مراقبة المواد السامة باستخدام المستشعرات البيولوجية:

استخدام بكتيريا *E. coli* مهندسة لمراقبة الملوثات في عينات المياه

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** و**جين 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 سنفحص تأثير التراكيز المختلفة لنوعين من الملوثات على التعبير الجيني الذي أُدخل إلى مختلف السلالات.

خلال ساعة من حضن مختلف السلالات 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.

انتبهوا: سيقوم الطلاب الذين يعملون مع السم H_2O_2 (بيروكسيد الهيدروجين) باستخدام سلالات W و A.
وسيقوم الطلاب الذين يعملون مع السم NA (حمض النااليديكسيك) باستخدام W و E.

تحضير تخفيفات مزدوجة من السم (بيروكسيد الهيدروجين / حمض النااليديكسيك):

يرجى ملاحظة: التركيز الأولي للسموم هو: بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2): 0.5 %، حمض النااليديكسيك (NA) 2000 ppm

1. رقّم أنابيب 5 ابندورف **عاديات** بالأرقام T0،T1،T2،T3،T4.
2. اضبط الماصة الأوتوماتيكية ذات مدى 1000µl (ميكرولتر) ل- 500µl وضع مصاصة (تيب) نظيفة.
3. أدخل للأنابيب T1،T2،T3 500µl مياه مقطرة (DDW).
4. اضبط الماصة الأوتوماتيكية ذات مدى 1000µl ل- 1000µl وضع تيب نظيف.
5. أدخل للأنبوبة المرقمة T0 1000µl مياه مقطرة (DDW). أغلق الأنبوب.
6. ارمي التيب، وضع تيب نظيف على الماصة.
7. أدخل للأنبوبة المرقمة T4 1000µl من السم الذي على صينية العمل (H_2O_2 أو NA).
8. اضبط الماصة الأوتوماتيكية ل-500µl وضع تيب نظيف.
9. انقل 500µl من السم في أنبوبة T4 لأنبوبة T3.
10. أغلق الأنبوب وامزج جيدا بواسطة قلب الانبوبة وأيضا بواسطة جهاز الـفورتكس.
11. **استبدل بتيب جديد!**
12. انقل 500µl من السم في أنبوبة T3 لأنبوبة T2.
13. أغلق الأنبوب وامزج جيدا بواسطة قلب الانبوبة وأيضا بواسطة جهاز الـفورتكس.
14. **استبدل بتيب جديد!**
15. انقل 500µl من السم في أنبوبة T2 لأنبوبة T1.
16. أغلق الأنبوب وامزج جيدا بواسطة قلب الانبوبة وأيضا بواسطة جهاز الـفورتكس.

جدول يلخص الخطوات من 1 إلى 16 لإعداد تخفيفات مزدوجة من السم:

رقم الأنبوبة	T4	T3	T2	T1	T0
مياه مقطرة (DDW)	-	500µl	500µl	500µl	1000µl
سم	1000µl	500µl من أنبوبة T4	500µl من أنبوبة T3	500µl من أنبوبة T2	-
حساب التركيز النهائي للسم*:					

* يجب استخدام قيم التركيز الأولي ومضاعفته بعامل الخلط.

<u>تحضير البكتيريا:</u>

السلالات البكتيرية المختلفة (معلمات ب- A،E،W) متواجدات في دوارق مخروطية في الاحواض المائية المهتزة. سيقوم الطلاب الذين يعملون مع السم H_2O_2 باستخدام سلالات W و A، وسيقوم الطلاب الذين يعملون مع السم NA باستخدام W و E. تحتوي كل مجموعة على أنابيب اختبار زجاجية ذات أغطية معلّمة بلون مختلف. تذكر لون اغطية مجموعتك.

أمامك 10 أنابيب اختبار زجاجية.

<u>انتبه:</u> لكل خمسة أنابيب اختبار، يجب أن تنقل بكتيريا من <u>سلالة مختلفة</u>.

1. رقم 5 أنابيب زجاجية بالحرف W وبالأرقام 0-4 (W0،W1،W2،W3،W4).
2. امزج البكتيريا في الدورق الزجاجي المعلم ب-W بخفة.
3. انقل لكل أنبوبة 5 ملل بكتيريا من الدورق المعلم ب- W. اكتب اسمك أيضًا على أحد الأنابيب.

تحقق من التسجيل على صينية العمل، واعتمادًا على سلالة البكتيريا التي تعمل معها: رقم 5 أنابيب زجاجية أخرى بالحرف E أو A وبالأرقام 0-4 (E0،E1،E2،E3،E4 أو A0،A1،A2،A3،A4).

4. امزج البكتيريا في الدورق الزجاجي المعلم ب- E أو A بخفة.
5. انقل لكل أنبوبة 5 ملل بكتيريا من الدورق المعلم ب- E أو A اعتمادا على السم الذي تستخدمه.

تأكد من ترقيم الأنابيب بعلامة السلالة المناسبة. الحامل مع الأنابيب سيبدو هكذا:

W0	W1	W2	W3	W4
E0 أو A0	E1 أو A1	E2 أو A2	E3 أو A3	E4 أو A4

إضافة المادة السامة إلى البكتيريا:

6. اضبط الماصة الأوتوماتيكية ذات مدى 100µl ل- 50µl وضع مصاصة تيب نظيفة.
7. أضف إلى كل واحد من الأنابيب W0 وA0 (أو E0) 50µl من السم الموجود في الأنبوبة T0 و امزج بجهاز الـفورتكس.
8. استبدل بتيب جديد!
9. أضف لكل واحد من الأنابيب W1 و A1 (أو E1) 50µl من السم الموجود في الأنبوبة T1 و امزج بجهاز الـفورتكس.
10. كرر المقاطع 7-8 مع بقية أنابيب البكتيريا والسموم بتراكيز مختلفة، على التوالي.

الآن، سيتم تحضين البكتيريا لمدة 60 دقيقة عند 37 درجة مئوية في وجود السم:

قراءة درجة تعكر البكتيريا:

11. اضبط جهاز السبكتروفوتومتر بطول موجة 600nm.
12. قم بتصفير جهاز السبكتروفوتومتر بمساعدة الأنبوب الذي يحتوي على سائل LB (وسط غذائي) الموجود على حامل الأنابيب.
13. قم بقياس درجة الابتلاع (درجة التعكر) للبكتيريا بالسبكتروفوتومتر لجميع الأنابيب، وقم بتسجيل النتائج بالجدول في الصفحة 9.
14. ادخل الأنابيب للحوض ذو درجة حرارة C°37 مع الاهتزاز.
15. اضبط الساعة (TIMER) لـ 20 دقيقة وشغله.
16. ارمي أنابيب الابندورف مع السم الى سلة المهملات على طاولتك.
17. في الوقت المتبقي حتى القراءة التالية، قم بإعداد الأنابيب للتفاعل الأنزيمي وفقًا للتعليمات الموجودة في الصفحة 6.
18. عند سماعك رنين الساعة، قم بإخراج انابيب مجموعتك من الحوض المائي، وقم بقياس درجة الابتلاع للأنابيب بالسبكتروفوتومتر. قم بتسجيل النتائج بالجدول في الصفحة 9.
19. ارجع الأنابيب للحوض ذو درجة حرارة C°37 مع الاهتزاز، واضبط الساعة لـ 20 دقيقة وشغله.
20. في الوقت المتبقي حتى القراءة التالية رقّم الأنابيب لغسل البكتيريا كما هو موضح أدناه (الخطوات 1-2 من قسم "غسل البكتيريا").
21. عند سماعك رنين الساعة، قم بإخراج انابيب مجموعتك من الحوض المائي، وقم بقياس درجة الابتلاع للأنابيب بالسبكتروفوتومتر. قم بتسجيل النتائج بالجدول في الصفحة 9.
22. ارجع الأنابيب للحوض ذو درجة حرارة C°37 مع الاهتزاز، واضبط الساعة لـ 20 دقيقة وشغله.

23. عند سماعك رنين الساعة، قم بإخراج انابيب مجموعتك من الحوض المائي، وقم بقياس درجة الابتلاع للأنابيب بالسبكتروفوتومتر. قم بتسجيل النتائج بالجدول في الصفحة 9.

24. انقل الأنابيب إلى سلة الثلج.

غسل البكتيريا:

1. ضع 10 أنابيب ابندورف صغيرة في حامل الأنابيب.

2. رقم 5 أنابيب بالأحرف: **W0** حتى **W4**، و 5 أنابيب بالأحرف: **A0** حتى **A4** (أو **E0** حتى **E4** اعتمادا على السلالات التي تعمل بها). 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 10 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، تحقق لرؤية راسب بكتيري، وأدخلها لحامل الأنابيب بلطف.

8. اسكب السائل العلوي. **احرص على عدم سكب الراسب!** إذا لزم الأمر، قم بإزالة السائل العلوي مع الماصة المضبوطة لـ- 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 لـ- 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، وأدخلها لحامل الأنابيب بلطف.

15. اسكب السائل العلوي. **احرص على عدم سكب الراسب!** إذا لزم الأمر، قم بإزالة السائل العلوي مع الماصة المضبوطة لـ- 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 لـ- 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:

25. ضع 10 أنابيب ابندورف صغيرة **مع قفل** في حامل الأنابيب.
26. رقم 5 أنابيب بالأحرف: **W0** حتى **W4**، و 5 أنابيب بالأحرف: **A0** حتى **A4** (أو **E0** حتى **E4** اعتمادا على السلالات التي تعمل بها).
27. اضبط الماصة الأوتوماتيكية ذات مدى 1000µl ل- 900µl.
28. 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.

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

تنفيذ التفاعل الأنزيمي:

1. قم بإزالة ورق الألومنيوم من أنابيب التفاعل وانقلها من سلة الثلج إلى الصينية على طاولتك.
2. اضبط الماصة الأوتوماتيكية ذات مدى 100µl ل- 100µl.
3. امزج البكتيريا المغسولة في أنبوبة الابندورف **W0**، المتواجدة في سلة الثلج، بخفة بواسطة الماصة الأوتوماتيكية.
4. انقل 100µl من البكتيريا المغسولة **W0** لأنبوبة التفاعل المرقمة **W0**.
5. ارجع البكتيريا المغسولة لسلة الثلج.
6. **استبدل بتيب جديد!**
7. امزج البكتيريا المغسولة في أنبوبة الابندورف **W1**، المتواجدة في سلة الثلج، بخفة بواسطة الماصة الأوتوماتيكية.
8. انقل 100µl من البكتيريا المغسولة **W1** لأنبوبة التفاعل المرقمة **W1**.
9. ارجع البكتيريا المغسولة لسلة الثلج. **استبدل بتيب جديد!**

10. بنفس الطريقة، انقل البكتيريا من جميع الأنابيب إلى جميع أنابيب التفاعل. تأكد من تغيير تيب في كل مرة تستخدم فيها بكتيريا من أنبوب آخر.

11. اضبط الماصة الأوتوماتيكية ذات مدى 100µl ل- 50µl.

12. أضف لكل واحدة من أنابيب التفاعل 50µl كلوروفورم. (الكلوروفورم يزيد من الثقوب في غشاء الخلية ويحسن خروج الإنزيم من الخلية).

13. اقفل بسرعة و بشكل جيد كل أنبوبة بعد إضافة الكلوروفورم (الكلوروفورم سائل متطاير).

14. امزج خليط التفاعل جيدا بواسطة قلب الانبوبة وأيضا بواسطة جهاز الڤورتكس.

15. اضبط الساعة لـ 30 دقيقة.

16. 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 صحن القراءة:</u>

بشكل عام: ستحتاج إلى نقل كل من البكتيريا ومزيج التفاعل إلى صحن القراءة التي تحتوي على 96 حجيرة مرقمة. تأكد من حمل كل صحن 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**).

1. قم بترقيم الصحن ذات ال 96 حجيرة كما هو موضح في القائمة أدناه:

			0 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
			1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
OD600	W	**A**												
	W	**B**												
	A	**C**												
	A	**D**												
OD405	W	**E**												
	W	**F**												
	A	**G**												
	A	**H**												

نقل البكتيريا: <u>انتبه لإدخال السائل إلى مركز الحجيرة، بدون فقاعات</u>

2. اضبط الماصة الأوتوماتيكية ذات مدى 100µl ل- 100µl.
3. امزج البكتيريا المغسولة في أنبوبة الابندورف **W0** بلطف بواسطة جهاز الـفورتكس.
4. انقل 100µl من البكتيريا المغسولة للحجيرة A1 وللحجيرة B1 للحصول على 2 تكرارات.
5. استبدل بتيب جديد.
6. امزج البكتيريا المغسولة في أنبوبة الابندورف **W1** بلطف بواسطة جهاز الـفورتكس.
7. انقل 100µl من البكتيريا المغسولة للحجيرة A2 وللحجيرة B2 للحصول على 2 تكرارات، استبدل بتيب جديد.
8. بنفس الطريقة، انقل البكتيريا من جميع الأنابيب العشرة إلى الحجيرات المناسبة: من أنبوبة **W2** للحجيرات A3 و B3 للحصول على 2 تكرارات، من أنبوبة **W3** للحجيرات A4 و B4، إلخ. في نهاية النقل الحجيرات A1 حتى D5 يجب أن تكون مليئة بالبكتيريا من العينات المختلفة.

<u>نقل العينات من التفاعل الأنزيمي:</u>

9. 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.

<u>انتبهوا لإدخال السائل إلى مركز الحجيرة، بدون كلوروفورم وبدون فقاعات!</u>

10. انقل 100µl من كل واحدة من أنابيب التفاعل المرقمة بالأحرف- A أو W والأرقام 0،1،2،3،4، الى الحجيرات المناسبة بالصحن، في المنطقة المعلمة ب- OD405، في الصفوف الأربعة الأخيرة. (من أنبوبة W0 للحجيرات E1 وF1، من أنبوبة W1 للحجيرات E2 وF2، إلخ. في نهاية النقل الحجيرات E1 حتى H5 يجب أن تكون مليئة بمنتجات التفاعل الأنزيمي من العينات المختلفة).
11. 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:

زمن (دقائق)	W0	W1	W2	W3	W4
0					
20					
40					
60					

زمن (دقائق)	A0/E0	A1/E1	A2/E2	A3/E3	A4/E4
0					
20					
40					
60					