



ויסות גנים – אופרון הלקטוז – זיהוי גנוטיפ

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 מפיך 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:

במעבדה זו תקבלו ארבעה זנים של החיידק *E. coli*. זן אחד שבו כל הגנים תקינים, והוא נקרא "זן הבר" ושלושה זנים הפגועים בגנים שונים של אופרון הלקטוז (מוטנטים). הגנוטיפים של הזנים השונים הינם:

- זן הבר. כל הגנים תקינים.
 - מוטנט הפגוע בגן לדכאן (רפרסור) בלבד.
 - מוטנט הפגוע בגן לאנזים ביתא-גלקטוזידאז בלבד.
 - מוטנט הפגוע בגן לחלבון פרמאז בלבד.
- הזנים מסומנים במספרים 1-4 (מיספור הזנים השונים, אקראי).

מטרת המעבדה: זיהוי הגנוטיפ של כל אחד מהזנים.

על מנת לאפשר את זיהוי המוטנטים השונים, במהלך הניסוי, תגדלו את החיידקים במצעים עם תוספות שונות: מצע עני ללא תוספת; מצע בתוספת לקטוז; מצע בתוספת גלוקוז; מצע בתוספת IPTG.

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 45 דקות, הוא פחות מזמן הדור של התרבית במצע זה.

מצע עני בתוספת לקטוז – לקטוז משמש כמשרן (אינדוסר) של הגנים של האופרון, וגם כסובסטרט של האנזים ביתא-גלקטוזידאז. הלקטוז משמש כמקור פחמן וכמקור אנרגיה לחיידק.

מצע עני בתוספת גלוקוז – גלוקוז מדכא את תעתוק הגנים של האופרון, אך יכול לשמש בעצמו כמקור פחמן וכמקור אנרגיה.

הן הגלוקוז והן הלקטוז חודרים לתא באמצעות נשאים. הפרמאז הוא הנשא ללקטוז.

מצע עני בתוספת IPTG (או TMG) – בהעדר לקטוז, יכול תעתוק האופרון להיות מושרה על ידי חומרים בעלי דמיון מבני ללקטוז. אחד החומרים הללו הוא הדו סוכר IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) משרן שאיננו סובסטרט לאנזים. כאמור, 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 וכמקור אנרגיה. בניגוד ללקטוז, IPTG יכול לחזור לתא החיידק גם בהעדר החלבון הנשא- הפרמאז.



לאחר 45 דקות הדגרה במצעים השונים תבדקו את ביטוי הגנים של אופרון הלקטוז בתרביות השונות.

כיצד נמדדת רמת ביטוי הגנים?

אילו היינו רוצים לבדוק את העלייה ברמת ביטוי הגנים באופן ישיר, היינו צריכים להפיק מהחידקים RNA ו"לספור" כמה מולקולות RNA שליח 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.

כיצד נמדדת פעילות האנזים ביתא-גלקטוזידאז?

רמת פעילות האנזים ביתא-גלקטוזידאז תיבדק בכל הדגימות לאחר תום ההדגרה של 45 דקות. 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 ממוקלות 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).

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

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



תקציר העבודה המעשית:

1. הכנת התרביות בתנאים השונים (הוספת החומרים על פי הכתוב בחוברת).
2. הכנת מבחנות עם החומרים הממסים את קרומי החיידקים.
3. הכנת המבחנות לבניית עקום הכיול.
4. אחרי 45 דקות – מדידת הצפיפות האופטית של התרביות.
5. לקיחת דוגמא מכל תרבית לבדיקת פעילות האנזים ביתא-גלקטוזידאז. הוספת הסובסטרט המלאכותי, הדגרה של 10 דקות לשם ביצוע הריאקציה האנזימטית, והפסקת הריאקציה ע"י הוספת נתרן-קרבונט (המביא את התמיסה ל-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 פעילות האנזים לחיידק.
8. זיהוי המוטנטים השונים ע"פ מידת השריית ייצור האנזים ביתא-גלקטוזידאז במצעים השונים.

