

תפוצת חיידקי וולבכיה בפרוקי רגליים - ללבורנט 28.3.19

הקדמה

וולבכיה הוא חיידק המקיים יחסי גומלין מסוג סימביוזה¹ עם פרוקי רגליים וביניהם חרקים ממינים רבים. חיידקים אלה מדביקים את הנקבות ומתרבים בתאי הרבייה שלהן. חרקים המודבקים בוולבכיה מוגנים מהדבקה של וירוסים כדוגמת וירוס הזיקה הנפוץ במרכז אמריקה ובדרומה וירוס הדאנגי שהיה נפוץ באוסטרליה. חוקרים מצאו כי במדינות בהן אחוז החרקים המודבקים בוולבכיה הוא גבוה, שיעור התחלואה בקדחת הזיקה הוא נמוך.

בניסוי, התלמידים יפיקו DNA מחרקים שאספו בטבע וישוו אותו ל-DNA של חרקים אשר ידוע שהודבקו בוולבכיה (מסומנים W+) ולחרקים אשר ידוע כי לא הודבקו בוולבכיה (מסומנים W-). על פי השוואה זו התלמידים יוכלו לקבוע האם החרקים שאספו נדבקו בוולבכיה. בניסוי 3 חלקים.

חלק א: הכרת שיטה להפקת DNA מתאים

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

חלק ג: זיהוי חרקים שהודבקו בוולבכיה באמצעות באלקטרופורזה בג'ל.

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. **הערכה כוללת פריטים לכל שלושת החלקים של הניסוי.**

לפני הזמנת הערכה מבר אילן, יש לקרוא בעיון את רשימות הכלים והחומרים הכלולים בערכה (טבלאות 1א, 1ב, 1ג) ואת אלו שיש להכין (טבלאות 2א, 2ב, 2ג) ולבדוק האם יש לכם בבית הספר את כל שנדרש לביצוע הניסוי כגון: טיפים, מבחנות אפנדורף, כוסיות חד פעמיות, חלוקים, משקפי מגן, פחים לפסולת ביולוגית, כפפות, שקיות פלסטיק המתאימות לסילוק פסולת ביולוגית. אם חסרים לכם פריטי ציוד חשוב שתרכשו אותם בהקדם אצל ספקי הציוד למעבדות.

אם אין ברשותכם אוטוקלב יש לדאוג לכלי בגודל מתאים לטיפול בפסולת ביולוגית (בכלי תמיסת אקונומיקה בריכוז 10%).

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

לתשומת לבכם:

- חלק מהפריטים הכלולים בערכה ניתנים בהשאלה לבית הספר, ופריטים אחרים בערכה מיועדים לשימוש בניסוי שיבצעו התלמידים.
- את הפריטים הניתנים בהשאלה יש להחזיר כשהם נקיים ותקינים.
- הנכם מתבקשים לתאם מראש עם הלבורנטיות בצוות בר אילן את מועד קבלת הערכה.
- בעת מסירת הערכה יש לוודא שכל הפריטים הרשומים בטבלאות א1, ב1, ג1 נמסרו לכם.

לתשומת לבכם:

כיום קבלת הערכה אילן יש לחלק את הנוזלים שקיבלתם במבחנות אפנדורף

("מים", "DNA6", "MIX TAQ", "MIX P") ל- 4 מבחנות אותן יש לשמור במקפיא עד ליום ביצוע הניסוי. את

מבחנות ה"מים" ניתן לשמור מחוץ למקרר.

ראו הערות לטבלה ב2 עמוד 14.

נהלי בטיחות בעבודה:

- במהלך ביצוע הניסוי חובה על תלמידים, על הלבורנטים ועל המורים להשתמש בכפפות, חלוק ומשקפי מגן.
 - בעת עבודה עם ציוד חשמלי יש לנקוט משנה זהירות ולהקפיד שסביבת העבודה תהיה יבשה.
 - לפני תחילת העבודה ובסיומה יש להקפיד על רחיצת ידיים וחיטוי השולחנות באלכוהול 70%.
- חשוב לקרוא את כללי הבטיחות וההנחיות [בחוזרי הבטיחות](#) המתפרסמים באתר מפמ"ר ביולוגיה ולעבוד על פי ההנחיות שהתפרסמו בהם ("חוזר מנכ"ל החדש והמעודכן לבטיחות במעבדה מרץ 2015", "הנחיות לשמירה על בטיחות בעבודה במעבדה לביולוגיה", "עבודה במעבדה במיקרוביולוגיה", "הנחיות הבטיחות לעבודה במעבדה 2018").

בטבלאות א1, ב1, ג1 יש רשימות של כל הפריטים שיהיו בערכה שתסופק על ידי המרכז בבר אילן וישמשו לביצוע חלקים א, ב ו-ג של הניסוי.

בטבלאות א2, ב2, ג2 יש מידע על כלים, אביזרים וחומרים הנדרשים לתלמידים לביצוע חלקים א, ב ו-ג של הניסוי. לאחר כל אחת מהטבלאות האלה, יש הערות על הפריטים שסומנו בכוכבית (*).

חלק א: הכרת שיטה להפקת DNA מתאים

בחלק זה התלמידים יפיקו DNA גנומי² מתאים של חרקים ויפרידו אותו משאר מרכיבי התאים. בחרקים שהודבקו בוולבכיה, נמצא DNA של החיידקים ו-DNA של החרקים. הפרדת ה-DNA תתאפשר אודות להרס הדרגתי של התאים המלווה בפגיעה בקרומיהם ובפירוק החלבונים שבהם.

על פי ההוראות התלמידים יכתשו 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).

אם החרק הנבדק הודבק בוולבכיה, בתום תהליך ההפקה יתקבל DNA של החרק ו-DNA של החיידק.

למידע נוסף לגבי שיטת הפקת ה-DNA, ראו בקובץ "תפוצת חיידקי וולבכיה בפרוקי רגלים- למורה".

הפקת DNA בדרך המתוארת בדפי העבודה לתלמיד פשוטה מאוד אך ה-DNA שיתקבל אינו מספיק נקי לצורך פעולות נוספות בביולוגיה מולקולרית כגון ריצוף DNA. בניסויים בהם מפיקים DNA לריצוף, יש להשתמש בפרוטוקול הפקת DNA בעזרת קולונות.

שימו לב:

- הבופר שבערכה הוא Tris-Cl והוא מכיל גם EDTA ו-NaCl בריכוזים הנדרשים להפקת ה-DNA. התלמידים יוסיפו לבופר את האנזים פרוטאינאז K.
- חשוב מאד להקפיד על תנאי האחסון של החומרים בזמן ההכנה של חלק א של הניסוי (ראו ההנחיות שבטבלה א1) ובמהלך הניסוי (כמפורט בדפי העבודה לתלמידים).
- בתום ביצוע חלק א ניתן לאחסן כל דגימה של DNA במבחנת אפנדורף פקוקה. את המבחנה יש לשמור עד ליום המחרת במקרר או עד לביצוע תהליך ההגברה ב-PCR (חלק ב של הניסוי) בתא הקפאה של המקרר בטמפ' של -20°C .

² כלל ה-DNA שבתאים.

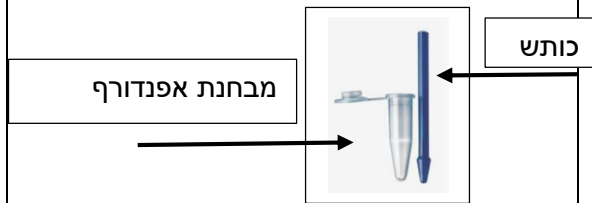
³ לחרקים יש שלד חיצוני ונוקשה העשוי כיטין.

טבלה א1: פריטים בערכה שתסופק על ידי המרכז לפיתוח ותמיכה

וישמשו להכנת חומרים לתלמידים לביצוע חלק א של הניסוי.

ציוד וחומרים אלו מיועדים ל- 4 קבוצות של תלמידים ובכל קבוצה 2-3 תלמידים.

מס' פריט	כלים וחומרים (ראו פרוט בטבלה א2)	פריט	תנאי אחסון
I	בלוק חימום	בהשאלה	-
II	מבחנה ובה זבובי פירות (דרוזפילה) מודבקים בחיידקי וולבכיה (W+)	לשימוש במעבדה	שמירה באתנול 95%
III	מבחנה ובה זבובי פירות (דרוזפילה) שאינם מודבקים בחיידקי וולבכיה (W-)	לשימוש במעבדה	שמירה באתנול 95%
IV	מגבונים מסוג kimwipes	לשימוש במעבדה	-
V	מיקרופיפטורים: לטווח של 200 μ L-200 (P200) לטווח 100-1000 μ L (P1000)	בהשאלה	-
VI	10 כותשים למבחנות אפנדורף	לשימוש במעבדה	מיועד לשימוש רב פעמי. לאחר כל שימוש יש להשרות 10 דקות בתמיסת אקונומיקה ⁴ ,
VII	מבחנת אפנדורף מסומנת "פרוטאינאז K" במבחנה 160 μ L פרוטאינאז K	לשימוש במעבדה	במקרר
VIII	מבחנת אפנדורף מסומנת "בופר" במבחנה 1000 μ L תמיסת בופר	לשימוש במעבדה	במקרר
IX	קופסה לאחסון טיפים עבור מיקרופיפטור בנפח 20-200 μ L	בהשאלה	---



⁴ ראו הנחיות בעבודה במעבדה למיקרוביולוגיה

טבלה א2: מידע על ציוד וחומרים הנדרשים לתלמידים לביצוע חלק א של

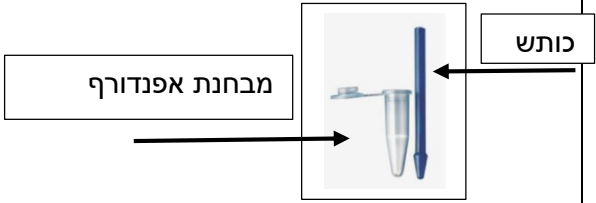
הניסוי .

ציוד וחומרים אלו מיועדים ל- 4 קבוצות של תלמידים ובכל קבוצה 2-3 תלמידים.

כל קבוצת תלמידים מפיקה DNA מ- 7 חרקים.

לפריטים המסומנים בכוכבית (*) יש פירוט ברשימת ההערות.

מס' פריט	שם הפריט	מקור הפריט	יונח על שולחן
1	בלוק חימום	בר אילן, פריט I	מורה
2*	שקית ובה מגבונים מהסוג kimwipes 1 מגבון לכל קבוצה	בר אילן, פריט IV	מורה
3*	בינוקולר	ציוד מעבדה	מורה
4	מיקרופיפטור בנפח 20-200 μ L	בר אילן, פריט V	תלמיד
5	קופסה לאחסון טיפים עבור מיקרופיפטור בנפח 20-200 μ L	בר אילן, פריט IX	תלמיד
6*	מבחנת אפנדורף מסומנת "בופר" במבחנה 250 μ L בופר	בר אילן, פריט VIII	תלמיד
7*	מבחנת אפנדורף מסומנת "פרוטאינאז K" במבחנה 40 μ L פרוטאינאז K	בר אילן, פריט VII	תלמיד
8*	קרח כתוש בכוס		תלמיד
9*	3 כוסיות לשימוש חד פעמי	ציוד מעבדה	תלמיד
10*	5 מבחנות עם פקק או כלים עם מכסה מסומנים DNA5 – DNA1 (בכל אחד מהכלים חרק אחר שנאסף על ידי קבוצת תלמידים בקרבת בית הספר)	אחריות התלמידים	תלמיד
11*	מבחנת אפנדורף מסומנת W+ ובה זבוב פירות (דרוזופילה) שידוע שהוא הודבק בחיידקי וולבכיה	בר אילן, פריט II	תלמיד
12*	מבחנת אפנדורף מסומנת W- ובה זבוב פירות (דרוזופילה) שידוע שהוא לא הודבק בחיידקי וולבכיה	בר אילן, פריט III	תלמיד

מס' פריט	שם הפריט	מקור הפריט	יונח על שולחן
13*	כלי מסומן "פסולת"	ציוד מעבדה	תלמיד
14*	7 כותשים רב פעמיים למבחנות אפנדורף 	בר אילן, פריט VI	תלמיד
15	25 מבחנות אפנדורף בנפח של 1.5 מ"ל כל אחת וכן למבחנות אפנדורף	ציוד מעבדה	תלמיד
16	משקפי מגן לכל תלמיד	ציוד מעבדה	תלמיד
17	זוג כפפות לכל תלמיד	ציוד מעבדה	תלמיד
18	חלוק לעבודה במעבדה לכל תלמיד	ציוד מעבדה	תלמיד
19	עט דק לסימון בצבע כהה על מבחנות	ציוד מעבדה	תלמיד
20*	סקלפל ⁵	ציוד מעבדה	תלמיד
21	פינצטה / מלקטת	ציוד מעבדה	תלמיד
22	7 צלוחיות קטנות צלוחיות בקוטר כ- 6-10 ס"מ. אפשר להשתמש בצלחות פטרי מפלסטיק, קטנות או גדולות או בצלחות לשימוש חד פעמי (בהתאם לגודל החרק)	ציוד מעבדה	תלמיד
23	נייר מגבת ובקבוק פקוק ובו אלכוהול 70% בתחילת העבודה ובסופה התלמידים יחטאו את משטח העבודה שלהם וימתינו לייבוש המשטח. *לפני כל שימוש בכוהל יש לוודא כי אין אש דולקת בחדר המעבדה.	ציוד מעבדה	שולחן המורה

⁵ יש לאפשר לתלמידים לעבוד עם סקלפל רק בהשגחת מורה או לבורנט.

הערות לפריטים מטבלה 2 שסומנו ב *

פריט 2: מגבון אחד מסוג kimwipes לכל קבוצה.
המגבונים ישמשו לספיגת שאריות האתנול מהחרקים. יש לחתוך כל מגבון ל- 4 ריבועים.

פריט 3: בינוקולר
בשיעורי ההכנה המורה ידריך את התלמידים שאספו חרקים הגדולים מ-2 מ"מ כיצד להפריד את אברי הרבייה מגופם של החרקים תוך כדי שימוש בסקלפל, פינצטה (פריטים 20, 21) ובינוקולר.
לתשומת לבכם: יש לקרוא הוראות בטיחות לעבודה עם סקלפל ולבצע פעולה זו בהשגחת מורה או לבורנט.

פריט 6: מבחנת אפנדורף מסומנת "בופר"
באמצעות עט לסימון על זכוכית רשמו " בופר" על כל אחת מ- 4 מבחנות אפנדורף.
העבירו לכל מבחנה $250 \mu\text{L}$ בופר ממבחנת אפנדורף "בופר" שבערכה.

פריט 7: מבחנת אפנדורף מסומנת "פרוטאינאז K"
באמצעות עט לסימון על זכוכית רשמו "פרוטאינאז K" על כל אחת מ- 4 מבחנות אפנדורף.
העבירו לכל מבחנה $40 \mu\text{L}$ אנזים פרוטאינאז K ממבחנת אפנדורף "פרוטאינאז K" שבערכה.

פריט 8: קרח כתוש בכוס
הכינו 4 כוסות גדולות העשויות קרטון ומיועדות לשימוש חד פעמי. על פי בקשת התלמידים הכניסו קרח כתוש לכל כוס. מכוס זו התלמידים יעבירו קרח לכוסיות הקטנות שברשותם (פריט 9).
הכנת קרח כתוש:
בתחנות דלק או במרכזים ניתן לקנות שקית גדולה ובה קוביות קרח.
יום לפני ביצוע הניסוי הכניסו קוביות קרח לשקית עבה של ניילון וסגרו את השקית.
- השתמשו בפטיש רגיל או בפטיש להכנת שניצלים ורסקו היטב את קוביות הקרח. העבירו במהירות את הקרח הכתוש לקערה / לשקית ניילון והכניסו לתא ההקפאה.
- אחרי זמן קצר טלטלו את הקערה / שקית כדי שחתיכות הקרח שאולי הופשרו מעט תהיינה מפורדות. שמרו את הקרח הכתוש בתא ההקפאה.
- חשוב שיהיה לכם עודף קרח כתוש בתא ההקפאה כדי שאפשר יהיה להוסיף לתלמידים במהלך העבודה.



פריט 9: שלוש כוסיות לשימוש חד פעמי

ניתן להשתמש בכוסיות חד פעמיות לשתייה חריפה (ראו תמונה).
הערה: התלמידים יעבירו כמות מתאימה של קרח מהכוס שקיבלו אל הכוסית, יכניסו מבחנת אפנדורף לתוך הקרח שבכוסית ויכתשו את החרקים.

פריט 10: חמש מבחנות עם פקק או כלים קטנים עם מכסה מסומנים DNA5 – DNA1 .

בכל כלי או מבחנה ישמר חרק שנאסף על-ידי קבוצת התלמידים בקרבת בית הספר.
התלמידים יקבלו הנחיות מהמורה על אופן איסוף החרקים והטיפול בהם.

פריט 11: מבחנת אפנדורף מסומנת W+

מבחנה ובה זבוב פירות דרוזופילה שהודבק בוולבכיה.
באמצעות עט לסימון על זכוכית רשמו "W+" על כל אחת מ- 4 מבחנות אפנדורף.
העבירו זבוב אחד מודבק בחיידק הוולבכיה מהערכה לכל אחת מהמבחנות המסומנות "W+".

פריט 12: מבחנת אפנדורף מסומנת W-

מבחנה ובה זבוב פירות דרוזופילה שלא הודבק בוולבכיה.
באמצעות עט לסימון על זכוכית רשמו "W-" על כל אחת מ- 4 מבחנות אפנדורף.
העבירו זבוב אחד מודבק בחיידק הוולבכיה מהערכה לכל אחת מהמבחנות המסומנות "W-".

פריט 13: כלי מסומן "פסולת"

כוס כימית או כלי אחר בגודל 250-400 מ"ל שמיועד להנחת כלים משומשים.
התלמידים יניחו בכלי את כל הכלים שבאו במגע עם החומר הביולוגי כגון: טיפים, כפפות, מבחנות אפנדורף.

פריט 14: כותשים למבחנות אפנדורף

רצוי 7 כותשים בצבעים שונים.
חשוב להסב את תשומת לב התלמידים שבכותשים יעשה שימוש רב פעמי ולכן בתום הניסוי **אין לזרוק אותם!!** התלמידים יעבירו את הכותשים המשומשים לכלי הפסולת.
בסיום חלק א של הניסוי, העבירו את הכותשים שבכלי הפסולת לכלי ובו תמיסת אקונומיקה 10% למשך לפחות 10 דקות ואחר כך שטפו אותם במים.

פריט 20: סקלפל

בעת השימוש בסקלפל יש להחזיק את החרק עם פינצטה ולא עם היד.
עדיף להשתמש עם מכסה / נדן ולסגור את הסקלפל בתום השימוש. אם אין נדן לסקלפל יש להעמידו
בתוך מבחנה כאשר הלהב כלפי מטה. אין להשתמש בסקלפל שימוש חוזר. בתום השימוש רצוי
לזרוק לפח פסולת חדה או לכסות את הסכין באמצעות נייר עבר ולהשליכו לפח אשפה רגיל.
אם אין ברשותכם סקלפל תוכלו להשתמש בסכין עם להב עשוי מתכת וחד.

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

בחלק זה תבוצע הגברה של קטעי DNA ספציפיים מתוך כלל ה- DNA הגנומי שהופק מחרקים בחלק א של הניסוי. באמצעות מכשיר ה- PCR יוגבר קטע של DNA ייחודי לחרק וקטע אחר של DNA ייחודי לחיידק הוולבכיה.

מידע חשוב על העקרונות שעליהם מבוססת שיטת ה- PCR והערות לגבי הפעלת מכשיר ה- PCR ניתן לקרוא בקובץ ["זיהוי גן לעמידות באמצעות PCR ואלקטרופורזה בג'ל"](#).

לתשומת לבכם: בתום תהליך ההגברה במכשיר ה-PCR ניתן לאחסן עד ליום המחרת את מבחנות ה-PCR במקרר או לשמור בתא ההקפאה של מקרר בטמפ' של -20°C עד לביצוע חלק ג.

טבלה ב1: פריטים בערכה שתסופק על ידי המרכז לפיתוח ותמיכה וישמשו

להכנת חומרים לתלמידים לביצוע חלק ב של הניסוי.

ציוד וחומרים אלו מיועדים ל- 4 קבוצות של תלמידים וכל קבוצה 2-3 תלמידים.

מס' פריט	כלים וחומרים (ראו פרוט בטבלה ב2)	פריט	תנאי אחסון
I	MINIONE -PCR	בהשאלה	
II	טאבלט MINIONE	בהשאלה	
III	מבחנת אפנדורף המסומנת "DNA6" במבחנה $15\mu\text{L}$ דגימת DNA שהופק עבורכם מוולבכיה	ערכה	לשמור במקפיא עד לשימוש
IV	מבחנת אפנדורף המסומנת "MIX P" במבחנה $360\mu\text{L}$ תערובת פריימרים (תחלים) המכילה פריימר קדמי ופריימר אחורי לכל אחד מהגנים שיעברו הגברה במכשיר ה- PCR התערובת מכילה את הפריימרים האלה: Wspec-F primer ($5\mu\text{M}$) Wspec-R primer ($5\mu\text{M}$) CO1-F primer ($5\mu\text{M}$) CO1-R primer ($5\mu\text{M}$)	ערכה	לשמור במקפיא עד לשימוש

מס' פריט	כלים וחומרים (ראו פרוט בטבלה ב2)	פריט	תנאי אחסון
V	מבחנה אפנדורף המסומנת כ-"MIX TAQ" במבחנה 420μL תערובת של DNA פולימראז (TAQ), בופר ונוקלאוטידים (dNTPS).	ערכה	לשמור במקפיא עד לשימוש
VI	מבחנת אפנדורף I המסומנת "מים" מבחנה בה 100μL מים נטולי נוקליאזות.	ערכה	טמפ' החדר
VII	כן למבחנות אפנדורף	בהשאלה	
VIII	מבחנות PCR דקות דופן 40 מבחנות PCR בנפח 0.2 מ"ל כל אחת	ערכה	
IX	כן למבחנות PCR	בהשאלה	
X	קופסה לטיפים	בהשאלה	
XI	מיקרופיטור	בהשאלה	

טבלה ב2: מידע על רשימות הכלים, ציוד וחומרים הנדרשים לתלמידים לביצוע חלק א של הניסוי .

ציוד וחומרים אלו מיועדים ל- 4 קבוצות של תלמידים ובכל קבוצה 2-3 תלמידים.

כל קבוצת תלמידים מגבירה DNA מ- 7 חרקים ו-DNA שהתקבל בערכה של בר אילן (DNA6 פריט III טבלה ב1).

לפריטים המסומנים בכוכבית (*) יש פירוט ברשימת ההערות.

מס' פריט	שם הפריט	מקור הפריט	יונה על שולחן
1	MINIONE -PCR	בר אילן, פריט I	מורה
2	טאבלט MINIONE יש להטעין את תוכנית ההגברה ע"פ הנחיות	בר אילן, פריט II	מורה
3	מבחנת אפנדורף המסומנת "W+ " מבחנה ובה דגימת DNA שהתלמידים הפיקו בחלק א מדרוזפילה שהודבקה בוולבכיה	חלק א של הניסוי	תלמיד

מס' פריט	שם הפריט	מקור הפריט	יונח על שולחן
4	מבחנת אפנדורף המסומנת "W-" מבחנה ובה דגימת DNA שהתלמידים הפיקו בחלק א מדרוזופילה שלא הודבקה בוולבכיה	חלק א של הניסוי	תלמיד
5	5 מבחנות אפנדורף מסומנות "DNA5 - DNA1" מבחנות ובהן דגימות DNA שהתלמידים הפיקו בחלק א, מחרקים אותם אספו בחצר בית הספר	חלק א של הניסוי	תלמיד
6*	מבחנת אפנדורף מסומנת "DNA 6" מבחנה ובה דגימת DNA של חרק המודבק בוולבכיה שהופק עבור התלמידים	בר אילן, פריט III	תלמיד
7*	מבחנת המסומנת "MIX P" מבחנה ובה תערובת של תחלים תחל קדמי ותחל אחורי לכל אחד משני הגנים שיעברו הגברה במכשיר ה-PCR.	בר אילן, פריט IV	תלמיד
8*	מבחנה המסומנת "MIX TAQ" מבחנה המכילה תערובת של DNA פולימראז (Taq), בופר ונוקלאוטידים (dNTPS) יש לשמור בקרח על מגש התלמיד.	בר אילן, פריט V	תלמיד
9*	מבחנת אפנדורף מסומנת "מים" מבחנה ובה מים נטולי נוקליאזות	בר אילן, פריט VI	תלמיד
10	8 מבחנות PCR דקות דופן	בר אילן, פריט VIII	תלמיד
12	כן למבחנות PCR	בר אילן, פריט VII	תלמיד
13	כן למבחנות אפנדורף	בר אילן, פריט VII	תלמיד
14	קופסה ובה טיפים למיקרופיפטור בנפח 200 μ L - 2 μ L	בר אילן, פריט X	תלמיד
15	מיקרופיפטור 20 μ L - 200 μ L מיקרופיפטור 200 μ L - 20 μ L	בר אילן, פריט XI	תלמיד
16*	קרח כתוש בכוס	-	תלמיד
17*	כלי בנפח כ- 500 - 400 מ"ל המסומן "כלי פסולת"	ציוד מעבדה	תלמיד
18	עט לרישום על זכוכית המאפשר סימון דק ובולט	ציוד מעבדה	תלמיד

מס' פריט	שם הפריט	מקור הפריט	יונח על שולחן
19	משקפי מגן לכל תלמיד	ציוד מעבדה	תלמיד
20	זוג כפפות לטקס לכל תלמיד	ציוד מעבדה	תלמיד
21	חלוק מעבדה לכל תלמיד	ציוד מעבדה	תלמיד
22	נייר מגבת ובקבוק פקוק ובו אלכוהול 70% בתחילת העבודה ובסופה התלמידים יחטאו את משטח העבודה שלהם וימתינו לייבוש המשטח. *לפני כל שימוש בכוהל יש לוודא כי אין אש דולקת בחדר המעבדה.	ציוד מעבדה	שולחן המורה

הערות לפריטים מטבלה ב2 שסומנו *

להלכירכט, עט קבלת הצרכה מבר אילן התבקשתם לחלק כל אחד מהנוגזים
4-4 מבחנות אפנדורף על פי ההצרות בפריטים 6-9.

פריט 6: מבחנת אפנדורף מסומנת "DNA6"

רשמו "DNA6" על כל אחת מ- 4 מבחנות אפנדורף.

העבירו לכל מבחנה נפח של כ- 5µl נוזל ממבחנת האפנדורף המסומנת "DNA6" שהתקבלה בערכה מבר אילן.

פריט 7: מבחנת המסומנת "MIX P"

רשמו "MIX P" על כל אחת מ- 4 מבחנות האפנדורף.

העבירו לכל מבחנה נפח של כ- 90µl נוזל ממבחנת האפנדורף המסומנת MIX P שהתקבלה בערכה של בר אילן.

פריט 8: מבחנת המסומנת "MIX TAQ"

באמצעות עט לסימון על זכוכית רשמו "MIX TAQ" על כל אחת מ- 4 מבחנות האפנדורף.

העבירו לכל מבחנה נפח של כ- 100µl נוזל ממבחנת האפנדורף המסומנת MIX TAQ שהתקבלה בערכה של בר אילן.

פריט 9: מבחנת המסומנת "מים"

באמצעות עט לסימון על זכוכית רשמו "מים" על כל אחת מ- 4 מבחנות האפנדורף.
העבירו לכל מבחנה נפח של כ 25 µl נוזל ממבחנת האפנדורף המסומנת ב-"מים" שהתקבלה
בערכה של בר אילן.

פריט 16: קרח כתוש בכוס

ראו הערות לפריטים מטבלה 2 הסבר לפריט 8

פריט 17: כלי מסומן "פסולת":

ראו הערות לפריטים מטבלה 2 הסבר לפריט 13

יש להקפיד על כך ש:

1. לפני תחילת הניסוי כל הציוד והחומרים נמצא על המגש בהתאם לרשימת החומרים.
2. במשך הניסוי מבחנות האפנדורף: "MIX P", "MIX TAQ", DNA6, DNA5 - DNA1, W-, W+ יהיו בקרח. ניתן להפשיר את הנוזלים במבחנות על ידי החזקה שלהם בכף יד קמוצה במשך כדקה. בתום השימוש יש להחזיר לקרח.
3. התלמידים ישתמשו בטיפ חדש בכל מעבר מחומר אחד לאחר.

חלק ג: זיהוי החרקים שהודבקו בוולבכיה באמצעות אלקטרופורזה בג'ל

בחלק הראשון של הניסוי התלמידים הפיקו DNA מתאי החרקים, בהמשך, בחלק השני של הניסוי – הגבירו את DNA במכשיר ה-PCR. בחלק זה התלמידים ישתמשו בשיטת האלקטרופורזה בג'ל כדי לקבוע האם דגימות ה-DNA שהפיקו מהחרקים מכילות בנוסף ל-DNA של החרק גם DNA של חיידק הוולבכיה.

עד לביצוע הניסוי:

- מומלץ להכין במגשים את כל הציוד והחומרים שאינם מצריכים קירור.
- שמרו את פריטים 7-8 בתא ההקפאה.

בבוקר הניסוי:

יש להכין תבנית ובה ג'ל אגרוז על פי ההוראות בפריט 2. עד לשימוש תאחסנו את התבנית בטמפרטורת החדר ובחושך.

בתחילת הניסוי:

- העבירו את פריט 7 מתא ההקפאה לאחד מהכלים עם הקרח (פריט 13).
- העבירו את פריט 8 מתא ההקפאה לכלי אחר עם קרח (פריט 13).

טבלה ג' 1 בעמ' 16

טבלה ג'1: פריטים בערכה שתסופק על ידי המרכז לפיתוח ותמיכה וישמשו להכנת חומרים לתלמידים לביצוע חלק ג של הניסוי.

ציוד וחומרים אלו מיועדים ל- 4 קבוצות של תלמידים ובכל קבוצה 2-3 תלמידים.

מספר פריט	כלים וחומרים (ראו פרוט בטבלה ג2)	פריט	תנאי אחסון
I	אלקטרופורזה בג'ל MINIONE המכשיר כולל קופסה, 2 תבניות ו-2 מסרקים והנחיות בעברית להפעלת המכשיר	בהשאלה	
II	תמיסת בופר TAE להכנת כל ג'ל נדרשים 25 מ"ל בופר למכשיר האלקטרופורזה – נדרשים 125 מ"ל בופר	ערכה	מקרר
III	מבחנת אפנדורף מסומנת "SM" במבחנה 15 µL צבע SMART GLOW	ערכה	מקרר
IV	4 קופסאות קטנות מסומנות "אגרוז" בכל קופסה 0.5 גרם אבקת אגרוז	ערכה	טמפרטורת החדר
V	כן למבחנות PCR	בהשאלה	
VI	מבחנת אפנדורף מסומנת "DNA LADDER" במבחנה 80 µL DNA LADDER מבחנה ובה דגימות DNA ובריכוז 50 µg/mL	ערכה	לשמור במקפיא עד לשימוש
VII	קופסה ובה טיפים למיקרופיפטור בנפח 2-20 µL	בהשאלה	
VIII	מיקרופיפטור בנפח 2-20 µL	בהשאלה	

טבלה ג2: מידע על רשימות הכלים, ציוד וחומרים הנדרשים לתלמידים לביצוע חלק ג של הניסוי .

ציוד וחומרים אלו מיועדים ל- 4 קבוצות של תלמידים ובכל קבוצה 2-3 תלמידים.

כל קבוצת תלמידים מטעינה בג'ל DNA מ- 7 חרקים, DNA שהתקבל בערכה של בר אילן
ו-DNA LADDER .

לפריטים המסומנים בכוכבית (*) יש פירוט ברשימת ההערות.

מס'	שם הפריט ומידע על הפריט	מקור הפריט	יונה על שולחן
1	אלקטרופורזה בג'ל MINIONE המכשיר כולל קופסה, 2 תבניות ו-2 מסרקים והנחיות בעברית להפעלת המכשיר	בר אילן, פריט I	מורה
2*	תבנית ובה ג'ל אגרוז את הג'ל יש להכין מפריטים 3-5	בר אילן	מורה
3*	תמיסת בופר TAE להכנת כל ג'ל נדרשים 25 מ"ל בופר למכשיר האלקטרופורזה – נדרשים 125 מ"ל בופר	בר אילן, פריט II	לבורנט ומורה
4	מבחנת אפנדורף מסומנת "SM" במבחנה 15 µL צבע SMART GLOW	בר אילן, פריט III	לבורנט
5	4 קופסאות קטנות מסומנות "אגרוז" בכל קופסה 0.5 גרם אבקת אגרוז	בר אילן, פריט IV	לבורנט
6	כן למבחנות PCR	בר אילן	תלמיד
7	5 מבחנות PCR מסומנות בשם של כל אחת מהקבוצות מבחנות PCR (W-, W+, DNA1-DNA6) משלב הגברה ב- PCR לכוס עם קרח כתוש יש לשמור בכלי עם קרח על שולחן התלמיד	מסיום עבודה בחלק ב	תלמיד
8	מבחנת אפנדורף מסומנת "DNA LADDER" במבחנה-80 µL DNA LADDE מבחנה ובה דגימות DNA בריקוז 50 µg/mL יש לשמור בכלי עם קרח על שולחן המורה	בר אילן, פריט VI	מורה

מס'	שם הפרויט ומידע על הפרויט	מקור הפרויט	יונח על שולחן
9	משורה בנפח 200 מ"ל	ציוד מעבדה	מורה
10	קופסה ובה טיפים למיקרופיטור בנפח 2-20 µL	בר אילן, פריט VII	תלמיד
11	מיקרופיטור בנפח 2-20 µL	בר אילן, פריט VIII	תלמיד
12	עט לרישום על זכוכית המאפשר סימון דק ובולט	ציוד מעבדה	תלמיד
13*	קרח כתוש בשני כלים המסומנים "כלי לקרח"	-----	תלמיד
14*	כלי בנפח כ- 400-500 מ"ל המסומן "כלי פסולת"	ציוד מעבדה	תלמיד
15	משקפי מגן, משקפיים לכל תלמיד	ציוד מעבדה	תלמיד
16	כפפות לטקס, זוג לכל תלמיד	ציוד מעבדה	תלמיד
17	חלוק לעבודה במעבדה לכל תלמיד	ציוד מעבדה	תלמיד
18	נייר מגבת ובקבוק פקוק ובו אתנול 70% בתחילת העבודה ובסופה התלמידים יחטאו את משטח העבודה שלהם וימתינו לייבוש המשטח. *לפני כל שימוש באתנול יש לוודא כי אין אש דולקת בחדר המעבדה.	ציוד מעבדה	מורה

הערות לפריטים מהרשימה שסומנו ב *

פריט 2: תבנית ובה ג'ל אגרוז

להכנת פריט זה תשתמשו בפריטים האלה: אבקת אגרוז, תמיסת בופר TAE

וצבע SMART GLOW שסופקו בערכה ע"י המרכז בבר אילן.

הוראות הכנה של מגש אחד של ג'ל אגרוז 1% המכיל שתי תבניות:

א. הכניסו 0.5 גרם אבקת האגרוז לארלמאייר בנפח 100 מ"ל והוסיפו 50 מ"ל בופר TAE.

ב. הכניסו את הארלמאייר למיקרוגל למשך זמן של 20-30 שניות.

חזרו על פעולה זו עד להמסת הג'ל וקבלת תמיסה צלולה. היעזרו בכפפות מתאימות (לכלים חמים),

הוציאו את הארלמאייר והניחו במקום חסין לחום כדי שיתקרר.

זהירות! בזמן הרתיחה לא ניתן להבחין בבוועות אגרוז שנשפך על היד מתקרר על היד ועלול לגרום

לכוויה חמורה.

ג. המתינו כחמש עד שבע דקות עד לקרור האגרוז מבלי שתתקרב (ניתן להכניס מד חום ולהמתין עד

שהתמיסה תתקרר לטמפרטורה של 50°C).

ד. הוסיפו נפח של 3 μL SMART GLOW לארלמאייר וערבבו בעדינות בתנועות סיבוביות.

היאמצו מלאף את האדיט של ה'א'.

הערה:

מומלץ להכניס את המבחנה שבה יש SMART GLOW למיניצנטריפוגה לפני ההוספה לג'ל אגרוז

וכך כל הנוזל יהיה בתחתית המבחנה. אם אין ברשותכם מיניצנטריפוגה, ניתן להקיש בעדינות על

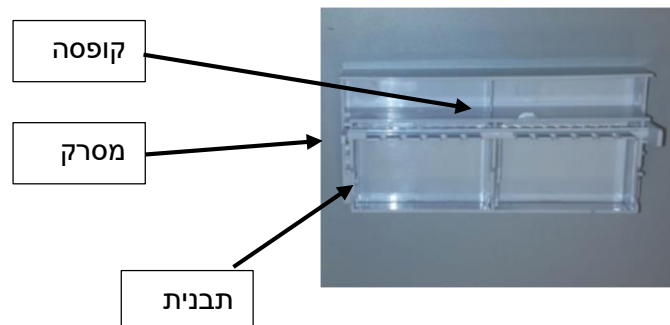
המבחנה כדי לוודא כי כל הנוזלים נמצאים בבסיס המבחנה.

- מזגו כ- 25 מ"ל אגרוז לכל אחת מתבניות הג'ל.

ה. הכניסו את המסרק שבו 9 שיניים לכל תבנית בקצה העליון והמתינו עד לקרישת הג'ל

(כ- 10 דקות, תלוי בטמפרטורת החדר). (תמונה 1)

- רק כאשר הג'ל נקשר ניתן להוציא את המסרק בעדינות.



תמונה 1. קופסה ובה שתי תבניות שאליהן יש לשפוך את ג'ל אגרוז

לתשומת לבכם:

- הצבע **SMARG GLOW** שהוספנו לג'ל הוא רגיש לאור ולכן עד לשימוש יש להניח את תבניות הג'ל במקום חשוך.
- יש להוציא את תבנית הג'ל מהקופסה ולנגב במגבת נייר את שאריות האגרוז שבתחתית התבנית. פעולה זו חיונית כדי למנוע בעתיד היווצרות של בועיות אוויר במכשיר האלקטרופורזה בג'ל.
- מיד בתום השימוש יש לשטוף את הכלי שבו הכנתם את האגרוז כדי למנוע מצב שבו ושאריות האגרוז ייקרשו בכלי ויקשו על ניקיונו.

יש להקפיד על כך ש:

1. לפני תחילת הניסוי כל הציוד והחומרים נמצאים על המגש בהתאם לרשימות.
2. במשך הניסוי מבחנות ה-PCR: **DNA1 - DNA6**, **W+**, **-W** ומבחנת סולם ה-DNA (**DNA LADDER**) יהיו בקרח. ניתן להפשיר את הנוזלים במבחנות על ידי החזקה שלהם בכף יד קמוצה לבמשך כדקה. בתום השימוש יש להחזיר לקרח.
3. התלמידים ישתמשו בטיפ חדש בכל מעבר מחומר אחד לאחר.

פריט 3: תמיסת בופר TAE

יש למזוג בעדינות, רצוי ממשורה או ארלמאייר נפח של 125 מ"ל בופר TAE לתוך המיכל במכשיר הג'ל אלקטרופורזה. הנוזל צריך לכסות במילימטרים ספורים את הג'ל. להכנת מגש המכיל 2 תבניות ג'ל אגרוז 1%, יש צורך בנפח של 50 מ"ל בופר TAE.

פריט 13: קרח כתוש בכלים לקרח

הכינו שני כלים עם קרח, אחד יונח על שולחן המורה והכלי השני יונח על שולחן התלמיד. ראו הערות לפריטים בטבלה 2 הסבר לפריט 8

פריט 14: כלי מסומן "פסולת":

ראו הערות לפריטים בטבלה 2 הסבר לפריט 13.