

דף ללבורנט 10.3.25

חיידקים ביוסנסורים

הוראות הכנה למעבדת חקר מיועד למעבדה של 8 זוגות תלמידים.

הקדמה

ניסוי זה מדגים את השימוש בחיידקים כביוסנסורים לזיהוי שינויים סביבתיים. החיידקים עברו הנדסה גנטית וכוללים:

פרומוטור / אתר בקרה רגיש לעקה - מגיב לשינויי טמפרטורה ונוכחות אלוהול.

גן מדווח - מתבטא כאשר החיידק נמצא בתנאי עקה.

מערכת דיווח ויזואלית - שינוי צבע הנראה לעין.

גן בורר – עמידות לאמפיצילין

מטרות הניסוי

הדגמת מערכת ביולוגית מהונדסת גנטית – חיידקים כביוסנסורים.

חקר השפעת תנאי עקה על ביטוי גנים.

התנסות במיומנויות מעבדה מתקדמות.

תוצאות צפויות

במצבי עקה- צבע כחול בעוצמות שונות.

מדרג צפוי- ככל שהעקה חזקה יותר, הצבע יהיה כחול יותר. בתנאי עקה גבוהים מאד החיידקים מתים ולכן לא יתקבל צבע כחול.

הצלחת הבדיקה תלויה ב:

החיידקים צריכים להיות חיים ומשגשגים.

הגן המדווח תלוי בפרומוטור שרגיש לטמפרטורה ולכן יש לדאוג שבמהלך הגידול החיידקים לא

יחשפו לטמפרטורה מעל 30 מעלות צלזיוס.

לחיידקים יש עמידות לאנטיביוטיקה לאמפיצילין ובכך נמנע התפתחות של זיהום במערכת הניסוי על ידי חיידקים אחרים.

1. רשימת ציוד וחומרים

טבלה 1: רשימת הציוד והחומרים שתקבלו בערכה מבר אילן

פריט	כמות	תנאי אחסון	הערות
חיידקי E.coli מהונדסים	צלחת פטרי	4°C	עם הפלסמיד grpE
X-gal	400 µl	-20°C	ריכוז 40 mg/ml, עטוף באלומיניום
אמפיצילין	לפי הצורך	-20°C	ריכוז מלאי 100 mg/ml

2. חומרים להכנה במעבדה

חומר	כמות כוללת	מרכיבים	הערות
מצע LB אגר	200 מ"ל	7 גר' אבקה + מים	ל-7 - 8 צלחות + גיבוי
מצע LB נוזלי לגידול	100 מ"ל	2.5 גר' אבקה + מים	עם אמפיצילין בהנחיות הכנה כתוב 5 גר'
מצע LB נוזלי למיהולים	100 מ"ל	2.5 גר' אבקה + מים	ללא אמפיצילין בהנחיות הכנה כתוב 5 גר'

3. ציוד לכל קבוצה

פריט	כמות	סטריליות	הערות
עט לסימון על זכוכית	1		
מבחנות זכוכית/פלסטיק	10	לעקר	נפח 15 מ"ל
טיפים 1000 µl	4	לעקר	
טיפים 200 µl	10	לעקר	
טיפים 20 µl	20	לעקר	
מחטי זריעה (אפשר ממתכת ולהעביר באש בין כל זריעה או מחטים חד פעמיות סטריליות)	8	סטריילי	
כוס כימית	2	נקי	100 מ"ל
מיקרופיפטור P1000	1		מכיל
מיקרופיפטור P200	1		מכיל
מיקרופיפטור P20			

פרט	כמות	סטריליות	הערות
כזה	1		עם מלאי אלכוהול
צלחות אגר + אמפיצילין אולי הכוונה לצלחות פטרי סטריליות	1 - 2	סטריילי	מוכנות מראש
כפפות, חלוקים, משקפי מגן	1 לכל תלמיד		
כלי מסומן "פסולת" אפשר כוס לשימוש חד פעמי גדולה לאיסוף פסולת	1		
אתנול 70% ונייר סופג לניגוב השולחנות			

טבלה 4: חומרים לכל קבוצה

חומר	הערות
מבחנה ובה 10 מ"ל תרחיף חיידקים מהונדסים	
מבחנה ובה 7 מ"ל אתנול 95%	להכנת מיהולים
מבחנה ובה 7 מ"ל מצע LB נוזלי	להכנת מיהולים
מבחנת אפנדורף ובה X-gal בנפח 60 µl לבדוק כמות	

2. הכנות מקדימות (2-3 ימים לפני)

א. עיקור הכלים

הלבורנטים והתלמידים יעבדו בסביבה סטרילית עד כמה שניתן. על פי כללי הבטיחות. [הדרכות](#)

[והנחיה לעבודה במעבדת מיקרוביולוגיה.](#)

1. הכנת מבחנות מעוקרות:

10 מבחנות לכל קבוצה (לתרחיף חיידקים, למצע LB נוזלי ולאתנול).

הכניסו 10 מבחנות הפוכות לכוס כימית גדולה. סיגרו בנייר אלומיניום והדביקו נייר דבק לסימון

העיקור. הכניסו לאוטוקלב או לתנור ב 150°C למשך שעה.

או: ניתן להשתמש במבחנות מעוקרות מפלסטיק עם פקקים בנפח 15 מ"ל.

2. הכנת ארלנמיירים מעוקרים:

הוראות הכנה: עיקור ארלנמאירים: לוקחים פיסת רדיד אלומיניום, מקפלים ליצירת שכבה כפולה ועוטפים את פתח הארלנמייר. מדביקים נייר דבק לסימון כלים מעוקרים המיועד לאוטוקלאב משני הצדדים של הכלי, ומכניסים לאוטוקלאב. או: הכניסו לתנור ב 150°C למשך שעה.



3. טיפים מעוקרים:

הכינו כוסות כימיות קטנות כמספר הקבוצה. הכניסו טיפים מתאימים (4 טיפים גדולים ל מיקרופיפטור בנפח של 1000 מיקרוליטר ו 10 טיפים קטנים למיקרופיפטור בנפח של 200 מיקרוליטר) לכוס הכימית. סיגרו את הכוס בעזרת רדיד אלומיניום. הדביקו נייר דבק שמסמן שהכלי עוקר. הכניסו לעיקור באוטוקלב. או: ניתן לרכוש טיפים סטריליים.

ב. הכנת צלחות אגר עם אנטיביוטיקה (מתאים ל-8 צלחות פטרי):

הכניסו 7 גרם אבקת LB אגר לארלנמייר בנפח 0.5 - 1 ליטר. הוסיפו 200 מ"ל מים מזוקקים וערבבו. חממו על פלטה חשמלית עם בוחש מגנטי (סטירר) עד לטמפרטורה של 92°C מעלות צלזיוס, תוך כדי ערבוב עד להמסה מלאה של האבקה במים. לאחר ההמסה, יש לעקר את התמיסה באוטוקלב. בסיום העיקור, להמתין עד שהתמיסה תתקרר לטמפרטורה של 60°C (חשוב: אם התמיסה חמה מדי האנטיביוטיקה תתפרק). בטמפרטורה זו להוסיף 200 מיקרוליטר אמפיצילין (חשוב: 1 מיקרוליטר אמפיצילין לכל 1 מ"ל מצע). לערבב בעדינות ולצקת לצלחות פטרי סטריליות. בכל צלחת לצקת כ-20 מ"ל (אפשר לסמן מראש על הצלחת קו בגובה 7 מ"מ שיסמן את גובה המצע הרצוי). להשאיר את הצלחות סגורות בטמפרטורת החדר למשך כשעה עד להתמצקות מלאה של האגר. לאחר ההתמצקות, להפוך את הצלחות (כדי שמים המתעבים לא יטפטפו על המצע) ולאחסן במקרר.

ב. הכנת מצע LB נוזלי:

להוסיף 5 גרם אבקת LB לארלנמייר בנפח 500 מ"ל. הוסיפו 200 מ"ל מים מזוקקים וערבבו. חממו על פלטה חשמלית עם בוחש מגנטי עד להמסה מלאה של האבקה. עקרו באוטוקלב. לאחר העיקור ולאחר שהתמיסה התקררה, חלקו את המצע לשני ארלנמאירים בנפח 250 מ"ל: לארלנמייר הראשון המסומן "גידול החיידקים" העבירו 100 מ"ל LB והוסיפו 100 מיקרוליטר אמפיצילין (1 מיקרוליטר אמפיצילין לכל 1 מ"ל מצע) - מצע זה ישמש לגידול החיידקים. לארלנמייר הנוסף המסומן "מיהולים" העבירו את 100 המ"ל הנותרים, ללא תוספת אנטיביוטיקה - מצע זה ישמש להכנת המיהולים. את שני המצעים לשמור במקרר עד לשימוש.

הערה: בחירת ארלנמייר 500 מ"ל להכנה הראשונית ו-250 מ"ל לחלוקה מבטיחה:

1. נפח פנוי למניעת גלישה בזמן העיקור
2. יחס נוח בין נפח הכלי לנפח הנוזל לאוורור טוב

ג. הכנת תרבית חיידקים (יום לפני)

עבדו בקרבת להבה. עטו כפפות (רצוי סטריליות) על ידיכם.

לארלנמייר נקי בנפח 500 מ"ל הוסיפו 50 מ"ל מצע LB נוזלי מעוקר. להוסיפו 50 מיקרוליטר אמפיצילין (לפי החישוב: 1 מיקרוליטר אמפיצילין לכל 1 מ"ל מצע) וערבבו בעדינות. באמצעות טיפ סטרילי גרדו בעדינות מספר מושבות מצלחת החיידקים המהונדסים שהתקבלה מבר-אילן. השליכו את הטיפ עם החיידקים לתוך הארלנמייר (הטיפ יישאר בתוך הארלנמייר). סגרו את הארלנמייר עם פקק כותנה או פקק אלומיניום רופף כדי לאפשר אוורור. הדגירו באינקובטור בטמפרטורה של 30°C מעלות צלזיוס בדיוק (חשוב: לא לחרוג מטמפרטורה זו) למשך 18-24 שעות.

הערה חשובה: נפח הארלנמייר (500 מ"ל) גדול פי 10 מנפח המצע (50 מ"ל) כדי לאפשר אוורור מספק לגידול החיידקים.

ד. ביום הניסוי

תמיסת X-gal בריכוז 40 מ"ג / מ"ל* פריט זה מגיע בריכוז המתאים 40 מיקרוליטר למ"ל. יש לשמור עטוף ברדיד אלומיניום בהקפאה.

ביום הניסוי הכינו מבחנות אפנדורף ובהן 60 מיקרוליטר X-gal כמספר הקבוצות. עטפו ברדיד אלומיניום ושמרו בקרור עד למועד הניסוי. כמה דקות לפני ביצוע הניסוי חלקו לכל קבוצה מבחנה ובה 60 מיקרוליטר תמיסת X-gal.