



ויסות גנים - אופרון הלקטוז

על השולחן מצויות שלוש המבחנות של קבוצתך, אותן תזהה לאורך הניסוי לפי צבע המכסה, לכל קבוצה צבע **שונה**. המבחנות מכילות תרבית חיידקי *E.coli* שלהם אופרון-לקטוז תקין (זן-בר) שנזרעו לפני תחילת המעבדה. שלוש המבחנות יעברו טיפולים שונים במהלך הניסוי:

מבחנה A : מכילה מצע עני ובו מקור הפחמן מוגבל לסודיום סוקצינט. כמו כן, מכיל המצע את המלחים המתאימים.

מבחנה B : מכילה אותו המצע כמו מבחנה A. לתרבית החיידקים במבחנה זו תוסיף לקטוז.

מבחנה C : מכילה אותו המצע כמו מבחנות A ו-B. לתרבית החיידקים במבחנה זו תוסיף כל קבוצה חומר שונה :

קבוצה א' תוסיף IPTG

קבוצה ב' תוסיף IPTG+גלוקוז

קבוצה ג' תוסיף גלוקוז

קבוצה ד' תוסיף גלוקוז+לקטוז

במשך 60 דקות, במרווחי זמן של 15 דקות, תאמוד את מספר החיידקים במבחנות באמצעות מדידת הצפיפות האופטית של התרבית. בנוסף, 0.5 מ"ל מהתרבית ישמש לקביעת פעילותו של האנזים ביתא-גלקטוזידאז ע"י מדידת ריכוז התוצר הצבעוני של פעילות האנזים באמצעות מדידת הבליעה האופטית של התמיסה בה מתרחשת התגובה. תרגום קריאות הבליעה האופטית ליחידות של ריכוז התוצר יעשה בעזרת עקום כיוול. הראקציה תבצע על סובסטרט מלאכותי שיוסף לדוגמאות החיידקים ונקרא ONPG (אורטו-ניטרו-פניל-גלקטוזיד). תוצר הפרוק של סובסטרט זה הוא החומר ONP (אורטו ניטרו פנול) שהוא בעל צבע צהוב חזק וניתן למדידה אופטית.

לכל הניסויים הנערכים במעבדה ארבעה חלקים:

I: גידול החיידקים

בחלק זה יגודלו החיידקים, תאספנה הדוגמאות מהזמנים השונים, יערך אומדן צפיפות אופטית והתאים יוכנו למדידת רמת האנזים ביתא-גלקטוזידאז.

הערך: OD_{600} הניסוי ה'ינו כזמן דור אחד OD_{600} החיידקים בתנאים אלו, ולכן אין צרכות להקדיש מדויק בקצב ה'דיף בין המצבים השונים.

II: הכנת עקום כיוול של ONP

יוכנו דוגמאות המכילות ריכוזים ידועים של ONP על מנת לבנות עקום כיוול.

III: ביצוע הראקציה האנזימטית

תבצע הראקציה האנזימטית של האנזים ביתא-גלקטוזידאז על הסובסטרט ONPG.

IV: קריאת תוצאות הניסוי

בחלק זה יימדד ריכוז ה-ONP שנוצר בריאקציה האנזימטית בדוגמאות השונות



מהלך הניסוי:

הכנה מוקדמת של מבחנות אפנדורף לביצוע הריאקציה האנזימטית:

1. העמד 15 מבחנות אפנדורף קטנות עם נעילה כפולה בתוך מעמד בשלוש שורות של 5 מבחנות. שים לב לצבע המבחנות שקיבלת.
2. הכנס את המעמד לקרח, לקערה המלבנית.
3. סמן שורה אחת (על המכסה) כך: A0, A1, A2, A3, A4.
4. סמן את השורה השנייה (על המכסה) כך: B0, B1, B2, B3, B4.
5. סמן את השורה השלישית (על המכסה) כך: C0, C1, C2, C3, C4.
6. כוון את הפיפטור של 1000 (כחול) ל- 300 מיקרוליטר. הלבש טיפ כחול.
7. הוסף לכל מבחנות האפנדורף המסומנות 300 מיקרוליטר של בופר המסה. זרוק את הטיפ לשקית.
8. כוון את הפיפטור של 100 (סגול/צהוב) ל-100 - הלבש טיפ לבן.
9. הוסף לכל המבחנות 100 מיקרוליטר של כלורופורם. זרוק את הטיפ.
10. כוון את הפיפטור של 100 (סגול/צהוב) ל- 50 והלבש טיפ לבן.
11. הוסף לכל אחת מהמבחנות 50 מיקרוליטר של SDS (דטרגנט). זרוק את הטיפ.

אתה מכילות המבחנות בופר SDS וכאורופורם שמטרתו להמיס את קרומי תאי החידקים כדי לשחרר את האנזימים לתוך הנוזל! לתוך מבחנות אלו תוכנסה במהלך המעבדה דואמאות של 0.5 מ"מ תרבית חיידקים לצידת פצילות האנזים.

חלק I: גידול החידקים

1. מדידת הצפיפות האופטית בזמן אפס:

הצרה כאלית: לפניך במצמד מבחנה המסומנת 0. מבחנה זו מכילה מצצ צני ותשמע לאיפוס הספקטרופוטומטר לצורך מדידת הצפיפות האופטית של תרביות החידקים. אף תשכך את תוכן המבחנה.

- א. הכנס את מבחנה 0 לספקטרופוטומטר ואפס את הספקטרופוטומטר באורך גל של 660 ננומטר. במצב זה תוכל למדוד את העכירות בדוגמאות.
לפניך 3 מבחנות של חיידקים במצע דל.
- ב. ערבב את מבחנה A בוורטקס וקרא את הצפיפות האופטית. *אם הקריאה נמוכה מ-0.04 - קרא למדריך!*
רשום את התוצאה בטבלה המתאימה בקובץ שבמחשב.



- ג. ערבב את מבחנה B בוורטקס וקרא את הצפיפות האופטית. רשום את התוצאות בטבלה המתאימה בקובץ שבמחשב.
- ד. ערבב את מבחנה C בוורטקס וקרא את הצפיפות האופטית. רשום את התוצאות בטבלה המתאימה בקובץ שבמחשב.

2. הכנת דוגמאות החידקים למדידת פעילות האנזים ביתא-גלקטוזידאז:

- א. כוון את הפיפטור של 1000 מיקרוליטר (כחול) ל- 500 והלבש טיפ כחול חדש.
- ב. העבר $500\mu\text{l}$ חיידקים ממבחנה A למבחנת האפנדורף המסומנת A0.
- ג. העבר $500\mu\text{l}$ חיידקים ממבחנה B למבחנת האפנדורף המסומנת B0.
- ד. העבר $500\mu\text{l}$ חיידקים ממבחנה C למבחנת האפנדורף המסומנת C0.
- ה. סגור היטב את המבחנות.
- ו. ערבב בוורטקס כמה שניות את שלוש מבחנות האפנדורף ושים אותן במעמד הנתון בקרח בקערה המרובעת. דוגמאות אלה תשמשנה לקביעת הפעילות של האנזים ביתא-גלקטוזידאז בחלק III של המעבדה.

3. הוספת החומרים השונים למבחנות B ו-C:

- א. הוסף למבחנות השונות את החומרים המתאימים לפי הפירוט שלהלן:
- מבחנה A – אל תוסיף דבר.
- מבחנה B – הוסף $100\mu\text{l}$ לקטוז.
- מבחנה C – הוסף אחד החומרים הבאים:
- קבוצה א' תוסיף $100\mu\text{l}$ IPTG.
- קבוצה ב' תוסיף $100\mu\text{l}$ IPTG + $100\mu\text{l}$ גלוקוז.
- קבוצה ג' תוסיף $100\mu\text{l}$ גלוקוז.
- קבוצה ד' תוסיף $100\mu\text{l}$ גלוקוז + $100\mu\text{l}$ לקטוז.
- ערבב את המבחנות בוורטקס.
- ב. הכנס את שלוש המבחנות לאמבט המטלטל והפעל את השעון ל-15 דקות.

4. לקיחת דוגמא של זמן 1 (אחרי 15 דקות מרגע הכנסת המבחנות לאמבט המטלטל):

- א. עם השמע צלצל השעון, הוצא את שלוש המבחנות של קבוצתך, נגב אותן היטב והבא אותן למקום עבודתך.
- ב. קרא את הצפיפות האופטית בשלוש המבחנות, ורשום את התוצאות בטבלה המתאימה במחשב.
- ג. העבר $500\mu\text{l}$ חיידקים ממבחנה A למבחנת האפנדורף המסומנת A1.
- ד. העבר $500\mu\text{l}$ חיידקים ממבחנה B למבחנת האפנדורף המסומנת B1.



- ה. העבר $500\mu\text{l}$ חיידקים ממבחנה C למבחנת האפנדורף המסומנת C1.
- ו. סגור היטב את המבחנות.
- ז. ערבב בוורטקס כמה שניות את שלוש מבחנות האפנדורף ושים אותן במעמד הנתון בקרח בקערה המרובעת. דוגמאות אלה תשמשנה לקביעת הפעילות של האנזים ביתא-גלקטוזידאז בחלק III של המעבדה.
- ח. החזר את שלוש המבחנות לאמבט המטלטל והפעל את השעון ל-15 דקות.

5. לקיחת דוגמא של הזמן הבא (אחרי 15 דקות מרגע החזרת המבחנות לטילטול):

בזמן זה (30 דקות) ובשני הזמנים הבאים (45 ו-60 דקות) חזור בדיוק על ביצוע ההוראות הכתובות בסעיף 4 א-ח. שים לב שסימון המבחנות שונה בזמנים השונים (עליך לקחת בסך הכל 5 דוגמאות מכל אחת משלוש המבחנות). בזמן הפנוי בצע את חלק II (הכנת עקום כיוול של ONP אורטו-ניטרו-פנול, התוצר הצהוב של פעולת האנזים על ONPG).

חלק II : הכנת עקום כיוול של ONP

- א. סמן 5 מבחנות אפנדורף שקופות במספרים 1-5.
- ב. הוסף למבחנות אלה את החומרים הרשומים בטבלה שלהלן:

| מספר מבחנה | תמיסה 10 (בופר פוספט) במיקרוליטרים | תמיסה 9 (ONP) במיקרוליטרים | תמיסה 6 (בופר קרבונט) במיקרוליטרים | ריכוז ONP במיקרומול/ליטר |
|------------|------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 1 | 1150 | 0 | 100 | 0 |
| 2 | 900 | 250 | 100 | 200 |
| 3 | 650 | 500 | 100 | 400 |
| 4 | 400 | 750 | 100 | 600 |
| 5 | 150 | 1000 | 100 | 800 |

- ג. ערבב את המבחנות בוורטקס מספר שניות. השאר מבחנות אלה בינתיים בצד במעמד. חזור לחלק I.



חלק III: מדידת פעילות האנזים ביתא-גלקטוזידאז

1. הכנת מבחנות יחוס (Reference):

א. לשתי מבחנות קטנות ונקיות הוסף את החומרים הרשומים להלן, תוך שאת/ה מחליף טיפ בין החומרים השונים וזורק את הטיפים המשומשים לפח כללי:

300 מיקרוליטר של תמיסה מספר 1 (בופר המסה)

500 מיקרוליטר של מצע עני

100 מיקרוליטר של תמיסה מספר 2 (כלורופורם)

50 מיקרוליטר של תמיסה מספר 3 (SDS)

ב. סגור היטב וערבב מספר שניות בוורטקס.

ג. סמן באות R וצרף למעמד שבקערה המרובעת (בקרר).

לפניך תהיינה 15 מבחנות אפנדורף מכל שלבי הניסוי + 2 מבחנות R.

2. פירוק התאים:

א. ערבב את תוכנן של כל המבחנות הקטנות, שבמעמד הנתון בקרר, בוורטקס במשך כ - 10 שניות.

ב. שים את המבחנות (כולל מבחנות הייחוס) במעמד עגול המסוגל לצוף ("סירה").

ג. העבר את המעמד לאמבט של 42 מעלות, למשך 5 דקות.

3. ביצוע התגובה האנזימטית:

א. כוון את הפיפטור של 1000 מיקרוליטר (כחול) ל - 200 מיקרוליטר והלבש טיפ כחול.

ב. הוצא את המעמד מהאמבט, הוסף לכל המבחנות (כולל מבחנות הייחוס) 200 מיקרוליטר של תמיסה מס' 5

(ONPG - סובסטר שתוצר הפרוק שלו צהוב).

ג. סגור היטב וערבב בוורטקס כ - 10 שניות.

ד. סדר את המבחנות בסירה ושים באמבט בטמפרטורה של 42⁰c למשך 10 דקות.

4. הפסקת התגובה האנזימטית (לאחר 10 דקות ההזגרה):

א. כוון את הפיפטור של 100 מיקרוליטר (סגול/צהוב) ל - 100 והלבש טיפ צהוב.

ב. הוסף מיד לאחר ההזגרה 100 מיקרוליטר של תמיסה מס' 6 (בופר קרבונט). גם למבחנות הייחוס! אם יש משקע

בבקבוקון – קח 100 מיקרוליטר מהנוזל העליון.

ג. בעזרת המדריך, סרכז את המבחנות במשך 3 דקות בטמפ' החדר, במהירות 14000 סל"ד.



חלק IV: מדידת ריכוז ה-ONP בדוגמאות השונות:

כללי: יהיה עליך להעביר את הנוזל הצליון של הדוגמאות לצלחות שבהן 96 באריות ממוספרות. הקפד להחזיק כל צלחת בשוליה ולא לנצת בתחתיתה. אחרי העברת הדוגמאות, תוכל לקרוא את הבליעה בצורת ספקטרופוטומטר מיוחד (Microplate Reader).

הקפד לקחת את הדוגמאות מהפאזה הצליונה של המבחנה! הפאזה התחתונה עכורה והדבר מפריע לקריאת עוצמת הבליעה.

- א. כוון את הפיפטור של 1000 מיקרוליטר (כחול) ל-200 מיקרוליטר והלבש טיפ כחול.
- ב. העבר 200 מיקרוליטר מהפאזה העליונה של מבחנה A0 לבארית מספר A1 ולבארית מספר B1, לקבלת 2 חזרות.
- ג. החלף טיפ, והעבר 200 מיקרוליטר מהפאזה העליונה של מבחנה A1 לבארית מספר A2 ולבארית מספר B2, לקבלת 2 חזרות.
- ד. המשך להעביר דוגמאות של 200 מיקרוליטר מכל אחת ממבחנות הניסוי לבאריות המתאימות, על פי התרשים המצורף.
- ה. העבר 200 מיקרוליטר ממבחנת הייחוס R1 ל-5 הבאריות A9-A12.
- ו. העבר 200 מיקרוליטר ממבחנת הייחוס R2 ל-5 הבאריות B9-B12.
- ז. העבר 200 מיקרוליטר מהמבחנות שהכנת בחלק II (לעקום כיוול) לבאריות G8-H12, על פי התרשים.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|----|----|----|----|----|---|---|---|----|----|----|----|
| A | A0 | A1 | A2 | A3 | A4 | | | | R1 | R1 | R1 | R1 |
| B | A0 | A1 | A2 | A3 | A4 | | | | R2 | R2 | R2 | R2 |
| C | B0 | B1 | B2 | B3 | B4 | | | | | | | |
| D | B0 | B1 | B2 | B3 | B4 | | | | | | | |
| E | C0 | C1 | C2 | C3 | C4 | | | | | | | |
| F | C0 | C1 | C2 | C3 | C4 | | | | | | | |
| G | | | | | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| H | | | | | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

ח. בעזרת המדריך, קרא במכשיר ELISA את הבליעה באורך גל של 406 ננומטר.



לאחר הקריאה תקבל מחשב אליון אקסל ובו תוצאות הקריאה, ומתחתן התוצאות המחושבות לאחר הפחתת התוצאה של מבחנות היחוס. בהמשך הדף יופיע צקוט הכיול שנבנה על פי המבחנות שהכנת, ואת חישוב ריכוז ה-ONP בכל אחת מהבאריות.

ט. הכנס את ריכוזי ה-ONP לטבלה המתאימה בקובץ שבמחשב. במידה ומפיע הערך >840.000 הכנס לטבלה את הערך 840.

בטבלה שמתחת לטבלה שמילאת חושב כבר ריכוז ה-ONP ל- 10^7 חיידיקים, ונתוני אילו מבוטאים בצורה גרפית בצד התחתון.
הצבר את נתוני צכירות החיידיקים מהטבלה בצמוד 4 ואת תוצאות הריאה ממכשיר ה-ELISA אליון סיכום הנתונים הנמצא על המחשב בצמדת הצמודה.