<u>למורה: הגברת גנים ב PCR וזיהוי גנים של החיידק אגרובקטריום באלקטרופורזה בג'ל</u>

<u>2.8.20</u>

תמצית מידע על הניסוי:	הניסוי משלב שיטות עבודה בביולוגיה מולקולרית להגברת קטעי DNA באמצעות מכשיר ה- PCR עם שיטות עבודה וניסויים בתחום המיקרוביולוגיה ובתחום האקולוגיה והביולוגיה של התא.
מתאים לנושאים בתכנית הלימודים:	• אקולוגיה: יחסי גומלין, תהליכים אבולוציונים, התערבות האדם בטבע: הדברה • התא: מבנה התא האאקריוטי והפרוקריטי, מבנה ה-DNA, הכפלת DNA, מ- DNA לחלבון, בקרת ביטוי גנים, מחזור חיי התא ומיטוזה, נשימה תאית ופוטוסינתזה • עקרונות בהנדסה גנטית, בקרה על ביטוי גנים והנדסה גנטית (נושא בחירה להעמקה) • חיידקים ונגיפים בגוף האדם (נושא בחירה להעמקה)
מתאים לתלמידים:	בחטיבה העליונה (כיתות יא ,יב)
ידע קודם נדרש:	1. מבנה DNA, הכפלת DNA, מ DNA לחלבון 2. מחזור התא ומיטוזה 3. יחסי גומלין בטבע 4. פלסמיד כנשא של חומר תורשתי 5. מהי תערובת האנזים ***hermus aquaticus*** - TAQ 6. מהו פריימר / תחל 7. מהי תערובת הבסיסים. 8. העקרונות עליהם מבוססת שיטת ה-PCR ואת המחזוריות בתהליך. היכרות עם כלים ושיטות עבודה בביולוגיה מולקולרית: שימוש במיקרופיפטורים, <u>מושגים:</u> בסיסים חנקניים, הכפלת DNA, DNA פולימראז תחלים – פריימרים, תהליך ה- PCR, זריעת בידוד, תא פרוקריוטי, פלסמיד, הדבקה, טפילות
לוח זמנים מומלץ: **בין 8 – 7 שיעורים**	שיעור מבוא: חומר רקע נדרש ועקרונות ה PCR שני שיעורים במעבדה לביצוע תהליך ה- PCR שיעור מבוא: אלקטרופורזה בג'ל עקרונות השיטה שיעור להכנת הג'ל, שיעור הרצת תוצרי ה- PCR בג'ל. שיעור אחד עד שניים לסיכום התוצאות ולדיון בתוצאות ובמסקנות

אסטרטגיות חשיבה מסדר גבוה:	• שילוב חשיבת חקר על כל שלביה מהתצפית ועד להסקת מסקנות תוך מתן דגש להבנת חשיבותה של בקרה, חשיבותם של קבועים וחזרות במערך ניסוי
מיומנויות טכניות נדרשות	• שימוש במיקרופיפטור.
ניסויים מקדימים שמומלץ שהתלמיד יתנסה בהם	• מומלץ לפתוח את הפעילות בתירגול עבודה עם מיקרופיפטורים. • אנטיביוטיקה, כמוסת הקסם – שימוש ב PCR • צבעי הקשת – תרגיל בשימוש בג'ל אגרוז

<u>רקע:</u>

- על שיטת ה- PCR ניתן בניסוי המקדים: אנטיביוטיקה גלולת הקסם
- רקע על שיטת אלקטרופורזה בג'ל ניתן בניסוי המקדים: "קשת צבעים"
- רקע על PCR ועל אלקטרופורזה בג'ל בדף לתלמיד
- רקע על PCR ועל אלקטרופורזה בג'ל בחומרי הלמידה המומלצים לנושא ההעמקה "בקרת ביטוי גנים והנדסה גנטית"

<u>מטרות</u>

הערכה מזמנת לתלמיד פעילות חקר החוצה רמות ארגון בביולויגה- החל מרמת המולקולה, DNA, דרך רמת התא ועד לרמת האורגניזם, אוכלוסיה ומערכת אקולוגית.

התלמידים יבינו את הקשר שבין תגלית מדעית, נוכחות גן שמקורו בחיידקים בתאי צמח, לבין שיטות יישומיות בביולוגיה מולקולרית לאבחון וזיהוי הגן.
הבנת יחסי הגומלין בין החיידק אגרובקטריום לבין הצמח המאכסן ועל ההשלכות של יחסי גומלין אלה על הצמח.

התלמידים יבינו שב-DNA שמצוי על הפלסמיד Ti DNA ישנו מידע תורשתי ייחודי לחיידק ובאמצעות שיטות מולקולריות ובדרכים נוספות כמו ביטוי חלבונים (קישור לניסוי טרנספורמציה) – ניתן לזהות אם צמחים מודבקים בחיידק האגרובקטריום.

הערכה מזמנת פעילות מעשית בכיתה ומגוון רחב של אפשרויות לעבודת חקר במסגרת הביוחקר.

<u>רקע לניסוי – זיהוי גנים שמקורם בפלסמיד של חיידקי האגרובקטריום</u>

כדי לחקור את המצאות / נוכחות ה-DNA של חיידק אגרובקטריום בתאי הצמח, יש צורך בהכפלת מקטע DNA ייחודי של החיידק ולקבל כמות גדולה של המקטע המוגבר.

כדי לקבל כמות DNA משמעותית נשתמש במכשיר ה - PCR - Polymerase Chain Reaction**.**

טכנולוגית ה –PCR מאפשרת לנו בסוף התהליך לצפות ב - DNA של חיידק שאינו נראה לעין ולזהות גנים ייחודיים באמצעות שיטת האלקטרופורזה בג'ל.

מחקר המבוסס על טכנולגיות אלו תורם להבנה של עקרונות ותהליכים ביולוגיים כמו שונות בין יצורים שונים, להבין תהליכים אבולוציוניים, לאבחן מחלות תורשתיות, ולהבין את התרומה המשמעותית להיבטים של רפואה משפטית.

במהלך התהליך התלמיד יבצע הגברת שני מקטעים ספציפיים מתוך ה-DNA הפלסמידי של החיידק אגרובקטריום.

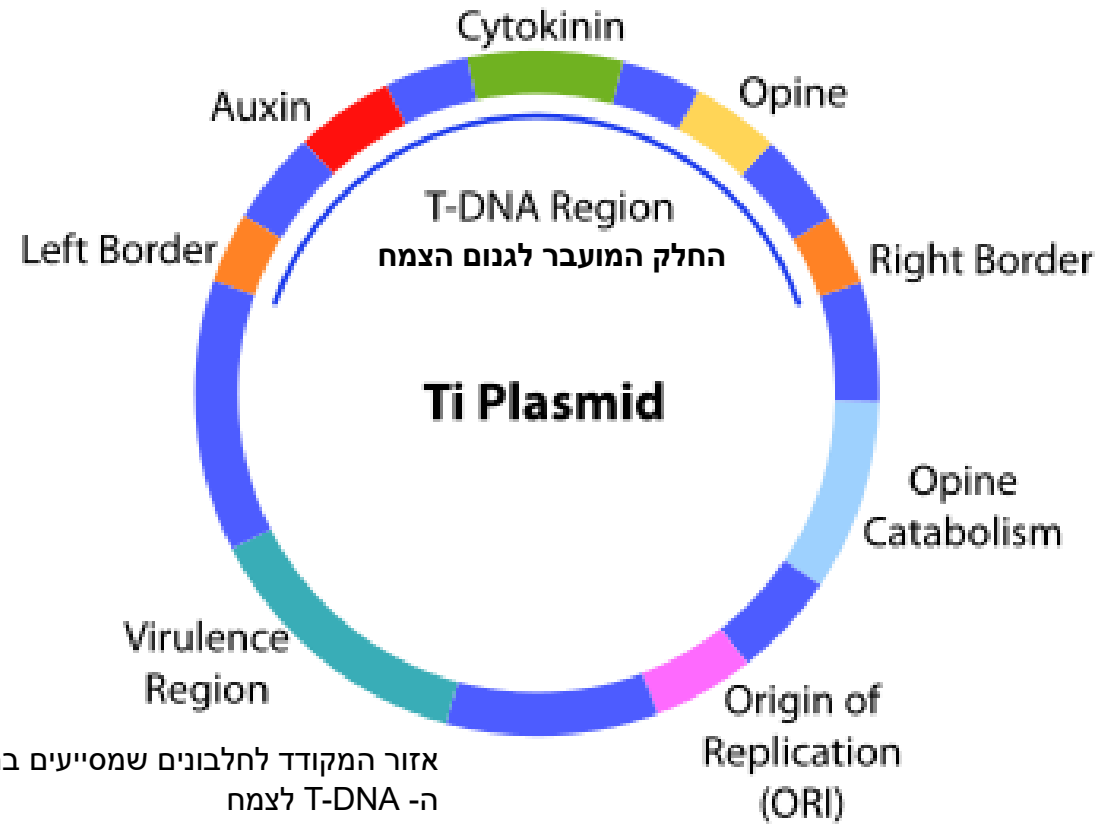
בחיידק אגרובקטריום מצוי פלסמיד המכונה Ti – Plasmid אשר חלק ממנו הוא מקטע המכונה T-DNA המועבר אל מקום אקראי בתוך ה-DNA הגנומי הנמצא בגרעין של תא צמח אותו החיידק מדביק. תהליך ההעברה דורש את נוכחותם של גנים המכונים Vir אשר נמצאים על הפלסמיד.

חוקרים מנצלים מערכת זו כדי להנדס גנטית צמחים.

אורך ה- T-DNA החיידקי הוא כ-24,000 זוגות בסיסים, ומכיל גנים המקודדים לאנזימים שמסנתזים אופינים (Opines - חומצות אמיניות ייחודיות) והורמונים צמחיים. על ידי העברת ה- T-DNA לגנום הצמח, החיידק משנה את בקרת ביטוי הגנים וגורם ליצירת גידול, וכן מזון המתאימים להתרבות חיידק כמו חומצות אמיניות מסוג Opine וסינתזת ההורמונים הצמחיים אוקסין וציטוקינין מאפשר את השגשוג של תאי הצמח ויצירתם של עפצים מסוג עפץ הכתר (Crown Gall).

תמונה 1: Ti plasmid

מתוך: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ti_plasmid_gl.svg



אזור המקודד לחלבונים שמסייעים בהעברת ה- T-DNA לצמח

הפקת הפלסמידים תעשה בשיטת ה- Colony PCR על – ידי העלאת טמפרטורה של תרבית חיידקים ל – 95°c למשך 10 דקות. בתנאים אלו החיידק עובר ליזיס ודנטורציה של חלבונים אך ה DNA לא נפגע, אלא משתחרר אל התמיסה ומהווה תבנית לשכפול הגנים בתהליך ה- PCR.

נעשה שימוש ב-PCR על מנת ליצור עותקים רבים של ה-DNA של מקטעים פלסמידיים מהחיידק אגרובקטריום וכן מקטעי DNA מחיידקי ביקורת שליליים.

בניסוי זה מגבירים את הגנים VirDC ו- VirDE המצויים בפלסמיד Ti-DNA. לגנים אלה תפקיד עיקרי ביכולת של החיידק להחדיר את הפלסמיד לתאי הצמח והם ייחודיים לחיידקי אגרובקטריום, כגון החיידק ריזוביום רדיובקטר.

נקבל תוצר בגודל 224bp מקורו בגן הוירולנטי VirDC

ותוצר בגודל 338bp מקורו בגן הוירולנטי VirDE

בביקורות השליליות כלומר – מצע גידול ללא חיידקים ורקמה בריאה של גזר לא אמור להתקבל תוצר כלשהו.

<u>נהלי בטיחות:</u>

- במהלך השיעור התלמיד ילבש כפפות וחלוק וירכיב משקפי מגן.
- הפעלת מכשיר ה- PCR והפסקת פעולתו תעשה רק באישור המורה
- יש לנקות את שולחן העבודה בתחילת הניסוי ובסופו בצמר גפן טבול באלכוהול 70%.
- מומלץ מאוד לתרגל עבודה באופן סטרילי כדי למנוע זיהום של הדגימות על ידי חומרים ביולוגים או ריאגנטים.
- יש לנקוט משנה זהירות בעת עבודה עם ציוד חשמלי.
- יש להקפיד על שטיפת ידיים לאחר טיפול בחומרים ביולוגיים או ריאגנטים.
- בתום הניסוי יש להקפיד על טיפול נאות על פי כללי הבטיחות והנחיות של ריאגנטים וחומרים המכילים שאריות DNA וחיידקים.

  כל הפסולת הביולוגית מועברת לשקיות –Biohazard שיעברו טיפול באוטוקלאב בסיום הניסוי

<u>שלב ההכנה לשלב ההגברה ב PCR:</u>

א. תכנות ל $95^{o}C$ constant temperature למשך 10 דקות
התוכנית של הפרוטוקול הבא תקרא "Agro95". בשלב זה קרומי התאים של החיידקים נהרסים ותוכנם, כולל הפלסמיד, נשפך אל תוך המבחנה. כך נחשפת תבנית ה- DNA ממנה יוגברו הגנים במהלך התהליך.

ב. תכנות מכשיר ה-PCR בהתאם להנחיות הבאות:

התוכנית של הפרוטוקול הבא תקרא "virD".

תכנות מכשיר ה- PCR

מספר מחזורים	טמפרטורה (^{o}C)	זמן
1	95	300 שניות
30	94	45 שניות
	60	45 שניות
	68	45 שניות
1	68	180 שניות
		כ 76 דקות

שאלות לתלמידים ותשובות:

ענו על השאלות הבאות:

1. קבעו איזו צלחות פטרי, A או B הכילה חיידקי אגרובקטריום. נמקו את קביעתכם.

תשובה: בדגימות שמקורן בצלחת A קיבלנו לאחר הגברה ב PCR והרצה בג'ל אלקטרופורזה, שני מקטעים (בנדים) של DNA בגדלים מתאימים (בהשוואה ל Ladder) ולכן סביר שהחיידקים בצלחת A היו מהסוג אגרובקטריום.

בדגימות שמקורן בצלחת B לא קיבלנו מקטעים של DNA ולכן סביר שהחיידקים בצלחת B היו מהסוג שאינו מכיל את גנים אלו ב- *E. coli* .

2. הציעו הסבר לכל אחת מהתוצאות המתוארות בסעיפים א-ד:

א. התקבל תוצר גם בביקורת השלילית.

הדגימות היו מזוהמות, לא עבדנו סטרילי.

ב. התקבל תוצר בביקורות החיוביות, אך לא בדגימות / בגדלים מתאימים.

התחלים לא תוחמים קטעים בגודל הנתון, שימוש בתחלים לא מתאימים, דגרדציה/פירוק של מקטעי ה- DNA במהלך ההרצה בג'ל (מומלץ לבחון אם קיימת תופעה דומה גם בסמן הגדלים)

ג. לא התקבלו מקטעי DNA באף אחד מהמקרים, כולל לא בסולם הגדלים של ה- DNA.

במקרה זה, מכיוון שלא התקבלו מקטעי DNA גם בסולם הגדלים זביר להניח כי יש בעיה בג'ל האגרוז (הוא למשל מזוהם בנוקלאזות) הגורם לפירוק מקטעי ה- DNA תוך כדי ההפרדה בג'ל.

ד. בדגימות שלכם התקבל תוצר נוסף על התוצרים הצפויים שגודלו שונה מהצפוי.

התוצר הנוסף הוא תוצאה של קישור התחלים למקטעים נוספים או קישור זוגות התחלים ביניהם ויצירת דימר באורך קצר ביותר, או תוצאה של זיהום.

שאלות אפשריות נוספות:

3. רשמו דוגמה המסבירה מהי החשיבות של טכנולוגיית ה- PCR בתחום הרפואה? - הסבירו מדוע המצאת המכשיר היתה פריצת דרך טכנולוגית?

תשובה:

- זיהו מחלות גנטיות או מוטציות בגנים.

ניתן להפיק DNA מתאים של אדם בריא ומתאים של אדם שמשערים שחולה במחלה גנטית מסוימת, ומשווים את קטעי ה-DNA. ניתן לזהות את המוטציה אם קיימת לפי השינויים בגודל המקטעים בעקבות המוטציה ואף להתאים את הטיפול לפי סוג המוטציה. (סוג המוטציה עשוי להתבטא גם בהבדלים באורך הגן המשוכפל)

- הגברת מקטעי DNA לצורך בדיקת רקמות או לצורך זיהוי פלילי
- בידוד מקטע גן לצורך החדרתו ליצור אחר בשיטות של הנדסה גנטית
- דוגמאות נוספות ניתן למצוא בחומרי הלמידה המומלצים לנושא ההעקמה "בקרת ביטוי גנים והנדסה גנטית".

4. מהו היתרון בהגברת שני גנים על פני גן אחד.

תשובה: הגברת שני גנים שמקורם באגרובקטריום וקבלת תוצר בשניהם, לעומת אי קבלת תוצר בשניהם באי קולי מגדילה את מהימנות המסקנות לגבי קביעת סוג החיידק. למעשה מדובר בשני ניסויים כשאחד מאשר את השני ולהיפך.

5. מדוע לדעתך נבחרו רק שני גנים להגברה באמצעות מכשיר ה – PCR?

הגברת DNA בשימוש ב PCR הוא תהליך יקר, ככל שנחסוך במספר המקטעים המוגברים – המשוכפלים נחסוך משאבים וכן נחסוך את משך זמן התהליך.

6. מדוע בחרו דווקא בשני גנים אלו?

.
גנים אלה נמצאים על הפלסמיד הייחודי לחיידקי אגרובקטריום, לעומת למשל גנים אחרים שמצויים על גם על פלסמידים אחרים או בגנום החיידק, אשר עשויים להיות קיימים גם בגנום של חיידקים אחרים. הגברת גנים ייחודיים לאגרובקטריום, כמו אלה המוגברים בניסוי, מאפשרים להסיק מסקנות מהימנות בקשר לזהותו של החיידק.

7. הסבר מהו תפקיד תערובת התחלים – פריימרים שהוספנו בתהליך?
- הסבירו האם התחלים ייחודיים לגן אותו רוצים לשכפל?
- הסבירו מדוע לכל גן שני פריימרים שונים.

תשובה: תחל הוא קטע קצר של DNA (כ- 20 נוקלאוטידים) המסייע בתהליך שכפול של DNA במבחנה. רצף הבסיסים החנקניים בקטע זה מתאים לרצף קצר המצוי בתחילת הגן אותו רוצים לשכפל (קצה 3') ותחל נוסף מתאים לרצף בסיסים חנקניים המצוי בסופו של גן זה (קצה 5').
לכל מבחנת PCR, מוסיפים תערובת של שני תחלים המתוכננים במיוחד עבור שכפול הגן הרצוי (תחל שנצמד לקצה 3' הוא "תחל קדמי - F" ותחל שנצמד לקצה 5' הוא "תחל אחורי- R").
התחל משמש כאתר להתחלת שכפול באמצעות האנזים DNA פולימראז.
סיום השיכפול נקבע על ידי משך הזמן של השיכפול שמוגדר במכשיר – כלומר משך הזמן לשכפול מספר מסוים של נוקלאוטידים.

8. הסבר מהי החשיבות של הוספת תערובת האנזימים TAQ לתהליך?
- מהי הטמפרטורה בה פעילים האנזימים? מהו לדעתך מקור אנזימים אלו?

תערובת זו מכילה את האנזים DNA פולימראז שמקורו בחיידק שחי במעיינות חמים ולכן האנזים מותאם לפעול בטמפרטורות גבוהות. האנזים מבצע את שיכפול מקטעי ה – DNA על ידי הוספת נוקלאוטידים מתאימים.

9. הסבר מדוע התכנות של מכשיר ה – PCR כולל שלב חימום ל- $95\ ^{O}C$?
חימום ל- $95\ ^{O}C$ מאפשר את הפרדות שני הגדילים ב- DNA. הפרדות הגדילים היא תנאי מוקדם להמשך השיכפול וההגברה של מקטע ה-DNA הנבדק.

10. הסבר את הפעולה המחזורית במכשיר ה – PCR ?

כל מחזור PCR בודד כולל שלושה שלבים:

- שלב דנטורציה (שלב הפרימה) – הפרדת שני הגדילים ב- DNA ב - $95^{O}C$
- שלב קישור התחלים ב - $72^{O}C$
- שלב ההתארכות (שלב ההגברה).

הגברה בעזרת PCR נעשית על-ידי חזרה של כל שלושת שלבי המחזור 20-30 פעמים.

תבנית הDNA תוכפל בכל אחד מהמחזורים. אם מתחילים עם מולקולת DNA יחידה, כעבור 20 מחזורים יכולים ליצור למעלה ממילון עותקים ע"פ הנוסחה (2^{n}).

כל אחד מהשלבים מתבצע בתנאים שונים של טמפרטורה ונמשך פרק זמן שונה. כדי להגיע למספר עותקים גדול יש צורך בפעולה מחזורית של המכשיר.

תקלות אפשרויות והתמודדות ראשונית איתן

בטבלה הבאה מפורטות סיבות אפשריות לאי קבלת תוצאות. במקרים אחרים, או אם הטבלה אינה מסייעת בפתרון הבעיה, יש לפנות אל המרכז בבר אילן.

הבעיה	סיבה אפשרית
חיידקי אגרובקטריום אינם גדלים על צלחת פטרי או במצע נוזלי	החיידקים גודלו בטמפרטורה של מעל $30^{o}C$
	החיידקים גודלו בטעות על צלחת המכילה אנטיביוטיקה
	החיידקים גודלו למשך זמן קצר מ- 48 שעות
	מצע הגידול לא הוכן על פי ההוראות
	מצע הגידול אינו מסוג NA/NB/LB
בהרצה בג'ל לא התקבל תוצר PCR גם לא בביקורת החיובית	לא הוסף אחד מהמרכיבים או שאחד המרכיבים אינו תקין (יתכן למשל שתערובת ה Mix taq איננה פעילה)
	בדוק שהמכשיר מתוכנת על פי התכנית הנדרשת
	לא הוספו חיידקים (DNA)
	לא בוצע שלב מקדים של הרתחת החיידקים במבחנת במשך 10 דקות בטמפרטורה של $95^{O}C$
	בוצע שלב ההרתחה הנ"ל אך <u>לאחר</u> הוספת שאר המרכיבים (פריימרים ו – PCR MIX)
	ג'ל האגרוז מזוהם בנוקלאזות
	ה- PCR נערך יום (או יותר) לפני ההרצה והדוגמאות לא נשמרו במקרר (או בהקפאה)
	רצוי לוודא שכל החומרים – פריימרים ו- PCR MIX עורבבו כראוי טרם ההוספה
	הפריימרים ו/או ה- PCR MIX הושארו לפרק זמן ארוך (מעל 30 דקות) בטמפרטורת החדר. יש לוודא שחומרים אלה נמצאים באמבט קרח במהלך הניסוי, במקרר בין ניסוי לניסוי באותו היום ובמקפיא לפרק זמן ארוך יותר
התקבל תוצר PCR בביקורת החיובית (אם קיימת) אך לא בדוגמאות של חיידקי אגרובקטריום	לא הוספו חיידקים למבחנה
	לא בוצע שלב ההרתחה של החיידקים טרם ה- PCR
	לא הוספו פריימרים
	נדגמו בטעות חיידקים אחרים (לא אגרובקטריום), לעתים חיידקים אלה הם זיהום שגדל על צלחת הפטרי
לא מתקבלים תוצרים בג'ל אלקטרופורזה / מתקבלות "מריחות" DNA כולל בסמן הגדלים	הג'ל הוכן בריכוז נמוך / גבוה מידי ולא 2% אגרוז כנדרש
	הג'ל מזוהם בנוקלאזות
	האגרוז הומס בתמיסת בופר שונה מ- TAE
	רצוי לבדוק את ה- pH של הבופר TAE כך שיהיה בין 7 ל- 8.
מכשיר האלקטרופורזה אינו פועל כראוי / נורת ההפעלה מהבהבת	נפח תמיסת הבופר במכשיר גדול מידי והג'ל מוצף בבופר TAE. יש להפסיק את פעולת המכשיר ולהוציא מעט מהבופר באמצעות פיפטת פסטר. יש לחזור על הפעולה מספר פעמים עד שהמכשיר ישוב לפעולה, כלומר נורת ההפעלה לא תהבהב.
לא מתקבלים גידולים על גזר	לא עברו לפחות 21 יום ממועד ההדבקה
	הגזרים הושהו בטמפרטורה נמוכה מטמפרטורת החדר (מומלץ לגלדם ב- $30^{o}C$)
	מיהול החיידקים לא נעשה על פי ההוראות (בעיקר לא עורבב כראוי טרם החלוקה למבחנות)
	מיהול החיידקים נעשה מתרבית לילה ישנה (בת מעל שבוע)
	תאי הגזר לא נפצעו מספיק במהלך החיתוך (מומלץ לחרוץ חתכים נוספים הגזר)
התקבל זיהום של עובש / ריקבון בגזרים	ההדבקה לא נערכה התנאים סטרילים
	ריכוז החיידקים ששימשו להדבקה גדול מידי / מיהול החיידקים לא נעשה כראוי – יש למהול את החיידקים מיהול נוסף פי 10 (כלומר למיהול 1:10,000)
	הגזרים לא חוטאו באתנול או בחומר חיטוי אחר טרם ההדבקה

	הגזרים הושארו להתפתחות גידולים בצלחות פתוחות או שהצלחות נפתחו פעמים רבות מזמן הניסוי
	לחלוח הנייר הסופג נעשה עם מי ברז לא מעוקרים
	הנייר בתחתית הצלחת ספוג בעודף מים
	במהלך ההדבקה נערכו בחדר ניסויים נוספים בהם היה שימוש בחיידקים אחרים
	התלמידים לא רחצו היטב ידיים ועבדו ללא כפפות – בעיקר לאחר אכילת פרי, ירק או כריך עם גבינה המכילים חיידקים רבים ופטריות עובש.
	העבודה נערכה בקרבת חלון פתוח