

אנטיביוטיקה, כמוסת הקסם?

ניסוי: זיהוי גן לעמידות באמצעות PCR ואלקטרופורזה בג'ל

תאריך עדכון: 1.2.2019 (ללברנט)

בניסוי זה התלמידים ישתמשו בשתי שיטות עבודה ובעזרתן יפתרו תעלומה. התלמידים יכירו את שיטת ההגברה של DNA בעזרת מכשיר ה-PCR ואת השיטה להפרדת קטעי DNA בעזרת מכשיר אלקטרופורזה בג'ל. באמצעות שיטות אלה הם יוכלו לקבוע האם בדגימה מחיידקים מצוי הגן המקנה עמידות בפני התרופה האנטיביוטית אמפיצילין.

- בדפים אלה יש מידע אודות הניסוי, שלוש טבלאות ובהן המלצות לארגון החומרים והציוד לפי לוח זמנים מתאים לניסוי, הנחיות לשמירה על כללי הבטיחות ושני נספחים, "כיצד פועל מכשיר ה-PCR?" (נספח 1) ו"כיצד פועל מכשיר אלקטרופורזה בג'ל?" (נספח 2). רקע תיאורטי מומלץ לקרוא בדפי המורה לניסוי זה.
לפני הזמנת הערכה מבר אילן, חשוב מאד לקרוא בעיון את רשימות הכלים והחומרים אותם יש להכין ואת אלו שכלולים בערכה (עמוד 5) ולבדוק האם יש לכם בבית הספר את כל שנדרש לביצוע הניסוי כגון: טיפים, מבחנות אפנדורף, חלוקים, משקפי מגן, פחים לפסולת ביולוגית, כפפות, שקיות פלסטיק המתאימות לסילוק פסולת ביולוגית. אם אין ברשותכם אוטוקלב יש לדאוג לכלי בגודל מתאים לטיפול בפסולת ביולוגית (המכיל תמיסת אקונומיקה בריכוז 10%).
- אם חסרים לכם פריטי ציוד חשוב שתרכשו אותם בהקדם אצל ספקי הציוד למעבדות.
- נציג בית הספר או אדם אחר מטעמו יבצע איסוף עצמי של הערכה מהמרכז בבר אילן. הערכה כוללת מספר רב של פריטים ולכן לא ניתן לשלוח אותה בדואר.
- **לתשומת לבכם:** חשוב לבצע את הניסוי לא יאחר מחודשיים מיום קבלת הערכה בבית הספר מכיוון שזמן חיי המדף של בופר TAE מוגבל לכ-7 שבועות).
- **הציוד והחומרים שיופקו לבית הספר על ידי המרכז מיועדים ל- 24-32 תלמידים שיעבדו בשני סבבים (בכל סבב 4 קבוצות שבכל אחת מהן 3-4 תלמידים).**

בטיחות בעבודת ההכנה של הלבורנט ובעבודת המורה והתלמידים

הפלסמידיים אותם תקבלו ממרכז הפיתוח והתמיכה יסופקו במבחנות אפנדורף. פלסמידיים אלה הופקו מחיידקים שאינם פתוגניים.

מטעמי זהירות אנו מחויבים לעבוד עם כל חומר ביולוגי במשנה זהירות בכדי לא להפיץ פלסמידיים המכילים גנים לעמידות. ראוי לציין כי הקפדה על ההנחיות כוללת גם את הטיפול בפסולת ביולוגית במהלך הניסוי ובסיומו, ניקוי משטחי העבודה ורחיצת ידיים בסיום העבודה.

כללי בטיחות בעבודה עם ציוד וחומר ביולוגי

- יש לנקות את שולחן העבודה בתחילת הניסוי ובסופו בנייר טבול באלכוהול 70% ולהמתין עד לייבוש.
 - בזמן העבודה יש להשתמש בכפפות, חלוק ומשקפי מגן.
 - רצוי לתרגל עם התלמידים עבודה באופן סטרילי כדי למנוע זיהום של ריאגנטים או ציוד כגון הנחת מיקרופיפטור שבתוכו טיפ על שולחן, לפני השימוש בו ולאחריו.
 - יש להקפיד על רחיצת ידיים לאחר טיפול בחומרים ביולוגיים או ריאגנטים.
 - חשוב להקפיד ולשמור על כללי הבטיחות בעבודה עם כלים ונוזלים בטמפרטורה גבוהה.
- בתום הניסוי יש להקפיד על טיפול נאות על פי כללי הבטיחות וההנחיות לגבי ריאגנטים וחומרים המכילים שאריות DNA וחיידקים.
- הערה: הנחיות ייחודיות לעבודה לפי כללי בטיחות בניסוי כלולות במסמך זה ובדפים לתלמיד.

הלבורנט חייב להקפיד ולעבוד על פי הנחיות הבטיחות בזמן שהוא מכין את הכלים והחומרים הניסוי ולהדריך את המורים והתלמידים בהנחיות אלה לפני ביצוע הניסוי ובמהלכו.

מידע אודות הניסוי

בהקדמה שבדפי הניסוי לתלמידים מוצג סיפור אמיתי שראשיתו במאה ה-19 וסיומו כמאה שנים לאחר מכן:

כסוף המאה ה-19 יצאה משפחת לחקור את הקוטב הצפוני! המשפחת לא היצאה ליצדה ולאחר שלוש שנים איש מבין חברים לא שרד. בשנת 1988 התגלו מתחת לקרח שבאזור הקוטב אפותיהם של שניים מחברי המשפחת. אתם הצטרפתם לקבוצה של מדענים שהחליטו לחקור האם בין החיידקים המתים שנמצאו באפותיהם של חברי המשפחת ישנם גם חיידקים הנושאים את הגן לצמידות בפני התרופה האנטיביוטית אמפיצילין. לאחר שתצאו את כל שלבי הניסוי ותסכמו את התוצאות תוכלו לפתור את התצלומה.

התלמידים מתבקשים "להצטרף לצוות החוקרים" ולפתור את התעלומה. על פי המידע בספרות, מבדיקת החיידקים המתים בגופות נמצא שמקצתם עמידים לחומרים אנטיביוטיים, וביניהם גם חומרים שבמאה ה-19 לא היו מוכרים למדע. כלומר, השימוש באותם חומרים החל שנים רבות אחרי מות חברי המשלחת. ממצאים אלה תומכים בתיאורית האבולוציה, על פיה בחיידקים חלות מוטציות מקריות הגורמות לשונות באוכלוסייה, וכתוצאה מלחץ סלקטיבי שורדים ומתרבים הפרטים המוטנטיים¹. כוונה תחילה המידע שנמסר לתלמיד הוא חלקי ואינו כולל את ממצאיהם של החוקרים. לאחר ביצוע הניסוי התלמידים יסכמו את תוצאותיו ויכולו לפתור את התעלומה. אנחנו ממליצים למורים וללבורנטים לאפשר לתלמידים לעבור את התהליך כולו, להסתקרן, להתרגש ולחוות את חווית הגילוי. לאחר פתרון התעלומה הם יישמו את התוצאות ויבינו את המשמעות של מוטציות אקראיות המתרחשות בטבע.

תכנון זמן:

משך הזמן הנדרש לביצוע כל שלבי הניסוי כ- 140 דקות, שניתן לפצל אותו לשלושה מפגשים:

מפגש ראשון:

- i. הכנת מבחנות ה-PCR (כ-45 דק').
- ii. מחזורי השכפול ב-PCR (כ-45 דק').

נקודת עצירה – לאחר שהריאקציה של ה-PCR הסתיימה, ניתן להעביר את מבחנות ה-PCR שבהן תוצרי ההגברה לקרור במשך לילה או להקפאה ללא הגבלת זמן. כאשר התלמידים מוכנים לביצוע הרצה באלקטרופורזה בג'ל, יש להוציא את המבחנות מההקפאה ולהניחן בכלי עם קרח על שולחן המורה.

מפגש שני: 20 דקות לשתי קבוצות

- i. הטענת דגימות ה-DNA ששוכפלו ב-PCR אל מכשיר אלקטרופורזה בג'ל.
- ii. הרצה אלקטרופורזה בג'ל וקריאת תוצאות.

מפגש שלישי:

דיון בתוצאות

¹ על פי: א. כהנא, [חיידקים ונגיפים בגוף האדם](#), הוצאת המרכז הארצי למורי ביולוגיה ומורי מדעי הסביבה, תשע"ז 2016

מידע אודות מהלך הניסוי

בניסוי התלמידים יעבדו עם פלסמידים הנושאים גן לעמידות לתרופה האנטיביוטית אמפיצילין².

שלב א: ההגברה ב-PCR:

התלמידים יכניסו למבחנות PCR תערובת של תחלים (פריימרים), תערובת המכונה MIX TAQ המכילה אנזים DNA פולימראז (TAQ), נוקלאוטידים, תמיסת בופר וקטע DNA (פלסמיד) שאותו מעוניינים להגביר.

מבחנה המסומנת A+ ובה פלסמידים, וידוע שהם נושאים גן לעמידות לאנטיביוטיקה מסוג אמפיצילין (amp^R) שאורכו 700³bp. מבחנה המסומנת A- ובה אין כלל פלסמידים.

מבחנה המסומנת R ויש בה פלסמידים מחיידקים שבודדו מגופם של חברי המשלחת התלמידים מכל הקבוצות יכניסו את כל המבחנות למכשיר באותו הזמן.

בתחילת הניסוי התלמידים אינם יודעים האם הפלסמידים שבמבחנה R נושאים גן לעמידות לאנטיביוטיקה מסוג אמפיצילין. **לידיעתכם, הפלסמידים במבחנה זו זהים לפלסמידים שבמבחנה A+.**

כאמור בעמוד 3, אנו ממליצים למורים וללבורנטים לא למסור מידע זה לתלמידים בתחילת הניסוי.

שלב ב: הרצה של דגימות DNA שהוגברו, באלקטרופורזה בג'ל⁴.

ההרצה תבוצע בשני סבבים. התלמידים משתי קבוצות יטעינו את הדגימות משלוש המבחנות בג'ל משותף ובו תשע באריות.

בטבלאות מוצג מידע על ההתארגנות לקראת ביצוע הניסוי:

בטבלה 1, מידע על הפריטים שבערכה שתסופק על ידי המרכז לפיתוח ותמיכה בבר אילן (עמ' 5).

בטבלה א, מידע על ציוד וחומרים הנדרשים לביצוע שלב ההגברה ב-PCR, **שלב א של הניסוי**

(עמ' 6-7) **ובטבלה ב** מידע על ציוד וחומרים הנדרשים לביצוע שלב ההרצה באלקטרופורזה בג'ל,

שלב ב של הניסוי (עמ' 8-9).

² תרופה ממשפחת הפנצילינים הסמיסינטטיים הנמצאת בשימוש החל משנת 1966

³ אורך של קטע DNA נמדד לפי מספר זוגות הבסיסים החנקניים שבו.

⁴ הסבר מפורט על עבודה עם אלקטרופורזה בג'ל ראו נספח 2 בקובץ זה (עמ' 16-17)

טבלה 1: פריטים בערכה שתסופק על ידי המרכז וישמשו להכנת חומרים

ערכה זו מיועדת ל- 24-32 תלמידים שיעבדו בשני סבבים (בכל סבב 4 קבוצות המונות 2-4 תלמידים).

מספר פריט	כלים וחומרים לקבוצת תלמידים (ראו פרוט בטבלאות א,ב)	תנאי אחסון	שימוש בפריט בטבלה	
			טבלה א	טבלה ב
I	מבחנת אפנדורף המסומנת A+ מבחנה ובה פלסמיד הנושא את הגן לעמידות לאמפיצילין בריכוז של 100 ng/μL ובנפח 50 μL	תא הקפאה	+	
II	מבחנת אפנדורף המסומנת R מבחנה ובה פלסמיד שתכונותיו אינן ידועות לתלמיד והוא נושא את הגן לעמידות לאמפיצילין בריכוז של 100 ng/μL ובנפח 50 μL	תא הקפאה	+	
III	<ul style="list-style-type: none"> • בקבוק ובו 350 מ"ל תמיסת בופר TAE • 4 מבחנות ובכל אחת מהן 50 מ"ל תמיסת בופר TAE כל הכלים מסומנים "תמיסת בופר"	מקרר		+
IV	מבחנת אפנדורף המסומנת MIX PRIMERS מבחנה ובה 160 μL תערובת תחלים (פריימרים) המכילה פריימר קדמי (F) ופריימר אחורי (R)	תא הקפאה	+	
V	מבחנת אפנדורף המסומנת DNA LADDER מבחנה ובה 80 μL סולם DNA בריכוז 50 μg/mL	מקרר		+
VI	מבחנת אפנדורף המסומנת MIX TAQ מבחנה ובה 740 μL תערובת של DNA פולימראז (Taq), בופר ונוקלאוטידים (dNTPS)	תא הקפאה	+	
VII	מבחנת אפנדורף מסומנת "מים" מבחנה ובה 1.4 מ"ל מים נטולי נוקליאזות	טמפ' החדר	+	
VIII	24 מבחנות PCR דקות דופן + כן מתאים		+	+
IX	4 קופסאות קטנות מסומנות "אגרז" בכל קופסה 0.5 גרם אבקת אגרז	טמפ' החדר	+	
X	מבחנת אפנדורף אטומה לאור מסומנת "SM" מבחנה ובה 11 μL של הצבע SMART GLOW	מקרר	+	

טבלה א: מידע על ציוד וחומרים הנדרשים לביצוע שלב ההגברה ב-PCR (שלב א).

הערות לפריטים המסומנים בכוכבית בטבלאות א ו-ב (*) ראו עמודים 10-12).

הציוד מיועד ל 24-32 תלמידים שיעבדו בשני סבבים (בכל סבב 4 קבוצות ובכל קבוצה 2-4 תלמידים).

לתשומת לבכם: החומרים בטבלה מיועדים לקבוצה של תלמידים.

מס'	הפריט	מקור הפריט	יונח על שולחן
1	מכשיר MINIONE PCR	בהשאלה	מורה
2	טאבלט MINIONE יש להטעין את תוכנית ההגברה על פי ההנחיות	בהשאלה	מורה
3	מיניצנטריפוגה MINIONE אם אין ברשותכם צנטריפוגה, ניתן להקיש בעדינות על מבחנת ה-PCR שעל שולחן המורה כדי לוודא כי כל הנוזלים נמצאים בבסיס המבחנה.	בהשאלה	מורה
4	נייר מגבת ובקבוק סגור ופקוק ובו אלכוהול 70% בתחילת העבודה ובסופה התלמידים יחטאו את משטח העבודה שלהם. לאחר החיטוי יש להמתין לייבוש המשטח. *לפני כל שימוש בכוהל יש לוודא כי אין אש דולקת במעבדה	רכישה עצמית	מורה
5*	5µl פלסמיד הנושא את הגן לעמידות לאמפיצילין במבחנת אפנדורף המסומנת A+ יש <i>לפנור כפלי עם קרח על מנת לתאם</i>	ערכה	תלמיד
6*	5µl פלסמיד מסוג הנושא את הגן לעמידות לאמפיצילין במבחנת אפנדורף המסומנת R יש <i>לפנור כפלי עם קרח על מנת לתאם</i>	ערכה	תלמיד

מס'	הפריט	מקור הפריט	יונה על שולחן
7*	20µL תערובת תחלים: תחל קדמי (F) ותחל אחורי (R) במבחנה המסומנת MIX Primers <i>יש לשמור בכלי עם קרח על מצל התלמיד</i>	ערכה	תלמיד
8*	85µL תערובת של DNA פולימראז (Taq), בופר ונוקלאוטידים (dNTPS) במבחנה המסומנת MIX TAQ <i>יש לשמור בכלי עם קרח על מצל התלמיד.</i>	ערכה	תלמיד
9*	100µL מים נטולי נוקליאזות במבחנה אפנדורף מסומנת "מים" <i>יש לשמור בכלי עם קרח על מצל התלמיד</i>	ערכה	תלמיד
10*	5 מבחנות אפנדורף בנפח 1.5 מ"ל	רכישה עצמית	תלמיד
11	3 מבחנות PCR דקות דופן + כן מתאים	ערכה	תלמיד
12	12 טיפים למיקרופיטור	רכישה עצמית	תלמיד
13	מיקרופיטור בנפח 2-20 µL	השאלה	תלמיד
14	מיקרופיטור בנפח 20-200 µL	השאלה	תלמיד
15	עט לרישום על זכוכית המאפשר סימון דק	רכישה עצמית	תלמיד
16*	קרח כתוש בכלי המסומן "כלי לקרח"	רכישה עצמית	תלמיד
17*	כלי פסולת ביולוגית	רכישה עצמית	תלמיד
18	משקפי מגן משקפיים לכל תלמיד	רכישה עצמית	תלמיד
19	כפפות לטקס זוג לכל תלמיד	רכישה עצמית	תלמיד
20	חלוק לעבודה במעבדה לכל תלמיד	רכישה עצמית	תלמיד

טבלה ב: מידע על ציוד וחומרים הנדרשים לביצוע שלב ההרצה

באלקטרופורזה בג'ל (שלב ב).

הערות לפריטים המסומנים בכוכבית בטבלאות א ו-ב (*) ראו עמודים

10-12).

הציוד מיועד ל 24-32 תלמידים שיעבדו בשני סבבים (בכל סבב 4 קבוצות וכל קבוצה 4-2 תלמידים). פריטים 22-25 מיועדים לשתי קבוצות. כל שאר הפריטים

מיועדים לקבוצה אחת של תלמידים

מס'	הפריט	מקור הפריט	יונה על שולחן
21	אלקטרופורזה בג'ל MINIONE המכשיר כולל קופסה, 2 תבניות ו-2 מסרקים.	השאלה	מורה
22*	ג'ל אגרוז לשתי קבוצות תלמידים את הג'ל יש להכין מפריטים 23-25	---	מורה
23	תמיסת בופר TAE במבחנה מבחנה ובה 50 מ"ל תמיסת בופר	ערכה	---
24	11 µL צבע SMART GLOW במבחנת אפנדורף מסומנת "SM"	ערכה	---
25	קופסה קטנה מסומנת "אגרוז" בכל קופסה 0.5 גרם אבקת אגרוז	ערכה	---
26	כן למבחנות PCR	השאלה	תלמיד
27	מבחנות PCR מסומנות בשם של כל אחת מהקבוצות 3 מבחנות PCR משלב א של כל קבוצת תלמידים יועברו מקרור או מהקפאה. <i>יש לשלוח בקבוצה עם קרח על יולפון האוכה</i>	מסיום עבודה בשלב א	מורה
28	140 מ"ל בופר TAE באמצעות משורה מזגו 140 מ"ל בופר TAE על פני תבנית הג'ל שבמכשיר האלקטרופורזה ג'ל. כך הנוזל במיכל יהיה גבוה רק במעט מגובה הג'ל שבתבנית.	ערכה	מורה

מס'	הפריט	מקור הפריט	יונה על שולחן
29	DNA LADDER 80μL במבחנה המסומנת DNA LADDER. יש למלא קרח על פי הוראות המורה	ערכה	מורה
<p>הפריטים שהמשק הטבלה שימשו הם אלה הנלווים ונדריים הם המשק. המספור וההערות של הפריטים להם לאלה שהטבלה א.</p>			
4	נייר מגבת ובקבוק סגור ופקוק ובו אלוהול 70% בתחילת העבודה ובסופה התלמידים יחטאו את משטח העבודה שלהם. לאחר החיטוי יש להמתין לייבוש המשטח. *לפני כל שימוש בכוהל יש לוודא כי אין אש דולקת במעבדה	---	מורה
12	4 טיפים למיקרופיטור	---	תלמיד
13	מיקרופיטור בנפח 2-20 μL	השאלה	תלמיד
15	עט לרישום על זכוכית המאפשר סימון דק	---	תלמיד
16*	קרח כתוש בכלי המסומן "כלי לקרח"	---	מורה
17*	כלי פסולת ביולוגית	---	תלמיד
18	משקפי מגן, משקפיים לכל תלמיד	---	תלמיד
19	כפפות לטקס, זוג לכל תלמיד	---	תלמיד
20	חלוק לעבודה במעבדה לכל תלמיד	---	

.... / המשך בעמ' 10

הערות לפריטים שסומנו ב * בטבלה א ובטבלה ב

פריט 5 - 5µL פלסמיד הנושא את הגן לעמידות לאמפיצילין

באמצעות עט לסימון על זכוכית רשמו "A+" על כל אחת מ- 8 מבחנות אפנדורף. העבירו לכל מבחנה 5 µL נוזל ממבחנת האפנדורף A+ שבערכה. **פקקו את המבחנות ושמרו אותן בקרח.**

פריט 6 - 5µL פלסמיד הנושא את הגן לעמידות לאמפיצילין

באמצעות עט לסימון על זכוכית רשמו "R" על כל אחת מ- 8 מבחנות אפנדורף. העבירו לכל מבחנה 5 µL נוזל ממבחנת האפנדורף R שבערכה. **פקקו את המבחנות ושמרו אותן בקרח.**

פריט 7 - 20µL תערובת תחלים: תחל קדמי (F) ותחל אחורי (R)

באמצעות עט לסימון על זכוכית רשמו "MIX Primers" על כל אחת מ- 8 מבחנות אפנדורף. העבירו לכל מבחנה 20 µL נוזל ממבחנת אפנדורף MIX Primers שבערכה. **פקקו את המבחנות ושמרו אותן בקרח.**

פריט 8 - 85µL תערובת של DNA פולימראז (Taq), בופר ונוקלאוטידים (dNTPS)

באמצעות עט לסימון על זכוכית רשמו "MIX TAQ" על כל אחת מ- 8 מבחנות אפנדורף. העבירו לכל מבחנה 90 µL נוזל ממבחנת אפנדורף MIX TAQ שבערכה. **פקקו את המבחנות ושמרו אותן בקרח.**

פריט 9 - 100µL מים נטולי נוקליאזות

באמצעות עט לסימון על זכוכית רשמו "מים" על כל אחת מ- 8 מבחנות אפנדורף. העבירו לכל מבחנה 100 µL מים ממבחנת אפנדורף "מים" שבערכה. **פקקו את המבחנות ושמרו אותן בקרח.**

פריט 10 - 5 מבחנות אפנדורף בנפח 1.5 מ"ל

מבחנות אלה ישמשו להכנת פריטים 5-9 לכל אחת מקבוצות התלמידים (ראו הוראות הכנה בעמוד 10 לעיל).

הצטיידו ב- 40 מבחנות אפנדורף, 5 מבחנות לכל קבוצה של תלמידים.
כדי להקל על התלמידים בזיהוי 5 המבחנות, מומלץ שכל אחת מהן תהיה בצבע שונה

פריט 16- קרח כתוש בכלי המסומן "כלי לקרח"

להכנת כלי לקרח אפשר להשתמש בכוסות חד פעמיות לשתייה חמה (הניחו כוס בתוך כוס).

הכנת קרח כתוש:

- יום לפני ביצוע הניסוי הכניסו קוביות קרח לשקית עבה של ניילון וסגרו את השקית.
 - השתמשו בפטיש רגיל או בפטיש להכנת שניצלים ורסקו את קוביות הקרח. העבירו במהירות את הקרח הכתוש לקערה או לשקית ניילון והכניסו לתא ההקפאה.
 - אחרי זמן קצר טלטלו את הקערה או השקית כדי שחתיכות הקרח שאולי הופשרו מעט תהיינה מפורדות.
 - עד לביצוע הניסוי שמרו את הקרח הכתוש בכלי בתא ההקפאה.
 - הקפידו על כך שכמות הקרח הכתוש שהתלמידים יקבלו תתאים לכלי לקרח.
 - חשוב שיהיה לכם עודף קרח כתוש בתא ההקפאה כדי שאפשר יהיה להוסיף לתלמידים במהלך העבודה.
- הערה: ניתן לרכוש שקיות עם קוביות קרח בתחנות דלק.

פריט 17 - כלי פסולת ביולוגית

התלמידים יניחו את כל הכלים שבאו במגע עם החומר הביולוגי: טיפים, כפפות, מבחנות אפנדורף בכלי הפסולת.

פריט 22 - ג'ל אגרוז (לשתי קבוצות)

להכנת פריט זה תשתמשו בפריטים 23, 24, 25.

הוראות הכנה למגש אחד של ג'ל אגרוז 1% המכיל שתי תבניות, תבנית לכל קבוצה:

- א. הכניסו 0.5 גרם אבקת אגרוז לארלנמאיר בנפח 100 מ"ל והוסיפו 50 מ"ל בופר TAE. מומלץ לפקוק את הארלנמאיר בצמר גפן עטוף בפד גזה.
 - ב. הכניסו את הארלנמאיר למיקרוגל למשך 20-30 שניות.
- חיזרו על פעולה זו עד להמסת הג'ל וקבלת תמיסה צלולה.

המשך פריט 22 – גל אגרוז (לשתי קבוצות)

ג. היעזרו בכפפות מתאימות (לכלים חמים), הוציאו את הארלנמאייר והניחו אותו במקום חסין לחום כדי שיתקרר.

זהירות! בזמן הרתיחה לא ניתן להבחין בבועות. אגרוז שנשפך על היד עלול לגרום לכוויה חמורה.

ד. המתינו כחמש עד שבע דקות עד לקרוור האגרוז **מבלי שיתקרש** (יש להכניס מד טמפרטורה ולהמתין עד שהתמיסה תתקרר לטמפרטורה של 50°C).

ה. הוסיפו $3\ \mu\text{L}$ SMART GLOW לארלנמאייר וערבבו בעדינות בתנועות סיבוביות. **הימנעו מלשאוף את האדים של הג'ל.**

ו. הערה: מומלץ להכניס את המבחנה שבה יש SMART GLOW למיניצנטרפוגה לפני ההוספה לג'ל אגרוז וכך כל הנוזל יהיה בתחתית המבחנה. היעזרו במשורה ומיזוג 25 מ"ל אגרוז לכל אחת משתי תבניות הג'ל.

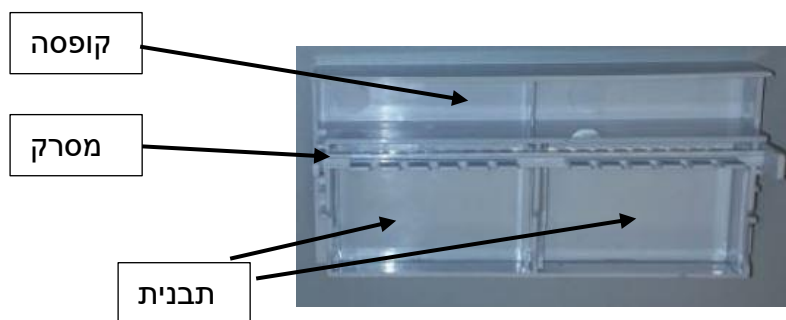
ז. ברשותכם מסרק משותף לשתי תבניות אליהן מזגתם את הג'ל.

הכניסו את המסרק לתבנית והמתינו עד לקרישת הג'ל (כ- 10 דקות, תלוי בטמפרטורת החדר).

שימו לב: אין להזיז את התבניות עד לקרישת הג'ל. ראו תמונה 1.

ח. כאשר הג'ל נקרש יש להוציא את המסרק בעדינות.

תמונה 1. קופסה ובה שתי תבניות שאליהן יש לשפוך את ג'ל אגרוז



לתשומת לבכם:

- הצבע **SMART GLOW** שהוספתם לג'ל הוא רגיש לאור ולכן עד שהתלמידים יהיו מוכנים להטעין את דגימות ה-DNA יש להניח את תבניות הג'ל במקום חשוך.
- לפני העברת תבנית הג'ל למיכל של אלקטרופורזה בג'ל יש להוציא בעדינות את תבנית הג'ל מהקופסה ולנגב במגבת נייר את שאריות האגרוז שבתחתית התבנית.
- פעולה זו חיונית כדי למנוע בעתיד היווצרות של בוטות אוויר במכשיר אלקטרופורזה בג'ל.
- מיד בתום השימוש יש לשטוף את הכלי שבו הכנתם את האגרוז כדי למנוע מצב שבו שאריות האגרוז יקרשו בכלי ויקשו על ניקיונו.

הצלחת הניסוי תלויה בכך ש:

1. התלמידים ישתמשו בטיפ חדש בכל מעבר מחומר אחד לאחר.
2. לפני תחילת הניסוי יש לוודא כי כל הציוד והחומרים נמצאים על המגש בהתאם לרשימות הציוד והחומרים.
3. במהלך הכנת הניסוי ובעת ביצועו בכיתה, יש להקפיד כי מבחנות האפנדורף: **R, A+**, "MIX PRIMER", "MIX TAQ", מים – ומבחנת סולם ה **DN-A (DNA LADDER) יהיו בקרח**. אם הנוזל במבחנות ששהו בכלי הקרח קפא, ניתן להפשיר אותו על ידי החזקת המבחנות בכף יד קמוצה במשך כדקה. בתום השימוש יש להחזיר את המבחנות לכלי קרח.

נהלי בטיחות

- במהלך המעבדה יש להשתמש בכפפות ובמשקפי מגן.
- רצוי לתרגל עבודה באופן סטרילי כדי למנוע זיהום של ריאגנטים.
- יש לנקוט משנה זהירות בעת עבודה עם ציוד חשמלי.
- יש להקפיד על רחיצת ידיים במים וסבון לאחר טיפול בחומרים ביולוגיים או ריאגנטים.
- בתום הניסוי יש להקפיד על טיפול בחומרים ביולוגיים על פי כללי הבטיחות והנחיות [בחוזרי הבטיחות](#) המתפרסמים באתר מפמ"ר ביולוגיה ולהשרות את כל תכולת הכלים של פסולת ביולוגית כגון כפפות, טיפים, מבחנות אפנדורף, מבחנות PCR בתמיסת אקונומיקה 10% למשך לפחות 10 דקות.

עד לבוקר הניסוי

- מומלץ להכין במגשים את כל הציוד והחומרים שאינם מצריכים קירור.
- שמרו את פריטים 5-8 בתא ההקפאה.

בבוקר הניסוי:

- יש להכין ג'ל אגרוז על פי ההוראות בפריט 22.
- העבירו את פריטים 5-8 מתא ההקפאה לכלי עם קרח. הוסיפו לכלי גם את פריט 9.
- יש להטעין את הטאבלט בעזרת כבל ה-USB.

הערה:

בניסוי זה שני חלקים: הגברה ב- PCR והרצה של הדגימות באלקטורופזה בגל. לאחר שהריאקציה של ה- PCR תסתיים, ניתן לשמור בקירור את מבחנות ה- PCR המסומנות בשם של התלמידים, רק במקרה ששלב ההרצה יבוצע בפרק זמן קצר מ- 48 שעות. אם שלב ההרצה יבוצע לאחר פרק זמן ארוך יותר - חובה לשמור את המבחנות בתא ההקפאה (ללא הגבלת זמן).

נספח 1: כיצד פועל מכשיר ה-PCR?

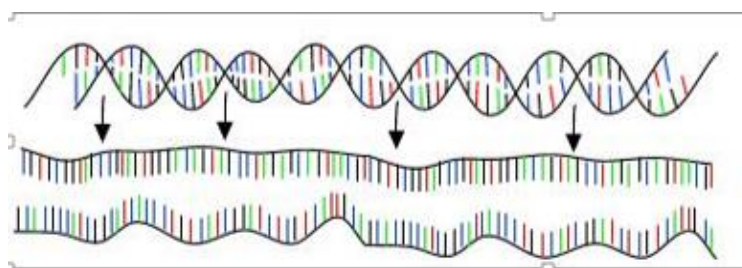
בניסוי זה נשתמש במכשיר PCR שבאמצעותו נגביר דגימת DNA. דגימה זו היא התבנית שבה הגן לעמידות לאמפיצילין.

מכניסים לכל מבחנת PCR דגימה של DNA. מוסיפים לכל מבחנה תערובת של שני תחלים יחודיים (תחל שנצמד לקצה ה- 3' ומכונה "תחל קדמי F" ותחל שנצמד לכיוון 5' המכונה "תחל אחורי-R") (איור 2), וכן תערובת המכונה **MIX TAQ** המכילה בופר, אנזים DNA פולימראז המוכר כ- **TAQ** פולימראז ותערובת נוקלאוטידים dNTPS (שאלות הכנה, שאלה 1א). התארכות של גדילי DNA נעשית מכיוון 5' לכיוון 3' (שלבים א, ב סעיפים א-ח, בדף לתלמיד).

שלבים במחזור ה-PCR (איורים 1-4 מתוך [Polymerase Chain Reaction Graphics](#))

מחזור PCR בודד כולל שלושה שלבים: שלב דנטורציה (שלב הפרימה), שלב קישור התחלים ושלב ההתארכות (שלב ההגברה) (שאלות הכנה, שאלה 1ב). הגברה בעזרת PCR נעשית על-ידי חזרה על כל שלושת שלבי המחזור 20-30 פעמים. תבנית ה-DNA תוכפל בכל אחד מהמחזורים. אם מתחילים עם מולקולת DNA יחידה, כעבור 20 מחזורים יוצרו למעלה ממילון עותקים על פי הנוסחה (2ⁿ).

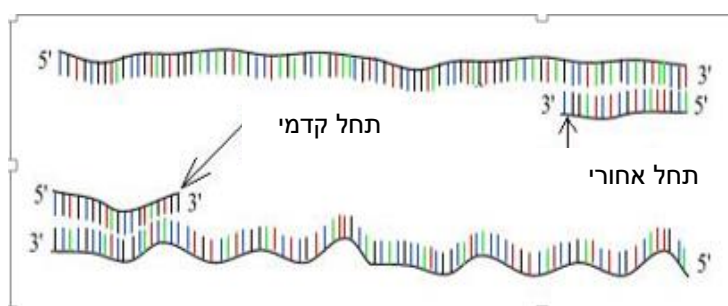
שלב ראשון – מתרחש בטמפרטורה של כ-94°C. הטמפרטורה הגבוהה מפרידה את קשרי המימן שבין הבסיסים החנקניים וכך נוצרים 2 גדילים בודדים שמהווים תבנית לבניית הגדיל המשלים. שלב זה מכונה **שלב הדנטורציה או שלב הפרימה** (איור 1).



איור 1: דנטורציה או פרימה

שלב שני- מתרחש בטמפרטורה בין 50°C ל- 70°C . טמפרטורה זו, נקבעת על פי רצף התחל ואורכו ומטרתה לייעל את הקישור של התחלים לתבנית ה-DNA. מפני שתחל חייב להיות משולב בכל מולקולת DNA חדשה שנוצרת, מוסיפים תחלים בכמות גדולה מאוד. הריכוז הגבוה מעלה את תדירות הקשירה של התחל לתבנית ה-DNA ומפחית את הסיכוי ששני גדילים שהופרדו קודם לכן יתחברו. שלב זה מכונה **שלב קישור התחלים** (איור 2).

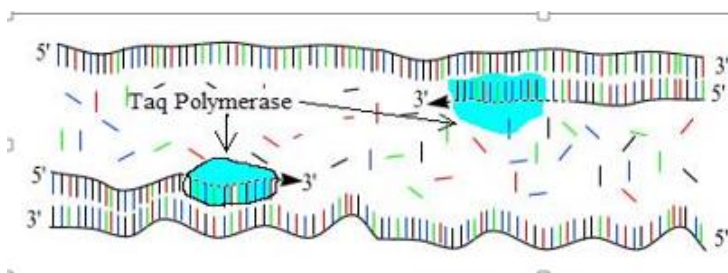
איור 2: קישור התחלים



שלב שלישי – מתרחש בטמפרטורה של 68°C מעלים בשנית את הטמפרטורה של המכשיר עד לטמפרטורה המיטבית לאנזים TAQ^5 . כמות רבה של האנזימים הללו תסייע לשכפול בזמן של תבניות ה-DNA שבמבחנה. שלב זה מכונה **שלב ההתארכות או שלב ההגברה** (איור 3).

איור 3: התארכות או הגברה

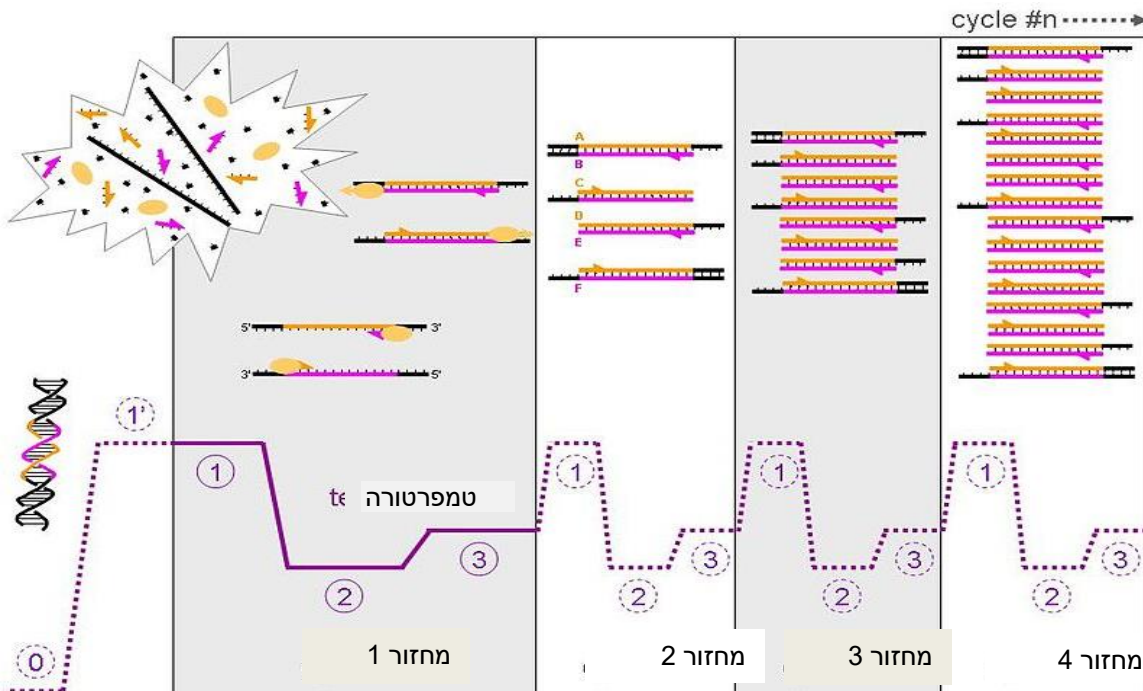
TAQ פולימראז



איור 4 (בעמוד 16) מדגים את 4 המחזורים הראשונים של הגברה בעזרת PCR. שימו לב שככל שמתבצעים יותר מחזורים, מספר תוצרי ה-PCR הרצויים גדל גם הוא.

⁵ טמפרטורה זו ייחודית לאנזים DNA פולימראז זה.
15

איור 4: סכימה של 4 מחזורי PCR



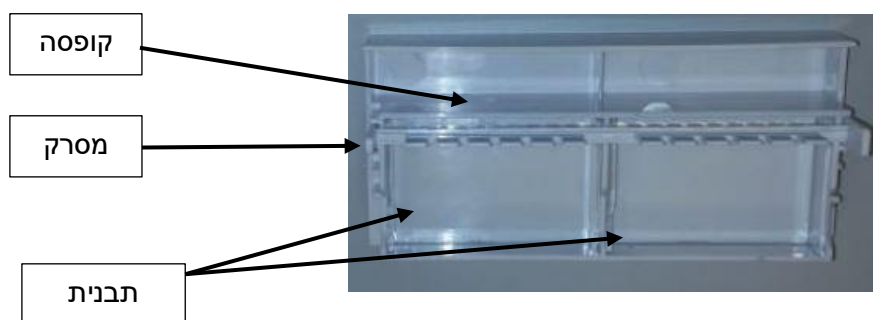
נספח 2: כיצד פועל מכשיר אלקטרופורזה בג'ל?

אלקטרופורזה בג'ל (gel electrophoresis) היא שיטה המאפשרת להפריד בין קטעי DNA שונים מתוך תערובת ולזהות נוכחות של קטעי DNA השווים באורכם על פי מהירות התנועה של אותם קטעים בשדה חשמלי. ההפרדה נעשית בתוך ג'ל אגרוז⁶ שהוא חומר מוצק למחצה.

כדי להכין ג'ל יש לערבב את האגרוז היבש בבופר TAE ולחמם במיקרוגל לקבלת תמיסת אגרוז בריכוז 1%. לאחר שהג'ל מתקרר יש להוסיף תמיסת צבע המכונה SMART GLOW. מאחר וה-DNA אינו נראה לעין בתוך הג'ל הצבע שהוסף לג'ל נקשר ל-DNA וצובע אותו וכך מאפשר לנו לעקוב אחרי התקדמות ה-DNA בג'ל. הצבע נקשר ל-DNA בין הבסיסים A – T. הצבע רגיש לאור ומתפרק יחסית מהר (אחרי כשעתיים). מוזגים את הג'ל לתבנית מפלסטיק. לתבנית זו מכניסים מסרק היוצר את החורים בג'ל המכונים "באריות" (ראו תמונה 2).

⁶ אגרוז הוא רב סוכר אותו מפיקים מאצות

תמונה 2. קופסה להכנת הג'ל והמסרק



יש להניח את התבנית ובה הג'ל בתוך המכל השקוף ולמזוג לתוכו את תמיסת הבופר TAE עד לגובה של כ-1-2 מ"מ מעל לג'ל.

כאשר מחברים את המכל בו נתון הג'ל למקור חשמל, התמיסה מאפשרת מעבר זרם חשמלי ושומרת על pH תקין בתמיסה. את דגימות ה-DNA מטעינים לבאריות שבג'ל. בזמן הטענת דגימות ה-DNA בבאריות המכשיר יהיה כבוי, אך מומלץ להדליק את נורת ההטענה המסייעת להבחין במיקום המדויק של הבאריות.

בבארית הראשונה מטעינים לרוב את סולם ה-DNA (DNA LADDER) ובבאריות האחרות מטעינים את הבקורות ודגימות ה-DNA (טיפול הניסוי). מכבים את נורת ההטענה, מכסים במכסה המגן מפני נורת הלבד שבמכשיר ומדליקים את המכשיר (תמונה 3), (שלב ג הטענה בג'ל, סעיפים ט-יח בדפי התלמיד). כעבור מספר דקות נדליק את נורת התוצאות, ואז נוכל לראות בג'ל פסים. נורת התוצאות היא נורת לד. על פי הוראות הבטיחות יש להדליק אותה רק כאשר המכסה של המכשיר מונח במסגרת הייעודית לו.

ניתן לקרב את מצלמת הטלפון הנייד לחור שבמכסה ולצלם את קטעי ה-DNA בג'ל.