



עדכון: 2.1.19

דפים ללבורנט

נושא: טרנספורמציה בתאי חיידק E.Coli

טרנספורמציה היא שינוי מכוון במטען התורשתי של תא שנוצר כתוצאה מהחדרת DNA זר. בניסוי התלמידים יכניסו לתאי חיידק E.Coli פלסמיד מהונדס ששמו "pGFP". בפלסמיד ישנו אזור בקרה שממנו מתחיל שכפול הגנים בפלסמיד (ORI) ושני גנים, הגן GFP, שמקודד לחלבון זוהר, והגן BLA (β לקטאמאז) שמקודד לאנזים המפרק אמפיצילין.

כדי שהפלסמיד יחדור אל תוך תאי החיידקים, החיידקים יעברו טיפול בתמיסת טרנספורמציה (CaCl₂) ובשוק תרמי. לאחר הטרנספורמציה, החיידקים שקלטו את הפלסמיד יתרבו בצלחת פטרי שבה אגר LB ואמפיצילין והם יזהרו בחושך לאחר הארה באור UV. למידע נוסף מומלץ לקרוא בדפים למורה.

הצלחת הניסוי תלויה בהקפדה על ביצוע כל ההנחיות המפורטות בהמשך ובכלל זה גם התייעצות עם המורה והרכז לגבי מועד ביצוע הניסוי ובדיקת התוצאות.

עבודה מדויקת של הלבונט בכל שלבי הביצוע כגון:

- הכנת תמיסות ומצעי גידול בריכוזים המתבקשים,

- הכנת החומרים לפי לוח הזמנים,

- שמירה על טמפרטורה רצויה לפי ההנחיות

- זריעת חיידקים ועבודה בתנאים סטריליים (ראו "[עבודה במעבדה במיקרוביולוגיה](#)" סרט ודפי הנחייה).

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-8 קבוצות של תלמידים שבכל קבוצה יעבדו 2-4 תלמידים (ראו פירוט בעמוד 3).

לפני הזמנת הערכה מבר אילן, חשוב מאד לקרוא בעיון את רשימות הכלים והחומרים אותם יש להכין ואת אלו שכלולים בערכה (עמ' 3 - 7) ולבדוק האם יש לכם בבית הספר את כל שנדרש לביצוע הניסוי. אם חסרים לכם פריטי ציוד חשוב שתרכשו אותם בהקדם אצל ספקי הציוד למעבדות או תבדקו אפשרות לשאול אותם מבית ספר אחר. כך תוכלו לבצע את הניסוי במועד סמוך לקבלת הערכה מבר אילן.

נהלי הזמנת ערכה: את הערכה יש להזמין מהמרכז לפיתוח ותמיכה בבר אילן, כשלושה שבועות לפני המועד שנבחר לביצוע הניסוי עם התלמידים. הלבונט יתקשר למרכז ויבדוק עם הצוות מהו המועד המתאים להגעת שליח מטעם בית הספר. בהתאם להנחיות שהלבונט יקבל, הוא יזמין שליח שיגיע לבר אילן, יקבל את הערכה וימסור אותה ללבונט בבית הספר. **לתשומת לבכם:**

- חשוב לבצע את הניסוי לא יאחר משבועיים מיום קבלת הערכה בבית הספר.
- בית הספר יישא בהוצאות משלוח הערכה מבר אילן או שידאג לנציג מטעמו שיבצע איסוף עצמי.



תמיכה והתארגנות: בכל שאלה הקשורה להכנת הניסוי ניתן להתקשר למרכז לפיתוח ולהתייעץ עם הלבורנטיות שהתמחו בניסוי זה.

בכל שנה תתקיימה במרכז השתלמויות למורים וללבורנטים בנושא ביולוגיה מולקולרית. אנו ממליצים לכם לעקוב באופן שוטף אחר המידע שיתפרסם בנושא זה [באתר המרכז](#).

בטיחות בעבודת ההכנה של הלבורנט ובעבודת המורה והתלמידים: חיידקי E.Coli מזן DH5 α , אותם תקבלו ממרכז הפיתוח והתמיכה יסופקו בצלחת אגר מזין. חיידקים אלה אינם פתוגניים, אך מטעמי זהירות אנו מחויבים **לעבוד עם כל המיקרואורגניזמים במשנה זהירות ובתנאים סטריליים**. לפיכך, כבר בשלב תכנון הניסוי חובה עליכם לקרוא בעיון את הסעיפים הרלוונטיים [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").
ראוי לציין כי הקפדה על ההנחיות כוללת גם את הטיפול בפסולת ביולוגית במהלך הניסוי ובסיומו, ניקוי משטחי העבודה ורחיצת ידיים בסיום העבודה.
הערה: הנחיות ייחודיות לעבודה לפי כללי בטיחות בניסוי כלולות במסמך זה ובדפים לתלמיד.

בטבלאות ובנספחים שבעמודים הבאים מוצג מידע על ההתארגנות לקראת ביצוע הניסוי:
בטבלה 1, מידע על הפריטים שבערכה שתסופק על ידי המרכז לפיתוח ותמיכה בבר אילן (עמ' 3).
בטבלה 2, מידע על הצידוד שימצא על שולחן המורה בעת ביצוע הניסוי (עמ' 4).
בטבלה 3, מידע על הכלים והחומרים שהלבורנט צריך כדי להכין את כל הנדרש לכיתה ולכל קבוצת תלמידים (עמ' 5).
בנספח 1, רשימת כלים וחומרים לשיעור הכנה ותרגול לתלמידים.
בנספח 2, מידע על טיפול באקונומיקה בסיום הניסוי.

לידיעתכם:

יש להשתמש באוטוקלאב או סיר לחץ להכנת פריטים 1, 2, 3, 5.
חשוב להפעילם על פי הוראות הבטיחות של היצרן!



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

שימוש בפריט בטבלה 3	לוח זמנים לעבודה עם הפריט	תנאי אחסון וזמן מתאים לאחסון	לקבוצת תלמידים (ראו פרוט בטבלאות 2, 3) כלים וחומרים
2	7 ימים עד יממה לפני ביצוע הניסוי	שמירה בתא ההקפאה של המקרר	מבחנת אפנדורף ובה 1 מ"ל תמיסת אמפיצילין בריכוז של 100mg/ml. המבחנה פקוקה ומסומנת "אמפיצילין"
2		שמירה בטמפ' החדר.	כלי ובו 14 גרם אגר LB (אבקה). מתאים להכנת 400 מ"ל אגר LB. הכלי פקוק ומסומן "14 גרם אגר LB"
1		שמירה בטמפ' החדר	כלי ובו 7 גרם אגר LB (אבקה). מתאים להכנת 200 מ"ל אגר LB. הכלי פקוק ומסומן "7 גרם אגר LB"
3		שמירה בטמפ' החדר	כלי ובו 0.8 גרם אבקת LB. הכלי סגור ומסומן "0.8 גרם LB" (לשימוש כ- 24 שעות לפני ביצוע הניסוי)
5	ביום הניסוי	שמירה בטמפ' החדר	כלי ובו 6 מ"ל תמיסת CaCl_2 סטרילית בריכוז 1M. הכלי פקוק ומסומן "תמיסת טרנספורמציה" (לשימוש כשעתיים לפני ביצוע הניסוי)
3		שמירה במקרר בטמפ' 4°C.	צלחת פטרי קטנה שבה אגר מזין LB שעליו נזרעו חיידקי E.Coli מזן DH5α. הצלחת מסומנת "E.Coli" (לשימוש כשעתיים לפני ביצוע הניסוי)
12		שמירה בתא ההקפאה של המקרר	מבחנת אפנדורף ובה 20μl פלסמיד pGFP בריכוז 100 ng / 1μl מסומנת "פלסמיד" (להוציא מההקפאה 15 דקות לפני הניסוי)
11	על פי ההנחיות בפריטים		16 מבחנות אפנדורף עם מכסה: 8 מבחנות בצבע אחד ו-8 מבחנות בצבע אחר
10			כן מבחנות לאפנדורף



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

שם הפריט	הערות
פלסמיד pGFP במבחנת אפנדורף מסומנת "פלסמיד"	בערכה מבר אילן, במגש על שולחן המורה ראו פריט 12
8 מחטי זריעה סטריליות אז: מיקרופיפטור (פיפטור ידני) בנפח 20 מיקרוליטר + 8 טיפים סטריליים	במגש על שולחן המורה. מיועד להעברת הפלסמיד מהבקבוק אל מבחנת אפנדורף של כל קבוצה. ראו פריט 13
אמבט בטמפ' 42°C + מד טמפרטורה	על שולחן המורה. מיועד להכנסת כן מבחנות אפנדורף ובו מבחנות. ראו פריט 9
פיסות צמר גפן + בקבוק סגור ופקוק ובו כוהל 70% לחיטוי*	במגש על שולחן המורה. מיועד לחיטוי השולחנות. ראו פריט 20
גליל נייר דבק	במגש על שולחן המורה. ישמש להדבקת הצלחות בסוף הניסוי
פנס UV	במגש על שולחן המורה, לבדיקת תוצאות הניסוי לשימוש של המורה בלבד! ראו פריט 16

לתשומת לבכם:

לפני תחילת העבודה חשוב מאוד לנקות את שולחן העבודה של הלבורנט בכוהל 70%.
לאחר שהכוהל יתייבש, על פי הצורך יש לעבוד בקרבת להבה דולקת.

בתום העבודה יש לנקות את המשטח בכוהל ולעקר את הציוד על פי ההנחיות ב
"[חוזר המנכ"ל החדש והמעודכן לבטיחות במעבדה מרץ 2015](#)", הבטחת הבטיחות
במעבדות עמ' 48 - 50.



טבלה 3: רשימות הכלים והחומרים

לפריטים המסומנים בכוכבית (*) יש הסבר / פירוט ברשימת ההערות.

למשל: **לפכט:**

- יש לפצץ ציקור (סטריליזציה) באוטוקלב או בסיר לחץ, תוך הקפדה על כלי הבטיחות של היצרן.
- בהכנת פריט 1 - 5 יש לעבוד בקרבת אש ולקפיד על ההנחיות בדפיט האלו. את "עבודה במעבדה במיקרוביולוגיה".

מספר פריט	תיאור פריטים ורשימת הצידוד והחומרים הנדרשים להכנתם	כמות לכיתה	כמות לקבוצה: 2 - 4 תלמידים
1*	צלחת פטרי גדולה מסומנת "2" ובה אגר LB להכנה שבעה ימים עד שלושה ימים לפני הניסוי - 7 גרם אגר LB (בערכה מבר אילן) - 200 מ"ל מים מזוקקים - 8 צלחות פטרי גדולות וסטריליות - בקבוק ארלנמאייר בנפח 0.5 ליטר, מסומן "אגר LB" - פקק לבקבוק (עשוי צמר גפן עטוף בנייר אלומיניום) - פלטה לחימום + סטירר מגנטי (לא חובה) - אוטוקלב או סיר לחץ	8	1
2*	צלחת פטרי גדולה מסומנת "1" ובה אגר LB/AMP צלחת פטרי גדולה מסומנת "3" ובה אגר LB/AMP להכנה שבעה ימים עד שלושה ימים לפני הניסוי - 14 גרם אגר LB (בערכה מבר אילן) - 400 מ"ל מים מזוקקים - 16 צלחות פטרי גדולות וסטריליות - בקבוק ארלנמאייר בנפח 1 ליטר, מסומן "אגר LB/AMP" - פקק לבקבוק (עשוי צמר גפן עטוף בנייר אלומיניום) - פלטה חימום + מגנט סטירר (לא חובה) - 1 מ"ל תמיסת אמפיצילין בריכוז של 100mg/ml במבחנת אפנדורף פקוקה ומסומנת אמפיצילין (בערכה מבר אילן) - אוטוקלב או סיר לחץ	8 8	1 1



מספר פריט	תיאור פריטים ורשימת הציוד והחומרים הנדרשים להכנתם	כמות לכיתה	כמות לקבוצה: 4 - 2 תלמידים
*3	מצע מזון LB נוזלי במבחנה מסומנת "תרחיף חיידקים" הכנת הפריט תתבצע בשני שלבים שיבוצעו בהבדל זמנים. שלב א: מבחנה ובה מצע מזון LB נוזלי (להכנה 24 שעות לפני ביצוע הניסוי) - 0.8 גרם LB (בערכה מבר אילן) - 40 מ"ל מים מזוקקים - בקבוק ארלנמאייר בנפח 100 מ"ל, מסומן "LB" - פקק לבקבוק (עשוי צמר גפן עטוף בנייר אלומיניום) - 8 מבחנות סטריליות מפלסטיק, מסומנות "תרחיף חיידקים" + 8 פקקים מתאימים - פיפטה סטרילית בנפח 2 מ"ל או 5 מ"ל או 10 מ"ל + פרופיטה מתאימה - אוטוקלב או סיר לחץ שלב ב: מבחנה ובה תרחיף חיידקים במצע נוזלי (להכנה שעותיים לפני הניסוי) - צלחת קטנה עם אגר LB המסומנת "E.Coli" המכילה חיידקי E.Coli - מזון DH5α (בערכה מבר אילן) - מחט זריעה סטרילית - כוס כימית בנפח 200 – 400 מ"ל, מסומנת "כוס למבחנות"	8	1
*4	מצע מזון LB נוזלי במבחנה מסומנת "LB" להכנה 24 שעות לפני הניסוי - 24 מ"ל מצע מזון LB נוזלי (שנותר מפריט 3 שלב א) - 8 מבחנות סטריליות מפלסטיק + 8 פקקים, מסומנות "LB" - פיפטה סטרילית בנפח 2 מ"ל או 5 מ"ל או 10 מ"ל + פרופיטה מתאימה	8	1



מספר פריט	תיאור פריטים ורשימת הציוד והחומרים הנדרשים להכנתם	כמות לכיתה	כמות לקבוצה: 4 - 2 תלמידים
*5	תמיסת נוזל טרנספורמציה בריכוז 0.1M במבחנה המסומנת "TRAN" הכנת הפריט תתבצע בשני שלבים שיבוצעו בהבדל זמנים שלב א: מים סטריליים (להכנה שבעה ימים עד יום לפני הניסוי) - 54 מ"ל מים מזוקקים - בקבוק ארלנמיייר בנפח 100 – 250 מ"ל - פקק לבקבוק (עשוי צמר גפן עטוף בנייר אלומיניום) - אוטוקלב או סיר לחץ שלב ב: תמיסת טרנספורמציה מהולה (להכנה שעתיים לפני ביצוע הניסוי) - 54 מ"ל מים סטריליים (שהכנתם בשלב א) - כלי ובו 6 מ"ל תמיסת טרנספורמציה בריכוז 1M (בערכה מבר אילן) - 8 מבחנות סטריליות מפלסטיק + 8 פקקים - פיפטה סטרילית בנפח 10 מ"ל + פרופיטה מתאימה	8	1
*6	פיפטה סטרילית בנפח 5 מ"ל + פרופיטה מתאימה	8	1
*7	5 פיפטות פסטר סטריליות מפלסטיק בנפח 1 מ"ל א: מיקרופיטור (= פיפטור ידני) בטווח שבין 100 – 1000 מיקרוליטר + 5 טיפים סטריליים.	40	5
*8	קרח כתוש בכלי המסומן "אמבט קרח"	8	1
*9	אמבט מים כיתתי + מד טמפרטורה	1	---
*10	כֵּן למבחנות אפנדורף	8	1
*11	מבחנות אפנדורף בשני צבעים: 8 מבחנות בצבע אחד ו-8 מבחנות בצבע אחר	16	2
*12	פלסמיד pGFP במבחנת אפנדורף מסומנת "פלסמיד"	1	----



מספר פריט	תיאור פריטים ורשימת הציוד והחומרים הנדרשים להכנתם	כמות לכיתה	כמות לקבוצה: 4 - 2 תלמידים
*13	8 מחטי זריעה סטריליות (למורה) א: מיקרופיפטור + 8 טיפים מתאימים	8	1
14	מחט זריעה סטרילית לתלמיד	8	1
15	מקל דריגלסקי סטרילי	16	2
*16	פנס UV	1	---
17	עט לסימון על זכוכית	8	1
*18	שעון קיר עם מחוג שניות	1	----
*19	כלי בנפח כ- 500 - 750 מ"ל המסומן "כלי פסולת"	8	1
*20	פיסות צמר גפן + בקבוק סגור ופקוק ובו כוהל 70% לחיטוי		
21	משקפי מגן	32	8
22	4 - 2 זוגות כפפות לטקס		זוג לכל תלמיד

הערות לפריטים מהרשימה שסומנו *

פריט 1: צלחת פטרי גדולה מסומנת "2" ובה אגר LB

להכנה שבעה ימים עד שלושה ימים לפני הניסוי

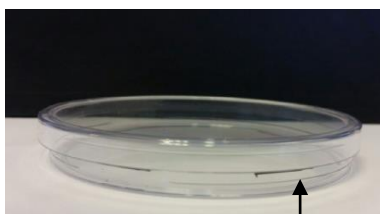
א. לרשותכם 8 צלחות פטרי סטריליות.

- מבלי לפתוח את מכסה הצלחות, השתמשו בעט דק לסימון שאינו מחיק וסמנו קו על דופן החלק התחתון של כל צלחת (ראו איור 1).

סימון זה יאפשר לכם למזוג נפח קבוע של אגר בכל צלחת.

- רשמו בשולי החלק התחתון של כל הצלחות: "צלחת 2", ו-"LB".

- הניחו את הצלחות על שולחן העבודה, כך שלאחר העיקור יהיה נוח למזוג אגר בכל צלחת.



סימון קו על צלחת אגר



- ב. העבירו 7 גרם אגר LB לבקבוק ארלנמיייר בנפח 0.5 ליטר והוסיפו 200 מ"ל מים מזוקקים.
- העבירו את הבקבוק לפלטת חימום, הוסיפו לבקבוק את המגנט (סטירר) וחממו תוך ערבוב עד להמסת האגר (אין צורך לחמם עד להרתחה).
- הערה:** אם אין לכם פלטת חימום תוכלו לחמם על להבה נמוכה של גז ולבחוש היטב.
- ג. הכינו פקק לבקבוק (צמר גפן עטוף בנייר אלומיניום) , והעבירו את הבקבוק לעיקור, באוטוקלב או בסיר לחץ.
- לתשומת לבכם:** יש לשמור על הוראות הבטיחות ולעבוד על פי הוראות היצרן.
- ד. לאחר סיום תהליך העיקור, המתינו כ- 15 דקות עד שהנוזל בבקבוק יתקרר עד לטמפרטורה $50^{\circ}\text{C} - 45^{\circ}\text{C}$.
- השתמשו בכפפה, הוציאו את הבקבוק בזהירות מהאוטוקלב או מסיר לחץ והניחו אותו על השולחן.
- ה. ביד אחת פתחו באופן חלקי את מכסה הצלחת (כך שיהיה בזווית של כ- 45°) וביד השנייה אחזו בבקבוק.
- מזגו אגר לכל צלחת עד לסימון שעל שולי החלק התחתון של הצלחת (ראו איור 1). סגרו את המכסה.
- ו. לאחר שהאגר נקרש, הפכו את הצלחות והניחו אותן על השולחן (כך שהמכסה יהיה צמוד לשולחן) כדי שטיפות מים לא יתעבו על האגר.
- ז. הכניסו את הצלחות לשקית המקורית ושמרו במקרר. כשעתיים לפני ביצוע הניסוי הוציאו את הצלחות מהמקרר.

פריט 2: צלחת פטרי גדולה מסומנת "1" ובה אגר LB/AMP

צלחת פטרי גדולה מסומנת "3" ובה אגר LB/AMP

להכנה שבעה ימים עד שלושה ימים לפני הניסוי

- א. לרשותכם 16 צלחות פטרי שבכל אחת מהן תכינו אגר LB/AMP.
- חזרו על ההוראות בפריט 1 סעיף א עם 16 הצלחות אך סמנו אותן כך:
- * בשולי החלק התחתון של 8 צלחות: "צלחת 1", "LB/AMP",
- * בשולי החלק התחתון של 8 צלחות: "צלחת 3", "LB/AMP".
- הניחו את הצלחות על שולחן העבודה, כך שיהיה לכם נוח למזוג את האגר לכל צלחת.
- ב. העבירו 14 גרם אגר LB לבקבוק ארלנמיייר בנפח 1 ליטר והוסיפו 400 מ"ל מים מזוקקים.
- ג. העבירו את הבקבוק לפלטת חימום, הוסיפו את המגנט (סטירר) וחממו תוך ערבוב עד להמסת האגר (אין צורך לחמם עד להרתחה).
- הערה:** אם אין לכם פלטת חימום תוכלו לחמם על להבה נמוכה של גז ולבחוש היטב.
- ד. הכינו פקק לבקבוק (צמר גפן עטוף בנייר אלומיניום), והעבירו את הבקבוק לעיקור, באוטוקלב או בסיר לחץ.
- לתשומת לבכם:** יש לשמור על הוראות הבטיחות ולעבוד על פי הוראות היצרן.
- ה. לאחר סיום תהליך העיקור, המתינו כ- 15 דקות עד שהנוזל בבקבוק יתקרר עד לטמפרטורה $50^{\circ}\text{C} - 45^{\circ}\text{C}$.
- השתמשו בכפפה, הוציאו את הבקבוק בזהירות מהאוטוקלב או מסיר לחץ והניחו אותו על השולחן.



- ו. פתחו את הפקק, העבירו את פתח הבקבוק בלהבה. הוסיפו לאגר את 1 מ"ל תמיסת אמפיצילין שבכלי (בערכה מבר אילן) וערבבו בזהירות.
- ז. ביד אחת פתחו באופן חלקי את מכסה הצלחת (כך שיהיה בזווית של כ-45°) וביד השנייה אחזו בבקבוק.
- מזגו אגר לכל צלחת עד לסימון שעל שולי החלק התחתון של הצלחת (ראו איור 1). סגרו את המכסה.
- ח. לאחר שהאגר נקשר, הפכו את הצלחות והניחו אותן על השולחן (כך שהמכסה יהיה צמוד לשולחן) כדי שטיפות מים לא יתעבו על האגר.
- הכניסו את הצלחות לשקית המקורית ושמרו במקרר. כשעתיים לפני ביצוע הניסוי הוציאו את הצלחות מהמקרר.

פריט 3: מצע מזון LB נוזלי במבחנה מסומנת "תרחיף חיידקים"

שלב א: להכנה 24 שעות לפני ביצוע הניסוי

- א. העבירו את כל אבקת LB (בערכה מבר אילן) לארלנמייר בנפח 100 או 250 מ"ל.
- הוסיפו לבקבוק 40 מ"ל מים מזוקקים,
- ב. העבירו את הבקבוק לפלטת חימום, הוסיפו את המגנט וחממו תוך ערבוב עד להמסת LB.
- (אין צורך לחמם עד להרתחה).
- הערה:** אם אין לכם פלטת חימום תוכלו לחמם על להבה נמוכה של גז ולבחוש היטב.
- ג. פקקו את הבקבוק בפקק מתאים (צמר גפן עטוף בנייר אלומיניום) והעבירו את הבקבוק לעיקור, באוטוקלב או בסיר לחץ למשך 20 דקות
- לתשומת לבכם:** יש לשמור על הוראות הבטיחות ולעבוד על פי הוראות היצרן
- ד. לאחר הוצאת הבקבוק המתינו להתקררות הבקבוק והנוזל.
- לרשותכם 8 מבחנות סטריליות, רשמו על כל אחת מהמבחנות "תרחיף חיידקים" (שימו לב: בשלב ב תוסיף למבחנה זו גם חיידקים).
- ה. באמצעות פרופיטה (בצבע ירוק) ופיפה סטרילית בנפח של 2 מ"ל (או 5 מ"ל)
- העבירו 2 מ"ל מצע מזון למבחנה ופקקו אותה היטב. העבירו את המבחנה לכוס המסומנת "כוס למבחנות"
- באותו אופן הכינו את המבחנות האחרות.

הערות:

- * שעתיים לפני ביצוע הניסוי העבירו חיידקים למצע המזון (כמתואר בשלב ב בפריט זה)
- * ביתרת מצע המזון הנוזלי שאותו עיקרתם בשלב א תשתמשו להכנת פריט 4.

../עמ' 11 (שלב ב)



שלב ב: להכנה שעתיים לפני ביצוע הניסוי

- א. היעזרו במחט זריעה סטרילית והעבירו צבר של מושבות בודדות מהצלחת עם החיידקים (בערכה מבר אילן) למבחנה "תרחיף חיידקים" ובה 2 מ"ל תמיסת LB סטרילית שהכנת בשלב א.
 - ב. באמצעות מחט הזריעה ערבבו את הנוזל במבחנה (כך שהמושבות יעברו לנוזל). פקקו את המבחנה.
 - ג. העבירו המבחנה לכוס המסומנת "כוס למבחנות".
 - ד. באותו אופן הכינו עוד 7 מבחנות.
 - ה. הדגירו את כל המבחנות עם החיידקים במשך שעתיים בטמפרטורה 37°C .
- אם אין ברשותכם אינקובטור או תנור, תוכלו להכניס את הכוסות בהן המבחנות לאמבט מים, ומדי פעם לדאוג להוסיף מים פושרים, עד לקבלת טמפ' קרובה ל 37°C .

פריט 4: מצע מזון LB נוזלי במבחנה מסומנת "LB" להכנה 24 שעות לפני הניסוי

- בפריט 3 הכנתם 40 מ"ל מצע מזון "LB" נוזלי והשתמשתם רק ב – 16 מ"ל.
- א. באמצעות עט לסימון על זכוכית רשמו "LB" על כל אחת מ – 8 המבחנות הסטריליות.
 - ב. בעזרת פיפטה סטרילית בנפח 5 מ"ל העבירו לכל מבחנה 2 מ"ל תמיסת מזון "LB". פקקו את המבחנות, והציבו כל מבחנה בכוס המסומנת "כוס למבחנות".

פריט 5: תמיסת נוזל טרנספורמציה בריכוז 0.1M במבחנה המסומנת "TRAN"

שלב א: להכנה שבעה ימים עד יום אחד לפני ביצוע הניסוי בעת הכנת פריט זה הקפידו לעבוד בסביבה סטרילית.

- א. רשמו "מים סטריליים" על בקבוק ארלנמייר בנפח 100 – 250 מ"ל.
 - ב. העבירו 54 מ"ל מים מזוקקים לבקבוק ופקקו אותו בפקק מתאים (צמר גפן עטוף בנייר אלומיניום)
 - ג. העבירו את הבקבוק לעיקור באוטוקלב או בסיר לחץ.
- לתשומת לבכם:** יש לשמור על הוראות הבטיחות ולעבוד על פי הוראות היצרן.

../ עמ' 12 (שלב ב)



שלב ב: להכנה שעתיים לפני ביצוע הניסוי

- א. לקבלת תמיסת טרנספורמציה בריכוז $0.1M$, העבירו 6 מ"ל נוזל טרנספורמציה ל- 54 מ"ל מים סטריליים בבקבוק שהכנתם בשלב א.
- ערבבו קלות את התמיסה המהולה.
- ב. באמצעות עט לסימון על זכוכית רשמו "TRAN" על כל אחת מ- 8 המבחנות הסטריליות.
- ג. באמצעות פיפטה סטרילית בנפח של 10 מ"ל העבירו 6 מ"ל נוזל טרנספורמציה בריכוז $0.1M$ מהבקבוק למבחנה סטרילית, פקקו את המבחנה.
- ד. העבירו את המבחנה לכוס המסומנת "כוס למבחנות".
- ה. באותו אופן הכינו את המבחנות האחרות.

פריט 6: פיפטה סטרילית בנפח 5 מ"ל + פרופיפטה מתאימה

אפשר להשתמש בפיפטה מזכוכית או בפיפטה מכוילת לשימוש חד פעמי (מפלסטיק)..
ניתן לרכוש אריזה של פיפטות שלכל אחת מהן אריזה נפרדת.
יש לצרף פרופיפטה **בצבע ירוק** המתאימה לפיפטה של 5 מ"ל .

לתשומת לבכם:

כשפרופיפטה מתיישנת, טבעת הגומי שאליה מכניסים את הקצה העליון של הפיפטה נעשית נוקשה ולכן אחיזת הפיפטה רופפת. מצב זה אינו מאפשר עבודה מדויקת.



במקרה כזה, כאשר מעלים נפח מסוים של נוזל, הנוזל "בורח" מהפיפטה עוד בטרם המשתמש משחרר את הנוזל. לפיכך, בזמן הכנת הציוד לכל ניסוי, יש לבדוק את הפרופיפטות ולתת לתלמידים רק פרופיפטות תקינות.

פריט 7: 5 פיפטות פסטר סטריליות מפלסטיק בנפח 1 מ"ל

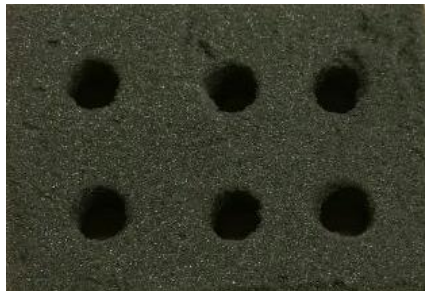
פיפטות אלה מיועדות לשימוש חד פעמי וכל אחת מהן ארוזה בנפרד.

13 עמ' /..



פריט 9: אמבט מים כיתתי + מד טמפרטורה

- א. בחרו כלי שניתן להכניס אליו בו זמנית 2 – 3 כנים של מבחנות אפנדורף. טמפרטורת המים בכלי צריכה להיות 42°C .
- השתמשו במד טמפרטורה והקפידו שהטמפרטורה תהיה קבועה כל עוד יש תלמידים שעליהם לבצע את סעיף טו.
- ב. מדדו את טמפרטורת המים במד טמפרטורה ואם הטמפרטורה גבוהה יותר מ- 42°C או נמוכה יותר, הוסיפו מעט מי ברז פושרים או מים חמים.
- אם נדרשת הוספת מים לאמבט, עשו זאת כשאין בתוכו מבחנות אפנדורף.
- ג. וודאו שכל קבוצה תגיע אל האמבט כשהמבחנה שלהם נמצאת בתוך כן המבחנות שלהם.
- ד. הנחו את התלמידים שיקפידו על כך שמשך השהיה באמבט יהיה בדיוק 60 שניות. שמירה על טמפרטורה של 42°C חיונית להצלחת הניסוי.



פריט 10: כן למבחנות אפנדורף

- בערכה מבר בערכה מבר אילן קיבלתם כן למבחנות.
- השקעים בכך זה מתאימים למימדיה של מבחנת אפנדורף.

פריט 11: מבחנות אפנדורף בשני צבעים

- בערכה שקיבלתם מבר אילן יש מבחנות אפנדורף בשני צבעים: 8 מבחנות בצבע אחד ו-8 מבחנות בצבע אחר.
 - א. כל קבוצה תקבל 2 מבחנות, כל מבחנה בצבע שונה.
 - הצבע השונה אינו מחליף את הרישום על כל מבחנה, אך נועד לסייע לתלמידים לא להתבלבל.
 - ב. לפני הניסוי רשמו על הלוח:
- | | |
|--------------------------|--------------|
| מבחנת אפנדורף בצבע | תשמש ל pGFP+ |
| מבחנת אפנדורף בצבע | תשמש ל pGFP- |
- השלימו את הצבע שיהיה לכל מבחנה.
 - כך הסימון בכל הקבוצות יהיה זהה ויקל על התלמידים לזהות את המבחנות.

פריטים 12 + 13 (ללברנט או למורה בשעת ביצוע הניסוי)

- פריט 12: פלסמיד pGFP במבחנת אפנדורף מסומנת "פלסמיד"
- פריט 13: מחט זריעה סטרילית לכל קבוצת תלמידים (סה"כ 8 מחטים)
- א. 15 דקות לפני ביצוע הניסוי הוציאו מתא ההקפאה את הבקבוק שבו הפלסמיד.
- בסעיפים ב-ה תעבירו כמות זעירה של פלסמיד אל מבחנת האפנדורף של כל קבוצה.



- ב. על פי בקשת התלמידים, העבירו באמצעות מיקרופיטור 2 מיקרוליטר פלסמיד ממבחנת אפנדורף שבה הפלסמיד (פריט 12) אל מבחנת האפנדורף pGFP+ של קבוצת התלמידים.
- ג. אם אין ברשותכם מיקרופיטור:
✓ הוציאו מחט זריעה מהאריזה (שימו לב: החזיקו בלולאת הזריעה ולא ב"ידית")
✓ טבלו את הידית של מחט זריעה סטרילית במבחנת אפנדורף שבה הפלסמיד, וטבלו אותה בנוזל שבמבחנת האפנדורף pGFP+ של קבוצת התלמידים.
- ד. העבירו לכלי פסולת את הטיפ של המיקרופיטור או את מחט הזריעה שבה השתמשתם.
- ה. חזרו על הוראות סעיפים ב – ד והעבירו פלסמיד למבחנת אפנדורף של כל אחת מ- 7 הקבוצות האחרות של התלמידים, עם טיפ סטרילי של מיקרופיטור או עם מחט זריעה סטרילית
- שימו לב: בכל העברה של פלסמיד חשוב להשתמש בטיפ סטרילי או במחט זריעה סטרילית חדשה.

פריט 16: פנס UV

באמצעות הפנס יש להאיר בחדר חשוך רק על צלחות הפטרי.
- הפנס יהיו בידי המורה שישתמש בו תוך נקיטת אמצעי זהירות.

פריט 18: שעון קיר

חשוב שהתלמידים ממקום מושבם יוכלו לעקוב אחר מחוג השניות (או אחר התצוגה בשעון דיגיטלי).
בסעיף טו בדפי הניסוי לתלמיד יש הוראה להכניס את מבחנות הניסוי לאמבט בו הטמפ' היא 42°C למשך 60 שניות בדיוק.

פריט 19: כלי מסומן "פסולת"

התלמידים יניחו את כל הכלים שבאו במגע עם החומר הביולוגי כגון פיפטות פסטר, מחט זריעה סטרילית, צלחת אגר זרועה בחיידקים, כפפות. הכלים והנוזלים יעברו עיקור ע"פ ההוראות ב**דפי הנחיה** לניסויים במיקרוביולוגיה.

פריט 20: פיסות צמר גפן + בקבוק סגור ופקוק ובו כוהל 70% לחיטוי

- א. לפני תחילת הניסוי וודאו שאין מקור אש בחדר המעבדה.
- מסרו לתלמידים פיסות צמר גפן טבולות בכוהל 70% והנחו אותם לחטא את משטח העבודה שלהם. לאחר החיטוי יש להמתין לייבוש המשטח.
- ב. בסיום הניסוי הנחו את התלמידים לחזור על פעולת החיטוי.

להזכרכם:

יש להכין תמיסת אקונומיקה ע"פ ההוראות ב**דפי הנחיה** לניסויים במיקרוביולוגיה ובתום העבודה של התלמידים יש לעקר את כל הנוזלים ואת כל הכלים שהיו במגע עם חיידקים. פירוט מלא לגבי שימוש באקונומיקה ראו בנספח 2, עמוד 16.

.... / נספחים בעמודים 15, 16



נספח 1: כלים וחומרים לשיעור הכנה (לקבוצה שבה 3 - 4 תלמידים)

הפריטים בנספח זה יסייעו למורה וללבוונט לארגן שיעור הכנה שמטרתו תרגול שיטת עבודה והכרת הכלים בהם התלמידים ישתמשו בניסוי.

אין צורך לשמור על תנאים סטריליים בעת הכנת הכלים והחומרים ובשעת תרגול בשיעור זה.

שם הפריט	הערות
צלחת פטרי ובה אגר רגיל (לא אגר מזין)	○ לכוס כימית בנפח 250 מ"ל יש להוסיף 2 גרם אגר רגיל ו- 100 מ"ל מים ולערבב. ○ יש לחמם את האגר תוך כדי בחישה, עד לרתיחה. ○ לאחר שהתרחיף התקרר מעט, יש לצקת כ-20 מ"ל לכל צלחת פטרי. ○ יש לקרר כ- 24 שעות את הצלחת עם האגר.
מחט זריעה	
מקל דריגלסקי	
מבחנה ובה כ- 5 מ"ל מים + טיפות של צבע מאכל (או תרכיז פטל)	○ מומלץ שצבע הנוזל שאותו בחרתם להוסיף יהיה כהה כגון כחול או אדום, כך שלאחר הערבוב תתקבל תמיסה צבעונית. התלמידים ישתמשו בתמיסה הצבעונית כפי שמשמשים בתרחיף חיידקים, כלומר יוציאו תמיסה באמצעות פיפטת פסטור, יטפטפו טיפה (או נפח...) ויפזרו אותה על האגר באמצעות מחט זריעה / מקל דריגלסקי. ○ יש להתאים את צורת הכלי בו תהיה התמיסה הצבעונית לדרך שבה התלמידים ישתמשו להוצאת הנוזל (מיקרופיפטור + טיפים מתאימים, או פיפטת פסטור מפלסטיק לשימוש חד פעמי).
מיקרופיפטור או: פיפטת פסטור מפלסטיק לשימוש חד פעמי בנפח 1 מ"ל	○ אם התלמידים ישתמשו בניסוי במיקרופיפטור, יש להכין להם פיפטור עם טיפים מתאימים לנפח 1000 מיקרוליטר. ○ אם התלמידים ישתמשו בפיפטות פסטור, חשוב להדגים להם כיצד ישתמשו בהן כאשר יבצעו את הניסוי ויעבדו באופן סטרילי.
הוראות לעבודה עם פיפטת פסטור סטרילית (ראו הקו המסומן על הפיפטה).	כאמור לעיל, בשיעור הכנה אין צורך להשתמש בפיפטה סטרילית, אך חשוב להסביר איך יעבדו איתה בניסוי. ○ פתחו את האריזה מהקצה שבו נמצא הטפטף של הפיפטה. החזיקו בטפטף והוציאו את הפיפטה. ○ פתחו גם את צידי האריזה ופרסו אותה כך שצידה החיצוני יהיה מונח על השולחן. הניחו את הפיפטה על האריזה. ○ באמצעות עט לסימון על זכוכית סמנו על הפיפטה סימן על נפח של 1 מ"ל. (בחלק מהפיפטות תהיה הנחיה לסמן קו על נפח קטן מ- 1 מ"ל)



מספר הכפפות בהתאם למספר התלמידים בקבוצה	זוגות כפפות חד פעמיות לתלמיד עט לסימון על זכוכית
	מבחנת אפנדורף
	כן לאפנדורף
כלי בנפח כ- 500 - 750 מ"ל המסומן "כלי פסולת"	כלי פסולת
פיסות צמר גפן + בקבוק סגור ופקוק ובו כוהל 70% לחיטוי ראו פירוט בעמוד 15 לעיל	ציוד לכיתה (פריט 20 בטבלה 3)

..נספח 2/ עמ' 18



נספח 2: עיקור וחיטוי בסיום העבודה (מתוך קובץ "עבודה במעבדה במיקרוביולוגיה")

בסיום העבודה המיקרוביולוגית חשוב לעקר ולחטא את כל התמיסות, הכלים והמשטחים איתם עבדנו.

עיקור באוטוקלב

1. אספו את כל הנוזלים המכילים חיידקים לבקבוק. שימו לב! גם בשלב זה אין למלא את הבקבוק יותר מ-2/3 מנפחו.
2. אספו את כל הצלחות המכילות חיידקים ואת הכלים החד פעמיים המזהמים לשקית מיוחדת המתאימה לאוטוקלב.
3. הכניסו לאוטוקלב את הכלי ובו הנוזלים שאספתם (סעיף 1), את השקית (סעיף 2), ואת כל שאר הכלים שהזדהמו בזמן העבודה.
4. הפעילו את האוטוקלב על-פי הוראות היצרן.
5. לאחר הטיפול באוטוקלב, השליכו את הפסולת המוצקה לפח האשפה, שפכו את הנוזלים לביוב ושטפו את הכלים לשימוש חוזר.

עיקור בעזרת אקונומיקה

יש להקפיד על שימוש בכפפות ומשקפי מגן כדי להגן על הגוף (והבגדים) מנזקי האקונומיקה. לעיקור הנוזלים:

1. אספו את כל הנוזלים המכילים חיידקים לבקבוק בעל שנתות.
2. מדדו את נפח הנוזלים המזהמים והוסיפו עשירית הנפח אקונומיקה.
3. המתינו לפחות 20 דקות ושפכו לביוב.
- לעיקור הכלים:
4. הכינו דלי עם נפח גדול של אקונומיקה מהולה פי 10.
5. הכניסו לדלי צלחות פטרי שגדלו עליהן חיידקים לאחר שהסרתם מהן את המכסה.
6. הכניסו לדלי כלים שהזדהמו בזמן העבודה.
7. המתינו 20 דקות לפחות.

שפכו את הנוזלים לביוב והשליכו את הפסולת המוצקה לפח האשפה. שטפו את הכלים לשימוש חוזר.

חיטוי משטח העבודה

1. צקו על משטח העבודה מעט תמיסת אתנול בריכוז 70% (לא 100%!). דאגו שלא יהיה מקור אש בקרבת מקום.
2. פזרו את האתנול על כל המשטח והניחו לו להתנדף.