

קשת צבעים

תרגיל שימוש במכשיר אלקטרופורזה בג'ל, למורה תאריך עדכון: 9.2.19

<ul style="list-style-type: none"> • התלמידים ילמדו את העקרונות עליהם מבוססת העבודה עם מכשיר אלקטרופורזה בג'ל. • התלמידים יתנסו בעבודה עם מכשיר אלקטרופורזה בג'ל. 	תמצית מידע על התרגיל:
הידע והמימוניות שירכשו בתרגיל יהוו בסיס לניסויים בהם נבדקת נוכחות של קטעי DNA מסוימים, הפרדה של קטעי DNA, זיהוי של קטעי DNA.	חשיבות ביצוע התרגיל:
ניסיון בעבודה עם מיקרופיטור	מיומנות קודמת שנדרשת:
בחטיבה העליונה (כיתות יא, יב)	מתאים לתלמידים:
שיעור עיוני אחד להיכרות עם הציוד ושיטת העבודה שני שיעורים במעבדה (שיעור אחד לכל סבב של 4 קבוצות)	הזמן הנדרש:

הקובץ כולל הקדמה, הסבר לגבי כל אחד משלבי התרגיל, תשובות לשאלות המשולבות בדפי העבודה לתלמידים ותוצאות צפויות.

הפניות לסעיפי ביצוע או לשאלות שבדפי התרגיל לתלמידים רשומות בסוגריים.

הקדמה:

אלקטרופורזה בג'ל (gel electrophoresis) היא שיטה המאפשרת להפריד רכיבים מתוך תערובת. ההפרדה מתבצעת בג'ל אגרוז¹ אותו מניחים בתוך מכל שיש בו תמיסת בופר (TAE)² המוליכה חשמל. (שאלה 2)

בביולוגיה מולקולרית משתמשים באלקטרופורזה בג'ל כדי להפריד בין מולקולות כגון DNA, RNA וחלבונים, כדי לבדוק נוכחות של קטעי DNA מסוימים וכדי לקבוע את הגודל של קטעי DNA המצויים בתערובת. למולקולות DNA יש מטען חשמלי שלילי, ולכן במכשיר אלקטרופורזה בג'ל קטעי DNA ינועו לכיוון הקוטב החיובי. קטעים קצרים ינועו מהר יותר מאשר קטעים ארוכים. פירוט בנושא זה ראו בנספח "הפרדת קטעי DNA באמצעות מכשיר אלקטרופורזה בג'ל" שבקובץ "אנטיבייטיקה, כמוסת הקסם? ניסוי: זיהוי גן לעמידות באמצעות PCR ואלקטרופורזה בג'ל".

¹ אגרוז הוא רב סוכר המופק מאצות. ג'ל אגרוז הוא חומר מוצק למחצה

² בתמיסת בופר TAE ה-pH הוא 8 ונשמר פחות או יותר קבוע.

בתרגיל "קשת צבעים" התלמידים יכירו את עקרונות הפעולה של מכשיר אלקטרופורזה בג'ל באמצעות הרצת צבענים (פיגמנטים) שונים בג'ל. לצבענים מסה מולרית³ שונה. ככל שהיא גדולה יותר, כך מולקולות הצבען ינועו בג'ל לאט יותר. חלק מהצבענים הם בעלי מטען חשמלי חיובי וחלקם בעלי מטען שלילי. בקצה אחד של הג'ל יש אלקטרודה חיובית ובקצהו האחר – אלקטרודה שלילית⁴. כאשר מחברים את המכל שבו נמצאת תמיסת בופר TAE למקור מתח מתחילה נדידה של רכיבים בחללים הזעירים שבג'ל: אלה שמטענם חיובי ינועו לאלקטרודה השלילית ואלה שמטענם שלילי ינועו לאלקטרודה החיובית (שאלה 1ב). ככל שמספר המטענים החיוביים במולקולת הצבען גדול יותר, כך המולקולה תנוע מהר יותר לכיוון האלקטרודה השלילית, וככל שמספר המטענים השליליים גדול יותר, כך המולקולה תנוע מהר יותר לכיוון האלקטרודה החיובית. (שאלה 3)

מולקולות הצבענים נבדלות זו מזו במבנה המרחבי. ככל שהוא מסועף יותר כך ינועו לאט יותר לסיכום, מהירות תנועת מולקולות הצבענים מושפעת מהמסה המולרית, מהמטען החשמלי ומעוצמתו ומהמבנה המרחבי של המולקולות.

הערה: בהקדמה לתרגיל (דפים לתלמיד עמוד 1) מתוארת אנלוגיה שמטרתה להמחיש את עיקרון הפעולה של מכשיר אלקטרופורזה בג'ל. חשוב לציין שהאנלוגיה היא חלקית: היא כוללת התייחסות לכושר התנועה של רכיב גדול לעומת רכיב קטן בסביבה צפופה, אך אין בה התייחסות לצורה המרחבית של הרכיבים ולתנועה כתוצאה ממשיכה כמו זו הקיימת בג'ל המצוי בשדה החשמלי שבמכשיר האלקטרופורזה.

התלמידים יטעינו צבען שונה בכל אחת מהבאריות 1-5 שבמכשיר אלקטרופורזה בג'ל ובבארית הימנית ביותר (מספר 6), יטעינו תערובת של צבענים שזהותם לא ידועה. לאחר פרק זמן התלמידים יעצרו את פעולת המכשיר ויבדקו את כל ה"פסים" (bands) בג'ל. כדי לפענח את התוצאות התלמידים ישוו את הפסים שיקבלו בבארית 6 (תערובת הצבענים) לאלה שיקבלו בבאריות 1-5. ראוי לשים לב לכך שבתרגיל זה לא ניתן לבודד תכונה אחת של הצבענים ולבדוק את השפעתה על המרחק שנעות המולקולות בג'ל. המרחק מושפע מכל התכונות שצוינו לעיל.

³ מסה מולרית היא המסה בגרמים של מול אחד של חומר
⁴ כאשר מריצים DNA (שהמולקולות שלו הן בעלות מטען חשמלי שלילי) יש במכשיר אלקטרופורזה בג'ל רק אלקטרודה חיובית

טבלה: תכונות הצבענים

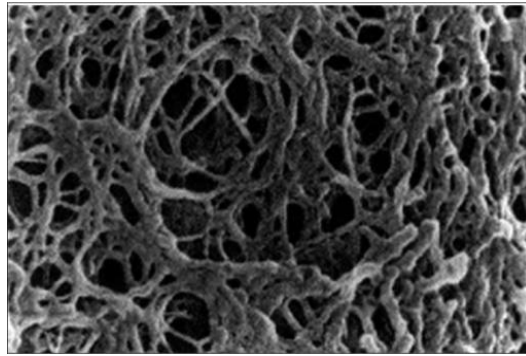
מסה מולרית (gr/mole)	שם הצבען	מס' מבחנה
319	מתילן כחול	1
289	אדום ניטרלי	2
466	תימול כחול	3
452	אורנג' G	4
351	ספרנין	5

הערות לשלבי העבודה

הכנת ג'ל

אגרוז הוא פולימר ארוך וישר המופק מאצה אדומה ומורכב ממולקולות של גלקטוז המחוברות זו לזו. כאשר ממיסים את האגרוז ומחממים אותו מבנה הפולימר משתנה ונוצרת תערובת של סיבים מסולסלים הנקשרים זה לזה בקשר כימי. כאשר מקררים את התמיסה נוצר מבנה דמוי ג'ל ובו חללים זעירים (תמונה 1). בחללים אלה נעים החומרים שהוטעמו בבאריות שבג'ל (שאלה 1א).

את הג'ל מכינים בארלנמייר שמוסיפים לו אבקת אגרוז ותמיסת בופר TAE ומחממים את התערובת במיקרוגל או על פלטת חימום עד שמתקבלת תמיסה צלולה.



תמונה 1: home.sandiego.edu/~josephprovost/AGAROSE%20GELS.pdf

מומלץ להכין פקק עשוי צמר גפן ועטוף בגאזה המתאים לארלנמייר 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 בתרגיל קובע את קצב נדידת הצבענים (שאלה 4).

כאשר התמיסה מתקררת והטמפרטורה בה היא כ- 50°C מוזגים אותה לתבנית ובה מסרק. לאחר שהג'ל נקרש לגמרי אוחדים את המסרק בשני צדדיו ומוציאים אותו בעדינות מהג'ל. בג'ל נשארות באריות (שקעים קטנים).

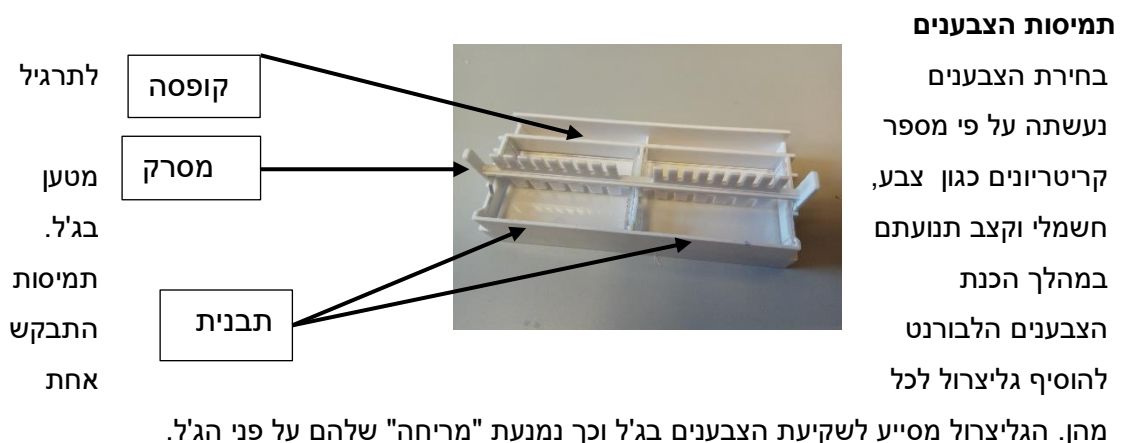
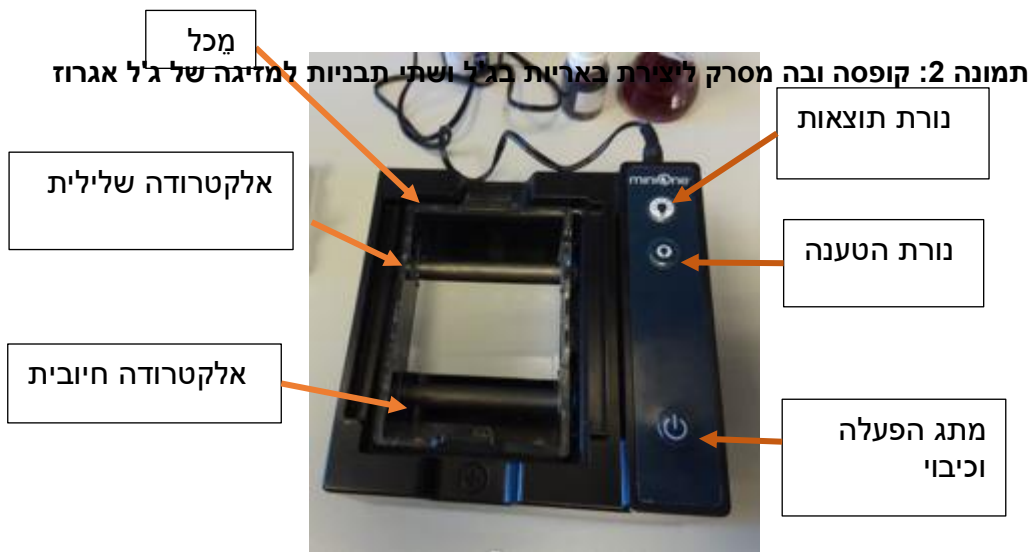
כאשר הג'ל מוכן להטענה, מומלץ להיעזר בלבורנט ולהוציא בעדינות את התבנית עם הג'ל המונחת בקופסה, ולהניחה על דף נייר. חשוב להרים את התבנית ולנקות עם נייר סופג את שאריות הג'ל שעל תחתית התבנית ועל שוליה ניקוי התבנית יבטיח הרצה תקינה בג'ל.

לתשומת לבכם:

- הבאריות בתרגיל זה, שלא כמו במקרים בהם נבדקים קטעי DNA, ממוקמות במרכז הג'ל (תמונה 2), כדי שהצבענים יוכלו לנוע על פי מטענם החשמלי (לכיוון אלקטרודה חיובית או אלקטרודה שלילית).
- יש לחזור על ביצוע סעיפים ח-כ שבדפי התרגיל לתלמיד, עם כל קבוצת תלמידים בנפרד.
- חשוב להקפיד ולשמור על כללי הבטיחות בעבודה עם כלים ונוזלים בטמפרטורה גבוהה.
- בדפים לתלמיד ההנחיות הן לחימום ג'ל שהלבורנט הכין בכלי המיועד לחימום במיקרוגל או בפלטה חשמלית. חשוב להדריך את התלמידים כיצד למזוג את הג'ל הנוזלי לתבניות.

- אם אין ברצונכם שהתלמידים יתנסו בעצמם במזיגת הג'ל, הודיעו על כך ללבורנט כדי שהוא יכין מבעוד מועד את הג'ל בתבנית ויכניס אותה למכל שבמכשיר האלקטרופורזה (הוראות לביצוע ראו בדפים ללבורנט).

תמונה 3: מכשיר אלקטרופורזה בג'ל



תמיסת בופר TAE (Tris Acetate-EDTA):

תמיסת הבופר משמשת הן כממס של האגרז והן כנוזל הרצה של הצבענים בג'ל.



תמונה 3: הרצת הצבענים בג'ל. צוות ביולוגיה, תיכון עירוני ה מודיעין

היונים שבתמיסה חיוניים להולכה של זרם חשמלי בג'ל. הודות לה גם נשמר pH פחות או יותר קבוע בתמיסה.

הטענת דגימות למכשיר אלקטרופורזה

בג'ל:

כדי שהפרדת הצבענים תראה באופן ברור צריך לוודא שתחתית הפלסטיק שבמכל המכשיר צבעה אפור ולא שחור. מכניסים את התבנית ובה הג'ל למכל המכשיר. מוזגים תמיסת בופר TAE כך שהתמיסה תכסה קלות את הג'ל (1-2 מ"מ). לוחצים על נורת ההטענה (תמונה 3) ומטעינים את דגימות הצבע על פי ההנחיות בדפים לתלמיד. בתום ביצוע התרגיל על ידי קבוצה אחת של תלמידים יש לשפוך בעדינות את הבופר TAE שבמכל אל כלי איסוף ולנגב בנייר סופג את הדפנות החיצוניים של המכל ואת הדפנות הפנימיים של המכשיר.

הפעלת מכשיר האלקטרופורזה בג'ל

הוראות בטיחות

- במהלך כל העבודה המעשית התלמידים ישתמשו בכפפות⁵, חלוק ומשקפי מגן.
- יש להקפיד כי סביבת המכשיר תהיה יבשה מנוזלים.
- יש להניח את המכסה הכתום על מסגרת מכשיר האלקטרופורזה בג'ל, לקבל את אישור המורה וללחוץ על מתג ההפעלה. מכסה שלא הונח כראוי ימנע את הפעלת המכשיר.
- המכסה מגן על המשתמש מקרינה הנפלטת ממנורת הLED.
- בזמן פעולת המכשיר חל איסור לפתוח את המכסה הכתום.

⁵ לתלמידים הרגישים ללטקס יש לספק כפפות כחולות (ללא לטקס)

- בסיום התהליך, יש ללחוץ על מתג הכיבוי ולנתק את המכשיר מהחשמל, ורק לאחר מכן מותר להוציא את הג'ל מהמכל.

סיכום תוצאות

חשוב להסביר לתלמידים כי

- "קשת צבעים" הוא תרגיל התנסות בעבודה עם מכשיר אלקטרופורזה בג'ל והכרת חשיבותו בהפרדת חומרים על פי תכונותיהם. גורמים אחדים משפיעים על מהירות התנועה של הצבענים ולא תמיד. ולכן לא נוכל להסביר את המרחק שעברו הצבענים בג'ל על פי תכונה אחת בלבד. בפועל זה גם סוג של חידה, בה התלמידים מפענחים אלו צבענים כלולים בתערובת.
- תנועת הצבענים בתערובת הייתה דומה מאוד לתנועה של כל צבען בנפרד, אך בשל ריכוז נמוך יותר של הצבענים בתערובת צבעם בהיר יותר.
- זיהוי מיקום הצבען לאחר פרק זמן קבוע מאפשר להתייחס לתוצאות כמרחק שעבר כל צבען מהבארית או למהירות תנועתו בג'ל.

מיהם הצבענים הכלולים בתערובת? (שאלה 5)

כפי שניתן לראות בתמונה 3, הצבענים שהיו בבאריות 1-5 נדדו על פי מטענם החשמלי למרחקים שונים בג'ל.

מתילן כחול (בארית 1), אדום ניטרלי (בארית 2) וספרנין (בארית 5), הם בעלי מטען חיובי ולכן נעו לכיוון האלקטרודה השלילית. תימול כחול (בארית 3) ואורנג' G (בארית 4), הם בעלי מטען שלילי ולכן נעו לכיוון האלקטרודה החיובית.

בארית 6 הוטענה בתערובת הצבענים אדום ניטרלי, תימול כחול, אורנג' G וספרנין. ניתן לראות הפרדה של 4 צבענים שחלקם נעו בג'ל לכיוון האלקטרודה החיובית וחלקם נעו לכיוון האלקטרודה השלילית. ניתן לקבוע את סוג הצבענים שבתערובת על פי השוואה למיקום כתמי הצבע של הצבענים בבאריות 1 – 5 שבג'ל.