



מעבדה בהנדסה גנטית

מעבדה זו מחולקת לשלושה שלבי עבודה. כל חלק מתחיל בהקדמה של הנושא והמושגים הרלוונטים לו. נא לקרוא את ההוראות עד הסוף בכל שלב ולבצע אותן לפי הסדר שבו הן מופיעות. במקרה וההוראות אינן ברורות, יש לגשת למדריך.

שלבי העבודה במעבדה

חלק I: הפקת DNA

בחלק זה של המעבדה נפיק DNA פלסמידי מתרבית חיידקי *E. coli* מזן $DH5\alpha$ הנושאים את הפלסמיד pUC 19. פלסמיד זה נושא שני גנים. האחד מקנה עמידות לאנטיביוטיקה אמפיצילין והשני מבטא את האנזים β -galactosidase. אנזים זה מפרק לקטוז לגלוקוז וגלקטוז.

חלק II: אנליזה של DNA באלקטרופורזה בגיל

בחלק זה נחתוך את הפלסמיד בעזרת אנזים הגבלה ונבצע אנליזה של ה-DNA ע"י הרצה על גבי גיל. בין השאר נשווה בין ה-DNA שנפיק במעבדה לבין DNA זהה המסופק מסחרית.

חלק III: טרנספורמציה של חיידקים קומפוטנטיים

DNA שיופק בחלק הראשון ישמש לטרנספורמציה לחיידקי *E. coli* קומפוטנטיים. במקביל נבצע ביקורת שלילית וביקורת חיובית. הביקורת החיובית תהיה טרנספורמציה באמצעות DNA פלסמידי מסחרי. ביקורת שלילית תהיה טרנספורמציה של חיידקים ללא DNA פלסמידי.



חלק 1 : הפקת DNA

במבחנה שבטל הקרח המסומנת באות R מצויה תרבית חיידקי *E. coli* מן *DH5α* הנושאים את הפלסמיד pUC19. פלסמיד זה מכיל גן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה אמפיצילין וכן גן המקודד לאנזים ביתא-גלאקטוזידאז. החיידקים גודלו במשך הלילה במצע גידול נוזלי LB אשר הכיל אמפיצילין. מתוך תרבית זו נבודד את ה DNA הפלסמידי.

שלב א' : השקעת תאים

עקוב אחר ההוראות שלב אחר שלב ו**סמן** לצד כל סעיף אותו סיימת לבצע. קיצורי דרך עשויים למנוע את הצלחת הניסוי.

בשלב זה נשקיע את החיידקים ונפריד בינם לבין המדיום בו הם גדלו.

- סימון מבחנות :
 - בעזרת עט סימון סמן שתי מבחנות אפנדורף **גדולות** במספרים : 1,2.
 - שים לב לצבע המבחנות של קבוצתך שכן המבחנות יוכנסו לצנטריפוגה יחד עם מבחנות של קבוצות אחרות.
- כיוון הפיטור :
 - כוון את הפיטור של 1000 מיקרוליטר (כחול) ל-900 מיקרוליטר והלבש טיפ כחול.
- חלוקת תרבית החיידקים למבחנות :
 - בעזרת הפיטור שכיוונת בשלב הקודם, העבר פעמיים לכל אחת מהמבחנות שסימנת 900 מיקרוליטר של תרבית חיידקים לקבלת נפח סופי של 1800 מיקרוליטר (1.8 מיליליטר).
 - שים לב :** המבחנה תתמלא כמעט לגמרי ולכן בכדי שהחומר לא ישפך המנע מלהכניס את הטיפ עמוק לתוך הנוזל שבמבחנת האפנדורף.
 - זרוק את הטיפ הכחול ל"שקית לאשפה בקטריולוגית". סגור את המבחנות היטב.
- השקעת החיידקים (העזר במדריך) :
 - הכנס את המבחנות לצנטריפוגה וסדר אותן כך שהציר הבולט של המכסה פונה החוצה. הקפד על איזון המבחנות בתוך הצנטריפוגה (חלוקה סימטרית של המבחנות בתאים).
 - סרכז למשך שתי דקות בטמפ' החדר במהירות של 13,000 סל"ד.
- הפרדת המשקע מהנוזל העליון (הזהר לבל תפגע במשקע!) :
 - שפוך בזהירות את הנוזל העליון לתוך כלי הפסולת הבקטריולוגית על ידי ניעור המבחנה מעל לכלי. לאחר מכן הפוך את המבחנות והנח אותן על גבי נייר סופג כדי לסלק את הטיפות האחרונות.
- חזור על שלבים 3-5 כדי להגדיל את מספר החיידקים.



שלב ב': פיצוץ עדין של התאים והידרוליזה של מולקולות RNA

שלב זה כולל הוספה של 3 תמיסות שונות:
תמיסה מספר 1 (PD1 Buffer) מכילה בופר Tris-HCl ו EDTA שתפקידם לספק סביבה מתאימה לפירוק עדין של התאים. בנוסף, מכילה התמיסה אנזים RNase A המפרק את מולקולות ה RNA.
תמיסה מספר 2 (PD2 Buffer) מכילה SDS ו NaOH וגורמת לפירוק קרומי התא.
תמיסה מספר 3 (PD3 Buffer) מכילה protease ותפקידה לפרק את החלבונים שבתא.

7. כיוון הפיפטור: כוון את הפיפטור של 1000 מיקרוליטר (כחול) ל- 200 מיקרוליטר והלבש טיפ כחול.
 8. הוספת תמיסה מס' 1 והרחפת המשקע:
 - הוסף 200 מיקרוליטר של "תמיסה מספר 1 (PD1 Buffer)".
 - הרחף את המשקע ע"י העלאת והורדת הנוזל בפיפטור (במידת הצורך העזר במדריך). השתדל להשאיר את קצה הטיפ כל הזמן בתוך הנוזל, כדי למנוע היווצרות קצף, והעלה והורד את הנוזל שוב ושוב עד שלא נראים יותר גושי חיידקים בתרחיף.
 - החלף טיפ ובצע כנ"ל גם למבחנה השניה.
 9. הוספת תמיסה מס' 2:
 - הלבש טיפ כחול והוסף 200 מיקרוליטר של "תמיסה מספר 2 (PD2 Buffer)" לכל אחת מהמבחנות.
 - ערבב את המבחנות בעדינות ע"י היפוכן 10 פעמים.
 - הדגר את המבחנות בטמפרטורת החדר למשך 2 דקות בלבד.
 10. הוספת תמיסה מס' 3:
 - כוון את הפיפטור של 1000 מיקרוליטר (כחול) ל- 300 מיקרוליטר והלבש טיפ כחול.
 - הוסף 300 מיקרוליטר של "תמיסה מספר 3 (PD3 Buffer)" לכל אחת מהמבחנות.
 - ערבב את המבחנות בעדינות ע"י היפוכן 10 פעמים.
- לאחר ביצוע שלב זה התמיסה מכילה תאים מפורקים - תוכל להבחין בהיווצרות גושים לבנים. ה - DNA הפלסמידי מורחף בתמיסה.



שלב ג' : ניקוי תרחיף התאים המפורקים

בשלב זה נרחיק מולקולות גדולות (בין השאר DNA כרומוזומלי) מתוך תרחיף התאים.

11. השקעת מולקולות גדולות המצויות בתרחיף התאים :

□ סרכו את המבחנות בצנטריפוגה במשך 3 דקות במהירות של 13,000 סל"ד בטמפ' החדר. לאחר ביצוע שלב זה ה - DNA הפלסמידי מומס בנוזל העליון.

שלב ד' : קשירת ה DNA הפלסמידי ל ממברנת הקולונה

בשלב זה ה DNA הפלסמידי ייקשר לממברנת הקולונה, בעוד ששאר המרכיבים יהיו חופשיים בתמיסה.

שים לב ! יש על השולחן שני סוגים של מבחנות אפנדורף : ללא מכסה ועם מכסה. המבחנות ללא מכסה שקופות ובעלות צבע אחיד. כאשר, הינך מתבקש להשתמש במבחנה ללא מכסה, עליך לסמן בנוסף למספרים 1, 2, גם את שם הקבוצה על מנת לא להתבלבל עם שאר הקבוצות.

12. סימון מבחנות : סמן שתי מבחנות אפנדורף גדולות שקופות ללא מכסה במספרים 1, 2 ורשום גם את שם הקבוצה.

13. הכנס קולונה לכל אחת מהמבחנות.

14. כיוון הפיטור : כוון את הפיטור של 1000 מיקרוליטר (כחול) ל - 650 מיקרוליטר והלבש טיפ כחול.

15. העברת התמיסה לקולונה : שאב בזהירות את הנוזל העליון תוך הקפדה לא לגעת במשקע. שים לב לא לשפוך

את הנוזל, משום שה - DNA הפלסמידי נמצא בנוזל !!!

העבר את הנוזל לתוך הקולונה שבמבחנת האפנדורף שסימנת. החלף טיפ ובצע כנ"ל גם למבחנה השנייה. (את המבחנות עם המשקע יש לזרוק לאשפה הבקטריולוגית).

16. קישור ה-DNA לקולונה : סרכו את המבחנות, בעזרת המדריך, בצנטריפוגה במשך 30 שניות במהירות של 8,000 סל"ד בטמפרטורת החדר.

זכור כי הדנ"א קשור לקולונה.

17. השלכת נוזל השטיפה מהמבחנה : הפרד בין המבחנות לבין הקולונות ושפוך את הנוזל לתוך האשפה הבקטריולוגית. לאחר מכן, הכנס שוב את הקולונה אל המבחנות והעמד את המבחנות במעמד המבחנות.



שלב ה': שטיפת הדנ"א הפלסמידי

שלב זה כולל שימוש בשתי תמיסות שונות:

תמיסה מספר 4: (W1 Buffer)

תמיסה מספר 5: (Wash Buffer)

תמיסות השטיפה מכילות: אתנול, בופר Tris HCl 1 - Potassium acetate

מטרת שלב זה היא לשטוף את הדנ"א משאריות של מלחים, אשר עלולים לפגוע ביעילות האנזים הפועל בשלב הבא של המעבדה.

18. כיוון הפיפטור: כיוון הפיפטור: כוון את הפיפטור של 1000 מיקרוליטר (כחול) ל - 400 מיקרוליטר והלבש טיפ כחול.
19. הוספת תמיסת שטיפה: הוסף 400 מיקרוליטר של תמיסה מס' 4 (W1 Buffer) אל מרכז הקולונות.
20. שטיפת הדנ"א: סרכז את המבחנות, בעזרת המדריך, למשך 30 שניות בטמפרטורת החדר במהירות 8,000 סל"ד.
21. השלכת נוזל השטיפה: הסר את הקולונות מהמבחנות, רוקן את תכולת המבחנות אל תוך האשפה הבקטריולוגית והחזר את הקולונות למבחנות.
22. כיוון הפיפטור: כיוון הפיפטור: כוון את הפיפטור של 1000 מיקרוליטר (כחול) ל - 600 מיקרוליטר והלבש טיפ כחול.
23. הוספת תמיסת שטיפה: הוסף 600 מיקרוליטר של תמיסה מס' 5 (Wash Buffer) אל מרכז הקולונות.
24. שטיפת הדנ"א: סרכז את המבחנות, בעזרת המדריך, למשך 30 שניות בטמפרטורת החדר במהירות 8,000 סל"ד.
25. השלכת נוזל השטיפה: הסר את הקולונות מהמבחנות, רוקן את תכולת המבחנות אל תוך האשפה הבקטריולוגית והחזר את הקולונות למבחנות.
26. הסרת שאריות נוזל השטיפה: סרכז את המבחנות, בעזרת המדריך, למשך 2 דקות בטמפרטורת החדר במהירות 13,000 סל"ד.
27. השלכת נוזל השטיפה: הסר את הקולונות מהמבחנות, רוקן את תכולת המבחנות אל תוך האשפה הבקטריולוגית והחזר את הקולונות למבחנות.



שלב ו' : ניתוק ה DNA הפלסמידי מהקולונה

בשלב זה נוסיף מים לקולונות. המים יגרמו להקטנת האפיניות (משיכה) בין הקולונה לדנ"א הפלסמידי ולכן הדנ"א ישתחרר מהקולונה וישטף ביחד עם המים.

28. סימון מבחנות: סמן 2 מבחנות אפנדורף, קטנות צבעוניות, במספרים 1,2.
29. העברת הקולונות: העבר את הקולונות למבחנות החדשות שסימנת וזרוק את המבחנות הישנות לכלי האשפה הבקטריולוגית.
30. כיוון הפיטור: כוון את הפיטור של 100 מיקרוליטר (סגול/צהוב) ל – 50 מיקרוליטר והלבש טיפ לבן.
30. הוספת מים:

- הוסף בזהירות 50 מיקרוליטר מים (DDW או Elution Buffer) אל מרכז פתח הקולונה.
- במידה והמים נשארו על דופן הקולונה הורד אותם ע"י נקישות קלות של המבחנה ע"ג השולחן.
- בצע כני"ל גם עבור המבחנה השניה.

31. סירכונ: סרכו למשך שתי דקות במהירות של 13,000 סל"ד בטמפ' החדר (העזר במדריך).

הנוזל שהתקבל מכיל דנ"א פלסמידי שישימש אותנו הן לאנליזה בעזרת אלקטרופורזה בג'ל (חלק 2) והן לטרנספורמציה של הפלסמיד לחיידקים קומפטינטים (חלק 3).

32. הפרדת הקולונות: הפרד בזהירות את הקולונות מהמבחנות והשלך את הקולונות לפח הבקטריולוגי.
33. איחוד ה DNA:
31. כיוון הפיטור: כוון את הפיטור של 100 מיקרוליטר (סגול/צהוב) ל – 50 מיקרוליטר והלבש טיפ לבן (חלק מהנוזל נספג בקולונה ולכן נפח הנוזל הסופי יכול להיות פחות מהנפח ההתחלתי).
- העבר את הנוזל עם ה – DNA שבמבחנה מס' 1 למבחנה מס' 2.
 - זרוק את מבחנה מס' 1.
34. סימון מבחנות:

סמן שתי מבחנות אפנדורף קטנות באותיות A ו-B. מבחנות אלה תשימשנה אותנו לחלק השני של המעבדה – אלקטרופורזה בג'ל.

35. חלוקת ה - DNA:

- כוון פיטור של 20 מיקרוליטר (כחול כהה) ל – 15 מיקרוליטר.
- העבר 15 מיקרוליטר ממבחנה מס' 2 למבחנה A.
- העבר 15 מיקרוליטר ממבחנה מס' 2 למבחנה B.
- כוון פיטור של 20 מיקרוליטר (כחול כהה) ל – 6.5 מיקרוליטר.
- הוסף 6.5 מיקרוליטר מים למבחנה A.

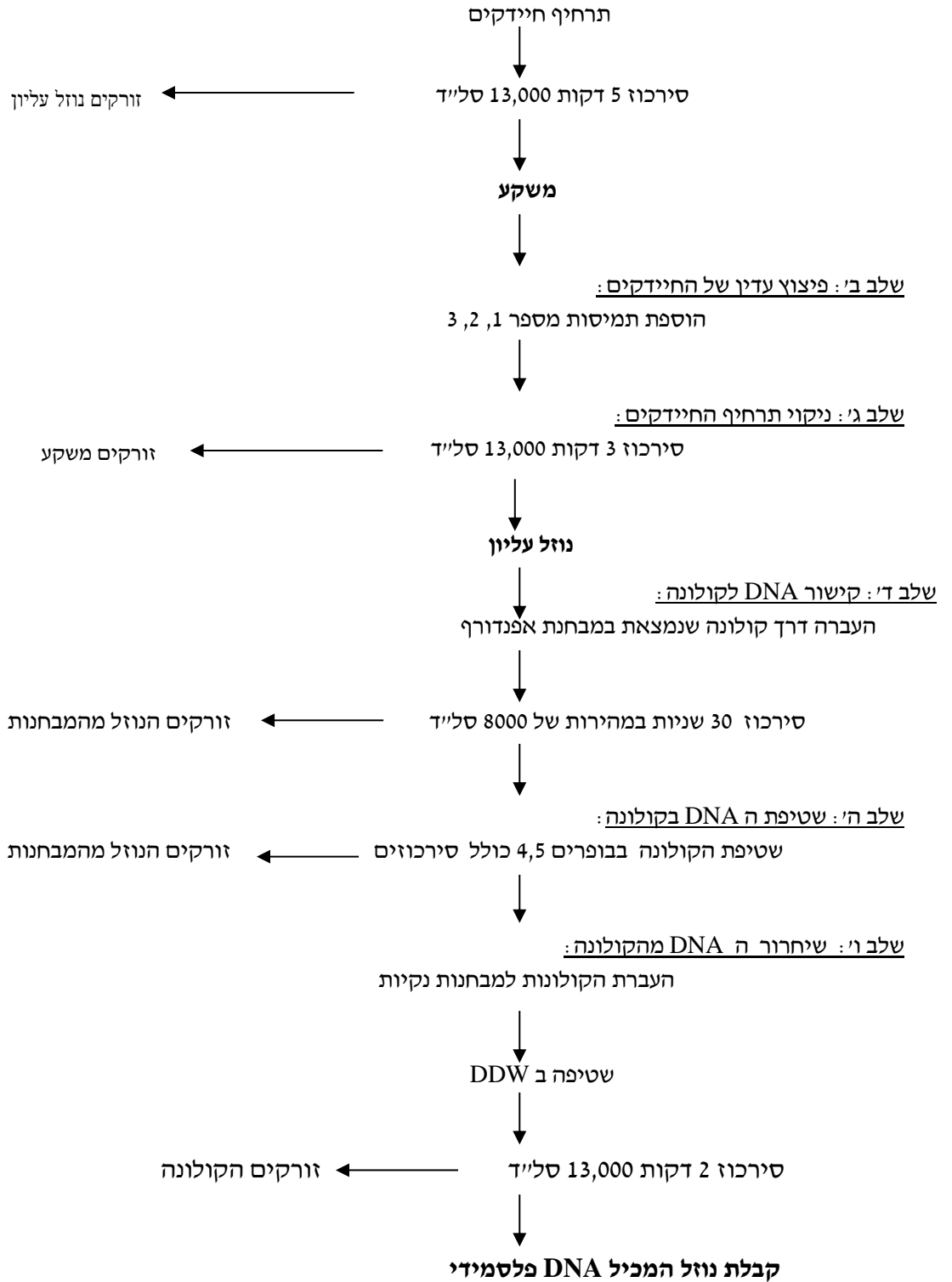


- כוון פיפטור של 20 מיקרוליטר (כחול כהה) ל – 5.5 מיקרוליטר.
 - הוסף 5.5 מיקרוליטר מים למבחנה B.
 - הכנס את המבחנות A ו – B לסל הקרח.
36. סימון מבחנה :
- סמן מבחנת אפנדורף קטנה כ – DNA. מבחנה זו תשמש אותנו לחלק השלישי של המעבדה – טרנספורמציה.
37. חלוקת ה – DNA :
- כוון פיפטור של 20 מיקרוליטר (כחול כהה) ל – 15 מיקרוליטר.



תקציר הפקת ה-DNA

שלב א': השקעת חיידקים :





חלק 2 : אנליזה של DNA באלקטרופורזה בג'ל

בחלק זה נבצע אנליזה של ה-DNA שהופק באמצעות הרצה על ג'ל. ראשית נבדוק שבתהליך ההפקה קיבלנו DNA. בנוסף, נשווה בין ה-DNA שהפקנו זה עתה לבין DNA זהה שהופק בשיטות אחרות, ונשווה בין דגימות DNA שעברו חיתוכים שונים באמצעות אניזמי רסטריקציה. גורמים המשפיעים על מהירות ריצת ה-DNA ע"ג הג'ל הן גודלו, צורתו המרחבית ומידת ניקיונו. ככל שמולקולת ה-DNA גדולה יותר היא תרוץ לאט יותר. DNA פלסמידי יכול להיות מאורגן בצורות מרחביות שונות, וארגונו המרחבי משפיע על מהירות ריצתו בג'ל: ככל שהפלסמיד דחוס יותר הוא ירוץ מהר יותר ולהיפך. גם מידת ניקיונו של הפלסמיד משפיעה על מהירות ריצתו בג'ל. פלסמיד בעל רמת ניקיון נמוכה יכלול גם מולקולות שונות שלא הוסרו כמו שצריך במהלך ההפקה, פלסמיד שכזה ירוץ לאט יותר בג'ל.

שלב א' : חיתוך הפלסמיד – אופציונאלי

[כיתות שיבצעו חיתוך ישתמשו בפרוטוקול לשלב א' + ב' של החיתוך והכנת הדגימות לג'ל, שמופיע בעמוד 14]

שלב ב' : הכנת הדגימות להרצה בג'ל

הכנת דגימה A (DNA שהפקת ולא חתכת) להרצה בג'ל:

- כוון פיפטור של 20 מיקרוליטר (כחול כהה) ל- 3 מיקרוליטר.
- הוסף למבחנה A 3 מיקרוליטר של צבע לג'ל. ערבב קלות בוורטקס.
- הורד את כל החומר לתחתית המבחנה ע"י נקישה עדינה בשולחן.

שלב ג' : הטענת הדגימות על הג'ל

באלקטרופורזה בג'ל תריך מספר דוגמאות:

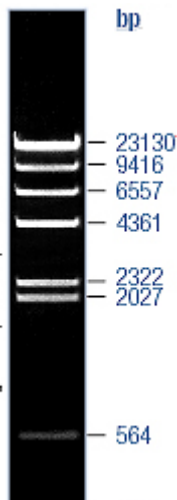
- דגימה 1 – הפלסמיד pUC 19 שהופק מחיידקים על ידנו ולא נחתך
- דגימה 2 – הפלסמיד pUC 19 שהופק בשיטה אחרת ולא נחתך
- דגימה 3 – הפלסמיד pUC 19 שהופק בשיטה אחרת ונחתך באנזים הרסטריקציה EcoRI.
- דגימה 4 – הפלסמיד pUC 19 שהופק בשיטה אחרת ונחתך באנזימי הרסטריקציה EcoRI ו-ScaI.
- דגימה מס' 5 – סמן המשמש לקביעת משקל מולקולרי. הסמן מורכב מ-DNA של בקטריופאג' למבדא שנחתך ע"י אנזים הרסטריקציה HindIII.

אין לגעת בג'ל בידיים חשופות - הג'ל מכיל חומר מסרטן!!

כיוון פיפטור :



- כוון פיפטור של 20 מיקרוליטר (כחול כהה) ל – 20 מיקרוליטר והלבש טיפ קטן.
- 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.**
- העמסת הדגימות: הוצא את המסרק והעמס את שתי הדגימות שלך. אל תשכח להחליף טיפ בין דוגמא לדוגמא. רשום לעצמך איזו דגימה העמסת בכל בארית.
- העמסת דגימות ביקורת: המדריך יעמיס את סמן הגודל, הפלסמיד המסחרי והפלסמיד המסחרי החתוך.
- 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.
- **בזמן ההמתנה החל בביצוע חלק 3 - טרנספורמציה.**
- סיום ההרצה: בתום ההרצה, האור הירוק יהפוך לאדום וישמע צפצוף מקוטע.
- צילום הגיל: המדריך יוציא את הגיל ממתקן ההרצה ויעבירו לשולחן UV. לאחר שנקבל תמונה טובה, יצלם המדריך את הגיל.



סמן הגודל:



חלק 3 : טרנספורמציה של חיידקים קומפטנטיים

עבודה זאת מתבצעת בתנאים סטריליים. עליך לעבוד ליד אש גלויה. הזהר מאוד! הרחק חומרים דליקים מהאש, כולל ניירות. תלמידים עם שיער ארוך מתבקשים לאסוף את שיערם.
הטרנספורמציה תבוצע עם שני סוגים של DNA פלסמידי:
א. DNA פלסמידי אשר הופק על ידכם על פי התהליך שתואר לעיל וסומן כ- **DNA**.
ב. DNA פלסמידי זהה שהופק בשיטה אחרת באופן מסחרי וסומן כ- **+**.
בנוסף, נבצע טרנספורמציה ללא פלסמיד (ביקורת שלילית). מבחנה זו תסומן כ- **0**.
חשוב לאיזה צורך מבצעים טרנספורמציה של DNA מסחרי ותמיסה ללא DNA. בעזרת המדריך עמוד על ההבדלים בין ביקורת שלילית לביקורת חיובית.

שלב א' : הוספת ה DNA הפלסמידי לתאים קומפטנטיים

1. הכנת התאים הקומפטנטיים לביצוע הטרנספורמציה : בסל הקרח מבחנה של תאים קומפטנטיים (מסומנת באות C). בדוק שהנוזל במבחנה הפשיר. במידה ולא, הוצא את המבחנה מסל הקרח לזמן קצר ככל האפשר.
הכנת המבחנות : ברשותך שתי מבחנות המכילות DNA פלסמידי :
 - ◀ מבחנה אחת שסימונה **DNA** שהכנת בחלק הראשון של המעבדה.
 - ◀ מבחנה שניה שסימונה **+** . מבחנה זו מכילה DNA פלסמידי זהה לזה שהפקת בחלק הראשון של המעבדה אשר נקנה מחברה מסחרית.המבחנות נמצאות בסל הקרח. העבר אותן למעמד המבחנות.
הכנת מבחנה ללא DNA :
 - סמן מבחנת אפנדורף נוספת כ- **0** והנח אותה במעמד המבחנות.מבחנה זו תעבור תהליך זהה למבחנות DNA ו- **+** אך ללא DNA.
הוספת מים :
 - כוון פיפטור של 20 מיקרוליטר (כחול כהה) ל- 15 מיקרוליטר והלבש טיפ לבן.
 - הוסף למבחנה המסומנת כ- **0** , 15 מיקרוליטר של מים.
 - כוון פיפטור של 20 מיקרוליטר (כחול כהה) ל- 10 מיקרוליטר והלבש טיפ לבן.
 - הוסף למבחנה המסומנת כ- **+** , 10 מיקרוליטר של מים.
 - כוון פיפטור של 20 מיקרוליטר (כחול כהה) ל- 5 מיקרוליטר והלבש טיפ לבן.
 - הוסף למבחנה המסומנת כ- **DNA** , 5 מיקרוליטר של מים.



[הערה: כמות הבופר אינה זהה בשלוש המבחנות משום שהנפח הסופי של כל התמיסות חייב להיות זהה (20 מיקרוליטר) וכמות ה-DNA בכל מבחנה שונה. הסיבה להבדל בכמויות ה-DNA- אותן אנו מוסיפים למבחנות + ו- DNA היא ריכוז ה-DNA. ה-DNA הקנוי מרוכז יותר מה-DNA אותו אנו מפיקים ולכן מוהלים אותו במים.]

הוספת התאים ל-DNA:

- כוון את הפיפטור של 100 מיקרוליטר (סגול/צהוב) ל- 60 מיקרוליטר והלבש טיפ לבן.
- חלק לשלוש המבחנות (DNA, +, 0) 60 מיקרוליטר תאים קומפטנטיים לכל מבחנה באופן סטרילי.
- ערבב את שלוש המבחנות בעדינות ע"י תיפוף באצבע. היזהר מיצירת בועות או פיזור התערובת על גבי דפנות המבחנות.

שלב ב' : החדרת ה-DNA לתאים

הדגרת התאים בקרח:

- שים את המבחנות במעמד "סירה" עגול והדגר את המבחנות בקרח במשך 20 דקות.
- בזמן ההדגרה המשך לבצע במידת האפשר את חלק 2 – הכנת הדגימות להרצה על ג'ל.

שוק חום:

- קרב את סל הקרח עם המבחנות אל אמבט 42°C הכנס את המבחנות לאמבט למשך 90 שניות בדיוק.

שוק קור:

- העבר מייד את המבחנות לקרח והדגר במשך 60 שניות בדיוק.

כיוון פיפטור:

- כוון את הפיפטור של 1000 מיקרוליטר (כחול) ל- 400 מיקרוליטר והלבש טיפ כחול.

הרחפת התאים במצע גידול:

- הוסף באופן סטרילי ליד אש, 400 מיקרוליטר של תמיסה מס' 9 (מצע גידול LB) לכל המבחנות.
- ערבב בעדינות רבה ע"י נקישת אצבע בדופן המבחנה. זרוק את הטיפ לשקית של פסולת בקטריולוגית.
- ביטוי הגן המקודד לעמידות לאנטיביוטיקה אמפיצילין:

- שים את המבחנות בתוך סירה. סדר את הסירה בתוך תופש ארלנמייר באמבט של 37°C .
- הדגר תוך כדי טלטול קל במשך 15-30 דקות.
- חזור לחלק 2 להשלמת העבודה.



שלב ג' : זריעת חיידקים על מצע מוצק

הזריעה מבוצעת ע"י פיזור נפח מסוים מתרבית החיידקים שעברו טרנספורמציה למצע גידול מוצק המצוי בצלחות. החיידקים יזרעו הן על מצע ללא סלקציה, והן על מצע המכיל את האנטיביוטיקה אמפיצילין המשמשת לסלקציה של הטרנספורמטים. כמו כן, מכיל מצע הסלקציה סובסטרט (X-gal) שמפורק ע"י האנזים ביתא-גלקטוזידאז ותוצר הפירוק שמתקבל הוא בעל צבע כחול.

לפניך שש צלחות פטרי המכילות מצע גידול מוצק כאשר שלוש צלחות מתוך השש עטופות בנייר כסף. צלחות אלו מכילות 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. שלוש הצלחות הנוספות, המשמשות כצלחות ביקורת, **אינן** מכילות אמפיצילין ו - X-gal. סימון הצלחות :

□ סמן את הצלחות העטופות בתחתיתן : **DNA** – מצע סלקטיבי,

+ – מצע סלקטיבי, **0** – מצע סלקטיבי. הוסף את שמך ותאריך.

□ סמן את צלחות הביקורת בתחתיתן : **DNA** – מצע ביקורת, + – מצע ביקורת,

0 – מצע ביקורת. הוסף את שמך ותאריך.

13. כוון פיטור :

כוון את הפיטור של 100 מיקרוליטר (סגול/צהוב) ל – 50 מיקרוליטר והלבש טיפ לבן.

14. זריעת הצלחות : הזריעה מבוצעת באופן סטרילי, בשני שלבים:

א. העברת החיידקים לצלחות :

□ העבר 50 מיקרוליטר של חיידקים מהמבחנה המסומנת כ - **DNA** לתוך צלחת "**DNA** – מצע סלקטיבי".

□ העבר 50 מיקרוליטר נוספים לצלחת "**DNA** – מצע ביקורת" וזרוק את הטיפ.

ב. מריחת החיידקים בצלחת :

□ הוצא ליד האש מקל מקופל (מקל דרגלסקי) ומרח בעזרתו היטב את החיידקים שזרעת על צלחת "**DNA** – מצע ביקורת". סגור את הצלחת.

□ מרח בעזרת **אותו** מקל את צלחת "**DNA** – מצע סלקטיבי".

את המקל המשומש הנח במיכל הפלסטיק הגדול.



חזור על שני השלבים עם הצלחות האחרות. אל תשכח להחליף טיפ ומקל דרגלסקי בזמן המעבר בין דוגמאות ה DNA השונות.

- הדבק את כל הצלחות יחדיו בעזרת סלוטייפ. אל תדביק את הצלחות מסביב.
 - הדגר את הצלחות ב – 37°C למשך 24 שעות וצפה בהופעת מושבות חיידקים.
- אל תשכח לעטוף חזרה את הצלחות שהיו עטופות בנייר כסף.



עיבוד תוצאות

טרנספורמציה וסלקציה

א. אומדן מספר התאים החיים בדוגמא שנזרעה:

מנה את מספר המושבות המופיעות על צלחת הביקורת. עשה זאת הן לגבי הצלחת בה נזרעו חיידקים שעברו טרנספורמציה ע"י ה-DNA שהפקת, והן לגבי הצלחת בה נזרעו החיידקים שעברו טרנספורמציה ע"י DNA פלסמידי שהופק בשיטה אחרת באופן מסחרי.

ב. קביעת אחוז טרנספורמנטים המבטאים עמידות לאמפיצילין:

מנה את מספר המושבות המופיעות על צלחות המכילות אמפיצילין ו-X-gal. ספור הן את המושבות הכחולות והן את המושבות הלבנות. עשה זאת הן לגבי הצלחת בה נזרעו חיידקים שעברו טרנספורמציה ע"י ה-DNA שהפקת והן לגבי הצלחת בה נזרעו החיידקים שעברו טרנספורמציה ע"י DNA פלסמידי שהופק בשיטה אחרת באופן מסחרי. היחס בין מספר המושבות בסעיף ב' לבין מספר המושבות בסעיף א', כפול מאה ייתן את אחוז הטרנספורמנטים המבטאים עמידות לאמפיצילין.

ג. קביעת אחוז טרנספורמנטים המבטאים את האנזים ביתא-גלקטוזידאז:

מנה את מספר המושבות הכחולות המופיעות על צלחות המכילות אמפיצילין ו-Xgal. עשה זאת הן לגבי הצלחת בה נזרעו חיידקים שעברו טרנספורמציה ע"י ה-DNA שהפקת, והן לגבי הצלחת בה נזרעו החיידקים שעברו טרנספורמציה ע"י DNA פלסמידי קנוי. היחס בין מספר המושבות בסעיף ג' לבין מספר המושבות בסעיף א', כפול מאה ייתן את אחוז טרנספורמנטים המבטאים את האנזים ביתא-גלקטוזידאז. ערוך טבלה מסכמת.

שאלות:

- 1) כיצד תוכל להסביר את השוני במספר מושבות החיידקים על שלוש הצלחות? השווה בין סידרת הצלחות שנזרעה ע"י חיידקים שעברו טרנספורמציה עם DNA שהפקת לבין חיידקים שעברו טרנספורמציה ע"י DNA קנוי.
- 2) אילו גורמים עשויים להשפיע על יעילות תהליך הטרנספורמציה?
- 3) בד"כ בודקים את ה-DNA שהופק באלקטרופורזה בגיל **לפני** ביצוע טרנספורמציה. הסבר מדוע.



הנחיות לחיתוך באנזימי רסטריקציה:

(דף חלופי לעמוד 9 למעלה לכיתות המבצעות חיתוך)

שלב א': חיתוך הפלסמיד

1. הוספת אנזים הרסטריקציה EcoRI למבחנה שמסומנת A:
המדריך יוסיף למבחנה A את החומרים הבאים (נמצאים אצל המדריך):
 - 1 מיקרוליטר של אנזים הרסטריקציה EcoRI.
 - 2.5 מיקרוליטר של בופר. ערבב קלות בעזרת הפיפטור.
2. הוספת אנזימי רסטריקציה EcoRI ו-ScaI למבחנה שמסומנת B:
המדריך יוסיף למבחנה B את החומרים הבאים (נמצאים אצל המדריך):
 - 1 מיקרוליטר של אנזים הרסטריקציה EcoRI.
 - 1 מיקרוליטר של אנזים הרסטריקציה ScaI.
 - 2.5 מיקרוליטר של בופר. ערבב קלות בעזרת הפיפטור.
3. הורדת התמיסה לתחתית המבחנה:
 - הכנס את המבחנות לצנטריפוגה ל-5 שניות במהירות 14,000 סל"ד.
4. הדגרה ב-37°C:
 - הכנס את המבחנות לסירה והדגר לכל הפחות 30 דקות ב-37°C (רשום לעצמך את הזמן בו התחילה ההדגרה).

בזמן ההמתנה החל בביצוע חלק 3 (בעמוד 10) - טרנספורמציה.

שלב ב': הכנת הדגימות להרצה בגיל

הכנת דגימה A (DNA שהפקת וחתכת ב-EcoRI) להרצה בגיל:

- כוון פיפטור של 20 מיקרוליטר (כחול כהה) ל-3 מיקרוליטר והלבש טיפ לבן.
- הוסף למבחנה A (שהדגרת ב-37°C) 3 מיקרוליטר של צבע לגיל. ערבב קלות בוורטקס.
- הורד את כל החומר לתחתית המבחנה ע"י נקישה עדינה בשולחן.

הכנת דגימה B (DNA שהפקת וחתכת ב-ScaI+EcoRI) להרצה בגיל:

- הוסף למבחנה B 3 מיקרוליטר של צבע לגיל. ערבב קלות בוורטקס.
- הורד את כל החומר לתחתית המבחנה ע"י נקישה עדינה בשולחן.
- המשך ע"פ ההנחיות בעמוד 9 החל משלב ג':

שלב ג': הטענת הדגימות על הגיל

(ראה עמוד 9 באמצע והלאה)