

הפקת DNA מחרקים

הנחיות ללבורנט

ציוד וחומרים:

לרשותך ערכה ובה תמיסות שונות מוכנות בריכוזים הנדרשים לתלמידים במהלך הניסוי. חלקו את התמיסות לתלמידים בהתאם לנדרש ברשימת החומרים. כדאי לסמן בצורה בולטת את החומרים. מומלץ לסמן כל מבחנת אפנדורף ובה תמיסה מסוימת על גבי המכסה עם מדבקה עגולה בצבעים שונים. כמו כן כדאי לסדר את המבחנות על כן המבחנות לפי סדר ההוספה.

נהלי בטיחות

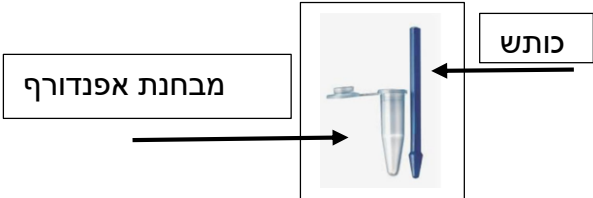
- במהלך המעבדה יש להשתמש בכפפות, חלוק ובמשקפי מגן.
- יש לנקוט משנה זהירות בעת עבודה עם ציוד חשמלי.
- יש להקפיד על שטיפת ידיים לאחר טיפול בחומרים ביולוגיים או ריאגנטים.
- בתום הניסוי יש להקפיד על טיפול נאות על פי כללי הבטיחות והנחיות [בחוזרי הבטיחות](#) המתפרסמים באתר מפמ"ר ביולוגיה ולעבוד על פי ההנחיות שהתפרסמו בהם ("חוזר המנכ"ל החדש והמעודכן לבטיחות במעבדה מרץ 2015", "הנחיות לשמירה על בטיחות בעבודה במעבדה לביולוגיה", "עבודה במעבדה במיקרוביולוגיה") וטיפול ריאגנטים וגלילים המכילים שאריות DNA של יצורים חיים.

ציוד וחומרים המסופקים על-ידי מרכז המעבדות בבר אילן

יחידה זו מיועדת לכ- 4 קבוצות תלמידים.

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

מספר פריט	לקבוצת תלמידים (ראו פרוט בטבלאות 2, 3) כלים וחומרים	תנאי אחסון וזמן מתאים לאחסון
1	וורטקס משמש לעירבוב תמיסות במבחנות אפנדורף	בערכת הציוד המושאלת
2	בלוק חימום	בערכת הציוד המושאלת
3	מיניצנריפוגה miniOne	בערכת הציוד המושאלת
4	זבובי פירות - דרוזופילה מודבק בחיידק הוולבכיה	נשמר באתנול 95%
5	זבובי פירות - דרוזופילה שאינו מודבק בחיידק הוולבכיה	נשמר באתנול 95%
6	מגבונים מסוג kimwipes	

7	מיקרופיפטורים: לטווח של 20-200 מיקרוליטר (P200) לטווח 100-1000 מיקרוליטר (P1000) לטווח עד 20 מיקרוליטר (P20)	בערכת הציוד המושאלת
8	כותשים למבחנות אפנדורף. 	ניתנים למחזור לאחר שטיפה באקונומיה
9	מבחנת אפנדורף מסומנת "PK" ובה תמיסת האנזים פרוטאינז קינאז	קירור
10	מבחנה מסומנת "GST" ובה תמיסת בופר GST	קירור
11	מבחנה מסומנת "GSB" ובה תמיסת בופר GSB	קירור
12	קולונות ספין להפרדת ה-DNA מחלקים אחרים של התאים	
13	מבחנה מסומנת "W1" ובה תמיסת בופר W1	קירור
14	מבחנה מסומנת "WB" ובה תמיסת בופר wash buffer	בקירור
15	מבחנה מסומנת "EB" בה תמיסת בופר EB	בקירור

ציוד וחומרים שאינם מסופק לניסוי ע"י מרכז המעבדות בבר אילן

מספר פריט	שם הפריט	הערות
	חרקים שנאספו בשטח על ידי התלמידים ונשמרו באתנול 95% ואו בהקפאה	
	טיפים למיקרופיפטורים (המיקרופיפטורים מסופקים עם הציוד בערכה)	המתאימים למיקרופיפטורים: לטווח של 20-200 מיקרוליטר (P200) לטווח 100-1000 מיקרוליטר (P1000) לטווח עד 20 מיקרוליטר (P20)
	מבחנות אפנדורף בנפח של 1.5 מ"ל וכן / מעמד למבחנות אפנדורף	

בבוקון סגור עם אתנול 70%	נדרש לניקוי משטחי העבודה
כלים לפסולת עם מעט אקונומיקה בריכוז 0.35% חומר פעיל	כוס כימית בנפח של כ 400-500 מ"ל עם תמיסת אקונומיקה נדרשת לחיטוי הכלים שבהם פסולת ביולוגית.
שקיות BIOHAZARD	שקיות BIOHAZARD נדרשות לפסולת שתעבור אוטוקלאב
כפפות, חלוקים, משקפי מגן	
טוש סימון לסימון דק אבל בולט, מדבקות בצבעים שונים עגולות לסימון מכסה מבחנת אפנדורף	
צלוחיות לשימוש חד פעמי	
סקלפלים בנדן, פינצטות להוסיף את כלל הציוד הנדרש לניתוח החרק, צלחות עם פראפין סקלפל, פינצטה בינקולר	

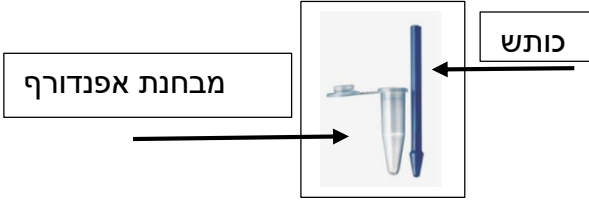
חומרים וציוד לתהליך הפקת DNA עבור קבוצת תלמידים

טבלה 2: מידע על ציוד שימצא על שולחן המורה בעת ביצוע הניסוי

מספר פריט	שם הפריט	הערות
16	וורטקס משמש לעירבוב תמיסות במבחנות אפנדורף	
17	בלוק חימום	
18	מיניצנריפוגה miniOne	
18*	מגבונים מהסוג kimwipes	לספיגת שאריות האתנול מהחרקים
20	בינקולר	להפרדת הגונדות מחרקים

טבלה 3: רשימות הכלים והחומרים לפריטים המסומנים בכוכבית (*) יש הסבר / פירוט ברשימת ההערות.

שימו לב: כל התמיסות מגיעות בערכה מוכנות בריכוז הנדרש. הלבורנט יחלק לכל קבוצה את התמיסות
בנפח הנדרש. יש לסמן את מבחנות האפנדורף בעזרת עט סימון לא מחיק בצורה ברורה, רצוי בצבעים
שונים.

מספר פריט	תיאור פריטים ורשימת הציוד והחומרים הנדרשים להכנתם	כמות ל- 4 קבוצות. לכמה קבוצות אנחנו נספק?	כמות לקבוצה: 4 - 2 תלמידים (כל קבוצה מפיקה DNA עבור 7 דוגמאות)
21	מיקרופיטור מתאים לנפח של 0 – 20 מיקרוליטר	4	1
22	מיקרופיטור מתאים לנפח של 20 – 200 מיקרוליטר	4	1
23	מיקרופיטור מתאים לנפח של 100 – 1000 מיקרוליטר	4	1
24	קופסת טיפים עבור מיקרופיטור של 20 - 200 מיקרוליטר	4	1
25	קופסת עם טיפים עבור מיקרופיטור של 100 - 1000 מיקרוליטר	4	1
26*	5 מבחנות / כלים מסומנים DNA1 – DNA5 ובהן חרקים שנאספו על ידי קבוצת התלמידים בקרבת בית הספר		5
27*	מבחנת אפנדורף מסומנת W+ ובה זבוב פירות דרוזופילה מודבק בחיידק הוולבכיה	4	1
28*	מבחנת אפנדורף מסומנת W- ובה זבוב פירות דרוזופילה שנבדק שאינו נושא את חיידק הוולבכיה	4	1
29*	כלי פסולת לטיפים ומבחנות משומשות כוס כימית בנפח 250 עד 400 מ"ל עם מעט אקונומיקה בריכוז 0.35% חומר פעיל.	4	1
30*	כותשים למבחנות אפנדורף 	28	7

31	21 מבחנות אפנדורף בנפח של 1.5 מ"ל כל אחת וכן למבחנות אפנדורף	147	21
32*	מבחנת אפנדורף מסומנת "PK" ובה של תמיסת האנזים פרוטאינז קינאז	700- 650	150- 140
33*	מבחנת אפנדורף מסומנת "GST" ובה תמיסת בופר GST	6 מ"ל	1.4 מ"ל
34*	מבחנת אפנדורף מסומנת "GSB" ובה תמיסת בופר GSB	6 מ"ל	1.4 מ"ל
35	מבחנת אפנדורף מסומנת "אתנול" ובה אתנול 95%	6 מ"ל	1.4 מ"ל
36*	קולונות ספין להפרדת ה- DNA מחלקים אחרים של התאים	28	7
37*	מבחנת אפנדורף מסומנת "W1" ובה תמיסת בופר W1	14 13 מ"ל	3.5 - 3 מ"ל
38*	מבחנת אפנדורף מסומנת "W2" ובה תמיסת בופר wash buffer	20 מ"ל	4.5 מ"ל
39*	מבחנת אפנדורף מסומנת "EB" ובה תמיסת EB בופר אלוציה	3 מ"ל	60 מיקרוליטר
40	זוג כפפות, חלוק מעבדה, משקפי מגן		לכל תלמיד
41	עט דק ובולט לסימון על זכוכית	4	1
42	סכין חדת ממתכת, רצוי סקלפל	4	1
43	פינצטה / מלקטת	4	1
44	צלוחיות קטנות לשימוש חד פעמי בקוטר של כ 6- 10 ס"מ	28	7

הערות לפריטים מהרשימה שסומנו *

פריט 18: מגבון אחד מסוג kimwipes לכל קבוצה. מגבונים נועדו לספיגת שאריות האתנול מהחלקים. ניתן לחתוך כל מגבון ל 4 ריבועים

פריט 26: מבחנה / כלי ובו חרק שנאסף על-ידי קבוצת התלמידים בקרבת בית הספר

התלמידים יקבלו הנחיות מהמורה על אופן איסוף החרקים

פריט 27: מבחנת אפנדורף מסומנת W+ ובה זבוב פירות דרוזופילה מודבק בחיידק הוולבכיה

לכל קבוצה זבוב אחד מודבק בחיידק הוולבכיה W+.

בערכה תהיה מבחנה עם אתנול ובה מספר חרקים. חרק זה יהווה בקרה להשוואת DNA מחרק מודבק בחיידק הוולבכיה.

פריט 28: מבחנת אפנדורף מסומנת W- ובה זבוב פירות דרוזופילה שאינו נושא את חיידק הוולבכיה.

לכל קבוצה זבוב אחד שאינו מודבק בחיידק הוולבכיה W-.

בערכה תהיה מבחנה עם אתנול ובה מספר חרקים. חרק זה יהווה בקרה להשוואת DNA מחרק שאינו מודבק בחיידק הוולבכיה.

פריט 29: כלי פסולת לטיפים ומבחנות משומשות

כוס כימית בנפח של כ 500 מ"ל עם מעט אקונומיקה בריכוז 0.35% חומר פעיל.

בסיום השיעור יש להעביר את הפסולת לשקית BIOHAZARD ואחר כך להעביר את השקית טיפול באוטוקלאב ולפנות לאשפה.

פריט 30: כותשים למבחנות אפנדורף

רצוי 7 כותשים בכמה צבעים למנוע בלבול (ניתן) לשטוף לשימוש חוזר. השרייה למשך חצי שעה עם אקונומיקה 0.35% חומר פעיל ואחר כך שטיפה במים)

פריט 32: מבחנת אפנדורף מסומנת "PK"

פרוטאינז קינאז : אנזים המזרז פירוק של חלבונים שבתאים לפפטידים (שרשרות קצרות של מספר חומצות אמיניות) ולחומצות אמינו בודדות. אנזים זה גורם לפירוק נוקלאזות שהם אנזימים המפרקים DNA המצויים בתא.

פריט 33: מבחנת אפנדורף מסומנת "GST"

פריט 34: מבחנת אפנדורף מסומנת "GST"

תמיסות בופר GST ו-GSB פועלת כמו סבון (דטרגנט) וגורמת להרס הקרומים בתאים ולדנטורציה של חלבונים בתא.

פריט 35: מבחנת אפנדורף מסומנת "אתנול" ובה אתנול 95%

אתנול גורם להשקעה של ה-DNA בעוד המרכיבים האחרים בתמיסה מומסים באתנול.

פריט 36: קולונות ספין להפרדת ה-DNA מחלקים אחרים של התאים

מהי קולונת ספין ראו הסברים נוספים בקובץ למורה.

פריט 37: מבחנת אפנדורף מסומנת "W1" ובה תמיסת בופר W1

פריט 38: מבחנת אפנדורף מסומנת "W2" ובה תמיסת בופר wash buffer

תמיסות בופר W1 ו-W2: תמיסות שטיפה המאפשרות ל-DNA להקשר אל קרום הסיליקה המצוי במסנן שבקולונה ושטיפת שאריות פסולת התאים.

פריט 39: מבחנת אפנדורף מסומנת "EB" ובה תמיסת EB בופר אלוציה

תמיסת בופר EB: תמיסה הגורמת ל ניתוק ה-DNA מהמסנן שבקולונה. במצב זה אפשר לאחסן הדנ"א למשך שנים רבות בתא הקפאה מבלי שיפגעו