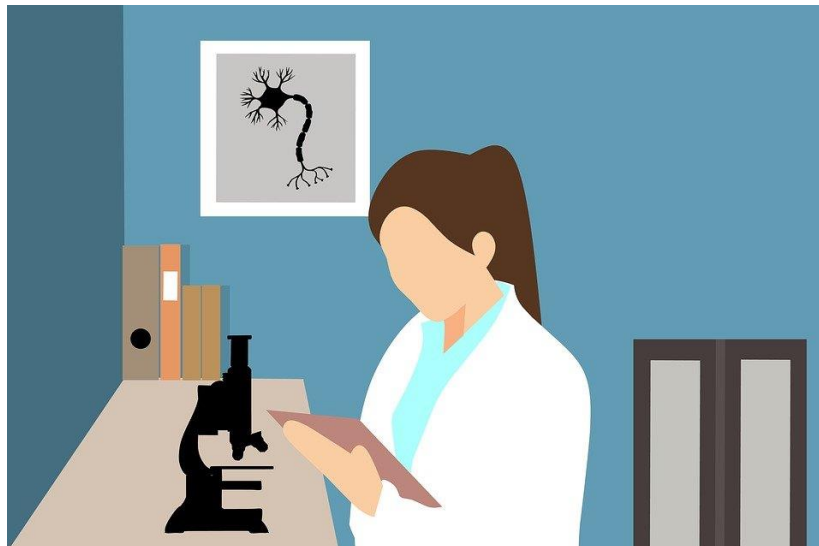


חוברת השתלמות מורים ותיקים

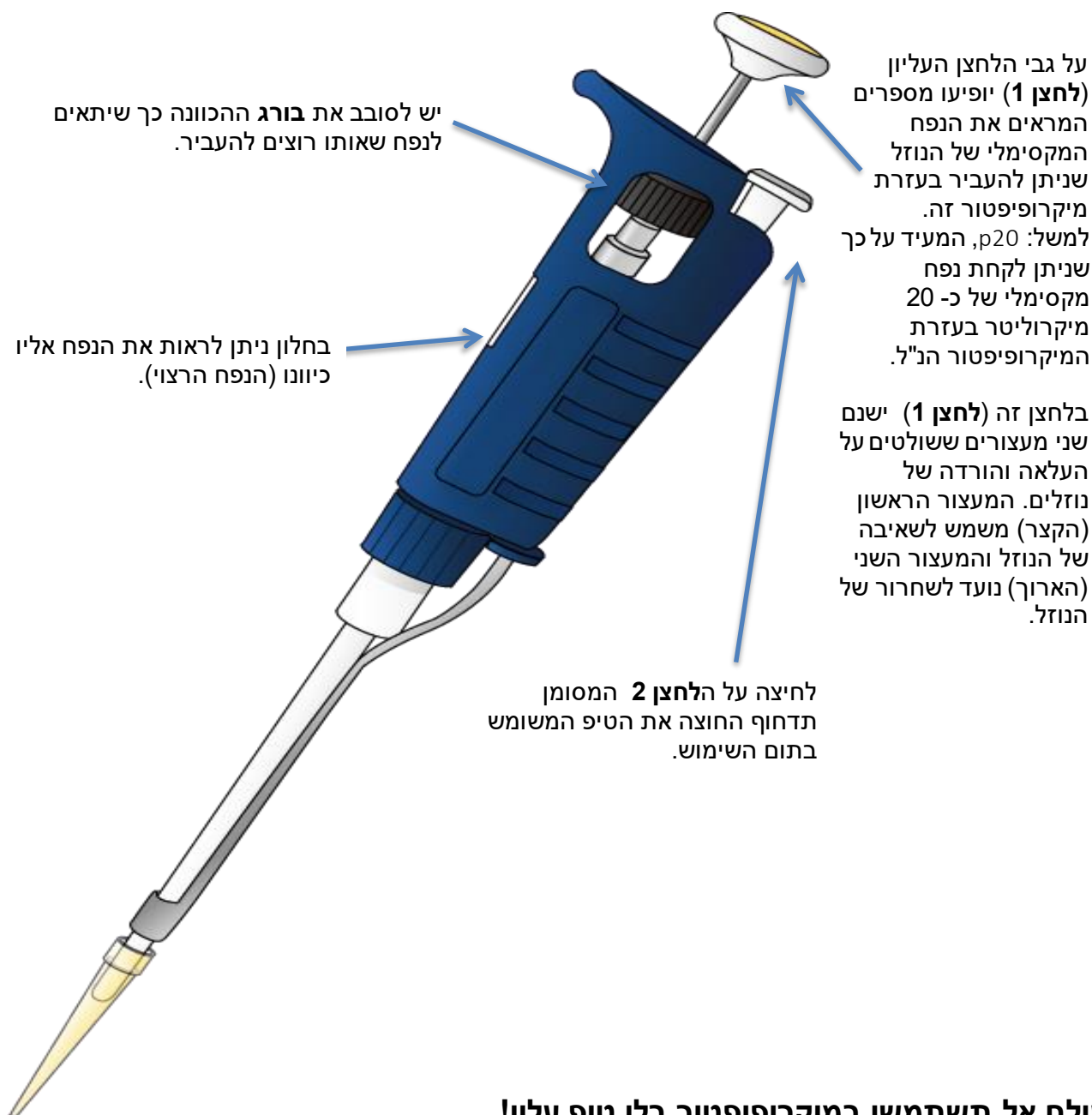
קיץ 2026 - תשפ"ו



תוכן עניינים

3.....	הכרת המיקרופיטור
4.....	תרגול שימוש במיקרופיטור
5.....	קשת צבעים - תרגיל שימוש באלקטרופורזה בג'ל לתלמיד
8.....	הגן לאינסולין מה תפקיד המתילציה ב-DNA?
12.....	טרנספורמציה בתאי החידק E. COLI (א. קולי)
18.....	זיהוי חלבוני עקה (HSP70) בנבטים באמצעות שיטת ELISA
25.....	ההשפעה של תמיסת דבש על תמיסת עמילן, 2026 ניסוי 4
29.....	ניסוי 5 חלק ב – התבוננות בגרגרי אבקה של פרח באמצעות מיקרוסקופ
30.....	למידה אסוציאטיבית (התניית פבלוב) בלריות של דרוזופילה
31.....	השפעת ריכוז אתנול על ביטוי החלבון B-GALACTOSIDASE בחידקים ביוסנסוריים
35.....	אבחון רמת הגלוקוז והאינסולין בדם לאחר ארוחה

הכרת המיקרופיפטור



- לעולם אל תשתמשו במיקרופיפטור בלי טיפ עליו!
- השתמשו תמיד בטיפ חדש ונקי לכל העברה.

תרגול שימוש במיקרופיטור

העברת נפחים שונים של בסיס NaOH, חומצה אצטית (חומץ 5%) ואינדיקטור פנול אדום אל פיסת פרפילם. עבדו בזהירות על פי ההוראות והקפידו להחליף טיפ לאחר כל העברה של נוזל.

לידיעתכם:

האינדיקטור פנול אדום משנה את צבעו עם שינוי ה-pH. בסביבה בסיסית צבעו אדום ובסביבה חומצית צבעו כתום-צהוב

לרשותכם:

- מבחנת אפנדורף המסומנת באות **ב** ובה בסיס NaOH,
- מבחנת אפנדורף המסומנת באות **ח** ובה חומצה (חומץ 5%),
- מבחנת אפנדורף המסומנת באות **א** ובה אינדיקטור פנול אדום
- מיקרופיטור מסוג p20 (המיועד ללקיחת נפחים הנעים בין 2-20 μL)
- טיפים
- נייר פרפילם

עבדו על פי ההנחיות הבאות:

א. בעזרת עט דק לסימון על זכוכית סרטטו על **כל** נייר הפרפילם את טבלה 1 "טבלת תרגול".

C	B	A	
			1
			2
			3

ב. על פי המידע שבטבלה 2 העבירו את הנפח הדרוש של כל תמיסה (חומצה, בסיס, פנול אדום) ממבחנת האפנדורף המתאימה לריבוע המתאים בטבלה שעל הפרפילם.

בכל ריבוע עליכם לטפטף שתי תמיסות שונות זו מעל זו. הקפידו לטפטף כל טיפה במרכז הריבוע המתאים.

את התמיסות בכל ריבוע ניתן לערבב על ידי שאיבה ושחרור של התמיסה או בערבוב קל עם קצה הטיפ. טבלה 2: הנחיות העברת התמיסות על גבי נייר הפרפילם

	C	B	A	
1	7 μL פנול אדום 3 μL בסיס	6 μL פנול אדום 4 μL חומץ	5 μL פנול אדום 5 μL בסיס	
2	14 μL פנול אדום 6 μL חומץ	12 μL פנול אדום 8 μL בסיס	10 μL פנול אדום 10 μL חומץ	
3	20 μL פנול אדום 10 μL בסיס	18 μL פנול אדום 12 μL חומץ	15 μL פנול אדום 15 μL בסיס	

1. השוו בין גודל הטיפות לאורך שורה ולאורך טור. האם הטיפות זהות בגודלן?

2. מה גרם להבדלים בצבע הטיפות שבתאים 1A ו-2A?

3. אם השלמתם את המשימה כראוי תוכלו להבחין בתבנית מסוימת על גבי הפרפילם. מהי התבנית שהנכם מזהים?

קשת צבעים - תרגיל שימוש באלקטרופורזה בג'ל לתלמיד

בתרגיל זה תכירו את מכשיר אלקטרופורזה בג'ל ותשתמשו בו כדי:

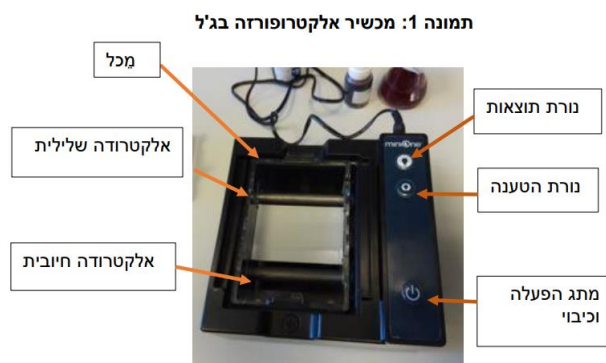
לבדוק את כיוון התנועה של מולקולות צבענים (טבלה 2) ואת המרחק שהן יעברו.

להפריד מולקולות של צבענים הנמצאים בתערובת. זהותם של הצבענים ותכונותיהם אינם ידועות לכם.

אלקטרופורזה בג'ל¹ (gel electrophoresis) היא שיטה המאפשרת להפריד רכיבים מתוך תערובת על פי מהירות התנועה של אותם רכיבים בשדה חשמלי, לדוגמה, הפרדה בין קטעי DNA שונים. ההפרדה נעשית בתוך ג'ל אגרוז² שהוא חומר מוצק למחצה. הגורמים העיקריים המשפיעים על מהירות הנדירה של הרכיבים הם המטען החשמלי והמסה המולרית שלהם.

מסה מולרית היא המסה בגרמים של מספר קבוע של מולקולות. ככל שהמסה המולרית של חומר גדולה יותר, כך המולקולות שלו ינועו בג'ל לאט יותר. הג'ל שבמכל של המכשיר טובל בתמיסת בופר (TAE) המוליכה חשמל. בחללים הזעירים שבג'ל ינועו רכיבים בעלי מטען חשמלי: אלה שמטענם חיובי ינועו לאלקטרודה השלילית ואלה שמטענם שלילי ינועו לאלקטרודה החיובית (תמונה 1).

בתרגיל "קשת צבעים" תבדקו תנועה של מולקולות צבענים (פיגמנטים) בג'ל והפרדה של צבענים המצויים בתערובת מהירות תנועת מולקולות הצבענים מושפעת מהמסה המולרית, מהמטען החשמלי ומעוצמתו ומהמבנה המרחבי של המולקולות.



1. לאיזה כיוון ינועו מולקולות שלהן מטען חשמלי שלילי?
2. לאיזה כיוון ינועו מולקולות שלהן מטען חשמלי חיובי?
3. הסבירו כיצד תכונות ג'ל האגרוז מסייעות להפרדת המולקולות שבתערובת.
4. מהו הכוח הגורם למולקולות לנוע בג'ל?
5. מה חשיבותה של תמיסת הבופר TAE שאותה מוסיפים ל מכל שבמכשיר אלקטרופורזה בג'ל?

טבלה 1: קשת צבעים ציוד וחומרים

תיאור הפריט
מכשיר ג'ל אלקטרופורזה, 2 תבניות ומסרק להכנת ג'לים (תמונה 1)
תמיסת בופר TAE
מיקרופיפטור בנפח 20-2 וטיפים מתאימים
כלי פסולת
5 מבחנות אפנדורף ובכל אחת מהן צבען
כלי עם אבקת אגרוז 0.5 גרם +50 מ"ל תמיסת TAE להכנת אגרוז בריכוז 1%
מגבות ניר

טבלה: 2 שמות הצבענים והמסה המולרית שלהם

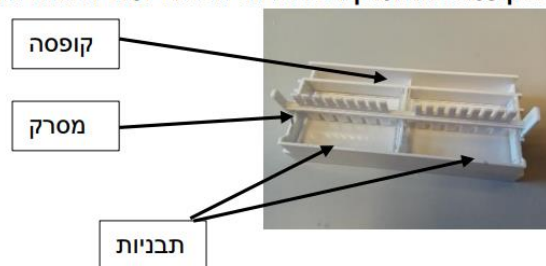
מספר מבחנה	שם הצבען	מסה מולרית (gr/mole)	מטען חיובי/ שלילי למלא בתום ההרצה בגיל
1	מתילן כחול	319	
2	אדום ניטרלי	289	
3	תימול כחול	466	
4	אורנג' G	452	
5	ספרנין	351	

מהלך העבודה

הכנת הג'ל

קראו בעיון מהלך העבודה וודאו שההנחיות ברורות לכם, ורק אז התחילו בביצוע.

תמונה 2: קופסה ובה מסרק ליצירת באריות בג'ל ושתי תבניות למזיגה של ג'ל אגרוז



- מקמו את המסרק במרכז התבניות (תמונה 2)
- העבירו 1 גרם אגרוז לארלנמייר בנפח של 150-250 מ"ל.
- בעזרת משורה העבירו לארלנמייר, 100 מ"ל של תמיסת TAE.
- הרתיחו את התמיסה על גבי פלטת חימום עד לקבלת תמיסה צלולה (יש להשתמש בסטירר לערבוב התמיסה) **הקפידו שהנוזל לא יגלוש מהארלנמייר.**
- בקשו עזרה מהמורה או הבורנט: בעזרת כפפות הורידו את הארלנמייר מפלטת החימום.
- הניחו לתמיסה להתקרר במשך 1-2 דקות. מדי פעם טלטלו בעדינות את הכלי כך שהתמיסה תתקרר באופן אחיד. ניתן להשתמש במד טמפרטורה ולהמתין עד שהתמיסה תתקרר ל 50°C אך לא תתקרש.
- מיזגו את הג'ל לתבנית כך ששיני המסרק יטבלו בתוך הג'ל, אבל בסיס המסרק יהיה מחוץ לג'ל (תמונה 2).
- המתינו עד לקרישת הג'ל (כ-10 דקות, תלוי בטמפרטורת החדר). שימו לב: אין להזיז את התבניות עד לקרישת הג'ל.
- כאשר הג'ל נקרש יש להוציא את המסרק. עשו זאת כך:
- החזיקו בצידי המסרק שאינם טבולים בג'ל ובעדינות הוציאו את המסרק מהג'ל.
- הוציאו את הג'ל יחד עם התבנית. נגבו בעדינות עם מגבת נייר את עודפי הג'ל שבשולי התבנית.

העברת הג'ל למכשיר אלקטרופורזה

- וודאו שמשטח פלסטיק אפור מונח בתחתית המכל שבמכשיר האלקטרופורזה (כך תוכלו לצפות בתוצאות).
- הניחו את התבנית עם הג'ל במקום המתאים במכשיר האלקטרופורזה (תמונה 1).

יד. העבירו באיטיות את הבופר למכל המכשיר, עשו זאת כך:

טו. מזגו את הבופר על פני תבנית הגיל בצד הקרוב לאלקטרודה החיובית עד שהג'ל יהיה טבול בתמיסה ואת יתרת הבופר מזגו בצד הקרוב לאלקטרודה השלילית. בסיום המזיגה גובה תמיסת ה-TAE במכל יהיה גבוה ב 1-2 מ"מ מגובה הג'ל.

הטענת הבאריות בצבענים

טז. בכל בארית תטעינו $10 \mu\text{L}$ של צבענים בעזרת מיקרופיפטור בנפח $20-2 \mu\text{L}$ (20p)

יז. הדליקו את נורת ההטענה (תמונה 1).

לאחר העברה של כל תמיסה יש להחליף את הטיפ במיקרופיפטור.

טיפ משומש יש להשליך לכלי הפסולת.

יח. שאבו תמיסת צבען ממבחנת אפנדורף 1 (טבלו רק את קצה הטיפ בתמיסת הצבען כדי שלא ייצמד נוזל נוסף לצדו החיצוני של הטיפ).

יט. נגבו בעדינות את שאריות הצבען מהצד החיצוני של קצה הטיפ - החזיקו את המיקרופיפטור מעל לבארית "1" (הראשונה מצד שמאל).

כ. הניחו את שני המרפקים שלכם על משטח העבודה (תמונה 3). תנוחה זו תייצב את המיקרופיפטור.

כא. החדירו את הטיפ בעדינות לבארית ושחררו את התמיסה אל תוך הבארית.

באותו אופן העבירו את יתר תמיסות הצבענים ליתר הבאריות כמתואר בטבלה 3.

טבלה 3: סדר הטענת תמיסות הצבענים בג'ל

בארית	6	5	4	3	2	1
הצבען	תערובת צבענים	ספרנין	אורנג' G	תימול כחול	אדום ניטרלי	מתילן כחול

כב. בסיום ההטענה כבו את נורת ההטענה, כסו את מכשיר הג'ל במכסה הפלסטיק שצבעו כתום.

כג. הפעילו את מכשיר האלקטרופורזה באמצעות לחיצה על מתג ההפעלה.

כד. לאחר שהמכשיר פעל במשך כ- 3 דקות הסירו את המכסה ובדקו את התקדמות הצבענים בג'ל.

כה. המשיכו להפעיל את מכשיר האלקטרופורזה עד שתמיסת הצבען שע מהר ביותר תגיע למרחק של כשני שלישים מקו הסיום בקצה הג'ל. תהליך זה צפוי להמשך עוד כ- 10 דקות.

כו. כבו את המכשיר, הסירו את המכסה הכתום וצלמו את התוצאות.

כז. הוציאו את הג'ל יחד עם התבנית. את הג'ל העבירו לכלי פסולת.

כח. שטפו את התבנית והחזירו למגש הכנת התבניות (תמונה 2).

כט. החזירו את תמיסת ה-TAE לכלי, ניתן להשתמש בה עוד מספר פעמים.

6. על פי תוצאות הניסוי, רשמו בטבלה 2 את המטען של כל אחד מהצבענים.

7. תלמידים הטעינו במכשיר אלקטרופורזה בג'ל שני חומרים שונים A ו-B אשר לשניהם אותה מסה מולרית.

התלמידים הריצו את החומרים במכשיר אלקטרופורזה בג'ל. לאחר 15 דקות נבדקו התוצאות ונמצא כי חומר A נשאר סמוך לבארית, בעוד שחומר B התרחק 2 ס"מ מהבארית לעבר האלקטרודה החיובית. הציעו הסבר אפשרי לתוצאות הניסוי.

8. תלמידים הריצו אותו צבען על שני ג'לים שונים ונמצא שבג'ל אחד הצבען התרחק 3 ס"מ מהבארית ובג'ל השני, באותו פרק זמן, הצבען התרחק 4 ס"מ מהבארית. בשתי ההרצות הצבען נע לכיוון הקוטב החיובי. הציעו הסבר אפשרי להבדלים במרחק התנועה של הצבען בשני הג'לים.

הגן לאינסולין מה תפקיד המתילציה ב-DNA?

ניסוי: למידה בעזרת PCR ואלקטרופורזה בג'ל
בניסוי תכירו את מכשיר ה-PCR שבעזרתו אפשר לקבל מכמות קטנה של DNA מספר רב של עותקים של מקטעי DNA. בניסוי תשכפלו את הגן לעמידות בפני אמפיצילין (amp^R). בהמשך הניסוי, תשתמשו בשיטת אלקטרופורזה בג'ל¹ (gel electrophoresis) המאפשרת לזהות נוכחות של קטעי DNA לקטעי DNA שאורכם ידוע. הגורמים העיקריים המשפיעים על מהירות התנועה של קטעים אלה הם אורך המקטעים והמטען החשמלי שלהם. קטעי ה-DNA נעים בתוך ג'ל אגרוז הטבל בתמיסת בופר² (TAE) המוליכה חשמל. הקטעים הם בעלי מטען חשמלי שלילי ולכן הם נועו לאלקטרודה החיובית. קביעת אורך קטעי ה-DNA (ביחידות של זוגות בסיסים חנקניים - bp) נעשית על פי השוואתם לסולם ה-DNA (DNA Ladder).

לרשותכם שתי מבחנות אפנדורף:

מבחנה המסומנת A+ ובה DNA ממותל (עבר מתילציה) לגן לאינסולין שאורכו 700bp.

מבחנה המסומנת R ויש בה DNA לא ידוע אם הגן לאינסולין ממותל או לא.

טבלה 1: החומרים והכלים הנדרשים לניסוי

על שולחן התלמיד	על שולחן המורה
מיקרופיפטורים בנפחים 2-20, 20-200	מכשיר PCR + טאבלט
טיפים למיקרופיפטורים	מיניצנטריפוגה
עט לרישום על זכוכית	מכשיר ג'ל אלקטרופורזה
אמבט קרח	תמיסת בופר להרצה בג'ל TAE
כן מבחנות PCR + 3 מבחנות	תבנית ג'ל אגרוז עם חומר לצביעת DNA
מבחנת אפנדורף מסומנת A+ ובתוכה 5 מיקרוליטר עם DNA ממותל	
מבחנת אפנדורף מסומנת R ובתוכה 5 מיקרוליטר עם DNA לא ידוע	
מבחנת אפנדורף עם תערובת תחלים לגן לאינסולין ומסומנת Mix Primer	
מבחנת אפנדורף ובה האנזים DNA פולימראז מסומנת Mix TAQ	
מבחנת אפנדורף ובה סולם DNA, מסומנת DNA Ladder	
כלי לפסולת ביולוגית	

שימו לב: במשך כל הניסוי יש לשמור באמבט קרח את כל המרכיבים הבאים:

DNA (DNA Ladder, A+, R), MIX PRIMER, MIX TAQ ומים.

פנו את משטח העבודה שברשותכם ונקו אותו עזרת 70% אתנול.

יש להחליף טיפ לפני כל העברה (גם כאשר מעבירים את אותה תמיסה כדי למנוע זיהום בין המבחנות)

יש לעבוד עם מיקרופיפטור בנפח של 20-20 μL .

שלב א: הוספת המרכיבים הנדרשים להגברת מקטעי ה-DNA ב-PCR

בשלב זה תכניסו את כל המרכיבים החיוניים להגברת קטע ה-DNA למבחנת הניסוי ולבקורות.

א. על שלוש מבחנות PCR רשמו את ראשי התיבות של שמכם. על אחת המבחנות רשמו גם A+, על המבחנה השנייה A-, ועל המבחנה השלישית R.

חשוב מאוד! יש לרשום בקצה העליון של המבחנות וגם בצדן (במקרה שאחד מהסימונים ימחק).

ב. קראו את המידע **בטבלה 2** והעבירו את הכמויות הדרושות של התמיסות לכל אחת משלוש מבחנות PCR (A-, A+, R).

- בכל שלב וודאו שכל הנוזל השתחרר מהטיפ אל המבחנה

- בסיום העברת כל רכיב בטבלה סמנו V.

טבלה 2: המרכיבים הנדרשים להגברת מקטעי ה-DNA ב-PCR

החומרים במבחנות אפנדורף	מבחנות PCR		
	A- (ללא פלסמידים)	A+ (פלסמידים שבהם גן לעמידות בפני אמפיצילין (amp ^R))	R (פלסמידים מחיידקים שבודדו מגופם של חברי המשלחת)
מים ³	21 μL	19 μL	19 μL
DNA פולימראז, בופר ונוקלאוטידים (dNTPS) מהמבחנה המסומנת MIX TAQ	25 μL	25 μL	25 μL
תערובת תחלים (פריימרים) מהמבחנה המסומנת MIX PRIMER	4 μL	4 μL	4 μL
תמיסה ובה פלסמידים	ללא	2 μL	2 μL
נפח סופי במבחנה	50 μL	50 μL	50 μL

³המים עברו סינון ועיקור ואין חשש שיש בהם זיהום של DNA

ג. פקקו את מבחנות ה-PCR, מסרו למורה או ללבורנט לצורך סירכוז קצר במיניצנטריפוגה על מנת לוודא שלא נשאר נוזל על דפנות המבחנה. אם אין ברשותכם מיניצנטריפוגה, החזיקו בעדינות את החלק העליון של המבחנה והקישו בעדינות על תחתית המבחנה. פעולה זו תגרום לריכוז הנוזלים בתחתית המבחנות.

שלב ב: הגברה ב-PCR

ד. הכניסו את 3 מבחנות ה-PCR למכשיר ה-PCR. המורה או הלבורנט יתכנתו את המכשיר על פי הפירוט בטבלה 3 ויפעילו את המכשיר.

טבלה 3: תכנות מכשיר ה-PCR

מספר מחזורים	טמפרטורה (°C)	זמן
1	94	60 שניות
20	94	15 שניות
	58	15 שניות
	68	30 שניות
1	68	120 שניות

ה. כעבור כ-40 דקות, כאשר תוכנית ה-PCR תסתיים הוציאו את המבחנות שלכם מהמכשיר והניחו אותן בכך המבחנות המתאים.

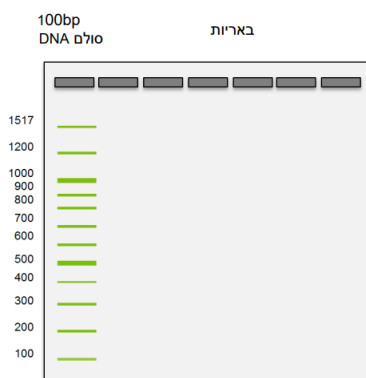
שימו לב! בדקו את הסימונים שרשמתם על המבחנות. אם יש צורך רשמו אותם שוב
שלב ג: הטענה בגיל

בשלב זה תטענו בגיל האגרוז דגימה מנוזל ה-PCR מכל אחת משלוש המבחנות A+, A-, R. לרשותכם גיל אגרוז המכיל 9 באריות, המותקן במכשיר האלקטרופורזה וטבול בתמיסת הבופר TAE. כדי לאפשר את זיהוי מולקולות ה-DNA בגיל, יש להשתמש בכמות מספקת של תוצרי ה-PCR. בנוסף, במהלך הכנת הגיל הוסף לאגרוז הצבע הפלואורסצנטי Glow Smart, הנקשר ל-DNA ומאפשר את זיהוי לאחר ההרצה. ניתן להטעין באותו גיל את תוצאותיהן של שתי קבוצות. הקפידו לתעד באילו באריות הוטענה כל דגימה, ולציין את תוכן כל מבחנה.

1. הדליקו את נורת ההטענה במכשיר האלקטרופורזה בגיל.
 2. באמצעות מיקרופיפטור מדויק שאבו DNA Ladder 10 μ L (על שולחן המורה), והעבירו לבארית מספר 1 (הראשונה משמאל) באופן הבא:
 - החדירו את הטיפ בעדינות לבארית ושחררו את התמיסה אל תוך הבארית. הקפידו לא לשאוב חזרה את הנוזל מהבארית.
 - העבירו את הטיפ לכלי הפסולת.
 - ח. באותו אופן העבירו 10 μ L תמיסה מכל אחת מהמבחנות A+, A-, R לבאריות 2, 3 ו-4 כמתואר בטבלה 4. הקבוצה השנייה תטעין בבאריות 6, 7 ו-8.
- טבלה 4: הסדר שבו הדגימות ממבחנות ה-PCR נטענו בגיל אגרוז

בארית	1	2	3	4	5	6	7	8
סוג הנוזל שהוטען	DNA Ladder				---			

- ט. בסיום ההטענה **כבו** את נורת ההטענה, **כסו** את מכשיר הגיל במכסה הפלסטיק הכתום והפעילו את המכשיר באמצעות לחיצה על מתג ההפעלה.
- חל איסור לפתוח את קופסת המכשיר כל עוד המכשיר פועל ועובר בו זרם חשמלי! את נורת הצפייה בתוצאות אפשר להדליק רק לזמן קצר.**



- י. עקבו אחר התקדמות הרצת הדגימות בגיל והמתינו כ-10 דקות.
- יא. בתום ההרצה, **כבו** את מכשיר האלקטרופורזה באמצעות מתג הכיבוי ונתקו אותו ממקור החשמל.
- יב. בחנו את התוצאות שהתקבלו בגיל, צלמו את הגיל, ולאחר מכן תעדו את התוצאות באמצעות שרטוט הפסים שהתקבלו בטבלה המאוירת שבדף איסוף הנתונים.

ניתוח תוצאות הניסוי

התבססו על התוצאות שהתקבלו על הגיל וענו על השאלות

1. מה מייצגים הפסים הנראים על גבי הגיל?
2. מדוע חשוב לכלול בניסוי את מבחנה A-? הסבירו תשובתכם.
3. מדוע חשוב לכלול בניסוי את מבחנה A+? הסבירו את תשובתכם.
4. איזה גן הוגבר באמצעות PCR?

5. האם פירוש תוצאות הניסוי ישתנה אם בעמודה A יתקבל פס של DNA?

6. האם פירוש תוצאות הניסוי ישתנה אם לא יראה פס בעמודה A+ ?

7. התבססו על כל תוצאות הניסוי וקבעו האם החיידקים בגופם של חברי המשלחת מכילים את הגן לעמידות נגד אמפיצילין. נמקו קביעתכם.

8. בהרצה בגיל של דגימות DNA מחיידקים שהיו בגופות של חברי המשלחת נמצאו מעט חיידקים שנשאו את הגן amp^R . הציעו הסבר אפשרי לממצא זה בהתחשב בכך שחברי המשלחת יצאו למסעם עוד בטרם החל השימוש הרפואי בחומרים אנטיביוטיים.

רשימת המושגים העיקריים וההסבר של כל אחד מהם תסייע לכם במהלך הניסוי.

תבנית DNA: קטע ה-DNA שאותו אנו מעוניינים לשכפל לקטע זה נקשרים התחלים.

תערובת נוקלאוטידים (dNTPS): תערובת של ארבעת הנוקלאוטידים שישמשו לבניית גדילי ה-DNA המשלימים.

DNA פולימראז (TAQ) אנזים המזרז שכפול של DNA שמקורו מחיידקים החיים במעינות חמים. שלא ככל האנזימים (שהם חלבונים) שמאבדים את פעילותם בטמפרטורות גבוהות, הטמפרטורה המיטבית של DNA פולימראז היא בטווח שבין 70°C - 80°C . תכונה זו של האנזים מאפשרת לו לפעול ביעילות גם בטמפרטורה גבוהה, כמו זו שבמכשיר ה-PCR

תחלים (פריימרים) F ו-R קטע קצר של DNA (כ-20 נוקלאוטידים) המסייע בתהליך שכפול של DNA במבחנה. רצף הבסיסים הנחקקיים בתחל מתאים לרצף קצר המצוי בתחילת הגן אותו רוצים לשכפל (קצה 3') ותחל אחר מתאים לרצף בסיסים חנקניים המצוי בסופו של גן זה (קצה 5'). לכל מבחנת PCR מוסיפים תערובת של שני תחלים המתוכננים במיוחד עבור הגברת הגן amp^R , תחל שנצמד לקצה 3' הוא "תחל קדמי (-F) ותחל שנצמד לקצה 5' הוא תחל אחורי (-R). התחל משמש כאתר להתחלת שכפול. האנזים DNA פולימראז (TAQ) מתחיל את השכפול ממקום הקישור של התחל אל הגדיל של ה-DNA, והתוצר של פעילותו היא תבנית ה-DNA. במבחנת PCR (ראו סעיף ו שלב ראשון) בהשפעת הטמפרטורה הגבוהה הקשרים בין שני הגדילים של תבנית ה-DNA נפרמים והתחלים נצמדים לקצוות גדילי ה-DNA בהתאמה. רק לאחר ההצמדות של התחלים, האנזים המשכפל המצוי בתערובת מזרז קישור של נוקלאוטיד מתאים. כך נוצר גדיל חדש המשלים את הגדיל הקיים ובסיומו של התהליך נוצרת מולקולת ה-DNA המבוקשת שהיא תבנית ה-DNA.

מחזור PCR בודד כולל שלושה שלבים

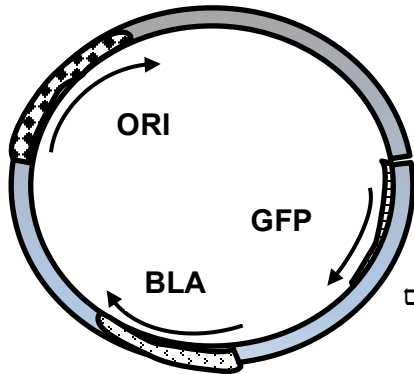
שלב ראשון: הוא שלב הדנטורציה (הפרדה) המתרחש בטמפרטורה של 94°C . הטמפרטורה הגבוהה גורמת להפרדות שני גדילי ה-DNA. כך נוצרים 2 גדילים בודדים שכל אחד מהם מהווה תבנית לבניית גדיל המשלים. שלב שני: הוא שלב קישור התחלים המתרחש בטמפרטורה שבין 50°C ל 70°C . טווח טמפרטורות אלה נקבע על פי אורך ורצף התחל ומטרתה לייעל את הקישור של התחלים לתבנית ה-DNA שלב שלישי: ההגברה (ההתארכות) המתרחש בטמפרטורה של 68°C . טמפרטורה זו מיטבית לפעילותו של האנזים – DNA פולימראז. לשלב זה חיוניים הנוקלאוטידים ויוני מגנזיום המשמשים כקו-אנזים ומצויים בבופר TAQ. ריכוז גבוה של האנזים מסייע לשכפול בו זמני של תבניות ה-DNA שבמבחנה. סולם DNA (DNA Ladder) תערובת של קטעי DNA באורך ידוע אותה מטעינים בתוך בארית של אלקטרופורזה בגיל. התערובת מסייעת לקביעת אורך של קטע DNA לא ידוע. את האורך של הקטע מבטאים במספר זוגות נוקלאוטידים (היחידות הן bp).

טרנספורמציה בתאי החיידק E.Coli (א. קולי)

טרנספורמציה היא שינוי מכוון במטען התורשתי של תא. השינוי נוצר כתוצאה מהחדרת DNA שמקורו בתא שיש לו גנוטיפ אחר¹.

בניסויי תעבירו את הפלסמיד "pGFP" לתאיהם של חיידקי E.Coli ותעקבו אחר ביטוי של הגנים שבפלסמיד.

מפת הפלסמיד:



GFP - גן המקודד לחלבון זוהר, מקורו מב"ח ימיים זוהרים.

BLA - (β לקטאמאז) גן המקודד לאנזים המזרז פירוק אמפיצילין.

ORI - אזור בקרה ממנו מתחיל שכפול הגנים בפלסמיד.

בניסויי תכינו את החיידקים לביצוע טרנספורמציה, תבצעו טרנספורמציה על ידי הוספת פלסמידים לחיידקים, תזרעו את החיידקים על אגר ותבדקו את תוצאות הניסוי.

חלק א

הכנת החיידקים לטרנספורמציה

בחלק זה תגרמו להגדלת חדירות הקרומים של תאי החיידקים כדי שתתאפשר כניסה יעילה של פלסמידים לתוך תאים אלו. החיידקים יהיו בסביבה של טמפרטורה נמוכה המונעת התרבות של חיידקים ומסייעת בחדירת דנ"א. א. לבשו כפפות והרכיבו משקפי מגן.

ב. בקשו מהלבורנט קרח גרוס והכניסו אותו לקערה המסומנת "אמבט קרח".

ג. קבלו מהלבורנט מבחנה המסומנת "תרחיף חיידקים" שבה יש חיידקי E.Coli במצע מזון נוזלי (LB). הכניסו את המבחנה לאמבט הקרח למשך 10 דקות.

היעזרו בשעון קיר שבמעבדה ורשמו את השעה _____

לידיעתכם 1: LB הוא מצע מזון עשיר המכיל מינרלים וחומרי הזנה כגון חלבונים, החיוניים לגדילת חיידקי

בעודכם ממתינים להוצאת המבחנה מאמבט הקרח בצעו את הוראות סעיף ד.

ד. לרשותכם שתי מבחנות אפנדורף באמצעות עט לסימון על זכוכית כתבו על כל אחד מהמכסים של המבחנות את האות הראשונה בשמו של אחד מחברי הקבוצה.

שימו לב: בהמשך הניסוי תוסיפו פלסמיד למבחנה "pGFP+" ואילו למבחנה "pGFP-" לא תוסיפו פלסמיד.

לרשותכם פיפטת פסטר סטרילית מפלסטיק.

ה. פתחו את האריזה מהקצה שבו נמצא הטפטף של הפיפטה. החזיקו בטפטף והוציאו את הפיפטה. פתחו גם את צידי האריזה ופרסו אותה כך שצידה החיצוני יהיה מונח על השולחן.

ו. הניחו את הפיפטה על גבי האריזה.

ז. באמצעות עט לסימון על זכוכית הדגישו בקו על הפיפטה את הסימן של 1 מ"ל - בהמשך תשתמשו בפיפטה שהכנתם.



¹ עתידה, י., גנטיקה עמ' 335 מילון מונחים.

בהמשך הניסוי תשתמשו מספר פעמים בפיפטות סטריליות. על מנת להקל על השימוש בפיפטות מומלץ להדגיש מראש את הנפח הרצוי 1 או 0.5 מ"ל.

ח. משחלפו **7 דקות** מהשעה שרשמתם בסעיף ג, המשיכו לעבוד לפי ההנחיות הבאות. לרשותכם מבחנה המסומנת "TRAN" ובה תמיסת טרנספורמציה.
- העבירו את המבחנה מהכוס לאמבט הקרח.

ט. משחלפו 10 דקות מהשעה שרשמתם בסעיף ג, הוציאו את המבחנה "TRAN" מאמבט הקרח לכוס.
- הוציאו את המבחנה "תרחיף חיידקים" מאמבט הקרח, **מבלי** לטלטל את התרחיף.
- בעזרת פיפטת הפסטר הסטרילית שסימנתם העבירו בזירות 1 מ"ל **מהנוזל העליון** שבמבחנה "תרחיף חיידקים" לכלי המסומן "פסולת". הניחו את הפיטה בכלי הפסולת.

במבחנה "תרחיף חיידקים" יש כעת תרחיף מרוכז של חיידקים. קראו את סעיפים י-יא ובצעו בזריזות את ההוראות.

י. לרשותכם פיטה סטרילית בנפח 5 מ"ל ופרופיטה מתאימה. העבירו 5 מ"ל מתמיסת ה-TRAN למבחנה "תרחיף חיידקים" שיש בה חיידקים בתמיסת LB. פקקו את המבחנה.
יא. ערבבו קלות את תכולת המבחנה. הכניסו את המבחנה לאמבט הקרח למשך 20 דקות.
רשמו את השעה _____

שאלה 1:

לידיעתכם 2:

תמיסת טרנספורמציה היא תמיסה מימית של המלח CaCl_2 .

- יוני הסידן (Ca^{2+}) מונעים דחייה חשמלית בין יונים שלילים (יוני הפוספט) שנמצאים ב-DNA של הפלסמיד לבין יונים שליליים הנמצאים בחומרים שבונים את הקרום החיצוני של חיידקי E.Coli.
- יוני הסידן גם מרחיבים את התעלות היוניות בקרום התא דרכן עוברים יונים אלה והודות לכך גדלה חדירות הקרום.

I. התאים של כל היצורים החיים מוקפים בקרום בררני. הסבירו את הקשר בין **מבנה** קרום התא לבין תפקודו.

II. בניסויים קודמים נמצא שחשיפת החיידקים לטמפרטורת נמוכות מאד (כמו זו שבה השתמשנו) מונעת את התרבותם ומאפשרת לקרום החיידקים להישאר חדיר, כך שגם פלסמידים יכולים לעבור דרכו. היעזרו במידע שבשאלה, במידע שבפתיח ובקטע לידיעתך 2 והסבירו כיצד הטיפול המתואר מסיעם להצלחת תהליך הטרנספורמציה בחיידקים?

III. ידוע כי בתאים של יצורים חיים קיימים מנגנוני הגנה. אחד המנגנונים הוא הימצאות אנזימים החותכים DNA זר שחודר לתאיהם.

בהמשך הניסוי תחשפו את החיידקים לטמפרטורה של 42°C , טמפרטורה שהיא גבוהה מהטמפרטורה האופטימלית לפעילות אנזימים אלה בתאי החיידקים, אך אינה פוגעת בחיוניותם. הציעו הסבר אפשרי לחשיבותו של הטיפול ב- 42°C להצלחת הטרנספורמציה.

משחלפו 20 דקות מהשעה שרשמתם בסעיף יא המשיכו לעבוד לפי ההנחיות הבאות.

יב. לרשותכם פיפטת פסטר סטרילית מפלסטיק. הדגישו את הסימון לנפח של 0.5 מ"ל.

יג. טלטלו בעדינות את הנוזל שבמבחנה "תרחיף חיידקים" שאלה הכנסתם גם נוזל טרנספורמציה

יד. פתחו את המכסה של מבחנת האפנדורף "pGFP+", ובאמצעות פיטה

פסטר סטרילית העבירו 0.5 מ"ל נוזל מהמבחנה "תרחיף חיידקים" למבחנת האפנדורף.

טו. סגרו את מכסה מבחנת האפנדורף.

טז. פתחו את המכסה של מבחנת אפנדורף "pGFP-" וחזרו על הוראות סעיף יב-טו עם המבחנה השנייה.

יז. הציבו מיד את מבחנות האפנדורף ("pGFP+", "pGFP-") בכך המבחנות, ואת הכן הניחו במיכל הקרח.

יח. הניחו את הפיטה בכלי הפסולת.

יט. **סעיף זה יתבצע בעזרת המורה**

התבוננו במורה המחזיק את הבקבוקון שבו נוזל ופלסמידים. המורה מאיר באור UV על הבקבוקון שבו נמצאים פלסמידים. האם היה שינוי בצבע הנוזל שבבקבוקון? _____

לידיעתכם 3:

הפלסמיד הוא מולקולת DNA טבעית שיכולה להתרבות ללא תלות בכרומוזום החיידק ומכילה מידע חיוני לגדילתו. ניתן להשתמש בפלסמיד כאמצעי להעברת קטעי גנום זר מאורגניזם אחד לאורגניזם אחר. בפלסמיד נמצא אזור בקרה ORI ממנו מתחיל שכפול DNA בפלסמיד. בניסוי תשתמש בפלסמיד המהונדס המכונה "pGFP".

לפלסמיד המהונדס הוכנסו הגנים האלה:

- גן GFP המקודד לחלבון זוהר. גן זה שכיח בבע"ח ימיים כגון זואופלנקטון, מדוזות, ודגים.
- גן BLA המקודד לחלבון "בטא לקטמאז" ומעניק לחיידקים תכונת עמידות בפני אנטיביוטיקה מסוג אמפיצילין.

שאלה 2:

התבססו על התוצאות שרשמתם בסעיף יט וקבעו האם הפלסמיד שבבקבוק מייצר חומר זוהר. הסבירו מדוע.

כ. הוציאו את מבחנת האפנדורף "pGFP+" מהקרח וגשו לשולחן המורה.

המורה יעביר 0.0025 מ"ל תרחיף פלסמידים מבקבוקון בו מצויים פלסמידים למבחנה "pGFP+".

סיגרו בזהירות את המכסה של מבחנת האפנדורף.

כא. החזיקו את המבחנה מעל שולחן והקישו קלות באמצעות האצבע בחלק התחתון של המבחנה על מנת לוודא כי כל הנוזלים נמצאים בתחתית המבחנה.

כב. החזירו את המבחנה "pGFP+" לכן המבחנות שבמיכל הקרח שבו נמצאת מבחנה "pGFP-".

רשמו את השעה _____

שימו לב: במשך 10 דקות המבחנות צריכות להיות טבולות בקרח, כך שרק המכסה יראה.

בעודכם ממתינים להוצאת המבחנות מאמבט הקרח השיבו על שאלה 3 ובצעו את סעיף כד.

שאלה 3

הסבירו מדוע חשוב היה לכלול בניסוי את המבחנה "pGFP-", מבחנה ללא פלסמיד?

לידיעתכם 4:

LB הוא מצע מזון עשיר המכיל מינרלים וחומרי הזנה כגון חלבון, החיוניים לגדילת חיידקים וביניהם חיידקי E.Coli.

LB/AMP הוא מצע מזון LB שהוסיפו לו חומר אנטיביוטי מסוג אמפיצילין.

כג. לרשותכם צלחות פטרי המסומנות בספרות 1 – 3. על תחתית כל צלחת קָשום גם הרכב האגר שבה. בצלחות אלה תשתמש לזריעת החיידקים.

- כד. באחת הצלחות מצע המזון הוא LB ובשתי הצלחות האחרות מצע המזון הוא LB/AMP.
- רשמו בשולי המכסה של כל אחת מהצלחות את שמו של אחד מחברי הקבוצה.
 - האגר שבצלחת 1 הוא LB/AMP. רשמו בשולי המכסה "pGFP+".
 - האגר שבצלחת 2 הוא LB. רשמו בשולי המכסה "pGFP-".
 - האגר שבצלחת 3 הוא LB/AMP. רשמו בשולי המכסה "pGFP-".
- לאחר שחלפו 10 דקות מהשעה שרשמתם בסעיף כב עברו לסעיף כה.**
עבדו בזריזות ובדייקנות.

כה. על שולחן המורה הוכן עבורכם אמבט מים בטמפרטורה של 42°C . העבירו את מבחנות האפנדורף הצבעוניות "pGFP+" ו-"pGFP-" לכן המבחנות והכניסו אותו לאמבט למשך 60 שניות בדיוק.

כו. בתום 60 שניות החזירו במהירות את המבחנות לאמבט הקרח למשך 2 דקות
שימו לב: הכניסו את המבחנות לעומק הקרח, כך שרק המכסה של המבחנות יראה.

חלק ב

זריעת חיידקים בצלחות עם מצע מזון

בחלק זה תזרעו את החיידקים שעברו טיפול להגדלת חדירות הקרומים. בחלק מהחיידקים התרחשה טרנספורמציה.

- כז. לרשותכם כלי המסומן "LB" ובו תמיסת מזון LB לגידול חיידקים.
- בתום 2 דקות הוציאו מהקרח את הכן והמבחנות שבתוכו.
 - לרשותכם פיפטת פסטר סטרילית מפלסטיק.
 - חיזרו על ההוראות בסעיף ה' וסמנו על הפיטה סימן על נפח של 1 מ"ל.
 - פתחו את המכסה של מבחנת "pGFP-" ובעזרת פיפטת פסטר סטרילית העבירו 1 מ"ל תמיסת LB מהכלי למבחנת "pGFP-". פקקו היטב את המבחנה.
 - באותו אופן, העבירו עם אותה פיפטת פסטר 1 מ"ל תמיסת LB גם למבחנת "pGFP+".

לידיעתכם 5:

בחלק א של הניסוי גרמתם לחדירת הפלסמידים לתאי החיידקים. העברת החיידקים לתמיסת LB העשירה בחומרי הזנה, מאפשרת קיומם של תהליכי תעוק ותרגום בתאיהם.

- כח. וודאו ששתי מבחנות אפנדורף הנמצאות בכך המבחנות פקוקות היטב. החזיקו את מבחנת "pGFP-" ובעדינות הפכו אותה כ- 6 פעמים כדי לערבב ולהרחיף את החיידקים.
- כט. הדגירו את מבחנות האפנדורף בטמפרטורה של 37°C למשך 30 דקות. פרק זמן זה יאפשר לחיידקים לייצר את האנזים המפרק פניצילין.
- ל. לרשותכם פיפטת פסטר סטרילית מפלסטיק. חיזרו על ההוראות בסעיף ה' וסמנו על הפיטה סימן המדגיש נפח של 0.5 מ"ל.
- לא. באמצעות הפיטה פסטר הסטרילית העבירו 0.5 מ"ל נוזל מהמבחנה "pGFP-" לצלחת 3 וטפטפו 2 טיפות לצלחת מספר 2. הניחו את הפיטה בכלי הפסולת.



לב. לרשותכם מחט זריעה סטרילית.

הרימו את המכסה של צלחת "pGFP-LB (צלחת 2) בזווית של כ- 45° והעבירו בעדינות את הלולאה על פני האגר כך שהנוזל יפוזר עליו באופן שווה.

סובבו את הצלחת 3 פעמים והמשיכו בפיזור עדין על פני האגר **ולא בתוכו**, כך שכל הנוזל יפוזר על פני הצלחת. סגרו את המכסה. העבירו את מחט הזריעה לכלי הפסולת.

לג. לרשותכם מקל דריגלסקי סטרילי:

הרימו את המכסה של צלחת "pGFP-LB/AMP (צלחת 3) בזווית של כ- 45° והעבירו בעדינות את המקל על פני האגר כך שהנוזל יפוזר באופן שווה על האגר. סובבו את הצלחת 3 פעמים והמשיכו בפיזור עדין על פני האגר ולא בתוכו כך שכל הנוזל יפוזר על פני הצלחת. סגרו את המכסה. העבירו את המקל לכלי הפסולת.

לד. החזיקו את מבחנת "pGFP+" ובעדינות הפכו את המבחנה כ- 6 פעמים כדי לערבב ולהרחיף את החיידקים.

לה. לרשותכם פיפטת פסטר סטרילית מפלסטיק.

חיזרו על ההוראות בסעיף ה' וסמנו על הפיטה סימן על נפח של 0.5 מ"ל.

באמצעות פיפטה הסטרילית העבירו 0.5 מ"ל נוזל ממבחנת "pGFP+" לצלחת 1. העבירו את הפיטה לכלי הפסולת.

לו. השתמשו במקל דריגלסקי סטרילי וחזרו על הוראות סעיף כ' עם צלחת "pGFP-LB/AMP (צלחת 1) העבירו את המקל לכלי הפסולת.

לז. ודאו ששמו של אחד מחברי הקבוצה רשום על המכסה של כל אחת מהצלחות.

הניחו את 3 הצלחות זו על גבי זו כשהן הפוכות (כשהמכסה של כל צלחת פונה כלפי מטה) והצמידו נייר דבק סביב 3 הצלחות.

מסרו את הצלחות ללבורנט והוא יעביר אותן לאינקובטור שהטמפרטורה בו היא 37°C למשך 24 שעות.

השליכו את הכפפות לכלי הפסולת. החזירו את כל הציוד למגש. נקו את השולחן בעזרת אלקוהול 70% ורחצו ידיים במים וסבון.

שאלה 4

I. הסבירו מדוע התבקשתם להכניס את מבחנות האפנדורף לקרח ולאחר מכן לאמבט בטמפרטורה 42°C ושוב לקרח.

II. מדוע יש להשאיר את הצלחות באינקובטור בטמפרטורה של 37°C במשך כ-24 שעות עד לקבלת התוצאות?

שאלה 5

הכינו טבלה לסיכום מערך הניסוי בה תרשמו את התכולה של כל אחת מהצלחות.

- הוסיפו שתי עמודות לרישום התוצאות שכותרתן "מספר כל המושבות" ו-"מספר המושבות הזוהרות".

- רשמו מתחת לטבלה שני גורמים שנשמרו קבועים בניסוי.

- הוסיפו כותרת לטבלה.

שאלה 6

מהן התוצאות הצפויות בכל אחת מהצלחות?

חלק ג

בדיקת התוצאות והסברן

לח. לבשו כפפות. הסירו בזהירות את סרט הדבק מהצלחות והניחו אותן כך שהתחתית של כל צלחת תהיה מונחת על השולחן. התבוננו בתוצאות מבלי לפתוח את הצלחות.
רישמו את התוצאות בעמודה המתאימה בטבלה שהכנתם (שאלה 5).
הערה: אם המושבות צפופות מאוד ולא ניתן לספור אותן – רשמו "כיסוי מלא".
לט. על פי הנחיות המורה, גשו לחדר חשוך. המורה יאיר במנורת UV על צלחות החיידקים. סיפרו את מספר המושבות הזוהרות שגדלו בכל אחת מהצלחות. רישמו את התוצאות בעמודה המתאימה בטבלה שהכנתם (שאלה 5).

השליכו את הכפפות לכלי פסולת.

קבלו מהלבורנט צמר גפן ספוג באלכוהול. נקו את משטח העבודה עליו עבדתם.
רחצו ידיים במים וסבון.

שאלה 7

- I. הסבירו את התוצאות שהתקבלו בכל אחת מהצלחות.
- II. האם התוצאות אותן רשמתם בטבלה תואמות את תשובתכם בשאלה 6? אם התוצאות אינן תואמות את אלה שקיבלתם בניסוי, הציעו הסבר אפשרי להבדל זה.

שאלה 8

הסבירו מדוע היה חשוב לכלול בניסוי את צלחות 2 ו-3?

שאלה 9

תלמיד החליט להוסיף לניסוי צלחת שמצע המזון בה הוא LB ועליה זרע חיידקים שהושהו עם פלסמידים (כמתואר בסעיפים א - טז).

בצלחת התפתחו מושבות רבות של חיידקים, ובהארה באור UV רק חלק מהן זוהרו.

- I. הסבירו את התוצאות שהתלמיד קיבל.
- II. מה חשיבותה של צלחת זו למערך הניסוי?

שאלה 10

הסבירו מדוע השפעת אור U.V שונה בהארת הפלסמיד במבחנה (תשובה לשאלה 2) מזו שצפיתם בבדיקת התוצאות?

שאלה 11

הפלסמיד בניסוי כולל את הגן GFP, שמקודד לחלבון זוהר, ומקורו מיצורים ימים זוהרים.
הסבירו כיצד יתכן שגן מיצורים ימיים אאוקריוטיים כגון מדוזות ודגים מתבטא בחיידקים פרוקריוטיים.

שאלה 12

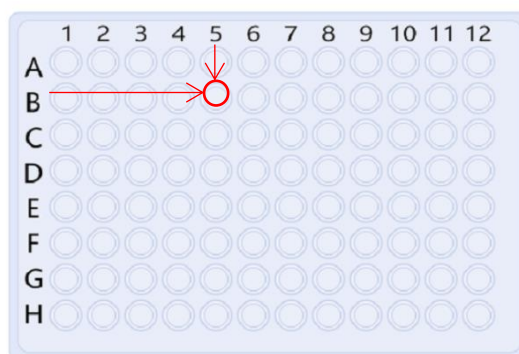
- I. בניסוי יצרתם חיידקים עמידים לאנטיביוטיקה מסוג אמפיצילין באמצעות שיטות עבודה של הנדסה גנטית. מה עלולה להיות הסכנה ביצירת חיידקים מהונדסים בבתי הספר?
- II. האם לדעתכם יש להתיר ניסויים בחיידקים מהונדסים גנטית במעבדות בתי הספר?
נמקו דעתכם בעזרת טיעון בעד או בעזרת טיעון נגד השימוש בחיידקים מהונדסים בבית ספר.

זיהוי חלבוני עקה (HSP70) בנבטים באמצעות שיטת ELISA (Enzyme-Linked Immuno sorbent Assay)

שינויים בתנאי הסביבה החורגים מהטווח האופטימלי להתפתחות האורגניזמים, גורמים למצבי עקה (Stress) ולפגיעה במבנה ובתפקוד התאים. תופעות כמו זיהום והתחממות גלובלית משנות את תנאי הסביבה ומגבירות את שכיחות מצבי העקה.

בצמחים, מצבי עקה עלולים להיגרם כתוצאה מחשיפה לגורמים אביוטיים כגון טמפרטורות קיצוניות (חום או קור), יובש, מליחות, קרינה, מתכות כבדות ומזהמים כימיים, וכן מגורמים ביוטיים כגון פתוגנים (חיידקים, פטריות, וירוסים), צמחים מתחרים וחרקים אוכלי-צמחים. השפעת גורמים אלו מתבטאת בשיבוש תהליכים ביוכימיים ופיזיולוגיים בתא, בין היתר עקב פגיעה בחלבונים חיוניים. במצבים כאלה מופעלים מנגנוני הגנה, ובראשם עלייה בביטוי חלבוני עקה (Stress proteins). חלבונים אלה שומרים על יציבות חלבונים אחרים, מפחיתים הצטברות של חלבונים פגומים, ולעיתים אף מכוונים חלבונים בלתי-תקינים לפירוק. רמות מוגברות של חלבוני עקה משמשות סמן ביולוגי אמין להתרחשות עקה ברקמה. HSP70 (Heat Shock Proteins) הוא אחד מחלבוני העקה והביטוי שלו עולה ככל שמצב העקה ממושך או קיצוני יותר.

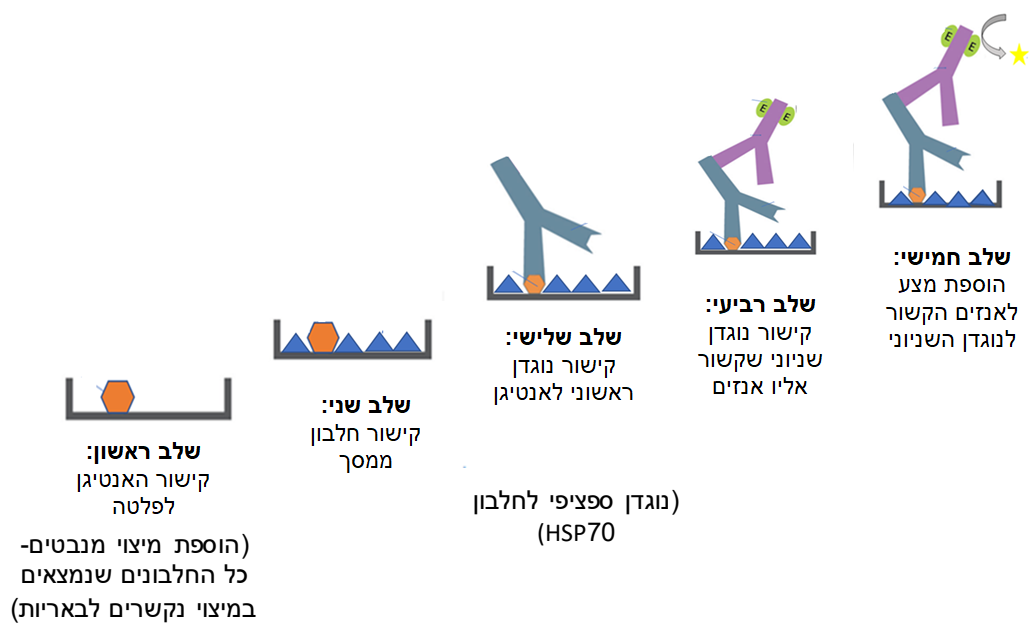
ניתן לזהות את נוכחותם של HSP70 באמצעות שיטת ה-ELISA. בעזרת שיטה זו ניתן לאתר ולכמת חלבונים ספציפיים המצויים בדגימה באמצעות שימוש בנוגדנים. תהליך הזיהוי נערך באמצעות פלטה בעלת 96 באריות (שקעים), המסודרות ב-8 שורות ו-12 טורים. לכל בארית קיימת כתובת ייחודית, למשל B5 (ראו איור 1). תחתית הבאריות מצופה בחומר המאפשר קישור לא ספציפי של חלבונים אל פני התחתית.
איור 1: פלטת ELISA



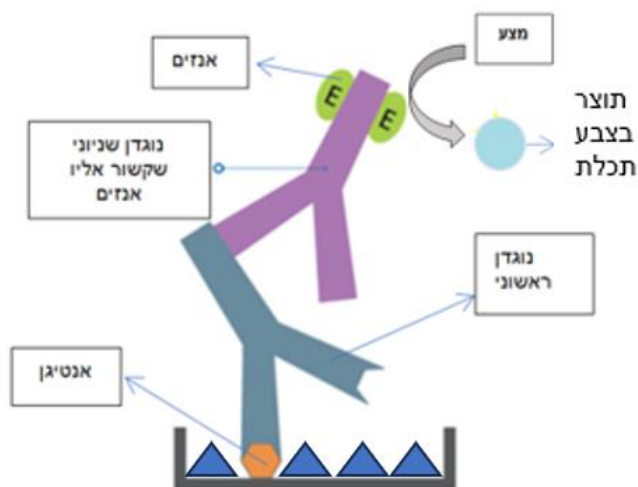
השיטה כוללת חמישה שלבים עיקריים:

- ציפוי (Coating):** החלבונים שבמיצוי הנבטים שתכינו בהמשך נקשרים לתחתית הבאריות ויוצרים שכבה דקה של חלבונים המשמשים כאנטיגנים, וביניהם נמצא גם חלבון המטרה, למשל HSP70.
- חסימה (Blocking):** הוספת תמיסה שחוסמת את אתרי הקשירה הפנויים בבאריות, שנשארו לאחר הציפוי למניעת קישור לא-ספציפי של נוגדנים בהם תשתמשו בשלבים הבאים.
- הוספת נוגדן ראשוני:** הוספת תמיסה ובה נוגדן ראשוני ייחודי לחלבון המטרה (HSP70).
- הוספת נוגדן שניוני מצומד אנזים:** הוספת תמיסה ובה נוגדן שניוני ייחודי הנושא עליו אנזים הנקשר לנוגדן הראשוני.
- הוספת סובסטרט ופיתוח צבע:** הוספת מצע לאנזים גורמת לתגובה כימית שבסיומה מתקבל תוצר צבעוני. עוצמת הצבע המתקבל פרופורציונלית לכמות חלבון המטרה בבארית. (ראו איורים 2–3).

איור 2 : שלבי הביצוע של ELISA בלתי ישירה (Indirect ELISA)



איור 3 : עקרון פעולה של ELISA בלתי ישירה: זיהוי אנטיגן באמצעות נוגדן ראשוני ונוגדן שניוני מסומן באנזים



טבלה 1: כלים עבור 2-3 תלמידים העובדים על אותה פלטה

כמות	פריט
1	פלטה ELISA
1	מיקרופיפטור המתאים להעברת נוזלים בנפח 100 μ l
1	מיקרופיפטור המתאים להעברת נוזלים בנפח 370 μ l
קופסה	קצות פיפטה (טיפים) המתאימים למיקרופיפטור/ים
5	כוסות כימיות מזכוכית בנפח 100 מ"ל
12	מבחנות אפנדורף
1	כן מבחנות ובו 5 מבחנות קצרות
10	פיפטות פסטר מפלסטיק בנפח 3 מ"ל
3	מסננת קטנה
3	משפך קטן בקוטר 6 ס"מ
3	עלי ומכתש
1	כוס כימית בנפח 200 מ"ל המכילה 100 מ"ל תמיסת בופר שטיפה (PBST)
1	נייר פרפילם/מכסה מתאים לפלטה
גליל	נייר סופג/מגבות נייר
1	עט לסימון על זכוכית
1	טיימר/שעון
1	צנטריפוגה למבחנות אפנדורף
1	אינקובטור
5	אמבטי מים - טמפרטורות ($4^{\circ}/25^{\circ}/45^{\circ}/65^{\circ}/80^{\circ}$ C)
5	מד טמפרטורה לאמבטי מים
1	מאזניים אנליטיים
1	מכשיר קורא ELISA / או אפליקציה מתאימה לקריאת הצבע המתקבל
1	כלי פסולת כימית

טבלה 2: חומרים עבור 2-3 תלמידים העובדים עם אותה פלטה

כמות	חומרים
10 גרם	נבטים בני 5 ימים (עדשים ירוקות/ שחורות/ חיטה/ לוביה)
12.5 מ"ל	בופר מיצוי
150 מ"ל	בופר שטיפה (PBST)
3 מ"ל	מבחנה המכילה חלבון ממסך המסומנת "אבקת חלב"
3 מ"ל	מבחנה עם *נוגדן ראשוני המסומנת "נוגדן 1"
3 מ"ל	מבחנה המכילה נוגדן שניוני עם אנזים המסומנת "נוגדן 2"
3 מ"ל	סובסטרט – ינתן על ידי המורה / הלבורנט ברגע השימוש
500 מ"ל	כלי המכיל מי ברז

*נוגדן ראשוני בו משתמשים בניסוי הוא Anti HSP70

מהלך הניסוי

הכנת המיצוי

- א. באמצעות עט לסימון, רשמו 4, 25, 45, 65 ו-80 בחלק העליון של הכוסות הכימיות.
- ב. לרשותכם נבטים בני 5 ימים. באמצעות מאזניים שקלו 5 קבוצות נבטים, משקל כל קבוצה 2 גרם. העבירו את קבוצות הנבטים ששקלתם לכוסות שסימנתם בסעיף א.
- ג. מלאו את הכוסות בכ-100 מ"ל מי ברז, וודאו שכל הנבטים מכוסים במים.
- ד. העבירו את הכוסות עם הנבטים לאמבטי מים: הוסיפו קרח/השאירו בטמפרטורת החדר/ הוסיפו מים חמים - בהתאם לטמפרטורות הנבדקות.
- ה. רשמו שעה _____.
- ו. המתינו שעה. יש לוודא שהטמפרטורות נשמרות קבועות בכל אחת מהכוסות בהתאם לטמפרטורה הרשומה על כל כוס.
- ז. כעבור שעה מהשעה שרשמתם בסעיף ה, שפכו את המים מהכוסות לכלי הפסולת והניחו את הכוסות על השולחן. אם הסימון על הכוסות נמחק חלקית/לא ברור רשמו שוב את הטמפרטורות באמצעות עט לסימון.
- ח. סמנו 5 מבחנות זכוכית קצרות במספרים 4, 25, 45, 65 ו-80.
- ט. העבירו את הנבטים מכוס המסומנת 4 למכתש.
- י. רשמו על פיפטת פסטור "בופר מיצוי". באמצעות פיפטת פסטור שסימנתם העבירו 2.5 מ"ל בופר מיצוי למכתש עם הנבטים.
- יא. כתשו את הנבטים באמצעות העלי במשך 3 דקות לקבלת המיצוי.
- יב. הציבו משפך מעל מבחנת הזכוכית המסומנת 4 והחזיקו את המסננת מעל המשפך.
- יג. העבירו את המיצוי שהתקבל במכתש דרך המסננת למבחנה.
- יד. שטפו את המכתש, העלי ואת המסננת במי ברז.
- טו. חזרו על הסעיפים ט-יד עם הנבטים בכוסות הנוספות והעבירו את המיצוי שהתקבל אל המבחנות זכוכית הקצרות שסימנתם בסעיף ח. הקפידו לשטוף היטב את המכתש, העלי ואת המסננת בין מיצוי למיצוי.

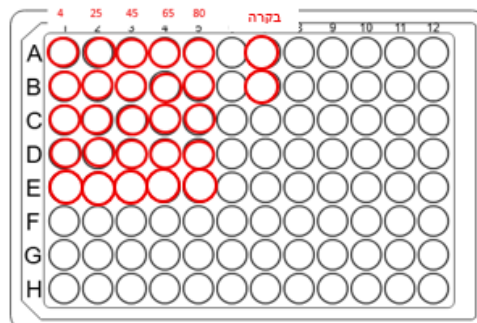
הכנת המיצוי לבדיקת אלייזה

- טז. באמצעות עט לסימון סמנו 5 מבחנות אפנדורף בהתאם לטמפרטורות הנבדקות. מומלץ לרשום על המכסה של המבחנה.
- יז. באמצעות מיקרופיפטור מתאים העבירו 1.5 מ"ל מהנוזל העליון במבחנת זכוכית המסומנת 4. סגרו את המבחנה והניחו בצד.
- יח. חזרו על ההנחיות בסעיף יז עם המיצוי בארבע מבחנות הנוספות. הקפידו להשתמש בטיפ חדש עבור כל מיצוי.
- יט. העבירו את המבחנות לצנטריפוגה. שימו לב! יש לאזן את הצנטריפוגה לפני ההרצה ובמידת הצורך להוסיף מבחנות איזון המכילות מים בנפח זהה לדוגמאות, בהתאם לדרישות הצנטריפוגה הספציפית.
- כ. כווננו את מהירות הצנטריפוגה ל-8000 סל"ד והפעילו אותה למשך 5 דקות.

זיהוי חלבוני HSP70 במיצוי באמצעות שיטת אליזה

כא. סמנו בעט לסימון את היקף הבאריות אליהן תוסיפו את הדגימות הנבדקות, רשמו את הטמפרטורות הנבדקות ובקרה (ראו איור 4).

איור 4: סימון הבאריות בפלטת ה-ELISA לביצוע הניסוי



שלב 1: קשירת אנטיגן לפלטת ELISA

כב. בעזרת המיקרופיפטור מתאים העבירו $100\mu\text{l}$ ממבחנת האפנדורף המסומנת 4 לבאריות בעמודה הראשונה (A1, B1, C1, D1, E1). העבירו את קצה הפיפטה (טיפ) לכלי פסולת.

כג. חזרו על סעיף כב עם מבחנות אפנדורף הנוספות והעבירו את המיצוי לבאריות בהתאם לסימון הפלטה. הקפידו להחליף את קצה הפיפטה אחרי כל מבחנה. שימרו את מבחנות האפנדורף ובהן המיצוי שנותר עד לסוף הניסוי.

כד. אל הבאריות המסומנות A7 ו-B7 העבירו $100\mu\text{l}$ בופר PBST.

כה. כסו את פלטת ELISA ברצועת נייר פאראפילם.

כו. הניחו את הפלטה באינקובטור שהטמפרטורה בו היא 37°C . רשמו את השעה: _____ המתינו 5 דקות.

בזמן ההמתנה הניחו על השולחן 4 שכבות של מגבות נייר והציבו את כלי הפסולת ואת הכלי המכיל בופר שטיפה (PBST) על יד המגבות. כווננו את המיקרופיפטור ל- $370\mu\text{l}$. כעבור 5 דקות מהשעה שרשמתם בסעיף כו הוציאו את הפלטה מהאינקובטור והסירו את הנייר פאראפילם.

כז. בצעו את השטיפות על פי ההנחיות ב"תהליך השטיפה". סרקו את הקוד QR/לחצו על

הקישור המצורף בסעיף כט והעזרו [בסרטון המדגים את תהליך השטיפה](#). שטיפת הבאריות

עם בופר שטיפה נועדה להרחיק את מולקולות החלבון שלא נקשרו לתחתית הבאריות.

תהליך השטיפה



- א. הפכו את הפלטה מעל כלי הפסולת ושפכו לתוכו את הנוזל שבתוך הבאריות. כדי להיפטר משאריות הנוזל, החזיקו את הפלטה ביד אחת כאשר פתח הבאריות כלפי מטה ודפקו 5 פעמים עם הפלטה על גבי מגבות הנייר.
- ב. על שולחנכם כלי המסומן "תמיסת שטיפה". בעזרת המיקרופיפטור המתאים העבירו $370\mu\text{l}$ של תמיסת שטיפה לכל אחת מהבאריות המסומנות ורוקנו את תמיסת השטיפה מהבאריות לכלי הפסולת כפי שמתואר בסעיף א.
- ג. חזרו פעמיים על תהליך המתואר בסעיף ב.

שלב 2: קישור חלבון ממסך לפלטת ELISA

לידיעתכם:

החלבון הממסך נקשר לפלטה במקומות אליהם לא נקשר האנטיגן ועל ידי כך מונע קשירת מולקולות חלבון אשר תתווספנה בשלבים הבאים.

כח. באמצעות מיקרופיפטור מתאים העבירו $100\mu\text{l}$ חלבון ממסך ממבחנה המסומנת "אבקת חלב" לכל אחת מהבאריות שסימנתם.

כט. כסו את פלטת ELISA ברצועת נייר פאראפילם.

ל. הניחו את הפלטה באינקובטור שהטמפרטורה בו היא 37°C . רשמו את השעה: ____ המתינו 5 דקות.

בזמן ההמתנה פֶּרְסוּ על השולחן 4 שכבות של מגבות נייר והציבו את כלי הפסולת ואת הכלי המכיל בופר שטיפה (PBST) על יד המגבות. כונו את המיקרופיפטור ל- $370\mu\text{l}$.

לא. כעבור 5 דקות מהשעה שרשמתם בסעיף ל הוציאו את הפלטה מהאינקובטור והסירו את נייר הפאראפילם.

לב. בצעו את תהליך השטיפה על פי ההנחיות בסעיף כט

שלב 3: הוספת נוגדן ראשוני הספציפי לחלבון HSP70

לג. בעזרת מיקרופיפטור מתאים העבירו $100\mu\text{l}$ של תמיסת הנוגדן הראשוני מהמבחנה המסומנת "נוגדן 1" לכל הבאריות המסומנות.

לד. כסו את פלטת ה-ELISA ברצועת נייר פאראפילם.

לה. הניחו את הפלטה באינקובטור שהטמפרטורה בו היא 37°C . רשמו את השעה: ____ המתינו 5 דקות.

בזמן ההמתנה פֶּרְסוּ על השולחן 4 שכבות של מגבות נייר והציבו את כלי הפסולת ואת הכלי המכיל בופר שטיפה (PBST) על יד המגבות. כונו את המיקרופיפטור ל- $370\mu\text{l}$.

לו. כעבור 5 דקות מהשעה שרשמתם בסעיף לה הוציאו את הפלטה מהאינקובטור והסירו את נייר הפאראפילם.

לז. בצעו את תהליך השטיפה על פי ההנחיות בסעיף כט.

שלב 4: הוספת נוגדן שניוני מוצמד אנזים

לח. בעזרת מיקרופיפטור מתאים העבירו $100\mu\text{l}$ של הנוגדן השניוני ממבחנה המסומנת "נוגדן 2" לכל הבאריות המסומנות.

לט. כסו את פלטת ה-ELISA ברצועת נייר פאראפילם.

מ. הניחו את הפלטה באינקובטור שהטמפרטורה בו היא 37°C . רשמו את השעה: ____ המתינו 5 דקות.

בזמן ההמתנה פֶּרְסוּ על השולחן 4 שכבות של מגבות נייר והציבו את כלי הפסולת ואת הכלי המכיל בופר שטיפה (PBST) על יד המגבות. כונו את המיקרופיפטור ל- $370\mu\text{l}$.

מא. כעבור 5 דקות מהשעה שרשמתם בסעיף מ הוציאו את הפלטה מהאינקובטור והסירו את נייר הפאראפילם.

מב. בצעו את תהליך השטיפה על פי ההנחיות בסעיף כט.

שלב 5: הוספת מצע ייחודי לאנזים

לידיעתכם:

המצע רגיש לאור – יש לעבוד בחדר ללא כל תאורה מלאכותית (אין צורך להחשיך את החדר לגמרי)

- כתוצאה מפעילות האנזים המוצמד לנוגדן השניוני נוצר תוצר בצבע תכלת.
- ככל שריכוז חלבוני עקה מסוג HSP70 גבוה יותר במיצוי שהוספתם כך יהיו יותר מולקולות אנזים בבארית, ולכן עוצמת הצבע שיתקל תהיה גבוהה יותר.

מג. בקשו מהמורה את הסובסטרט. בעזרת מיקרופיטור מתאים הוסיפו $100\mu\text{l}$ מצע מהמבחנה המסומנת "מצע" לכל הבאריות המסומנות.

מד. כסו את הפלטה בנייר פאראפילם.

מה. הניחו את הפלטה באינקובטור שהטמפרטורה בו היא 37°C למשך 5 דקות. רשמו את השעה: _____.

מו. כעבור 5 דקות מהשעה שרשמתם בסעיף מה הוציאו את הפלטה והביטו בשינויי הצבע שהתקבלו בכל הבאריות. צלמו את הפלטה. אם הצבע חלש כך שלא ניתן לראות הבדלי צבע בין הטיפולים השונים, כסו את הפלטה והחזירו אותה לאינקובטור והמתינו 5 דקות נוספות. כעבור 5 דקות הוציאו את הפלטה התבוננו בצבעים שהתקבלו בבאריות השונות. צלמו שוב את הפלטה והשוו לתמונה הקודמת. בדקו האם באריות הבקרה נשארו ללא הצבע.

מז. השתמשו במכשיר קורא פלטות אלייזה או באפליקציה לקבלת ערכים מספריים עבור כל בארית המכילה דגימת המיצוי.

טבלה 3: תרשים המסכם את תהליך הבדיקה:

השלבים	פעולה המבוצעת בשלב
1	הוספת מיצוי הנבטים לבאריות
2	הדגרה באינקובטור למשך 5 דקות
3	שטיפת הבאריות
4	הוספת חלבון ממסך לבאריות
5	הדגרה באינקובטור למשך 5 דקות
6	הכנת תמיסות נוגדן ראשוני
7	שטיפת הבאריות
8	הוספת נוגדן ראשוני לבאריות
9	הדגרה באינקובטור למשך 5 דקות
10	שטיפת הבאריות
11	הוספת נוגדן שניוני לבאריות
12	הדגרה באינקובטור למשך 5 דקות
13	שטיפת הבאריות
14	הוספת סובסטרט
15	הדגרה באינקובטור עד לקבלת מדרג צבעים בבאריות

ההשפעה של תמיסת דבש על תמיסת עמילן, 2026 ניסוי 4

לידיעתכם 1:

הדבש מורכב ברובו מסוכרים, בעיקר מן החד-סוכרים גלוקוז ופרוקטוז. הדבש עשיר גם במגוון של חומרים פעילים ביולוגית ובהם אנזימים שונים, שמקורם בגוף הדבורה.

על השולחן

- תמיסת דבש מהולה שריכוזה 21%, בכלי המסומן "תמיסת דבש 21%".
- 6 מ"ל תמיסת האנזים עמילאז במבחנה המסומנת "עמילאז".
- תמיסת עמילן בכלי המסומן "עמילן".
- תמיסת יוד בבקבוקון טפי המסומן "יוד".
- מים מזוקקים בכלי המסומן "מים מזוקקים".
- שתי כוסות חד-פעמיות הנתונות זו בזו. הכוס החיצונית מסומנת "אמבט מים". אין להפריד בין שתי הכוסות.
- כלי ובו מי ברז המסומן "מי ברז לאמבט".
- מד טמפרטורה
- מבחנות ריקות, פקקים ופיפטות.

לידיעתכם 2:

- עמילן הוא רב-סוכר. האנזים עמילאז מזרז פירוק עמילן לדו-סוכרים ולחד-סוכרים.
- הצבע של תמיסת יוד הוא צהוב-כתום. בתגובה בין עמילן לבין יוד צבע התמיסה משתנה לכחול או לשחור. תמיסת יוד אינה מגיבה עם חד-סוכרים ודו-סוכרים.

חלק א – הכרת שיטת המדידה באמצעות תמיסת יוד

- רשמו "א" בחלק העליון של המבחנה המסומנת "עמילאז", צמוד לשפת המבחנה.
- רשמו "ב", "ג" בחלק העליון של שתי מבחנות ריקות, צמוד לשפת המבחנה.
- רשמו "דבש" על פיפטה של 10 מ"ל. רשמו "מים" על פיפטה כזאת נוספת.
- רשמו "עמילן" על פיפטה של 1 מ"ל.
- באמצעות הפיפטות המתאימות העבירו מים מזוקקים ואת התמיסות דבש ועמילן למבחנות א, ב, ג, על פי המפורט בטבלה 1.

טבלה 1: השפעת עמילאז ודבש על עמילן

7	6	5	4	3	2	1	המבחנה
הימצאות עמילן (+ / -)	צבע התמיסה לאחר הוספת יוד (כחול / צהוב בהיר / חסר צבע)	צבע התמיסה לאחר השריה באמבט (צהוב בהיר / חסר צבע)	נפח תמיסת עמילן (מ"ל)	נפח מים מוזקקים (מ"ל)	נפח דבש בריכוז 21% (מ"ל)	נפח תמיסת עמילאז (מ"ל)	
			1	-	-	6	א
			1	-	6	-	ב
			1	6	-	-	ג

- פקקו היטב את שלוש המבחנות, והפכו אותן פעמיים כדי לערבב את תכולתן.
- עליכם להכין אמבט מים בטמפרטורה בטווח של $50^{\circ}\text{C} - 45^{\circ}\text{C}$ בכוס החד-פעמית הנתונה בתוך הכוס המסומנת "אמבט מים" (בלי להפריד בין הכוסות).
- שימו לב: כדי לייצב את אמבט המים, הציבו את מד הטמפרטורה באמבט רק לאחר מזיגת המים החמים.
- ד. בקשו מן המורה מלווה המעבדה למזוג מים חמים לכוס הפנימית עד גובה הקו המסומן בה.
- לקבלת מים בטמפרטורה בטווח הרצוי מדדו את הטמפרטורה של המים, ולפי הצורך הוסיפו לאמבט בהדרגה מים מן הכלי המסומן "מי ברז לאמבט". ערבבו את המים באמצעות מד הטמפרטורה.
- כשהטמפרטורה של המים היא בטווח הרצוי, הניחו את מד הטמפרטורה על השולחן.
- ה. העבירו את שלוש המבחנות לאמבט.
- רשמו את השעה _____, והמתינו 7 דקות.
- הערה: בזמן ההמתנה תרד טמפרטורת המים. אין צורך למדוד שוב את טמפרטורת המים.
- ו. בזמן ההמתנה העתיקו למחברת את טבלה 1.
- ז. כעבור 7 דקות מן השעה שרשמתם בסעיף ה, הוציאו את המבחנות מן האמבט, והניחו אותן בכך המבחנות.
- ח. התבוננו בצבע של התמיסות במבחנות, ורשמו בטבלה שבמחברת את צבע התמיסות (עמודה 5).
- ט. הסירו את הפקקים מן המבחנות.
- הוסיפו לכל אחת מן המבחנות טיפה אחת של תמיסת יוד, פקקו שוב היטב את המבחנות, הפכו אותן פעמיים כדי לערבב את תכולתן, והמתינו דקה אחת.

ענו על שאלות 37-39

- 37 א. התבוננו בצבעי התמיסות שהתקבלו במבחנות על פי תצפיותיכם, השלימו את עמודות 6 ו-7 בטבלה שבמחברת.
- ב. על סמך התוצאה שהתקבלה במבחנה א, מה אפשר להסיק בנוגע לדבש מן התוצאה שהתקבלה במבחנה ב? נמקו את תשובתכם. התבססו על המידע בקטעים "לידיעתכם 1" ו"לידיעתכם 38. הטיפול במבחנה ג הוא טיפול בקרה.
- הסבירו מדוע חשוב לכלול את טיפול הבקרה הזה בחלק א של הניסוי.
39. תלמיד הציע להרחיב תמיסת דבש מהולה, לקרר אותה לטמפרטורת החדר, לאחר מכן להוסיף לה עמילן, להשרות בטמפרטורה בטווח של $50^{\circ}\text{C} - 45^{\circ}\text{C}$ במשך 7 דקות, ולהוסיף יוד. שערו מה צפוי להיות צבע התמיסה לאחר הוספת היוד. נמקו את תשובתכם.

- י. העבירו לכלי האיסוף את מבחנות א, ב, ג והפקקים שלהן.
- שפכו לכלי הפסולת את המים שבאמבט המים שהכנתם.

חלק ב – השפעת ריכוז דבש על תמיסת עמילן

- יא. סמנו ארבע מבחנות "1", "2", "3", "4" בחלק העליון, צמוד לשפת המבחנה.
- ערבבו קלות את תמיסת הדבש באמצעות הפיטה המסומנת "דבש".
- באמצעות הפיטות המתאימות העבירו דבש ומים מזוקקים כמפורט בטבלה 2.

טבלה 2

המבחנה	נפח הדבש בריכוז 21% (מ"ל)	נפח המים המזוקקים (מ"ל)
1	6	0
2	4	2
3	2	4
4	0	6

עליכם להכין שוב אמבט מים בטמפרטורה בטווח של 45°C – 50°C בכוס חד-פעמית הנתונה בתוך הכוס המסומנת "אמבט מים" (בלי להפריד בין הכוסות).

- יב. בקשו מן המורה מלווה המעבדה למזוג מים חמים לכוס הפנימית עד גובה הקו המסומן בה.
- לקבלת מים בטמפרטורה בטווח הרצוי מדדו את הטמפרטורה של המים, ולפי הצורך הוסיפו לאמבט בהדרגה מים מן הכלי המסומן "מי ברו לאמבט". ערבבו את המים באמצעות מד הטמפרטורה.
כשהטמפרטורה של המים היא בטווח הרצוי, הניחו את מד הטמפרטורה על השולח.
יג. באמצעות הפיטה "עמילן" העבירו 1 מ"ל תמיסת עמילן לכל אחת מן המבחנות: 1, 2, 3, 4.
- פקקו היטב את ארבע המבחנות והפכו אותן פעמיים כדי לערבב את תכולתן.
- העבירו את ארבע המבחנות לאמבט.
- רשמו את השעה _____ והמתינו 10 דקות.
בזמן ההמתנה ענו על שאלה 40.
40. שבו את ריכוז תמיסת הדבש בכל אחת מן המבחנות 1, 2, 3, 4. רשמו את תוצאות החישובים במחברת.
פרט במחברת את אופן החישוב של ריכוז תמיסת הדבש במבחנה 2.
שימו לב: הריכוז ההתחלתי של תמיסת הדבש שהשתמשתם בה להכנת התמיסות המהולות הוא 21%, והנפח הסופי של התמיסה בכל אחת מן המבחנות הוא 7 מ"ל.

כעבור 10 דקות מן השעה שרשמתם בסעיף יג, הוציאו את המבחנות מן האמבט, והניחו אותן בכך המבחנות.

- א. הסירו את הפקקים מן המבחנות.
- הוסיפו לכל אחת מן המבחנות טיפה אחת של תמיסת יוד, פקקו שוב היטב את המבחנות, והפכו אותן פעמיים כדי לערבב את תכולתן.

- לאחר ערבוב התמיסות במבחנות, המתינו עד שהצבע במבחנה 1 חוזר להיות צהוב בהיר, אך לא יותר מדקה אחת.

ב. התבוננו בצבעים שהתקבלו במבחנות 2, 3, 4, וציינו את הצבע שהתקבל בכל מבחנה.
בחרו מבין הצבעים האלה: צהוב בהיר, כחול בהיר, כחול, כחול כהה, כחול-שחור.

מבחנה 1: _____ מבחנה 2: _____

מבחנה 3: _____ מבחנה 4: _____

הערה: ייתכן שהצבע ישתנה עם הזמן, אין צורך לשנות את מה שכתבתם בסעיף זה.

ענו על שאלה 41.

41. א. הכינו במחברת טבלה 3 לסיכום מערך הניסוי שביצעתם בחלק ב ותוצאותיו (סעיפים יא-טז),

- הוסיפו לטבלה עמודה והעתיקו אליה את תוצאות החישובים של ריכוז תמיסת הדבש (שאלה 40).
- הוסיפו לטבלה עוד שתי עמודות: אחת לרישום הצבע לאחר הוספת יוד ואחת לרישום הכמות היחסית של עמילן.

ב. השלימו בטבלה שבמחברת בעמודה המתאימה את הצבע שהתקבל בכל אחת מן המבחנות (סעיף טז)

- היעזרו בטבלה 4 שלפניכם, כדי לקבוע מהי הכמות היחסית של עמילן (מ' 0 עד 3), לפי הצבע שהתקבל בכל אחת מן המבחנות.

- השלימו בטבלה שבמחברת בעמודה המתאימה את הכמות היחסית של עמילן בכל מבחנה.

הערה: אם התקבל במבחנה צבע ביניים שאינו מפורט בטבלה 4, רשמו מספר לא שלם לציון הכמות היחסית של עמילן (לדוגמה: 2.5).

טבלה 4: הצבע שמתקבל לאחר הוספת תמיסת יוד והכמות היחסית של עמילן

הכמות היחסית של עמילן	הצבע שמתקבל
0	צהוב בהיר
1	כחול בהיר
2	כחול
3	שחור- כחול/כחול כהה

ג.

- כתבו כותרת מתאימה לטבלה שבמחברת.

- כתבו כותרת מתאימה לכל אחת מן העמודות

ענו על שאלות 42-44.

42. א. מהו המשתנה הבלתי תלוי בניסוי שביצעתם בחלק ב?

ב. מהו המשתנה התלוי בניסוי שביצעתם בחלק ב?

43. א. הסבירו את התוצאות שהתקבלו במבחנות הניסוי. התבססו על התוצאות בחלק א ועל המידע בקטעים "לידיעתכם 1" ו"לידיעתכם 2". בתשובתכם התייחסו גם לשיטת המדידה.

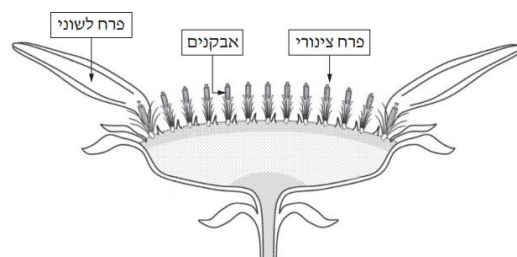
ב. התבוננו שוב בצבע התמיסות במבחנות 2 ו-3. עם הזמן הצבע מבהיר באחת מן המבחנות או בשתיהן. הציגו הסבר אפשרי לשינוי שחל עם הזמן בצבע התמיסה.

44. א. ציינו שני גורמים שנשמרו קבועים בניסוי שביצעתם בחלק ב.

ב. בחרו באחד מן הגורמים שצינתם בסעיף א, והסבירו מדוע חשוב לשמור **דווקא** את הגורם הזה קבוע במערך הניסוי.

ניסוי 5 חלק ב – התבוננות בגרגרי אבקה של פרח באמצעות מיקרוסקופ

אחת מדרכי ההאבקה של פרחים היא באמצעות חרקים ובהם דבורים. הדבורים אוספות מן הפרחים צוף וגרגרי אבקה. בעת איסוף הצוף גרגרי אבקה נדבקים לגופה של הדבורה וכך הם מגיעים גם אל הדבש. לפניכם איור של תפרחת של צמח. התפרחת נראית כאילו היא פרח אחד, אך למעשה היא מורכבת מפרחים רבים – חלקם פרחים לשוניים וחלקם פרחים צינוריים (ראו איור).



על השולחן :

מיקרוסקופ וציוד להכנת תכשיר לצפייה במיקרוסקופ
מלקטת (פינצטה)

כלי ובו תפרחת של צמח ממשפחת המורכבים .

בתפרחת שבכלי יש פרחים לשוניים ופרחים צינוריים .

מן הפרחים הצינוריים הפתוחים אפשר לאסוף גרגרי אבקה .

יג. טפטפו באמצעות הטפי טיפה אחת של מים על זכוכית נושאת.

הסירו באמצעות המלקטת את קצות האבקנים מן הפרחים הצינוריים, והעבירו אותם לטיפה שעל הזכוכית הנושאת .

פזרו באמצעות המלקטת את גרגרי האבקה בתוך טיפת המים.

כסו בזכוכית מכסה ולחצו עליה בעדינות כדי לפזר את גרגרי האבקה בטיפה. ספגו את עודף המים בעזרת נייר סופג.

התבוננו בתכשיר בהגדלה קטנה במיקרוסקופ, ואתרו בו גרגרי אבקה. גרגרי האבקה עגולים וצהובים. הזיזו את התכשיר כך שגרגרי האבקה יהיו במרכז שדה הראייה.

התבוננו בגרגרי האבקה שבתכשיר בהגדלה בינונית או גדולה.

ענו על שאלות 56–57.

(7 נקודות) 56. א. ציירו במחברת שני גרגרי אבקה. שימו לב לצורה של הדופן החיצונית של גרגרי האבקה.

(נקודה אחת) ב. כתבו כותרת לציור, ובה גם את שם הצמח, וציינו באיזו הגדלה התבוננתם בתכשיר

57. במעבר של הדבורה מפרח לפרח היא גם מאביקה את הפרחים. תהליך ההאבקה חיוני לתהליך הרבייה של הצמחים.

(נקודה אחת) א. איזה תא רבייה מצוי בגרגר אבקה – תא רבייה זכרי או תא רבייה נקבי?

(5 נקודות) ב. מבנה גרגרי האבקה של הצמח שלפניכם מותאם להאבקה על ידי חרקים (ובהם דבורים).

התבוננו שוב בדופן החיצונית של גרגרי האבקה בהגדלה גדולה במיקרוסקופ .

הסבירו כיצד המבנה של גרגר האבקה מותאם להעברתו על ידי הדבורים מפרח לפרח

למידה אסוציאטיבית (התניית פבלוב) בלרוות של דרוזופילה

בניסוי זה תלמדו על התניית פבלוב בלרוות של דרוזופילות.

על השולחן:

ציוד	כמות	הערות
צלחות פטרי המכילה אגרוז נטרלי (PURE)	5	4 צלחות מסומנת PURE וצלחת נוספת מסומנת TEST
צלחות פטרי המכילה אגרוז + פרוקטוז	4	המסומנת FRU
מבחנת אפנדורף המכילה 100 μ l ריח OCT	1	
מבחנת אפנדורף המכילה 100 μ l ריח AM	1	
צלחת פטרי ריקה	1	להוצאת הלרוות ממצע המזון
מכחול דק	1	
לרוות	כ-30	יש להעביר את הלרוות לצלחת פטרי ריקה כחצי שעה לפני תחילת הניסוי.
עט לסימון על זכוכית	1	
פיסות נייר סינון 0.5X0.5 ס"מ	14	7 בצלחת פטרי המסומנת OCT ו-7 נוספות בצלחת המסומנת AM
צלחת פטרי קטנה מסומנת OCT	1	
צלחת פטרי קטנה מסומנת AM	1	
מלקטת (פינצטה)	2	אחת מסומנת OCT והשניה AM
מיקרופיפטור של 20-2 μ l	1	

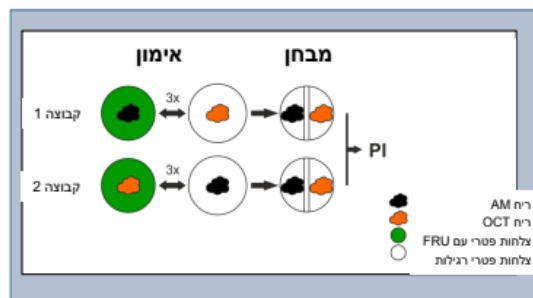
מהלך הניסוי

שלב האימון

- באמצעות הפינצטה המסומנת OCT העבירו שתי פיסות נייר סינון מהצלחת המסומנת OCT והניחו אותן על האגרוז, בצדדים המנוגדים של הצלחת.
- באמצעות מיקרופיפטור העבירו 10 μ L תמיסת OCT לכל אחת מהפיסות.
- העבירו 30 לרוות לצלחת שהכנתם והמתינו 5 דקות. כדקה לפני תום זמן ההמתנה הכינו צלחת נוספת.
- באמצעות הפינצטה המסומנת AM העבירו שתי פיסות נייר סינון מהצלחת המסומנת AM והניחו אותן על האגרוז, בצדדים המנוגדים של הצלחת.
- באמצעות מיקרופיפטור העבירו 10 μ L תמיסת AM לכל אחת מהפיסות.
- העבירו את הלרוות לצלחת עם ריח AM והמתינו 5 דקות. כדקה לפני תום זמן ההמתנה הכינו צלחת נוספת.
- חזרו על שלבי האימון (א-ו) פעמיים נוספות, כך שבסך הכול יתבצעו שלושה מחזורי האימון. בכל מחזור השתמשו בצלחות פטרי חדשות.

שלב המבחן

- סמנו קו במרכז החלק התחתון של צלחת המסומנת TEST, כך שתתחלק לשני חצאים שווים.
- הניחו בצד אחד של הצלחת פיסת נייר סינון ועליה 10 μ L OCT.
- הניחו בצד השני פיסת נייר סינון ועליה 10 μ L AM.
- העבירו את כל הלרוות למרכז הצלחת.
- המתינו 3 דקות.
- ספרו את מספר הלרוות בכל אחד משני צדי הצלחת.



השפעת ריכוז אתנול על ביטוי החלבון β -galactosidase בחיידקים ביוסנסוריים

מבוא

בעשורים האחרונים חלה עלייה מתמשכת ברמות הזיהום הסביבתי, המהווה איום משמעותי על בריאות האדם ועל יציבותן של מערכות אקולוגיות. כתוצאה מכך, גובר הצורך בפיתוח שיטות יעילות, רגישות ומהירות לניטור מזהמים סביבתיים. אחת הגישות החדשניות בתחום מבוססת על שימוש בביוסנסורים – חיידקים מהונדסים גנטית המגיבים לנוכחות מזהמים באמצעות ביטוי של אנזים. האנזים מזרז פירוק של מצע ייעודי, ובמהלך התגובה נוצר תוצר צבעוני המאפשר לזהות באופן חזותי את נוכחות המזהם במי השתייה.

מרכיב מרכזי בגישה זו הוא הגן $lacZ$ המקודד לאנזים β -galactosidase. באופן טבעי, גן זה הוא חלק מאופרון הלקטוז (lac operon) בחיידק *Escherichia coli*. אופרון הלקטוז כולל מספר גנים המעורבים בקליטת לקטוז ובפירוקו, ובכך מאפשר לחיידק לנצל לקטוז כמקור לפחמן ולאנרגיה. האנזים β -galactosidase מזרז את פירוק הלקטוז לשני חד-סוכרים – גלוקוז וגלקטוז.

בנוסף, האנזים מסוגל לפרק גם את החומר X -gal-סובסטרט מלאכותי הדומה ללקטוז. בעוד ש- X -gal עצמו חסר צבע, פירוקו על ידי β -galactosidase מוביל ליצירת תוצר כחול בלתי מסיס. לכן, הופעת הצבע הכחול מעידה על פעילות האנזים ועל ביטוי הגן $lacZ$, ומשמשת ככלי נפוץ לחקר ביטוי גנים, ויסות גנים ותפקוד אנזימטי במחקר הביולוגי.

חלבון נוסף הקיים בחיידקים הוא $GrpE$, המקודד על ידי הגן $grpE$. חלבון זה מהווה חלק ממערכת השפרונים $DnaK$ – $DnaJ$ – $GrpE$, המסייעת לחיידקים להתמודד עם תנאי עקה באמצעות קיפול מחדש של חלבונים שנפגעו ומניעת הצטברותם של חלבונים מקופלים באופן שגוי. באופן ספציפי $GrpE$, משמש כגורם לשחלוף נוקלאוטידים (Nucleotide Exchange Factor, NEF), המווסת את מחזור הפעילות התלוי ב-ATP של השפרון $DnaK$. פעילות זו חיונית לשמירה על תפקודם התקין של החלבונים ולהסתגלות החיידקים לתנאי עקה סביבתיים, כגון טמפרטורות גבוהות, חשיפה לרעלים ועקה חמצונית.

מחקרה של פרופ' אליאורה רון והחיידקים הביוסנסוריים המהונדסים

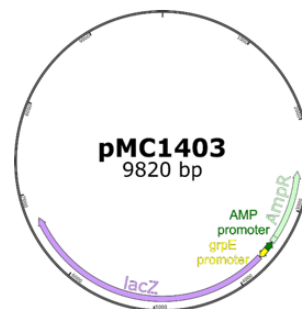
פרופ' אליאורה רון מאוניברסיטת תל אביב, פיתחה חיידקי *E. coli* מהונדסים גנטית שישמשו כביוסנסורים. חיידקים אלה חסרים את הגן $lacZ$ הטבעי, דבר המבטיח שכל ביטוי של β -galactosidase נובע אך ורק ממערכת רגולטורית שהוחדרה באופן יזום. לצורך כך, פלסמיד מהונדס המכיל את הגן $lacZ$ הוחדר לחיידקים. בנוסף, פרופ' רון שילבה אלמנט גנטי רגיש לעקה שהוא הפרומוטור ל $grpE$ המגיב לתנאי עקה סביבתיים, כגון ריכוז מלח גבוהים או חשיפה לאתנול.

פרופ' רון ניצלה את מנגנון הבקרה הרגיש לעקה של $grpE$ כדי ליצור מערכת ביוסנסורית המקשרת בין עקה סביבתית לשינוי צבע מדיד. על ידי חיבור הפרומוטור $grpE$ לגן $lacZ$ היא אפשרה לחיידקים לבטא את האנזים β -galactosidase רק כאשר הם נחשפים לתנאי עקה. כך, הפעלת $lacZ$ מובילה ליצור האנזים β -galactosidase והצבע הכחול המתקבל כתוצאה מפירוק X -gal משמשים כאינדיקטור ישיר לנוכחות עקה סביבתית.

שלבים ביצירת החיידקים הביוסנסוריים המהונדסים

1. תכנון הפלסמיד (ראה איור 1): יצירת פלסמיד מעגלי המכיל:
הפרומוטור $grpE$ (מסומן בצהוב), המחובר לגן $lacZ$ (מסומן בסגול).
2. גן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה (מסומן בירוק) המאפשר סלקציה של חיידקים המכילים את הפלסמיד.

3. טרנספורמציה של הפלסמיד: החדרת הפלסמיד לחיידקי *E. coli* חסרי הגן *lacZ* הטבעי.
4. גידול החיידקים: גידול החיידקים שעברו טרנספורמציה במצע המכיל אנטיביוטיקה כדי להבטיח שרק התאים שנושאים את הפלסמיד ישרדו.



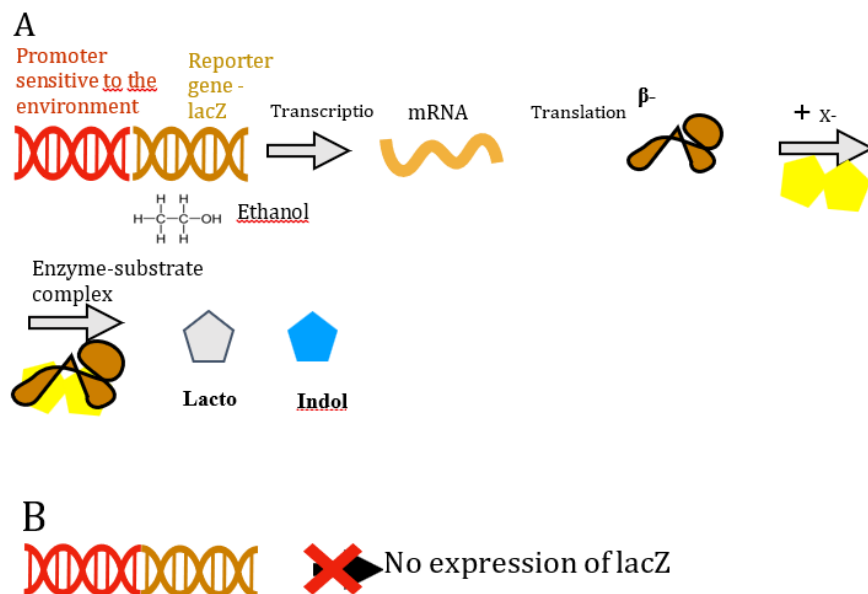
איור 1: מפת הפלסמיד (pMC1403) שהוכנס לחיידק.

סיכום: בעקבות חשיפה למצבי עקה, מופעל אתר הבקרה *grpE*, מתרחש תהליך תעתוק של הגן *lacZ* המתורגם לאנזים β -galactosidase. האנזים מזרז את פירוק ה-x-gal ובעקבות כך משתחררת מולקולת אינדול בעלת צבע כחול, וגורמת לשינוי צבע תרחיף החיידקים לכחול.

שאלות

1. מדוע החוקרים השתמשו בחיידקים שאינם מבטאים באופן טבעי את האנזים β -galactosidase?
2. אם חיידקים מהונדסים אלה ייחשפו לדלק, בנוכחות X-gal ניתן יהיה לראות צבע כחול. תאר את התהליך שמוביל להיווצרות הצבע הכחול.

איור 2: מודל השפעת תנאי הסביבה על ביטוי הגן *lac-Z* בחיידקים מהונדסים



A בתנאי עקה:

אם החיידקים נחשפים לגורם עקה (כגון אתנול), הפרומוטור *grpE* מופעל. כתוצאה מכך, מתרחש תעתוק של *lacZ* mRNA אשר לאחר מכן מתורגם לאנזים β -galactosidase. כאשר מוסיפים X-gal למצע הגידול, האנזים מפרק אותו ויוצר תרכובת כחולה שניתן למדוד.

B בתנאים רגילים:

אם אין גורמי עקה בסביבה, הפרומוטור *grpE* נותר בלתי פעיל, ולכן *lacZ* אינו מבטא. כתוצאה מכך, גם אם X-gal נוסף למצע, לא מתרחשת פעילות אנזימטית ולא נצפה שינוי צבע.

כן מתורגם לאנזים β -galactosidase. כאשר מוסיפים X-gal למצע הגידול, האנזים מפרק אותו ויוצר תרכובת

חלק א: השפעת ריכוזים שונים של אתנול על ביטוי החלבון β -galactosidase: חומרים וציוד:

- מבחנות מעוקרות
 - מיקרופיפטורים: נפח של 100 – 1000 מיקרוליטר ונפח של 20 – 200 מיקרוליטר.
 - טיפים מעוקרים
 - כלי ובו תמיסת אתנול בריכוז 70% ומעט צמר גפן או נייר מגבת – לחיטוי סביבת העבודה
 - מבחנה ובה 10 מ"ל תרחיף חיידקים מהונדסים
 - מבחנת אפנדורף עטופה ברדיד אלומיניום ובה החומר X-gal
 - מבחנה מסומנת "אתנול 100%" ובה 7 מ"ל אתנול בריכוז 100%
 - מבחנה מסומנת "LB" ובה 7 מ"ל מצע LB נוזלי.
 - כפפות, וחלוקים.
 - כלי לאיסוף פסולת ביולוגית קבוצתי וכלי לאיסוף פסולת ביולוגית כתתי.
- בניסוי זה נשתמש במיקרופיפטורים להעברת התמיסות. יש להקפיד להשתמש במיקרופיפטור מתאים לנפח הנדרש ובטיפים מתאימים.
- נפח של 20 עד 200 מיקרוליטר נעביר בעזרת מיקרופיפטור המיועד לנפח של 20-200.
- נפח מעל 200 מיקרוליטר נעביר בעזרת מיקרופיפטור המיועד לנפח של 100-1000.

לידיעתכם: אתנול הוא ממס שומנים וגורם לשינויים במבנה המרחבי של חלבונים.

מהלך הניסוי

- לבשו חלוקים, עטו כפפות.
- נקו את שולחן העבודה ואת המיקרופיפטורים באתנול בריכוז 70%.
- העבירו 50 מיקרוליטר של הסובסטרט X-gal ממבחנת האפנדורף למבחנה המכילה 10 מ"ל תרחיף חיידקים.
- באמצעות טוש סימון, סמנו 7 מבחנות ריקות בספרות 1 – 7.
- העבירו לכל אחת מהמבחנות 1-7 את התמיסות הבאות: תרחיף חיידקים עם הסובסטרט X-gal (שהכנתם בסעיף ג'), מצע LB נוזלי ואתנול, בהתאם לנפחים הרשומים בטבלה 1.

טבלה 1: מערך הניסוי

מספר מבחנה	נפח חיידקים מהונדסים בתרחיף + X-gal (הכנתם בסעיף ד) (מיקרוליטר)	נפח LB (מיקרוליטר)	נפח אתנול 100% (מיקרוליטר)	ריכוז אתנול (אחוזים)
1	1000	1000	0	
2	1000	900	100	
3	1000	800	200	
4	1000	600	400	
5	1000	400	600	
6	1000	200	800	
7	1000	0	1000	

- הניחו את המבחנות בכך המבחנות לפי סדר עולה 1 – 7 וצלמו את התוצאות.
- רשמו את הזמן _____ והמתינו 30 דקות. בכל 5 - 10 דקות בדקו את התוצאות וצלמו אותן.

- ח. במהלך ההמתנה הכינו טבלה שתסכם את מערך הניסוי ותוצאותיו. הוסיפו 5 עמודות אחת לחישוב ריכוז האתנול בתמיסה והנוספות לרישום התוצאות בזמן 0 דקות, בזמן 10, 20 ו-30 דקות.
- ט. כעבור 30 דקות הוציאו את הכן ובו המבחנות מן האינקובטור. עליכם לקבוע את דרגת הצבע שהתקבלה בכל אחת מן המבחנות. ניתן לעשות זאת באמצעות יצירת סולם צבעים באופן שרירותי או בעזרת ספקטרופוטומטר.

חלק ב: זריעה של החיידקים על צלחות לקביעת הוויטאליות (חיות) של החיידקים בכל אחד מהטיפולים:
זריעת החיידקים תאפשר לקבוע אם בטיפולים מסוימים היעדר הצבע כחול או מעיד על חוסר ביטוי של הגן או שהוא תוצאה של מות החיידקים כתוצאה מהחשיפה לאתנול.

ציוד לזריעת חיידקים:

- כפפות חד פעמיות
- צלחת פטרי עם מצע נוטריינט אגר ואמפיצלין
- מחט זריעה
- עט סימון עמיד למים
- כוהלייה
- מבחנות 1-7
- סרט פאראפילם
- פח לפסולת ביולוגית
- כלי עם אלכוהול 70% לחיטוי משטחים

הכנת הצלחות:

- בעזרת עט סימון רשמו על הצד התחתון של הצלחת (לא על המכסה!) שם ותאריך
- ציירו על התחתית קווים שיחלקו את הצלחת ל-8 חלקים שווים
- מספרו את החלקים מ-1 עד 8 על גבי תחתית הצלחת (ניתן לזרע על צלחת אחת חיידקים ממספר טיפולים שונים (ראו תמונה 2).
- טבלו את מחט הזריעה במבחנה 1, ובצעו זריעת בידוד (צורת נחש) בשמינית הצלחת הממוספרת בספרה 1.
- חזרו על הפעולה עבור כל מבחנה, יש להשתמש במט זריעה חדשה (אם משתמשים במחט רב פעמית יש לחטא את המחט באש לפני כל טבילה במבחנה).

שאלות:

1. התקבלה תגובות צבע גם בחיידקים שלא נחשפו לאתנול, צבע בדרגה נמוכה. הציעו הסבר אפשרי לתופעה זו.
2. הסבירו את התוצאות שהתקבלו בכל אחת מן המבחנות 1 – 7 כעבור 30 דקות.
3. הסבירו מדוע יש הבדלים בתוצאות שהתקבלו כעבור 10 דקות וכעבור 30 דקות.

אבחון רמת הגלוקוז והאינסולין בדם לאחר ארוחה

יובל (בן 40), רותם (בת 42) ומשה (בן 16) הגיעו למרפאה לבדיקות רפואיות שגרתיות. יובל, מנהל משרד, הרגיש לאחרונה עייף יותר מהרגיל ומרבה לשתות יותר מהרגיל. במהלך היום הוא יושב די הרבה, ומרבה לאכול ארוחות עשירות בפחמימות. רותם, מורה לחינוך גופני, מרגישה טוב ולא שמה לב לשינויים כלשהם בבריאותה. היא מקפידה על תזונה מאוזנת ופעילות גופנית סדירה. משה, תלמיד תיכון, הגיע לבדיקה בליווי הוריו. לאחרונה הוא חש עייפות רבה, ירידה במשקל ללא סיבה נראית לעין, ותחושת צמא מוגברת. הרופא המליץ לשלושתם לעבור בדיקת סבילות לגלוקוז, הכוללת בדיקות רמות אינסולין וגלוקוז בפלסמת הדם ובשתן. הבדיקות נערכו לאחר צום של 12 שעות. אחרי הצום, שתו הנבדקים תמיסת גלוקוז מרוכזת. דגימות הדם נלקחו בנקודות זמן שונות: לפני שתיית התמיסה (0 דקות), ואחרי 60, 120 ו-180 דקות. דגימת השתן נלקחה בזמן 0.

כעת, אתם, כצוות המעבדה, תבדקו את הדגימות של יובל, רותם ומשה כדי לקבוע למי מהם יש סוכרת, ואם כן - מאיזה סוג. תוצאות הבדיקות יסייעו לרופא לאבחן את מצבם ולהמליץ על טיפול מתאים במידת הצורך.

בפעילות זו תבצעו הדמיה של אבחון סוכרת באמצעות בדיקת דגימות דם ושתן מדומות. תבדקו רמות גלוקוז ואינסולין בארבע נקודות זמן שונות, תנתחו את התוצאות, ותקבעו האם הנבדק בריא או שקיים חשש לסוכרת סוג 1 או 2.

כלים וחומרים

בדיקת גלוקוז בדם:

- 4 מבחנות עם דגימות פלסמת הדם מדומות (מסומנות לפי זמני דגימה: 0, 60, 120 ו-180 דקות)
- 4 מקלונים לבדיקת גלוקוז בדם
- סקלת הצבעים לקביעת ריכוז הגלוקוז בדם
- שעון עצר

מהלך העבודה

שם הנבדק/ת

א. לרשותכם 4 מבחנות המכילות דגימות פלסמת הדם מדומות, מסומנות לפי זמני הדגימה: 0, 60,

120 ו-180 דקות לאחר שתיית תמיסת הסוכר.

ב. טבלו את קצה המקלון לבדיקת גלוקוז בתמיסת פלסמת הדם במבחנה המסומנת 0 למשך 2 שניות.

ג. הוציאו את המקלון והמתינו 30 שניות בדיוק! (השתמשו בשעון עצר).

ד. כעבור 30 שניות השוו את צבע המקלון לסקלת הצבעים ורשמו את רמת הגלוקוז בטבלת התוצאות

(טבלה 1)

ה. חזרו על הסעיפים ב-ד עם המבחנות המסומנות 60, 120 ו-180.

צבע בקצה המקלון	400	250	180	80	0
ריכוז הגלוקוז מ"ג/דצ"ל					

בדיקת גלוקוז בשתן:

- מבחנה המכילה דגימת שתן מדומה
- מקלון לבדיקת גלוקוז בשתן
- סקלת הצבעים לקביעת ריכוז הגלוקוז בשתן
- שעון עצר

מהלך העבודה

- א. לרשותכם מבחנה המכילה תמיסה המדמה דגימות שתן.
- ב. השתמשו במקלון חדש, טבלו את קצה המקלון בדגימת השתן המדומה למשך 2 שניות.
- ג. הוציאו את המקלון והמתינו 30 שניות בדיוק! (השתמשו בשעון עצר).
- ד. כעבור 30 שניות השוו את צבע המקלון לסקלת הצבעים וקבעו את ערך הגלוקוז.
- ה. רשמו את הערך שהתקבל בטבלת התוצאות (טבלה 1).

צבע בקצה המקלון	400	250	180	80	תקין
ריכוז הגלוקוז מ"ג/דצ"ל					0

בדיקת אינסולין בדם:

- 4 מבחנות עם דגימות פלסמת הדם המדומות (מסומנות לפי זמני דגימה 0, 60, 120 ו-180 דקות)
- מבחנת אפנדורף המכילה תמיסה לזיהוי אינסולין
- פלטת שקעים
- 5 פיפטות פסטר לשימוש חד פעמי (4 עבור הדגימות ו-1 עבור התמיסה לזיהוי אינסולין)
- סקלת צבעים לקביעת ריכוז האינסולין
- עט דק לרישום על זכוכית
- 4 קיסמי עץ

מהלך העבודה

- א. לפניכם פלטת שקעים, סמנו ארבעה שקעים במספרים 0, 60, 120 ו-180 המייצגים את זמני הדגימה בדקות.
- ב. באמצעות עט לסימון, סמנו 4 פיפטות פסטר במספרים 0, 60, 120 ו-180
- ג. לרשותכם 4 מבחנות המכילות דגימות פלסמת הדם מדומות, מסומנות לפי זמני הדגימה: 0, 60, 120 ו-180 דקות לאחר שתיית תמיסת הסוכר. העבירו את פיפטות הפסטר שסימנתם למבחנות בהתאם לסימון.
- ד. בעזרת פיפטת פסטר שהעברתם למבחנות, טפטפו 10 טיפות תמיסה מכל מבחנה לשקע המתאים בפלטת השקעים. החזירו את הפיפטות למבחנות.
- ה. בעזרת פיפטה חדשה, הוסיפו טיפה אחת של תמיסה לזיהוי האינסולין לכל שקע המכיל את פלסמת הדם.

1. ערבבו בעדינות את התמיסה בכל שקע באמצעות קיסמי עץ, השתמשו בקיסם חדש עבור כל שקע.
2. השוו את הצבע שהתקבל בכל שקע לסקלת הצבעים עבור ריכוזי האינסולין.
3. רשמו את ריכוז האינסולין המתאים לכל זמן דגימה בטבלת התוצאות (טבלה 1).

סקלת הצבעים לקביעת ריכוז האינסולין:

צבע התמיסה לאחר הוספת טיפה אחת של תמיסה לזיהוי האינסולין	ירוק בהיר	צהוב	ורוד	ירוק	כחול	סגול
ריכוז האינסולין (mcu*/ml)	10	20	30	40	50	60

טבלה 1: סיכום תוצאות בדיקת ריכוז הגלוקוז ואינסולין בפלסמת הדם וריכוז הגלוקוז בשתן של הנבדק/ת

זמן מרגע שתיית תמיסת הגלוקוז (דקות)	ריכוז הגלוקוז בפלסמת הדם (מ"ג/דצ"ל)	ריכוז הגלוקוז בדגימת שתן (מ"ג/דצ"ל)	ריכוז האינסולין בפלסמת הדם (mcu*/ml)
0			
60			
120			
180			

*מיקרו-יחידות בינלאומיות

שאלות

1. שרטטו גרף המתאר את רמות הגלוקוז וגרף נוסף המתאר את רמות האינסולין לאורך זמן בדם הנבדק.
2. האם תוצאת בדיקת רמת הגלוקוז בשתן תקינה?
3. לאור התוצאות שהתקבלו קיים חשד ל (הקיפו בעיגול): סכרת נעורים/סכרת מבוגרים/בריא/ה, הסבירו מדוע.
4. השוו את תוצאותיכם לתוצאות שהתקבלו בקבוצות שבדקו את הדגימות של הנבדקים הנוספים (יובל, רותם או משה).
5. דונו על המשמעות של התוצאות עבור כל אחד מהנבדקים.