



ויסות גנים – אופרון הלקטוז - קינטיקה

רקע תאורטי: "גנטיקה", יהודית עתידיה, 2004, עמ' 170 – 175

הגנים המבניים המרכיבים את אופרון הלקטוז הינם:

1. גן המקודד לאנזים ביתא-גלקטוזידאז, שפעילותו היא פרוק הלקטוז לחד-סוכרים גלוקוז וגלקטוז, (מהם מפיק החידק אנרגיה בתהליכי הנשימה התאית).
2. גן המקודד לחלבון פרמאז שהוא נשא המאפשר את כניסת הלקטוז לתא דרך קרום התא הבררני.
3. גן המקודד לחלבון טרנסאצטילאז שתפקידו המדויק במטבוליזם של הלקטוז איננו ברור.

רקע לנעשה במעבדה:

במהלך הניסוי אנו מעוניינים לעקוב אחר רמת הביטוי של הגנים של אופרון הלקטוז בחיידקי *E. coli* בתנאים שונים - במצעי

גידול שונים. אילו היינו רוצים לבדוק את העלייה ברמת ביטוי הגנים באופן ישיר, היינו צריכים להפיק מהחיידקים RNA

ו"לספור" כמה מולקולות RNA שליו של אופרון הלקטוז נוצרו בכל אחד מהתנאים. מאחר והדבר מסובך לביצוע, אנחנו

נעקוב אחר פעילות האנזים ביתא-גלקטוזידאז. פעילות זו אמורה לבטא את מידת התעתוק של האופרון.

שימו לב – אנחנו מניחים (על סמך מחקרים שנעשו) שמרגע שה-mRNA נוצר, החומרים שבמצע (לקטוז, גלוקוז או IPTG)

אינם משפיעים על קצב התרגום או על פעילות האנזים. מכאן שאם תראה עליה בפעילות האנזים, עליה זו נובעת מעליה בתעתוק הגן, שמביאה ליצירת כמות גדולה יותר של מולקולות אנזים, ולכן לעליה בפעילות האנזים. עליה בפעילות האנזים משמעה עליה בכמות התוצר.

המצע בו גדלים החיידקים נקרא: מצע עני. מצע זה מכיל סוג אחד של מולקולה אורגנית: נתרן-סוקצינט, ומספר מלחים המספקים לחיידק את כל היסודות הכימיים הנחוצים לו לבניית התרכובות השונות. המולקולה האורגנית המשמשת כמקור פחמן איננה סוכר, ואיננה מקור אנרגיה מיטבי. במצע זה החיידקים מתרבים לאט מאוד. משך הניסוי, הנמשך 60 דקות, הוא בערך זמן הדור של התרבית במצע זה.

במהלך הניסוי תוכלו לבדוק את השינוי במספר החיידקים ואת מידת ביטוי האנזים ביתא-גלקטוזידאז בתנאי הגידול

השונים, כאשר מוסיפים למצע העני תוספות שונות:

לקטוז – המשמש כמשרן (אינדוסר) של הגנים של האופרון, וגם כסובסטרט של האנזים ביתא-גלקטוזידאז.

גלוקוז – המדכא את תעתוק הגנים של האופרון.

IPTG – משרן שאיננו סובסטרט לאנזים: ה IPTG הוא חומר בעל דמיון מבני ללקטוז. הדמיון ללקטוז מאפשר ל IPTG

להקשר לדכאן (רפרסור) של אופרון הלקטוז ולשמש כמשרן (אינדוסר). כלומר בנוכחותו אמור להיות ביטוי הגנים של האופרון. מאידך, חומר זה לא מזוהה כסובסטרט ע"י האנזים ביתא-גלקטוזידאז, ולכן איננו עובר פירוק, ולא משמש כמקור פחמן ואנרגיה.



במהלך הניסוי, הנמשך 60 דקות, תבדקו כל רבע שעה שני פרמטרים:

- א. מספר החיידקים. מספר זה יחושב על סמך מדידת הצפיפות האופטית של התרבית.
- ב. פעילות האנזים ביתא-גלקטוזידאז.

על מנת למדוד בקלות את פעילות האנזים, אני מספקים לו סובסטרט שהתוצר שלו הוא חומר בעל צבע. הסובסטרט הניתן במעבדה הוא סובסטרט מלאכותי שמפורק ע"י האנזים. הסובסטרט נקרא ONPG (o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside). הסובסטרט מרכב ממולקולת גלקטוז אליה חוברה מולקולה בשם ONP (o-nitrophenol). הסובסטרט הלא מפורק-ה-ONPG הוא חומר **חסר צבע**. לאחר שהאנזים ביתא גלקטוזידאז מפרק את ה-ONPG, מתקבל ONP שהוא חומר בצבע **צהוב**. (ראו סכמה בתחתית העמוד).

מאחר שתנאי הריאקציה במעבדה תוכננו כך שיש עודף גדול של סובסטרט, וזמן הריאקציה מוגבל, הגורם המגביל את קצב הריאקציה בתנאים אילו הוא כמות האנזים. כלומר: ככל שיש יותר מולקולות של אנזים, כך הן יפרקו יותר מולקולות של סובסטרט ביחידת זמן, וכך נקבל יותר תוצר, כלומר - יותר צבע צהוב. את עוצמת הצבע הצהוב ניתן לקרוא בקורא אופטי. על מנת לבדוק את כמות האנזים ביתא-גלקטוזידאז שנוצרה בתאי החיידק במהלך הגידול, תיקחו בכל רבע שעה דגימה מתרבית החיידקים, ובדגימה זו תבדקו את כמות האנזים שנוצר.

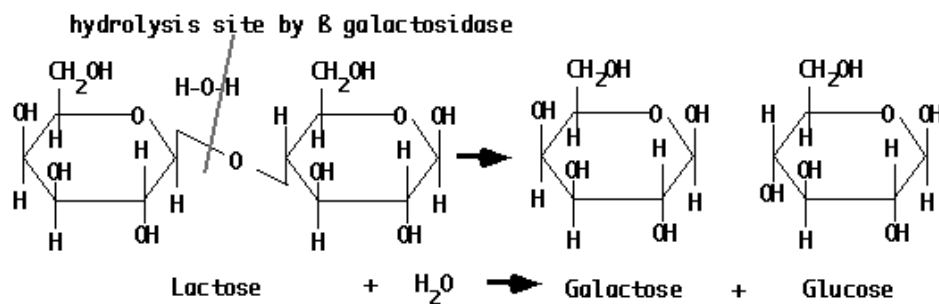
הסובסטרט המלאכותי - ONPG איננו יכול לחדור דרך קרום התא. ולכן, על מנת לבדוק את פעילות האנזים עלינו לפרק את קרומי החיידקים ולאפשר לאנזים לצאת אל מחוץ לתא. לשם כך מוסיפים לתרבית החיידקים בופר המכיל SDS (דטרגנט) וכלורופורם (ממס אורגני) הממיסים את קרום התא של החיידקים. תכולת התאים, יחד עם האנזים ביתא-גלקטוזידאז "נשפכת" לתמיסה. להעברת האנזים אל מחוץ לתא יתרון נוסף: כאשר האנזים מחוץ לתא החיידק, ניתן להיפטר מהדפנות ומשאריות התאים ע"י השקעה בצנטריפוגה, כך שהקריאה של עוצמת הצבע הצהוב לא תושפע מעכירות שנגרמת ע"י דפנות החיידקים ושאריות תאי החיידקים.

קביעת ריכוז התוצר שנוצר: כדי לתרגם את עוצמת הצבע הצהוב לריכוז ONP, יש להיעזר בעקום כיוול שיוכן ע"י מדידת בליעתן של תמיסות ONP בריכוזים ידועים. על סמך התוצאות ניתן לחשב את כמות ה-ONP ביחידות של מיקרומולר ONP שיוצר במשך 10 דקות (זמן ההדגרה של הדוגמאות עם הסובסטרט ONPG).

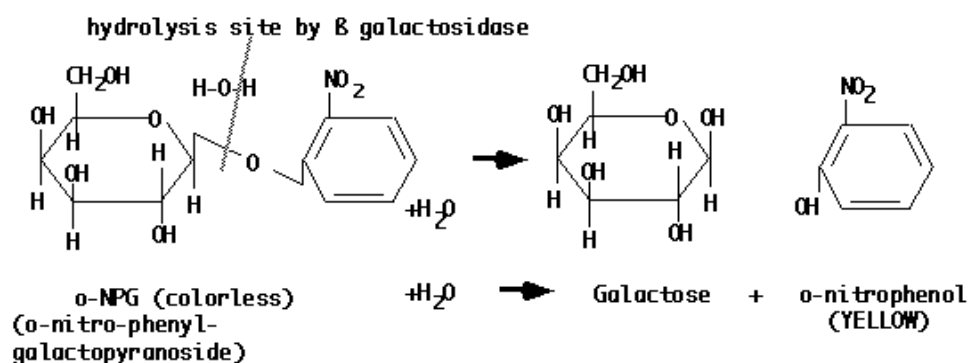
חישוב כמות התוצר לחיידק: חשוב לזכור שאם יש הבדל במספר החיידקים בין הדוגמאות השונות יתקבל הבדל במידת פעילות האנזים, הבדל שאיננו קשור למידת פעילות האופרון. (במקרה של תעתוק שווה של האופרון, מיליון חיידקים ייצרו כמות כפולה של אנזים מחצי מיליון חיידקים). לכן את התוצאה הסופית של ריכוז ה-ONP יש לחלק במספר החיידקים בדוגמא.



איור 1: תגובת פירוק הלקטוז ע"י האנזים ביתא-גלקטוזידאז:



איור 2: תגובת פירוק הסובסטרט המלאכותי ONPG ע"י האנזים ביתא-גלקטוזידאז:





תקציר העבודה המעשית:

1. הכנת מבחנות עם החומרים הממסים את קרומי החיידקים.
2. מדידת זמן 0 (זמן תחילת הניסוי) – מדידת עכירות התרביות והוצאת דוגמא למדידת פעילות ביתא-גלקטוזידאז.
3. הכנת התרביות בתנאים השונים (הוספת החומרים על פי הכתוב בפרוטוקול של כל קבוצה).
4. כל 15 דקות, מדידת עכירות התרביות והוצאת דוגמא למדידת פעילות ביתא-גלקטוזידאז.
5. אחרי 60 דקות – הוספת הסובסטרט המלאכותי, הדגרה של 10 דקות לשם ביצוע הריאקציה האנזימטית, והפסקת הריאקציה ע"י הוספת נתרן-קרבונט (המביא את התמיסה ל- $\text{pH}=11$ הגורם להפסקת פעילות האנזים ומאפשר את התפתחותו של צבע צהוב אופייני ל- ONP בסביבה בסיסית).
6. קריאת עוצמת הצבע בדוגמאות השונות + עקום כיול.
7. חישוב סופי והשוואת פעילות האנזים בתנאים השונים.