

תפוצת חיידקי וולבכיה בפרוקי רגליים - לתלמיד 28.3.2019

הקדמה

וולבכיה הוא חיידק המקיים יחסי גומלין מסוג סימביוזה¹ עם פרוקי רגליים וביניהם חרקים ממינים שונים. חיידקי וולבכיה מדביקים את הנקבות ומתרבים בתאי הרבייה שלהן. החרקים המודבקים מוגנים מהדבקה של וירוסים כדוגמת וירוס ה**זיקה** הנפוץ במרכז אמריקה ובדרומה או וירוס ה**דאנגי** שהיה נפוץ באוסטרליה. במחקרים שבוצעו עד היום נמצא כי במדינות בהן אחוז החרקים המודבקים בוולבכיה הוא גבוה, שיעור התחלואה של בני אדם בקדחת הזיקה הוא נמוך.

בניסוי תפיקו DNA מחרקים אותם אספתם בטבע וזיהיתם (בעזרתו של המורה). את ה-DNA שהפקתם תשוו ל-DNA של חרקים אחרים שידוע שהם הודבקו בוולבכיה. על פי השוואה זו תוכלו לקבוע האם החרקים שאספתם נדבקו בוולבכיה.

בניסוי שתבצעו 3 חלקים.

חלק א: הכרת שיטה להפקת DNA מתאים.

חלק ב: הגברת ה-DNA שהופק באמצעות שיטת PCR.

חלק ג: זיהוי חרקים שנדבקו בוולבכיה באמצעות אלקטרופורזה בג'ל.

חלק א: הכרת שיטה להפקת DNA מתאים

בחלק זה תפיקו DNA גנומי² מתאים של חרקים ותפרידו את ה-DNA משאר מרכיבי התאים. בחרקים שהודבקו בוולבכיה, נמצא DNA של החיידקים ו-DNA של החרקים. הפרדת ה-DNA משאר מרכיבי התאים, תתאפשר הודות להרס הדרגתי של התאים המלווה בפגיעה בקרומיהם ובפירוק החלבונים שבהם.

תמיסת הבופר (Tris-Cl) שתקבלו מכילה גם EDTA וריכוז גבוה של המלח NaCl. לתמיסה זו תוסיפו גם את האנזים **פרוטאינאז K** (סעיף ב). על פי ההוראות בהמשך (סעיפים י-יא) תכתשו את החרקים (או את חלקם) - פעולה שתגרום לפגיעה במבנה הכיטין³. פגיעה זו תאפשר חשיפה של קרומי התאים של החרקים לחומרים שבתמיסת הבופר ולאנזים פרוטאינאז K (אנזים המזרז פירוק חלבונים).

¹ ידועים סוגים שונים של יחסי סימביוזה בין חיידקי וולבכיה לבין האורגניזמים המאכסנים אותם, מטפילות ועד הדדיות הכרחית.

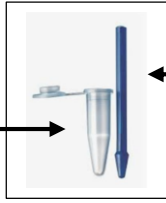
כלל ה-DNA² שבתאים

³ לחרקים יש שלד חיצוני ונוקשה העשוי כיטין

קראו בעיון את ההערות לגבי כל אחד מהפריטים שברשימות.

הערות	ציוד כיתתי
מחמם מבחנות לטמפרטורה הרצויה בדיוק גבוה	בלוק חימום
מכשיר אופטי שלו שתי עיניות, המאפשר להגדיל עצם בדרך כלל עד פי 40. התמונה של העצם המתקבלת היא תלת מימדית.	בינוקולר

כלים וחומרים לקבוצה

הערות	שם הפריט
שמורים באתנול או בהקפאה	5 חרקים (או חלק מהם) שאספתם בקרבת בית הספר
חרק זה ישמש בקרה	זבוב פירות (דרוזופילה) שהודבק בוולבכיה
חרק זה ישמש בקרה	זבוב פירות (דרוזופילה) שידוע שלא הודבק בוולבכיה
	זוג כפפות, חלוק ומשקפי מגן לכל תלמיד
עט לא מחיק	עט דק לסימון ברור על מבחנות
יש לעבוד על פי הוראות הבטיחות ולהשתמש בסקלפל בהשגחת המורה או הבורנט	סקלפל
	פינצטה / מלקטת
המגבונים ישמשו לספיגת שאריות האתנול מהחרקים	מגבונים מסוג kimwipes
	קופסה ובה טיפים עבור מיקרופיפטור של 20-200μL
מיקרופיפטור שמתאים לנפח 20-200μL	מיקרופיפטור
מיועד לטיפים ומבחנות משומשות	כלי פסולת
מבחנת אפנדורף  כותש	7 כותשים למבחנות אפנדורף
כל מבחנה בנפח 1.5 מ"ל	7 מבחנות אפנדורף + כן מתאים
לפני הכתישה תכניסו את המבחנות לכוסיות	3 כוסיות לשימוש חד פעמי

שם הפריט	הערות
7 צלוחיות לשימוש חד פעמי	בצלוחיות תניחו את החרקים ותספגו מהם את שאריות אתנול
מבחנת אפנדורף מסומנת "פרוטאינאז K"	במבחנה 35 מיקרוליטר של תמיסת אנזים
מבחנת אפנדורף מסומנת "בופר"	במבחנה 315 מיקרוליטר של תמיסת בופר

מהלך העבודה

לפני תחילת העבודה קראו בעיון את סעיפים א-יג וודאו שכל ההנחיות בסעיפים אלה ברורות לכם.
מומלץ לסמן V ליד כל סעיף שסיימתם לבצע את ההנחיות הרשומות בו.

- א. סמנו 2 מבחנות אפנדורף בסימונים האלה: W-, W+.
- סמנו 5 מבחנות אפנדורף בסימונים האלה: DNA1, DNA2, DNA5.....
- הניחו את כל המבחנות בקן המבחנות.

- ב. בעזרת מיקרופיפטור, העבירו 35 מיקרוליטר פרוטאינאז K ממבחנת אפנדורף מסומנת "פרוטאינאז K" למבחנת אפנדורף המסומנת "בופר".
- סיגרו היטב את הפקקים של שתי המבחנות.
- ערבבו קלות את הנוזלים במבחנה "בופר".

לידיעתכם:

- **תמיסת בופר** היא תמיסה בה נשמרת דרגת pH קבועה פחות או יותר בעת הוספת כמויות לא גדולות של חומצה או בסיס. הבופר בו תשתמשו מייעל את קצב הפעילות של האנזים פרוטאינאז K.
- **האנזים פרוטאינאז K** מזרז פירוק של רוב החלבונים שבתאים לפפטידים (שרשרות קצרות של חומצות אמיניות) ולחומצות אמיניות בודדות..
- הטמפרטורה האופטימלית לפעילות האנזים פרוטאינאז K היא 60°C.
- בטמפרטורה של 90°C האנזים עובר דנטורציה ופעילותו מופסקת.

- ג. בעזרת מיקרופיפטור העבירו 40 מיקרוליטר מתמיסת הבופר לכל אחת מ-7 המבחנות שסיימתם בסעיף א.

לפניכם **7 חרקים**: 5 חרקים שאספתם בסביבה הקרובה לבית ספרכם, זבוב דרוזופילה **שהודבק** בוולבכיה (W+) וזבוב דרוזופילה **שלא הודבק** בוולבכיה (W-).

ד. סמנו 7 צלוחיות באותם הסימונים שסימנתם בסעיף א: DNA1, DNA2, DNA5....., W-, W+.

- רפדו את הצלוחיות במגבונים.

ה. הניחו אחד מהחרקים שאספתם (או את אברי הרבייה שלו) בצלוחית המסומנת "DNA1".

באופן דומה הניחו את שאר החרקים שאספתם בצלוחיות המתאימות.

ו. אם ברשותכם חרקים שאספתם ושמתם באתנול, ספגו את האתנול בעזרת מגבון.

ז. הניחו את זבוב הדרוזופילה **שלא הודבק** בוולבכיה בצלוחית "W-".

- הניחו את זבוב הדרוזופילה **שהודבק** בוולבכיה בצלוחית "W+".

- השתמשו במגבון וספגו היטב את האתנול בו נשמרו הזבובים.

שימו לב: את ההנחיות בסעיפים ח-ט בצעו ברציפות עם כל אחד מהחרקים בנפרד.

ח. העבירו אחד מהחרקים או את אברי הרבייה שלו למבחנת אפנדורף DNA1 (אין להעביר חתיכה הגדולה מ-2 מ"מ).

ט. חזרו על ההוראות בסעיף ח עם צלחות DNA2, DNA3, DNA5....., W-, W+.

ועם 4 החרקים או אברי הרבייה שלהם.

שימו לב: את ההנחיות בסעיפים י-יא בצעו ברציפות עם כל אחד מהחרקים בנפרד.

י. בקשו מהלבורנט כלי עם קרח. הכניסו קרח לאחת הכוסיות.

- העבירו את מבחנה DNA1 לכוסית.

- השתמשו בכותש, **ובמשך שתי דקות** כתשו היטב את החרק או את חלקי החרק בתוך התמיסה שבמבחנה DNA1. בזמן הכתישה המבחנה צריכה להיות בתוך הקרח.

- פקקו את מבחנה DNA1, העבירו אותה לכן המבחנות והעבירו את הכותש לכלי פסולת.

יא. השתמשו בכותש נקי ובטיפים נקיים וחזרו על ההוראות בסעיף י עם כל אחד מהחרקים המצויים בצלוחיות DNA2 - DNA5, W-, W+ בהתאמה.

יב. העבירו את 7 מבחנות אפנדורף למשך 20 דקות לבלוק החימום שהטמפרטורה בו היא 60°C .
- לאחר 20 דקות, הוציאו את כל המבחנות מבלוק החימום והעבירו אותן לכן המבחנות שברשותכם.

יג. החזירו את 7 מבחנות אפנדורף, לבלוק החימום שהטמפרטורה בו היא 95°C (המורה או הלבורנט
יכונו את הטמפרטורה במכשיר).
- לאחר 10 דקות, הוציאו את כל המבחנות מבלוק החימום והעבירו אותן לכן המבחנות שברשותכם.

יד. בדקו את הסימונים שרשמתם על המבחנות.
אם על אחת המבחנות הסימון אינו ברור, נגבו בזהירות את המבחנה ורשמו עליה שוב את
הסימון.

טו. מסרו ללבורנט את הכן ובו 7 המבחנות.
הלבורנט יאחסן את המבחנות, במקרר עד למחרת, או בתא הקפאה בטמפ' של כ- -20°C עד לביצוע
חלק ב בניסוי.

חלק ב: הגברת ה- DNA שהופק באמצעות שיטת PCR

חלק זה תבצעו הגברה של קטעי DNA ספציפיים מתוך כלל ה- DNA הגנומי שהפקתם מחרקים בחלק הראשון של הניסוי.

השיטה להגברת DNA באמצעות מכשיר PCR מבוססת על היצמדות של תחלים (פריימרים) לקטע DNA הייחודי לחרק ולקטע DNA אחר הייחודי לחיידק הוולבכיה. קטעים אלה ישוכללו מספר רב של פעמים.

אחד מקטעי ה- DNA שתגבירו מקודד לתת היחידה הקטנה במבנה ה- RNA הריבוזומלי (16 S rRNA) שייחודי רק לחיידקי הוולבכיה.

קטע DNA נוסף אותו תגבירו מקודד לחלבון ציטוכרום אוקסידאז (CO1) והוא מצוי במיטוכונדריה. קטע זה ייחודי רק ליצורים אוקריוטים.

מומלץ לקרוא בעיון את הרקע המדעי וההסברים אודות כל אחד מהמרכיבים הדרושים לתהליך ה- PCR בקובץ ["זיהוי גן לעמידות באמצעות PCR ואלקטרופורזה בג'ל – לתלמיד"](#).

כלים וחומרים לקבוצה

לפני שתתחילו לעבוד, קראו בעיון את ההסברים אודות כל אחד מהפריטים שברשימה.

על שולחן המורה	לכל קבוצה על המגש
- מכשיר PCR - טאבלט	- מיקרופיפטור 20 - 200μL - מיקרופיפטור 2 - 20μL - כלי ובו טיפים מתאימים למיקרופיפטורים - עט לרישום על זכוכית המאפשר סימון דק וברור - כלי ובו קרח כתוש 8 מבחנות PCR בעלות דופן דקה + כן מתאים - מבחנת אפנדורף מסומנת "מים" ובה מים ללא נוקליאזות - מבחנת אפנדורף מסומנת "W+" ובה דגימת DNA שהפקתם מחרק - שהודבק בוולבכיה - מבחנת אפנדורף מסומנת "W-" ובה דגימת DNA שהפקתם מחרק שלא הודבק בוולבכיה

	5 מבחנות אפנדורף מסומנות DNA5 – DNA1 ובהן דגימות DNA שהפקתם מחקרים שאספתם בקרבת בית ספר - מבחנת אפנדורף מסומנת DNA6 ובה דגימת DNA של חרק שהודבק בוולבכיה שהפקנו עבורכם (בקרה הבודקת את שיטות העבודה: תהליך ההפקה של ה-DNA ותוכנית העבודה של מכשיר ה-PCR) - מבחנת אפנדורף מסומנת "MIX PRIMER" ובה תערובת של תחלים לגן CO1 ולגן 16S rRNA - מבחנת אפנדורף מסומנת "MIX TAQ" ובה תמיסה של האנזים DNA פולימראז TAQ, תערובת נוקלאוטידים בבופר. - כלי לפסולת
--	---

שימו לב:

במשך כל הניסוי יש לשמור בכלי עם קרח את כל מבחנות האפנדורף: מבחנות עם ה-DNA, תחלים **MIX PRIMER**, אנזים **MIX TAQ**, בופר ומים.

מהלך העבודה:

לפני תחילת הביצוע קראו בעיון את סעיפים א-יא. וודאו שכל ההנחיות בסעיפים אלה ברורות לכם. מומלץ לסמן V ליד כל סעיף שסיימתם לבצע את ההנחיות הרשומות בו.

שלב I: הכנת מבחנות הניסוי

בשלב זה תכניסו למבחנות PCR את כל המרכיבים החיוניים להגברת מקטעי ה-DNA במכשיר ה-PCR.

א. פנו את משטח העבודה שברשותכם. נקו את המשטח ואת כל הציוד הנלווה (מיקרופיפטורים, כן מבחנות, כלי פסולת, כלי לקרח) בעזרת צמר גפן ספוג באתנול 70%.

ב. סמנו 8 מבחנות PCR בסימנים האלה על מכסה המבחנה וגם על צידה: **DNA6, DNA5 - DNA1, W-, W+**. רשמו על המבחנות גם שם או סימן זיהוי בולט לקבוצה.

שימו לב: יש צורך ב-8 מבחנות PCR :

7 מבחנות עבור הפקות DNA שביצעתם בחלק א של הניסוי ומבחנה נוספת **DNA6**.

טבלה 1: מקור ה-DNA שבמבחנות

סימון המבחנות	מקור ה-DNA במבחנה
W+	DNA שהופק מחרק שהודבק בוולבכיה
W-	DNA שהפקתם מחרק בקרה שלא הודבק בוולבכיה
DNA5 - DNA1	DNA שהפקתם מהחרקים שאספתם
DNA6	DNA שהופק עבורכם מחרק שהודבק בוולבכיה

שימו לב: הנפחים של התמיסות בהם תשתמשו קטנים מאוד ולכן עליכם להקפיד על דיוק בעבודה עם המיקרופיפטורים.

ג. העבירו באמצעות פיפטור מתאים (p20) ובו טיפ נקי לכל אחת משמונה מבחנות PCR המסומנות: **W+, W-, DNA6-DNA1** את הנפח של המים הרשום בטבלה 2.

להזכירכם:

- חשוב לוודא שכל המים השתחררו מהטיפ אל התחתית של המבחנה.
- **חשוב להחליף טיפ** אחרי כל העברה של מים למבחנה.
- יש להעביר את הטיפ המשומש לכלי הפסולת.
- יש לסמן V בטבלה בשורה "מים".

ד. החליפו טיפ וחזרו על הוראות סעיף ג עם התערובת MIX TAQ.

- החליפו טיפ וחזרו על הוראות סעיף ג עם התערובת MIX PRIMER.

טבלה 2: נפחים של חומרים (μL) שיש להעביר לכל אחת ממבחנות PCR

נפח (מיקרוליטר)	החומרים
2.5μL	מים נטולי נוקלאזות
12.5μL	MIX TAQ תערובת הכוללת אנזימים, dNTPs, בופרים
8μL	MIX PRIMER תערובת הכוללת את 4 התחלים (הפריימרים)
23μL	נפח כולל של הנוזלים במבחנה

לידיעתכם:

בחלק א של הניסוי השתמשו בתמיסת בופר שהכילה גם ריכוז גבוה מאד של NaCl הגורם להקטנת המסיסות של חלבונים ולשינוי במבנה המרחבי שלהם. הודות לכך החלבונים שקעו במבחנות. בחלק העליון של הנוזל שבמבחנות נמצאות מולקולות DNA.

שימו לב:

בסעיפים ה-ח, עליכם להעביר 2μL מהתמיסות שבמבחנות האפנדורף המסומנות W+, W-, DNA6-DNA1 לכל אחת ממבחנות ה-PCR המתאימה. במבחנות DNA5-DNA1 יש להקפיד ולהוציא ממבחנות האפנדורף את הנוזל שבחלק העליון של המבחנות מבלי להרחיף את המוצקים הנמצאים בתחתית המבחנות. כך הנפח הסופי בכל מבחנות ה-PCR יהיה 25μL.

עשו זאת כך:

ה. החליפו טיפ והעבירו 2μL מהנוזל העליון של התמיסה במבחנת אפנדורף המסומנת W+

למבחנת ה-PCR המסומנת W+ לקבלת נפח סופי של 25μL.

- יש לוודא שכל הנוזל השתחרר מהטיפ אל תחתית מבחנת ה-PCR.

- העבירו את הטיפ לכלי הפסולת.

ו. החליפו טיפ והעבירו 2μL מהנוזל העליון של התמיסה במבחנת אפנדורף המסומנת W-

למבחנת ה-PCR המסומנת W- לקבלת נפח סופי של 25μL.

- יש לוודא שכל הנוזל השתחרר מהטיפ אל תחתית מבחנת ה-PCR.

- העבירו את הטיפ לכלי הפסולת.

ז. החליפו טיפ והעבירו 2μL מהנוזל העליון של התמיסה במבחנת אפנדורף המסומנת DNA1

למבחנת ה-PCR המסומנת DNA1 לקבלת נפח סופי של 25μL.

- יש לוודא שכל הנוזל השתחרר מהטיפ אל תחתית מבחנת ה-PCR.

- העבירו את הטיפ לכלי הפסולת.

ח. חזרו על הוראות סעיף ז עם כל אחת מהמבחנות DNA5 – DNA2.

- החליפו טיפ והעבירו 2μL של התמיסה ממבחנת אפנדורף המסומנת DNA6

למבחנת ה-PCR המסומנת DNA6 לקבלת נפח סופי של 25μL.

- יש לוודא שכל הנוזל השתחרר מהטיפ אל תחתית מבחנת ה-PCR.

- העבירו את הטיפ לכלי הפסולת.

ט. סגרו את כל המבחנות. הקישו בעדינות על תחתית כל מבחנה על מנת לערבב את החומרים שבה.

י. העבירו את כל מבחנות ה-PCR שבכל אחת מהן הנפח הכולל הוא 25µl לכלי ובו קרח כתוש.

שימו לב: בדקו עם המורה את התקדמותכם בשלבי הביצוע עד כה. רק לאחר קבלת האישור מהמורה, בצעו את שלב ו.

שלב ו: הגברה ב-PCR

יא. העבירו את 8 המבחנות אל מכשיר ה-PCR, קראו למורה ובקשו שיפעיל את המכשיר. מכשיר ה-PCR תוכנת על ידי המורה או הלבורנט בהתאם להנחיות שבטבלה 3. שמה של התוכנית "Wolbachia".

טבלה 3: תכנות מכשיר ה-PCR

מספר מחזורים	טמפרטורה (°C)	זמן
1	94	120 שניות
30	94	30 שניות
	49	45 שניות
	68	60 שניות
1	68	600 שניות

יב. פעולת המכשיר תמשך כ-110 דקות. כאשר תכנית ה-PCR תסתיים העבירו את המבחנות מהמכשיר אל כן המבחנות.

שימו לב:

- בדקו את הסימונים שרשמתם על המבחנות. אם על אחת המבחנות הסימון אינו ברור, נגבו בזירות את המבחנה ורשמו עליה שוב את הסימון.
- מסרו ללבורנט את הכן ובו 8 המבחנות.
- הלבורנט יאחסן את המבחנות בקירור עד למחרת, או בהקפאה ללא הגבלת זמן ב-20°C עד לביצוע חלק ג של הניסוי.

בחלק ג של הניסוי תשתמשו בשיטת אלקטרופורזה בג'ל ותזהו את קטעי ה-DNA שהגברתם בעזרת מכשיר ה-PCR.

יג. סדרו את שולחן העבודה.

נקו עם נייר סופג ואתנול את השולחן ואת כל הציוד בו השתמשתם.

חלק ג: זיהוי חרקים שנדבקו בוולבכיה באמצעות אלקטרופורזה בג'ל.

הקדמה

בחלק א של הניסוי הפקתם DNA מחרקים ובחלק ב הגברתם קטעי DNA במכשיר ה-PCR. בחלק ג תשתמשו במכשיר אלקטרופורזה בג'ל ותשוו בין אורכם של קטעי DNA של חרקים שאספתם לבין קטעי DNA של חרק שידוע כי הוא הודבק בוולבכיה (+W). על פי התוצאות שתקבלו תוכלו לקבוע האם דגימות ה- DNA של החרקים שאספתם מכילות גם DNA של וולבכיה.

אחד מקטעי ה-DNA שהגברתם בחלק ב של הניסוי מקודד לחלבון ציטוכרום אוקסידאז⁴ (CO1). **קטע זה הוא חלק מגן הנמצא במיטוכונדריה וייחודי ליצורים אאוקריוטים, וביניהם חרקים.** אורכו של הקטע הוא 708 זוגות בסיסים.

קטע אחר של DNA שהגברתם מקודד לתת היחידה הקטנה במבנה ה-RNA הריבוזומלי (16 S rRNA). בקטע זה יש מוטציה **ייחודית לחיידק הוולבכיה.** אורכו של קטע DNA זה הוא 436 זוגות בסיסים.

לידיעתכם:

כדי שנוכל לזהות את ה-DNA בג'ל נדרשת כמות רבה של DNA וחומר שצובע אותו ששמו SMART GLOW. בזמן הכנת הג'ל הלבורנט הוסיף את חומר הצבע הנקשר בין שני גדילי ה-DNA.

טבלה 1: זיהוי החומרים והכלים הנדרשים לניסוי

לפני שתתחילו לעבוד, קראו בעיון את הפרטים אודות הפריטים שברשימה.

מונח	תיאור הפריט
על שולחן המורה	מכשיר אלקטרופורזה בג'ל
על שולחן המורה	תבנית ובה ג'ל אגרוז
על שולחן המורה	כלי מסומן TAE ובו 140 מ"ל תמיסת בופר TAE
על שולחן המורה	מבחנת אפנדורף המסומנת DNA LADDER
במגש על שולחן העבודה	5 מבחנות PCR, מסומנות DNA5-DNA1

⁴ חלבון המתפקד בתהליך הנשימה התאית

מונח	תיאור הפריט
במגש על שולחן העבודה	מבחנת PCR המסומנת ב W+
במגש על שולחן העבודה	מבחנת PCR המסומנת ב W-
במגש על שולחן העבודה	מבחנת PCR, מסומנות DNA6
במגש על שולחן העבודה	מיקרופיפטור בנפח 20µl-2 + טיפים
במגש על שולחן העבודה	כלי פסולת לטיפים משומשים
במגש על שולחן העבודה	נייר מגבת ובקבוק סגור ופקוק ובו אתנול 70% לחיטוי
במגש על שולחן העבודה	זוג כפפות, חלוק ומשקפי מגן לכל תלמיד

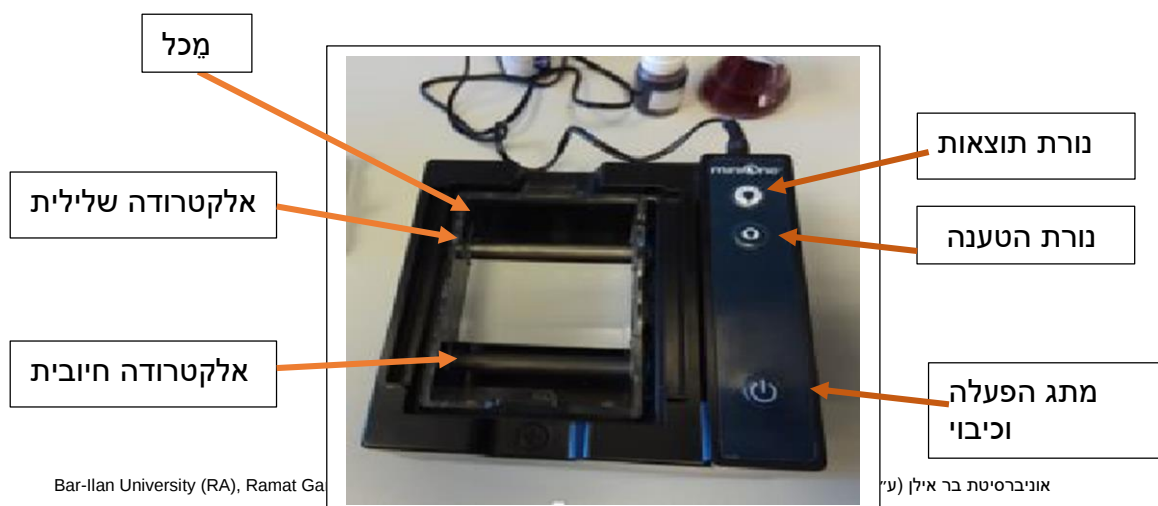
מהלך העבודה:

לפני תחילת הביצוע קראו בעיון את סעיפים א-יב. וודאו שכל ההנחיות בסעיפים אלה ברורות לכם.
מומלץ לסמן V ליד כל סעיף שסיימתם לבצע את ההנחיות הרשומות בו.

שימו לב: בסעיפים א-ב נדרש לווי של הלבורנט

- וודאו שמשטח הפלסטיק התחתון המונח בתחתית המכל שבמכשיר האלקטרופורזה הוא בצבע שחור (כך תוכלו לצפות בתוצאות).
- הניחו את התבנית במקום המתאים במכשיר האלקטרופורזה (תמונה 1).
- העבירו באיטיות את הבופר למכל המכשיר, עשו זאת כך:
 - העבירו את כל תמיסת הבופר מהבקבוק למשורה.
 - באמצעות משורה מזגו את הבופר על פני תבנית הג'ל בצד הקרוב לאלקטרודה החיובית עד שהג'ל יהיה טבול בתמיסה. את יתרת הבופר מזגו בצד הקרוב לאלקטרודה השלילית. כך הנוזל במכל יהיה גבוה רק במעט (1-2 מ"מ) מגובה הג'ל שבתבנית.

תמונה 1: מכשיר אלקטרופורזה בג'ל



Bar-Ilan University (RA), Ramat Ga

אוניברסיטת בר אילן (ע')

שלב I: הטענת הבאריות בדגימות ה-DNA

לרשותכם ג'ל אגרוז ובו 9 באריות. בשלב זה תטעינו בג'ל דגימה של נוזל מכל אחת משמונה המבחנות (DNA1-DNA6, W-, W+).

קראו בעיון את סעיפים ג-ד, וודאו שההנחיות ברורות ורק אז התחילו בביצוע.

ג. עליכם להעביר $10\mu\text{L}$ תמיסה ממבחנת אפנדורף

המסומנת DNA LADDER לבארית המתאימה בג'ל.



תמונה 2:

אופן החזקת המיקרופיפטור

עשו זאת כך:

- כווננו מיקרופיפטור מתאים לנפח של $10\mu\text{L}$ וחברו טיפ מתאים.
- הדליקו את נורת ההטענה במכשיר האלקטרופורזה בג'ל.
- באמצעות מיקרופיפטור שאבו $10\mu\text{L}$ DNA LADDER (מצוי על שולחן המורה).
- החזיקו את המיקרופיפטור מעל לבארית "1" (הראשונה מצד שמאל).
- החזיקו את הטיפ בעדינות לבארית ושחררו את התמיסה אל תוך הבארית. העבירו את הטיפ לכלי הפסולת.

לידיעתכם:

DNA LADDER היא תערובת דגימות של קטעי DNA בעלי גודל ידוע המשמשת לפיענוח גודלם של קטעי ה-DNA הנבדקים.

תזכורת:

- לאחר העברה של כל תמיסה יש להחליף את הטיפ במיקרופיפטור.
- טיפ משומש יש להשליך לכלי הפסולת.

- ד. חזרו על הוראות סעיף ג עם תמיסה במבחנת PCR המסומנת DNA1 ובארית "2".
- באותו אופן העבירו את התמיסות ממבחנות DNA6-DNA2 לבאריות 3, 4, 5, 6, 7 בהתאמה וכן את התמיסות ממבחנות PCR המסומנות W+ ו- W- לבאריות 8 ו-9.

טבלה 2: הסדר שבו הדגימות ממבחנות PCR נטענו בג'ל אגרוז

בארית	9	8	7	6	5	4	3	2	1
סוג הנזל שהוטען	W-	W+	DNA6	DNA5	DNA4	DNA3	DNA2	DNA1	DNA Ladder

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

שלב ו': הרצת דגימות ה- DNA בג'ל

ה. לאחר שקבלתם אישור מהמורה הפעילו את מכשיר האלקטרופורזה באמצעות לחיצה על כפתור ההפעלה.

- חל איסור לפתוח את קופסת המכשיר כל עוד המכשיר פועל ועובר בו זרם חשמלי!**
- את נורת הצפייה בתוצאות (תמונה 1) אפשר להדליק רק לזמן קצר.**
- א. לאחר שהמכשיר פעל במשך 5 דקות שימו לב שאתם מבחינים בהתקדמות ה-DNA בג'ל. אם אינכם רואים את התקדמות הדגימות בג'ל קראו למורה.
 - ב. המשיכו להפעיל את מכשיר הג'ל אלקטרופורזה עד שדגימת הצבע שנעה מהר ביותר תגיע למרחק של שני שלישי מקו הסיום בקצה הג'ל. תהליך זה נמשך כ- 15 דקות.
 - ג. **כבו את המכשיר ואל תסירו את המכסה הכתום**
 - ד. הדליקו את נורת התוצאות (תמונה 1) והסתכלו על הג'ל **מבעד** למכסה.
 - ה. **שימו לב** לנוכחות או להעדר **פסים (bands)** בכל אחד מהטורים.
 - ו. הניחו את המצלמה של הטלפון הנייד על החלון שבחלקו העליון של המכסה הכתום וצלמו את התוצאות שהתקבלו בג'ל. על פי רוב, הפסים הנראים בצילום בולטים יותר בהשוואה למה שנראה בהסתכלות.
 - ז. **כבו את נורת התוצאות והסירו את המכסה כתום.**
 - ח. הוציאו בזהירות את התבנית ובה הג'ל ממכל המכשיר (תמונה 1).
 - ט. בעזרת הלבורנט או המורה הפרידו בעדינות את הג'ל מהתבנית והשליכו את הג'ל לכלי הפסולת.
 - י. **ודאו כי התבנית השקופה בה היה הג'ל נמצאת על המגש.**

- יג. השליכו את המבחנות והכפפות לכלי הפסולת.
- יד. קבלו מהלבורנט נייר סופג ואתנול 70%. נקו את משטח העבודה עליו עבדתם.
רחצו ידיים במים וסבון.

דף איסוף נתונים

הוראות: אחרי שביצעתם את הניסוי על כל שלביו סמנו את התוצאות שהתקבלו בג'ל.



טבלת סיכום תוצאות:

שמות התלמידים בקבוצה	מספר בארית	החומר שהוטען	שם החרק ממנו הופק ה-DNA	תוצאות: DNA המקודד ל- RNA ריבוזומלי של החידק (+/-)	תוצאות: DNA המקודד לאנזים COI של החרק (+/-)
	1	DNA LADDER	----		
	2	DNA1			
	3	DNA2			
	4	DNA3			
	5	DNA4			
	6	DNA5			
	7	DNA6	---		
	8	W+	דרוזופילה		
	9	W-	דרוזופילה		