



הנושא: טרנספורמציה בחיידקים (למורה) תאריך עדכון: 9.5.18

תמצית מידע על הניסוי:	הניסוי משלב שיטות עבודה במיקרוביולוגיה ובהנדסה גנטית.
מתאים לנושאים בתכנית הלימודים:	• התא (נושא חובה) • בקרה על ביטוי גנים והנדסה גנטית (נושא בחירה להעמקה) • חיידקים ונגיפים בגוף האדם (נושא בחירה להעמקה)
מתאים לתלמידים:	בחטיבה העליונה (כיתות יא, יב)
ידע קודם נדרש: (ראו נספח 1)	1. גנים, מ-DNA לחלבון, עקרונות הנדסה גנטית 2. היכרות עם כלים ושיטות עבודה במיקרוביולוגיה
הזמן הנדרש:	1 שיעור הכנה (עיוני ומעשי) 2 שיעורים במעבדה לביצוע הניסוי 1 שיעור לבדיקת תוצאות הניסוי וסיכומו
אסטרטגיות חשיבה מסדר גבוה:	• ניסוח השערות • דיווח על תוצאות ניסוי • הסבר חשיבותה של בקרה • הסבר תוצאות ניסוי

הקובץ כולל רקע עיוני לניסוי, הסבר כל שלבי הניסוי, תשובות לשאלות המשולבות בדף העבודה לתלמידים, הצעות לשאלות הרחבה וסיכום הניסוי וכן הצעה לשילוב הניסוי בפעילות בית ספרית מיוחדת ורשימת מקורות מידע. הפניות לסעיפי ביצוע או לשאלות שבדפי הניסוי לתלמידים רשומות בסוגריים.

בנספח 1 יש הצעה מפורטת לתרגיל שכדאי לבצע עם תלמידים שהם חסרי ניסיון בעבודה עם חיידקים והנחיות ללבורנט לביצוע תרגול זה.

בניסוי מהנדסים את חיידקי **E. Coli** מזן **DH5α**. חיידקים אלה מסופקים על ידי מרכז הפיתוח והתמיכה בבר אילן והם אינם פתוגניים, אך מטעמי זהירות אנו מחויבים לעבוד עם כל המיקרואורגניזמים במשנה זהירות ובתנאים סטריליים על פי ההנחיות.





רקע עיוני

הנדסה גנטית היא מונח מדעי פופולרי המתייחס לאפשרות של האדם להרכיב על פי כללים מסוימים ("להנדס") גנום או קטע של גנום של יצור כלשהו. השינויים המכוונים האלה ב-DNA מקדמים את המחקר והם מיושמים בתחומים כגון חקלאות ורפואה¹.

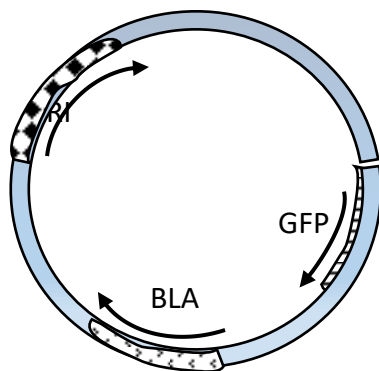
העברת קטע DNA מפרט אחד לפרט אחר **שאינו** מאותו מין וביטוי הגנים בקטע DNA זה אצל הפרט המקבל מתאפשר הודות לאחידות הקיימת בדרך כלל במבנה ה-DNA ובקוד הגנטי בכל היצורים החיים. כלומר, באמצעות שיטות של הנדסה גנטית ניתן להתגבר על **מחסום המינים**. לדוגמה, בניסוי זה מועבר קטע DNA ממדוזה לחיידק E. Coli ובתנאים מתאימים הגנים שיועברו יבואו לידי ביטוי בחיידק.

ההצלחה של החדרת גן זה לתאי החיידק וביטוי בתאים אלה, היא דוגמה ל**שבירת מחסום המינים**. (שאלה 11) אחת השיטות הנפוצות ביותר להעברת גנים היא טרנספורמציה באמצעות נשא (פלסמיד או וירוס מהונדס). **טרנספורמציה** היא שינוי מכוון במטען התורשתי של תא. השינוי נוצר כתוצאה מהחדרת DNA שמקורו בתא שיש לו גנוטיפ אחר². יצור שהחדירו לו DNA זר מכונה יצור טרנסגני. בטבע, תדירותם של תהליכים שבהם DNA ממקור זר חודר לתא היא נמוכה.

בניסוי זה התלמידים יחדירו פלסמיד מהונדס לחיידקי E. Coli מזן DH5α.

פלסמיד הוא מולקולת DNA קטנה ומעגלית הנמצאת מחוץ לכרומוזום של יצורים פרוקריוטים ומכילה גנים מבניים (בניסוי זה הגנים הם BLA ו-GFP) המקודדים לחלבונים וכן אתרי בקרה (פרומוטר בלועזית ובעברית, אתר מקדם ו-ORI).

מפת הפלסמיד pGFP



ORI (origin of replication): אתר בקרה על שכפול הגנים

GFP (green fluorescent protein): גן המקודד לחלבון שזוהר בצבע ירקרק

BLA: גן המקודד לאנזים β לקטאמאז

¹ עתידה, י., גנטיקה עמ' 267
² עתידה, י., גנטיקה עמ' 335 מילון מונחים



אתר הבקרה מאפשר שכפול עצמאי של הפלסמידים שנכנסו לתאי החיידקים ללא תלות בחלוקת תאים אלה. השכפול חיוני להתבטאות מיטבית של הגנים בפלסמידים ולהצלחת הטרנספורמציה.

בחיידקים רבים מצוי האנזים טרנספפטידאז אשר בעת חלוקת התאים הוא מזרז את בניית הדופן הקשיחה, דופן השומרת על שלמות התאים. כאשר חודרת מולקולת אמפיצילין לחיידקים אלו, היא נקשרת לאנזים טרנספפטידאז ומונעת את פעילותו. כתוצאה מכך, בעת התחלקות התאים לא נוצרת דופן קשיח והחיידקים מתים.

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 הדופן של החיידקים. בניסוי זה החיידקים שיקלטו את הפלסמיד (הכולל את הגן BLA) יהפכו עמידים לאמפיצילין ויצליחו לגדול על מצע מזון LB ואמפיצילין זאת בניגוד לחיידקים שלא עברו טרנספורמציה והם רגישים לאמפיצילין (ראו גם הסבר לשאלה 7, צלחת 1 שבה קרקע מזון LB/AMP ופלסמיד pGFP).

מכאן שהגן BLA הוא **גן בורר (= גן ממיין)** המאפשר להבדיל בין תאים הנושאים את הגן לבין תאים שאינם נושאים אותו. במקרה זה כמו ברוב המקרים, הגן הבורר מקנה לחיידקים יתרון השרדותי ומאפשר להם לשרוד בתנאים מסוימים, בעוד שחיידקים ללא הגן מתים בתנאים אלו³.

בפלסמיד המהונדס, בצמוד לגן BLA, נמצא הגן **GFP** המקודד לחלבון GFP אשר פולט אור ירקרק כאשר מאירים עליו באור אולטרה סגול. הגן מקורו במדוזה A. Victoria ובטבע החומר הזהיר משמש כאמצעי להרתעת טורפים, לתקשורת בין פרטים מאותו מין ובכך מסייע לרבייה. **גן זה הוא גן מדווח**, כלומר, גן לתכונה המאפשרת להבחין באופן איכותי או כמותי בין תאים הנושאים את הגן לבין תאים שאינם נושאים אותו. בפלסמיד, הגן המדווח נמצא בסמוך לגן הבורר, והביטוי של שני הגנים יעיד על הצלחת הטרנספורמציה (שאלת הרחבה 1).

ביטוי של גנים מבניים כגון גן BLA וגן GFP בחיידק מהונדס מתאפשר הודות לכך שהם סמוכים לאזור בקרה מתאים האחראי על תחילת תעתוק הגנים ומכונה אתר מקדם (promoter). אזור בקרה ייחודי זה מקורו בפלסמיד שהוחדר לתא המאכסן.

הסבר שלבי הניסוי ותוצאותיו

בשנות ה-40 של המאה הקודמת הוכיחו מקלאוד ומקרטי כי יש מקרים בהם תכונות של חיידקים יכולות להשתנות לאחר שחודר אליהם DNA זר. שנים לאחר מכן, חוקרים פיתחו שיטות שונות באמצעותן אפשר להגביר את יכולת הקליטה של DNA זר בתאי חיידקים, כגון שימוש בתמיסת טרנספורמציה וחשיפה לשוק תרמי.

בסעיפים I - VII שבהמשך יש התייחסות להיבטים עיוניים ומעשיים של הניסוי.

³ מאלפי הגנים, מכון ויצמן הוראת המדעים.



חלק א בניסוי: הכנת חיידקים לטרנספורמציה

I. העברת תרבית החיידקים מטמפרטורה אופטימלית לאמבט קרח:

24 שעות לפני הניסוי הלבורנט הכין לכל קבוצה מבחנה סטרילית ובה מצע מזון נוזלי LB. שעתיים לפני הניסוי הוא הוסיף לכל מבחנה חיידקי E. Coli ושמר את כל המבחנות בטמפרטורה של 37°C עד לתחילת הניסוי. בפרק זמן זה החיידקים שבתרבית הנוזלית היו בשלב ההשהיה.

בתחילת הניסוי התלמידים העבירו את המבחנות לאמבט קרח. העברה זו עיכבה את המעבר של אוכלוסיית החיידקים משלב ההשהיה לשלב הגידול המעריכי. בשלב ההשהיה החיידקים קומפטנטיים מאוד, כלומר, DNA זר יכול לחדור את הקרום ולהיכנס אל תוך התאים (שאלה 1 II).

הערה: בסעיפים ד, ח, יז, יח, כ בדפי הניסוי לתלמידים ובנספח 1 בדפים אלה התלמידים מתבקשים לסמן באמצעות עט לסימון על זכוכית, נפח של נוזל על פיפטות פסטר לשימוש חד פעמי העשויות מפלסטיק. חשוב להקפיד ולבצע שלב זה במדויק ולוודא שהתלמידים יעזרו בצילום ויעבדו לפי ההנחיות המפורטות (ראו [שיעור הכנה לקראת הניסוי](#)).

II. הוספת תמיסת טרנספורמציה לתרבית החיידקים והשהייה בקרח:

תמיסת הטרנספורמציה היא תמיסה של המלח CaCl_2 . יוני סידן (Ca^{+2}) מונעים דחייה חשמלית בין יונים שלילים (יוני הפוספט) שנמצאים ב-DNA של הפלסמיד לבין יוני פוספט שלילים הנמצאים בליפופוליסכרידים שבונים את הקרום החיצוני של חיידקי E. Coli. הודות ליוני הסידן הפלסמיד יכול להימצא בסמיכות רבה לקרום החיידק (סעיף ז). יוני הסידן שבתמיסה גם מרחיבים את התעלות היוניות של יוני הסידן המצויות בקרום התא והודות לכך הקרום הופך למחורר יותר. יוני הסידן חוזרים אל התא ובהמשך הניסוי יחדרו בעקבותיהם גם הפלסמידים.

III. הוספת פלסמיד והשהייה בקרח:

כאמור, לאחר הוספת הפלסמיד למבחנה pGFP+ (סעיפים יב – יד) הפלסמיד יכול להיכנס אל התאים (שאלה 1 II). התלמידים מחזירים את המבחנה לאמבט הקרח. המשך ההשהיה בקרח גורמת להיצרות החריצים בקרום התא (שנוצרו עם כניסת יוני הסידן דרך קרום התא) וכך לא נפגעת שלמות הקרום של תאי החיידקים. **הערה:** בסעיף יא, המורה התבקש להעביר 0.002 מ"ל תרחיף פלסמידים מהבקבוקון בו מצוי התרחיף למבחנה "pGFP+". אם אין ברשותך מיקרופיטור אנו ממליצים שתשתמש בידית של מחט הזריעה להעברת התרחיף. עשה זאת כך: החזק את מחט הזריעה הפוך, כך שהמחט תהיה בין אצבעותיך. טבול בתרחיף הפלסמידים את ידית האחיזה העגולה והכנס את הידית למבחנת האפנדורף של התלמיד המסומנת "pGFP+". ערבב מעט את הנוזל שבמבחנה, הוצא את המחט וסגור את מכסה המבחנה.



IV. השהיה קצרה של התרבית בטמפרטורה גבוהה (שוק חום Heat shock):

על פי הנחיות הביצוע (סעיף טו) התלמידים יעבירו את המבחנה שבה מצויים החיידקים משהייה בקרח אל אמבט בטמפרטורה של 42°C למשך 60 שניות בלבד. שוק החום משתק את החיידקים כך שמנגנונים שבאופן טבעי מתרחשים בתאי החיידקים ומתקנים נזקים או מבצעים חיתוכים של DNA זר באמצעות אנזימי רסטריקציה (אנדונוקלאזות), אינם פועלים. היתרון הוא שהפלסמיד שחדר נותר בשלמותו ובהמשך, המידע שבו יכול להתבטא (שאלה 1 III).

V. העברת התרבית לאמבט קרח:

לאחר 60 שניות התלמידים מעבירים את המבחנות לאמבט קרח למשך 2 דקות (סעיף טז), וזאת כדי להקטין את חדירות קרום התא ולמנוע את יציאת הפלסמידים מהתאים שעברו טרנספורמציה. חשוב להקפיד ולבצע שלב זה במדויק מכיוון שהטמפרטורה הגבוהה פוגעת בחיוניות החיידקים ויש להוריד אותה במהירות.

הטיפול שהתלמידים בצעו בחלק א של הניסוי גרמו ליצירת חיידקים קומפוטנטיים. חיידקים אלה עברו טיפול ייחודי הגורם לשינויים בקרום התא כך שה-DNA הזר שאליו נחשפו החיידקים נקלט בקלות לתאים (שאלה 4).

חלק ב בניסוי: זריעת חיידקים בצלחות עם מצע מזון

VI. הוספת תמיסת מזון LB לתרחיף החיידקים

התלמידים יוציאו מהקרח את שתי מבחנות אפנדורף שבהן מצויים החיידקים הקומפוטנטיים והפלסמידים שהכינו בחלק א של הניסוי ויוסיפו לכל אחת מהן **מצע גידול LB נוזלי**. בתנאים אלה החיידקים שבתרבית הנוזלית יהיו בשלב ה"השהיה" שבמהלכו הם יסתגלו למצע שבו הם נמצאים, המטבוליזם שלהם יתייצב ויתחיל יצור חלבונים. בחיידקים שנקלט הפלסמיד (שעברו טרנספורמציה) ייווצר גם האנזים β לקטאמאז הגורם לעמידות החיידקים כנגד אמפיצילין. **כדי לאפשר זמן לאנזים להיווצר חשוב להדגיר את החיידקים בטמפרטורה של 37°C למשך כ- 30 דקות, לפני הזריעה על גבי צלחות אגר.**

VII. זריעת החיידקים בצלחות

התלמידים זורעים את החיידקים על אגר LB המכיל חומרי הזנה (צלחת 2), ועל אגר LB המכיל חומרי הזנה בתוספת אמפיצילין (צלחות 1 ו-3).

בכל הצלחות שהתלמידים ישתמשו **מצע הגידול LB** כולל אגר ולכן הוא **מצע מוצק**.

חשוב מאד להסב את תשומת ליבם של התלמידים לכך שצפוי שנפח החיידקים שיזרעו על כל צלחת יהיה גורם קבוע בניסוי. אלא שעל פי הוראות העבודה הנפח אותו הם יעבירו מהמבחנות לצלחות הוא **שונה**: לצלחות 1 ו-3 הנפח הוא 0.5 מ"ל ואילו לצלחת 2 רק 2 טיפות.





בעת ניתוח תוצאות הניסוי כדאי להסביר להם מדוע נבחרו נפחים שונים (ראו להלן הערות).
התלמידים פועלים על פי ההוראות ובסיום הזריעה ימסרו את כל הצלחות ללבורנט.
הלבורנט יכניס את הצלחות לאינקובטור בטמפרטורה של 37°C למשך 24 שעות.
תנאים אלה מתאימים להתרבות החיידקים ולאחר יממה או יותר ניתן יהיה לזהות מושבות בחלק מהצלחות (שאלה 4 II).

הערות:

- ניתן להחליף את השימוש בפיפטת פסטור במיקרופיפטור וטיפים סטריליים בנפח המתאים.
נפח 2 טיפות שווה ערך ל- 0.1 מ"ל.
- כאמור לעיל, הנפח של תרחיף חיידקים בנוזל LB שנזרע על צלחות 1, 2, 3 אינו זהה. בצלחות 1 ו-3 הנפח גדול יחסית (בהשוואה לנפח בצלחת 1 ו-3) וזה יאפשר לקבל מספר משמעותי של מושבות בצלחת 1 (שבה נזרעו חיידקים שרק חלק מהם הכילו פלסמיד).
הבדל נוסף בין הטיפולים הוא שיטת הזריעה.
- בצלחות 1 ו-3 הזריעה היא באמצעות מקל דריגלסקי, שכן בצלחת 1 צפוי מספר מועט של מושבות ובצלחת 3 לא צפוי שיתפתחו מושבות.
בצלחת 2 הזריעה היא באמצעות מחט זריעה שכן בצלחות זו צפויה התפתחות של מספר רב של מושבות והשימוש במחט מגדיל את הסיכויים לקבלת מושבות בודדות.
- אם ניתן יהיה לספור את מספר המושבות בצלחת 2 התלמידים יוכלו לחשב את אחוז הטרנספורמציה. בחישוב יש לקחת בחשבון שנזרעו נפחים שונים.
הנפח שנזרע על צלחת 2 הוא 2 טיפות ובהנחה שהוא שווה ערך ל- 0.1 מ"ל, אחוז הטרנספורמציה יהיה שווה ל:
מספר מושבות שנספרו בצלחת 1 X 100
5 X מספר המושבות שנספרו בצלחת 2
- מומלץ שהלבורנט יבדוק לאחר כ- 24 שעות את הצלחות המסומנות "1" של התלמידים. אם התפתחו מושבות זוהרות בצלחות אפשר להעביר את הצלחות למקרר עד למועד שהמורה יגיע עם תלמידיו לבדיקת התוצאות (בדיקת הצלחות על פי ההנחיות בסעיף כו בדפי הניסוי לתלמידים).
- אם בבית ספר אין אינקובטור או תנור שניתן לכוונו לטמפרטורה של 37°C , אפשר להשהות את הצלחות ליממה נוספת לפני בדיקת התוצאות.



חלק ג בניסוי: בדיקת התוצאות והסברן

צלחת המסומנת LB/AMP, "pGFP+" (צלחת 1)

בצלחת 1, שבה מצע המזון הוא LB שהוסף לו אמפיצילין, נזרע תרחיף חיידקים קומפטנטיים שהוסיפו לו פלסמידים. אחרי 24 שעות או יותר, בתגובה להארה באור UV, ניתן לזהות רק מספר מושבות זוהרות. **הסבר:** רק בחלק מהחיידקים התקיימה טרנספורמציה ובהם התבטאו הגנים שבפלסמיד. חיידקים אלו החלו ליצר את האנזים בטא לקטמאז, המקודד על ידי הגן BLA. אנזים זה מזרז את הפירוק של האמפיצילין ולכן לא נפגעת יצירת הדופן של החיידקים והם מתרבים באין מפריע. בחיידקים אלה מתבטא גם הגן המקודד ליצירת החלבון הזוהר - GFP (שאלה 7). חשוב לציין שמספר המושבות הזוהרות בצלחת תלוי בהצלחת הטרנספורמציה. החיידקים שנזרעו, אך לא עברו טרנספורמציה רגישים לאמפיצילין, נפגעת בהם יצירת הדופן והם אינם מתרבים.

הערה: בצלחת LB/AMP, "pGFP+" בסמוך למושבות גדולות של חיידקים עשויות להתפתח מושבות זעירות של חיידקים. מושבות אלו מכונות "מושבות לוויין". בחיידקים, שבהם נקלט הפלסמיד והתבטא, נוצר האנזים בטא לקטמאז שזרז את פירוק האנטיביוטיקה במצע המזון שבסביבתם, והודות לכך חיידקים שלא עברו טרנספורמציה ורגישים לאנטיביוטיקה הצליחו להתרבות בסמוך למושבות הגדולות.

צלחת המסומנת LB/AMP, "pGFP-" (צלחת 3)

בצלחת 3, שבה מצע המזון זהה לזה שבצלחת 1 (LB שהוסף לו אמפיצילין). נזרעו חיידקים שעברו טיפול זהה לאלה שנזרעו במבחנה 1, אך הם לא נחשפו לפלסמידים. בצלחת אין צמיחה של מושבות חיידקים. **הסבר:** לחיידקים ללא פלסמיד אין גן BLA המקנה עמידות לאנטיביוטיקה מסוג אמפיצילין. האמפיצילין שבאגר יגרום לעיכוב האנזים טרנספפטידאז המעורב בסינתזת דופן החיידק, חלוקת החיידקים תפגע ולא ייווצרו מושבות. בחיידקים בצלחת 1 שעברו טרנספורמציה (קלטו את הפלסמיד), יש ביטוי של הגן BLA (הגן הבורר) ולכן חיידקים אלו התרבו ונוצרו מושבות. (שאלות 7, 8).

צלחת 3 היא אחת מהבקורות בניסוי. הטיפול בצלחת 3 מאפשר לשלול הסבר חלופי על פיו החיידקים שבהם השתמשו בניסוי היו עמידים לאמפיצילין. **אז:** טיפול זה מאפשר לשלול הסבר חלופי שמקור הגן לעמידות לאמפיצילין אינו בפלסמיד

צלחת המסומנת LB, "pGFP-" (צלחת 2)

בצלחת 2, שבה מצע המזון הוא LB נזרעו חיידקים ללא פלסמיד. בצלחת יש מושבות רבות של חיידקים אך המושבות אינן זוהרות בתגובה להארה באור UV.



הסבר: החיידקים שבצלחת זו הם חסרי פלסמיד, כלומר אינם מכילים את הגנים BLA ו-GFP. מכיוון שמצע המזון בצלחת 2 אינו מכיל אמפיצילין, חיידקים ללא פלסמיד יכולים להתרבות בה וליצור מושבות, אך אין ביניהן מושבות חיידקים זוהרים. צלחת 2 היא אחת מהבקורות בניסוי.

בצלחת זו נזרעו חיידקים שעברו טיפולים שונים (סעיפים א - טז בדפי הניסוי לתלמידים) כגון השריה בתמיסת טרנספורמציה ושוק תרמי. הבקרה המאפשרת לשלול הסבר חלופי על פיו הטיפולים שבוצעו פגעו בחיוניות החיידקים. (שאלות 3, 7, 8).

לסיכום תוצאות הניסוי התלמידים מתבקשים להכין טבלה לסיכום מערך הניסוי ותוצאותיו ולהוסיף כותרת לטבלה. התוצאות בטבלה הן לדוגמה בלבד (שאלה 5, סעיף כו).

השפעת סוג המצע והפלסמיד "pGFP" על מספר מושבות החיידקים ועל מספר מושבות החיידקים הזוהרים:

סוג הצלחות	סוג המצע	נוכחות פלסמיד "pGFP"	הערכה של מספר כל מושבות החיידקים	מספר מושבות של חיידקים זוהרים
צלחת 1	LB/AMP	+	20 – 10	20 - 10
צלחת 2	LB	-	מאות מושבות	0
צלחת 3	LB/AMP	-	0	0

בשאלה 9 מתוארת הצעה של תלמיד להוסיף עוד טיפול בקרה לניסוי. בטיפול זה נזרעו חיידקים קומפלטניים שהוספו להם פלסמידים על צלחת שבה קרקע המזון הוא LB.

בצלחת זו צפוי שיתפתחו מושבות רבות של חיידקים, ובהארה באור UV רק חלק מהן יזהרו. בפלסמיד קיים הגן המדווח GFP המקודד לחלבון זוהר. לפיכך רק חיידקים שקלטו את הפלסמיד יזהרו בהארה של אור UV, ואילו חיידקים שלא עברו טרנספורמציה יגדלו ויצרו מושבות שאינן זוהרות בהארת אור UV (שאלה 9 סעיף I) בקרה זו מאפשרת לשלול את ההסבר החלופי על פיו הטמפרטורה (סעיף טו) פגעה בביטוי של הפלסמיד (שאלה 9 סעיף II).

חשוב לציין כי בהארת הפלסמיד באור U.V במבחנה ללא תאי חיידקים (שאלה 2) לא נצפתה כל זהירה ואילו בהארת צלחת LB/AMP ו-"pGFP" באור זה נצפו מושבות זוהרות. הפלסמיד אמנם מכיל את הגן המקודד לחלבון זוהר אולם התהליך מ



DNA לחלבון" אינו מתרחש במבחנה מפני שאין בה רכיבים החיוניים ליצירת החלבון הזוהר כגון אנזימים, ח' אמיניות, ATP, בניגוד למה שמתרחש בצלחת 1 שבה פלסמידים חדרי לתאי חיידקים ובהם מתקיימים תהליכי התעתוק והתרגום של הגן GFP (שאלה 2, שאלה 10).

הערה: עבודה מרושלת ואי הקפדה על תנאים סטריליים יכולה לגרום להעברה של גנים מחיידקים טרנסגניים לחיידקים לא מהונדסים. שינוי זה יכול להקנות לחיידקים בסביבתנו תכונות חדשות כגון עמידות לתרופות אנטיביוטיות, במקרה כזה עלולה להיפגע יעילות הטיפול בחיידקים גורמי מחלה באותן תרופות אנטיביוטיות. (שאלה 12 סעיף I).

שאלה 12 סעיף II היא דוגמה לשאלת עמ"ר.

הצעה לשאלות הרחבה ושאלות לסיכום הניסוי

בשאלות הרחבה ובשאלות סיכום תוכלו להשתמש על פי שיקול דעתכם, לשבצם בין שאלות הניסוי, בסוף הניסוי או לוותר עליהם.

שאלות הרחבה בנושאים תורשה ומיקרוביולוגיה

1. לפלסמיד שבניסוי הכניסו שני גנים, גן מדווח וגן בורר. הסבירו מהי חשיבותו של כל אחד מהגנים בניסוי.
2. בניסוי דומה לזה שביצעתם, החליפו את אזור הבקרה בפלסמיד באזור אחר. האם לדעתכם תתקיים יצירה של החלבון GFP? נמקו תשובתכם.
3. תלמידים זרעו חיידקי E. Coli שהכילו את הפלסמיד pGFP, על קרקע מזון LB שהוסיפו לו אריתרומיצין. האם נראה מושבות של חיידקים זוהרים בצלחת זו? הסבירו את קביעתכם.

שאלות לסיכום הניסוי

1. א. הציעו הסבר אפשרי לכך (אחד או יותר) שמספר המושבות שעברו טרנספורמציה הוא לא 100%?
ב. כיצד ניתן להגביר את יעילות הטרנספורמציה בניסוי שביצעת? הסבר הצעתך.
2. האם לדעתכם מומלץ לחשוף את החיידקים לשוק תרמי בטמפרטורה גבוהה יותר או במשך זמן ארוך יותר. נמקו תשובתכם.

המלצות למקורות מידע/ עמ' 10



המלצות למקורות מידע

שנת פרסום	הערות	מקור מידע	סוג המידע
2008	כל פרק בספר מסתיים ברשימה של פרטים כגון, מושגים, תהליכים ושיטות, גישות מחקר ועקרונות, יישומים . באתר המלווה את הספר מוצגות אנימציות וחומרים למורה	הנדסה גנטית, מעקרונות ושיטות למחקר ויישומים דן מיכאל, ענת ירדן. הוצאת המחלקה להוראת המדעים, מכון ויצמן למדע	ספר
2005	בספר מבנית מבוא בה נסקרים עקרונות הביוטכנולוגיה ושלושה מאמרי מחקר בתחום ביוטכנולוגיה שעובדו להוראה (כל מאמר מלווה בשאלות)	מאלפי הגנים קובץ מחקרים בביוטכנולוגיה הדה פלק, יעל פיונטקביץ, גילת בריל, אילת ברעם – צברי, ענת ירדן הוצאת המחלקה להוראת המדעים, מכון ויצמן למדע	ספר
2015	חוקרים סיניים דיווחו לראשונה על שיטה ביוטכנולוגית חדשה בשם "קריספר" שבאמצעותה הצליחו לשנות את הגנום של עוברים אנושיים .	CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. Protein Cell. 2015 May; 6(5): 363–372	מאמר מחקר
2017	חלקיקים דמויי נגיף הפוליו, שמיוצרים על ידי צמחים מהונדסים גנטית, עשויים להחליף את נגיפי הפוליו המוחלשים שמיוצרים כיום בתרבויות תאים.	חיסון פוליו מהצומח ד"ר דרור בר ניר, באתר מדע גדול בקטנה	מאמר פופולרי



2016	מים מלוחים גורמים להרס אדמות חקלאיות. מחקרים בהנדסה גנטית, הנערכים בין השאר גם בישראל מצאו שיטות להנדוס של אורז ועגבניות באמצעות גנים המגבירים את עמידות הצמחים למלח.	הפיתרון המלוח: השקיה במי ים מדוללים מארק האריס, בסיינטיפיק אמריקן ישראל	מאמר פופולרי
1994	"מרוץ חימוש" מתנהל בין התרופות האנטיביוטיות ובין החיידקים שמצליחים לרכוש עמידות כנגדן. מי ינצח?	אנטי אנטיביוטיקה , צבי עצמון גלילאו, כתב עת למדע ומחשבה, גיליון 7, עמ' 18-23 ובאתר עולם החיידקים, האוניברסיטה הפתוחה	מאמר פופולרי
	טרנספורמציה של DNA פלסמידי לתוך חיידקים, מידע שימושי אודות תהליך הטרנספורמציה בחיידקים.	טיפים על קצה הטיפ בביולוגיה מולקולרית יבגני בדיצ'בסקי BioInform גיליון 6, 2011	מאמר פופולרי
2016	שימוש בהנדסה גנטית עודד פיתוח פתרונות ידידותיים לסביבה כנגד מזיקים ו"עשבים רעים".	Plant Genetic Engineering Change the World הרצאתו של פרופ' אסף אהרוני ב-TED (אנגלית)	סרטון
	הסרטון מציג את מבנה הפלסמיד וחשיבותו לשונות הגנטית בחיידקים.	הפלסמיד כאמצעי להנדסה גנטית? הסרטון תורגם על ידי צוות אתר דוידסון אונליין	סרטון מלווה בתרגום
2011	הסרטון מציג את מבנה החלבון GFP, הפולט אור ירקרק כאשר מאירים עליו באור כחול ובאולטרה סגול. ה-GFP קיים בבעלי חיים ימיים, שם הוא משמש בין היתר	GFP- החלבון הפלורוסנטי הירוק- גילוי ושימוש בגן GFP הסרטון תורגם על ידי צוות אתר דוידסון אונליין	סרטון מלווה בתרגום



	כאמצעי הרתעה לטורפים.		
2014	סרטון המציג את המאבק בינינו לבין החיידקים, בו ידה של האבולוציה על העליונה. עמידות לאנטיביוטיקה מתפתחת ביותר ויותר זנים וזה מאלץ את האדם לפתח תרופות חדשות.	מעטים מול רבים החיידקים העמידים ד"ר חגית ניסן משה צוות אתר דוידסון אונליין	סרטון מלווה בהסבר

נספח 1 / עמוד 13



נספח 1: המלצות להכנת התלמידים לביצוע הניסוי

נספח זה כולל המלצות למורה לשיעור הכנה, דף עבודה להכרות של התלמידים עם כלים ושיטות (מהלך המדמה עבודה עם חידקים), מידע ללברנט בנוגע להכנת כלים וחומרים שנדרשים לשיעור הכנה והצעה לשילוב הניסוי בפעילות בית ספרית מיוחדת.

א. המלצות למורה לשיעור הכנה

לפני ביצוע הניסוי מומלץ להסביר לתלמידים את עקרונות העבודה עם החידקים, עבודה שתהיה מבוססת על שמירת בריאותם ומניעת זיהום בסביבה.

- חשוב שלפני ביצוע הניסוי התלמידים יכירו את שמות הכלים ויתנסו בשיטות העבודה הייחודיות למיקרוביולוגיה. התנסות זו תקל על התלמידים את העבודה בזמן ביצוע הניסוי ותגדיל את סיכויי ההצלחה של הטרנספורמציה בחידקים.
- חשוב להקפיד בשעת ביצוע הניסוי על עבודה בסביבה סטרילית. עם זאת, חשוב להדגיש שבשל חוסר הניסיון של התלמידים הם אינם עובדים ליד אש.
- לפני תחילת העבודה יש ללבוש כפפות ולנקות את משטח העבודה בפיסת צמר גפן טבולה באלכוהול 70%.
- בתום העבודה יש לנקות את שולחן העבודה באלכוהול 70%. לזרוק את הכפפות לכלי הפסולת ולנקות את הידיים בג'ל אלקוהול או לשטוף את הידיים במים ובסבון.
- לפני שמשתמשים באלכוהול, יש לוודא שלא דולקת אש בחדר המעבדה.
- בסעיף 4 מתבקשים התלמידים לספוג את הנוזל שעל פני האגר בכדי לאפשר שימוש חוזר באותה צלחת גם בסעיף 5.

ב. דף עבודה להכרות של התלמידים עם כלים ושיטות

התלמידים יעבדו בזוגות ויכירו בפעילות זו את שיטות העבודה עם מחט זריעה סטרילית ומקל דריגלסקי עם זאת, במהלך העבודה התלמידים לא יעבדו באופן סטרילי.

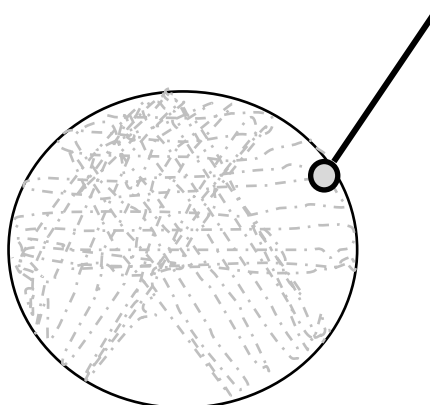
1. לרשותכם אריזה סגורה ובה פיפטה סטרילית. פתחו את האריזה מהקצה שבו נמצא הטפטף של הפיפטה. החזיקו בטפטף והוציאו את הפיפטה.



- 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, ועל נפח של 0.5 מ"ל.



2. לפניכם כלי עם נוזל צבעוני. בעזרת פיפטת פסטר סטרילית⁴ מפלסטיק המסומנת בשנתות, העבירו 0.5 מ"ל נוזל מהכלי לצלחת הפטרי.
3. הרימו את המכסה של הצלחת בזווית של כ- 45° והעבירו בעדינות את ידית מקל דריגלסקי על פני האגר ולא בתוכו, כך שהנוזל יפוזר באופן שווה על האגר.
- סובבו את הצלחת כמה פעמים עם כיוון השעון והמשיכו בפיזור עדין על פני האגר ולא בתוכו!! (ראו איור)
- סגרו את המכסה.
- העבירו את המקל לכלי הפסולת.
4. בעזרת מגבת נייר ספגו את הנוזל שעל פני האגר.
5. בעזרת פיפטת פסטר סטרילית העבירו 2 טיפות נוזל מהכלי עם הנוזל הצבעוני לצלחת פטרי.
- העבירו בעדינות את הלולאה של המחט על פני האגר ולא בתוכו.
- משכו בעדינות את הנוזל שעל פני האגר, תוך כדי סיבוב הצלחת, עד שהנוזל יתפזר בצלחת.



ג. הנחיות ללבורנט להכנת כלים וחומרים לשיעור הכרות של התלמידים עם כלים ושיטות

עבודה

שימו לב: בשיעור ההכנה התלמידים יתרגלו פתיחה של אריזת פיפטת פסטר סטרילית וסימון הנפח הנדרש על הפיפטה.

מלבד פריט זה אין צורך להשתמש בכלים סטריליים ולהכין צלחות פטרי סטריליות.

⁴ ניתן להחליף את העבודה בפיפטת פסטר במיקרופיפטור וטיפים סטריליים.



ד. הצעה לשילוב הניסוי בפעילות בית ספרית מיוחדת

- יום העשרה בית ספרי לתלמידי י"א ו-י"ב ביולוגיה הכולל הרצאת פתיחה מתחום "ביולוגיה מולקולרית" וביצוע הניסוי במעבדת בית הספר.
את איסוף התוצאות ועיבודן כדאי לבצע במהלך שיעורים במעבדה.
ניתן להזמין מרצים מעמותת ב"שער" או להיעזר בהרצאות הקיימות באינטרנט.
- לקראת חג חנוכה – יום העשרה בנושא "ביולומינסנציה - הארה ביולוגית",
ניתן להכין מצגת בנושא הארה ביולוגית בה תוצג התופעה בטבע תוך שילוב סרטונים ותמונות.
את איסוף התוצאות ועיבודן כדאי לבצע במהלך שיעורים במעבדה.



נספח 2: מילון מושגים

פלסמיד הוא מולקולת DNA קטנה מעגלית שנמצאת מחוץ לכרומוזום של יצורים פרוקריוטים ומכילה רצפים שמאפשרים את שכפולה בנפרד משכפול הכרומוזום של היצור. לרוב, הפלסמיד מקודד לתכונות המקנות יתרון הישרדותי לייצור כגון עמידות לאנטיביוטיקה⁵ בחיידקים. הפלסמיד משמש אמצעי להעברת קטעי גנום זר מאורגניזם אחד לאורגניזם אחר.

טרנספורמציה היא שינוי מכוון במטען התורשתי של תא. השינוי נוצר כתוצאה מהחדרת DNA שמקורו בתא שיש לו גנוטיפ אחר⁶. בטבע יש מקרים בהם מתקיים תהליך שבו DNA ממקור זר חודר לתא.

גן בורר, או **גן ממיין** הוא גן לתכונה שמאפשרת להבדיל בין תאים הנושאים את הגן לבין תאים שאינם נושאים אותו. לרוב, הגן מקנה לחיידקים תכונה המאפשרת להם לשרוד בתנאים מסוימים, בעוד שחיידקים ללא הגן מתים בתנאים אלו.⁷

גן מדווח הוא גן לתכונה המאפשרת להבחין באופן איכותי או כמותי בין תאים הנושאים את הגן לבין תאים שאינם נושאים אותו. בפלסמיד הגן המדווח נמצא בסמוך לגן הממיין (גן המקדד לאנזים מפרק אמפצילין), ולכן ביטויים של שני הגנים יהיה משולב ויעיד על הצלחת הטרנספורמציה.

גן מבני הוא מקטע של DNA המקודד ליצירת חלבון.

אתר בקרה "מקור השכפול" (origin of replication) הוא אזור בקרה על שיכפול הגנים, ממנו מתחיל שכפול הגנים העצמאי בפלסמיד.

מחסום המינים פרושו שבאורגניזמים מאותו מין גמטות יכולות להפרות זו את זו וליצור צאצאים פוריים. אם מתקיימת הפריה של גמטות של אורגניזמים ממין שונה ויווצר אורגניזם הוא יהיה בלתי פורה (פרד למשל).

⁵ מאלפי הגנים, מכון ויצמן הוראת המדעים.

⁶ עתידיה, י., גנטיקה עמ' 335 מילון מונחים

⁷ מאלפי הגנים, מכון ויצמן הוראת המדעים.



שבירת מחסום המינים פרושו שבאמצעות הנדסה גנטית ניתן להתגבר על מחסום המינים ולהעביר תכונות השייכות לאורגניזמים ממין שונה וכך להקנות תכונות חדשות.

חיידקים קומפטנטיים הוא כינוי לחיידקים בעלי יכולת לקלוט DNA זר ולעבור טרנספורמציה.

מצע גידול מוצק / אגר מזין הוא מצע מזון לגידול חיידקים המכיל מוקופוליסכריד **דמוי** ג'לטין העשוי מדפנות של תאי אצות שאינו מפורק על ידי החיידקים. תכונות מצע זה מאפשרות גידול מושבות.

מושבה היא מספר רב של חיידקים זהים שמקורם מחיידק שהתרבה. כשמגדלים חיידקים על קרקע מזון מוצק ניתן לראות מושבות.