

אוגדן מעבדות בביוטכנולוגיה

מחברות:

תמר פרץ-מנחמוב

ד"ר רותם פניגר בריש

ייעוץ מדעי ופדגוגי:

ד"ר רותם פניגר בריש

מפמ"רית המגמה:

יהודית דסקלו

תשפ"ד

© כל הזכויות שמורות למשרד החינוך

מרכז המורים הארצי למקצועות הטכנולוגיים, מור-טק

הפרויקט מבוצע על ידי מוסד הטכניון עפ"י מכרז 22/11.2020

הפרויקט מבוצע עבור המזכירות הפדגוגית, משרד החינוך

האוגדן יצא לאור במימון האגף למדעים במזכירות הפדגוגית ומינהלת מל"מ המרכז הישראלי לחינוך מדעי טכנולוגי.

אין לשכפל, להעתיק, לצלם, להקליט, לתרגם, לאחסן במאגר מידע, לשדר או לקלוט בכל דרך או אמצעי אלקטרוני, אופטי או מכני או אחר כל חלק שהוא מהחומר שבחברת זו. שימוש מסחרי מכל סוג שהוא בחומר הכלול בחוברת זו אסור בהחלט אלא ברשות מפורשת בכתב מהמו"ל.

תוכן עניינים

| | |
|---|----|
| רשימת שמונה המעבדות ומושגי החובה בביוקטליזה ובהנדסה גנטית לבחינת הבגרות במערכות ביוטכנולוגיה..... | 2 |
| 1. מעבדה מס' 6 – קיבוע תאי שמרים באלגינט ותסיסת סוכרים ע"י שמרי אפייה מקובעים..... | 6 |
| 1.1 מטרת המעבדה, 1.2 שאלת חקר, 1.3 רקע עיוני..... | 6 |
| 1.4 מהלך הניסוי..... | 9 |
| 1.5 ניתוח תוצאות, דיון ומסקנות..... | 12 |
| 2. מעבדה מס' 7 – טרנספורמציה של פלסמיד רקומביננטי עם גן המדווח לחיידקים קומפטינטיים..... | 13 |
| 2.1 מטרת המעבדה, 2.2 שאלת חקר, 2.3 רקע עיוני..... | 13 |
| 2.4 מהלך הניסוי..... | 22 |
| 2.5 ניתוח תוצאות, דיון ומסקנות..... | 29 |
| 3. נספחים למורה וללברנט..... | 30 |
| 3.1 מעבדה מס' 6 - תסיסת שמרים מקובעים באלגינט..... | 30 |
| 3.1.1 מחוון לשאלות לדיון ומסקנות..... | 30 |
| 3.1.2 הוראות ללברנט..... | 31 |
| 3.2 מעבדה 7 - מעבדת טרנספורמציה של חיידקים עם הגן GFP..... | 33 |
| 3.2.1 מחוון לסיכום והסבר תוצאות גדילת החיידקים בניסוי על צלחות הזריעה השונות..... | 33 |
| 3.2.2 מחוון לשאלות לדיון ומסקנות..... | 34 |
| 3.2.3 מעבדה 7 – טרנספורמציה של הגן GFP בחיידקים – הוראות ללברנט..... | 36 |

**רשימת שמונה המעבדות ומושגי החובה בביוקטליזה ובהנדסה גנטית לבחינת הבגרות
במערכות ביוטכנולוגיה**

| מיומנויות אקסל ספציפיות הנדרשות לבחינת הבגרות | מושגי חובה לבחינת הבגרות | שם המעבדה | |
|---|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - בניית טבלה - בניית גרף - ספקטרום בליעה - חישוב בטבלה של ריכוז לאחר מיהול - בניית גרף כיול - הצגת משוואת קו מגמה בתרשים - חישוב ריכוז נעלם בעזרת משוואת הקו הישר | <ul style="list-style-type: none"> - ספקטרום בליעה - בחירת אורך גל מיטבי לקריאה - מושג ערך הבליעה - גרף כיול - הכנת סדרת מיהול - חישוב ריכוז לאחר מיהול על פי המשוואה $(C1 \times V1 = C2 \times V2)$ - חישוב ריכוז נעלם בעזרת משוואת הקו הישר - חשיבות איפוס ספקטרופוטומטר | <p align="center">הכרת ספקטרופוטומטר: קביעת אורך גל אופטימלי וריכוז תמיסה בשיטה ספקטרופוטומטרית</p> <p>ניסוי 4.2 עמ' 47-50 בספר "לקט ניסויים בביוכימיה מכשירית".</p> | 1 |
| <ul style="list-style-type: none"> - בניית טבלה - חישוב בטבלה של ריכוז לאחר מיהול - בניית גרף כיול - הצגת משוואת קו מגמה בתרשים - חישוב ריכוז נעלם בעזרת משוואת הקו הישר | <ul style="list-style-type: none"> - מבנה חלבון ראשוני, שניוני, שלישוני ורביעוני (קשר פפטידי, קצה אמיני וקצה קרבוקסילי) - ראגנט ביורט - גרף כיול - הכנת סדרת מיהול - חישוב ריכוז לאחר מיהול על פי המשוואה $(C1 \times V1 = C2 \times V2)$ - חישוב ריכוז נעלם בעזרת משוואת הקו הישר - חשיבות איפוס ספקטרופוטומטר | <p align="center">אפיון חלבונים: קביעת ריכוז חלבון בשיטת ביורט</p> <p>ניסוי 4.5 עמ' 57-61 בספר "לקט ניסויים בביוכימיה מכשירית".</p> | 2 |

| | | | |
|--|--|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - בניית טבלה - חישוב בטבלה של הפרש בליעה - בניית גרף פעילות האנזים כתלות בטמפרטורה (גרף רציף) | <ul style="list-style-type: none"> - האנזים טריפסין ותפקידו - המצע BANI - תפקיד האנזים כזרז תגובות כימיות - תגובת אנזים ומצע - השפעת גורמים שונים (טמפרטורה, pH, ריכוז אנזים וריכוז מצע) על פעילות האנזים בניסוי זה יש להתמקד בהשפעת הטמפרטורה על פעילות האנזים (מעל ומתחת לטמפרטורה האופטימלית) - בקרה פנימית השוואתית - ניתוח גרף הפעילות האנזימטית - חישוב פעילות על פי יצירת התוצר - הפסקת פעילות האנזים על ידי חומצה | <p style="text-align: center;">אפיון פעילות אנזימטית: השפעת הטמפרטורה על פעילות האנזים</p> <p>ניסוי 9.2 עמ' 151-152 בספר "לקט ניסויים בביוכימיה מכשירית".</p> | 3 |
| <ul style="list-style-type: none"> - בניית טבלה - חישוב בטבלה של פעילות האנזים על ידי הפרש בליעה לדקה - בניית גרף פעילות האנזים המתאר את השינוי בבליעה לדקה כתלות ב-pH (גרף רציף) | <ul style="list-style-type: none"> - האנזים אינברטאז ותפקידו - המצע סוכרוז - תפקיד האנזים כזרז תגובות כימיות - תגובת אנזים ומצע - השפעת גורמים שונים (טמפרטורה, pH, ריכוז אנזים וריכוז מצע) על פעילות האנזים בניסוי זה יש להתמקד בהשפעת pH על פעילות האנזים - בקרה פנימית השוואתית - חישוב פעילות על פי יצירת התוצר - ראגנט סמנר מזהה חד-סוכרים /סוכרים מחזרים (גלוקוז ופרוקטוז) - ניתוח גרף הפעילות האנזימטית - הפסקת פעילות האנזים על ידי ראגנט סמנר | <p style="text-align: center;">אפיון פעילות אנזימטית: השפעת pH על פעילות האנזים</p> <p>ניסוי 9.3 עמ' 153-156 בספר "לקט ניסויים בביוכימיה מכשירית".</p> | 4 |

| | | | |
|---|---|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - בניית טבלה - בניית גרף כיוול - חישוב בטבלה של ריכוז לאחר מיהול - הצגת משוואת קו מגמה בתרשים - חישוב ריכוז התוצר בעזרת משוואת הקו הישר - חישוב פעילות האנזים על ידי הפרשי בליעה לדקה - בניית גרף פעילות האנזים כתלות בריכוז המצע (גרף רציף) - עקומת מיכאליס מנטן | <ul style="list-style-type: none"> - האנזים בטא עמילאז ותפקידו - המצע עמילן - תפקיד האנזים כזרז תגובות כימיות - תגובת אנזים ומצע - השפעת גורמים שונים (טמפרטורה, pH, ריכוז אנזים וריכוז מצע) על פעילות האנזים בניסוי זה יש להתמקד בהשפעת ריכוז המצע על פעילות האנזים - חשיבות הבקרה השלילית - חישוב פעילות על פי יצירת התוצר לדקה - ראגנט סמנר מזהה חד-סוכרים /סוכרים מחזרים (גלוקוז ופרוקטוז, מלטוז) - הפסקת פעילות האנזים על ידי ראגנט סמנר - חישוב ריכוז לאחר מיהול על פי המשוואה $(C1 \times V1 = C2 \times V2)$ - חישוב ריכוז התוצר בעזרת משוואת הקו הישר - ניתוח גרף הפעילות האנזימטית - עקומת מיכאליס מנטן ואומדן של הקבועים הקינטיים על פי העקומה - הבנת משמעות הקבועים הקינטיים Km ו-V_{max} (ללא חישוב) - מעכב תחרותי והשפעתו על הקבועים הקינטיים ועל עקומת מיכאליס מנטן - מעכב לא תחרותי והשפעתו על הקבועים הקינטיים ועל עקומת מיכאליס מנטן | <p style="text-align: center;">אפיון פעילות אנזימטית: קינטיקה אנזימטית וקביעת קבועים קינטיים. השפעת ריכוז המצע על פעילות האנזים</p> <p>קינטיקה של האנזים עמילאז. ניסוי 9.1 בעמ' 143-150 בספר "לקט ניסויים בביוכימיה מכשירית".</p> | 5 |
| <ul style="list-style-type: none"> - בניית טבלה - חישוב ממוצע | <ul style="list-style-type: none"> - תהליכי נשימה בשמרים (אירובי ואנאירובי) - מטרת קיבוע תאים - טיטרציה של חומצה פחמתית - אינדיקטור חומצה בסיס - שימוש חוזר בשמרים מקובעים - חשיבות ביצוע חזרות | <p style="text-align: center;">קיבוע תאי שמרים באלגינט ותסיסת סוכרים על ידי שמרים מקובעים</p> | 6 |

| | | |
|---|---|--|
| <p>- בניית טבלה - חישוב ממוצע של מספר המושבות בכל טיפול</p> | <p>- חיידקים קומפטנטיים - טרנספורמציה בעזרת CaCl_2 ושוק תרמי - מפת הפלסמיד ואזורים חיוניים בו (אתרי הגבלה, מוצא הכפלה, מקדם פרומוטור), גן עמידות לאנטיביוטיקה) - בקרה חיובית ושליטת על ביטוי גנים - יצירת פלסמיד רקומביננטי על ידי החדרת מחדר בעזרת ליגציה עם האנזים ליגאז - מצע בררני - גן מדווח GFP - חשיבות ביצוע הבקורות השונות (טרנספורמציה ללא פלסמיד, זריעה על מצע לא בררני) - ספירת מושבות של הטיפולים השונים</p> | <p>7</p> <p>טרנספורמציה של פלסמיד רקומביננטי עם גן המדווח לחיידקים</p> <p>pGLO Bacterial Transformation Kit – Bio Rad</p> <p>או מכוני מחקר ומרכזים טכנולוגיים</p> <p>או מעבדות בר אילן (למנויים)</p> |
| <p>- בניית טבלה - חישוב ממוצע של מספר המושבות בכל טיפול</p> | <p>- חיידקים קומפטנטיים - טרנספורמציה בעזרת CaCl_2 ושוק תרמי - מפת הפלסמיד ואזורים חיוניים בו (מוצא הכפלה, מקדם או אזור בקרה, גן עמידות לאנטיביוטיקה) - מצע בררני - בקרה על ביטוי גנים (חיובית ושליטת) - גן מדווח - מערכת קריספר, האנזים CAS-9, ומולקולת RNA-מדריך - מערכת תיקון DNA תאית - חשיבות ביצוע הבקורות השונות - ספירת מושבות של הטיפולים השונים</p> | <p>8</p> <p>קריספר CAS-9 בחיידקים</p> <p>Out of the Blue CRISPR Kit</p> <p>או מכוני מחקר ומרכזים טכנולוגיים</p> |

1. מעבדה מס' 6 – קיבוע תאי שמרים באלגינט ותסיסת סוכרים ע"י שמרי אפיייה מקובעים

1.1 מטרת המעבדה

מעקב אחר תסיסת גלוקוז על-ידי שמרי אפיייה מקובעים באלגינט בשימוש ראשון ובשימוש חוזר, על-ידי טיטור החומצה הפחמתית הנוצרת במהלך התסיסה.

1.2 שאלת חקר

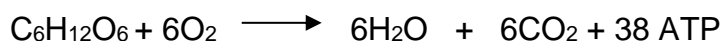
השפעת שימוש חוזר בשמרים מקובעים על עוצמת תסיסת השמרים הנמדדת על ידי על נפח הבסיס NaOH הדרוש כדי לסתור את החומצה הפחמתית הנוצרת בעקבות התסיסה.

1.3 רקע עיוני

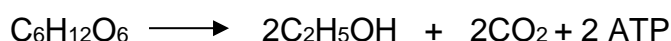
שמרים הינם אורגניזמים חד-תאיים אאוקריוטיים השייכים לממלכת הפטריות. השמרים הם צרכנים הניזונים מסוכרים ממקורות שונים ואינם מבצעים פוטוסינתזה. השמרים הם יצורים אנאירובים פקולטיביים, זאת אומרת שבסביבה שמכילה חמצן הם מפיקים אנרגיה בתהליך של נשימה תאית אירובית ובסביבה חסרת חמצן מסוגלים לעבור לנשימה אנאירובית (תהליך זה נקרא גם תסיסה).

תהליכי הנשימה האירובית והאנאירובית המבוצעים על ידי שמרים מתבצעים במספר רב של שלבים ביוכימיים וניתן לסכם אותם על פי המשוואות הבאות:

נשימה תאית – אירובית:



נשימה אנאירובית – תסיסה:



כפי שניתן לראות במשוואות, שני תהליכי הנשימה מבוססים על פירוק גלוקוז ($C_6H_{12}O_6$). אך בעוד שבתהליך הנשימה התאית נוצרים תוצרים אנאורגניים (מים- H_2O ופחמן דו חמצני- CO_2) ומספר גדול של מולקולות אנרגיה ATP, בתהליך הנשימה האנאירובית נוצר תוצר אורגני בשם אתנול (C_2H_5OH) ומעט מולקולות אנרגיה ATP. לכן, תהליך הנשימה האנאירובית הינו תהליך הרבה פחות יעיל מבחינה אנרגטית לשמרים, אך הוא מאפשר להם לשרוד בתנאים ללא חמצן.

תוצרי הנשימה (האירובית ואנאירובית) הסופיים של השמרים משמשים רבות בתעשיית המזון: בעת התפתחת בצק באפיה, הפחמן הדו חמצני המשתחרר מהשמרים נלכד בבצק וגורם לתפיחתו. בתהליכי ייצור של משקאות

חריפים כגון יין וביירות, משתמשים באתנול (הנקרא גם כוהל אתילי או אלכוהול) ובפחמן הדו-חמצני הנוצרים בתהליך התסיסה (תהליך זה נקרא גם תסיסה כוהלית).

שמרים מסוגלים לבצע תהליכי נשימה תוך ניצול חד-סוכרים נוספים לגלוקוז, דוגמת הסוכרים גלקטוז ופרוקטוז. כמו כן, שמרים מסוגלים להפיק אנרגיה גם מדו-סוכרים על ידי שימוש באנזימים ספציפיים המפרקים את הדו-סוכר לחד-סוכר. לדוגמה האנזים אינברטאז המבוטא בשמרים מפרק את דו-סוכר סוכרוז לשני חד-סוכרים גלוקוז ופרוקטוז ומאפשר בכך את ניצול סוכרים אלו בתהליכי הנשימה.

בנוסף לשימוש כיום בשמרים בתעשיית המזון (ביוטכנולוגיה מסורתית) משמשים תאי השמרים האאוקריוטים גם בתעשיית הביוטכנולוגיה המתקדמת לייצור של חלבונים שונים טבעיים או רקומביננטיים (חלבונים הנוצרים בתאי השמרים בעקבות הנדסה גנטית שהם עברו). ייצור חלבונים בתרבית שמרים נחשבת כיעילה וחסכונית, מכיוון שתאים אלו הינם חד-תאיים המתרבים מהר בתרחיף ותנאי הייצור שלהם פשוטים יותר מתאי צמחים או בעלי חיים, ולמרות זאת הם מבטאים חלבונים באופן דומה לתאי צמחים ובעלי חיים. דוגמה לתהליך ייצור של חלבונים רקומביננטיים בשמרים בתעשיית הביוטכנולוגיה הן חברות סטרט-אפ המייצרות היום חלב אם או חלב פרה משמרים מהונדסים המייצרים את חלבוני החלב השונים.

קישורים להעשרה:

1. [חלב נטול חלב – מכון דוידסון](#)

2. [חלב פרה הדור הבא – אוניברסיטת תל אביב](#)

אחת מהדרכים להשתמש בשמרים בתעשייה במטרה לייצר חלבונים, היא להשתמש בשמרים מקובעים בתוך חלקיקי ג'ל פולימרי בלתי מסיסים וזאת על ידי "אריזת" התאים בתוכם. לצורכי קיבוע ניתן להשתמש בסוגים שונים של פולימרים יוצרי ג'ל ולכל אחד מהם יתרונות וחסרונות ייחודיים. ג'לים שונים נבדלים, בין היתר, בחדירות, בחוזק, במידת רעילותם ובעמידותם הכימית.

שיטה מקובלת לקיבוע שמרים היא שימוש ברב-סוכרים כגון אגר ואלגינט המופקים מאצות והיכולים לספוח מים וליצור ג'ל פולימרי.

בניסוי זה נעשה שימוש בשמרי אפיה מסוג *Saccharomyces cerevisiae* מקובעים בתמיסת נתרן אלגינט. חומר זה הוא פולימר מסיס בו מורחפים תאי השמרים. כאשר הפולימר ובו השמרים בא במגע עם תמיסת סידן כלורי מתקבל מלח קשה תמס של אלגינט הסידן. הפולימר הבלתי מסיס יוצר צורת נשאים כדוריים ובתוכם כלואים תאי השמרים. שיטת הקיבוע באלגינט יכולה לשמש גם לקיבוע אנזימים ולא תאים שלמים וכן בבישול מולקולרי.

קישורים להעשרה:

1. [קוויאר ממיץ פטל – מכון דוידסון](#)

2. [נשיא המדינה אפרים קציר וקיבוע אנזימים – מכון דוידסון](#)

השימוש בשמרים או תאים מקובעים בתעשייה הביוטכנולוגית יוצר ייתרון גדול בכך שניתן להפריד שמרים מקובעים ממערכת התגובה הכוללת מצע ותוצרים, ולשוב ולהשתמש בהם בתהליכים נוספים. כמו כן, ניתן להכין עמודה של שמרים מקובעים ולהעביר דרכה מצע באופן רציף ולקבל תוצרים רצויים בצורה רציפה. לעיתים מהווה הקיבוע גם הגנה על תאי השמרים.

בניגוד לכך, קיים חסרון לעבודה עם שמרים מקובעים הנובע מירידה בסיכויי המפגש בין השמרים למצע כתוצאה מהקטנת היחס בין שטח הפנים והנפח של השמרים ולכן המטבוליזם איטי יותר.

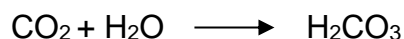
ניתן לעקוב אחרי תוצרי הנשימה / תסיסה של השמרים במספר שיטות:

1. **לפי כמות האתנול שנוצר בתהליך:** ככל שתמיסה מכילה כמות גדולה יותר של אתנול - המשקל הסגולי של התמיסה יורד. ניתן לעקוב בדרך קלה ע"י שימוש במכשיר ההידרומטר המודד צפיפות נוזלים (השיטה מקובלת בתעשיית היין).

2. **לפי כמות הפחמן דו חמצני CO₂ הנפלט מתאי השמרים:** במקרה זה ניתן לבצע את הבדיקה בשתי שיטות:

א. מעקב אחרי נפח הגז שנוצר לדוגמא על ידי מזרק המחובר למבחנת התסיסה והגז הנוצר דוחק את הבוכנה.

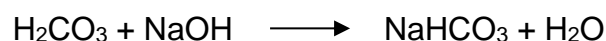
ב. בדיקת החומציות הנוצרת בתמיסה כתוצאה מהתגובה בין פחמן דו חמצני לבין מים לקבלת חומצה פחמתית (H₂CO₃):



את רמת החומציות ניתן לבדוק בשתי שיטות:

(1) בדיקת pH

(2) טיטרציה של החומצה הפחמתית עם בסיס (NaOH) בעזרת אינדיקטור פנולפתלאין עד להופעת צבע ורדרד יציב (בסביבה בסיסית). התגובה הכימית המתרחשת היא:



1.4 מהלך הניסוי



1. סמנו 2 ארלנמיירים של 100 מ"ל אחד בכיתוב "גלוקוז" והשני "מים".
2. הכניסו בכל אחד משני ארלנמיירים 20 גרם כדורי שמרים מקובעים באלגינט.
3. סמנו משורה אחת בכיתוב "גלוקוז" והשנייה "מים".
4. הוסיפו בעזרת משורות אלו לכל אחד מהארלנמיירים, 50 מ"ל תמיסת גלוקוז 10% או 50 מ"ל מים בהתאם לסימון על הארלנמיירים ועל המשורות.
5. הניחו את הארלנמיירים עם השמרים לאינקובציה באמבט מים בטמפרטורה של 35°C למשך 15 דקות.



תמונה 6.1: אינקובציה של השמרים המקובעים באמבט בטמפרטורה של 35°C

6. בזמן האינקובציה באמבט הכינו ארבעה ארלנמיירים קטנים וסמנו שניים בכיתוב "גלוקוז" ושניים בכיתוב "מים".
7. בסיום האינקובציה, בעזרת פיפטור או פיפטה הוציאו מכל ארלנמייר ששהה באמבט, שתי דגימות של 10 מ"ל מן הנוזל העליון (תסנין) והעבירו אותן לתוך שני ארלנמיירים שהכנתם בעלי אותו כיתוב. בנוסף, הוסיפו לכל אחד מהארלנמיירים 3 טיפות של פנולפתלאין.
8. בצעו שטיפה כפולה של כדורוני האלגינט עם מים בשני הארלנמיירים בדרך הבאה: שימו מסננת צמודה לפיה של הארלנמייר המסומן בכיתוב "מים" והפכו את הארלנמייר ושפכו רק את הנוזל (ללא הכדורונים) לכלי הפסולת. הפכו את הכלי והמסננת חזרה והחזירו את הכדורונים לארלנמייר. הוסיפו 50 מ"ל מים מזוקקים ערבבו ושפכו רק את הנוזל בעזרת מסננת צמודה לפיה. הוסיפו שנית 50 מ"ל מים מזוקקים לכדורונים, ערבבו ושפכו את הנוזל בלבד בעזרת מסננת צמודה לפיה. חזרו על תהליך זה של שטיפת הכדורונים בארלנמייר השני המסומן בכיתוב "גלוקוז".



תמונות 6.2 ו-6.3: שטיפה של השמרים המקובעים בעזרת מסננת המוצמדת לפיית הארלנמייר והוצאת הנוזל ללא הכדורונים

9. לביצוע תהליך תסיסה חוזרת בשמרים המקובעים, הוסיפו שוב לכל אחד מהארלנמיירים 50 מ"ל תמיסת גלוקוז 10% או 50 מ"ל מים עם המשורות המתאימות בהתאם לסימון עליהם. שימו לב להכניס את התמיסה הנכונה לכל ארלנמייר כדי לא לפגוע בניסוי.
10. הניחו שוב את הארלנמיירים באמבט מים בטמפרטורה של 35°C למשך 15 דקות לבדיקת תהליך התסיסה בשימוש החוזר בשמרים המקובעים.

11. טטרו בצורה איטית (טיפה אחר טיפה) את התסנין שבארבעת הארלנמיירים שהכנתם בסיום האינקובציה הראשונה, עם תמיסת NaOH 0.05M עד לקבלת צבע ורדרד חיוור יציב. רשמו את התוצאות בטבלה 6.1 המצורפת.

12. הכינו ארבעה ארלנמיירים קטנים נוספים וסמנו שניים בכיתוב "גלוקוז" ושניים בכיתוב "מים".
 13. כעבור 15 דקות של התסיסה החוזרת בשמרים המקובעים, הוציאו בעזרת פיפטור או פיטה מכל ארלנמייר ששהה באמבט, שתי דגימות של 10 מ"ל מן הנוזל העליון והעבירו אותן לתוך שני ארלנמיירים. לכל ארלנמייר הוספו 3 טיפות פנולפתלאין.

14. טטרו בצורה איטית (טיפה אחר טיפה) את התסנין שבארבעת הארלנמיירים עם תמיסת NaOH 0.05M עד לקבלת צבע ורדרד חיוור יציב. רשמו את התוצאות בטבלה המצורפת.

טבלה 6.1 – טבלה לרישום תוצאות הטיטרציה של תסנין השמרים המקובעים

| הפרש ממוצע נפח הטיטרציה של השמרים המקובעים עם וללא גלוקוז | נפח טיטרציה ממוצע של NaOH 0.05M (מ"ל) | חזרה 2- נפח NaOH 0.05M (מ"ל) | חזרה 1- נפח NaOH 0.05M (מ"ל) | |
|---|--|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| | | | | "מים" חזרה ראשונה |
| | | | | "גלוקוז" חזרה ראשונה |
| | | | | "מים" חזרה שנייה |
| | | | | "גלוקוז" חזרה שנייה |

1.5 ניתוח תוצאות, דיון ומסקנות

ניתוח תוצאות ניסוי תסיסה בשמרים מקובעים:

1. חשבו את ממוצע נפח הטיטרציה בכל ארלנמייר בשימוש הראשון ובשימוש החוזר עם גלוקוז ועם מים ורשמו אותו בטבלה.
2. הפחיתו את ממוצע נפח הטיטרציה שהתקבל בארלנמייר שהכיל מים מממוצע של נפח הטיטרציה שהתקבל בארלנמייר עם הגלוקוז בכל אחת מהחזרות ורשמו אותו בטבלה. הפרש זה מבטא את עוצמת תהליך התסיסה של שמרים מקובעים אלו.

שאלות לדיון ומסקנות ניסוי תסיסה בשמרים מקובעים:

1. סכמו את מסקנותיכם מתוצאות הניסוי.
2. הסבירו ממה נובע ההבדל ברמת חומציות התמיסה המתקבלת לאחר פעולת השמרים בין הארלנמייר עם גלוקוז לזה המכיל רק מים.
3. מדוע מכל ארלנמייר עם שמרים מקובעים נלקחו שתי דגימות ולא דגימה אחת?
4. הסבירו מהו היתרון בשימוש בשמרים מקובעים לעומת שמרים מסיסים.
5. מדוע חוקרים בוחרים להשתמש בתרבית תאי שמרים בתעשיית הביוטכנולוגיה כיום, ומה ההבדל בין השימושים בתאי השמרים בתעשיית הביוטכנולוגיה המסורתית לזו המודרנית?
6. בניסוי זה השתמשו בתאי שמרים מקובעים באלגינט המכילים אנזימים רבים הפועלים בתאים אלו והמבצעים תהליכים רבים, ביניהם תהליכי הנשימה להפקת אנרגיה. בטכניקות דומות ניתן להשתמש באנזימים שהופקו מתאים מקובעים לג'ל פולימרי, במקום להשתמש בתאים השלמים מקובעים. אלו יתרונות ואלו חסרונות יכולים להיות לדעתכם בשימוש בקיבוע אנזים מסוים על פני תא המכיל מספר גדול של אנזימים הפועלים יחד?

2. מעבדה מס' 7 – טרנספורמציה של פלסמיד רקומביננטי עם גן המדווח לחיידקים קומפטינטיים

2.1 מטרת המעבדה

ביצוע טרנספורמציה של פלסמיד רקומביננטי לחיידקי *E. Coli*, בעזרת שוק תרמי (Heat shock), ובדיקת ביטוי הגנים בחיידקים על ידי גן מדווח.

2.2 שאלת חקר

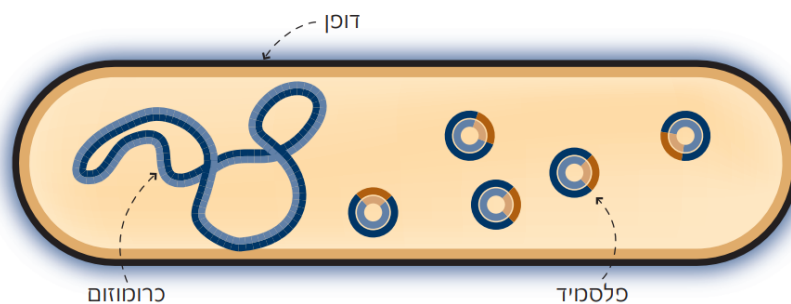
השפעת ביצוע טרנספורמציה על ידי שוק תרמי עם פלסמיד רקומביננטי על ביטוי הגן המדווח בחיידקי *E. coli*.

2.3 רקע עיוני

2.3.1 פלסמיד

חיידקים הינם אורגניזמים פרוקריוטים חד תאיים. לחיידקים כרומוזום אחד מעגלי גדול המכיל את גנום החיידק. בנוסף חיידקים רבים מכילים פלסמידים-DNA מעגלי קטן באורך של עד כ-10,000 נוקלאוטידים. כל פלסמיד מופיע בתא החיידק מספר פעמים, בניגוד לכרומוזום החיידק הנמצא יחיד בתא. לפלסמיד יכולת שכפול עצמאית ללא תלות בשכפול של החיידק עצמו. מקטע הנקרא "מוצא ההכפלה" או "Origin of replication" (בקיצור ORI) הינו אזור בגנום ממנו מתחיל תהליך שכפול ה-DNA. כדי שפלסמיד יוכל להשתכפל בתוך תא החיידק באופן עצמאי יש צורך שיכיל את מקטע מוצא ההכפלה ORI בעצמו.

פלסמידים בחיידק; כל פלסמיד קטן בערך פי 1000 מהכרומוזום.



תמונה 7.1: גנום החיידק מכיל כרומוזום ומספר עותקים של פלסמידים הבנויים מ-DNA דו גדילי

מקור: דן מיכאל וענת ירדן, הנדסה גנטית מעקרונות ושיטות מחקר להנדסה גנטית, מכון ויצמן ומשרד החינוך, 2008.

פלסמידים מכילים לרוב גנים בעלי תוספות שאינן חיוניות לתפקוד החיידק כגון פירוץ לקטוז, עמידות לאנטיביוטיקה ועוד, תכונות אלו מעניקות לחיידק יתרון הישרדותי על פני חיידקים אחרים בסביבה. לחיידקים שונים פלסמידים שונים הנבדלים באורך הפלסמיד, כמות וסוג הגנים בפלסמיד ומספר העותקים של הפלסמיד בתוך התא.

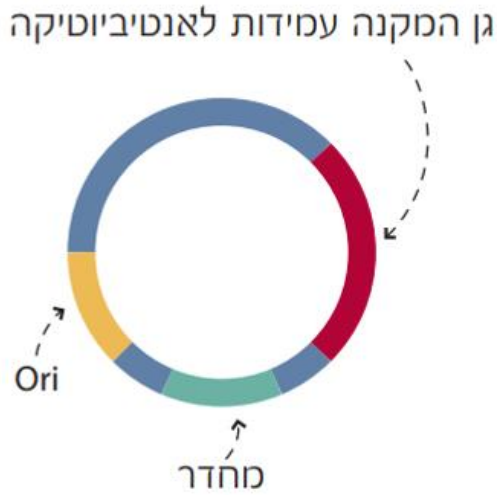
טבלה 7.1: סיכום ההבדלים המרכזיים בין כרומוזום החיידק ל-DNA פלסמידי

| | כרומוזום חיידק | DNA פלסמידי |
|-----------------------------------|---|---|
| צורה | מעגלי | מעגלי |
| אורך | גדול יחסית | קטן יחסית |
| מספר עותקים בתא | אחד | מספר עותקים בודדים עד מאות עותקים (כתלות בפלסמיד ובחיידק) |
| מוצא ההכפלה | קיים | קיים |
| שכפול | שכפול לקראת חלוקת התא | שכפול עצמאי לאורך חיי התא |
| גנים | גנים חיוניים לחיות החיידק, תפקודו ושכפולו | מכיל לרוב גנים לתכונות ייחודיות הנותנות לחיידק יתרון הישרדותי |
| אפשרות מעבר בין אורגניזמים | הכרומוזום מגדיר את החיידק, ואינו עובר בין חיידקים | חיידקים שונים יכולים להעביר ביניהם פלסמידים |

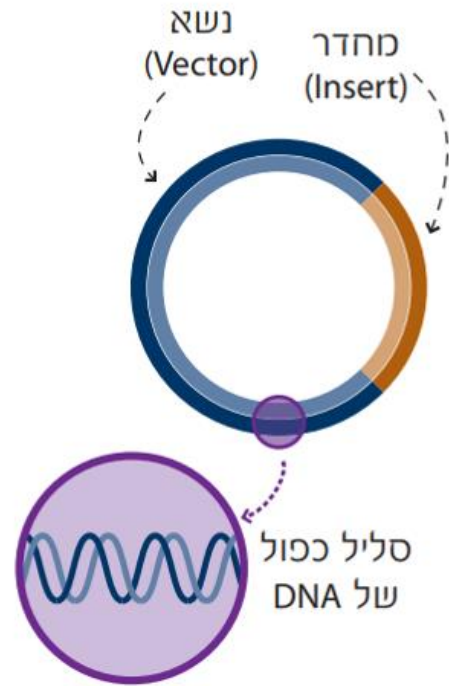
2.3.2 פלסמיד רקומביננטי

בהנדסה גנטית ניתן לייצר פלסמיד רקומביננטי המכיל DNA ממקורות שונים. מקטע ה-DNA שמכניסים לפלסמיד נקרא **מחדר** ומקורו יכול להיות מחיידק אחר או מאורגניזם אאוקריוטי אחר. מכיוון שהפלסמיד הינו מולקולה קטנה יחסית, גודל המחדר אותו ניתן להכניס לפלסמיד מוגבל ומתואם לגודל הפלסמיד. פלסמיד המיועד לשיבוט חייב להכיל לפחות אתר הגבלה אחד לאנזים הגבלה (אנזים רסטריקציה) כך שניתן יהיה לחתוך אותו לצורך הכנסת מחדר רצוי. כמו כן, על הפלסמיד להכיל גן בורר שהינו גן עמידות לאנטיביוטיקה לצורך ברירת החיידקים שקיבלו את הפלסמיד הרקומביננטי, מהחיידקים שלא קיבלו את הפלסמיד.

צורה סכמטית שניה להצגת פלסמיד



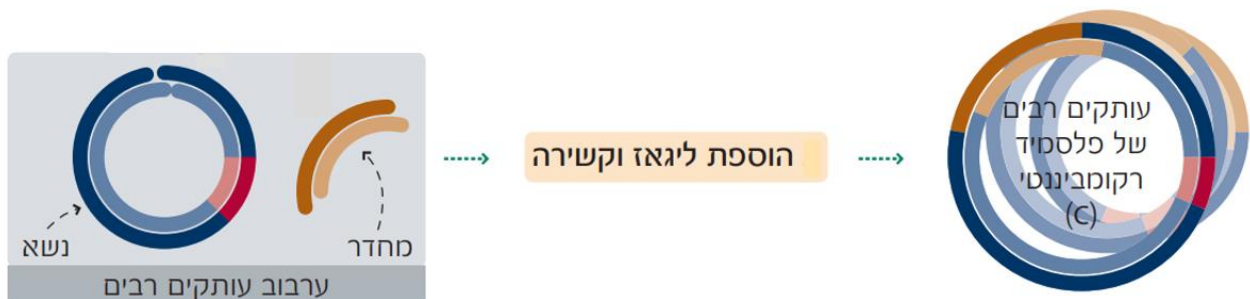
צורה סכמטית אחת להצגת פלסמיד



תמונה 7.2: אזורים בפלסמיד רקומביננטי: מוצא ההכפלה, גן סלקטיבי ומחדר

מקור: דן מיכאל וענת ירדן, הנדסה גנטית מעקרונות ושיטות מחקר להנדסה גנטית, מכון ויצמן ומשרד החינוך, 2008.

על מנת לייצר פלסמיד רקומביננטי יש צורך לחתוך את המחדר מהגנום הרצוי ואת הפלסמיד באותו אנזים הגבלה (רסטריקציה), או באנזימי הגבלה שונים היוצרים קצוות המתאימים לחיבור, ולבודד את תוצרי החיתוך הרצויים. חיבור המחדר והפלסמיד נקרא תהליך ליגציה ומתרחש בעזרת האנזים ליגאז, היוצר קשרים בין הנוקלאוטידים של המחדר והפלסמיד (קשרים פוספודיאסטריים). בחירת אתרי החיתוך בפלסמיד חשובה במטרה לא לפגוע באזורים חשובים בפלסמיד כגון אזור ה-ORI וגן העמידות לאנטיביוטיקה.

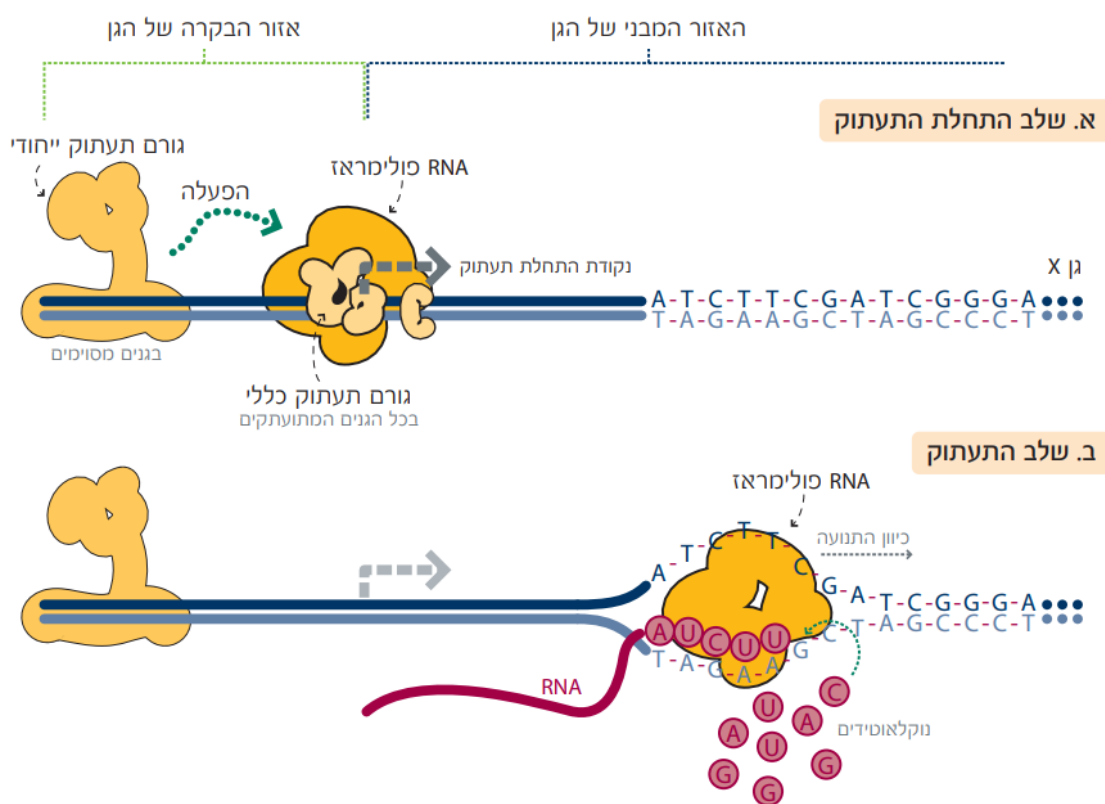


תמונה 7.3: יצירת פלסמיד רקומביננטי בעזרת חיתוך באנזים הגבלה וליגציה עם מחדר בקרת ביטוי גנים

מקור: דן מיכאל וענת ירדן, הנדסה גנטית מעקרונות ושיטות מחקר להנדסה גנטית, מכון ויצמן ומשרד החינוך, 2008.

בקרה על ביטוי גנים מאפשרת לתאים לבטא גנים ייחודיים, בהתאמה לסביבה בהם הם מצויים ולצרכי התא בזמן נתון וכן מניעת ייצור יתר של חלבונים לא נדרשים. ויסות הביטוי של גנים מתרחש לרוב ברמת תעתוק מ-RNA ל-DNA.

אזור המקדם (פרומטור), הוא אזור בקרה הנמצא בתחילת גן ב-DNA אליו נקשר האנזים RNA פולימראז לצורך התחלת תהליך תעתוק של הגן. כאשר מתאפשר קישור של האנזים RNA פולימראז לאזור המקדם (פרומטור) - יתרחש תהליך התעתוק. האנזים RNA פולימראז יכול להקשר לאזור המקדם (פרומטור) רק לאחר קישור של חלבונים הנקראים גורמי תעתוק (פקטורי תעתוק) לרצף הפרומטור. גורם התעתוק מתווך את הקישור של האנזים RNA פולימראז אל המקדם (פרומטור) ובכך מפעיל אותו לבצע את תהליך התעתוק וביטוי הגן. בדרך זו מבצעים גורמי התעתוק בקרה חיובית על ביטוי גנים.



תמונה 7.4: הפעלת תהליך התעתוק על ידי גורם תעתוק ייחודי הנקשר לרצף הבקרה של הגן

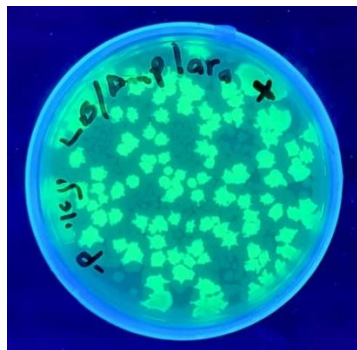
מקור: דן מיכאל וענת ירון, הנדסה גנטית מעקרונות ושיטות מחקר להנדסה גנטית, מכון ויצמן ומשרד החינוך, 2008.

בנוסף לגורמי התעתוק הפועלים בבקרה חיובית להגברת תהליך התעתוק, קיימים גם חלבונים דכאנים (רפרסור) הפועלים לדיכוי תהליך התעתוק. חלבונים אלו נקשרים לאזור הבקרה המקדם (פרומטור) ובכך מונעים את קישור גורמי התעתוק ו/או האנזים RNA פולימראז ומונעים את ביטוי הגן בזמן שהוא אינו חיוני לתא. בעת הצורך בביטוי הגן, יתנתק או יפורק החלבון הדכאן מאזור הבקרה ובעקבות כך יחל ביטוי הגן בתא. פעולת חלבונים המדכאים את ביטוי הגן מוגדרת כבקרה שלילית על ביטוי גנים, מכיוון שהיא מונעת את ביטויים.

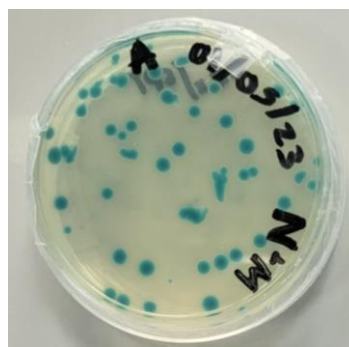
ביצירת פלסמיד רקומביננטי המכיל גן המיועד לשיבוט בתא, השונה מהתא המקורי של הגן, יש לוודא כי הפלסמיד מכיל את האזור המבני של הגן ואזור בקרה מקדם (פרומוטור) המותאם לתא המקבל. במקרה ואזור הבקרה המקורי של הגן אינו מתאים לתא, ניתן לחבר בעזרת חיתוך וליגציה (חיבור בעזרת האנזים ליגאז) אזור בקרה שהתא יוכל להפעיל אותו. הוספת אזור הבקרה המתאים יאפשר חיבור של גורמי התעתוק (פקטורי השעתוק) הייחודיים של התא המקבל לאזור הבקרה והפעלה של האנזים RNA פולימראז המבצע את פעולת התעתוק.

2.3.3 גן מדווח

גן מדווח הינו גן שאת התוצר החלבוני שלו ניתן למדוד באופן פשוט כגון מדידת צבע או פלורוסנציה. ביטוי גן מדווח יכול להצביע על הפעלה של מקדם (פרומוטור) או המצאות פלסמיד בתא המקבל וכך ניתן להשתמש בו במטרה לוודא את הצלחת תהליך הטנספורמציה בחיידקים. אחד מהגנים הנפוצים ביותר במחקר הינו הגן המדווח Green Fluorescent Protein (GFP). GFP הינו חלבון פלורוסנטי ירוק שמקורו במדוזה. כאשר מקרינים על החלבון קרני UV החלבון פולט אור באורך גל נראה בצבע ירוק. מסיבה זו הגן ל-GFP משמש כגן מדווח, מכיוון שניתן להבחין בתוצר הגן בצורה פשוטה. גנים מדווחים נוספים המקובלים לשימוש הינם הגן לאנזים בטא גלקטוזידאז המפרק מצע הנקרא X-gal ליצירת תוצר כחול והאנזים אלקליין פוספטאז היוצר בעת פירוק המצע תוצר בעל צבע צהוב.



תמונה 7.5: חיידקים לאחר טנספורמציה עם הגן GFP תחת תאורת UV



תמונה 7.6: חיידקים לאחר טנספורמציה עם הגן לאנזים בטא גלקטוזידאז וזריעה על מצע הכולל X-gal

2.3.4 ביצוע טרנספורמציה של פלסמיד לחיידקים על ידי שוק תרמי

במטרה לבטא את הגנים הנמצאים בפלסמיד (כולל הגן המדווח) יש להכניס את הפלסמיד הרקומביננטי לתאי חיידקים. פעולת הכנסת הפלסמיד לחיידקים דורשת ביצוע שוק תרמי במטרה ליצירת חורים קטנים בקרום את החיידק המאפשרים את כניסת הפלסמיד מחוץ התא לתוך הציטופלסמה. בתהליך השוק התרמי מוכנסים החיידקים לבופר טרנספורמציה המכיל מלח מסוג CaCl_2 יחד עם הפלסמידים במבחנה. יוני הסידן (Ca^{2+}) הנמצאים בבופר ממסכים את המטען השלילי של קרום התא ומאפשרים את התקרבות הפלסמיד שגם הוא טעון במטען שלילי לקרום.

את המבחנה מכניסים לטמפרטורה נמוכה של 0°C במטרה למנוע את תנועת מולקולות הפוספוליפידים בקרום תא החיידקים. לאחר מכן מכניסים את החיידקים והפלסמידים לטמפרטורה גבוהה יותר של 42°C לזמן קצר מאד. המעבר החד מטמפרטורה נמוכה לגבוהה יוצרת חורים קטנים בקרום החיידק דרכם הפלסמידים יכולים להיכנס לציטופלסמה של החיידק. השארת החיידקים לזמן ממושך בטמפרטורה גבוהה תגרום לפירוק קרום החיידק ולמוות שלו. לכן, לאחר הזמן הקצוב יש להכניס את החיידקים חזרה לקרח. הסיכוי שפלסמידים יכנסו אל החיידק בתהליך טרנספורמציה מסוג זה הינו נמוך ולכן משתמשים לצורך התהליך בחיידקים קומפטנטיים - חיידקים שעברו תהליך המגביר את חדירות הקרום שלהם לפלסמידים.

2.3.5 תהליך ברירת החיידקים (סלקציה) לאחר ביצוע הטרנספורמציה

לאחר השוק התרמי יש לתת לחיידקים זמן לשכפול הפלסמיד, לביטוי הגנים הנמצאים בו ולהתאוששות מהשוק התרמי. בזמן ההתאוששות יש לגדל את החיידקים בטמפרטורה אופטימלית (37°C) ומצע מזון עשיר, כך החיידקים יוכלו לייצר מספיק אנרגיה לשכפול הפלסמיד שחדר בשוק התרמי ולביטוי הגנים. לאחר שלב ההתאוששות, יש לזרוע את החיידקים על צלחות אגר המכילות מזון ואנטיביוטיקה (מצע סלקטיבי). החיידקים שעברו טרנספורמציה עם הפלסמיד ביטאו בזמן ההתאוששות את הגנים שבפלסמיד וכעת הם עמידים לאנטיביוטיקה. בשלב זה נערך שלב הברירה בין החיידקים הטרנספורמנטיים שקיבלו את הפלסמיד, לבין החיידקים שלא עברו טרנספורמציה. רק החיידקים שקיבלו את הפלסמיד ומבטאים את הגן לעמידות יוכלו להתרבות וליצור מושבה ואילו החיידקים שלא קיבלו את הפלסמיד ימותו, כיוון שהגן לעמידות נמצא רק על הפלסמיד. מושבות החיידקים שיגדלו על מצע המזון הסלקטיבי הם חיידקים טרנספורמנטיים. חשוב לציין שישנם סוגים רבים של אנטיביוטיקה, ויש להתאים את סוג האנטיביוטיקה עליה מגדלים את החיידקים לגן עמידות שנמצא בפלסמיד שהוחדר לחיידקים, ולגנים נוספים לעמידות במידה ונמצאים כבר בחיידקים המקבילים. לצרכי בקרה, יש לזרוע את החיידקים גם על מצע מזון עשיר ללא אנטיביוטיקה. במצע מזון זה תהיה גדילה של כלל החיידקים ששרדו את השוק התרמי. הבקרה מאפשרת לוודא שתהליך השוק התרמי בוצע היטב והחיידקים שרדו את התהליך.

קישורים להעשרה:

1. [אנימציה של תהליך יצירת פלסמיד רקומביננטי וטרנספורמציה לחיידקים](#)
2. [מצגת טרנספורמציה לחיידקים של פלסמיד רקומביננטי המכיל את הגן המדווח GFP](#)
(מקור Bio-Rad)

הערה: במידה ובוצע ניסוי טרנספורמציה השונה מזה המוצג בחוברת זו יש לעבור לשלב השאלות לדיון בסוף המעבדה.

2.3.6 מעבדת טרנספורמציה לחיידקי *E. Coli* עם פלסמיד המכיל את הגן GFP בבקרת ארבינוז

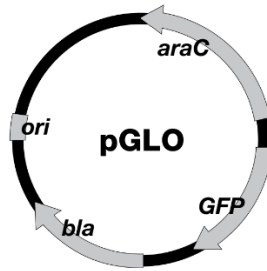
כאמור, בקרה על ביטוי גנים מאפשרת ביטוי מתאים של גנים ספציפיים, תוך התאמה לסביבה ולצרכי התא ומונע ייצור יתר של חלבונים. לדוגמה, הסוכר ארבינוז הוא מקור אנרגיה ומקור לפחמן לתא. חיידקי *E. Coli* מייצרים שלושה אנזימים (חלבונים) הדרושים לפירוק ארבינוז כמקור מזון. הגנים המקודדים לאנזימים אלה אינם מתבטאים כאשר ארבינוז אינו נמצא בסביבה, אלא הם מתבטאים רק כאשר ארבינוז נמצא בסביבתם.

המקדם (פרומוטור) לגן המקודד לאנזימים האחראים על פירוק הארבינוז נקרא PBAD. תעתוק הגנים לפירוק ארבינוז דורש כמו כל הגנים, את קישורו של האנזים RNA פולימראז לאזור הבקרה אך פעולה זו מתאפשרת רק בעת שגורם התעתוק *araC* הינו פעיל.

גורם התעתוק *araC* נקשר ל-DNA באזור המקדם (פרומוטור) באופן קבוע, אך הוא במצב לא פעיל ולכן האנזים RNA פולימראז לא יכול להקשר לאזור הבקרה ואין תעתוק של הגן. לעומת זאת, בנוכחות הסוכר ארבינוז שנכנס לתוך תא החיידק, נוצר קשר ישיר של הסוכר עם החלבון *araC*. קשר זה גורם לחלבון *araC* לשנות את צורתו ובכך מתאפשר קישורו של האנזים RNA פולימראז למקדם (פרומוטור) ומתחיל תעתוק הגנים האחראים לפירוק ארבינוז. בדרך זו, רק בנוכחות הסוכר ארבינוז יש ביטוי של החלבונים המפרקים את הארבינוז. כאשר הארבינוז מפורק החיידק משתמש בו לצרכי אנרגיה ומקור פחמן. בתום תהליך הפירוק, כאשר אין יותר ארבינוז בתא, גורם תעתוק *araC* חוזר לצורתו המקורית ותהליך התעתוק של הגן נפסק.

בניסוי זה נעשה שימוש בפלסמיד רקומביננטי pGLO. אל פלסמיד המכיל מוצא ההכפלה (ORI) וגן עמידות לאנטיביוטיקה אמפיצילין (*bla*) הוחדר הגן ל-*araC* המתבטא באופן קבוע, והמקדם (פרומוטור) PBAD אליו מחובר הגן לחלבון GFP. בפלסמיד זה, בנוכחות ארבינוז גורם התעתוק *araC* יהיה פעיל ויתרחש תעתוק ותרגום של הגן GFP. נוכחות של החלבון GFP בתא מעידה על הפעלת המקדם (פרומוטור) PBAD.

בהיעדר ארבינוז, לא נראה את ביטוי החלבון GFP בתאים וזאת מכיוון שהאנזים RNA פולימראז לא יוכל להיקשר אל המקדם (פרומוטור) ולא יהיה תעתוק של הגן. במצב זה צבע המושבות תחת תאורת UV יהיה לבן, ולא ירוק זוהר.



pGLO plasmid. Sequence and map are available at <http://explorer.bio-rad.com> under "Teaching Resources"

תמונה 7.7: מבנה הפלסמיד הרקומביננטי

ori: מוצא ההכפלה של הפלסמיד

bla: גן עמידות לאנטיביוטיקה אמפיצילין

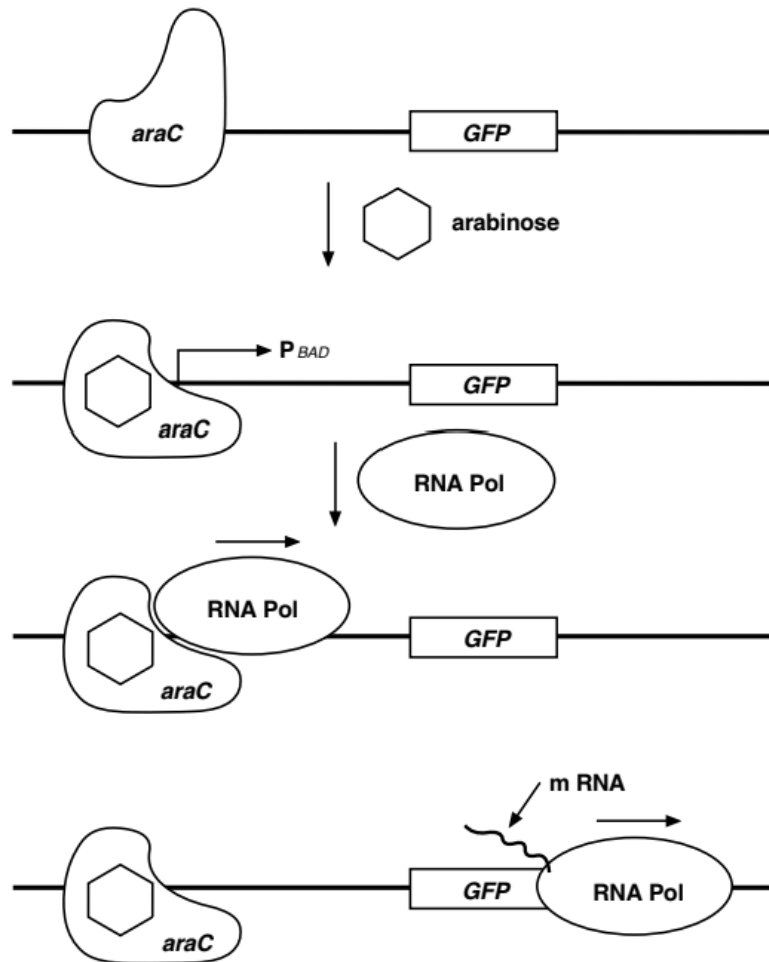
araC: גן לביטוי גורם תעתוק *araC*, שפעיל רק בנוכחות ארבינוז

GFP: גן מדווח לחלבון פלורוסנטי ירוק, כולל אזור בקרה של PBAD

מקור: BIO-RAD

<https://www.bio-rad.com/en-il/product/pglo-bacterial-transformation-kit?ID=619b8f74-9d3f-4c2f-a795-8a27e67598b7>

Expression of Green Fluorescent Protein



תמונה 7.8: מבנה אזור הבקרה PBAD וביטוי הגן המדווח GFP

מקור: BIO-RAD

<https://www.bio-rad.com/en-il/product/pglo-bacterial-transformation-kit?ID=619b8f74-9d3f-4c2f-a795-8a27e67598b7>

2.4 מהלך הניסוי

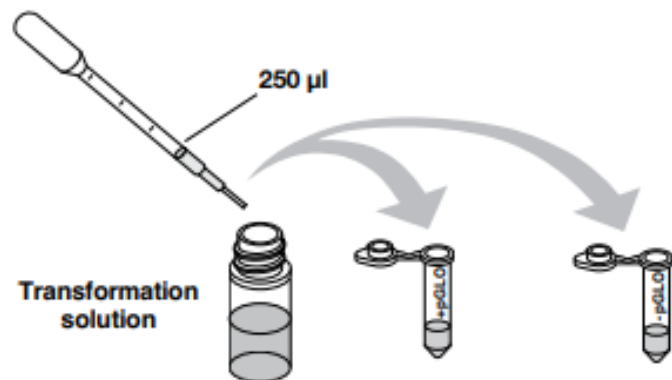
2.4.1 מהלך העבודה בניסוי בתרשים זרימה

שימו לב: מהלך הניסוי מותאם לניסוי [#1660003EDU BIO-RAD](#). אם הנכם מבצעים את הניסוי מחברה אחרת, בצעו את מהלך הניסוי בהתאם להוראות החברה.

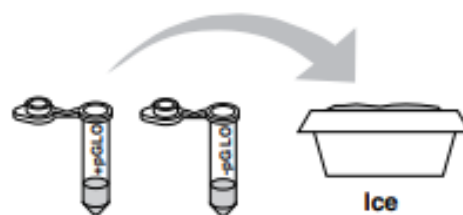
1. סמנו מבחנות ניסויי בכיתוב +pGLO / -pGLO



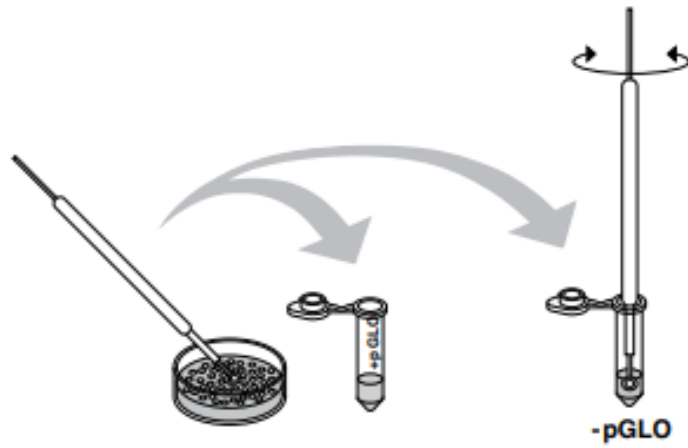
2. העבירו תמיסת טרנספורמציה למבחנות הניסוי



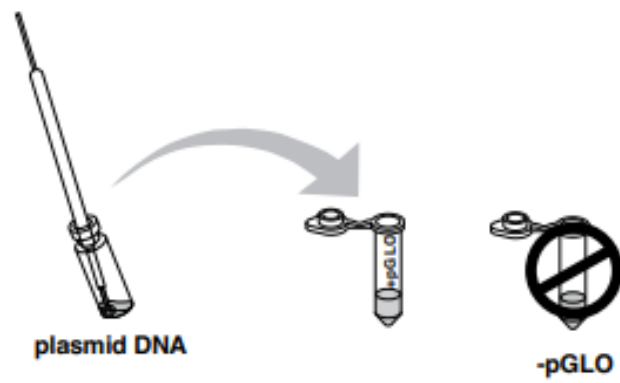
3. הכניסו את המבחנות אל סל הקרח



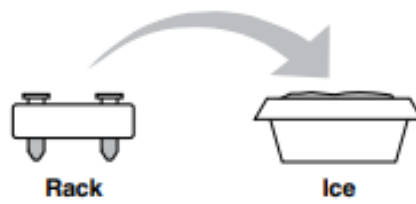
4. הוסיפו חיידקים למבחנות הניסוי



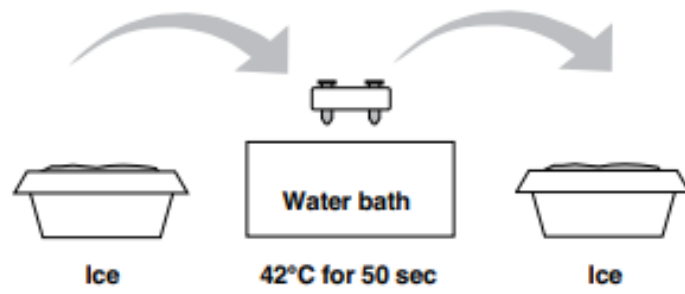
5. הוסיפו פלסמיד למבחנה +pGLO



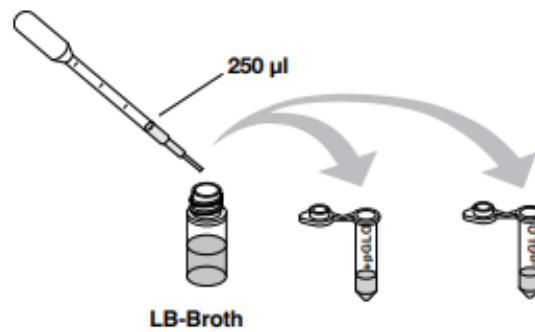
6. בצעו אינקובציה של המבחנות בקרח (10 דקות): שוק קור



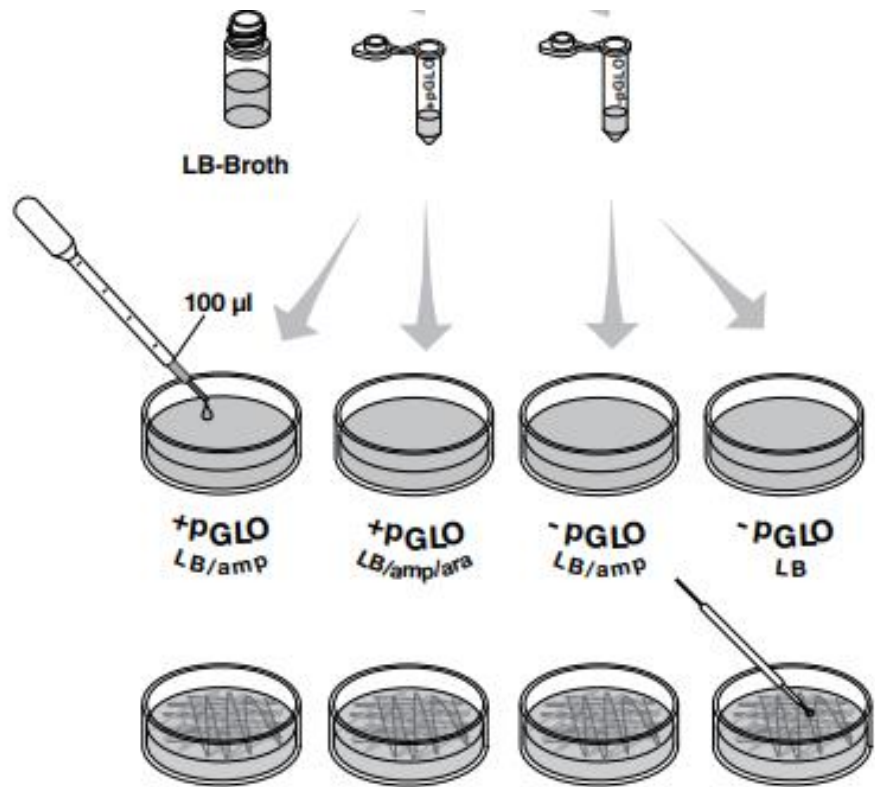
7. שוק תרמי: שוק חום (42°C למשך 50 שניות) שוק קור (2 דקות בסל קרח)



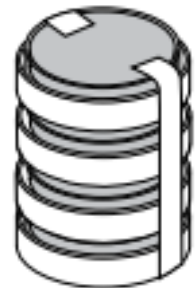
8. בצעו אינקובציה עם מצע גידול (LB): 10-30 דקות ב-37°C



9. זרעו את החיידקים



10. בצעו הדגרת החיידקים: (יומיים בטמפרטורת החדר או 24 שעות באינקובטור ב-37°C)



11. קבלו את התוצאות: (שולחן UV או פנס UV)

2.4.2 מהלך ניסוי טרנספורמציה על פי קיט של חברת [Bio-Rad מספר קטלוגי #1660003EDU](#)

הנכם עומדים לבצע ניסוי טרנספורמציה של פלסמיד רקומביננטי לחיידקים. במעבדה זו שימוש בטכניקות עדינות ועבודה במיקרוביולוגיה.

יש לוודא שהבנתם כל שלב בביצוע הניסוי ולבצע את הניסוי לפי כל כללי הבטיחות במעבדה!

סימון מבחנות הניסוי

1. סמנו מבחנת אפנדורף אדומה ב pGLO-. וודאו כי המבחנה סגורה.
2. סמנו מבחנת אפנדורף ירוקה ב pGLO+. וודאו כי המבחנה סגורה.
3. סמנו את שתי המבחנות במדבקה בצבע הקבוצה שלכם, או בסמל של קבוצתכם.

הכנת המבחנות

1. בעזרת פיפטור עם טיפ סטרילי העבירו 250 מיקרוליטר (μl) תמיסת טרנספורמציה (CaCl_2) לכל מבחנה מהמבחנות שסימנתם (הירוקה והאדומה).
2. זרקו את הטיפ של הפיפטור לפח הביולוגי וסגרו את המבחנות.
3. הכניסו את המבחנות לסל הקרח.
4. פתחו את השקית המכילה מקלות דגימה סטריליים מהצד של הידית, כך שהטבעות עצמן לא יזדהמו. הקפידו על פתח קטן ככל האפשר. הקפידו לקחת מקל דגימה אחד בכל פעם, ולהשאיר את השאר נקיים בתוך השקית. הקפידו לא לגעת בטבעת עצמה אלא רק בידית האחיזה!
5. בעזרת הטבעת של מקל דגימה אחד, קחו לפחות מושבה אחת (עד 3 מושבות) מתוך צלחת פטרי המכילה מושבות, ומסומנת ב-E.Coli. הכניסו מיד את הטבעת אל המבחנה האדומה pGLO-. סובבו את מקל הדגימה מספר פעמים כך שהחיידקים יתמוססו בנוזל.
6. זרקו את מקל הדגימה לפח הביולוגי וסגרו את המבחנה.
7. בעזרת מקל דגימה נוסף בצעו את התהליך שוב למבחנה pGLO+. קחו לפחות מושבה אחת (עד 3 מושבות) מתוך צלחת הפטרי המכילה מושבות, ומסומנת ב-E.Coli. הכניסו מיד את הטבעת אל המבחנה הירוקה pGLO+. סובבו את מקל הדגימה מספר פעמים כך שהחיידקים יתמוססו בנוזל.
8. זרקו את מקל הדגימה לפח הביולוגי. סגרו את המבחנה ואת צלחת החיידקים.
9. הכניסו מקל דגימה נקי אל מיכל הפלסמידים אשר נמצא אצל המורה. וודאו שהטבעת מכילה נוזל פלסמידים. הכניסו מיד את הטבעת עם הפלסמידים למבחנת pGLO+. סובבו את מקל הדגימה מספר פעמים בנוזל כך שהפלסמידים יתמוססו בנוזל.
10. זרקו את מקל הדגימה לפח הביולוגי וסגרו את המבחנה.
11. **שימו לב: אין להכניס פלסמידים למבחנה האדומה. מבחנה זו היא מבחנת הבקרה בניסוי.**

ביצוע שוק תרמי

1. השאירו את המבחנות בסל הקרח ל-10 דקות. וודאו כי תחתית המבחנות מכוסה בקרח.
2. כווננו טיימר ל-50 שניות.
3. העבירו את המבחנות (אדום וירוק) יחד עם מעמד המבחנות מסל הקרח לאמבט מים ב-42°C. הפעילו את הטיימר. וודאו כי תחתית המבחנות בתוך המים החמים.
4. לאחר 50 שניות העבירו את המבחנות לסל הקרח ל-2 דקות. וודאו כי תחתית המבחנות בתוך הקרח.
5. הוציאו את המבחנות מסל הקרח.
6. בעזרת פיפטור עם טיפ סטרילי הוסיפו 250 מיקרוליטר (μl) של מצע LB לכל אחת מהמבחנות - גם למבחנה האדומה (-pGLO) וגם למבחנה הירוקה (+pGLO). **החליפו טיפ בכל מבחנה.** בתום השימוש זרקו את הטיפים לפח הביולוגי
7. הכניסו את המבחנות לאמבט מים ב-37°C. השאירו את המבחנות סגורות באמבט במשך 10-30 דקות.

זריעת החיידקים

1. בזמן שאתם מחכים - סמנו את צלחות הזריעה שלכם. לרשותכם 4 צלחות זריעה. סמנו בקצה החיצוני של כל צלחת את שם הקבוצה שלכם ואת תאריך הניסוי. הקפידו לרשום על הצלחת עצמה (ולא על המכסה), ורשמו בכתב קטן וברור בשוליים - כך שתוכלו לראות היטב את התוצאות.
2. על צלחות LB/amp ו-LB/amp/ara הוסיפו את הכיתוב +pGLO.
3. על צלחות LB/amp ו-LB הוסיפו את הכיתוב -pGLO.
4. לאחר ההמתנה, ערבבו בעדינות את שתי המבחנות בעזרת נקישות באצבע.
5. בעזרת פיפטור עם טיפ סטרילי העבירו 100 מיקרוליטר (μl) ממבחנת +pGLO ל-2 צלחות הזריעה אותן סימנתם +pGLO.
6. זרקו את הטיפ לפח הביולוגי. סגרו את הצלחות.
7. בעזרת פיפטור עם טיפ סטרילי העבירו 100 מיקרוליטר (μl) ממבחנת -pGLO ל-2 צלחות הזריעה אותן סימנתם -pGLO.
8. זרקו את הטיפ לפח הביולוגי. סגרו את הצלחות.
9. השתמשו במקל דגימה חדש לכל צלחת ומרחו בעדינות את הנוזל על גבי כל הצלחת בצורת שתי-וערב. היזהרו לא לפצוע את האגר על גבי הצלחת.
10. זרקו את מקלות הדגימה לפח הביולוגי וסגרו את הצלחות.

הדגרת החיידקים

1. סגרו את הצלחות בנייר פארפילם או בדבק נייר למעבדה, והכניסו אותן לאינקובטור ב-37°C ל-24 שעות. הצלחות צריכות להישאר עם מצע המזון כלפי מעלה. במידה ואין ברשותכם אינקובטור, השאירו את הצלחות בטמפרטורת החדר ליומיים.

2. צפו בתוצאות הניסוי. הניחו את צלחות הניסוי על שולחן UV והדליקו אותו. שימו לב להשתמש באמצעי ההגנה המתאימים המגיעים עם השולחן. במידה ואין ברשותכם שולחן UV, הדליקו את פנס ה-UV המגיע בערכה וכוונו לעבר המושבות בצלחות.

אין לכוון את הפנס לעבר בני-אדם!

כתבו: באילו צלחות לא גדלו מושבות כלל? באילו צלחות גדלו מושבות לבנות? באילו צלחות גדלו מושבות הזוהרות בירוק בעת קרינה עם UV? הסבירו את תוצאות הניסוי.

טבלה 7.2: סיכום תוצאות הניסוי

| מספר מושבות לבנות | מספר מושבות מאירות | צלחת הזריעה |
|-------------------|--------------------|--|
| | | חיידקים ללא פלסמיד, צלחת בקרה |
| | | חיידקים ללא פלסמיד, צלחת סלקציה עם אמפיצילין |
| | | חיידקים עם פלסמיד, צלחת סלקציה עם אמפיצילין |
| | | חיידקים עם פלסמיד, צלחת סלקציה עם אמפיצילין והסוכר ארבינוז |

2.5 ניתוח תוצאות, דיון ומסקנות

2.5.1 הסבר לתוצאות הניסוי

1. מדוע יש צורך בביצוע הניסוי ללא החדרת פלסמיד לחיידקים?
2. החיידקים שקיבלו פלסמיד רקומבנינטי בטרנספורמציה נזרעו על שתי צלחות. שתי הצלחות הכילו אנטיביוטיקה אמפיצילין, אבל רק אחת מהן הכילה גם את הסוכר ארבינוז. תארו את ההבדלים בתוצאות הניסוי שהתקבלו בצלחות אלו והסבירו אותם.

2.5.2 שאלות לדיון ניסוי טרנספורמציה של גן מדווח לחיידקים קומפטנטיים

1. הסבירו מהי בקרה חיובית ומהי בקרה שלילית על תהליך התעתוק, אילו חלבונים מבצעים בקרה זו וכיצד הם פועלים.
2. בתהליך הטרנספורמציה אותו ביצעתם בניסוי הוכנס לתאים פלסמיד. הסבירו במה שונה הפלסמיד מגנום של החיידק אליו הוא הוכנס. בתשובה יש להתייחס להבדל בין מבנה הפלסמיד לבין כרומוזום החיידק ולגנים המצויים בהם.
3. הפלסמיד שהוכנס לתאים בתאים הטרנספורמציה הכיל גן בורר וגן מדווח. ענו על השאלות הבאות לגבי שני גנים אלו:
 - א. מיהו הגן הבורר שנמצא בפלסמיד ומה תפקידו בתהליך הטרנספורמציה?
 - ב. מיהו הגן המדווח שנמצא בפלסמיד ועל מה הוא מדווח?
4. מה היתרון בשימוש בגן מדווח ולא בגן רגיל וכיצד נוכל לקבוע ביטוי של גן שאינו גן מדווח?
5. תהליך הטרנספורמציה כלל שימוש בתמיסת המכילה את המלח CaCl_2 . מה תפקידה של תמיסה זו בתהליך?
6. החיידקים המקבלים עברו בתהליך הטרנספורמציה שלבים של קירור בקרח, חימום מהיר ל- 42°C (שוק תרמי) קירור נוסף בקרח וגידול ב- 37°C . הסבירו לגבי כל אחת מהטמפרטורות מה תפקידה בתהליך.

3. נספחים למורה וללבורנט

3.1 מעבדה מס' 6 - תסיסת שמרים מקובעים באלגינט

3.1.1 מחוון לשאלות לדין ומסקנות

1. מתוצאות הניסוי שהתקבלו ניתן לראות כי התססה חוזרת בתאי שמרים מקובעים באלגינט נותנת תסיסה דומה לזו שהתקבלה בעת התסיסה הראשונה של השמרים ולכן ניתן להשתמש בשמרים מקובעים לשימוש חוזר.
2. בעת הוספת גלוקוז לתאי השמרים יוגבר בהם תהליך נשימה (אירובית או אנאירובית) שאחד מתוצרי תהליך זה הוא פחמן דו חמצני. כאשר תוצר זה בא במגע עם מים (בתמיסה מימית) נוצרת תגובה כימית בינו לבין המים ותיווצר חומצה פחמתית. חומצה זו מעניקה לתמיסה אופי חומצי.
3. לקיחת שתי דגימות מכל ארלנמייר אפשרה ביצוע חזרה של תהליך הטיטרציה. ביצוע חזרות מאפשר חישוב ערך ממוצע והוא מדויק ומחזק את תוצאות הניסוי ומאשר כי התוצאות אינן מקריות.
4. שני היתרונות בשימוש בשמרים מקובעים לעומת השימוש בשמרים מסיסים הם שניתן להפריד את תוצרי השמרים המופרשים לנוזל הגידול מתאי השמרים עצמם וניתן לעשות בתאי השמרים שימוש חוזר.
5. ייצור חלבונים בתרבית שמרים נחשבת כיעילה וחסכונית, מכיוון שתאים אלו הינם חד-תאיים המתרבים מהר בתרחיף ותנאי הייצור שלהם פשוטים יותר מתאי צמחים או בעלי חיים, ולמרות זאת הם מבטאים חלבונים באופן דומה לתאי צמחים ובעלי חיים. בתעשיית הביוטכנולוגיה המסורתית משתמשים בתוצרים הטבעיים של השמרים (פחמן דו חמצני ואתנול) בעיקר בתעשיית המזון. לעומת זאת, בתעשיית הביוטכנולוגיה המודרנית משתמשים בשמרים רקומביננטיים במטרה להשתמש בשמרים כתרבית תאים לייצור חלבונים על בסיס הגנים שהוכנסו להם בהנדסה גנטית.
6. לשימוש באנזימים מקובעים במקום תאים מקובעים קיימים יתרונות וחסרונות.
חסרונות השימוש באנזימים מקובעים במקום תאים שלמים:
 - א. כאשר מופק אנזים מאורגניזם הוא מופרד מסביבתו הטבעית התאית ומחובר לפולימר ג'ל מלאכותי. לכן, יתכן כי פעילותו לא תהיה מיטבית.
 - ב. במידה והאנזים נדרש בפעילותו לאנזימים נוספים או תנאים ייחודיים הנמצאים בסביבתו הטבעית, סביבה של ג'ל פולימרי לא תאפשר לו זאת.יתרונות השימוש באנזימים מקובעים במקום תאים שלמים:
 - א. ניתן לחקור אנזים מקובע הפועל באופן עצמאי בצורה מיטבית בתנאים שאינם מושפעים מהסביבה הטבעית ולקבל פעילות ספציפית יותר.
 - ב. ניתן לייצר באופן מלאכותי תנאי פעילות המותאמים לאנזים זה בלבד וכן להשתמש באנזים במספר רב של חזרות, ללא תלות בחיות התאים.

3.1.2 הוראות ללבורנט

ציוד לכל תלמיד

2 ארלנמיירים גדולים 100 מ"ל המכילים 20 גרם שמרים כל אחד

8 ארלנמיירים קטנים 100 מ"ל\50 מ"ל עם פתח רחב

אמבט מחומם לטמפרטורה של 35 מעלות צלזיוס

פיפטור 1-5 מ"ל + טיפים

ביורטה 50 מ"ל

2 מסננות קטנות

2 משורות 50 מ"ל

כלי פסולת

מי ברז - 500 מ"ל

מרקר

שעון עצר

חומרים

40 גרם כדורונים של שמרים מקובעים

פנול פתלאין בטפי (0.6 גרם ל-300 מ"ל אתנול 95%)

150 מ"ל גלוקוז 10%

כ-100 מ"ל תמיסת 0.05M NaOH

הכנת הכדורונים (מ-1 ליטר מקבלים 600 גרם כדורונים)

20 גרם נטרן אלגינט (סיגמה מס' קטלוגי A-0682)

30 גרם שמרים טריים

1 ליטר סידן כלורי בריכוז 1%

- ממיסים 20 גרם נתרן אלגינט ב-1 ליטר מים מזוקקים. ההמסה נעשית בעזרת בוחש מגנטי תוך חימום למשך שעות אחדות עד לקבלת תמיסה הומוגנית.
- מקררים את התמיסה ומוסיפים 30 גרם שמרים טריים (יש לפזר את השמרים כדי לקבל תרחיף הומוגני).
- מטפטים בעזרת פיפטת פסטר קטומה או ביורטה את תמיסת השמרים באלגינט לתוך כוס המכילה את תמיסת הסידן הכלורי. תוך טפטוף יוצרו נשאים כדוריים בקוטר של 3-4 מ"מ אשר בתוכם כלואים השמרים.
- משהים את הנשאים בתמיסת הסידן כלורי למשך שעה לשם ייצוב הג'ל. ניתן לשמור את הנשאים במקרר במים או בתמיסת NaCl בריכוז 0.9%. רצוי להחליף את המים או את תמיסת המלח כל מספר ימים. כדי לקבל תוצאות ניסוי מיטביות עדיף להשתמש בשמרים מקובעים טריים ככל שניתן (עד שבועיים במקרר).

3.2 מעבדה 7 - מעבדת טרנספורמציה של חיידקים עם הגן GFP

3.2.1 מחוון לסיכום והסבר תוצאות גדילת החיידקים בניסוי על צלחות הזריעה השונות

| מספר מושבות לבנות | מספר מושבות מאירות | צלחת הזריעה |
|--|---|--|
| <p>מספר רב של מושבות עד מרבד חיידקים. בצלחת זו אין סלקציה וכל חיידק ששרד את תהליך השוק התרמי בניסוי יתרבה על הצלחת למושבה. צלחת זו היא בקרה המאפשרת לוודא כי מהלך הניסוי והשוק התרמי לא פוגעים בחיות החיידקים. בנוסף, צלחת זו מאפשרת להראות כי תכונת ההארה של החיידקים נגרמת מנוכחות הפלסמיד הרקומביננטי וביטוי הגן.</p> | <p>אין הארה. החיידקים לא עברו טרנספורמציה ולכן אינם מבטאים את הגן ל-GFP הגורם להארה ירוקה</p> | <p>חיידקים ללא פלסמיד, צלחת בקרה</p> |
| <p>אין מושבות כלל. החיידקים לא עברו טרנספורמציה ואין את הגן עמידות לאמפיצילין. חיידקים אלו לא ישרדו על מצע המכיל אנטיביוטיקה. צלחת זו היא צלחת בקרה המלמדת שהישרדות החיידקים על המצע הסלקטיבי נובע מהפלסמיד הרקומביננטי.</p> | <p>אין מושבות כלל</p> | <p>חיידקים ללא פלסמיד, צלחת סלקציה (עם האנטיביוטיקה אמפיצילין)</p> |

| | | |
|---|---|--|
| <p>מספר מושבות (כתלות בהצלחת תהליך הטרנספורמציה). חיידקים אלו קיבלו בטרנספורמציה את הפלסמיד הרקומביננטי עם הגן עמידות לאנטיביוטיקה. חיידקים אלו ישרדו על המצע הסלקטיבי.</p> | <p>אין הארה. החיידקים עברו טרנספורמציה וקיבלו את הגן ל-GFP אך אין במצע המזון את הסוכר ארבינוז, המפעיל את אזור הבקרה לגן GFP בפלסמיד הרקומביננטי שהוחדר.</p> | <p>חיידקים עם פלסמיד, צלחת סלקציה (עם האנטיביוטיקה אמפיצילין)</p> |
| | <p>יש מושבות מאירות בירוק. החיידקים קיבלו בטרנספורמציה את הפלסמיד עם הגן ל-GFP. מצע המזון מכיל ארבינוז המפעיל את גורם התעתוק ומאפשר ביטוי של הגן ל-GFP.</p> | <p>חיידקים עם פלסמיד, צלחת סלקציה (עם האנטיביוטיקה אמפיצילין והסוכר ארבינוז)</p> |

3.2.2 מחוון לשאלות לדין ומסקנות

שימו לב, יש להתאים את התשובות לפרוטוקול הניסוי שביצעו התלמידים בפועל.

תשובות:

1. הבקרה העיקרית על ביטוי גנים מתבצעת בתחילת תהליך התעתוק על ידי אזור הבקרה הנמצא בתחילת הגן, הנקרא האזור המקדם (פרומטור). אל אזור בקרה זה נקשר האנזים RNA פולימראז המבצע את תהליך תעתוק של הגן. בקרה חיובית על ביטוי גן מתרחשת על ידי חלבונים הנקראים גורמי תעתוק (פקטורי שעתוק) הנקשרים אל האזור המקדם (פרומטור) ובכך מסייעים לאנזים RNA פולימראז להקשר אף הוא לאותו אזור ולפעול לביצוע את תהליך התעתוק וביטוי הגן. בקרה שלילית על ביטוי גנים מתרחשת על ידי חלבונים דכאנים (רפרסורים) הפועלים לדיכוי תהליך התעתוק. חלבונים אלו נקשרים לאזור הבקרה המקדם (פרומטור) ובכך מונעים את קישור גורמי התעתוק ו/או האנזים RNA פולימראז ובכך מונעים את ביטוי הגן בזמן שהוא אינו חיוני לתא.

2. פלסמיד הינה מולקולה של DNA מעגלי קטן (לרוב בסדר גודל של אלפי נוקלאוטידים) הנמצאת באופן טבעי בחיידקים שונים. לעומת זאת גנום החיידק בנוי ממולקולת DNA מעגלית גדולה הנקראת גם כרומוזום הכוללת מיליוני נוקלאוטידים. פלסמידים רקומביננטים המשמשים לשיבוט בחיידקים מכילים גנים שלא היו בגנום הטבעי של החיידק כגון גן מדווח וגן בורר. גנים אלו מקנים לחיידק תכונות נוספות אך הם אינם נדרשים לקיומו של החיידק.
3. א. הגן הבורר שנמצא בפלסמיד הינו גן עמידות לאנטיביוטיקה (דוגמת הגן לעמידות לאמפיצילין או טטראציקלין) ותפקידו לברור את מושבות החיידקים שקיבלו את הפלסמיד לאחר זריעת החיידקים על מצע הגידול המכיל את האנטיביוטיקה.
 - ב. הגן המדווח הינו הגן שאת ביטויו הפנוטיפי ניתן לראות בעת ביטוי החלבון (לדוגמה, חלבון GFP – חלבון פלורוסנטי ירוק, חלבון בטא גלקטוזידאז יוצר מושבות בעלות צבע כחול בעת גידול החיידקים על מצע הכולל את החומר X-gal). הגן המדווח בצורה הנראית לעין על ביטוי הגן שהוכנס בפלסמיד בתאי החיידקים.
4. היתרון בשימוש בגן מדווח הוא היכולת לקבוע בצורה קלה הנראית לעין את ביטוי החלבון, לרוב גם כאשר התאים חיים. במידה ונרצה לבדוק ביטוי של גן שאינו מדווח יש צורך להשתמש בשיטות לזיהוי חלבונים עם נוגדנים דוגמת תספיג מערבי.
5. מולקולת ה-DNA הינה מולקולה בעלת מטען שלילי. בנוסף, מעטפת החיידק וקרומ התא הבנוי מפוספוליפידים הינם בעלי מטען שלילי. יוני סידן הטעונים חיובית (Ca^{2+}) הנוצרים מהמסת תמיסת ה- $CaCl_2$, נקשרים למטענים השליליים בקרום התא וממסכים את המטען השלילי של הקרום וכך מתאפשרת התקרבות של מולקולות הפלסמיד לקרום התא.
6. קירור תאי החיידקים בנוכחות הפלסמיד ותמיסת ה- $CaCl_2$ מאפשרת את התקרבות הפלסמיד לקרום תאי החיידקים ומניעת תנועת מולקולות הפוספוליפידים בקרום התא. חימום מהיר וקצר של החיידקים לאחר מכן ל- $42^{\circ}C$ גורם לתנועה מהירה של מולקולות הפוספוליפידים ויצירת חורים בקרום התא. חורים אלו מאפשרים את כניסת הפלסמיד לתוך התא. השריית החיידקים שנית בקרח לאחר תהליך החימום, גורמת להפסקת תנועת מולקולות הפוספוליפידים בקרום תא החיידק וכך נוצר קיבוע זמני של החורים בקרום תא החיידק, המייעל את כניסת הפלסמידים. גידול החיידקים לאחר מכן בטמפרטורה של ל- $37^{\circ}C$ מאפשר את התאוששות החיידקים וגדילתם והתרבותם בתנאים אופטימליים כמו גם שכפול הפלסמיד שחדר לתא וביטוי הגנים בו.

3.2.3 מעבדה 7 – טרנספורמציה של הגן GFP בחיידקים – הוראות ללבורנט
החומרים המיועדים לביצוע הטרנספורמציה וזריעת החיידקים מסופקים על ידי היצרן בקיט

ציוד לכל קבוצת תלמידים

מעמד מבחנות המכיל:

- 2 מבחנות אפנדורף ריקות (אדומה וירוקה)
- מבחנת אפנדורף עם תמיסת טרנספורמציה
- מבחנת אפנדורף עם תמיסת מצע מזון LB

צלחת פטרי עם מושבות חיידקים

2 צלחות זריעה מסומנות LB/amp

צלחת זריעה מסומנת LB/amp/ara

צלחת זריעה מסומנת LB

נייר פארפילם או דבק נייר למעבדה

שקית אטומה עם 8 מקלות דגימה סטריליים

פיפטור (100-1,000 מיקרוליטר) עם טיפים סטריליים

כפפות חד פעמיות

סל קרח + פח ביולוגי + טוש לרישום על המבחנות + טיימר

ציוד כללי (עבור כיתה)

אמבט מים ב-42°C

אמבט מים ב-37°C

מיכל פלסטידים אצל המורה

שולחן UV (או פנס UV אצל המורה)

הכנת המעבדה

חשוב: לפניך קיט של חברת Bio-Rad (מספר קטלוגי #EDU1660003) לביצוע ניסוי טרנספורמציה בכיתה. מיד עם קבלת הקיט, יש לפתוח את החבילה ולהכניס לאחסון את רכיבי החבילה השונים בהתאם להוראות - שקית עם חומרי הניסוי לקירור, ואת שאר כלי הניסוי בטמפרטורת החדר. יש לקרוא ולפעול לפי הוראות הבטיחות המגיעות בחוברת עם קיט המעבדה.

החיידיקים במעבדה אינם יוצרים ביופילמים, ומאשרים לעבודה עם תלמידים.

הכנת צלחות זריעה (יומיים עד שבוע לפני המעבדה)

את צלחות האגר מומלץ להכין 3 ימים לפני ביצוע המעבדה, כך שהצלחות יוכלו להתייבש במשך יומיים. במידה והדבר לא מתאפשר, ניתן לייבש את הצלחות בטמפרטורת החדר למספר שעות.

להכנת האגר, הכניסו 500 מ"ל מים מזוקקים לארלנמייר של 1 ליטר, הוסיפו את תכולת שקית האגר (LB nutrient agar) אל הארלנמייר. בעזרת בוחש מגנטי ערבבו את התמיסה תוך כדי חימום עד להמסת האגר בצורה מלאה. הזהרו לא לחמם את תמיסת האגר לייבוש. הרתיחו את התמיסה במשך 5 דקות תוך כדי ערבוב ליצירת תמיסה סטרילית והשאירו את האגר לקירור לטמפרטורה של 50 °C. היזהרו לא לקרר את האגר יותר מידי, על מנת שלא ייקרש בארלנמייר.

בזמן התקררות האגר הכינו את הצלחות ואת החומרים שיש להוסיף לאגר בהתאם להוראות הבאות המותאמות לעבודה בקיט עבור 8 קבוצות עבודה:

סמנו 16 צלחות פטרי ב-LB בתחתית הצלחת (לא על המכסה!). שימו לב לכתוב בצדדי התחתית ולא במרכז, על מנת שניתן יהיה להבחין כראוי בתוצאות הניסוי.

באופן דומה סמנו 16 צלחות פטרי LB/AMP וסמנו 8 צלחות פטרי LB/AMP/ara

המסת ארבינוז: הארבינוז מגיע כאבקה בתוך מיכל קטן. עם פיפטור סטרילי, העבירו 3 מ"ל מתמיסת הטרנספורמציה (transformation solution) למיכל הארבינוז. ערבבו את התמיסה עד להמסה מלאה. ארבינוז מתמוסס לאט יחסית, והתהליך יכול לקחת מספר דקות.

המסת אמפיצילין: האמפיצילין מגיע כאבקה במיכל קטן. עם פיפטור סטרילי חדש, העבירו 3 מ"ל מתמיסת הטרנספורמציה (transformation solution) למיכל האמפיצילין. ערבבו את התמיסה עד להמסה מלאה.

הכנת הצלחות: ל-16 צלחות פטרי המסומנות LB שפכו מתמיסת האגר שהכנתם. מלאו כל צלחת עד לשליש הגובה (או מחצית מגובה הצלחת) וכסו את הצלחות.

הוסיפו את תמיסת האמפיצילין שהכנתם לארלנמייר עם האגר. שימו לב לבצע שלב זה רק לאחר שהכנתם את צלחות LB. ערבבו את התמיסה ושפכו מתמיסה זו ל-16 צלחות הפטרי המסומנות LB/AMP עד לשליש גובה

הצלחת וכסו את הצלחות. הוסיפו את תמיסת הארבינוז שהכנתם לארלנמייר עם האגר והאמפיצילין. שימו לב לבצע שלב זה רק לאחר שהכנתם את צלחות LB וצלחות LB/AMP. ערבבו את התמיסה ושפכו מתמיסה זו ל-8 צלחות הפטרי המסומנות LB/AMP/ara עד לשליש גובה הצלחת וכסו את הצלחות.

השאירו את הצלחות להתייבבות 30 דקות בטמפרטורת החדר. לאחר שלב זה ניתן להכניס את הצלחות למקרר לאחסון, או להשאיר בטמפרטורת החדר ליומיים. אחסון הצלחות במקרר צריך להיעשות כך ששכבת האגר פונה כלפי מעלה.

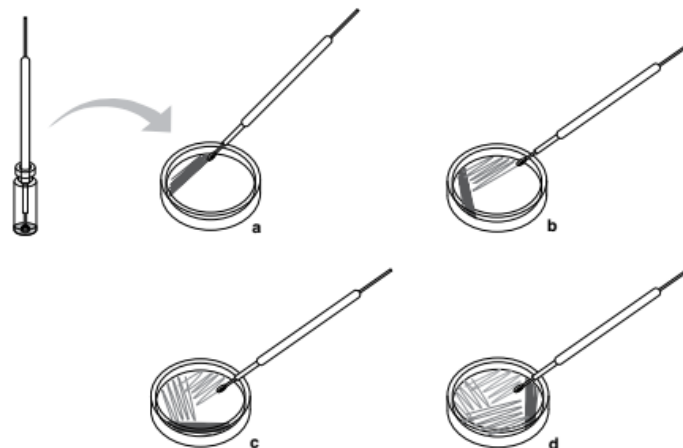
זריעת חיידקים (יום-יומיים לפני המעבדה)

בעזרת פיפטור סטרילי, הוסיפו 250 מיקרוליטר מתמיסת LB (LB nutrient broth) למיכל החיידקים E. coli HB101. ערבבו בעדינות את המיכל עד המסת החיידקים. הכניסו את תמיסת החיידקים לאינקובטור ב-37°C ל-8 עד 24 שעות.

את תמיסת ה-LB שנשארה שמרו במקרר. התלמידים זקוקים לתמיסה זו במהלך הניסוי.

לאחר האינקובציה, ערבו בעדינות את תמיסת החיידקים.

ל-8 מצלחות הפטרי המסומנות LB יש לבצע זריעת בידוד עם החיידקים. הכניסו את הלולאה שבמקל זריעה חדש לתוך תמיסת החיידקים. ודאו כי יש תמיסה על הלולאה. על רבע מהצלחת הניחו את החיידקים בעדינות, בצורת פסים. סובבו את הצלחת ב-90 מעלות, ומתוך האזור הראשון של הזריעה, משכו חיידקים לרבע צלחת נוספת. וכך לזריעה של כל הצלחת כמוצג בתמונה 7.9.



תמונה 7.9: זריעת בידוד חיידקים כהכנה למעבדת טרנספורמציה

זרעו באופן דומה 8 צלחות פטרי מסומנות LB. סגרו את הצלחות מהר ככל האפשר למניעת זיהומים. את הצלחות הכניסו לאינקובטור ב-37°C ללילה. **ביצוע חלק זה חייב להיות בלילה שלפני ביצוע הניסוי.**

המושבות של חיידקי E.coli הן לבנות ועם שוליים חלקים. במידה ואתם רואים בצלחת מושבה אחרת – זהו זיהום ואין לתת לתלמידים להשתמש בה. יש להשמיד את הצלחת באוטוקלב.

הכנת תמיסות העבודה (יום לפני הניסוי או ביום הניסוי)

בעזרת פיפטור עם טיפ סטרילי הוספו 250 מיקרוליטר של תמיסת טרנספורמציה לתוך הבקבוקון של הפלסמיד DNA pGLO lyophilized. שימו לב שכמות ה-DNA כל כך קטנה עד שהבקבוקון יכול להיראות ריק. חשוב לוודא שה-DNA מומס וקיים בתמיסה ולא נצמד למכסה. בשלב זה ניתן להיעזר בצנטריפוגה ספין דאון – ערבבו את הנוזל היטב במבחנת הפלסמיד והכניסו את המבחנה לצנטריפוגה ל-10 שניות (חשוב להכניס מבחנה אחרת במקביל למיקום מבחנת הפלסמיד כדי לשמור על הצנטריפוגה מאוזנת). אחסנו את ה-DNA במקרר עד לתחילת הניסוי.

הכנת מגשי העבודה

עבור כל קבוצת תלמידים הכינו מבחנת אפנדורף עם 1 מ"ל של תמיסת טרנספורמציה (CaCl_2) ומבחנה נוספת עם 1 מ"ל של תמיסת LB. סמנו כל מבחנה בהתאם. הכינו את מגשי העבודה לפי תיאור הציוד הנדרש לכל קבוצת תלמידים.

בסיום העבודה יש להכניס את כל החומר הביולוגי כולל הפחים הביולוגיים של קבוצות העבודה לאוטוקלב לעיקור בנוסף לאחר קריאת תוצאות הניסוי בצלחות יש להשמיד את החיידקים על באוטוקלב