



אופרון הלקטוז – זיהוי מוטנטים

במעבדה זו תקבלו 4 זנים של החיידק *E. coli*. שלושה מהזנים פגועים בגנים שונים של אופרון הלקטוז. הגנוטיפים של הזנים הינם:

- זן הבר. כל הגנים תקינים.
- מוטנט הפגוע בגן לדכאן (רפרסור) בלבד.
- מוטנט הפגוע בגן לאנזים ביתא-גלקטוזידאז בלבד.
- מוטנט הפגוע בגן לפרמיאז בלבד (פרמיאז הוא חלבון קרום (נשא) המחדיר את הלקטוז דרך קרום התא).

הזנים מסומנים במספרים 1-4. עליכם לזהות את הגנוטיפ של כל זן. על מנת לאפשר את הזיהוי, תגדלו את הזנים ב-4 מצעים שונים: מצע עני בתוספת לקטוז, מצע עני בתוספת גלוקוז ולקטוז, ומצע עני בתוספת IPTG (IPTG הוא משרן מלאכותי החודר לתא גם בהעדר פרמיאז). לאחר 45 דקות הדגרה במצעים השונים תמדדו את הצפיפות האופטית של התרביות השונות, ותקחו דוגמא מכל תרבית לבדיקת פעילות האנזים ביתא-גלקטוזידאז. פעילות האנזים תבדק ע"י הוספה של סובסטרט מלאכותי, שקוף, בשם ONPG, שפירוק שלו נותן תוצר בצבע צהוב.

גידול החיידקים:

זני החיידקים השונים (מסומנים 1-4) נמצאים בבקבוקים שבאמבט המטלטל, במצע עני. לפניך במעמד 16 מבחנות. לכל ארבע מבחנות עליך להעביר חיידקים מזן אחר. רשום את שמך על אחת המבחנות.

1. סמן 4 מבחנות במספר 1. העבר לכל מבחנה 7 מ"ל חיידקים מבקבוק מספר 1.
2. סמן 4 מבחנות במספר 2. העבר לכל מבחנה 7 מ"ל חיידקים מבקבוק מספר 2.
3. סמן 4 מבחנות במספר 3. העבר לכל מבחנה 7 מ"ל חיידקים מבקבוק מספר 3.
4. סמן 4 מבחנות במספר 4. העבר לכל מבחנה 7 מ"ל חיידקים מבקבוק מספר 4.

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

טבלה מסכמת של שלבים 1-4: (הכנסת 7 מ"ל חיידקים מכל זן למבחנות זכוכית):

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2 | 2 | 2 | 2 |
| 3 | 3 | 3 | 3 |
| 4 | 4 | 4 | 4 |

* כל מספר בטבלה מייצג את מספר זן החיידקים



הוספת משרנים למבחנות החיידקים: (שימו לב להחליף טיפים בין חומר לחומר!)

הוסף לכל מבחנה חומר אחד מהחומרים המשפיעים על ביטוי האופרון ע"פ הסדר הבא:

1. כוון פיפטור של $100\mu\text{L}$ ל-100.
2. רשום על 4 מבחנות, מבחנה אחת מכל זן, את המילה "עני". למבחנות אלו אל תוסיף דבר.
3. רשום על 4 מבחנות, מבחנה אחת מכל זן, "L".
4. הוסף לכל אחת מהמבחנות שסימנת $100\mu\text{L}$ לקטוז. החלף טיפ בין מבחנה למבחנה.
5. רשום על 4 מבחנות, מבחנה אחת מכל זן, "L + G".
6. הוסף לכל אחת מהמבחנות שסימנת $100\mu\text{L}$ גלוקוז + $100\mu\text{L}$ לקטוז. החלף טיפ בין מבחנה למבחנה.
7. רשום על 4 מבחנות, מבחנה אחת מכל זן, "IPTG".
8. הוסף לכל אחת מהמבחנות שסימנת $100\mu\text{L}$ IPTG. החלף טיפ בין מבחנה למבחנה.
- 9.

טבלה מסכמת של שלבים 1-8: הוספת $100\mu\text{L}$ מכל אחד מן החומרים:

| | | | |
|-------|----|------|-------|
| 1 עני | 1L | 1G+L | 1IPTG |
| 2 עני | 2L | 2G+L | 2IPTG |
| 3 עני | 3L | 3G+L | 3IPTG |
| 4 עני | 4L | 4G+L | 4IPTG |

עני = מצע עני; L = לקטוז; L+G = לקטוז + גלוקוז; IPTG;

10. ערבב את המבחנות בוורטקס.
11. הכנס את המעמד עם המבחנות לאמבט המטלטל ב- 37°C , והפעל את השעון ל-45 דקות.
12. בזמן ההמתנה הכן מבחנות לביצוע הריאקציה האנזימטית שתתבצע בהמשך ומבחנות לעקום הכיול.



הכנת מבחנות לביצוע הריאקציה האנזימטית:

- א. העמד 18 מבחנות אפנדורף קטנות בתוך מעמד (ראו טבלה להלן).
- ב. הכנס את המעמד לקרח בקערה המלבנית.
- ג. סמן 4 מבחנות (על המכסה) כך: 1 עני, 1L, 1G+L, 1IPTG.
- ד. סמן 4 מבחנות (על המכסה) כך: 2 עני, 2L, 2G+L, 2IPTG.
- ה. סמן 4 מבחנות (על המכסה) כך: 3 עני, 3L, 3G+L, 3IPTG.
- ו. סמן 4 מבחנות (על המכסה) כך: 4 עני, 4L, 4G+L, 4IPTG.
- ז. סמן 2 מבחנות (על המכסה) כך: R

סימון המבחנות:

| | | | | |
|-------|----|------|-------|---|
| 1 עני | 1L | 1G+L | 1IPTG | R |
| 2 עני | 2L | 2G+L | 2IPTG | R |
| 3 עני | 3L | 3G+L | 3IPTG | - |
| 4 עני | 4L | 4G+L | 4IPTG | - |

- ח. כוון את הפיפטור של 1000 ל- 300. הלבש טיפ כחול.
- ט. הוסף לכל מבחנות האפנדורף המסומנות 300 מיקרוליטר של בופר המסה. זרוק את הטיפ לשקית.
- י. כוון את הפיפטור של 100 ל- 50 והלבש טיפ לבן.
- יא. הוסף לכל אחת מהמבחנות 50 מיקרוליטר של SDS (דטרגנט) זרוק את הטיפ.
- יב. כוון את הפיפטור של 100 ל- 100 - הלבש טיפ לבן.
- יג. הוסף לכל המבחנות 100 מיקרוליטר של כלורופורם זרוק את הטיפ.
- יד. סגור היטב את המבחנות.

הכלורופורם נדיף, שימו לב לפקוק את כל המבחנות היטב!



הכנת מבחנות לעקום כיוול של ONP :

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

| מספר מבחנה | בופר פוספט במיקרוליטרים | ONP במיקרוליטרים | בופר קרבונט במיקרוליטרים | ריכוז ONP במיקרואוליטר |
|------------|----------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 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 |

1. ערבב את המבחנות בוורטקס מספר שניות. השאר מבחנות אלה בינתיים בצד במעמד.
מדידת העכירות האופטית של החיידקים במצעים השונים:
13. לאחר 45 דקות (עם השמע צלצול השעון) הוצא את המבחנות של קבוצתך, נגב אותן היטב הבא אותן למקום עבודתך.
לפניך במעמד מבחנה המסומנת 0. מבחנה זו מכילה מצע עני ותשמש לאיפוס הספקטרופוטומטר לצורך מדידת הצפיפות האופטית של תרביות החיידקים.
14. הכנס את מבחנה 0 לספקטרופוטומטר ואפס את הספקטרופוטומטר.
15. קרא את הצפיפות האופטית בכל אחת מהמבחנות, ורשום את התוצאה בטבלה שלהלן:

| | | | |
|--------------|-----------|-------------|--------------|
| <u>1 עני</u> | <u>1L</u> | <u>1G+L</u> | <u>1IPTG</u> |
| <u>2 עני</u> | <u>2L</u> | <u>2G+L</u> | <u>2IPTG</u> |
| <u>3 עני</u> | <u>3L</u> | <u>3G+L</u> | <u>3IPTG</u> |
| <u>4 עני</u> | <u>4L</u> | <u>4G+L</u> | <u>4IPTG</u> |



לקיחת דוגמא מכל תרבית לבדיקת פעילות האנזים ביתא-גלקטוזידאז, ופירוק התאים:

16. העבר $500\mu\text{m}$ חיידקים מכל תרבית חיידקים למבחנת האפנדורף המסומנת בהתאמה (מתרבית "1 עני" העבר $500\mu\text{m}$ למבחנת האפנדורף המסומנת "1 עני", מתרבית "L1" העבר למבחנת אפנדורף "L1" וכן הלאה...)
17. לשתי המבחנות המסומנות R הוסף $500\mu\text{m}$ של מצע עני בלבד מהמבחנה המסומנת 0.
18. סגור היטב את כל המבחנות. (היות ש"הסירה" איננה יציבה- שימו לב שהמבחנות לא יתהפכו במהלך הסגירה)
19. ערבב בוורטקס במשך כ- 10 שניות.
20. שים את כל המבחנות במעמד עגול המסוגל לצוף ("סירה").
21. העבר את המעמד לאמבט של 42 מעלות, למשך כ-5 דקות. זכור את צבע המבחנות של קבוצתך!

ביצוע התגובה האנזימטית:

1. עם תום ההדגרה ב 42 מעלות, הוצא את הסירה עם מבחנות האפנדורף מהאמבט והעבר המבחנות למעמד שעל שולחןך.
2. כוון את הפיפטור של 1000 מיקרוליטר ל- 200 מיקרוליטר והלבש טיפ כחול.
3. הוסף לכל אחת מ 18 המבחנות (כולל מבחנות הייחוס) 200 מיקרוליטר של ONPG (סובסטר שתוצר הפרוק שלו צהוב).
4. סגור היטב וערבב בוורטקס כ- 10 שניות.
5. סדר את המבחנות ב"סירה" והחזר לאמבט בטמפרטורה של 42°C למשך 10 דקות נוספות.
6. בתום ההדגרה, העבר את המבחנות לסל הקרח.

הפסקת התגובה האנזימטית (לאחר 10 דקות ההדגרה):

7. כוון את פיפטור של 100 מיקרוליטר ל- 100 והלבש טיפ לבן.
8. הוסף במהירות 100 מיקרוליטר של בופר קרבונט לכל אחת מהמבחנות (כולל למבחנות הייחוס!).
9. סגור היטב וערבב בוורטקס כ- 10 שניות.
10. בעזרת המדריך, סרכז את המבחנות במשך 3 דקות בטמפ' החדר, במהירות 13,500 סל"ד.

מדידת ריכוז ה-ONP בדוגמאות השונות:

כאלי: יהיה עליך להעביר את הנוזל הצליון של הדוגמאות לצלחות שבהן 96 באריות ממוספרות. הקפד להחזיק כל צלחת בשליפה ולא לנעוץ את החתימה. אחרי העברת הדוגמאות, תוכל לקרוא את המליצה בצורת ספקטרוסקופטור מיוחד (Microplate Reader). הקפד לקחת את הדוגמאות מהפאזה הצליונה של המחנה! הפאזה התחתונה עכורה והדבר מפריע לקריאת צלחות הצבע.



- א. כוון את הפיפטור של 1000 מיקרוליטר ל-200 מיקרוליטר והלבש טיפ כחול.
 ב. העבר 200 מיקרוליטר מהפאזה העליונה של מבחנה "1 עניי" לבארית מספר A1 ולבארית מספר B1, לקבלת 2 חזרות.
 ג. החלף טיפ, והעבר 200 מיקרוליטר מהפאזה העליונה של מבחנה "1L" 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-4 הבאריות A9-A12.
 ו. העבר 200 מיקרוליטר ממבחנת הייחוס R2 ל-4 הבאריות B9-B12.
 ז. העבר 200 מיקרוליטר מהפאזה העליונה של המבחנות שהכנת לכיול לבאריות G8-H12, על פי התרשים.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-------|----|------|-------|---|---|---|---|----|----|----|----|
| A | 1 עני | 1L | 1G+L | 1IPTG | | | | | R1 | R1 | R1 | R1 |
| B | 1 עני | 1L | 1G+L | 1IPTG | | | | | R2 | R2 | R2 | R2 |
| C | 2 עני | 2L | 2G+L | 2IPTG | | | | | | | | |
| D | 2 עני | 2L | 2G+L | 2IPTG | | | | | | | | |
| E | 3 עני | 3L | 3G+L | 3IPTG | | | | | | | | |
| F | 3 עני | 3L | 3G+L | 3IPTG | | | | | | | | |
| G | 4 עני | 4L | 4G+L | 4IPTG | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| H | 4 עני | 4L | 4G+L | 4IPTG | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

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

לאחר הקריאה תקבל במחשב גרפיקה ובו תוצאות הקריאה, ומתחתן התוצאות המחושבות לאחר הפחתת התוצאה של מבחנות הייחוס. בהמשך הדף יופיע צקוט הכיול שנתנה 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 הערך 840.

הטבלה שמתחת לטבלה שמלאת חושב כבר ריכוז ה-ONP ל- 10^7 חיידיקים, ונתונים אלו מבוטאים בצורה גרפית בצד התחתון.

הצבר את נתוני עכירות החיידיקים מהטבלה בצמוד 4 ואת תוצאות הקריאה ממכשיר ה-ELISA לגרפיקה. סיכום הנתונים הנמצא על המחשב בצמדית הצמודה.