مراقبة المواد السامة باستخدام المستشعرات البيولوجية: بيوتكنولوجيا تجربة أولية

استخدام بكتيريا ال-*E. coli* المهندسة لمراقبة الملوثات

في هذا المختبر ستحصلون على 3 سلالات من بكتيريا ال-*E. coli* المهندسة لتكون بمثابة أجهزة الاستشعار البيولوجي للمواد التي يمكن أن تضر بال-DNA. تم إدخال بلازميد في جميع السلالات الثلاث مع مكونين رئيسيين: مستشعر وجين مراسل.
المستشعر هو محفز (Promoter) الذي يتم تفعيله عند تراكم الضرر بال-DNA ويتم تفعيل نظام SOS للبكتيريا، **الجين المراسل** يشفر إنزيم اسمه: الفوسفاتاز القلوي (Alkaline Phosphatase)، إنزيم من السهل قياس نشاطه في المختبر. إن تنظيم هذين العنصرين في البلازميد هو أنه عندما يتم تنشيط موقع المحفز (يتم تنشيط المستشعر)، هناك تعبير عن الجين المراسل، ويتم انتاج إنزيم الفوسفاتاز القلوي.

سؤال: هل من الممكن أن نقول أن كمية الفوسفاتاز القلوية المتولدة سوف تتناسب طرديا مع درجة الضرر الذي تسبب في ال-DNA للبكتيريا؟

اثنان من السلالات التي نستخدمها في المختبر لديها طفرات إضافية تزيد من حساسية البكتيريا للملوثات البيئية. الطفرات هي طفرات من نوعين: النوع الأول، الطفرات التي تزيد من نفاذية الغشاء البكتيري؛ النوع الثاني: الطفرات التي تغير (او تقلل) القدرة على إصلاح الحمض النووي للبكتيريا.
الأنماط الجينية للسلالات التي سنعمل عليها هي:

- **W-** النوع البري. كل الجينات طبيعية.
- **E-** سلالة تحوي طفرة في جين الذي يشفر واحد من مركبات الغشاء الخارجي للبكتيريا (عديد السكاريد الشحمي، Lipopolysaccharide). عدم وجود عديد السكاريد الشحمي يزيد بشكل كبير من نفاذية الغشاء البكتيري لجزيئات كبيرة نسبيا.
- **A-** سلالة تحوي طفرة في الجين المرتبط لإصلاح الأضرار التي لحقت ال-DNA: يتم ترميز هذا الجين إلى بروتين يكتشف العيوب في البنية المكانية للحمض النووي. يزيد خلل البروتين بشكل ملحوظ من قابلية هذه البكتيريا إلى تلف الحمض النووي.

سؤال: لماذا من المهم زيادة حساسية البكتيريا المستخدمة كمستشعرات بيولوجية للمواد الملوثة؟

خلال المختبر سوف ندرس تأثير أنواع مختلفة من نوعين من الملوثات على التعبير عن الجين المراسل في الطفرات المختلفة.
ستختبر كل مجموعة من الطلاب تأثير مادة سامة أخرى على السلالات البكتيرية الثلاثة.

خلال ساعة من حضن مختلف الطافرات في وجود تراكيز مختلفة من الملوثات، سوف تقيسوا الكثافة البصرية للزراعات البكتيرية المختلفة كل 20 دقيقة. بعد ساعة، سوف تغسلوا البكتيريا وتأخذوا عينة من كل زراعة لاختبار نشاط إنزيم الفوسفاتاز القلوي. سيتم فحص نشاط الانزيم عن طريق إضافة ركيزة اصطناعية شفافة، باسم pNPP، التي تتحول الى اللون الأصفر عند تحللها. شروط الاختبار هي فائض كبير من pNPP بحيث كلما تكون كميات الإنزيم أكبر، كثافة اللون الأصفر ستكون أقوى.

<u>تحضير البكتيريا:</u> السلالات البكتيرية المختلفة معلّمة بالأحرف **W**، **E**، **A** ومتواجدات في دوارق مخروطية في الاحواض المائية المهتزة. تحتوي كل مجموعة على 6 أنابيب اختبار زجاجية ذات أغطية معلّمة بلون مختلف. تذكر لون اغطية مجموعتك.
أمامك 6 أنابيب اختبار زجاجية.
<u>انتبه</u>: لكل أنبوب اختبار يجب عليك نقل بكتيريا <u>من سلالة اخرى (المجموع 3 سلالات X 2 من كل سلالة)</u>.

1. رقم 3 أنابيب اختبار زجاجية في الجزء العلوي من الأنبوب مباشرة تحت الغطاء بالأحرف **W0،A0،E0** و3 أنابيب اختبار بالأحرف **W1،A1،E1** .
2. امزج البكتيريا المتواجدة في الدورق المعلم ب-W بخفة.
3. انقل لأنابيب W0،W1، 5 ملل بكتيريا من الدورق المعلم ب-W. اكتب اسمك أيضًا على أحد الأنابيب.
4. امزج البكتيريا المتواجدة في الدوارق المعلمة ب-A و E.
5. انقل لأنابيب E0،E1، 5 ملل بكتيريا من الدورق المعلم ب-E, ولأنابيب A0،A1، 5 ملل بكتيريا من الدورق المعلم ب-A.

تأكد من ترقيم الأنابيب برقم السلالة المناسب. حامل الأنابيب سيبدو هكذا:

1	2	3	4	5	6
W0	A0	E0	W1	A1	E1

<u>إضافة المادة السامة إلى البكتيريا:</u>
على صينية العمل توجد المادة السامة: **اما** بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2): 0.5 %؛ **او** حمض النالديكسيك (NA) 2000 ppm

6. اضبط الماصة الأوتوماتيكية ذات مدى 100µl ل- 100µl وضع مصاصة (تيب) بيضاء نظيفة.
7. أضف <u>لكل من الأنابيب</u> W1 و A1 و E1 100µl من المادة السامة المتواجدة بأنبوبة وامزج جيدا بواسطة جهاز الڤورتكس.

الآن، بعد قراءة مقياس الطيف الضوئي (مراحل 8-11) يتم تحضين البكتيريا بدرجة حرارة 37 درجة مئوية بوجود السم:

<u>قراءة درجة تعكر البكتيريا:</u>

8. اضبط جهاز السبكتروفوتومتر بطول موجة 600nm.
9. قم بتصفير جهاز السبكتروفوتومتر بمساعدة الأنبوب الذي يحتوي على سائل LB (وسط غذائي) الموجود على حامل الأنابيب.
10. قم بقياس درجة الابتلاع (درجة التعكر) للبكتيريا بالسبكتروفوتومتر لجميع الأنابيب، وقم بتسجيل النتائج بالجدول في الصفحة 7.
11. ادخل الأنابيب للحوض ذو درجة حرارة 37°C مع الاهتزاز.
12. اضبط الساعة (TIMER) لـ 20 دقيقة وشغله.
13. في الوقت المتبقي حتى القراءة التالية، قم بإعداد **<u>الأنابيب للتفاعل الأنزيمي</u>** وفقًا للتعليمات الموجودة في الصفحة 4.
14. عند سماعك رنين الساعة، قم بإخراج انابيب مجموعتك من الحوض المائي، وقم بقياس درجة الابتلاع للأنابيب بالسبكتروفوتومتر. قم بتسجيل النتائج بالجدول في الصفحة 7.
15. ارجع الأنابيب للحوض ذو درجة حرارة 37°C مع الاهتزاز، واضبط الساعة لـ 20 دقيقة وشغله.
16. في الوقت المتبقي حتى القراءة التالية رقّم الأنابيب لغسل البكتيريا كما هو موضح أدناه (الخطوات 1-2 من قسم "غسل البكتيريا").
17. عند سماعك رنين الساعة، قم بإخراج انابيب مجموعتك من الحوض المائي، وقم بقياس درجة الابتلاع للأنابيب بالسبكتروفوتومتر. قم بتسجيل النتائج بالجدول في الصفحة 7.
18. ارجع الأنابيب للحوض ذو درجة حرارة 37°C مع الاهتزاز، واضبط الساعة لـ 20 دقيقة وشغله.
19. عند سماعك رنين الساعة، قم بإخراج انابيب مجموعتك من الحوض المائي، وقم بقياس درجة الابتلاع للأنابيب بالسبكتروفوتومتر. قم بتسجيل النتائج بالجدول في الصفحة 7.
20. انقل الأنابيب إلى سلة الثلج.

<u>غسل البكتيريا:</u>

1. ضع 6 أنابيب ابندورف صغيرة في حامل الأنابيب.
2. رقم 3 أنابيب بالأحرف: **E0،A0،W0** و3 أنابيب بالأحرف **E1،A1،W1**. سيتم استخدام أنابيب الابندورف هذه لغسل البكتيريا لاحقًا.
3. اضبط الماصة الأوتوماتيكية ذات مدى 1000µl لـ- 900µl.
4. انقل 900µl من كل زراعة بكتيرية لأنابيب الابندورف **العادية** المرقمة على التوالي. مثال: انقل من أنبوب الاختبار الزجاجي المسمى **W0** إلى أنبوب الابندورف المرقم بـ **W0**؛ من أنبوب الاختبار **W1** إلى أنبوب الابندورف **W1**، وما إلى ذلك.
5. بمساعدة المرشد، انقل أنابيب الابندورف مع البكتيريا إلى جهاز الطرد المركزي (Centrifuge).
6. قم بعملية فراز (Centrifugation) للأنابيب لمدة 5 دقائق بالسرعة القصوى.
7. في نهاية الفراز، قم بإخراج أنابيب الابندورف، <u>تحقق لرؤية راسب بكتيري</u>، وأدخلها لحامل الأنابيب <u>بلطف</u>.

8. اسكب السائل العلوي. **احرص على عدم سكب الراسب!** إذا لزم الأمر، قم بإزالة السائل العلوي مع الماصة المضبوطة ل- 1000µl، يجب الحرص على عدم امتصاص الراسب البكتيري.
9. ضع الأنابيب وهي مقلوبة على قطعة ورق ماص لكي تتخلص مما بقي من السائل.
10. اضبط الماصة الأوتوماتيكية ذات مدى 1000µl ل- 500µl.
11. انقل 500µl **من محلول رقم 1**، لكل من أنابيب الابندورف مع الراسب البكتيري.
12. امزج الأنابيب جيدا بواسطة جهاز الڤورتكس، حتى يتم تعليق كل الرواسب.
13. انقل أنابيب الابندورف مع البكتيريا المعلقة إلى جهاز الطرد المركزي قم بعملية فراز لمدة 5 دقائق بالسرعة القصوى.
14. في نهاية الفراز، قم بإخراج أنابيب الابندورف، تحقق لرؤية راسب بكتيري، وأدخلهن لحامل الأنابيب بلطف.
15. اسكب السائل العلوي. **احرص على عدم سكب الراسب!** إذا لزم الأمر، قم بإزالة السائل العلوي مع الماصة المضبوطة ل- 1000µl، يجب الحرص على عدم امتصاص الراسب البكتيري.
16. ضع الأنابيب وهي مقلوبة على قطعة ورق ماص لكي تتخلص مما بقي من السائل.
17. اضبط الماصة الأوتوماتيكية ذات مدى 1000µl ل- 350µl.
18. انقل 350µl **من محلول رقم 2**، لكل من أنابيب الابندورف مع الراسب البكتيري.
19. امزج الأنابيب جيدا بواسطة جهاز الڤورتكس، حتى يتم تعليق كل الرواسب.
20. ضع الأنابيب مع البكتيريا المعلقة في سلة الجليد.
21. ابدأ في تنفيذ التفاعل الأنزيمي (أدناه).

تحضير أنابيب الاختبار للتفاعل الأنزيمي:

22. ضع 6 أنابيب ابندورف صغيرة **مع قفل** في حامل الأنابيب.
23. رقم 3 أنابيب بالأحرف: **W0،A0،E0** و3 أنابيب بالأحرف **W1،A1،E1**.
24. اضبط الماصة الأوتوماتيكية ذات مدى 1000µl ل- 900µl.
25. انقل 900µl من الانبوبة المعلمة ب **"محلول التفاعل"**، لكل واحدة من أنابيب الابندورف المرقمة ذات القفل.

محلول التفاعل يحتوي على ركيزة لإنزيم الفوسفاتاز القلوي والمنظف SDS الذي يخترق الأغشية البكتيرية ويسمح للإنزيم بالخروج من الخلية.

26. اقفل أغطية الأنابيب جيدا، ضعها في سلة الثلج وقم بتغطيتها بورق ألومنيوم حتى تستخدمها (المزيج حساس للضوء وبالتالي يجب تغطيته).

<u>تنفيذ التفاعل الأنزيمي:</u>

27. قم بإزالة ورق الألومنيوم من أنابيب التفاعل وانقلها من سلة الثلج إلى الصينية على طاولتك.
28. اضبط الماصة الأوتوماتيكية ذات مدى 100µl ل- 100µl.
29. امزج البكتيريا المغسولة في أنبوبة الابندورف **W0**، المتواجدة في سلة الثلج، بخفة بواسطة الماصة الأوتوماتيكية.
30. انقل 100µl من البكتيريا المغسولة **W0** لأنبوبة التفاعل المرقمة **W0**.
31. ارجع البكتيريا المغسولة لسلة الثلج.
32. **استبدل بتيب جديد!**
33. امزج البكتيريا المغسولة في أنبوبة الابندورف **W1** بخفة بواسطة الماصة الأوتوماتيكية.
34. انقل 100µl من البكتيريا المغسولة **W1** لأنبوبة التفاعل المرقمة **W1**.
35. ارجع البكتيريا المغسولة لسلة الثلج. **استبدل بتيب جديد!**
36. بنفس الطريقة، نقل البكتيريا من جميع الأنابيب إلى جميع أنابيب التفاعل. تأكد من تغيير تيب في كل مرة تستخدم فيها بكتيريا من أنبوب آخر.
37. اضبط الماصة الأوتوماتيكية ذات مدى 100µl ل-50µl.
38. أضف لكل واحدة من أنابيب التفاعل 50µl كلوروفورم. (الكلوروفورم يزيد من الثقوب في غشاء الخلية ويحسن خروج الإنزيم من الخلية).
39. اقفل بسرعة و بشكل جيد كل أنبوبة بعد إضافة الكلوروفورم (الكلوروفورم سائل متطاير).
40. امزج خليط التفاعل جيدا بواسطة قلب الانبوبة وأيضا بواسطة جهاز الـڤورتكس.
41. اضبط الساعة لـ 30 دقيقة.
42. أدخل أنابيب التفاعل لداخل الحوض المائي بدرجة حرارة 37°C لمدة 30 دقيقة. خلال هذا الوقت يجب عليك البدء في إعداد لوحة القراءة (أدناه).

<u>إعداد لوحة القراءة:</u>

بشكل عام: ستحتاج إلى نقل كل من البكتيريا ومزيج التفاعل إلى لوحة القراءة التي تحتوي على 96 حجيرة مرقمة. تأكد من حمل كل لوحة بالحواف وعدم لمس الجزء السفلي. تأكد من أخذ العينات من <u>الطبقة العلوية</u> من الأنبوب! الطبقة السفلية معكرة وهذا يتداخل مع كثافة اللون.

بعد نقل العينات، يمكنك قراءة الابتلاع باستخدام سبكتروفوتومتر خاص (**Microplate Reader**).

43. قم بترقيم اللوحة ذات ال 96 حجيرة كما هو موضح في القائمة أدناه:

			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
OD600		A	W0	A0	E0	W1	A1	E1						
		B	W0	A0	E0	W1	A1	E1						
		C												
		D												
OD405		E	W0	A0	E0	W1	A1	E1						
		F	W0	A0	E0	W1	A1	E1						
		G												
		H												

نقل البكتيريا:

44. اضبط الماصة الأوتوماتيكية ذات مدى 100µl ل- 100µl.
45. امزج البكتيريا المغسولة في أنبوبة الابندورف **W0** بلطف بواسطة جهاز الـفورتكس.
46. انقل 100µl من البكتيريا المغسولة للحجيرة A1 وللحجيرة B1 للحصول على 2 تكرارات. استبدل بتيب جديد.
47. امزج البكتيريا المغسولة في أنبوبة الابندورف **W1** بلطف بواسطة جهاز الـفورتكس.
48. انقل 100µl من البكتيريا المغسولة للحجيرة A2 وللحجيرة B2 للحصول على 2 تكرارات. استبدل بتيب جديد.
49. بنفس الطريقة، انقل البكتيريا من جميع الأنابيب الستة إلى الحجيرات المناسبة كما هو موضح في الجدول A1 إلى B6.

نقل العينات من التفاعل الأنزيمي:

50. بعد نهاية 30 دقيقة (عند سماعك رنين الساعة) أخرج أنابيب الابندورف (ذات القفل) التابعة لمجموعتك من الحوض المائي، قم بمسحها جيدا وأحضرها إلى سطح طاولتك.
51. انقل 100µl من كل واحدة من أنابيب التفاعل إلى المنطقة المعلمة ب- OD405 (من أنبوبة W0 للحجيرات E1 وF1، من أنبوبة W1 للحجيرات E2 وF2، إلخ. في نهاية عملية النقل الحجيرات E1 حتى 6F يجب أن تكون مليئة بمنتجات التفاعل الأنزيمي من العينات المختلفة).
52. بمساعدة المرشد، اقرأ بواسطة جهاز ELISA مدى الابتلاع بطول موجة 405nm وبعد ذلك اقرأ بطول موجة 600nm. بعد القراءة، سوف تتلقى صفحتين: في صفحة واحدة، ستكون نتائج قراءة الطول الموجي 405 وقراءة الطول الموجي 600 في الأخرى.

<u>نقل البيانات إلى ملف Excel:</u>

انسخ قراءات الابتلاع بأطوال الموجة 600 و 405 الى ملف Excel، إلى الموقع المناسب (يوجد علامة لكل واحد من أطوال الموجة).

جدول لقياس تعكر البكتيريا (O.D.) مع أو بدون المادة السمية:

W0	A0	E0	W1	A1	E1	زمن (دقائق)
						0
						20
						40
						60