



אוניברסיטת בר-אילן
Bar-Ilan University

Faculty of Social Sciences
The Pinchas Churgin
School of Education

הפקולטה למדעי החברה
בית הספר לחינוך
ע"ש פרופ' פ. חורגין

משרד החינוך, המזכירות הפדגוגית
הפיקוח על הוראת הביולוגיה
המרכז לפיתוח ותמיכה במעבדות הביולוגיה
בבתי הספר



שיטות עבודה מתקדמות בביולוגיה מולקולרית

השתלמות מורים – הפקת DNA

יוני – יולי 2019

תשע"ט



שיטות עבודה מתקדמות בביולוגיה מולקולרית

- תרגול: עבודה במיקרופיפטור
- תרגול: עבודה באלקטרופורזה בגל
- אנטיביוטיקה – סוד הקסם?
ניסוי: בדיקת עמידות לחומר אנטיביוטי (שימוש ב- PCR ואלקטרופורזה בג'ל)
- פרוייקט הוולבכיה
ניסוי: הפקת DNA של חרקים וחיידקים (שימוש ב- קולונת ספין, PCR ואלקטרופורזה בג'ל)
- סדנה: ביוחקר מולקולרי

הפקת DNA

תמצית מידע על הניסוי: הניסוי משלב שיטות עבודה בביולוגיה מולקולרית.

הזמן הנדרש:

- 2 שיעורים הכנה להיכרות עם פרוייקט הוולבכיה וחשיבותו, הבנת עקרונות השיטה להפקת DNA ולקריאת ההנחיות והבנתן.
- 2 שיעורים לביצוע הפקת ה-DNA מ-3 חרקים.
- 2 שיעורים הרצה ב-PCR.
- 2 שיעורים הטענה והרצה באלקטרופורזה בג'ל.
- 2 שיעורים דיווח על התוצאות ודיון בתוצאות.

אסטרטגיות חשיבה

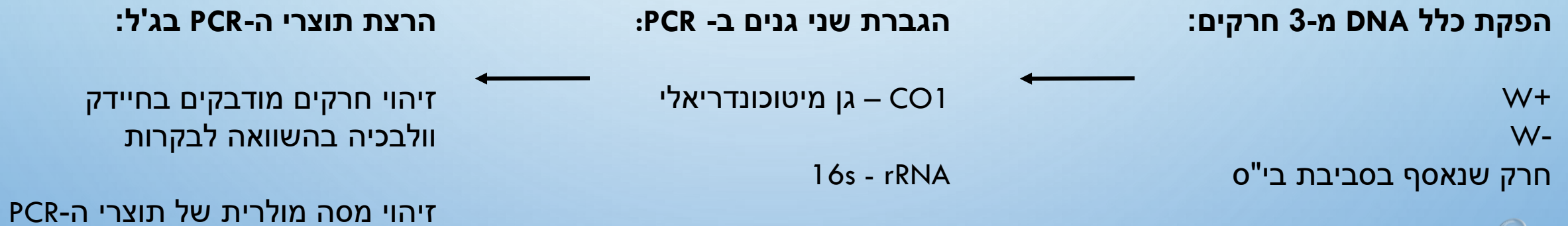
מסדר גבוה:

- דיווח על תוצאות הניסוי.
- הסבר חשיבותה של בקרה.
- הסבר תוצאות הניסוי.

ניסויים מקדימים

- תרגול עבודה במיקרופיפטור.
- תרגול עבודה עם PCR ועם שיטת אלקטרופורזה בג'ל

פרוייקט הוולבכיה: תרשים זרימה של מהלך העבודה



הפקת DNA מחרקים

1. זבוב דרוזופילה מודבק בחיידק הוולבכיה W^+
2. זבוב דרוזופילה שאינו מודבק בחיידק הוולבכיה W^-
3. חרק שנאסף בסביבת בית הספר

ציוד וחומרים נדרשים:

א. ציוד וחומרים שיספקו על ידי בר אילן:

- האנזים פרוטאינאז K
- תמיסות בופר: AE ,AW2 ,AW1 ,AL ,ATL
- קולונות ספין
- מבחנות PCR להמשך

• מיקרופיפטורים

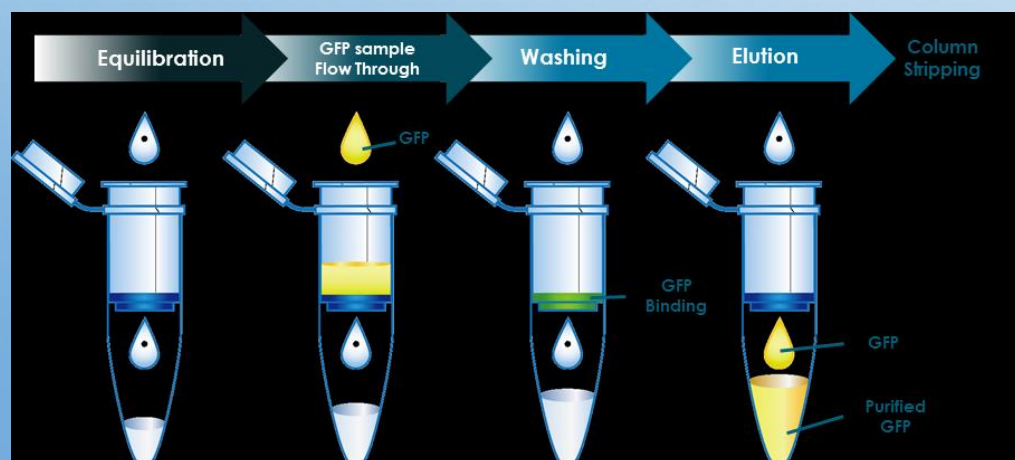
• מיניצנטריפוגה

• חרקים W+ באתנול

• חרקים W- באתנול

• מגבונים מסוג KIMWIPES

• כותשים



ב. ציוד דרוש שאינו מסופק בערכה

- חרק שנאסף בשטח
- טיפים למיקרופיפטורים
- מבחנות אפנדוף
- אתנול
- כלים לפסולת
- אקונומיקה
- כפפות
- חלוקים
- משקפי מגן
- טוש סימון לסימון דק אבל בולט
- צלוחיות לשימוש חד פעמי
- סקלפלים בנדן, פינצטות

כל תרגיל וניסוי כולל (1)

דף לתלמיד:

- רקע: עקרונות עליהם מבוססת שיטה להפקת DNA
- מהלך עבודה
- שאלות לפני ביצוע הניסוי ולאחריו (כולל קישור לידע קודם).

דף ללבורנט:

- מידע לגבי הציוד והחומרים שיסופקו מבר אילן.
- הנחיות לתכנון לוח זמנים ולהכנת הציוד והחומרים.
- הנחיות להכנת מגשים לקבוצות תלמידים.

כל תרגיל וניסוי כולל (2)

דף למורה:

- רקע עיוני לניסוי ומקורות מידע (סרטונים ומאמרים).
- המלצות לשילוב ברצף ההוראה.
- הסבר מפורט של שלבי הניסוי.
- התייחסות לשאלות המשולבות בדף העבודה לתלמידים.
- שאלת העמקה.
- רשימת מושגים חיוניים (תחליף "לידיעתך").

הוראות בטיחות

- יש לעבוד על פי ההנחיות המפורטות בחוזר מנכ"ל ובדפי העבודה לתלמיד וללבורנט.

- החומרים כלולים ברשימה המאושרת לעבודה עם תלמידים

- חובה להשתמש בחלוק, בכפפות ובמשקפי מגן בעת ביצוע העבודה המעשית

- חובה להשליך פסולת ביולוגית למיכל מסומן "פסולת ביולוגית"

- השמדת החומר הביולוגי באקונומיקה מהולה 1:10 (ריכוז 0.35%)

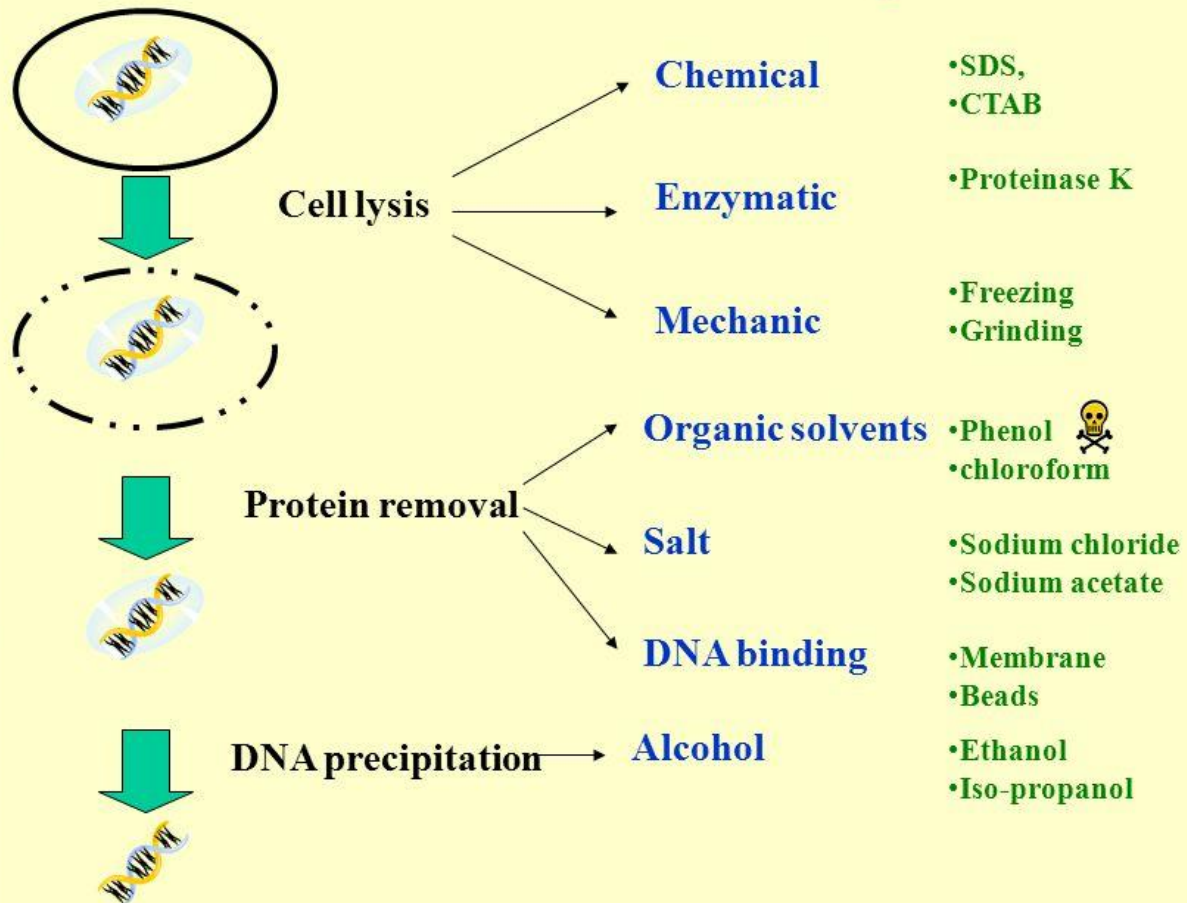
- בתחילת העבודה ובסופה יש לרחוץ ידיים עם מים וסבון ולחטא של משטחי העבודה עם אלקוהול 70%.

הפקת DNA מחרקים

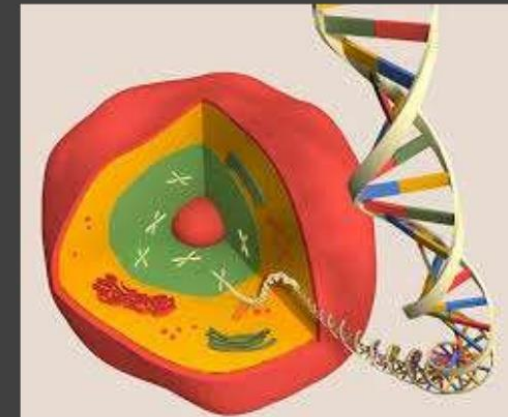
DNA extraction – the basic concept

Process

Common procedure



HOW TO TAKE THIS DNA OUT OF THE CELL?



VPB 321

מטרות:

- הבנת חשיבות פרוייקט הוולבכיה – נדון בהמשך
- התלמידים יכירו שיטה להפקת DNA
- התלמידים יבינו שהפקת ה-DNA כוללת גם את כלל ה-DNA של החרק וגם DNA של החיידק.
- הבנת חשיבות הבקרה כאמצעי השוואה וזיהוי ברמה המולקולרית.
- הבנת העקרונות עליהם מבוססת השיטה להפרדת ה DNA משאר מרכיבי התא

למורה:

מיומנויות: במהלך העבודה המורה יוכל להעריך את היכולת של התלמיד לעקוב אחרי הנחיות מורכבות ומפורטות לניסוי, להעריך את רמת הביצוע של תהליך הפקת ה-DNA ואת יכולת הארגון של התלמיד במהלך הביצוע המורכב משלבים רבים.

הערות למורה:

- יש לתרגל עם התלמידים שימוש במיקרופיפטורים.
- בשיעור ההכנה יש לקרא בעיון עם התלמידים את כל ההנחיות לפני התחלת הביצוע ולוודא שהתלמידים יודעים את שלבי הניסוי ובאיזה תמיסות בופר משתמשים בכל שלב.
- רצוי שהתלמידים יצלמו ויתעדו את התהליך.
- לאחר שלב 14 בעבודתו של התלמיד, אפשרית נקודת עצירה: ניתן לעצור את הניסוי ולאחסן את המבחנות ב-4 מעלות למשך הלילה.

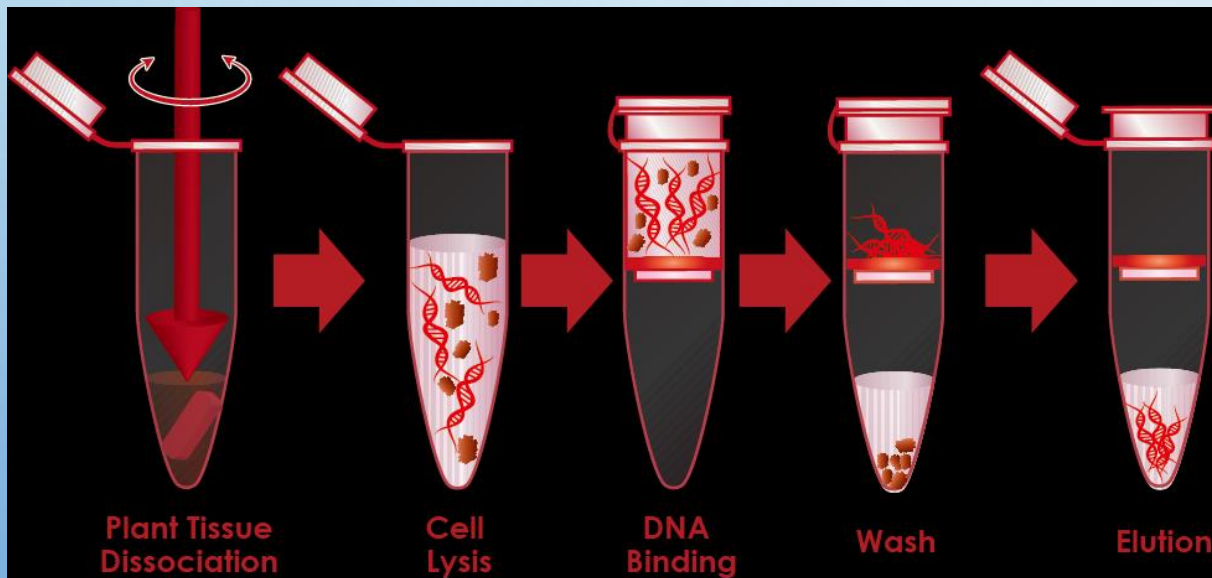
רקע נדרש:

שלבי הפקת ה-DNA:

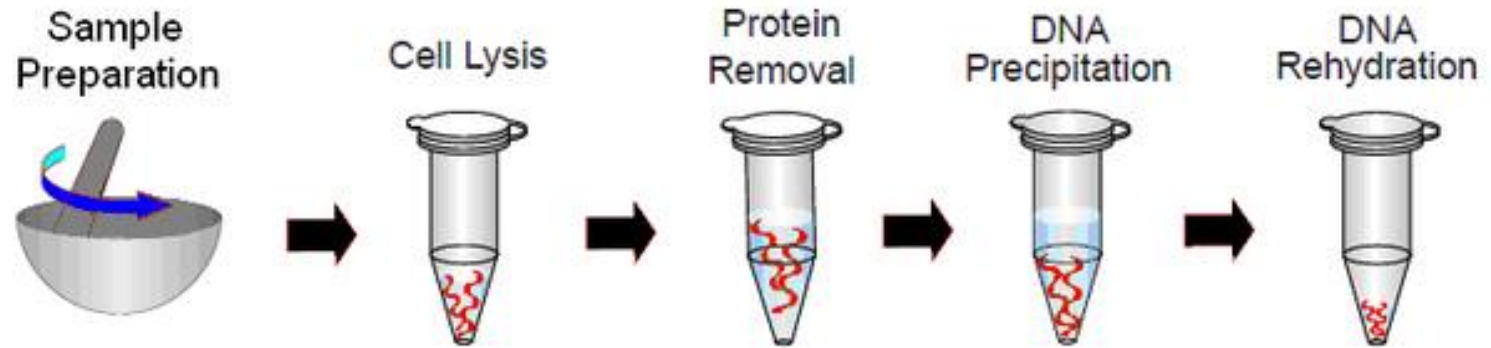
א. תהליך פירוק התאים

ב. הפרדת ה-DNA משאר מרכיבי התא

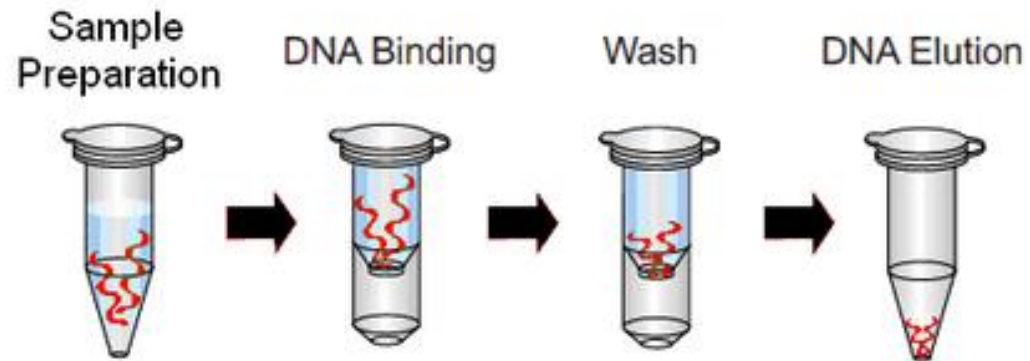
ג. איסוף ה-DNA



Genomic DNA Isolation

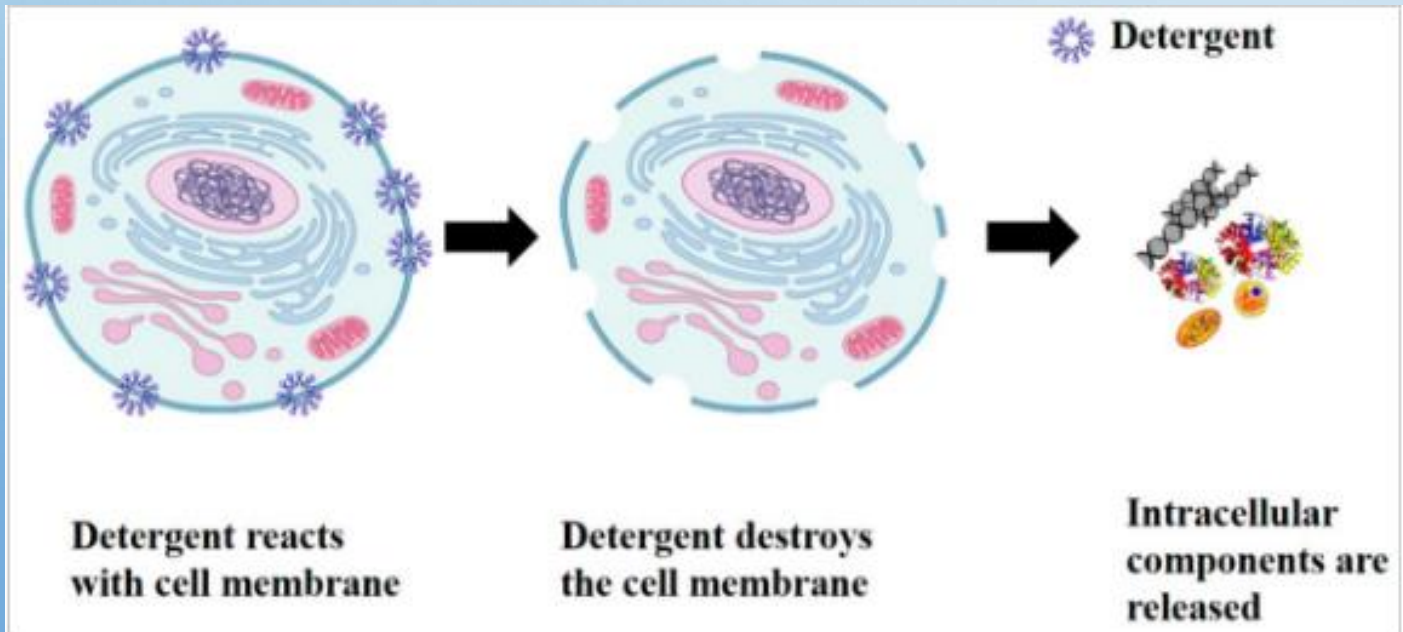


DNA Purification



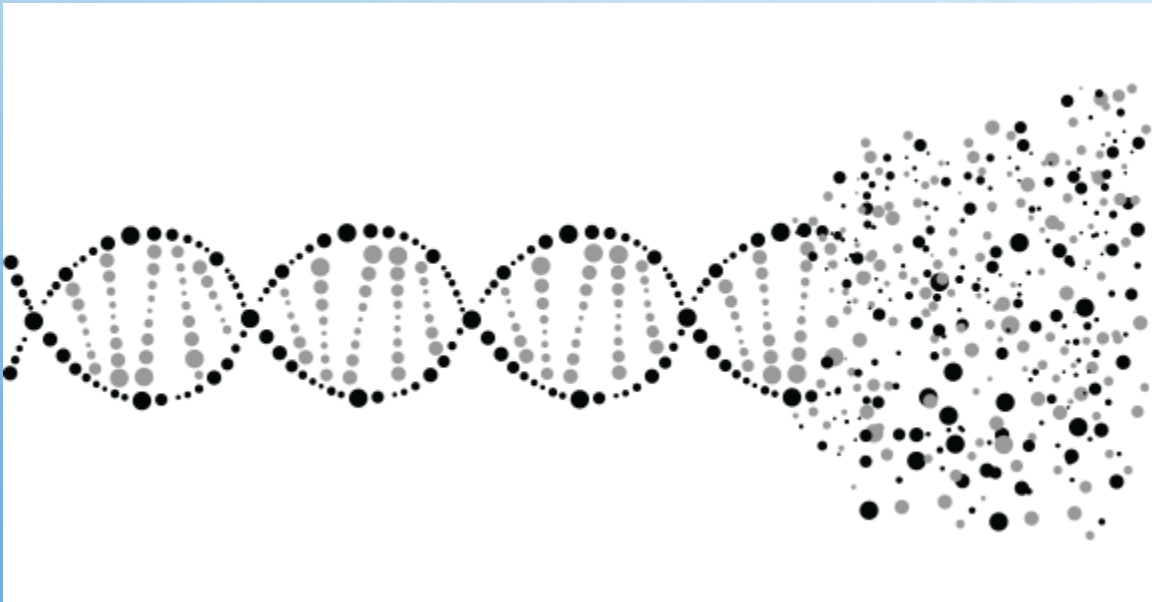
פירוק התאים

- **תמיסת הבופר ATL** מכילה SDS, SODIUM DODECYL SULFATE הגורם להרס התאים. SDS הוא חומר אניוני (טעון מטען במטען חשמלי שלילי), פעיל שטח פועל כדטרגנט ותורם להרס התא. החומר גורם לפירוק קשרים לא-קוולנטים בחלבונים וגורם לפתיחת המבנה המרחבי של החלבונים ולדנטורציה.
- **תמיסת הבופר- ATL** מכילה גם CHAOTROPIC AGENT GUANIDINIUM CHLORIDE שמקדם את תהליך הרס קרום התא, וגם דנטורציה של חלבונים, של DNA ושל חומרים נוספים. GUANIDINIUM CHLORIDE - מפריע לקשרי מימן, להשפעות הידרופוביות וכוחות ואן דר ואלס והתוצאה היא דנטורציה של חלבונים ו-DNA.



פירוק התאים - המשך

- בעקבות פירוק התאים מתעוררת בעיה שה DNA שהיה מוגן בתוך הגרעין על ידי קרום הגרעין הבררני, נחשף לחלבונים שונים במיצוי רקמות החרק כמו נוקלאזות שונות ולכן **מוסיפים את האנזים פרוטאינאז K** הגורם לפירוק החלבונים לפפטידים קצרים וחומצות אמיניות ושומר על הDNA שלם. האנזים פרוטאינאז K עוזר בפירוק של החלבונים במיצוי התאים של החרק. הוא פוגע בנוקלאוזות שהם אנזימים בעלי פעילות של פירוק חומצות גרעין. נוכחות ופעילות נוקלאזות יכולה להשפיעה על תוצאות התהליך.



הפרדת ה-DNA משאר מרכיבי התא

ניקוי ה-DNA בעזרת קולנת ספין. מומלץ גם להיעזר בקישור הבא: עיקרון הפעולה של קולנת ספין.

קולנת ספין:

קולונה היא מתקן המכיל מסנן ובו קרום עשוי מסיליקה (קוורץ SiO_2) הנתון בתוך מבחנת איסוף.

שימוש בקולנת ספין היא שיטה מהירה להפרדת חומצות גרעין משאר החלקים של התאים שפורקו. שיטה זו מבוססת על כך שחומצות גרעין, בניגוד לשאר חלקי התא, נקשרות לקרום הסיליקה שבמסנן בגלל תכונותיהן הכימיות והפיזיקליות. בתמיסה בתנאים של PH מסוים, הרכב מלחים מסוים וריכוז מלחים מסוים חומצות גרעין יתקשרו לקרום הסיליקה, ובשינוי התנאים (על ידי הוספת תמיסת בופר אחרת) הן יתנתקו ויצטברו במבחנת האיסוף.

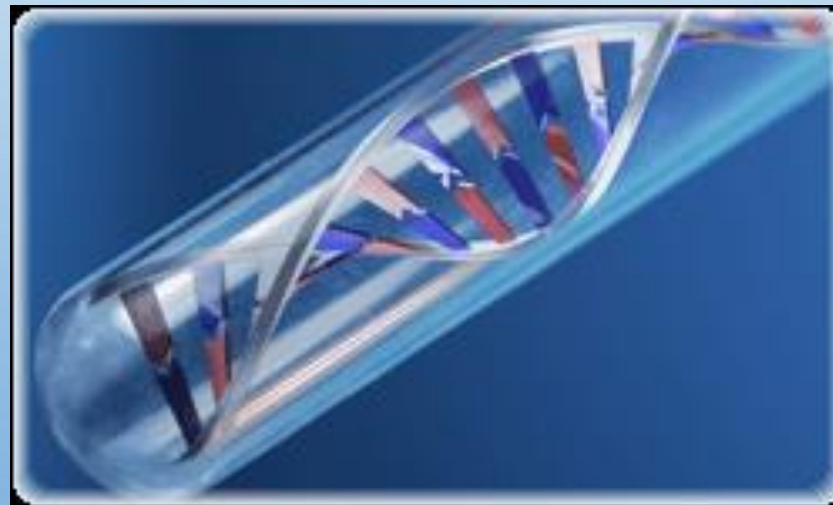
[גודל חומצות גרעין שאותו המסנן סופח הוא בין 0.5KB-10KB].

התלמיד יטעין על הקולונה, את מיצוי תאי החרק, המיצוי כולל DNA ושאר מרכיבים תאיים, וישטוף את הקולונה בעזרת שתי **תמיסות בופר AW1 AW2**. שטיפה זו תגרום ל-DNA להקשר לקולונה וכל שאר המרכיבים ישטפו ויורחקו.



איסוף ה- DNA

- שלב זה בפעילות יסתיים בניתוק ה- DNA הקשור לקרום הסיליקה במסנן שבקולונה. שלב זה מתבצע באמצעות **תמיסת בופר הסרה AE**. תמיסה זו תגרום לניתוק ה- DNA ולשטיפתו מהקולונה למבחנת האיסוף. סיבוב המבחנה עם ה- DNA המצוי על גבי המסנן בצינטריפוגה יגרום למעבר הבופר דרך המסנן ו"לדחיפת" ה- DNA לתוך מבחנת האיסוף ומאפשרת אחסון ה- DNA במקפוא בטמפ' של -20°C עד לביצוע תהליך ההגברה ב-PCR או למשך שנים.



סיכום הניסוי

1. תארו בקצרה את השלבים שיש לבצע על מנת לבודד את ה-DNA שבתאי חרק ולהפרידו משאר מרכיבי התא (אין צורך לציין שמות חומרים).
- הסבירו מהם העקרונות עליהם מבוססת השיטה להפרדת DNA משאר חלקי התא.
2. אלו מהחומרים המצויים בתא יכולים להפריע בתהליך הפקת ה-DNA.
3. מדענים מנסים לקבוע את זהותו של נגיף שפעת התוקף תאים ממערכת הנשימה של אדם.
הציעו שיטה באמצעותה תוכלו לקבוע:
 - האם הרקמות מודבקות בנגיף?
 - האם זהו נגיף ידוע או שמדובר בנגיף שהתגלה לראשונה?
4. מה היתה מטרת ההפקה של ה-DNA בניסוי שערכתם? מה יהיה הצעד הבא שבו תפעלו על מנת לקבוע את שכיחות הימצאות חיידק הוולבכיה בבית גידול מסוים בקרבת בית הספר שלכם?
5. בפרוייקט הוולבכיה משתתפים תלמידים מבתי ספר ברחבי העולם. מהי לדעתכם החשיבות של פרוייקט זה?

סיכום הניסוי

- הצעות לשילוב הניסוי ברצף ההוראה
- שאלות העמקה/ שאלות הרחבה נוספות – למורים
- הכנות התלמידים לשלבים הבאים: PCR, אלקטרופורזה בג'ל