

תפוצת חיידקי וולבכיה בפרוקי רגליים

שלבים עיקריים:

- I. הפקת כלל ה-DNA מתאים של חרקים שונים.
 - II. הגברת גנים של החרק ושל חיידק הוולבכיה.
 - III. זיהוי גנים של חיידק הוולבכיה ולקבוע אם החרק נושא את חיידק הוולבכיה.
- אחרי כל אחד מהשלבים נתן להקפא את הדגימות בטמפרטורה של 20- מעלות צלסיוס ולהמשיך לשלב הבא במועד אחר.
- שימו לב:** הפקת ה-DNA וזיהוי הגנים הם תהליכים ארוכים ומורכבים הכוללים שליבי ביצוע רבים. כל טעות באחד השלבים תשפיע על תוצאות הניסוי.
- קראו בעיון את ההנחיות עד סופן לפני שתתחילו לבצע.
- בדקו האם הרקע הביולוגי וכל ההנחיות ברורות לכם.

שלב I: הפקת DNA מחרקים ומחיידק הוולבכיה – לתלמיד

החרקים שייכים למערכת פרוקי הרגליים בממלכת בעלי החיים
הפקת ה-DNA מחרקים שאספתם והשוואתו ל-DNA של חרקים אחרים שנדבקו בחיידק הוולבכיה
תאפשר לכם לקבוע האם גם החרקים שאספתם נדבקו בחיידק.

מטרות הניסוי:

הכרת שיטה להפקת DNA מחרקים, על מנת להשתמש בו בהמשך לזיהוי נוכחות של חיידק הוולבכיה בחרקים שונים.

רשימת ציוד וחומרים:

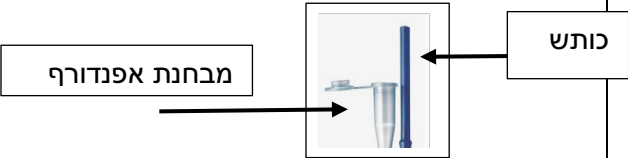
קראו בעיון את ההסברים אודות כל אחד מהפריטים שברשימה
הערה: רשימת הציוד והחומרים ארוכה. קריאה בעיון של הרשימה תאפשר לכם היכרות ראשונית עם ציוד וחומרים שלא היכרתם בעבר.

ציוד כתתי:

עליכם לוודא (בסיוע מורה/לבורנט) שלרשותכם עומד הציוד הבא:

ציוד	הערות
וורטקס	נועד לערבוב מהיר של תכולת מבחנה. אם אין ברשותכם וורטקס ערבבו ידנית את כל אחת מהמבחנות על ידי הפיכתה 25 פעמים בכל פעם שדרוש וורטקס.
בלוקר חימום	מחמם ברמת דיוק גבוהה מבחנות לטמפרטורה הרצויה.
מיני צנטריפוגה	משמשת לשיקוע חומרים (לצורך הפרדתם מתמיסה) במהירות גבוהה.

ציוד וחומרים לקבוצה / תלמיד:

<u>שם הפריט</u>	<u>הסברים והערות</u>
1 חרקים שאספתם.	החרקים שבחרתם לחקור בניסוי (שמורים באתנול 96% ו/או בהקפאה).
2 תסיסנית המחקר (זבוב דרוזופילה) שהודבק בחיידק הוולבכיה מסומן + W	חרק זה ישמש בהמשך כביקורת חיובית לבדיקת נוכחות וולבכיה.
3 דרוזופילה שלא הודבק בחיידק הוולבכיה – מסומן ב- W-	חרק זה ישמש בהמשך כביקורת שלילית לבדיקת נוכחות וולבכיה.
4 כפפות, חלוק, משקפי מגן לכל תלמיד	
5 עט דק לסימון על מבחנות	
6 סכין חדה ממתכת, רצוי סקלפל מכוסה בכיסוי / נדן	עליכם להיות מאד זהירים בזמן העבודה עם סקלפל בעל להב חד במיוחד.
7 פינצטה / מלקטת ומחט מתקן	
8 מגבונים נייר	המגבונים נועדו לספיגת שאריות האתנול מהחרקים
9 קופסת טיפים עבור מיקרופיטור של 200μL-20	
10 קופסת טיפים עבור מיקרופיטור של 100 - 1000μL	
11 שני מיקרופיטורים	מיקרופיטור שמתאים לטווח נפחים של 200μL-20 והשני לטווח 100 - 1000μL
12 כלי פסולת ביולוגית לטיפים ומבחנות משומשות ובו שקית Biohazard.	
13 כותשים למבחנות אפנדורף כמספר החרקים מהם תפיקו DNA – כותש לכל חרק	
14 מבחנות אפנדורף בנפח של 1.5 מ"ל וכן למבחנות אפנדורף	
15 מבחנת אפנדורף מסומנת "PK" ובה האנזים פרוטאינז קינאז	פרוטאינאז קינאז: אנזים המזרז פירוק של חלבונים שבתאים ומסייע בכך להפרדת ה-DNA מהחלבונים שבתא.
16 מבחנת אפנדורף מסומנת "GST" ובה תמיסת GST	תמיסת בופר GST פועלת כמו סבון (דטרגנט) וגורמת להרס במבנה הקרומים בתאים (ליזיס) ולדנטורציה של חלבונים בתא, ומסייעת בהפרדת ה-DNA משאר חלקי התא.
17 מבחנת אפנדורף מסומנת "GSB" ובה תמיסת GSB	תמיסת בופר GSB פועלת אף היא כמו סבון (דטרגנט) וגורמת להמשך הליזיס של התאים, להרס הקרומים בתאים ולדנטורציה של חלבונים בתא, ומסייעת בהפרדת ה-DNA מיתר חלקי התא.
18 מבחנת מסומנת "אתנול" ובה אתנול 95%	אתנול גורם להפרדה של ה-DNA בעוד המרכיבים האחרים בתמיסה מומסים באתנול ואינם שוקעים, וכך נפרד ה-DNA מחומרים אחרים בתמיסה.

שם הפריט	הסברים והערות
19	קולונות ספין להפרדת ה-DNA מחלקים אחרים של התאים. קולונה אחת לכל חרק שברשותכם ולבקורות
20	מבחנת אפנדורף מסומנת "W1" ובה תמיסת W1 תמיסות בופר W1 ו-W2: תמיסות שטיפה המאפשרות ל-DNA להקשר אל קרום הסיליקה המצוי במסנן שבקולונה ושטיפת שאריות פסולת התאים.
21	מבחנת אפנדורף מסומנת "W2" ובה תמיסת W2
22	מבחנת אפנדורף מסומנת "EB" ובה תמיסת EB תמיסת בופר EB: תמיסה הגורמת לניתוק ה-DNA מהמסנן שבקולונה וקבלת DNA נקי במבחנה להמשך עבודה.
23	צלוחיות לשימוש חד פעמי להנחת החרקים ולספיגת שאריות אתנול

לידיעתכם:

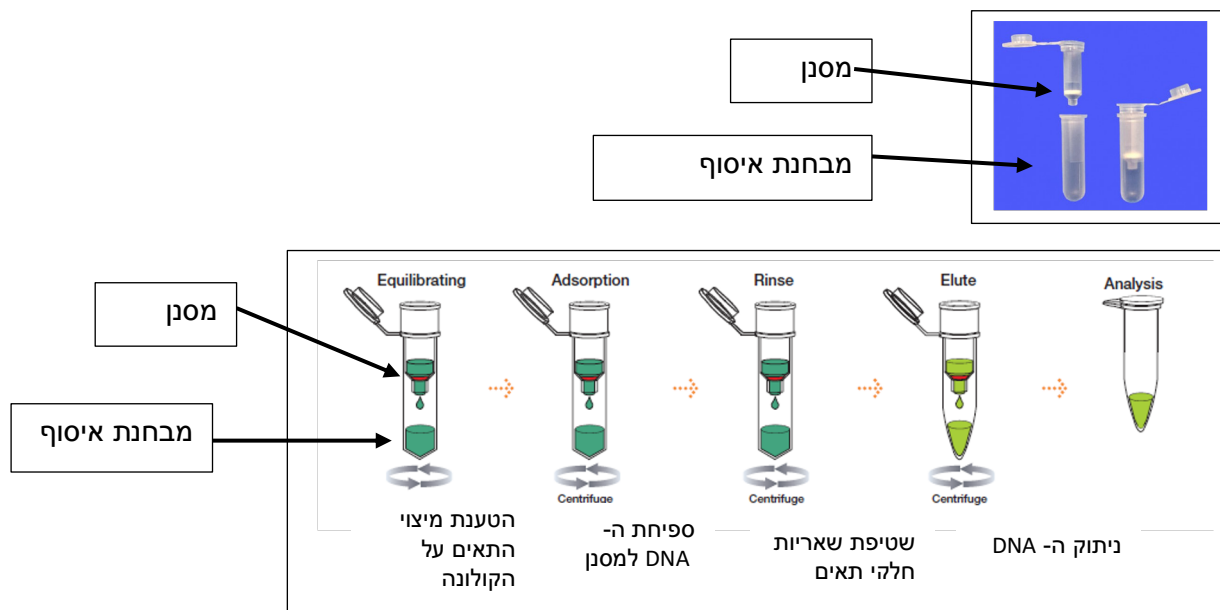
1. תמיסת בופר:

היא תמיסה בה נשמרת דרגת pH יציבה בעת הוספת כמויות קטנות של חומצה או של בסיס. טווח pH יציב פחות או יותר המאפשר את קיומם של תהליכים ביולוגיים בתאים, כגון תהליכים אנזימטיים. תמיסות הבופר בניסוי מסייעות לשמור על מבנה תקין של ה-DNA במהלך ההפקה.

2. קולונת ספין:

קולונה היא מתקן המכיל מסנן ובו קרום עשוי מסיליקה (קוורץ SiO_2) הנתון בתוך מבחנה. שימוש בקולונת ספין היא שיטה מהירה להפרדת חומצות גרעין (למשל DNA) משאר החלקים של התאים שפורקו. שיטה זו מבוססת על כך שחומצות גרעין, בניגוד לשאר חלקי התא, נקשרות לקרום הסיליקה שבמסנן (תמונה 1) בגלל תכונותיהן הכימיות. כאשר בתמיסה קיים pH מסוים וריכוז מלחים מסוים חומצות גרעין יתקשרו למסנן בקולונה ובשינוי התנאים (על ידי הוספת תמיסת בופר אחר) הן יתנתקו ויצטברו במבחנת האיסוף.

תמונה 1: מבנה ואופן פעולת קולונת ספין



רגע לפני שמתחילים:

הפקת ה-DNA מחרקים מתבצעת ב-3 שלבים עיקריים:

א. פירוק התאים:

תהליך פירוק התאים מתרחש בסביבה בה יש תמיסות שגורמות להרס קרום התא ולקרומים נוספים כמו קרום הגרעין (הבופרים GST ו-GSB). בתהליך זה ה-DNA הממוקם בגרעין התא או בציטופלסמה של חיידי הוולבכיה נחשף לחלבונים – ביניהם אנזימים שונים במיצי התאים העלולים לפרק אותו (אנזימים מפרקי חומצות גרעין – נוקלאזות). לכן מוסיפים את האנזים פרוטאינז קינאז PK, הגורם לדנטורציה ולפירוק של החלבונים במיצי התאים ושומר על ה-DNA שלם. בנוסף, האנזים PK מסייע בפירוק החלבונים הקשורים ל-DNA. הוספת אתנול בסיום שלב זה תגרום לשקיעה של ה-DNA בתמיסה ותקל על ההפרדה שלו משאר חלקי התא (חלבונים שלא פורקו, חומצות אמיניות, שומנים, חלק אברונים ועוד).

ב. הפרדת ה-DNA משאריות חלקי התאים:

לאחר שלב פירוק התאים והחלבונים בתא מתבצע שלב ניקוי ה-DNA במתקן הנקרא קולנת ספין. סירכוז בצנטריפוגה של מיצי מתאי החרק בתוך קולונה ייחודית, יאפשר קישור ספציפי של ה-DNA למסנן שבקולונה מצד אחד, ובנוסף שטיפת שאריות חלקי התא מהקולונה.

ג. איסוף ה-DNA:

שלב זה בתהליך הפקת ה-DNA יסתיים בניתוק ה-DNA מהמסנן ומתבצע באמצעות תמיסת הבופר EB. סירכוז הקולונה בצנטריפוגה עם ה-DNA המצוי על גבי המסנן יגרום למעבר תמיסת הבופר דרך התווך של המסנן ולדחיקת ה-DNA לתוך מבחנת האיסוף, זהו ה-DNA שישימש לאחר מכן לבדיקת נוכחות וולבכיה בחרקים.

שימו לב: לא להתבלבל בהוספת התמיסות בשלבי העבודה השונים. לכל תמיסה מסוג מסוים חשיבות שונה בתהליך הפקת ה-DNA. החלפה בין התמיסות השונות תמנע את הצלחת התהליך. כדאי לוודא שהתמיסות מסודרות לפי סדר הוספת התמיסות בהנחיות.

מהלך העבודה:

קראו בעיון כל אחד מהסעיפים 1-9 לפני תחילת הביצוע ותבררו אם ההנחיות בסעיף זה ברורות, רק לאחר מכן התחלו בביצוע ההנחיות. היעזרו בתרשים המתאר את שלבי העבודה בעמוד 11.

הערות	מהלך העבודה	
פירוק תאי החרק – כל שלבי הניסוי מתקיימים בטמפרטורת החדר.		
	1 סמנו מבחנות אפנדורף ב: W+ (עבור ביקורת חיובית) -, W (עבור ביקורת שלילית) סמנו את המבחנות עבור כל חרק שתבדקו DNA1, DNA2 (אפשר לסמן בכל סימון אחר שתבחרו)	
2 שיש לב: אם החרק גדול משני מילימטר, מומלץ לנתק את הבטן באמצעות סכין (חלקו האחורי של החרק המכיל את אברי הרבייה) ולהשתמש רק בה להפקה.	סמנו צלוחיות לשימוש חד פעמי באותם סימנים שסימנתם את המבחנות – צלוחית לכל מבחנה. - רפדו את הצלוחיות במגבון. - הניחו את החרקים שאספתם בצלוחיות המסומנות DNA1, DNA2... - את הדרוזופילה שאיננה נושאת את חידק הוולבכיה בצלוחית "W-" - את דרוזופילה המודבקת בוולבכיה בצלוחית "W+." - אם החרק נשמר באתנול, ספגו בעדינות בעזרת המגבון את שאריות האתנול.	
שימו לב: את ההנחיות בסעיפים 3-7 בצעו לכל אחד מהחרקים במבחנות מסומנות. השתמשו בכותש נקי ובטיפים נקיים לכל אחת מהמבחנות ובהם דגימת חרק שונה. קראו היטב את ההוראות והכינו לכם מיקרופיפטורים מתאימים וקופסאות טיפים לעבודה רצופה. μl - מיקרוליטר		
3 לידעתכם: פירוק הרקמות גורם לשחרור אנזימים מפרקי DNA (נוקלאזות) שמפרקים DNA במהירות ולכן חשוב להוסיף במהירות את האנזים פרוטאינאז קינאז המפרק חלבונים ובהם גם נוקלאזות.	הוסיפו לכל אחת מהמבחנות μl 200 של בופר "GST" ו- 20 μl של תמיסת "PK" - אם החרק קטן העבירו את החרק בשלמותו או העבירו את חלק הבטן האחורי כ- 2 מ"מ. אל מבחנת אפנדורף.	
הפרדת ה-DNA משאריות חלקי התאים: בצעו את כל השלבים בטמפרטורת החדר		
	4. השתמשו בכותש, וכתשו היטב את החרק בתוך התמיסה שבמבחנה במשך 2 דקות. - ערבבו באמצעות וורטקס למשך 10 שניות.	
	5. העבירו את כל המבחנות לבלוקר חימום (או לאמבט חימום) שהטמפרטורה בו היא 60°C למשך 30 דקות. במהלך החימום הוציאו כל 5 דקות את המבחנות וערבבו בעזרת וורטקס במשך 10 שניות. מיד לאחר הוורטקס החזירו את הדגימות אל האמבט.	
6 המבחנות ישמשו בשלב הסופי (סעיף מס' 22) של הפקת ה-DNA.	חימום תמיסת תמיסת בופר "EB" (בופר אילוציה): הכינו מבחנת אפנדורף נוספת, העבירו לתוכה תמיסת EB בנפח	

	של 60 מיקרוליטר עבור כל דגימה שיש ברשותכם. והניחו את המבחנה באמבט היבש 60°C .	
7	כעבור 30 דקות הוציאו את המבחנות עם דגימות החרקים מהאמבט והעבירו לכן המבחנות.	<u>שימו לב:</u> השאירו את מבחנות שבהן בופר ה"EB" באמבט עד ביצוע שלב ג, סעיף מס' 22.
8	בעזרת צנטריפוגה סרכזו את המבחנות שיצאו מהאמבט למשך 2 דקות במהירות 10,000 rpm. לאחר הסירכוז העבירו בזהירות ובעדינות כ- 200 מל מתוך הנוזל העליון של כל מבחנה למבחנת אפנדורף נקיה ומסומנת. הוסיפו למבחנות 200 מיקרוליטר של בופר "GSB" והעבירו לערבוב בוורטקס ל-10 שניות.	<u>הערות:</u> חשוב שהדגימה ובופר ה-GSB יתערבבו היטב. המהירות המקסימלית של הצנטריפוגה שבר אילן מספק היא: 10,000 rpm
9	קשירת ה-DNA אל הקולונה: הוסיפו 200 מל אתנול 95% למבחנות האפנדורף (המכילות שאריות מהתאים שעברו ליזיס) וערבבו מיד עם וורטקס למשך 10 שניות.	
10	סמנו קולונות ספין על מכסה הקולונה ועל צידה של מבחנת האיסוף בסימנים תואמים את מבחנות ההפקה (קולונה לכל מבחנה).	
11	העבירו 600 מל מן הנוזל העליון ממבחנת האפנדורף המכילה את שאריות התאים לתוך קולונת ספין המסומנת בהתאם. חיזרו על הנחיות אלה עם שאר המבחנות שברשותכם. השתמשו בטיפ חדש עבור כל דגימה.	השתדלו להוסיף את הנוזל במרכז הקולונה, מבלי לגעת עם הטיפ במסנן.
12	הניחו את הקולונות מעל מבחנת האיסוף. העבירו את הקולונות יחד עם מבחנת האיסוף אל הצנטריפוגה לסירכוז של דקה אחת במהירות 10,000 rpm.	ה – DNA שבדגימה נקשר למרכיב בקולונה
13	הוציאו את הקולונות מהצנטריפוגה והעבירו את תוכן מבחנות האיסוף שבתוכן שפכו לכלי הפסולת הביולוגית. הניחו את הקולונה מעל מבחנת האיסוף הריקה.	
לידיעתכם: בסיום פעולת הצנטריפוגה ה-DNA במיצוי תאי החרקים יהיה מחובר אל קרום המסנן בתוך קולונת הספין.		
15	שלב שטיפות הקולונה: הוסיפו לכל אחת מהקולונות 400 מיקרוליטר בופר שטיפה "W1".	השתדלו להוסיף את הנוזל במרכז הקולונה, מבלי לגעת עם הטיפ במסנן.
16	סרכזו למשך דקה אחת במהירות 10,000 rpm ושפכו את הנוזל ממבחנת האיסוף (שיצא אל מבחנת האיסוף לאחר הסירכוז) לכלי הפסולת הביולוגית. החזירו את הקולונה אל מבחנת האיסוף.	
17	הוסיפו 600 מיקרוליטר של בופר שטיפה "W2" אל תוך הקולונה.	השתדלו להוסיף את הנוזל במרכז הקולונה, מבלי לגעת עם הטיפ במסנן.
18	סרכזו דקה אחת במהירות 10,000 rpm ושפכו את הנוזל ממבחנת האיסוף לכלי הפסולת.	

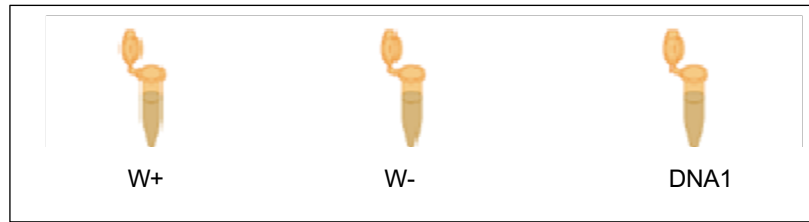
20	סמנו מבחנות אפנדורף נקיות בסימונים התואמים את סימוני המבחנות שלכם. העבירו את הקולונות למבחנת אפנדורף / איסוף חדשה ובצעו "סירכוז יבש" (ללא הוספת נוזל לקולונה) עם מכסים פתוחים, למשך 3 דקות במהירות 10,000 rpm. בסיום העבירו את מבחנת האיסוף לפח הפסולת הביולוגית.	פעולה זו תעזור לסלק את שאריות האתנול.
21	איסוף ה-DNA - שלב האילוציה (ניתוק הדנ"א מהקולונה): - <u>סמנו שוב</u> מבחנות אפנדורף נקיות בסימונים התואמים את סימוני המבחנות שלכם - העבירו את הקולונות היבשות שיצאו מהסירכוז אל מבחנות האפנדורף החדשות.	
22	הוסיפו אל מרכז הקולונה 50 מיקרוליטר של בופר "EB" שחומם באמבט יבש שהטמפרטורה בו היא 60°C.	EB = Elution Buffer בופר הגורם לניתוק הקשר בין ה-DNA לקולונה.
23	הניחו את המבחנות בטמפ' החדר בן המבחנות למשך 3 דקות לצורך ספיגת הנוזל בבקרום הסיליקה שבקולונה.	
24	כעבור 3 הדקות העבירו את הדגימות לסירכוז של דקה אחת במהירות 13,000rpm בצנטריפוגה. לבסוף, העבירו את הנוזל (50 מיקרוליטר) שבמבחנת האפנדורף – מבחנת האיסוף שוב בעדינות אל הממברנה (קרום הסיליקה) שבמרכז הקולונה ובצעו סירכוז נוסף של דקה אחת במהירות 13,000rpm בצנטריפוגה לצורך מיצוי ה-DNA מתוך ההקולונה.	

שימו לב: שימרו את הנוזל שבתחתית מבחנת האיסוף - נוזל זה מכיל את דגימת ה-DNA שהפקתם.

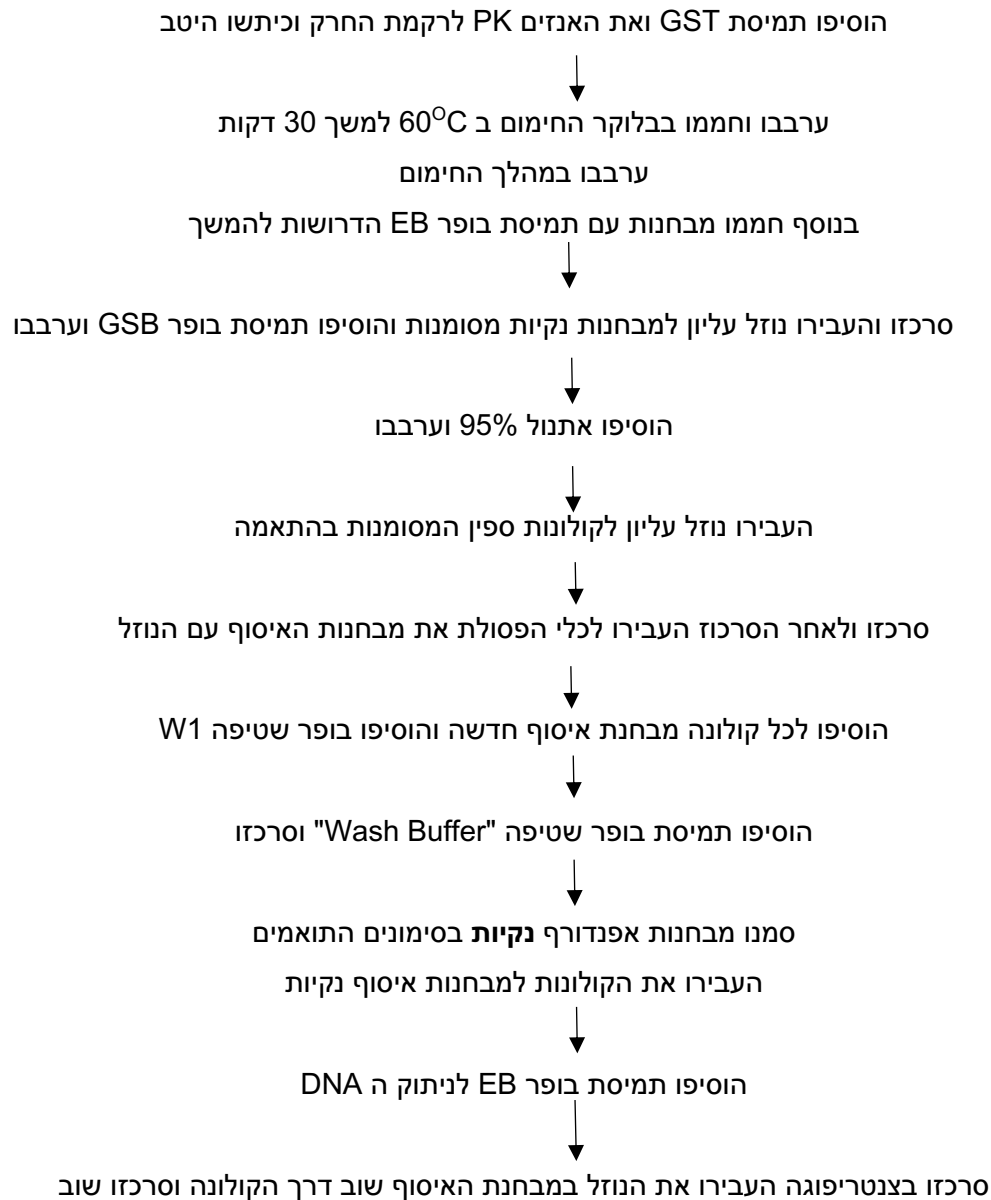
את הנוזל שקיבלתם במבחנת האיסוף (כ 50 מיקרוליטר) ניתן לשמור במקפיא בטמפרטורה של -20°C עד למעבר לשלב הבא – הגברת מקטעי DNA מתוך הדגימה המופקת על ידי ריאקציית ה-PCR.
אחרת, העבירו ישירות מתוך הדגימה את הכמות הדרושה לריאקציית ה-PCR למבחנת ה-PCR ואת יתרת הכמות שמרו אצלכם במינוס 20- מקפיא.

העבירו את הקולונות בלבד אל כלי הפסולת ושימרו את מבחנת האיסוף.

תרשים עזר: שלבי הפקת ובידוד ה-DNA



מבחנות עם דגימות
חרקים מהסוגים:



שמרו (!) את הנוזל שבמבחנות –ה-DNA שהפקתם נמצא בהן

שימו לב: את ה-DNA שהפקתם ניתן לשמור בהקפאה בטמפרטורה של -20°C מעלות
צלסיוס עד לביצוע השלב הבא **או:** לעבור לביצוע השלב הבא של הגברת ה-DNA (שלב II).

שאלות לחזרה ולתרגול:

- בשיטה בה השתמשו להפקת DNA כוללת מספר שלבים. לפניכם חלק מהפעולות שביצעתם בשלבים השונים, הסבירו בקצרה את המטרה של כל אחת מפעולות אלה.
 - א. כתישה של החרק.
 - ב. הרחפת הכתישה בבופר המכיל דטרגנט.
 - ג. הדגרה עם פרוטאינאז קינאז PK.
 - ד. ערבוב תמיסת ההפקה עם אתנול.
- בתאים מצויים אנזימים בשם נוקלאזות, המזרזים פירוק של חומצות גרעין, וביניהן גם DNA.
 - א. אילו חומצות גרעין מצויות בתא, פרט ל-DNA.
 - ב. ציין 3 הבדלים בין ה-DNA לבין חומצות הגרעין הנוספות שצינת בסעיף א.
 - ג. מדוע חשוב לנטרל נוקלאזות אלה במהלך ההפקה?
 - ד. מה עשוי להיות היתרון בקיום אנזימים אלה בתאים של יצורים חיים?
 - ה. הצע הסבר לכך שבתאים של יצורים חיים, הנוקלאזות אינם פוגעים ב-DNA של היצור עצמו.
- 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?
- בפרוייקט הוולבכיה משתתפים תלמידים מבתי ספר ברחבי העולם. מהי לדעתכם החשיבות של פרוייקט זה?
- קרא את המאמרים הבאים:
[החיידק נגד הזכרים \(מאת נועם לויתן, אתר מכון דוידסון\):](#)
[חיידקים נגד יתושים מפצי' נגיפים \(מאת יונת אשחר, אתר מכון דוידסון\):](#)
האם, לדעתך, ניתן להשתמש בחיידק הוולבכיה להדברה ביולוגית של חרקים מזיקים? בסס תשובתך על עובדות מתוך המאמרים.
- הפקת ה-DNA שביצעת מבוססת על תכונות בכימיות ופיזיקליות של ה-DNA, כלומר על המבנה שלו ועל יכולתו להגיב עם חומרים אחרים. לאור עובדה זו ענה:
 - א. הסבר מדוע ניתן לנצל את הפרוטוקול להפקת DNA גם מיצורים חיים אחרים.
 - ב. לצורך הפקת DNA מתאים של יצורים אחרים נדרשות לעתים התאמות קלות, למשל שינוי משך זמן הכתישה, או שינוי משך זמן ההדגרה עם הבופר GST. הצע הסבר ביולוגי לכך.
 - ג. ה-DNA שהפקת כולל DNA של החרק ו-DNA של החיידק. הצע דרך לוודא האם שני סוגי ה-DNA נמצאים במבחנת ההפקה או רק אחד מהם.
- במהלך העבודה הפקת גם DNA מדוגמה שהיא ביקורת חיובית ומדוגמה שהיא ביקורת שלילית. הסבר מהי החשיבות של שימוש בביקורות אלה בהמשך המחקר.

עבודה נעימה!!!