



פעילות האנזים ליזוזים

ניסוי מספר 1: בדיקת השפעת טמפרטורה על קצב ושיעור פעילות הליזוזים

פתח את הקובץ "תוצאות ליזוזים" שעל ה- desktop ושמור אותו תחת שמך בכונן BIOLOGY.

מהלך העבודה:

1. בעזרת עט סימון סמן 3 מבחנות במספרים: 1,2,3.
2. בעזרת פיפטה, העבר 3 מיליליטר בופר פוספט $\text{pH}=6.3$, לכל אחת מהמבחנות.
3. כוון פיפטור של 1000 מיקרוליטר ל-500 מיקרוליטר והלבש טיפ כחול.
4. הוסף לכל אחת מהמבחנות 500 מיקרוליטר מתמיסת הליזוזים (בריכוז 0.05 מ"ג למ"ל).
5. ערבב את תכולת המבחנות בעדינות בוורטקס.
6. הכנס את המבחנות לאמבטים המתאימים למשך 3-5 דקות. (מבחנה מספר 1 לאמבט בטמפרטורה של 25°C , את מבחנה מספר 2 לאמבט בטמפרטורה של 37°C ואת מבחנה מספר 3 לאמבט בטמפרטורה של 65°C)

בשלב זה הנוזל בו תיערך התגובה בין האנזים לסובסטרט צריך להגיע לטמפרטורת האמבט

7. כוון את הספקטרופוטומטר לאורך גל 450nm .
8. אפס את הספקטרופוטומטר בעזרת מבחנה המכילה מים, הנמצאת במעמד המבחנות.
9. כוון פיפטור של 1000 מיקרוליטר ל-500 מיקרוליטר והלבש טיפ כחול.

משלב 10 בניסוי, יהיה עליך לבדוק את עכירות תערובת הריאקציה מידי דקה במהלך 5 דקות. בדוק שאתה ערוך לביצוע המשך הניסוי לפני תחילת העבודה ושים לב לעבוד במהירות: התגובה האנזימטית נערכת באמבט בטמפרטורה המתאימה, ומדידת העכירות נעשית בספקטרופוטומטר המצוי על שולחןך. הקפד על שתי ההנחיות הבאות:

- ✓ לערבב את תכולת המבחנות לפני כל קריאה (דפנות החיידקים שוקעות במבחנה)
- ✓ להחזיר לאחר הקריאה את המבחנות לאמבט המתאים במהירות האפשרית.

הקפידו על סדר העבודה: שלבים 10-21 יבוצעו עם מבחנה מספר 1 בלבד. לאחר סיום שלב 21 יבוצעו שלבים 10-21 עם מבחנה מספר 2. לאחר סיום שלב 21 יבוצעו שלבים 11-21 עם מבחנה מספר 3.

10. ערבב היטב את המבחנה המכילה דפנות חיידקים
11. הוצא את מבחנה מספר 1 בלבד מהאמבט ונגב אותה היטב
12. הוסף למבחנה מספר 1 500 מיקרוליטר דפנות חיידקים.
13. ערבב את תכולת המבחנה בוורטקס וקרא במהירות את הבליעה במבחנת הניסוי.
14. רשום את הקריאה בטבלה המופיעה בהמשך.
15. כוון את שעון- העצר (סטופר) לדקה



16. החזר במהירות האפשרית את המבחנה לאמבט בטמפרטורה 25°C
17. לאחר דקה הוצא את המבחנה מן האמבט
18. ערבב את תכולת המבחנה בזורטקס
19. נגב המבחנה היטב ממי האמבט וקרא במהירות את הבליעה. רשום את הקריאה.
20. החזר את המבחנה לאמבט בטמפרטורה 25°C
21. חזור על שלבים 17-19, מידי דקה עד 5 דקות.
22. חזור על שלבים 9-21 עם מבחנה מספר 2 ואמבט בטמפרטורה 37°C
23. חזור על שלבים 9-21 עם מבחנה מספר 3 ואמבט בטמפרטורה 65°C

טבלה לרישום הנתונים:

עכירות [OD ₍₄₅₀₎] תערובת הריאקציה			
3	2	1	מספר מבחנה
65°C	37°C	25°C	זמן (דקות) // טמפרטורה
			0
			1
			2
			3
			4
			5



פעילות האנזים ליזוזים

ניסוי מספר 2: השפעת DTT על קצב ושיעור פעולת הליזוזים

פתח את הקובץ "תוצאות ליזוזים" שעל ה- desktop ושמו אותו תחת שמך בכונן BIOLOGY.

מהלך העבודה:

1. בעזרת עט סימון סמן 4 מבחנות במספרים: 1,2,3,4
 2. בעזרת פיפטה, העבר 3 מיליליטר בופר פוספט $\text{pH}=6.3$, למבחנות 1 ו 3
 3. בעזרת פיפטה, העבר 2 מיליליטר בופר פוספט $\text{pH}=6.3$, למבחנות 2 ו 4
 4. כוון פיפטור של 1000 מיקרוליטר ל-500 מיקרוליטר והלבש טיפ כחול.
 5. הוסף לכל אחת מהמבחנות 500 מיקרוליטר מתמיסת הליזוזים (בריכוז 0.05 מ"ג למ"ל).
 6. כוון פיפטור של 1000 מיקרוליטר ל-1000 מיקרוליטר והלבש טיפ כחול.
 7. הוסף למבחנה מספר 2 ולמבחנה מספר 4 1000 מיקרוליטר DTT.
 8. ערבב את 4 המבחנות.
 9. הכנס את מבחנות מספר 1 ו 2 לאמבט בטמפרטורה של 25°C ואת מבחנות מספר 3 ו 4 לאמבט בטמפרטורה של 65°C
- בשלב זה הנוזל בו תיערך התגובה בין האנזים לסובסטרט צריך להגיע לטמפרטורת האמבט
10. כוון את הספקטרופוטומטר לאורך גל 450nm.
 11. אפס את הספקטרופוטומטר בעזרת מבחנה המכילה מים, הנמצאת במעמד המבחנות.
 12. כוון פיפטור של 1000 מיקרוליטר ל-500 מיקרוליטר והלבש טיפ כחול

משלב 12 בניסוי, יהיה עליך לבדוק את עכירות תערובת הריאקציה מידי דקה במהלך 5 דקות.

בדוק שאתה ערוך לביצוע המשך הניסוי לפני תחילת העבודה ושים לב לעבוד במהירות: התגובה האנזימטית נערכת באמבט בטמפרטורה המתאימה, ומדידת העכירות נעשית בספקטרופוטומטר המצוי על שולחןך. הקפד על שתי

ההנחיות הבאות:

✓ לערבב את תכולת המבחנות לפני כל קריאה (דפנות חיידקים שוקעות במבחנה)

✓ להחזיר לאחר הקריאה את המבחנות לאמבט במהירות האפשרית.

הקפידו על סדר העבודה: שלבים 13-24 יבוצעו עם מבחנה מספר 1 בלבד. לאחר סיום שלב 23 יבוצעו שלבים

13-24 עם מבחנה מספר 2. לאחר סיום שלב 23 יבוצעו שלבים 13-24 עם מבחנה מספר 3, ולבסוף עם מבחנה

מספר 4.

13. ערבב היטב את המבחנה המכילה דפנות חיידקים

14. הוצא את מבחנה מספר 1 מהאמבט ונגב אותה היטב

15. הוסף למבחנה מספר 1 500 מיקרוליטר דפנות חיידקים.

16. ערבב את תכולת המבחנה בוורטקס וקרא במהירות את הבליעה במבחנת הניסוי.



17. **רשום** את הקריאה בטבלה המופיעה בהמשך
 18. **כוון** את שעון- העצר (סטופר) לדקה.
 19. **חזור** במהירות האפשרית את המבחנה **לאמבט** בטמפרטורה 25°C
 20. לאחר דקה **הוצא** את המבחנה מן האמבט
 21. **ערבב** את תכולת המבחנה בזורטקס
 22. **נגב** המבחנה היטב ממי האמבט **וקרא במהירות** את הבליעה. **רשום** את הקריאה.
 23. **חזור** את המבחנה לאמבט בטמפרטורה 25°C
 24. **חזור** על שלבים 20-23, **מידי דקה** עד 5 דקות.
 25. חזור על שלבים 12-24 עם מבחנה מספר 2 והדגרה באמבט 25°C .
 26. הוצא את מבחנה 3 מהאמבט וחזור על שלבים 12-24 עם הדגרה באמבט 65°C .
 27. הוצא את מבחנה 4 מהאמבט וחזור על שלבים 12-24 עם הדגרה באמבט 65°C .
 28. העבר הנתונים לטבלה במחשב.
- טבלה לרישום הנתונים:

עכירות [OD ₍₄₅₀₎] תערובת הריאקציה				
4	3	2	1	מספר מבחנה
65°C		25°C		טמפרטורה
+	-	+	-	זמן (דקות)/נוכחות חומר מחזר
				0
				1
				2
				3
				4
				5



פעילות האנזים ליזוזים

ניסוי מספר 3: השפעת ריכוזים שונים של החומר 3-NAG על קצב ושיעור פעילות ליזוזים

פתח את הקובץ "תוצאות ליזוזים" שעל ה- desktop ושומר אותו תחת שמך בכונן BIOLOGY.

מהלך העבודה:

1. בעזרת עט סימון סמן 3 מבחנות במספרים: 1,2,3.
2. בעזרת פיפטה, העבר 3 מיליליטר בופר פוספט $\text{pH}=6.3$, לכל אחת מהמבחנות.
3. כוון פיפטור של 1000 מיקרוליטר ל-500 מיקרוליטר והלבש טיפ כחול.
4. הוסף לכל אחת מהמבחנות 500 מיקרוליטר מתמיסת הליזוזים (בריכוז 0.05 מ"ג למ"ל).
5. כוון פיפטור של 100 מיקרוליטר ל-100 מיקרוליטר והלבש טיפ לבן.
6. למבחנה מספר 2 הוסף 100 מיקרוליטר 3-NAG בריכוז 0.5mg/ml.
7. כוון פיפטור של 100 מיקרוליטר ל-100 מיקרוליטר והלבש טיפ לבן חדש.
8. למבחנה מספר 3 הוסף 100 מיקרוליטר 3-NAG בריכוז 0.5mg/ml.
9. ערבב את שלוש המבחנות.
10. הכנס את המבחנות לאמבט בטמפרטורה של 37°C
בשלב זה הנוזל בו תיערך התגובה בין האנזים לסובסטרט צריך להגיע לטמפרטורת האמבט
11. כוון את הספקטרופוטומטר לאורך גל 450nm.
12. אפס את הספקטרופוטומטר בעזרת מבחנה המכילה מים, הנמצאת במעמד המבחנות.
13. כוון פיפטור של 1000 מיקרוליטר ל-500 מיקרוליטר והלבש טיפ כחול

משלב 14 בניסוי, יהיה עליך לבדוק את עכירות תערובת הריאקציה מידי דקה במהלך 5 דקות.

בדוק שאתה ערוך לביצוע המשך הניסוי לפני תחילת העבודה ושים לב לעבוד במהירות: התגובה האנזימטית נערכת באמבט בטמפרטורה המתאימה, ומדידת העכירות נעשית בספקטרופוטומטר המצוי על שולחן. הקפד על שתי

ההנחיות הבאות:

✓ לערבב את תכולת המבחנות לפני כל קריאה (דפנות החיידקים שוקעות במבחנה)

✓ להחזיר לאחר הקריאה את המבחנות לאמבט במהירות האפשרית.

✓

הקפידו על סדר העבודה: שלבים 14-25 יבוצעו עם מבחנה מספר 1 בלבד. לאחר סיום שלב 25 יבוצעו שלבים

14-25 עם מבחנה מספר 2. לאחר סיום שלב 25 יבוצעו שלבים 14-25 עם מבחנה מספר 3.

14. ערבב היטב את המבחנה המכילה דפנות חיידקים

15. הוצא את מבחנה מספר 1 מהאמבט ונגב אותה היטב

16. הוסף למבחנה מספר 1 500 מיקרוליטר דפנות חיידקים.

17. ערבב את תכולת המבחנה בוורטקס וקרא במהירות את הבליעה במבחנת הניסוי.



18. **רשום** את הקריאה בטבלה המופיעה בהמשך או בטבלה המופיעה על המחשב.
19. **כוון** את שעון- העצר (סטופר) לדקה
20. **חזר** במהירות האפשרית את המבחנה **לאמבט** בטמפרטורה 37°C
21. לאחר דקה **הוצא** את המבחנה מן האמבט
22. **ערבב** את תכולת המבחנה בוורטקס
23. **נגב** המבחנה היטב ממי האמבט ו**קרא במהירות** את הבליעה. **רשום** את הקריאה.
24. **חזר** את המבחנה לאמבט בטמפרטורה 37°C
25. **חזור** על שלבים 21-23, **מידי דקה** עד 5 דקות.
26. **חזור** על שלבים 13-25 עם מבחנה מספר 2 ולאחר מכן עם מבחנה מספר 3
27. העבר הנתונים לטבלה במחשב.

טבלה לרישום הנתונים:

עכירות [$\text{OD}_{(450)}$] תערובת הריאקציה			
3	2	1	מספר מבחנה
3-NAG (5mg/ml)	3-NAG (0.5mg/ml)	ללא תוספת	זמן (דקות)
			0
			1
			2
			3
			4
			5



קריסטלוגרפיה של חלבונים

1. השפעת ריכוז המלח NaCl על יצירת הגבישים: יש להקפיד לעבוד ללא כפפות

על שולחנכם תמצאו מבחנות עם מספר חומרים:

- DDW – מים מזוקקים פעמיים.
- תמיסת ליזוזים בריכוז 46 mg/ml.
- תמיסת NaCl בריכוז 4.8M.
- בופר NaAcetate בריכוז 1M, pH=4.8.

כל החומרים מסוננים, על מנת למנוע יצירת גרעיני-גיבוש לא-ספציפיים.

מהלך העבודה:

1. סמנו 3 מבחנות אפנדורף במספרים 1, 2, 3.
2. העבירו למבחנות את החומרים הבאים:

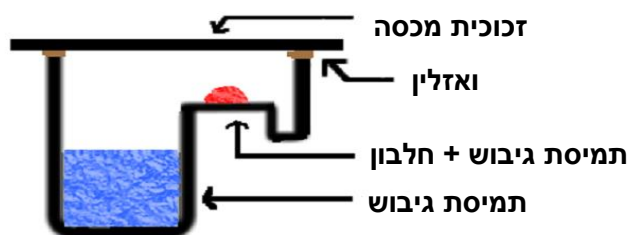
כמויות החומרים שיש להוסיף למבחנות			ריכוז סופי של NaCl	מבחנה מספר
4.8M NaCl	1M NaAcetate	DDW (מים)	NaCl	
125 μ l	100 μ l	775 μ l	0.6 M	1
250 μ l	100 μ l	650 μ l	1.2 M	2
375 μ l	100 μ l	525 μ l	1.8 M	3

בידי המדריך צלחת של 24 באריות עם גשרונים. שפת כל בארית מכוסה בוזלין שסייע מאוחר יותר באטימת הבאריות באמצעות זכוכיות מכסה.

3. סמנו 3 באריות בשמכם, וסמנו כל אחת במספר בין 1 ל-3.
4. הוסיפו 1 מ"ל ממבחנה מספר 1 לבארית מספר 1.
5. העבירו 5 μ l מהתמיסה שבבארית לשקע שבגשרון.
6. הוסיפו לשקע שבגשרון 5 μ l של תמיסת חלבון ואיטמו את הבארית בעזרת זכוכית מכסה.

החזיקו את הצלחות במקום ממוזג (קרוב ככל האפשר ל-20°C). בעוד יומיים, בידקו את תוכנה של כל בארית בבינוקולר וראו האם הצלחתם לקבל גביש.

בארית לגיבוש חלבון:





קריסטלוגרפיה של חלבונים

2. השפעת מידת החומציות על יצירת הגבישים: יש להקפיד לעבוד ללא כפפות

על שולחנכם תמצאו מבחנות עם מספר חומרים:

- DDW – מים מזוקקים פעמיים.
 - תמיסת ליזוזים בריכוז 46 mg/ml.
 - תמיסת NaCl בריכוז 4.8M.
 - 3 תמיסות בופר NaAcetate בריכוז 1M, בחומציות שונה: pH=5.8, pH=4.8, pH=3.8.
- כל החומרים מסוננים, על מנת למנוע יצירת גרעיני-גיבוש לא-ספציפיים.

מהלך העבודה:

1. סמנו 3 מבחנות אפנדורף במספרים 1, 2, 3.
2. העבירו למבחנות את החומרים הבאים:

כמויות החומרים שיש להוסיף למבחנות			מבחנה מספר
1M NaAcetate	4.8M NaCl	DDW (מים)	
pH=3.8, 100 μ l	250 μ l	650 μ l	1
pH=4.8, 100 μ l	250 μ l	650 μ l	2
pH=5.8, 100 μ l	250 μ l	650 μ l	3

בידי המדריך צלחת של 24 באריות עם גשרונים. שפת כל בארית מכוסה בוזלין שסייע מאוחר יותר באטימת הבאריות באמצעות זכוכיות מכסה.

3. סמנו 3 באריות בשמכם, וסמנו כל אחת במספר בין 1 ל-3.
4. הוסיפו 1 מ"ל ממבחנה מספר 1 לבארית מספר 1.
5. העבירו 5 μ l מהתמיסה שבבארית לשקע שבגשרון.
6. הוסיפו לשקע שבגשרון 5 μ l של תמיסת חלבון ואיטמו את הבארית בעזרת זכוכית מכסה.

החזיקו את הצלחות במקום ממוזג (קרוב ככל האפשר ל-20°C). בעוד יומיים, בידקו את תוכנה של כל בארית בבינוקולר וראו האם הצלחתם לקבל גביש.

בארית לגיבוש חלבון:

