



הנדסה גנטית בחיידקים: טרנספורמציה של חיידקים באמצעות פלסמיד

בסל הקרח שלפניך 3 מבחנות:

תכולת המבחנה	סימון המבחנה
-	0
DNA פלסמידי	+
חיידקים המסוגלים לקלוט DNA	C

בדוק שהנוזל במבחנה C הפשיר. במידה ולא, הוצא את המבחנה מסל הקרח לזמן קצר, ככל האפשר, ומיד החזר לקרח.

שלב א: ערבוב החיידקים עם ה-DNA הפלסמידי:

1. כוון את הפיפטור של ה-100 מיקרוליטר (סגול/צהוב) ל 60 מיקרוליטר והלבש טיפ.
2. הוסף למבחנה + 60 מיקרוליטר חיידקים ממבחנה C.
3. הוסף למבחנה 0 60 מיקרוליטר חיידקים ממבחנה C.
4. ערבב את שתי המבחנות בעדינות ע"י תיפוף באצבע. היזהר מיצירת בועות או פיזור התערובת על גבי דפנות המבחנות.
5. שים את המבחנות במעמד "סירה" עגול והדגר את המבחנות בקרח במשך 20 דקות.

שלב ב: החזרת ה-DNA לחיידקים

6. קרב את סל הקרח עם המבחנות אל אמבט 42°C . הכנס את הסירה עם המבחנות לאמבט למשך 90 שניות בדיוק (=שוק חום).
7. העבר מיד את הסירה עם המבחנות לקרח והדגר במשך 60 שניות בדיוק (=שוק קור).

שלב ג: התאוששות החיידקים:

8. כוון את הפיפטור של 1000 מיקרוליטר (כחול) ל- 400 מיקרוליטר והלבש טיפ כחול.
9. הוסף לכל אחת מהמבחנות 400 מיקרוליטר של מצע גידול LB (נמצא במעמד שעל השולחן).
10. ערבב בעדינות רבה ע"י נקישת אצבע בדופן המבחנה.
11. שים את המבחנות בתוך סירה. הנח את הסירה באמבט של 37°C .
12. הדגר במשך 15-30 דקות.

שלב ד': זריעת חיידקים על פלטות מצע מוצק:

- לפניך ארבע צלחות פטרי המכילות מצע גידול מוצק.
- שתי צלחות מתוך הארבע עטופות בנייר כסף. צלחות אלו הן צלחות סלקטיביות המכילות במצע הגידול את החומרים: אמפיצילין ו-X-gal. הסובסטרט (X-gal), שתוצר הפירוק שלו כחול, רגיש לאור ולכן תמיד יש להגן עליו בעזרת נייר כסף.
- שתי הצלחות הנוספות, המשמשות כצלחות ביקורת, ואינן מכילות אמפיצילין ו-X-gal.



סימון הצלחות :

13. סמן את הצלחות המכילות אנטיביוטיקה בתחתיתן :

"DNA – מצע סלקטיבי". "0 – מצע סלקטיבי". הוסף את שמך ותאריך.

14. סמן את צלחות הביקורת בתחתיתן :

"-DNA - מצע ביקורת", "0" – מצע ביקורת". הוסף את שמך ותאריך.

זריעה :

15. כוון את הפיפטור של 100 מיקרוליטר (סגול/צהוב) ל- 100 מיקרוליטר והלבש טיפ.

16. העבר 100 מיקרוליטר של חיידקים מהמבחנה המסומנת כ- 0 לתוך מרכז צלחת "0 – מצע ביקורת".

17. העבר 100 מיקרוליטר מאותה מבחנה לצלחת "0 – מצע סלקטיבי" וזרוק את הטיפ.

18. בעזרת מקל זריעה מרח היטב את החיידקים שזרעת על צלחת "0 – מצע ביקורת". סגור את הצלחת.

19. בעזרת מקל זריעה מרח היטב את החיידקים שזרעת על צלחת "0 – מצע סלקטיבי". סגור את הצלחת.

20. העבר 100 מיקרוליטר של חיידקים מהמבחנה המסומנת כ- + לתוך מרכז צלחת "DNA - מצע ביקורת".

21. העבר 100 מיקרוליטר מאותה מבחנה לצלחת "DNA – מצע סלקטיבי" וזרוק את הטיפ.

22. בעזרת מקל זריעה מרח היטב את החיידקים שזרעת על צלחת "DNA – מצע ביקורת". סגור את הצלחת.

23. בעזרת מקל זריעה מרח היטב את החיידקים שזרעת על צלחת "DNA - מצע סלקטיבי". סגור את הצלחת.

24. הדבק את כל הצלחות יחדיו בעזרת סלטייפ. אל תדביק את הצלחות מסביב.

25. הדגר את הצלחות ב- 37°C למשך 24 שעות וצפה בהופעת מושבות חיידקים.

לאחר 24 שעות תוכל לבדוק לנוכחות מושבות חיידקים ולצבען של המושבות (לבנות או כחולות) ע"ג הפלטות.



הפקת DNA מתאי לחי:

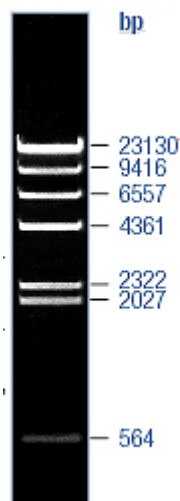
1. על שולחן תמצא כוס חד פעמית עם מים. שטוף היטב את פיך במים אלו במשך 30 שניות. השתדל להוסיף רוק למים.
2. העבר את המים שבפיך למבחנה עם הפקק הכחול (עד מחצית המבחנה).
3. כוון את הפיפטור של 1000 מיקרוליטר (כחול) ל- 1000 מיקרוליטר (1 מ"ל).
4. הלבש טיפ כחול על הפיפטור והוסף למבחנה 1 מ"ל תמיסת מלח. זרוק את הטיפ.
5. הלבש טיפ כחול על הפיפטור והוסף 1 מ"ל תמיסת דטרגנט. זרוק את הטיפ.
6. פקוק את המבחנה וערבב **בעדינות** את תוכנה ע"י היפוך המבחנה מצד לצד.
7. המתן שתי דקות.
8. על השולחן תמצא מבחנה ובה אלכוהול. העבר את האלכוהול למבחנה עם הפקק הכחול ע"י מזיגתו **לאט על דופן המבחנה**. האלכוהול ייצור שכבה מעל לשכבת הנוזל התחתונה. **אל תערבב** את שתי השכבות! הדני"א יצטבר בגבול שבין שתי השכבות.



גיל אלקטרופורזה

אנחנו נריך דגימה של פלסמיד מעגלי ושל פלסמיד חתוך פעם אחת באנזים הגבלה.
אין לגעת בגיל בידיים חשופות - הגיל מכיל חומר מסרטן!!

1. פתיחת הגיל: בעזרת המדריך פתח את עטיפת הגיל היבש והנח אותו במתקן הגילים.
צד ימין של הקסטה נכנס ראשון. יש לפתוח את עטיפת הגיל סמוך ככל האפשר לזמן ההטענה - למניעת ייבוש.
2. העמסת הדגימות: הוצא את המסרק והעמס את שתי הדגימות שלך. אל תשכח להחליף טיפ בין דוגמא לדוגמא. רשום לעצמך איזו דגימה העמסת בכל בארית.
3. העמסת דגימות ביקורת: העמס את סמן הגודל.
4. אתחול הרצת הגיל: להתחלת הריצה, לחץ לחיצה קצרה על הכפתור. אור ירוק קבוע יעיד על הפעלה נכונה. תן לגיל לרוץ בין 15 ל- 30 דקות. התבונן בריצת הצבע, אך אל תגע במכשיר.
5. סיום ההרצה: בתום ההרצה, האור הירוק יהפוך לאדום וישמע צפצוף מקוטע.
6. צילום הגיל: המדריך יוציא את הגיל ממתקן ההרצה ויעבירו לשולחן UV. לאחר שנקבל תמונה טובה, יצלם המדריך את הגיל.



סמן הגודל: