

אנטיביוטיקה, כמוסת הקסם?

ניסוי: זיהוי גן לעמידות באמצעות PCR ואלקטרופורזה בג'ל

תאריך עדכון: 30.1.2019

למורה

הקובץ כולל הקדמה, הערות לגבי שיעורי הכנה וביצוע הניסוי, תשובות לשאלות שבדפי התלמיד ונספחים.

• הכרת השיטה להגברה של קטעי DNA ב-PCR.	תמצית מידע על הניסוי:
• בקרה על ביטוי גנים והנדסה גנטית. • חיידקים ונגיפים בגוף האדם. • תהליכים אבולוציוניים.	מתאים לנושאים בתכנית הלימודים:
בחטיבה העליונה (כיתות יא, יב)	מתאים לתלמידים:
• מבנה ה-DNA, הכפלת ה-DNA, מ-DNA לחלבון. • עקרונות הנדסה גנטית. • היכרות עם כלים ושיטות עבודה בביולוגיה מולקולרית: הגברה ב-PCR (שיעור הכנה) ואלקטרופורזה בג'ל (קשת צבעים).	ידע קודם נדרש:
• 2 שיעורי הכנה להיכרות עם מושגים רלוונטיים <u>בתכנית הלימודים</u> ושיטת PCR. • 2 שיעורים לביצוע שלב ההגברה ב-PCR (כולל כ- 40 דק' שבהם המכשיר פועל). • 1 שיעור להרצה באלקטרופורזה בג'ל. • 1 שיעור לבדיקת תוצאות הניסוי וסיכום.	הזמן הנדרש:
• דיווח על תוצאות ניסוי. • הסבר חשיבותה של בקרה. • הסבר תוצאות ניסוי. • ניסוח מסקנה.	אסטרטגיות חשיבה מסדר גבוה:
• שימוש במיקרופיטור, הטענת ג'ל	מיומנויות טכניות נדרשות
• תרגיל הכרת מבנה המיקרופיטור ועקרונות השימוש בו. • קשת צבעים, תרגיל שימוש באלקטרופורזה בג'ל. • טרנספורמציה בחיידקים (מומלץ).	תרגילים שחשוב לבצע וניסוי מומלץ

מטרות הניסוי

1. בניסוי זה התלמידים יכירו את שיטת ההגברה של DNA בעזרת מכשיר ה-PCR ואת העקרונות עליהם מבוססת השיטה.
2. התלמידים יכירו את השיטה להפרדת קטעי DNA במכשיר אלקטרופורזה בג'ל ויזהו את אורכם של הקטעים באמצעות שימוש בסולם DNA (DNA Ladder).
3. התלמידים יזהו באמצעות הרצה באלקטרופורזה בג'ל את נוכחותו של הגן המקנה עמידות לאמפיצילין שהוגבר במכשיר ה-PCR.

הקדמה

בסוף שנות ה-20 של המאה הקודמת הבחין אלכסנדר פלמינג כי אחת מצלחות הפטרי שבה גידל מושבות חיידקים זוהמה בפטרייה מסוג פניציליום והחיידקים במושבות שבקרבת הפטרייה מתו. לאחר זמן פלמינג בודד חומר שהפטרייה מפרישה והוא זה שגרם למות החיידקים. לחומר זה נתן פלמינג את השם פניצילין.

אחרי למעלה מעשר שנים החלו לטפל בפניצילין ובתרופות אנטיביוטיות אחרות באנשים שחלו במחלות זיהומיות. באותה תקופה, ההגדרה המקובלת לאנטיביוטיקה הייתה קבוצה של חומרים הנוצרים במיקרואורגניזמים ופועלים נגד חיידקים¹. בעשורים האחרונים הורחבה ההגדרה והיא מתייחסת גם לחומרים אנטיביוטיים מלאכותיים הפועלים כנגד מיקרואורגניזמים².

במשך שנים נראה היה שהשימוש באנטיביוטיקה הוא הפתרון לריפוי מחלות זיהומיות בבני האדם. אלא, שלפני כמה עשורים הסתבר כי השימוש הנרחב במגוון חומרים אנטיביוטיים גרם לעלייה דרמטית במספר המינים של החיידקים העמידים לסוגים שונים של אנטיביוטיקה.

ההסבר לתופעה זו הוא שבחיידקים, כמו גם באורגניזמים אחרים, חלים שינויים גנטיים אקראיים (מוטציות) ולחיידקים המוטנטים יש תכונות שלא היו לחיידקים בדור הקודם. לרוב, שינויים גנטיים אלה מתרחשים בפלסמידים שבתאי חיידקים ואין קשר בין השינויים לבין חשיפת החיידקים לחומרים אנטיביוטיים. בעת חשיפה לאנטיביוטיקה החיידקים הרגישים לאותו סוג אנטיביוטיקה מתים והחיידקים העמידים מתרבים ומעבירים תכונה זו לדור הבא. יש מקרים בהם פלסמידים הנושאים גן לעמידות לאנטיביוטיקה מועברים אחד לאחר בדרכים שונות (לדוגמה, העברה אופקית).

בחיידקים מוכרים מנגנונים שונים המקנים עמידות כנגד מגוון חומרים אנטיביוטיים, כגון ייצור אנזימים

¹ ברנהולץ, ח., פלד, ל., וינקלר, ר., פרקים במיקרוביולוגיה ובמערכות הגנה. המרכז להוראת המדעים האוניברסיטה העברית בירושלים תשס"א (2001), עמ' 229

² "המרכז לפיתוח ותמיכה במעבדות הביולוגיה בבתי הספר"

המפרקים את החומר האנטיביוטי לפני שהוא פוגע בתפקוד התא, שינוי במבנה קרום התא ופגיעה בחדירותו לאנטיביוטיקה מסוימת, יצירת משאבות בקרום התא המוציאות את האנטיביוטיקה אל מחוץ לתא (שאלות הכנה, שאלה 3).

מידע אודות הניסוי

בניסוי התלמידים יעבדו עם פלסמידים הנושאים גן לעמידות לתרופה האנטיביוטית אמפיצילין³. מנגנון העמידות לאמפיצילין מאופיין בפירוק החומר האנטיביוטי. בחיידקים מצוי האנזים טרנספפטידאז שבעת חלוקת התאים הוא מזרז את יצירת הקשרים הצולבים העשויים מפפטידים קצרים אשר מחברים בין שרשרות של רב סוכרים, שרשרות המקנות לדופן את קשיחותה. הדופן הקשיחה שומרת על שלמות התאים. כאשר חודרות מולקולות אמפיצילין לחיידקים רגישים לאמפיצילין, הן נקשרות לאתר הפעיל של האנזים טרנספפטידאז ומונעות את פעילותו. כתוצאה מכך, כשהתאים מתחלקים נוצרת בתאי הבת דופן לא קשיחה. כשתאים כאלו מצויים בסביבה היפוטונית חודרים אליהם נוזלים, הלחץ על דפנות התאים עולה והתאים מתפוצצים. לעומתם, בחיידקים עמידים לאמפיצילין נמצא הגן BLA המקודד לחלבון האנזימטי β לקטאמאז. אנזים זה מזרז את ההידרוליזה של מולקולת האמפיצילין והודות לכך בעת התחלקות התאים לא נפגעת יצירת דופן קשיחה בחיידקים. **לתשומת לבכם:** בניסוי, הגן לעמידות לאמפיצילין סומן כך: amp^R .

בהקדמה שבדפי הניסוי לתלמידים מוצג סיפור אמיתי שראשיתו במאה ה-19 וסימום כמאה שנים לאחר מכן:

בסוף המאה ה-19 יצאה משלחת לחקור את הקוטב הצפוני. המשלחת לא היצאה ליצדה ולאחר שלושים שנים איש מבין חבריה לא שרד. בשנת 1988 התגלו מתחת לקרח שבאזור הקוטב גופותיהם של שניים מחברי המשלחת. אתם הצטרפתם לקבוצה של מדענים שהחליטו לחקור האם בין החיידקים המתים שנמצאו בגופותיהם של חברי המשלחת ישנם גם חיידקים הנושאים את הגן לצמידות בפני התרופה האנטיביוטית אמפיצילין. לאחר שתבצעו את כל שלבי הניסוי ותסכמו את התוצאות תוכלו לפתור את התעלומה.

³ תרופה ממשפחת הפנצילינים הסמיסינטטיים הנמצאת בשימוש החל משנת 1966.

התלמידים מתבקשים "להצטרף לצוות החוקרים" ולבדוק את שאלת המחקר.
על פי המידע בספרות, מבדיקת החיידקים המתים בגופות נמצא שמקצתם עמידים לחומרים אנטיביוטיים, וביניהם גם חומרים שבמאה ה-19 לא היו מוכרים למדע. כלומר, השימוש באותם חומרים החל שנים רבות אחרי מות חברי המשלחת.
ממצאים אלה תומכים בתיאורית האבולוציה, על פיה בחיידקים חלות מוטציות מקריות הגורמות לשונות באוכלוסייה, וכתוצאה מלחץ סלקטיבי שורדים ומתרבים הפרטים המוטנטיים⁴ (שאלה 5).
בכוונה תחילה, המידע שנמסר לתלמיד הוא חלקי ואינו כולל את ממצאיהם של החוקרים. לאחר ביצוע הניסוי התלמידים יסכמו את תוצאותיו ויוכלו לפתור את התעלומה.
אנחנו ממליצים למורים וללבורנטים לאפשר לתלמידים לעבור את התהליך כולו, להסתקן, להתרגש ולחוות את חווית הגילוי. לאחר פתרון התעלומה הם יישמו את התוצאות (שאלה 5) ויבינו את המשמעות של מוטציות אקראיות המתרחשות בטבע.

שיעורי הכנה לפני ביצוע הניסוי

מטרות שיעורי ההכנה לניסוי הן להקנות לתלמיד ידע בסיסי שיסייע לו להבין את מהלך העבודה, לבצע את הניסוי ולפרש את תוצאותיו.

מושגים חיוניים להיכרות עם שיטות העבודה ולהסבר תוצאות הניסוי

שיטת הגברה במכשיר PCR (ראו נספח 1)	שיטת הפרדה באלקטרופורזה בג'ל (ראו נספח 2)	תהליכים אבולוציוניים
תבנית DNA	DNA Ladder	ברירה טבעית
תערובת של DNA פולימראז (TAQ), בופר ונוקלאוטידים (dNTPS)	SMART GLOW	קו אבולוציה
מים נטולי נוקלאזות	מושגים נוספים שנלמדו ב"קשת צבעים, תרגיל שימוש באלקטרופורזה בג'ל"	מוטציה
תחלים (MIX PRIMER)		שונות באוכלוסייה
		התאמה
		עמידות לאנטיביוטיקה
		העברה אופקית
		פלסמיד
		יצור טרנסגני

⁴ על פי: א. כהנא, [חיידקים ונגיפים בגוף האדם](#), הוצאת המרכז הארצי למורי ביולוגיה ומורי מדעי הסביבה, תשע"ז 2016

כחלק משאלות ההכנה לניסוי (שאלות הכנה, שאלה 1ג), התלמידים מתבקשים להשוות בין תהליך שכפול ה-DNA כפי שמתרחש בתאים לבין הגברת ה-DNA במכשיר PCR.

ההבדלים בין שכפול DNA במכשיר PCR ושכפול DNA בתאים⁵

מרכיבים ומאפיינים	שכפול DNA בתאים	שכפול DNA במכשיר PCR
חומר מוצא	DNA דו גדילי	DNA דו גדילי
להתחלת השכפול נדרשים	תחלים שנוצרו בתא	תחלים מלאכותיים
מרכיבים הכרחיים נוספים	DNA פולימראז, נוקלאוטידים, תחלים	DNA פולימראז, נוקלאוטידים, תחלים
הפרדת גדילים לפני שכפול מתבצעת באמצעות	אנזימים וחלבונים יחודיים	טמפרטורה גבוהה מאוד
כמות החומר התורשתי שמשוכפל	כל ה-DNA של התא	רק קטע מוגדר, קטן יחסית
מספר השכפולים	פעם אחת בתא	מספר רב של פעמים
תיקון טעויות בזמן שכפול	תיקון יעיל מאוד	תלוי באיכות האנזים TAQ בו משתמשים בהגברה

קישורים אפשריים בין נושא הניסוי לבין נושאים בתכנית הלימודים

נושאי ליבה

גוף אדם בדגש הומיאוסטזיס: מערכות הגנה.

התא מבנה ותפקוד: חידקים, מאפיינים של תאים פרוקריוטים ואאקריוטים, פעילות אנזים, מעכבים אקולוגיה: תחרות, כשירות, שכיחות, השפעת האדם, שונות, מוטציה, עמידות.

נושאי העמקה

חידקים ונגיפים בגוף האדם: התרבות, חלוקת תא, מנגנונים המקנים עמידות לאנטיביוטיקה, לחץ סלקטיבי שהוביל להתפתחות זני חידקים עמידים לאנטיביוטיקה. בקרה על ביטוי גנים והנדסה גנטית: היכרות עם שיטות עבודה מולקולריות.

⁵ על פי: מיכאל ד., ירדן, ע., [הנדסה גנטית מעקרונות ושיטות למחקר ויישומים](#), המרכז להוראת המדעים מכון יצמן למדע (מהדורה שנייה 2012), עמוד 115

הערות לגבי ביצוע הניסוי:

ארגון הכיתה:

הציוד והחומרים שסופקו לבית הספר על ידי המרכז לפיתוח ותמיכה במעבדות בתי הספר מיועדים ל- 24-32 תלמידים שיעבדו בשני סבבים (בכל סבב 4 קבוצות המונות 2-4 תלמידים).

תכנון זמן:

- שני שיעורי הכנה.

- משך הזמן הנדרש לביצוע הניסוי:

משך ביצוע כל שלבי הניסוי כ- 140 דקות. הניסוי תוכנן כך שניתן יהיה לפצל אותו לשלושה מפגשים:

מפגש ראשון:

- i. הכנת מבחנות ה-PCR (כ-45 דק').
- ii. מחזורי השכפול ב-PCR (כ-45 דק').

נקודת עצירה – לאחר שהריאקציה של ה-PCR הסתיימה, ניתן להעביר את מבחנות ה-PCR שבהן תוצרי ההגברה לקירור במשך לילה או להקפאה ללא הגבלת זמן. כאשר התלמידים מוכנים לביצוע הרצה באלקטרופורזה בג'ל, יש להוציא את המבחנות מהקפאה ולהניח בכלי עם קרח על שולחן המורה.

מפגש שני: 20 דקות לשתי קבוצות

- i. הטענת דגימות ה-DNA ששוכפלו ב-PCR אל מכשיר אלקטרופורזה בג'ל.
- ii. הרצה אלקטרופורזה בג'ל וקריאת תוצאות.

מפגש שלישי: (כ-30 דקות)

דיון בתוצאות.

מידע אודות מהלך הניסוי

בניסוי, התלמידים ישתמשו בשתי שיטות עבודה מתקדמות בביולוגיה מולקולרית.

א. הגברה של תבנית DNA באמצעות מכשיר ה-PCR (ראו פירוט בנספח 1)

התלמידים מכל הקבוצות יכניסו את כל המבחנות למכשיר באותו הזמן:

מבחנה המסומנת A+ ובה פלסמידים, וידוע שהם נושאים גן לעמידות לאנטיביוטיקה מסוג אמפיצילין (amp^R) שאורכו 700bp⁶.

מבחנה המסומנת A- ובה אין כלל פלסמידים.

מבחנה המסומנת R ויש בה פלסמידים מחיידקים שבודדו מגופם של חברי המשלחת.

הערות:

- בתחילת הניסוי התלמידים אינם יודעים האם הפלסמידים שבמבחנה R נושאים גן לעמידות לאנטיביוטיקה מסוג אמפיצילין. לידיעתכם, פלסמידים אלה זהים לפלסמידים שבמבחנה A+.
- כאמור בעמוד 4 לעיל, אנו ממליצים למורים וללבוורנטים לא למסור מידע זה לתלמידים בתחילת הניסוי.
- על פי שיקול דעתכם והתייעצות עם הלבוורנט תוכלו לשנות בחלק מקבוצות התלמידים את תכולת מבחנת אפנדורף המסומנת R ובמקום פלסמידים לשים בה מים נטולי נוקליאזות (כך שהכנתה תהיה זהה להכנת מבחנת אפנדורף המסומנת A-).
- אם בחרתם בשינוי זה, מומלץ לא לשתף את התלמידים בשינוי. תלמידים בקבוצות אלו יסיקו כי בחיידקים מתים שבודדו מגופות אין פלסמידים הנושאים את הגן לעמידות בפני אמפיצילין, בעוד שתלמידים מהקבוצות האחרות יסיקו שבפלסמידים מחיידקים מתים שבודדו קיים גן כזה. ההסבר להבדלים בין התוצאות שיתקבלו בקבוצות השונות הוא שלא בכל החיידקים שבודדו יש פלסמידים הנושאים את הגן לעמידות.
- כדאי להפנות את תשומת ליבם של התלמידים לבופרים השונים בהם אנו משתמשים בניסוי. הבופר במבחנת האנזים TAQ שבו משתמשים בשלב ה-PCR מכיל גם יוני מגנזיום שהם קו-אנזים לאנזים זה.
- לעומתו, הבופר TAE שבמיכל האלקטרופורזה, מוליך חשמל ומונע התקשרות של יוני מגנזיום לאנזים המזרז פירוק DNA.

⁶ אורך של קטע DNA נמדד לפי מספר זוגות הבסיסים החנקניים שבו.

ב. הרצה של דגימות ה-DNA שהוגברו באלקטרופורזה בג'ל (ראו פירוט בנספח 2).
ההרצה תבוצע בשני סבבים. התלמידים משתי קבוצות יטעינו את הדגימות משלוש
המבחנות בג'ל משותף ובו תשע באריות.

הערות:

- בשלב זה הג'ל מונח בתמיסת בופר TAE שדרגת ה-pH שלה היא 8.5-8. תמיסת בופר זו מוליכה חשמל ומונעת התקשרות של יוני מגנזיום לאנזים המזרז פירוק DNA.
- כמפורט בסעיפים ט – יא (בדפי התלמיד), תלמיד אחד יטעין 10μL DNA Ladder בבארית 1 ושאר התלמידים יתחילו לעבוד מסעיף יב ואילך.
- בסעיפים יב – יד (בדפי התלמיד), תלמידים מקבוצה אחת יטעינו בבאריות 2, 3, 4. החל מסעיף טז, תלמידי הקבוצה השנייה יטעינו את הנוזל בבאריות 6, 7, 8.
- כדאי להסב את תשומת לב התלמידים להבדלים משמעותיים בין השימוש באלקטרופורזה בג'ל בתרגיל "קשת צבעים, תרגיל שימוש באלקטרופורזה בג'ל" לבין השימוש בניסוי זה, כגון מיקום באריות, צבע המשטח במכשיר, הוספת SMART GLOW לג'ל, DNA Ladder, קטעי ה-DNA הטעונים שלילית.
- על פי הוראות הבטיחות יש להדליק את נורת הצפייה העשויה לִד רק כאשר המכסה הכתום של המכשיר מונח במסגרת הייעודית לו. ניתן לקרב את מצלמת הטלפון הנייד לחור שבמכסה ולצלם את קטעי ה-DNA בג'ל. הפסים הנראים בתמונה של מסך הטלפון בולטים יותר מאשר הפסים הנראים על פני הג'ל עצמו.

יש להקפיד על ההוראות האלה:

- לפני תחילת הניסוי יש להיעזר ברשימת החומרים שבדפי התלמיד ולוודא כי כל הציוד והחומרים נמצאים על המגשים של התלמידים. בעמדת המורה יהיו המכשירים המשותפים לכל תלמידי הכיתה.
- וודאו כי התלמידים יודעים להשתמש במיקרופיטור ידני (ראו שיעור הכנה "תרגיל הכרת מבנה המיקרופיטור ועקרונות השימוש בו").
- **במשך הניסוי יש להקפיד** כי DNA Ladder, ומבחנות אפנדורף אלה: מים, קטעי ה-DNA (R, A+), התחלים והאנזים TAQ פולימראז, יהיו בקרח.

- חשוב להזכיר לתלמידים להחליף טיפים ע"פ ההנחיות.
- חשוב להזכיר לתלמידים לרשום את שמם בקצה העליון של 3 מבחנות PCR וגם בצדן (במקרה שאחד מהסימונים ימחק).

כללי בטיחות בעבודה עם ציוד וחומר ביולוגי

- יש לנקות את שולחן העבודה, בתחילת הניסוי ובסופו, בנייר טבול באלכוהול 70% ולהמתין עד לייבוש.
- בזמן העבודה יש להשתמש בכפפות, חלוק ומשקפי מגן.
- רצוי לתרגל עם התלמידים עבודה באופן סטרילי כדי למנוע זיהום של ריאגנטים כגון הנחת מיקרופיפטור שבתוכו טיפ על שולחן, לפני השימוש בו ולאחריו.
- יש להקפיד על רחיצת ידיים לאחר טיפול בחומרים ביולוגיים או ריאגנטים.
- חשוב להקפיד ולשמור על כללי הבטיחות בעבודה עם כלים ונוזלים בטמפרטורה גבוהה.
- בתום הניסוי יש להקפיד על טיפול נאות, על פי כללי הבטיחות וההנחיות, בריאגנטים ובכלים המכילים שאריות DNA וחיידקים.

סיכום מהלך הניסוי ותוצאותיו

בתום שלב ההגברה ב-PCR, התלמידים ישתמשו במכשיר אלקטרופורזה בג'ל כדי להשוות בין תבנית ה-DNA של הגן amp^R לעמידות לאמפיצילין (מבחנה A+) לבין DNA מ"זן חיידקים לא ידוע" (מבחנה R), וכך יקבעו האם חיידקים שבודדו מגופם של חברי המשלחת נושאים את הגן amp^R לעמידות לאמפיצילין.

אלקטרופורזה בג'ל היא שיטה להפרדת חומרים השונים במסה המולרית ובמטען החשמלי בתוך ג'ל אגרוז. ההפרדה מבוססת על קצב התנועה של החומרים בג'ל כאשר הם נתונים להשפעת שדה חשמלי. חשוב להזכיר לתלמידים כי ל-DNA מטען חשמלי שלילי ולכן תנועת קטעי ה-DNA תהיה לעבר האלקטרודה החיובית (שאלות הכנה, שאלה 2).

השלב הראשון בעבודה עם מכשיר אלקטרופורזה הוא הטענה של סולם ה-DNA (DNA Ladder), (תמונה 1 עמוד 11) שניתן באמצעותו לאמוד את אורך הגן לעמידות לאנטיביוטיקה (700 bp).

בהמשך התלמידים יעבירו את הנוזל משלוש המבחנות R, A+, A-, יטעינו אותו בשלוש באריות בהתאמה, יפעילו את המכשיר ותתחיל הרצת הדגימות בג'ל (שלב ג הטענה בג'ל, סעיפים ט-יח בדפי התלמיד).

לאחר מספר דקות התלמידים יראו את תוצאות ההגברה של ה-DNA במכשיר האלקטרופורזה בג'ל. התוצאות יראו כפסים כהים בג'ל. הפסים הם מקטעי ה-DNA (הנושאים את הגן ל amp^R) שחדר אליהם הצבע **SMART GLOW** (שאלה 1א, שאלה 1ד).

אנחנו מצפים כי בעמודה A- לא יופיע פס. A- משמש כבקרה שלילית, בקרה זו לא הכילה דגימת DNA. מטרת בקרה זו היא לוודא כי הריאגנטים בניסוי לא היו מזהמים בקטעי DNA. הופעה של פס בעמודה A-, מעידה על כך שיש קטע DNA הנושא את הגן amp^R בתערובת הריאקציה. ניתן להסביר זאת בכך שבריאגנטים היה זיהום של DNA זר בעל גן לעמידות שמקורו משימוש בפיפטה לא נקיה שהייתה מזהמת ב-DNA או מהוצאת נוזל מאפנדורף לא מתאים (שאלה 1ב).

אם תתקבל תוצאה כזו לא ניתן יהיה להסיק כי הופעה של פס ב-DNA הנבדק אכן מעיד על נוכחות של גן עם עמידות לאמפיצילין. (שאלה 2).

אנו מצפים כי בעמודה A+ יופיע פס בודד באורך 700 bp. A+ משמש כבקרה חיובית. ידוע שהוא הכיל גן amp^R אליו התחברו התחלים ולכן הייתה הגברה שלו.

מטרת בקרה זו לוודא כי התחלים מתאימים לרצף ה-DNA בגן, כל מרכיבי ה-MIX TAQ⁷ תקינים וכי תכנית ההגברה ב-PCR תקינה אף היא (שאלה 1ג).

אם לא הופיע פס, יתכן שלא הוכנסו כל הריאגנטים למבחנת הריאקציה או שמכשיר ה-PCR לא עבד כראוי.

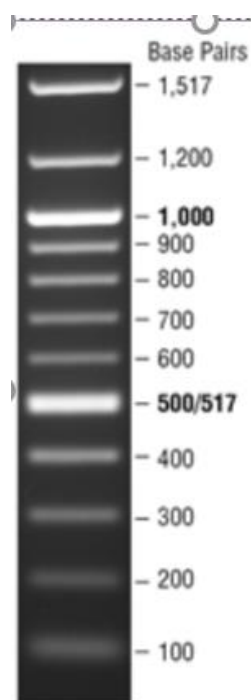
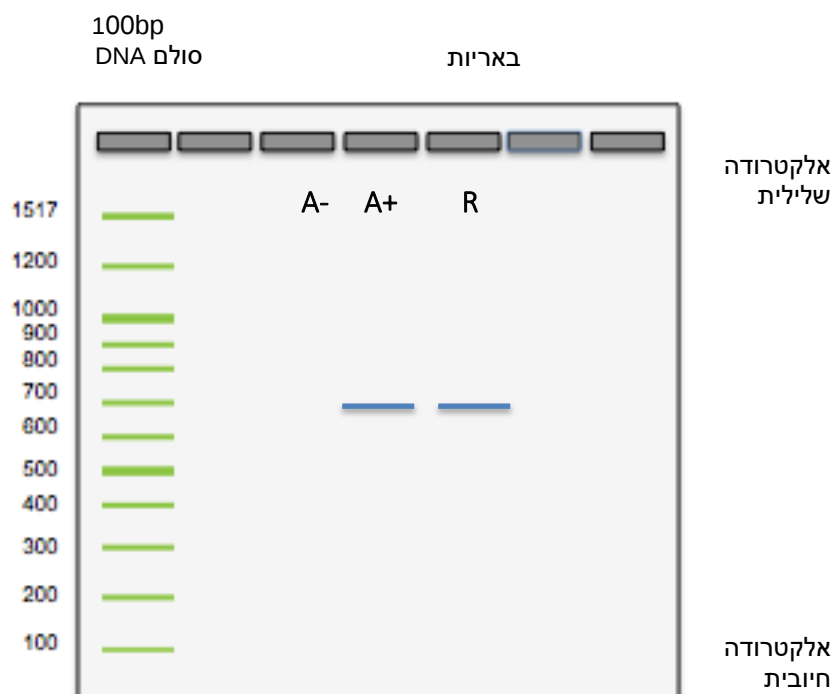
אי הופעה של פס בעמודת הבקרה החיובית A+ היא משמעותית בעיקר כאשר לא מופיע פס בעמודה בה נמצא DNA מפלסמידים לא ידועים (מבחנת R). במקרה זה לא ניתן יהיה להגיע למסקנה כי ב-DNA שנלקח מהחיידקים שנמצאו בגופות יש גן עמיד לאמפיצילין (שאלה 3).

אנו מצפים כי בעמודה R, "זן חיידקים לא ידוע", יופיע פס בודד (זהו באורכו ל-700bp ודומה לפס בעמודת A+) מפני שנמצאים בו פלסמידים הנושאים את הגן amp^R לעמידות לאמפיצילין (שאלה 4).

⁷ תערובת המכילה את האנזים TAQ פולימראז, נוקלאוטידים, בופרים
10

איסוף תוצאות הניסוי

דוגמת הג'ל: קטעי ה-DNA שלהם יש עמידות לאנטיביוטיקה מסוג אמפיצילין.



תמונה 1: דוגמה לסולם של DNA (Ladder DNA)

שאלות העמקה:

- i. קיימות שתי שיטות שניתן לבדוק באמצעותן נוכחות גן לעמידות לאנטיביוטיקה בחיידקים:
- גידול חיידקים בצלחת פטרי שבה מצע גידול ואנטיביוטיקה.
 - באמצעות PCR ואלקטרופורזה בג'ל.
- הסבירו את היתרונות והחסרונות של כל שיטת עבודה לזיהוי חיידקים עמידים לאנטיביוטיקה.

תשובה:

גידול חיידקים על מצע המכיל אנטיביוטיקה	PCR ואלקטרופורזה בג'ל	
תהליך איטי, יש להמתין כ- 24 שעות עד שאפשר לזהות מושבות.	תהליך מהיר מאוד, תוך כשעה וחצי ניתן לקבל מידע אודות תכונות החיידק	זמן שנדרש לביצוע הבדיקה
כלים וחומרים זמינים בהרבה מעבדות, עלות החומרים נמוכה	המכשור והחומרים לא תמיד זמינים ועלותם גבוהה	ציוד וחומרים
נדרשת מימנות בסיסית של עבודה סטרילית, הכנת מצעים וזריעה.	נדרש ידע בתפעול המכשירים	מימנות עבודה

- ii. התבוננו בתוצאות שהתקבלו בעמודות R-I A+, האם ניתן להסיק כי הפלסמידים בשתי עמודות אלה, מקורם מאותו חיידק?

תשובה: לא.

הסבר: פס באורך זהה של 700 bp בשתי העמודות רק מעיד שהגן זהה באורכו אולם אין זה מנבא אם מקור הגן מאותו החיידק.

.... המשך בעמוד 13

iii.

א. חיידקי על ידועים בעמידותם כנגד מספר רב של סוגי אנטיביוטיקה. הסבירו מדוע חיידקים אלו נפוצים דווקא בבתי חולים.

ב. כיום מנסים למצוא חלופות לשימוש בתרופות אנטיביוטיות שיסייעו בהשמדת חיידקי על. לדוגמה:

* שימוש בבקטריופאג'ים (וירוסים תוקפי חיידקים) המתקיפים חיידקים ספציפיים.

* ייצור נוגדנים ייחודיים כנגד רעלן שחיידק מייצר.

* השתלת צואה כאמצעי לדחיקה של חיידקים אלימים.

הסבירו כיצד כל אחת מהחלופות יכולה לסייע בהשמדת חיידקי על.

ג. הסבירו כיצד אזרחים אחראיים צריכים להתנהג על מנת לצמצם את הסיכוי להתפתחות חיידק על (שאלת עמ"ר).

תשובה:

א. חיידקי על הם חיידקים שלהם גנים שונים המקנים עמידות בפני סוגים שונים של אנטיביוטיקה. מקורם של גנים אלו יכולה להיות תוצאה של העברה אופקית של פלסמידים, שכיחות גבוהה של מוטציות וחשיפה לגורם סלקטיבי קיצוני (חולים רבים מקבלים מגוון תרופות אנטיביוטיות בריכוזים גבוהים ולאורך זמן).

ב. בקטריופאגים תוקפים חיידקים ייחודיים וכך מונעים את התרבותם. בדומה למנגנון החיסון הסביל, ניתן לייצר נוגדנים שייצמדו לחלבון הרעלן המופרש מהחיידקים האלימים וימנעו את הפגיעה בתאי המאכסן. במערכת העיכול יש מספר עצום של חיידקים המסייעים לגוף להתמודד עם זיהומיים ממקור חיידקי. השתלת חיידקים צואתיים תגרום לדחיקה תחרותית וכך יפחת מספרם של חיידקי העל במערכת העיכול של האדם המושתל.

ג. לא להשתמש אנטיביוטיקה לטיפול כנגד מחלה הנגרמת על ידי נגיף (שפעת). לא להשתמש באנטיביוטיקה ללא מרשם רופא או לשמור אנטיביוטיקה לטיפול בעתיד. לא לשכנע את הרופא שיתן מרשם לתרופה אנטיביוטית ללא צורך. ליטול את האנטיביוטיקה רק לפי המינון ופרק הזמן שרשם הרופא.

נספח 1: כיצד פועל מכשיר ה-PCR?

בניסוי זה נשתמש במכשיר PCR שבאמצעותו נגביר דגימת DNA. דגימה זו היא התבנית שבה הגן לעמידות לאמפיצילין.

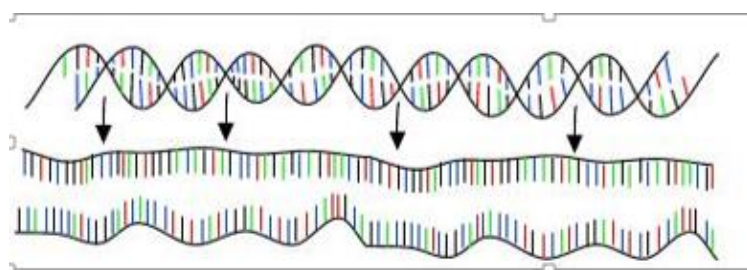
מכניסים לכל מבחנת PCR דגימה של DNA. מוסיפים לכל מבחנה תערובת של שני תחלים יחודיים (תחל שנצמד לקצה ה-3' ומכונה "תחל קדמי" F ותחל שנצמד לכיוון ה-5' המכונה "תחל אחורי" R) (איור 2), וכן תערובת המכונה MIX TAQ המכילה בופר, אנזים DNA פולימראז המוכר כ-TAQ פולימראז ותערובת נוקלאוטידים dNTPS (שאלות הכנה, שאלה 1א). התארכות של גדילי DNA נעשית מכיוון ה-5' לכיוון ה-3' (שלבים א, ב, סעיפים א-ח, בדף לתלמיד).

שלבים במחזור ה-PCR (איורים 1-4 מתוך [Polymerase Chain Reaction Graphics](#))

מחזור PCR בודד כולל שלושה שלבים: שלב דנטורציה (שלב הפרימה), שלב קישור התחלים ושלב ההתארכות (שלב ההגברה) (שאלות הכנה, שאלה 1ב). הגברה בעזרת PCR נעשית על-ידי חזרה על כל שלושת שלבי המחזור 20-30 פעמים. תבנית ה-DNA תוכפל בכל אחד מהמחזורים. אם מתחילים עם מולקולת DNA יחידה, כעבור 20 מחזורים יוצרו למעלה ממילון עותקים על פי הנוסחה (2ⁿ).

שלב ראשון – מתרחש בטמפרטורה של כ-94°C. הטמפרטורה הגבוהה גורמת לפירוק קשרי המימן שבין בין שני גדילים וכך נוצרים 2 גדילים בודדים שמהווים תבנית לבניית הגדיל המשלים. שלב זה מכונה **דנטורציה או פרימה** (איור 1).

איור 1: דנטורציה או פרימה



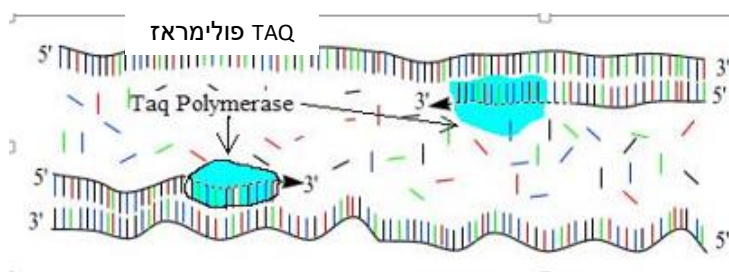
שלב שני- מתרחש בטמפרטורה בין 50°C ל- 70°C . טמפרטורה זו, נקבעת על פי רצף התחל ואורכו ומטרתה לייעל את הקישור של התחלים לתבנית ה-DNA. מפני שתחל חייב להיות משולב בכל מולקולת DNA חדשה שנוצרת, מוסיפים תחלים בכמות גדולה מאוד. הריכוז הגבוה מעלה את תדירות הקשירה של התחל לתבנית ה-DNA ומפחית את הסיכוי ששני גדילים שהופרדו קודם לכן יתחברו. שלב זה מכונה **שלב קישור התחלים** (איור 2).

איור 2: קישור התחלים



שלב שלישי – מתרחש בטמפרטורה של 68°C . מעלים בשנית את הטמפרטורה של המכשיר עד לטמפרטורה המיטבית לאנזים Taq⁸. כמות רבה של האנזימים הללו תסייע לשכפול בזמנית של תבניות ה-DNA שבמבחנה. שלב זה מכונה **שלב ההתארכות או שלב ההגברה** (איור 3).

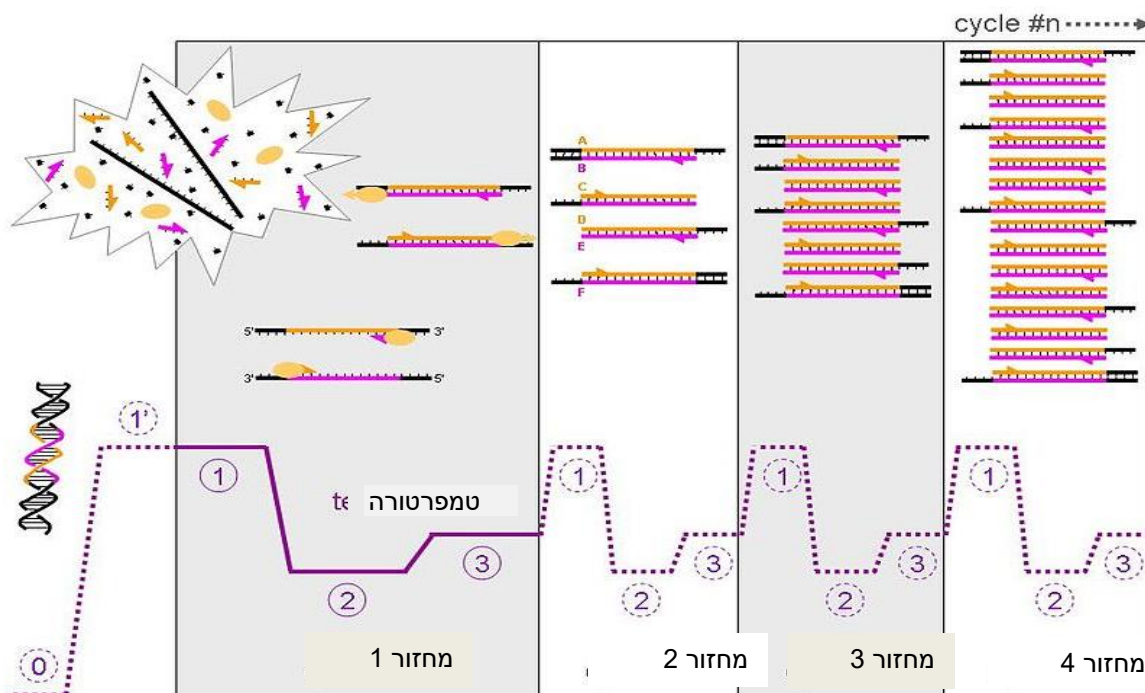
איור 3: התארכות או הגברה



איור 4 (עמוד 16) מדגים את ארבעת המחזורים הראשונים של הגברה בעזרת PCR. שימו לב שכל שמתבצעים יותר מחזורים, מספר תוצרי ה-PCR הרצויים גדל גם הוא.

⁸ טמפרטורה זו ייחודית לאנזים DNA פולימראז זה.
15

איור 4: סכימה של 4 מחזורי PCR



נספח 2: כיצד פועל מכשיר אלקטרופורזה בג'ל?

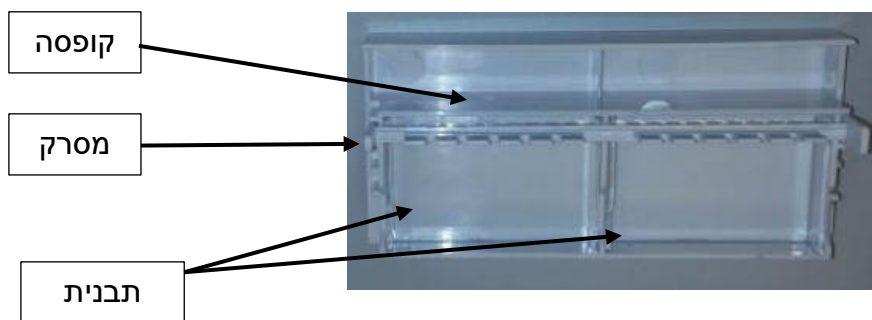
אלקטרופורזה בג'ל (gel electrophoresis) היא שיטה המאפשרת להפריד בין קטעי DNA שונים המצויים בתערובת ולזהות נוכחות של קטעי DNA השווים באורכם על פי מהירות התנועה של אותם קטעים בשדה חשמלי. ההפרדה נעשית בתוך ג'ל אגרז⁹ שהוא חומר מוצק למחצה.

כדי להכין ג'ל יש לערבב את האגרז היבש בבופר TAE ולחמם במיקרוגל לקבלת תמיסת אגרז בריכוז 1%. לאחר שהג'ל מתקרר יש להוסיף תמיסת צבע המכונה SMART GLOW. הצבע שהוסף לג'ל נקשר ל-DNA וצובע אותו וכך מאפשר לנו לעקוב אחרי התקדמות ה-DNA בג'ל. הצבע נקשר ל-DNA בין הבסיסים A – T. הצבע רגיש לאור ומתפרק יחסית מהר (אחרי כשעתיים). מוזגים את הג'ל

⁹ אגרז הוא רב סוכר אותו מפיקים מאצות

לתבנית מפלסטיק. לתבנית זו מכניסים מסרק היוצר את החורים בג'ל המכונים "באריות" (ראו תמונה 2).

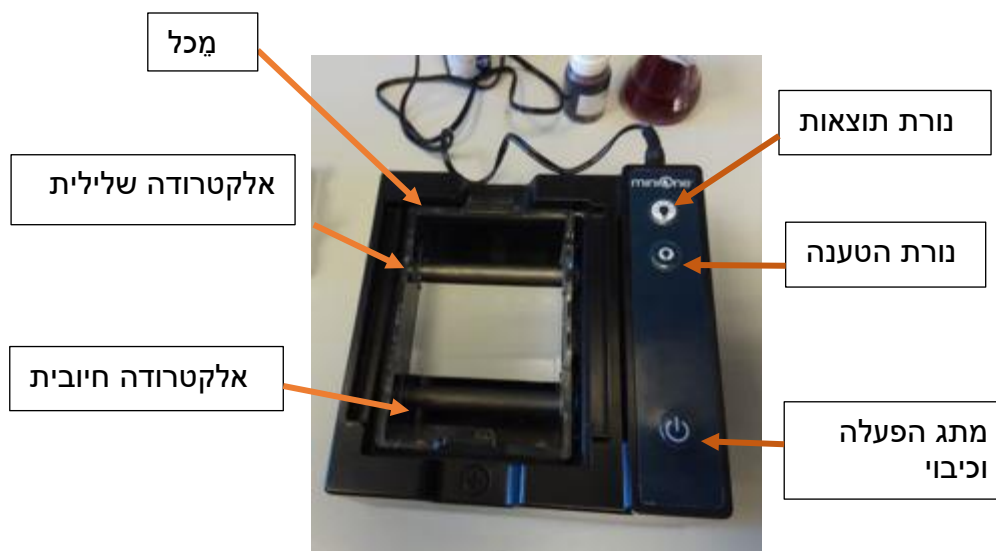
תמונה 2. קופסה להכנת הג'ל והמסרק



יש להניח את התבנית ובה הג'ל בתוך המכל השקוף ולמזוג לתוכו את תמיסת הבופר TAE עד לגובה של כ- 2-1 מ"מ מעל לג'ל.

תמיסת הבופר מאפשרת תנועה של זרם חשמלי בזמן הפעלת המכשיר וכן שומרת על pH תקין בסביבת גדילי ה-DNA. את דגימות ה-DNA מטעינים לבאריות שבג'ל. בזמן ההטענה המכשיר יהיה כבוי, אך מומלץ להדליק את נורת ההטענה המסייעת להבחין במיקום המדויק של הבאריות. בבארית הראשונה מטעינים לרוב את סולם ה-DNA (DNA LADDER) ובבאריות האחרות מטעינים את הבקורות ודגימות ה-DNA (טיפול הניסוי). מכבים את נורת ההטענה, מכסים במכסה המגן מפני נורת הליד שבמכשיר ומדליקים את המכשיר (תמונה 3), (שלב ג הטענה בג'ל, סעיפים ט-יח בדפי התלמיד). כעבור מספר דקות מדליקים את נורת התוצאות, ואז אפשר לראות פסים בג'ל. נורת התוצאות היא נורת לד. על פי הוראות הבטיחות יש להדליק אותה רק כאשר המכסה של המכשיר מונח במסגרת היעודית לו. ניתן לקרב את מצלמת הטלפון הנייד לחור שבמכסה ולצלם את קטעי ה-DNA בג'ל.

תמונה 3: מכשיר אלקטרופורזה בג'ל



נספח 3: מושגים לתלמיד

אנו מאמינים להדפיס את הרשימה בנספח מדפי הניסוי ולהנחות על שולחנות העבודה
ההתלמידים. כך המידע לא יאבד מאנשים העוקרים יהיה זמין להם בזמן העבודה.

א. תבנית DNA

קטע ה-DNA שאותו אנו מעוניינים לשכפל. לקטע זה נקשרים התחלים.

ב. תערובת נוקלאוטידים (dNTPS)

תערובת של ארבעת הנוקלאוטידים שישמשו לבניית גדילי ה-DNA המשלימים.

ג. DNA פולימראז (TAQ)

DNA פולימראז (TAQ), הוא אנזים המזרז שכפול של DNA שמקורו מחיידקים החיים במעינות
חמים. שלא ככל האנזימים (שהם חלבונים) שמאבדים את פעילותם בטמפרטורות גבוהות,
הטמפרטורה המיטבית של DNA פולימראז היא בטווח שבין 70°C ל- 80°C .
תכונה זו של האנזים מאפשרת לו לפעול ביעילות גם בטמפרטורה גבוהה, כמו זו שבמכשיר
ה-PCR.

ד. תחלים (פריימרים) R ו-F

תחל הוא קטע קצר של DNA (כ-20 נוקלאוטידים) המסייע בתהליך שכפול של DNA במבחנה.
רצף הבסיסים החנקניים בתחל מתאים לרצף קצר המצוי בתחילת הגן אותו רוצים לשכפל
(קצה 3') ותחל אחר מתאים לרצף בסיסים חנקניים המצוי בסופו של גן זה (קצה 5').
לכל מבחנת PCR, מוסיפים תערובת של שני תחלים שתוכננו במיוחד עבור הגברת הגן amp^R ,
תחל שנצמד לקצה 3' הוא "תחל קדמי" (F-) ותחל שנצמד לקצה 5' הוא תחל אחורי (R-).
התחל משמש כאתר להתחלת שכפול.

האנזים DNA פולימראז (TAQ) מתחיל את השכפול ממקום הקישור של התחל אל הגדיל של
ה-DNA, והתוצר של פעילותו הוא תבנית ה-DNA.
במבחנת PCR (ראו סעיף ח שלב שני) בהשפעת הטמפרטורה הגבוהה הקשרים בין שני הגדילים
של תבנית ה-DNA נפרמים והתחלים נצמדים לקצוות גדילי ה-DNA בהתאמה. רק לאחר
ההצמדות של התחלים, האנזים המשכפל המצוי בתערובת מזרז קישור של נוקלאוטיד מתאים.
כך נוצר גדיל חדש המשלים את הגדיל הקיים ובסיומו של התהליך נוצרת מולקולת ה-DNA

המבוקשת שהיא תבנית ה-DNA.

ה. מכשיר PCR

מחזור PCR בודד כולל שלושה שלבים:

שלב ראשון: הוא שלב הדנטורציה (הפרדה) המתרחש בטמפרטורה של 94°C . הטמפרטורה הגבוהה גורמת להיפרדות שני גדילי ה-DNA. כך נוצרים 2 גדילים בודדים שכל אחד מהם מהווה תבנית לבניית גדיל המשלים.

שלב שני: הוא שלב קישור התחלים המתרחש בטמפרטורה שבין 50°C ל- 70°C . טווח טמפרטורות אלה נקבע על פי אורך ורצף התחל ומטרתו לייעל את הקישור של התחלים לתבנית ה-DNA.

שלב שלישי: הוא שלב ההגברה (ההתארכות) המתרחש בטמפרטורה של 68°C . טמפרטורה זו מיטבית לפעילותו של האנזים DNA-פולימראז. לשלב זה חיוניים הנוקלאוטידים ויוני מגנזיום המשמשים כקו-אנזים ומצויים בבופר TAQ. ריכוז גבוה של האנזים מסייע לשכפול בזמני של תבניות ה-DNA שבמבחנה.

ו. סולם DNA (DNA Ladder)

תערובת של קטעי DNA באורך ידוע אותה מטעינים בתוך בארית של אלקטרופורזה בג'ל. התערובת מסייעת לקביעת אורך של קטע DNA לא ידוע. את האורך של הקטע מבטאים במספר זוגות נוקלאוטידים (היחידות הן bp).

נספח 4: מקורות מידע

שנת פרסום	הערות	מקור מידע	סוג המידע
2018	התכנים בחוברת מתאימים לתכנית הלימודים המותאמת	סיאני, מ., אשנב לאבולוציה המרכז הארצי למורי ביולוגיה ומורי מדעי הסביבה, תשע"ח 2019	חוברת
2016	התכנים בחוברת מתאימים לתכנית הלימודים המותאמת	כהנא, א., חיידקים ונגיפים בגוף האדם , המרכז הארצי למורי ביולוגיה ומורי מדעי הסביבה, תשע"ז 2016	חוברת
1994	"מרוץ חימוש" מתנהל בין התרופות האנטיביוטיות ובין החיידקים העמידים. מי ינצח?	עצמון, צ., אנטי אנטיביוטיקה גלילאו, כתב עת למדע ומחשבה, גיליון 7, עמ' 18-23 ובאתר עולם החיידקים, האוניברסיטה הפתוחה	מאמר פופולרי
2016	מחקר ישראלי-אמריקאי בהשראה קולנועית גילה בין השאר כי לא תמיד החיידקים העמידים ביותר הם המנצחים בקרבות ההישרדות. הסרטון מציג אבולוציה בפעולה (*).	החיים בסרט: כך החיידקים מפתחים עמידות לאנטיביוטיקה ליתן, נ. מכון דוידסון	מאמר פופולרי וסרטון
2017	הפשרת הקרחונים בעקבות התחממות כדור הארץ חושפת אותנו למחלות שנעלמו מן העולם	Fox-Skelly, j. There are diseases hidden in ice, and they are waking up BBC	מאמר פופולרי
	הטענת דגימות DNA בבאריות שבמכשיר אלקטרופורזה בג'ל. הסרטון מתאים לצפייה של תלמידים ולבורנטים.	DNA electrophoresis sample loading	סרטון
	הסרטון מציג בקצרה את אופן ההגברה במכשיר ה-PCR	עקרונות השימוש ב-PCR	אנימציה
	הרקע ההיסטורי של פיתוח מכשיר PCR והשימושים בו	מבוא ל-PCR	אנימציה

* במשך שנים הייתה מקובלת האסכולה של דרווין על פיה עמידות של חיידקים בפני אנטיביוטיקה היא תוצאה של מוטציות אקראיות והישרדות של הפרטים העמידים