

## קשת צבעים

### תאריך עדכון: 9.2.19

### תרגיל שימוש באלקטרופורזה בג'ל לבורנט

#### הקדמה:

אלקטרופורזה בג'ל<sup>1</sup> (gel electrophoresis) היא שיטה המאפשרת להפריד רכיבים מתוך תערובת על פי מהירות התנועה של אותם רכיבים בשדה חשמלי.

בביולוגיה מולקולרית משתמשים בשיטה זו כדי להפריד בין מולקולות DNA, RNA וחלבונים וכדי לקבוע את הגודל של קטעי DNA המצויים בתערובת.

ההפרדה של הרכיבים השונים נעשית בתוך ג'ל אגרוז<sup>2</sup> שהוא חומר מוצק למחצה המונח בתוך תמיסת בופר (TAE) שהיא מוליכת חשמל. הגורמים העיקריים המשפיעים על מהירות הנדידה של הרכיבים הם המטען החשמלי והמסה המולרית שלהם. השיטה מבוססת על כך של DNA יש מטען חשמלי שלילי, ולפיכך קטעי DNA הנמצאים בשדה החשמלי ינועו לכיוון הקוטב החיובי. בתוך בו נשתמש כמו ג'ל אגרוז, קטעים קצרים ינועו מהר יותר מאשר קטעים ארוכים<sup>3</sup>.

בתרגיל "קשת צבעים" התלמידים יבדקו תנועה של מולקולות צבענים (פיגמנטים) בג'ל ויפרידו באמצעות מכשיר ג'ל אלקטרופורזה צבענים המצויים בתערובת. המולקולות של הצבענים השונים בתערובת הן בעלות מסה מולרית ומטען חשמלי שונה ולא ידוע.

כיוון התנועה בג'ל של הצבענים שבתערובת (לעבר הקוטב השלילי או החיובי) יאפשר לתלמידים לקבוע מהו המטען החשמלי של כל אחד מהצבענים בתערובת והמרחק שהצבענים ינועו באגרוז יאפשר לקבוע את המסה המולרית של מולקולות אותם צבענים (מידע על המסה המולרית של כל הצבענים ראו בטבלה 3). הסבר על דרך העבודה עם מכשיר אלקטרופורזה בג'ל ראו בנספח בקובץ "אנטיביוטיקה..."

**טבלה 1** - פריטים בערכה שתסופק על ידי המרכז לפיתוח ותמיכה במעבדות הביולוגיה בבתי הספר וישמשו להכנת חומרים (עמ' 2).

**טבלה 2** - מידע על ציוד וחומרים הנדרשים לביצוע ההרצה באלקטרופורזה בג'ל (עמ' 3).

**טבלה 3** - מידע על המסה המולרית של הצבענים השונים (עמ' 6).

בדפי התלמידים ההנחיות הן לחימום ג'ל שהכין הבורנט בכוסית (כלי המיועד לחימום במיקרוגל או בפלטה חשמלית). חשוב להדריך את התלמידים כיצד למזוג את הג'ל הנוזלי לתבניות.

אם המורה אינו מעוניין שהתלמידים יתנסו בעצמם במזיגת הג'ל, הבורנט יכין מבעוד מועד את הג'ל בתבנית ויכניס אותה למכל שבמכשיר האלקטרופורזה (הוראות בהמשך, פריט 3, הכנת ג'ל).

<sup>1</sup> עתידיה, גנטיקה עמ' 240, מילון מונחים עמ' 328.

<sup>2</sup> אגרוז הוא רב סוכר אותו מפיקים מאצות

**טבלה 1: פריטים בערכה שתסופק על ידי המרכז לפיתוח ותמיכה וישמשו להכנת חומרים ציוד וחומרים אלו מיועדים ל 24-30 תלמידים שיעבדו בשני סבבים (בכל סבב 4 קבוצות המונות 2-4 תלמידים)**

מספר פריט	כלים וחומרים לקבוצת תלמידים (ראו פרוט בטבלה 2)	תנאי אחסון
טמפרטורת החדר	i. 180 $\mu$ L מתילן כחול בריכוז 0.1% במבחנת אפנדורף מסומנת "מתילן כחול"	
	ii. 220 $\mu$ L אדום ניטרלי בריכוז 0.5% במבחנת אפנדורף מסומנת "אדום ניטרלי"	
	iii. 220 $\mu$ L תימול כחול בריכוז 0.1% במבחנת אפנדורף מסומנת "תימול כחול"	
	iv. 220 $\mu$ L אורנג' G בריכוז 1% במבחנת אפנדורף מסומנת "אורנג' G"	
	v. 220 $\mu$ L ספרנין בריכוז 0.04% במבחנת אפנדורף מסומנת "ספרנין"	
	vi. 250 $\mu$ L גליצרול 20% במבחנת אפנדורף מסומנת "גליצרול"	
	vii. 4 קופסאות ובהן 0.5 גרם אבקת אגרוז האבקה משמשת להכנת ג'ל אגרוז	
viii.	בקבוק ובו 350 מ"ל תמיסת בופר TAE (בריכוז 1X) + 4 מבחנות ובכל אחת מהן 50 מ"ל תמיסת בופר	מקרר

## טבלה 2: מידע על ציוד וחומרים הנדרשים לביצוע שלב ההרצה באלקטרופורזה בג'ל.

לפריטים המסומנים בכוכבית (\*) יש הסבר / פירוט ברשימת ההערות.

ציוד וחומרים אלו מיועדים ל 24-32 תלמידים שיעבדו בשני סבבים (בכל סבב 4 קבוצות, ובכל קבוצה 2-4 תלמידים)

מס'	שם הפריט תאור הפריט / מידע על הפריט	מקור הפריט	יונח על שולחן
1	אלקטרופורזה בג'ל MINIONE המכשיר כולל קופסה, 2 תבניות ומסרק. יש להניח בבסיס מכל המכשיר את משטח הפלסטיק האפור במקום המשטח השחור כדי להבחין טוב יותר בהרצת הצבעים.	השאלה	מורה
2*	140 מ"ל בופר TAE (בריכוז 1X) בקבוק ובו 140 מ"ל תמיסת בופר ומשורה בנפח 150 מ"ל.	ערכה פריט VIII	מורה
3*	ג'ל אגרוז את הג'ל יש להכין מפריטים 4-5 הוראות ההכנה מיועדות להכנת 2 תבניות ג'ל ל-2 קבוצות או: להכנת ג'ל בכוסיות ל-4 קבוצות	ערכה	מורה
4	תמיסת בופר TAE (בריכוז 1X) מבחנה ובה 50 מ"ל תמיסת בופר נפח זה של הבופר מיועד ל-2 קבוצות	ערכה פריט VIII	---
5	4 קופסאות קטנות מסומנות "אגרוז" בכל קופסה 0.5 גרם אבקת אגרוז (קופסה אחת מיועדת ל-2 קבוצות)	ערכה פריט VII	---
6	מיקרוגל או פלטת חימום מיועד להמסת הג'ל	ציוד המעבדה	מורה
7	סכין לשימוש חד פעמי (רק לתלמידים שמקבלים ג'ל אגרוז בכוס)	---	תלמיד
8	כפפות מתאימות להעברה לאחיזה של כלים חמים	---	מורה
9*	20µL מתילן כחול במבחנת אפנדורף מסומנת "מתילן כחול"	ערכה פריטים I ו-VI	תלמיד
10*	20µL אדום ניטרלי במבחנת אפנדורף מסומנת "אדום ניטרלי"	ערכה פריטים II ו-VI	תלמיד
11*	20µL תימול כחול במבחנת אפנדורף מסומנת "תימול כחול"	ערכה פריטים III ו-VI	תלמיד

תלמיד	ערכה פריטים IV VI -I	20µL אורנג' G במבחנת אפנדורף מסומנת "אורנג' G"	12*
תלמיד	ערכה פריטים V VI -I	20µL ספרנין במבחנת אפנדורף מסומנת "ספרנין"	13*
תלמיד	ערכה פריטים VI-II	30µL תערובת צבעים פריטים VI-II	14*
תלמיד	---	6 טיפים למיקרופיטור	15
תלמיד	---	מיקרופיטור בנפח 2-20 µL	16
תלמיד	---	כלי המסומן "פסולת"	17
מורה	---	נייר מגבת ובקבוק סגור ופקוק ובו אלכוהול 70% בתחילת העבודה ובסופה התלמידים יחטאו את משטח העבודה שלהם וימתינו לייבוש המשטח. <b>*לפני כל שימוש בכוהל יש לוודא כי אין אש דולקת במעבדה</b>	18
תלמיד	---	משקפי מגן, משקפיים לכל תלמיד	19
תלמיד	---	זוג כפפות לכל תלמיד	20
תלמיד	---	חלוק לעבודה במעבדה לכל תלמיד	21
תלמיד	---	נייר לבן	22

## הערות לפריטים מהרשימה שסומנו ב \*

### פריט 2 - 140 מ"ל בופר TAE (בריכוז 1X)

העבירו 140 מ"ל בופר TAE מפריט VIII שבערכה מבר אילן לבקבוק עם פקק. התלמיד יעביר את הבופר מהבקבוק למשורה. **התלמיד** ימזוג באמצעות משורה את הבופר על פני תבנית הג'ל בצד הקרוב לאלקטרודה החיובית עד שהג'ל יהיה טבול בתמיסה ואת יתרת הבופר ימזוג בצד הקרוב לאלקטרודה השלילית כך הנוזל במכל יהיה גבוה רק במעט (1-2 מ"מ) מגובה הג'ל שבתבנית. **הערה:** על פי החלטת המורה מזיגת הבופר למכל שבמכשיר תבוצע על ידי התלמיד או על ידי הבורנט.

### פריט 3- ג'ל אגרוז

להכנת פריט זה תשתמשו בפריטים 4-6.

#### לתשומת לבכם:

\* אם המורה בחר באפשרות שתלמידיו יקבלו ג'ל מוכן בתוך התבנית של המכשיר, עליכם לעבוד על פי סעיפים א - ז. במקרה זה ניתן למזוג את האגרוז לתבניות יום לפני מועד התרגיל, להשאיר בתבנית ולשמור בכלי סגור במקרר.

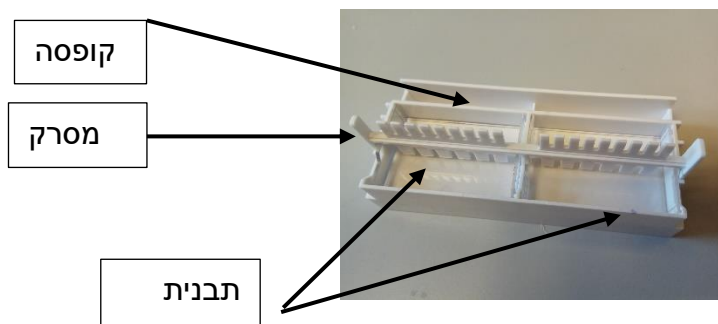
\* אם המורה בחר באפשרות שתלמידיו יתנסו ביציקת ג'ל בתבניות, עליכם לעבוד על פי סעיפים ח-יב.

### הוראות להכנת שתי תבניות של ג'ל אגרוז 1% (מיועד לשתי קבוצות)

את הג'ל חייבים להכין לשתי קבוצות בלבד ובמידת הצורך יש לחזור שוב על הוראות הכנת הג'ל בסעיפים א-ז.

- א. השתמשו ב 0.5 גרם אבקת אגרוז (קופסה אחת מפריט 5).  
- הכניסו את האבקה לארלנמאייר בנפח 100 מ"ל והוסיפו 50 מ"ל בופר TAE (מבחנה אחת מפריט 4).  
- הכניסו את הארלנמאייר למיקרוגל למשך 20-30 שניות. ניתן להמיס את הג'ל גם בפלטת חימום. חיזרו על פעולה זו עד להמסת הג'ל וקבלת תמיסה צלולה.  
\* מומלץ להכין פקק עשוי צמר גפן ועטוף בגזה המתאים לארלנמאייר ולפקוק את הכלי בזמן החימום. כמו כן, חשוב גם להימנע מחימום ממושך של התמיסה.  
\* הקפדה על פרטים אלה נועדה לשמור על הריכוז הרצוי של הג'ל שיווצר. ריכוז הג'ל שבו משתמשים בניסוי קובע את קצב נדידת הצבענים.
- ב. היעזרו בכפפות מתאימות (לכלים חמים), העבירו את הארלנמאייר והניחו אותו במקום חסין לחום כדי שהג'ל יתקרר.  
**זהירות!** בזמן הרתיחה לא ניתן להבחין בבועות. אגרוז שנשפך על היד מתקרר על היד ועלול לגרום לכוויה חמורה.
- ג. המתינו כחמש עד שבע דקות עד לקרור האגרוז. מומלץ להכניס מד טמפרטורה ולהמתין עד שהתמיסה תתקרר ל- 50°C, אך לא תתקרש.
- ד. ברשותכם מסרק משותף לשתי תבניות שאליהן מזגתם את הג'ל.  
הכניסו את המסרק ל**מרכז** תבניות הפלסטיק והמתינו עד לקרישת הג'ל (כ- 10 דקות, תלוי בטמפרטורת החדר).  
**שימו לב:** אין להזיז את התבניות עד לקרישת הג'ל (ראו תמונה 1).

### תמונה 1. קופסה ובה שתי תבניות למזיגה של ג'ל אגרוז



- ה. מיזגו 25 מ"ל אגרוז לכל אחת מתבניות הג'ל.  
כאשר הג'ל נקרש יש להוציא את המסרק בעדינות.
- ו. מיד בתום השימוש יש לשטוף את הכלי שבו הכנתם את האגרוז כדי למנוע מצב שבו שאריות האגרוז ייקרשו בכלי ויקשו על ניקיונו.
- ז. לפני העברת תבנית הג'ל למכל של אלקטרופורזה בג'ל יש להוציא בעדינות את תבנית הג'ל מהקופסה ולנגב במגבת נייר את שאריות האגרוז שבתחתיתה.  
פעולה זו חיונית כדי למנוע בעתיד היווצרות של בועיות אוויר במכשיר אלקטרופורזה בג'ל.

### הוראות להכנת ג'ל אגרוז 1% בכוסיות (מיועד ל- 4 קבוצות)

- ח. הכינו 4 כוסיות קטנות העשויות מחומר המתאים לחימום במיקרוגל.
- ט. השתמשו ב- 1 גרם אבקת אגרוז (2 קופסאות מפריט 5).  
- הכניסו את האבקה לארלנמאייר בנפח 200 מ"ל והוסיפו 100 מ"ל בופר TAE (2 מבחנות מפריט 4).  
- הכניסו את הארלנמאייר למיקרוגל למשך 20-30 שניות. ניתן להמיס את הג'ל גם בפלטת חימום. חיזרו על פעולה זו עד להמסת הג'ל וקבלת תמיסה צלולה.  
\* מומלץ להכין פקק עשוי צמר גפן ועטוף בגזה המתאים לארלנמאייר ולפקוק את הכלי בזמן החימום. כמו כן, חשוב גם להימנע מחימום ממושך של התמיסה.  
\* הקפדה על פרטים אלה נועדה לשמור על הריכוז הרצוי של הג'ל שיווצר. ריכוז הג'ל שבו משתמשים בניסוי קובע את קצב נדידת הצבענים.
- י. חזרו על סעיפים ב ו-ג.
- יא. מיזגו 25 מ"ל אגרוז לכל כוסית קטנה וכסו בנייר פרפילם. שמרו את הכוסיות בקירור.
- יב. מיד בתום השימוש יש לשטוף את הכלי שבו הכנתם את האגרוז כדי למנוע מצב שבו שאריות האגרוז ייקרשו בכלי ויקשו על ניקיונו.

### לתשומת לבכם:

בתרגיל "קשת צבעים" כדי לראות בצורה מיטבית את הרצת הצבעים באגרוז, מומלץ להחליף את המשטח השחור בתחתית מכל השקוף למשטח אפור. בתום השימוש חשוב להחזיר את המשטח השחור לבסיס המכל השקוף.

### פריט 9- מתילן כחול

- להכנת פריט זה תשתמשו בפריט 1 | מטבלה 1.
- הוראות הכנה לצבען מתילן כחול לארבע קבוצות:
- א. באמצעות עט לסימון על זכוכית רשמו "מתילן כחול" על כל אחת מ- 4 מבחנות אפנדורף.
- ב. העבירו לכל מבחנה מסומנת "מתילן כחול" 20  $\mu$ L נוזל ממבחנת אפנדורף שבערכה (פריט 1) ל-4 מבחנות האפנדורף המסומנות "מתילן כחול".

### פריט 10- אדום ניטרלי

להכנת פריט זה תשתמשו בפריטים II מטבלה 1.  
חזרו על ההוראות בסעיפים א-ב בפריט 9, עם **הצבען אדום ניטרלי**.

### פריט 11- תימול כחול

להכנת פריט זה תשתמשו בפריטים III מטבלה 1.  
חזרו על ההוראות בסעיפים א-ב בפריט 9, עם **הצבען תימול כחול**.

### פריט 12- אורנג' G

להכנת פריט זה תשתמשו בפריטים IV מטבלה 1.  
חזרו על ההוראות בסעיפים א-ב בפריט 9, עם **הצבען אורנג' G**.

### פריט 13- ספרנין

להכנת פריט זה תשתמשו בפריטים V מטבלה 1.  
חזרו על ההוראות בסעיפים א-ב בפריט 9, עם **הצבען ספרנין**.

### פריט 14- תערובת צבעים

להכנת פריט זה תשתמשו בפריטים VI-II מטבלה 1.  
את תערובת הצבעים יש להכין בסמוך לתחילת הניסוי (עד כשעה לפני תחילת הניסוי)  
**הוראות הכנה לתערובת צבעים המיועדת לארבע קבוצות:**

- הכניסו למבחנת אפנדורף  $20\mu\text{L}$  מכל אחד מהצבעים : אדום ניטרלי, תימול כחול, אורנג' G, ספרנין.
- הוסיפו  $80\mu\text{L}$  גליצרול 20% למבחנת האפנדורף.
- בעזרת וורטקס ערבבו את תכולת המבחנה למשך 10 שניות.
- באמצעות עט לסימון על זכוכית רשמו "תערובת צבעים" על כל אחת מ-4 מבחנות אפנדורף.
- העבירו  $40\mu\text{L}$  נוזל ממבחנת אפנדורף לכל מבחנה המסומנת "תערובת צבעים".

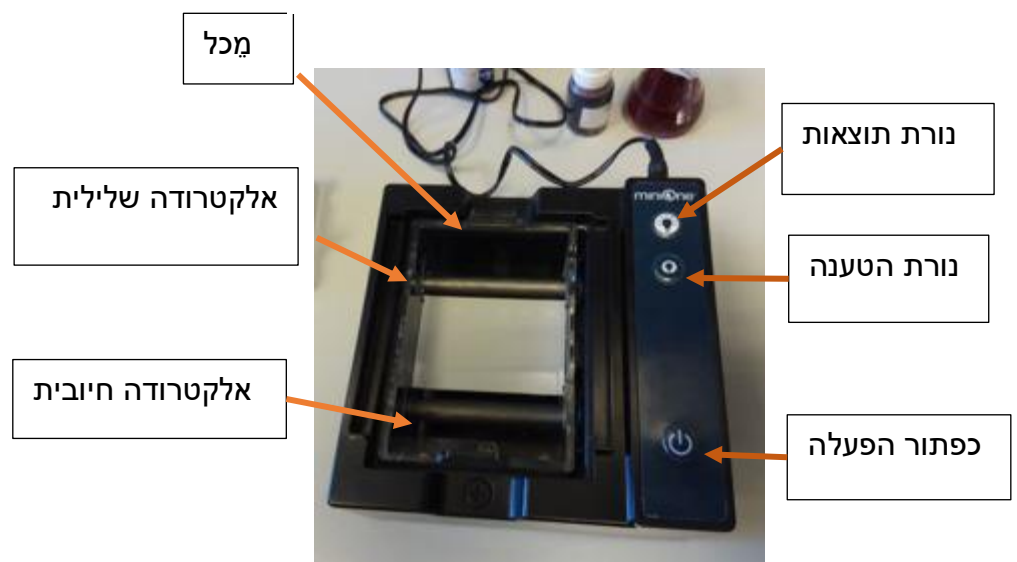
### נהלי בטיחות

- במהלך ביצוע התרגיל יש להשתמש בכפפות, חלוק ובמשקפי מגן.
- 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 נאות בחומרים ובכלים ע"פ כללי הבטיחות והנחיות [בחוזרי הבטיחות](#) המתפרסמים באתר מפמ"ר ביולוגיה ולעבוד על פי ההנחיות שהתפרסמו בהם ("חוזר המנכ"ל החדש והמעודכן לבטיחות במעבדה מרץ 2015").

### טבלה 3: תכונות הצבענים (פריטים 1-5)

מיקום בג'ל	שם הצבען	מסה מולרית (gr/mole)	מטען חשמלי	צבע המתקבל בג'ל
1	מתילן כחול	319	+	כחול
2	אדום ניטרלי	289	+	אדום כתום
3	תימול כחול	466	-	צהוב
4	אורנג' G	452	-	כתום-צהוב
5	ספרנין	351	+	אדום-ורוד

### תמונה 2: מכשיר אלקטרופורזה בג'ל



### ..יש להקפיד על כך ש:

1. לפני תחילת הניסוי כל הציוד והחומרים נמצאים על המגש בהתאם לרשימת החומרים.
2. התלמידים ישתמשו בטיפ חדש בכל מעבר מחומר אחד לאחר.

### המלצה:

ראו סרטון המדגים הטענת נוזל באגרז

<https://www.youtube.com/watch?v=tTj8p05jAFM>