

דף ללבורנט: ערכת אגרובקטריום

(עדכון: 2.8.20)

מידע על ציוד וחומרים הנדרשים לביצוע הגברה של גנים של חיידקי אגרובקטריום במכשיר PCR. זיהוי הגנים בשיטת האלקטרופורזה בג'ל. תצפית מיקרוסקופית והדבקת גזר בחיידקי אגרובקטריום. צריך להקפיד כל כללי הבטיחות. התלמידים יעבדו רק עם חלוקים, כפפות, משקפי מגן ושיער אסוף.

הנחיות ללבורנט

נושא: זיהוי גנים של החיידק אגרובקטריום המצויים על הפלסמיד $Ti - DNA$

בניסוי התלמידים יפיקו DNA משני סוגי חיידקים: חיידקי *E. Coli* וחיידקי אגרובקטריום מזן CP58. התלמידים יגבירו גנים המאפיינים פלסמיד המצוי בחיידק האגרובקטריום בעזרת PCR ויזהו את תוצרי ה-PCR בשיטת האלקטרופורזה בג'ל. למידע נוסף מומלץ לקרוא בדפים למורה.

הצלחת הניסוי תלויה בהקפדה על ביצוע כל ההנחיות המפורטות בהמשך ובכלל זה גם התייעצות עם המורה והרכז לגבי מועד ביצוע הניסוי ובדיקת התוצאות.

- עבודה מדויקת של הלבורנט בכל שלבי הביצוע כגון:
- הכנת תמיסות ומצעי גידול בריכוזים המתבקשים.
- הכנת החומרים לפי לוח הזמנים.
- שמירה על טמפרטורה ותנאי אחסון רצויים לפי ההנחיות.
- זריעת חיידקים ועבודה בתנאים סטריליים (ראו ["עבודה במעבדה במיקרוביולוגיה" סרט ודפי הנחייה](#)).

ערכה לביצוע הניסוי: בתי הספר המנויים במרכז לפיתוח ולתמיכה במעבדות ביולוגיה יוכלו להזמין ערכה שבה יהיו חלק מהחומרים ומהציוד שנדרשים לביצוע הניסוי. הערכה מיועדת ל-4 קבוצות של תלמידים שבכל קבוצה יעבדו 2-3 תלמידים.

לפני הזמנת הערכה מבר אילן, חשוב מאד לקרוא בעיון את רשימות הכלים והחומרים אותם יש להכין ואת אלו שכלולים בערכה (עמ' 4 - 8) ולבדוק האם יש לכם בבית הספר את כל שנדרש לביצוע הניסוי. אם חסרים לכם פריטי ציוד חשוב שתרכשו אותם בהקדם אצל ספקי הציוד למעבדות או תבדקו אפשרות לשאול אותם מבית ספר אחר. כך תוכלו לבצע את הניסוי במועד סמוך לקבלת הערכה מבר אילן.

הערה: בתי ספר שמשתמשים בציוד שאינו מסופק על ידי המרכז בבר אילן צריכים לבצע התאמות בעיקר בכמויות החומרים הדרושים לכנת ג'לים.

נהלי הזמנת ערכה: את הערכה יש להזמין מהמרכז לפיתוח ותמיכה בבר אילן, כשלושה שבועות לפני המועד שנבחר לביצוע הניסוי עם התלמידים. הלבורנט יתקשר למרכז ויבדוק עם הצוות מהו המועד המתאים להגעת שליח מטעם בית הספר. בהתאם להנחיות שהלבורנט יקבל, הוא יזמין שליח שיגיע לבר אילן, יקבל את הערכה וימסור אותה ללבורנט בבית"ס.

לתשומת לבכם:

- חשוב לבצע את הניסוי לא יאחר משבוע מיום קבלת הערכה בבית הספר.
- בית הספר יישא בהוצאות משלוח הערכה מבר אילן או שידאג לנציג מטעמו שיבצע איסוף עצמי.

תמיכה והתארגנות: בכל שאלה הקשורה להכנת הניסוי ניתן להתקשר למרכז לפיתוח ולהתייעץ עם הלבורנטיות שהתמחו בניסוי זה.

בכל שנה תתקיימה במרכז השתלמויות למורים וללבורנטים בנושא ביולוגיה מולקולרית. אנו ממליצים לכם לעקוב באופן שוטף אחר המידע שיתפרסם בנושא זה [באתר המרכז](#).

בטיחות בעבודת ההכנה של הלבורנט ובעבודת המורה והתלמידים: חיידקי *E. Coli* מין DH5α, וחיידקי אגרובקטריום מהזן: *Rhizobium radiobacter*, CP58. את החיידקים תקבלו ממרכז הפיתוח והתמיכה יסופקו בצלחת אגר מזין. חיידקים אלה אינם פתוגניים, אך מטעמי זהירות אנו מחויבים **לעבוד עם כל המיקרואורגניזמים במשנה זהירות ובתנאים סטריליים**. לפיכך, כבר בשלב תכנון הניסוי חובה עליכם לקרוא בעיון את הסעיפים הרלוונטיים [בחוזרי הבטיחות](#) המתפרסמים באתר מפמ"ר ביולוגיה ולעבוד על פי ההנחיות שהתפרסמו בהם ("חוזר המנכ"ל החדש והמעודכן לבטיחות במעבדה מרץ 2015", "הנחיות לשמירה על בטיחות בעבודה במעבדה לביולוגיה", "עבודה במעבדה במיקרוביולוגיה"). ראוי לציין כי הקפדה על ההנחיות כוללת גם את הטיפול בפסולת ביולוגית במהלך הניסוי ובסיומו, ניקוי משטחי העבודה ורחיצת ידיים בסיום העבודה.

הערה: הנחיות ייחודיות לעבודה לפי כללי בטיחות בניסוי כלולות במסמך זה ובדפים לתלמיד.

הלבורנט חייב להקפיד ולעבוד על פי הנחיות הבטיחות בזמן שהוא מכין את הכלים והחומרים לניסוי ולהדריך את המורים והתלמידים בהנחיות אלה לפני ביצוע הניסוי ובמהלכו.

בטבלאות ובנספחים שבעמודים הבאים מוצג מידע על ההתארגנות לקראת ביצוע הניסוי:

בטבלה 1 מידע על הפריטים שבערכה שתסופק על ידי המרכז לפיתוח ותמיכה בבר אילן (עמ' 4 - 8).

בטבלה 2 מידע על הציוד שימצא על שולחן המורה בעת ביצוע הניסוי (עמ' 4).

בטבלה 3 מידע על הכלים והחומרים והוראות הכנה שהלבורנט צריך כדי להכין לכל קבוצת תלמידים (עמ' 6 - 12).

לידיעתכם:

יש להשתמש באוטוקלאב או סיר לחץ להכנת מצעי המזון. ניתן להכין גם ע"י חימום והרתחה על גבי פלטת חימום ולמזוג לצלחות בתנאים סטריליים.
חשוב להפעילם על פי הוראות הבטיחות של היצרן!

לתשומת לבכם:

לפני תחילת העבודה חשוב מאד לנקות את שולחן העבודה של הלבורנט בכוהל 70%.
לאחר שהכוהל יתייבש, על פי הצורך יש לעבוד בקרבת להבה דולקת.

בתום העבודה יש לנקות את המשטח בכוהל ולעקר את הציוד על פי ההנחיות ב "[חוזר המנכ"ל החדש והמעודכן לבטיחות במעבדה מרץ 2015](#)", הבטחת הבטיחות במעבדות עמ' 48 - 50.

טבלה 1: פריטים בערכה שתסופק על ידי המרכז לפיתוח ותמיכה וישמשו

להכנת חומרים בנוסף על אלה שמצוינים בטבלאות 2,3

שימוש בפריט בטבלה 3	לוח זמנים לעבודה עם הפריט	תנאי אחסון וזמן מתאים לאחסון	לקבוצת תלמידים (ראו פרוט בטבלאות 2, 3) כלים וחומרים
27, 26		שמירה במקרר	צלחות ובהן תרבית חיידקי <i>E. coli</i> ותרבית חיידקי אגרובקטריום בצלחות פטרי קטנות המכילות מצע מזון NA. לזרוע זריעת בידוד את החיידקים. לאחר הזריעה להכניס לאינקובטור למשך 24 שעות ולאחר מכן לשמור במקרר עד למועד הניסוי.
45, 26, 27	יומיים לפני ביצוע הניסוי	שמירה בטמפ' החדר. צלחות עם אגר לשמור במקרר	כלי ובו 15 גרם אגר NA (אבקה). מתאים להכנת 500 מ"ל אגר NA. להכנת 18 צלחות פטרי לגידול חיידקים הכלי פקוק ומסומן "15 גרם אגר NA" להעביר את אבקת האגר לארלנמאייר בנפח 1 ליטר. ל 15 גרם NA יש להוסיף 500 מ"ל מים מזוקקים. ניתן להכין באוטקלאב או: לחמם לטמפרטורה של 93°C – 90°C בטמפרטורה זו האגר מתמוסס. לקרר לטמפרטורה של 60°C למזוג לכל צלחת אגר לגובה 0.8 – 0.9 ס"מ. להמשיך לקרר ולאחר שהאגר נקרש להכניס למקרר. הצלחות ישמשו לזריעת חיידקים ראו טבלה 3 פריטים: 26, 27, 45
42	יומיים לפני ביצוע הניסוי	לשמור במקרר	שני כלים המסומנים "NB" ובהם 1.3 גרם אבקה להכנת 100 מ"ל מצע גידול <u>נוזלי</u> הדרוש להכנת "תרבית לילה" של חיידקי אגרובקטריום. <u>ראו הסבר נוסף פריט 42</u> להעביר 1.3 גרם אבקת NB לכלי בנפח 250 מ"ל יש להוסיף 100 מ"ל מים מזוקקים ולערבב היטב תוך כדי חימום ל 93°C – 90°C עד שהאבקה מתמוססת. להכניס את התמיסה לאוטוקלאב או לסיר לחץ לעיקור. 25 מ"ל מתמיסת NB המעוקרת ישמש להכנת תרבית לילה של חיידקי אגרובקטריום <u>ראה פריט 12</u> בטבלה 2 ופריט 42 בטבלה 3

טבלה 2: ציוד וחומרים על שולחן המורה לביצוע COLONY PCR של

אגרובקטריום ואלקטרופורזה בג'ל

מס'	שם הפריט תאור הפריט / מידע על הפריט	מסופק על ידי:	יונח על שולחן / לקבוצה
1	אלקטרופורזה בג'ל MINIONE הערכה כוללת שני מכשירי אלקטרופורזה, שתי תבניות להכנת 4 ג'לים ושני מסרקים ליצירת באריות. הנחיות בעברית להפעלת המכשיר. אם המכשיר של חברה אחרת יש לבצע התאמת כמויות של החומרים	בר אילן	מרכזי
2	מכשיר PCR	בר אילן	1
3	מכשיר מיניצנטריפוגה ומכשיר וורטקס	בר אילן	1 מכל סוג
4	פלטות חימום עם בוחש מגנטי או מיקרוגל יש להוסיף ארלנמאירים בנפח 150 – 250 מ"ל להכנת הג'ל.		
5	גליל נייר פראפילם + מספריים		
6	פח מרכזי ובו שקית Biohazard להשלכת פסולת ביולוגית		1
*7	קרח כתוש בכמות מספיקה לפי מספר הקבוצות. וקרח נוסף למילוי חוזר של אמבטי הקרח		בהקפאה
8	כפפות ניטריל במגוון מידות		
9	בקבוק עם אתנול 70% לחיטוי משטחי העבודה		
*10	מבחנת אפנדורף אטומה לאור (שחורה) מסומנת "SM" ובה צבע SMART GLOW לצביעת DNA. יש לאחסן בחושך במקרר. יש להוסיף 3µL צבע מסוג SMART GLOW לכל 50 מ"ל ג'ל אגרוז. <u>הסבר ראו פריט 29</u>	בר אילן	15µL לכל 4 קבוצות 50 מ"ל תמיסת אגרוז מספיקה להכנת שני ג'לים
*11	בקבוק ובו תמיסת בופר TAE בנפח של כ- 150 מ"ל לכל קבוצה. הבופר יכול לשמש מספר הרצות במכשיר האלקטרופורזה. אם מכשיר האלקטרופורזה של חברה אחרת יש לבצע התאמת כמויות של הבופר	בר אילן	600 מ"ל ל 4 קבוצות

12*	מבחנה ובה תרבית "לילה" במצע NB של חיידקי אגרובקטריום	ראו פירוט בהמשך בפריט 42
13	קוס כימית מרכזית עם אקונומיקה מהולה במים (1:10) להשריית הזכויות הנושאות המושמות	
14	מים מזוקקים (כ- 100 מ"ל) בבקבוק שטיפה להרטבת הניירות הסופגים לאחר הדבקת הגזר באגרובקטריום	

טבלה 3: ציוד וחומרים על השולחן של כל אחת מקבוצות העבודה לביצוע

COLONY PCR של אגרובקטריום ואלקטרופורזה בג'ל

מס'	שם הפריט תאור הפריט / מידע על הפריט	יונח על שולחן הקבוצה
הגברת גנים של חיידק אגרובקטריום ב PCR וזיהוי הגנים בג'ל		
15	מיקרופיפטור בנפח 2-20 μ L	בר אילן
16	מיקרופיפטור בנפח 0.5-10 μ L	בר אילן
17	כן / מעמד למבחנות אפנדורף ובו 6 מבחנות אפנדורף	1
18	כן / מעמד למבחנות PCR ובו 6 מבחנות PCR מעוקרות / סטריליות	בר אילן
19	קופסה ובה 25 טיפים לפחות המתאימים למיקרופיפטור בנפח עד 200 μ L	1
20	נייר מגבת	5 ריבועים
21	עט לרישום על זכויות המאפשר סימון דק ובולט	1
22	כפפות (רצוי כפפות ניטריל) כמספר חברי הקבוצה	לכל אחד מהתלמידים בקבוצה
23	משקפי מגן כמספר חברי הקבוצה	
24	חלוקים כמספר חברי הקבוצה	
25	כלי המסומן פסולת בנפח חצי ליטר ובו שקית	1
26*	צלחת פטרי המסומנת ב- "A" ובה מושבות בודדות של חיידקי אגרובקטריום (עדיף כזו שהוכנה בזריעת בידוד)	ראו פירוט בהמשך

1	ראו פירוט בהמשך	צלחת פטרי המסומנת ב- "B" ובה מושבות בודדות של חיידקי <i>E. coli</i> (עדיף כזו שהוכנה בזריעת בידוד)	*27
15µL לכל 4 קבוצות תלמידים	בר אילן	מבחנת אפנדורף מסומנת "SM" ובה צבע SMART GLOW לצביעת DNA. יש לאחסן בחושך במקרר עד לשימוש. כל קבוצה תוסיף ל- 50 מ"ל לג'ל האגרוז בטמפרטורה של כ- 50 מעלות 3 µL צבע SMART GLOW	*28
1 מספיק להכנת שני ג'לים לשתי קבוצות	בר אילן	כלי המסומן "אגרוז" ובו 1 גרם אבקת אגרוז (או שני כלים ובכל אחד 0.5 גרם אגרוז) להכנת שני ג'לים בריכוז 2% אגרוז.	*29
מבחנה אחת לכל שני ג'לים	בר אילן	מבחנה מסומנת "TAE" ובה 50 מ"ל תמיסת בופר TAE אם מכשיר האלקטרופורזה של חברה אחרת יש לבצע התאמת כמויות של הבופר	30
1 לשמור במקרר עד לשימוש	בר אילן	מבחנה המסומנת "LADDER" ובה 7µL DNA LADDER	31
1 לשמור בהקפאה עד	בר אילן	מבחנה המסומנת "mix taq" ובה 85µL תערובת PCR mix TAQ	32
לגבי פריטים 33 – 35 רצוי שתהיה מבחנה אחת לכל אחד מהחומרים על שולחן המורה, בגלל הנפחים הקטנים.			
1 לשמור בהקפאה עד לשימוש ולערבב היטב בוורטקס לפני השימוש	בר אילן	מבחנה המסומנת "p1" ובה 6 µL תמיסת פריימר P1	33
1 לשמור בהקפאה עד לשימוש ולערבב היטב בוורטקס לפני השימוש	בר אילן	מבחנה המסומנת "p2" ובה 5 µL תמיסת פריימר P2	34
1 לשמור בהקפאה עד לשימוש ולערבב היטב בוורטקס לפני השימוש	בר אילן	מבחנה המסומנת "p3" ובה 5 µL תמיסת פריימר P3	35
1 לשמור בטמפרטורת החדר		מבחנת אפנדורף מסומנת "מים מזוקקים" ובה 100 µL מים מזוקקים מעוקרים	*36

צפייה במיקרוסקופ בחיידקי אגרובקטריום, הדבקת גזר באגרובקטריום			
37	6 מקלות זריעה סטריליים לזריעת חיידקים (חד פעמיים או מקל אחד ממתכת)		
38	סכין חיתוך רצוי בעל להב חלק – מתאים לחיתוך גזר		
39	צלחת פטרי סטרילית סגורה, מרופדת בנייר סופג		
40	מלקטת / פינצטה		
41	מיקרוסקופ + ציוד למיקרוסקופ הכולל 2 זכוכיות נושאות, זכוכיות מכסות, בקבוקון עם מים ומחט מתקן.		
*42	מבחנת אפנדורף מסומנת "אגרובקטריום" ובה 0.5 – 1 מ"ל מתרבית "לילה" מהולים 1:1000 במצע- LB של חיידקי אגרובקטריום	ראה בהמשך פריט 12	1 לקבוצה לגדל ב 30°C
43	חצי גזר		1
44	כלי מתאים לטבילת חצי גזר מסומן "אתנול 70%" ובו אתנול בריכוז 70%. יש לכסות בנייר פראפלים.		
45	סבון כלים לניקוי הגזר. לשטיפת הגזר		
46	צלחת פטרי ובה מצע מזון מסוג NA מעוקר לזריעת חיידקי אגרובקטריום.		

הסבר נוסף לפריטים המסומנים ב - *

פריט 7: קרח כתוש, להכנת כלי לקרח אפשר להשתמש בכוסות חד פעמיות לשתייה חמה (הניחו כוס בתוך כוס). ניתן לרכוש קרח שקיות עם קרח בסופר מרקט ולשמור עד לביצוע הניסוי.

פריט 11: בקבוק ובו תמיסת בופר TAE

הערה: במידה ואתם משתמשים במכשיר אלקטרופורזה שאינו מתוצרת Minione יש לבצע התאמות בנפחים של הבופר.

בופר הרצה: תמיסת בופר המשמשת למילוי מכשיר האלקטרופורזה.
לקראת ההרצה בג'ל יש להניח את הג'ל המוכן בתבנית הפרספקס במקום המתאים במכשיר.
יש למלא בזהירות בופר עד גובה הג'ל כך שיכסה את הבארות.

שימו לב: יש להקפיד על גובה תמיסת הבופר במכשיר. אין למלא מעל גובה הג'ל. עודפים ניתן לשאוב עם פיפטת פסטר.

בופר זה ניתן לשימוש חוזר עד 3 – 4 פעמים נוספות. בתום ההרצה בג'ל ואיסוף התוצאות. יש לנתק את המכשיר מהחשמל, להוציא את ההתבנית של הג'ל של המכשיר ובה הבופר ולהחזיר בזירות לבקבוק. יש לנגב את המכשיר היטב בעזרת נייר מגבת.

פריט 12*: מבחנה ובה תרבית "לילה" במצע NB של חיידקי אגרובקטריום.

העבר 1.3 גרם אבקת NB ל 100 מ"ל מים מזוקקים והכן מצע מזון נוזלי לפי ההנחיות הבאות:
ניתן להכין באוטקלאב או: לחמם על פלטת חימום עם בוחש מגנטי לטמפרטורה של $90^{\circ}\text{C} - 93^{\circ}\text{C}$ בטמפרטורה זו האגר מתמוסס.
לקרר לטמפרטורה של 60°C למזוג בתנאים סטריליים לכלי.

ל- 25 מ"ל של מצע נוזלי מעוקר בבקבוק אלרנמאייר בנפח 50-100 מ"ל יש להוסיף חיידקים באופן הבא:

- חטא היטב את משטח העבודה באמצעות תמיסת אתנול 70%.
- עבוד בסביבה סטרילית בנוכחות להבת אש.
- באמצעות קיסם עץ מעוקר גע במושבת חיידקים בודדת שעל צלחת פטרי שקיבלת מבר אילן. השתדל לאסוף את המושבה באמצעות הקיסם.
- העבר את הקיסם אל תוך הארנלמאייר המכיל את מצע הגידול. וערבב באמצעותו את המצע. העבר את הקיסם לפח פסולת ביולוגית.
- הדגר את החיידקים בטמפרטורה של 30°C למשך 24-48 שעות, עדיף בטלטול (באינקובטור או באמבט).
- תרבית החיידקים ניתנת לשמירה ב- 4°C עד לשבוע.
- **הערה:** כדאי להכין יומיים לפני ביצוע הניסוי ולגדל את החיידקים ב 30°C במשך 48 ש'.

פריט 26*: צלחת פטרי המסומנת "A" ובה מושבות בודדות של חיידקי אגרובקטריום

- חטא היטב את משטח העבודה באמצעות תמיסת אתנול 70%.
- עבוד בסביבה סטרילית בנוכחות להבת אש.
- באמצעות מחט לזריעת חיידקים גע קלות במושבה שנמצאת על צלחת הפטרי של אגרובקטריום שקיבלת מבר אילן.
- "קשקש" בעדינות עם מחט בזריעה על צלחת NA סטרילית מספר פעמים בצורות של זיגזג. ראה איור 1:

איור 1: זריעת בידוד



- גדל את החיידקים באינקובטור בטמפרטורה של 30°C למשך 24-48 שעות, עד להופעת מושבות עגולות חלקות מבריקות בצבע לבן-צהבהב.

- שים לב: אם בתום הגידול התקבלו מריחות חיידקים ולא מושבות בודדות – גע באמצעות מקל זריעה סטרילי בשולי אחת מהמריחות ומרח שוב בשולי הצלחת הנקיים מחיידקים – גדל שוב ל- 24 שעות ב- 30°C. אם גם אז לא התקבלו מושבות בודדות – פנה להתייעצות בבר אילן.

פריט 27*: צלחת פטרי המסומנת "B" ובה מושבות בודדות של חיידקי *E. coli*

- חטא היטב את משטח העבודה באמצעות תמיסת אתנול 70%.
- עבוד בסביבה סטרילית בנוכחות להבת אש.
- באמצעות מחט לזריעת חיידקים גע קלות במושבה שנמצאת על צלחת הפטרי של *E. coli* שקיבלת מבר אילן.
- "קשקש" בעדינות עם מחט בזריעה על צלחת NA סטרילית מספר פעמים בצורות של זיגזג. ראה איור 1.
- גדל את החיידקים באינקובטור בטמפרטורה של 37°C למשך 8-12 שעות, עד להופעת מושבות עגולות חלקות מבריקות בצבע לבן.
- שים לב: אם בתום הגידול התקבלו מריחות חיידקים ולא מושבות בודדות – גע באמצעות מקל זריעה סטרילי בשולי אחת מהמריחות ומרח שוב בשולי הצלחת הנקיים מחיידקים – גדל שוב ל- 8 שעות ב- 37°C. אם גם אז לא התקבלו מושבות בודדות – פנה להתייעצות בבר אילן.

פריט 28*: מבחנת אפנדורף מסומנת "SM" ובה צבע SMART GLOW לצביעת DNA. יש לשמור

במקרר עד השימוש במבחנה אטומה לאור.

ראו המשך בפריט 29.

פריט 29*: כלי המסומן "אגרוז" ובו 1.0 גרם (או שני כלים ובכל אחד 0.5 גרם) אבקת אגרוז להכנת

ג'ל אגרוז (שני ג'לים).

ניתן להכין את הג'ל יום לפני הניסוי. לעטוף בנייר כסף ולשמור במקרר.

הוראות הכנה למגש אחד של ג'ל אגרוז 2% המכיל שתי תבניות:

- הכניסו 1 גרם אבקת אגרוז לארלנמאייר בנפח 100 מ"ל והוסיפו 50 מ"ל בופר TAE. הכניסו את הארלנמאייר למיקרוגל למשך 20-30 שניות. מומלץ לכסות עם נייר (כלומר לפקוק על מנת שלא יתאדה ואז אחוזי הג'ל משתנים)
- חזרו על פעולה זו עד להמסת הג'ל וקבלת תמיסה צלולה.
- אז: לאלנמאייר שבו 1 גרם אגרוז + 50 מ"ל TAE להוסיף בוחש מגנטי ולכסות את הכלי בנייר אלומיניום. לחמם על פלטת חימום עד לטמפרטורה של 93°C – 90°C בטמפרטורה זו האגרוז מתמוסס.

שימו לב: בטמפרטורה גבוהה מזה התמיסה עלולה לגלוש.

- ב.** היעזרו בכפפות מתאימות (לכלים חמים), הוציאו את הארלנמאייר והניחו במקום חסין לחום כדי שיתקרר.
- זהירות!** בזמן הרתיחה לא ניתן להבחין בבועות אגרוז שנשפך על היד מתקרר על היד ועלול לגרום לכוויה חמורה.
- ג.** יש לקרר את האגרוז לטמפרטורה של כ- 50 °C ולהוסיף 3 µL תמיסת צבע SMART GLOW במהירות. לערבב מעט על ידי טלטול עדין של הכלי ולשפוך במהירות לתבניות הג'ל. בטמפרטורה מעט נמוכה יותר הג'ל נקרש. לאחר הוספת הצבע לא ניתן לחמם שוב את הג'ל.
- ד.** ברשותכם מסרק משותף לשתי תבניות אליהן מזגתם את הג'ל. מיזגו 25 מ"ל אגרוז לכל אחת מתבניות הג'ל.
- הכניסו את המסרק לתבניתו והמתינו עד לקרישת הג'ל (כ- 10 – 15 דקות, תלוי בטמפרטורת החדר). **שימו לב:** אין להזיז את התבניות עד לקרישת הג'ל. ראו תמונה 1.
- ה.** כאשר הג'ל נקרש יש להוציא את המסרק בעדינות.
- פריט 36:** להרתיח כלי מכוסה ובו מים מזוקקים למשך מספר דקות. לקרר לטמפרטורת החדר ולהעביר למבחנות אפדורף 100 µL.
- פריט 42:** מבחנת אפנדורף מסומנת "אגרובקטריום" ובה 0.5 – 1 מ"ל מתרבית "לילה" מהולים 1:1,000 במצע- NB של חיידקי אגרובקטריום
- חטא היטב את משטח העבודה באמצעות תמיסת אתנול 70%.
 - עבוד בסביבה סטרילית בנוכחות להבת אש.
 - באמצעות מיקרופיפטור בנפח 20-2 µL העבר 20 µL מתרבית לילה של אגרובקטריום אל תוך 20 מ"ל מצע גידול נוזלי טרי, NB, בהתאם למצע שבו הוכנה תרבית הלילה.
 - ערבב היטב המשך שקשוק הארלנמאייר למשך כ- 2 דקות.
 - חלק למבחנות אפנדורף, כ- 0.5-1 מ"ל במבחנה.

