



**ניטור חומרים גנוטוקסיים באמצעות חיישנים ביולוגיים: ביוטק ניסוי מקדים**

**שימוש בחיידק E.coli מהונדס לניטור מזהמים.**

במעבדה זו תקבלו 3 זנים של החיידק E.coli שהונדסו לשמש כביו-סנסורים לחומרים העלולים לגרום נזקים ל DNA. לכל שלושת הזנים הוחדר פלסמיד ובו שני מרכיבים מרכזיים: **חייש וגן מדווח**. החייש הוא פרומוטור (אתר מקדם) המופעל כאשר יש הצטברות נזקים ב DNA ומערכת ה SOS של החיידק מופעלת; **הגן המדווח** מקודד לאנזים הנקרא: אלקלין פוספטאז, אנזים שאת פעילותו קל מאוד למדוד במעבדה. ארגון שני המרכיבים הללו בפלסמיד הוא כך שכאשר האתר המקדם מופעל (החייש מופעל), יש ביטוי לגן המדווח, ונוצר האנזים אלקלין פוספטאז.

**אלה: האם ניתן לאתר שכמות האלקלין פוספטאז הנוצרת תהיה ביחס ישיר לאיכות הנזק שנצרכה DNA? בחיידק?**

שניים מהזנים בהם נשתמש במעבדה הם בעלי מוטציות נוספות המגדילות את רגישות החיידקים למוזהמים סביבתיים. המוטציות הן מוטציות משני סוגים: סוג אחד, מוטציות המגדילות את החדירות הקרום של החיידק; סוג שני: מוטציות המשנות (מקטינות) את יכולת תיקון ה DNA של החיידק.

הגנוטיפים של הזנים עימם נעבוד הינם:

- **W** - זן הבר. כל הגנים תקינים.
- **E** - מוטנט הפגוע בגן המקודד לאחד ממרכיבי הקרום החיצוני של החיידק (ליפופוליסכאריד). העדר הליפופוליסכאריד מגדיל מאוד את חדירות קרום החיידק למולקולות גדולות יחסית.
- **A** - מוטנט הפגוע בגן הקשור לתיקון נזקים ב DNA: גן זה מקודד לחלבון המזהה פגמים במבנה המרחבי של ה DNA. חוסר תפקוד של החלבון מעלה באופן משמעותי את הרגישות של חיידקים אלו לנזקים ב DNA.

**אלה: מדוע חשוב להאזין את רגישות החיידקים המשנים כמיונסורים לחומרים מזהמים?**

במהלך המעבדה נבדוק את השפעתם של סוגים שונים של שני סוגי מזהמים על ביטוי הגן המדווח במוטנטים השונים.

**כל קבוצת תלמידים תבדוק השפעה של רעלן אחר על שלשת זני החיידקים.**

במהלך שעה של הדגרה של המוטנטים השונים בנוכחות ריכוזים שונים של מזהמים תמדדו את הצפיפות האופטית של התרביות השונות מידי 15 דקות. בתום שעה, תשטפו את החיידקים ותיקחו דוגמא מכל תרבית לבדיקת פעילות האנזים אלקלין-פוספטאז. פעילות האנזים תיבדק ע"י הוספה של סובסטרט מלאכותי, שקוף, בשם pNPP, שפירוקו נותן תוצר בצבע צהוב. תנאי הבדיקה הם בעודף גדול של pNPP כך שככל שכמות האנזים גדולה יותר, עוצמת הצבע הצהוב תהיה חזקה יותר.



**הכנת החיידקים:** זני החיידקים השונים מסומנים באותיות A, E, W ונמצאים בארלנמיירים באמבט המטלטל. לכל קבוצה 6 מבחנות המסומנות בפקקים בצבע שונה. זכור את צבע הפקקים של קבוצתך. לפניך במעמד 6 מבחנות זכוכית.

שים לב: לכל שתי מבחנות עליך להעביר חיידקים מזן אחר (סה"כ 3 זנים X 2 מכל זן).

1. סמן 3 מבחנות זכוכית בחלקה העליון של המבחנה מיד מתחת לפקק באותיות **W0, A0, E0** ו3 מבחנות באותיות **W1, A1, E1**.
2. ערבב קלות את החיידקים בארלנמייר המסומן W
3. העבר למבחנות W0 W1 5 מ"ל חיידקים מהארלנמייר המסומן W. רשום גם את שמך על אחת המבחנות.
4. ערבב קלות את החיידקים בארלנמייר המסומן A ו E.
5. העבר למבחנות E0 E1 5 מ"ל חיידקים מהארלנמייר המסומן E, ולמבחנות A0 A1 5 מ"ל חיידקים מהארלנמייר המסומן A.

הקפד לסמן את המבחנות במספר הזן המתאים. המעמד עם המבחנות יראה כך:

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

6. **בנוסף אני מבצעים הפקת חלבונים מהחיידקים**, כל קבוצה מפיקה מסוג חיידק אחד בלבד. סוג החיידק ממנו תפיקו רשום על הארלנמייר הקטן שעל מגשכם.
- לפי הרשום על הארלנמייר הקטן שעל שולחנך שלך, קח 20 מ"ל מחיידקים הרלוונטיים והעבר לארלנמייר קטן.

### הוספת הרעלן לחיידקים:

- על מגש העבודה נמצא הרעלן: **או** מי חמצן ( $H_2O_2$ ): 0.5 % ; או נלידיקסיק אסיד (NA) 2000 ppm
7. כוון פיפטור של  $100 \mu$  ל- 100 והלבש טיפ חדש.
  8. הוסף לכל אחת ממבחנות W1 ו A1 ו E1  $100 \mu$  מהרעלן במבחנה וערבב בווקטרס
  9. **במידה** והנך עובד **להפקת החלבונים** עם זן מטופל הוסף לארלנמייר  $400 \mu$  של הרעלן הרלוונטי. **תן את הארלנמייר למדריך לצורך הדגרה וטלטול לשעה**

**צנה, לאחר הקריאה של המבחנות בספקטרוסקופ (Fe 10-12) החיידקים (הן המבחנות והן הארלנמיירים) יודגרו בטמפרטורה של  $37^\circ C$  בנוכחות הרעלן:**



### קריאת עכירות החיידקים:

10. כוון את מכשיר הספקטרופוטומטר לאורך גם 600 ננומטר.
11. אפס את הספקטרופוטומטר בעזרת המבחנה המכילה מצע LB הנמצאת במעמד המבחנות
12. קרא את העכירות האופטית של החיידקים בכל 6 המבחנות, ורשום התוצאות בטבלאות רשום התוצאות בטבלא בעמוד 6
13. הכנס את כל המבחנות להדגרה ב-  $37^{\circ}\text{C}$  בטילטול.
14. כוון סטופר ל 20 דקות.
15. בזמן הנותר עד לקריאה הבאה הכן את המבחנות לביצוע הריאקציה האנזימטית ע"פ ההנחיות בעמוד 4.
16. עם השמע הצלצול הוצא את המבחנות עם החיידקים מהאמבט, וקרא את העכירות האופטית. רשום התוצאות בטבלא בעמוד 6.
17. כוון את הסטופר ל 20 דקות, והחזר את המבחנות לאמבט ב  $37^{\circ}\text{C}$  בטילטול.
18. בזמן הנותר עד לקריאה הבאה **סמן** את המבחנות לשטיפת החיידקים כמתואר בהמשך (סעיפים 1-2 בסעיף "שטיפת החיידקים")
19. עם השמע הצלצול הוצא את המבחנות עם החיידקים מהאמבט, וקרא את העכירות האופטית. רשום התוצאות בטבלא בעמוד 7
20. כוון את הסטופר ל 20 דקות, והחזר את המבחנות לאמבט ב  $37^{\circ}\text{C}$  בטילטול.
21. עם השמע הצלצול הוצא את המבחנות עם החיידקים מהאמבט, וקרא את העכירות האופטית. רשום התוצאות בטבלא בעמוד 7
22. העבר את מבחנות החיידקים לסל הקרח.
23. **קעת נתפנה לטפל בחיידקים הנמצאים בארלנמייארים סעיפים 24 - 39**
24. שאב את תוכן כל אחד מהארלנמייארים והעבר למבחנת 50 מ"ל עם הכיתוב התואם.
25. הביאו את המבחנה למדריך וסרכזו 5 min, 3000rpm.
26. הכינו מבחנת אפנדורף עם הכיתוב תואם.
27. הוציאו את המבחנה מהסרכוז, שאבו בעדינות עם פיפטה את הנוזל העליון וזרקו אותו לפח הביולוגי.
28. הוסיפו 1 מ"ל PBS, שברו את המשקע בעדינות ע"י פיפטציה. העבירו את התרחיף שנוצר למבחנת האפנדורף שהכנתם בסעיף 26. סגרו את המבחנה והביאו למדריך לסרכוז.
29. סרכזו את הדוגמא 5 min, 13,000.
30. הוציאו את המבחנה מהסרכוז, שאבו בעדינות עם פיפטה את הנוזל העליון וזרקו אותו לפח הביולוגי.
31. הוסיפו למבחנה 1 מ"ל SDS 5%. בצעו פיפטציה יסודית בלי הקצפה.
32. סרכזו את הדוגמאות 5 min, 13,000. במהלך הסרכוז הכינו שתי מבחנות אפנדורף חדשות עם כיתוב תואם.
33. העבירו את הנוזל לאחת ממבחנות האפנדורף החדשות שהכנתם.
34. מתוך הנוזל שהעברתם קחו  $20\ \mu\text{l}$  דגימה ושימו במבחנת האפנדורף השניה. הביאו את הדגימה שנתרה באפנדורף למדריך להקפאה.
35. הוסיפו למבחנה  $60\ \mu\text{l}$  של תמיסת sample buffer. ערבבו היטב



36. הרתיחו את המבחנה בפלטה של 95C ל 5 דקות.
37. הוציאו את המבחנה
38. בעזרת המדריך: הרכיבו את מערכת הגיל, הטעינו את הדוגמאות כולל סמן גודל ודוגמאת אנוים הפוספאטאז.
39. הריצו את הגיל.
40. בשלב זה חזרו לעבוד עם מבחנות החיידקים אשר שמתם בסל קרח בסעיף 22.

### שטיפת החיידקים:

1. העמד 6 מבחנות אפנדורף קטנות **רגילות** בתוך מעמד.
2. סמן את 3 מבחנות מבחנות בסימון: **W0,A0,E0** ו 3 מבחנות באותיות **W1,A1,E1**. מבחנות אלה ישמשו לשטיפת החיידקים בהמשך.
3. כוון פיפטור של 1000  $\mu$ ל - 900  $\mu$ ל
4. העבר 900  $\mu$ ל מכל תרבית חיידקים למבחנת האפנדורף **הרגילות** המסומנת בהתאמה. לדוגמא: העבר ממבחנת הזכוכית המסומנת ב-**W0** למבחנת אפנדורף המסומנת ב-**W0**; ממבחנה **W1** למבחנת אפנדורף **W1**, וכן הלאה.
5. העבר את מבחנות האפנדורף עם החיידקים לצנטריפוגה.
6. סרכז 5 דקות במהירות המקסימלית.
7. בתום הסירכוז, הוצא את מבחנות האפנדורף, בדוק שנראה בהן משקע, והכנס אותן למעמד המבחנות בעדינות.
8. שפוך את הנוזל העליון. **שימו לב לא לשפוך את המשקע!** במידת הצורך הוצא את הנוזל העליון עם פיפטור מכוון ל- 1000 מיקרוליטר, הישמר מלשאוב את משקע החיידקים.
9. הספג שאריות נוזל ע"י היפוך המבחנה על נייר סופג.
10. כוון פיפטור של 1000  $\mu$ ל - 500  $\mu$ ל
11. העבר 500  $\mu$ ל **מבופר מספר 1**, לכל אחת ממבחנות האפנדורף עם משקע החיידקים.
12. ערבב היטב בוורטקס את המשקע, עד להרחפת כל המשקע.
13. העבר את מבחנות האפנדורף עם החיידקים המרחפים לצנטריפוגה וסרכז 5 דקות במהירות מקסימלית.
14. בתום הסירכוז, הוצא את מבחנות האפנדורף, בדוק שנראה בהן משקע, והכנס אותן למעמד המבחנות בעדינות.
15. שפוך את הנוזל העליון. **שימו לב לא לשפוך את המשקע!** במידת הצורך הוצא את הנוזל העליון עם פיפטור מכוון ל- 1000 מיקרוליטר, הישמר מלשאוב את משקע החיידקים.
16. הספג שאריות נוזל ע"י היפוך המבחנה על נייר סופג.
17. כוון את הפיפטור של 1000 מיקרוליטר ל- 350  $\mu$ ל
18. העבר 350  $\mu$ ל **מבופר מספר 2**, לכל אחת ממבחנות האפנדורף.
19. ערבב היטב בוורטקס עד להרחפת כל המשקע.



20. הנח את המבחנות עם החיידקים המרחפים בסל הקרח.

21. התחל בביצוע התגובה האנזימטית (להלן)

#### הכנת מבחנות לביצוע הריאקציה האנזימטית:

41. העמד 6 מבחנות אפנדורף קטנות עם נעילה בתוך מעמד.
42. סמן את המבחנות בסימון: **W0,A0,E0** ו3 מבחנות באותיות **W1,A1,E1**.
43. כוון פיפטור של  $1000 \mu\text{l}$  ל-  $900 \mu\text{l}$
44. העבר  $900 \mu\text{l}$  ממבחנה המסומנת "בופר ריאקציה", לכל אחת מ- 6 מבחנות האפנדורף המסומנות עם הנעילה. **בוסר הריאקציה מכיל את הסוסטרט לאנזים אלקליין פוספטאז ואת הדטרנט SDS מחורר את קרואי החיידקים ומאפשר לאנזים לצאת מהתא.**
45. נעל היטב את פקקי המבחנות, הכנס אותן לסל הקרח וכסה אותם בגיליון של נייר כסף עד לשלב בו תשתמש בהן. **(התערובת רגישה לאור וצף כן יש לכסותה.)**

#### ביצוע התגובה האנזימטית:

1. הסר את נייר הכסף ממבחנות הריאקציה, והעבר אותן מסל הקרח למעמד שעל שולחןך.
2. כוון פיפטור של 100 מיקרוליטר לנפח של  $100 \mu\text{l}$ .
3. הרחף קלות את החיידקים השטופים שנמצאים בסל הקרח, במבחנה **W0** באמצעות הפיפטור.
4. העבר  $100 \mu\text{l}$  מהחיידקים השטופים **W0** למבחנת הריאקציה המסומנת **W0**.
5. החזר את החיידקים השטופים לסל הקרח.
6. **החלף טיפ!**
7. הרחף קלות את החיידקים השטופים במבחנה **W1** באמצעות הפיפטור.
8. העבר  $100 \mu\text{l}$  מהחיידקים השטופים **W1** למבחנת הריאקציה המסומנת **W1**.
9. החזר את החיידקים השטופים לסל הקרח. **החלף טיפ!**
10. העבר באותו אופן חיידקים מכל המבחנות לכל מבחנות הריאקציה. שים לב להחליף טיפ בכל פעם שתשתמש בחיידקים ממבחנה אחרת.
11. סגור את המבחנות והעבר בתוך המעמד למדריךך.
12. **למדריךך:** כוון פיפטור של 100 מיקרוליטר לנפח של  $50 \mu\text{l}$ .
13. עלה לקומה מעל למעבדות כימיה ובתוך ההוד הכימי הוסף לכל אחת מעשר מבחנות הריאקציה  $50 \mu\text{l}$  כלורופורם. **(הכלורופורם מדיף את החורים בקראס התא ומיצף את יציאת האנזים מהתא)**



14. נעל במהירות היטב כל מבחנה לאחר הוספת הכלורופורם (הכלורופורם נדיף).

15. החזר את המבחנות לתלמיד

16. ערבב את תערובת הראקציה היטב ע"י היפוך המבחנה ובעזרת הוורטקס.

17. כוון את הסטופר ל 30 דקות.

18. הכנס את מבחנות הריאקציה לאמבט של- 37°C. למשך 30 דקות. בזמן זה עליך להתחיל להכין את פלטת הקריאה (להלן).

19. לאחר סיום הכנת הפלטה, בדקו מה מצב הגיל. במידה וההרצה הסתיימה הוציאו בעזרת המדריך את הגיל. העבירו לקכרת פלסטיק והוסיפו 15 מ"ל קומאסי בלו (בקשו מהמדריך). המתינו 20 דק לפיתוח הגיל.

### הכנת פלטת קריאה

כאלי: יהיה עליך להעביר גם את רחיצת החיידקים השטופים וגם את צרובת הריאקציה לצלחות שבהן 96 באריות ממוספרות. הקפד להחזיק כל צלחת בשוליה ולא לצאת בתחתיתה.

**הקפד לקחת את הדואמאות מהפאזה הצליונה fe המבחנה! הפאזה התחתונה עכורה והדבר מפריע לקריאת עוצמת הצבע.**

אחרי העברת הדוגמאות, תוכל לקרוא את הבליעה בעזרת ספקטרוטומטר מיוחד (**Microplate Reader**).

1. סמן את פלאטת 96 הבאריות כפי שמצוין ברישום להלן:

			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													

### **העברת החיידקים:**

2. כוון פיפטור של 100 מיקרוליטר לנפח של 100 µl

3. ערבב את החיידקים השטופים במבחנה W0 בעדינות בוורטקס



4. העבר  $100 \mu\text{g}$  מהחיידקים לבארית A1 ולבארית B1 לקבלת 2 חזרות. החלף טיפ.
5. ערבב את החיידקים השטופים במבחנה W1 בעדינות בוורטקס
6. העבר  $100 \mu\text{g}$  מהחיידקים לבארית A4 ולבארית B4 לקבלת 2 חזרות; החלף טיפ.
7. העבר באותו אופן חיידקים מכל 7 המבחנות לבאריות המתאימות ע"פ הרשום בטבלה לבאריות A1 עד B6

**העברת דגימות מהריאקציה האנזימטית:**

8. בתום 30 דקות (עם השמע צלצול השעון) הוצא את מבחנות האפנדוף (עם הנעילה) של קבוצתך מהאמבט, נגב אותן היטב והבא אותן לשולחן העבודה.

**קפד לקחת את הדואמאות מהפאזה הצ'ינה! הפאזה התחתונה צכורה והדבר מפריע לקריאת עוצמת הצ'י.**

9. העבר  $100 \mu\text{g}$  מכל אחת ממבחנות הריאקציה המסומנת לאזור המסומן ב- OD405, (ממבחנה W0 לבאריות E1 וF1; ממבחנה W1 לבאריות E2 וF2) וכ"י.
10. בתום ההעברה באריות E1 עד 6F אמורות להיות מלאות בתוצרי הריאקציה האנזימטית מהדגימות השונות).
11. בעזרת המדריך, קרא במכשיר ELISA את הבליעה באורך גל של 405 ננומטר ואחר כך קרא באורך גל 600 ננומטר. לאחר הקריאה תקבל שני דפים: בדף האחד יהיו תוצאות הקריאה באורך גל 405 והשני הקריאה באורך גל 600.

**העברת נתונים לקובץ אקסל**

העתק את קריאת ה- OD באורך גל 600 ו 405 לקובץ האקסל, למיקום הרלוונטי (יש סימון לכל אחד מאורכי הגל).

**טבלה למדידת עכירות החיידקים (O.D.) עם וללא רעלן:**

W0	A0	E0	W1	A1	E1	זמן (דקות)
						0
						20
						40



						60
--	--	--	--	--	--	----