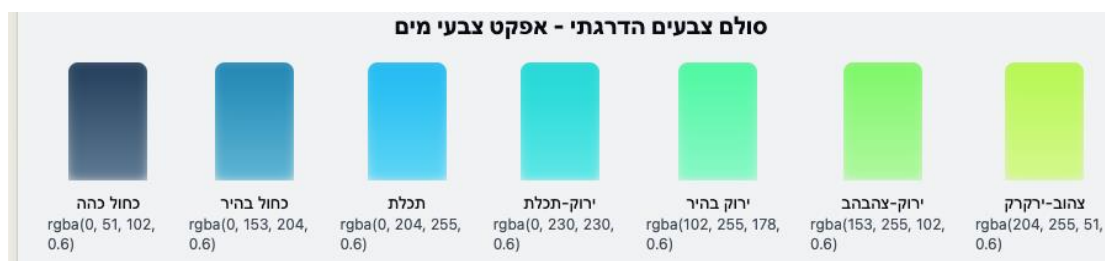
לשלב זה, נשתמש: באתר <http://colormine.org/delta-e-calculator>

- א. באתר זה, תראו שני מלבנים צבעוניים: "Color 1" ו-"Color 2".
- ב. תחת "Color 1", הכניסו את ערכי ה-RGB של מבחנת הייחוס שרשמתם קודם. המבחנה שבה ריכוז האתנול 0%.
- ג. תחת "Color 2", הכניסו את ערכי ה-RGB של המבחנה שברצונכם להשוות למבחנת הייחוס.
- ד. לחצו על "Calculate" כדי לקבל את ערך ה-Delta E, המייצג את המרחק בין שני הצבעים.
- ה. חיזרו על התהליך עבור כל מבחנה, תוך שימוש בערכי ה-RGB של מבחנת הייחוס כ- "Color 1" וערכי ה-RGB של כל מבחנה אחרת כ- "Color 2".
- ו. רשמו את ערכי ה-Delta E עבור כל מבחנה. אלו הם היחידות השרירותיות שמייצגות את ההבדל בין כל מבחנה למבחנת הייחוס.

שימו לב שככל שערך ה-Delta E גבוה יותר, כך ההבדל בין הצבעים גדול יותר.

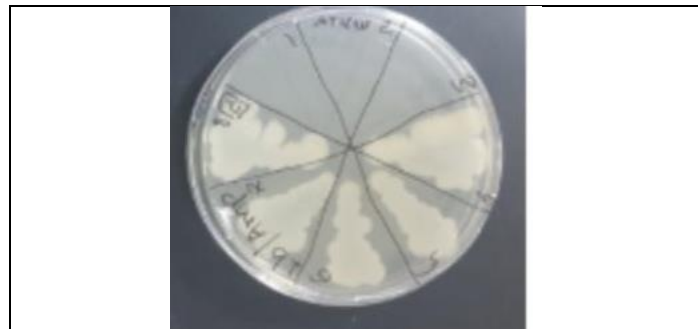
2. שימוש בסולם צבעים:

הערה: את סולם הצבעים הכנו על ידי שימוש ב AI:



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

בתום הניסוי ניתן לזרוע את החיידקים מכל אחד מהטיפולים על צלחות עם מצע LB - אגר המכילות אמפיצילין. זריעת החיידקים תאפשר לקבוע אם היעדר צבע כחול או צבע כחול בדרגה נמוכה מעיד על חוסר ביטוי של הגן או שהוא תוצאה של מות החיידקים כתוצאה מהחשיפה לאתנול.
מהלך הניסוי מפורט בקובץ לתלמיד.



תמונה 4: תוצאות זריעת החיידקים מהטיפולים השונים

ניתן לראות שבריכוזי אתנול: 50%, 40% וב-30% החיידקים לא התרבו. כלומר, בריכוזים אלו החיידקים מתו ולא שרדו.

רעיונות נוספים

- השפעת ריכוז החיידקים (אנזים) בתרחיף על קצב פעילות האנזים β -galactosidase.
- השפעת ריכוז ה X-GAL על קצב פעילות האנזים β -galactosidase.
- השפעת טמפרטורות שונות על שיעור הביטוי החלבון β -galactosidase / על שיעור הפירוק של X gal.
- השפעת ריכוז האתנול על קצב הנשימה התאית בחיידקים הביוסנסוריים.

תשובות לדף עבודה של התלמיד

1. חישוב ריכוז האתנול בכל אחד מהטיפולים:

טיפול 1: 0%

טיפול 2: 5%

טיפול 3: 10%

טיפול 4: 20%

טיפול 5: 30%

טיפול 6: 40%

טיפול 7: 50%

2. הסבר התוצאות לאחר 30 דקות:

ככל שריכוז האתנול עולה, צפויה עלייה בעוצמת הצבע הכחול עד לנקודה מסוימת, ולאחר מכן ירידה. הסבר:

השפעת האתנול על החיידקים:

- בריכוזים נמוכים-בינוניים: האתנול גורם לעקה תאית, ובתגובה החיידק מפעיל את אתר הבקרה $grpE$, ומוביל לביטוי מוגבר של הגן $lacZ$, ולכן קצב פירוק המצע $X-gal$ ודרגת הצבע הכחול עולה.
- בריכוזים גבוהים: האתנול עלול לפגוע בחיוניות החיידקים ולהפחית את ייצור האנזים β -galactosidase עקב מותם.

*הקשר בין ביטוי הגן לצבע הכחול:

- ביטוי הגן $lacZ$ <-- ייצור האנזים β -galactosidase <-- פירוק $X-gal$ <-- היווצרות אינדול (בעל צבע כחול)

- עוצמת הצבע הכחול מהווה אינדיקציה ישירה לרמת ביטוי הגן $lacZ$.

ההבדלים בדרגת הצבע הכחול לאורך זמן: ההבדלים בתוצאות בין 10 ל-30 דקות נובעים מזמן התגובה הדרוש לביטוי הגן, ייצור האנזים, והצטברות התוצר הכחול. לאחר כ- 30 דקות, דרגת הצבע הכחול המתקבלת היא הגבוהה ביותר (קצב התגובה האנזימטית מקסימלי).

3. האירור מציג בקרה חיובית על הגן $lacZ$ המהונדס. הנימוק:

הפלסמיד $pMC1403$ מכיל את הגן $lacZ$ ללא הפרומוטור המקורי שלו (באופרון הלקטוז). במקום זאת, הגן $lacZ$ נמצא תחת בקרה של אתר הבקרה $grpE$. אתר הבקרה $grpE$ מגיב לתנאי עקה כמו טמפרטורה גבוהה או נוכחות מזהמים אורגניים. בתנאי עקה, גורמי תעתוק ספציפיים נקשרים לאתר הבקרה $grpE$. קשירת גורמי התעתוק לאתר הבקרה $grpE$ מגביר את הקישור של RNA פולימראז לאתר הבקרה ומתחיל תעתוק הגן $lacZ$.

זוהי בקרה חיובית מכיוון שהיא מגבירה את התעתוק בתגובה לגירוי (תנאי עקה), ולא מסירה עיכוב. בהיעדר תנאי עקה, הגן $lacZ$ לא יתועתק או יתועתק ברמה נמוכה מאוד.

מנגנון זה מאפשר לחיידקים להגיב לתנאי עקה על ידי ייצור β -galactosidase, שניתן לזהות באמצעות שינוי צבע בנוכחות $X-gal$.

4. התגובה החלשה בחיידקים שלא נחשפו לאתנול יכולה לנבוע מ:

- רמת ביטוי בסיסית של הגן $lacZ$ שקיימת בתאים גם ללא חשיפה לתנאי עקה או מזהמים.
- גורמי עקה אחרים בסביבת הגידול.
- רגישות גבוהה של המנגנון לשינויים קטנים בתנאי הסביבה.
- פירוק ספונטני של המצע $X-gal$.