



הנושא: זיהוי הביטוי של חלבון מדווח בתאי מעי ובתאי שריר בנמטודות

טרנסגניות מסוג *C. elegans* (למורה) תאריך עדכון: 16.5.18

תמצית מידע:	הניסוי איכותי, משלב תצפית במיקרוסקופ והתנסות בהנדסה גנטית.
מתאים לנושאים בתכנית הלימודים:	<ul style="list-style-type: none"> • התא (נושא חובה) • בקרה באוקריוטיים (נושא חובה) • ביטוי גנים, הנדסה גנטית (נושאי בחירה להעמקה)
מתאים לתלמידים:	בחטיבה העליונה (כיתות יא, יב)
ידע קודם נדרש:	<ul style="list-style-type: none"> • גנים, מ - DNA לחלבון • מוטציות • בקרה על פעילות גנים • עקרונות הנדסה גנטית
הזמן הנדרש:	2 שיעורי מעבדה לביצוע הניסוי, איסוף תוצאות וסיכום
אסטרטגיות חשיבה מסדר גבוה:	<ul style="list-style-type: none"> • תצפית בתוצאות • דיווח על תוצאות ניסוי • הסבר תוצאות ניסוי • קישור ידע חדש לידע קודם

הקובץ כולל רקע עיוני¹ לניסוי, הסבר כל שלבי הניסוי, תשובות לשאלות המשולבות בדף העבודה לתלמידים, הצעות לשאלות הרחבה ויישום ורשימת מקורות מידע.

הפניות לסעיפי ביצוע או לשאלות שבדפי הניסוי לתלמידים רשומות בסוגריים. בקרת התבטאות גנים בתאים אאוקריוטים הוא נושא הכלול בתכנית הלימודים (נושא התא), אולם לצורך הבנת ניסוי זה חשוב לשלב בהוראה מושגים נוספים: גן מדווח, חלבון מדווח, אתר מקדם (פרומוטר), יצורים טרנסגניים ופלסמיד. בניסוי משתמשים בחיידקי *E. Coli* מזן OP50. 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

¹ רוב המידע התמציתי הכלול ברקע העיוני נועד להעשיר את הידע למורה. כל קורא יחליט מה מהפרטים האלה מתאים לתלמידיו.



ההנחיות.

בניסוי חייבים להשתמש בפיפטור כדי להעביר נפחים קטנים. אם אין ברשותכם פיפטור ההנחיה ללברנט היא לרכוש לפחות מכשיר אחד ולבצע את סעיפים ח ו- ט בניסוי (ראו דפים לתלמיד) עבור כל אחת מקבוצות התלמידים. אם יש ברשותכם מספר פיפטורים איתם יעבדו התלמידים, אנו ממליצים שלפני ביצוע הניסוי תתרגלו עם התלמידים את השימוש בפיפטור.

רקע עיוני

C. elegans היא אורגניזם רב תאי השייך למערכת התולעים הנימיות, בלועזית נמטודה².

נמטודה זו חיה בטבע בעיקר בקרקע עשירה בחומרים אורגניים וניזונה מסוגים שונים של חיידקים וביניהם חיידקי *E. Coli*. הפרטים של הנמטודה *C. elegans* הם קטנים (אורך הבוגר כ-1 מ"מ), רובם [הרמפרודיטים](#) שבגופם מתרחשת הפריה עצמית וחלקם [ממין זכר](#). הפרטים משתי קבוצות אלה מתרבים ברביה זוויגית.

בשנת 1963 החל החוקר סידיני ברנר³ לחקור את מערכת העצבים של הנמטודות ובשנת 1965 בחר בהן כחיות מודל מכיוון שקל מאד לגדל אותן במעבדה, מחזור החיים שלהן הוא קצר (פרק הזמן הדרוש להתפתחות נמטודה בוגרת מביצה הוא 3 ימים), וכל נמטודה מטילה כ-300 ביצים מופרות מהן מתפתחות הנמטודות הצעירות. זאת ועוד, נמטודות אלה שהן יצורים נחותים משמשות כחיות מודל גם ליצורים עילאיים מכיוון שגם להן יש מערכת עצבים, מערכת עיכול, מערכת רביה ושרירים. גופן של הנמטודות *C. elegans* הוא שקוף ולכן אפשר לצפות בהן במיקרוסקופ בעודן בחיים ולזהות את איבריהן הפנימיים. תכונה זו ומספר התאים הקטן והקבוע של הנמטודה (959 בהרמפרודיטים ו-1,031 בזכרים) מאפשר מעקב אחר מוטציות וארגון תאים.

הנמטודה היא האורגניזם הרב-תאי הראשון שהגנום שלו רוצף במלואו. נמצא כי גנים רבים של *C. elegans* קרובים מאד [לגנים של האדם](#).

בניסוי, נשתמש בפרטים של *C. elegans* שהם תוצר של הנדסה גנטית.

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 ורפואה⁴.

העברת קטע DNA מפרט אחד לפרט אחר **שאינו** מאותו מין וביטוי הגנים בקטע DNA זה אצל הפרט המקבל מתאפשר הודות

² בדפים אלה, וכך גם בדפים לתלמיד, כינינו את הפרטים של *C. elegans* נמטודות ולא תולעים

³ סידיני ברנר זכה בשנת 2002 יחד עם שני עמיתים בפרס נובל ברפואה ובפיזיולוגיה עבור תגליות בתחום ויסות גנטי של התפתחות איברים ומוות תאי מתוכנת.

⁴ עתידיה, י., גנטיקה עמ' 267



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 מחיידק E. Coli לתאי נמטודה ובתנאים מתאימים הגנים שיועברו יבואו לידי ביטוי בתאי הנמטודה.

ההצלחה של החדרת גן זה לתאי נמטודה וביטויו בתאים אלה, היא דוגמה ל**שבירת מחסום המינים**. 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 אחר⁵. יצור שהחדירו לו DNA זר מכונה יצור טרנסגני.

יצירת נמטודות טרנסגניות

תהליך יצירה זה הוא ארוך ומורכב, כולל הזרקה של פלסמידים לנוזל שבין תאי המין הראשוניים של הנמטודה וביצועו דורש מיומנות וניסיון רב. ההזרקה מתבצעת באמצעות קפילרה דקה ותחת מיקרוסקופ. בתאי המין הראשוניים, הקרום עדין אינו יציב ולכן DNA זר יכול לחדור אל הציטופלסמה שלהם דרך מרווחים בקרום התאים. כתוצאה מתהליך זה רק חלק מתאי המין קולטים את הפלסמיד שהוזרק.

הנמטודה היא יצור הרמפרודיטי ובתום הבשלת הביציות, תאי הזרע בגופה מפרים את הביציות ונוצרים עוברים. בעוברים, שנוצרו מביציות או מתאי זרע שקלטו את הפלסמיד, החומר התורשתי שכלול היה בפלסמיד ימצא בכל תא מתאי גופם. חשוב להסב את תשומת ליבם של התלמידים לכך שיש ההבדל בין טרנספורמציה בחיידקים לבין טרנספורמציה ביצור רב תאי כגון הנמטודה. בחיידקים, חוקרים משתמשים בשיטות שונות שבאמצעותן אפשר להגביר את יכולת הקליטה של DNA זר, כגון שימוש בתמיסת טרנספורמציה וחיפיה לשוק תרמי. תהליך זה פשוט, מהיר ואינו מצריך מכשור ולכן גם אנשים לא מיומנים יכולים ליצור חיידקים טרנסגניים.

בעת הכנת הנמטודות הטרנסגניות השתמשו בשני פלסמידים:

פלסמיד אחד ובו מצוי הגן המדווח⁶ LacZ המקודד ליצירת האנזים β -galactosidas בצמוד לגן זה יש מקטע של נוקלאוטידים NLS (Nuclear localization sequence) ואתר מקדם.

פלסמיד שני ובו גן מדווח⁷ הקובע את צורת הגוף של הנמטודה, צורה המשפיעה על אופן תנועת הגוף ובצמוד לו אתר מקדם.

פלסמיד זה חיוני בתהליך ברירת הנמטודות הטרנסגניות בשלב ההכנות לניסוי.

בכל הזרקה לנוזל שבין תאי המין הראשוניים של הנמטודה השתמשו בתערובת של שני סוגי הפלסמידים שבה ריכוז

⁵ עתידיה, י., גנטיקה עמ' 335 מילון מונחים

⁶ **גן מדווח**: הוא גן לתכונה המאפשרת להבחין באופן איכותי או כמותי בין תאים או פרטים הנושאים את הגן לבין תאים או פרטים שאינם נושאים אותו

⁷ גן זה יכול להיחשב כגן מדווח וזכגן בורר, מפני שלצאצאי הנמטודות הטרנסגניות, יש צורת גוף ואופן תנועה ייחודיים, ופרטים אלה יבודדו להמשך המחקר.



הפלסמידים הקובעים את צורת התנועה נמוך בהרבה מריכוז הפלסמידים הכוללים את הגן LacZ. לכן, סביר להניח שבנמטודה שנקלט הפלסמיד הקובע את צורת התנועה נקלט גם הפלסמיד הכולל את הגן LacZ. אפשר לזהות את הנמטודות הטרנסגניות לפי צורת תנועתן, כלומר שהגן הקובע את צורת הגוף הוא גן מדווח צורני. לאחר שמבודדים את הנמטודות הטרנסגניות על פי צורת תנועתן, מקרינים אותן בקרינת X הגורמות לשברים רנדומליים ב-DNA. שברים אלה מעודדים בתאים פעילות של אנזימים המאחים DNA ובכלל זה גם את איחוי ה-DNA הזר עם ה-DNA של הנמטודות. תהליך זה גורם לכך שה-DNA הזר ימצא בתאיהם של צאצאי הנמטודות. חשוב לציין שבעת יצירת נמטודות טרנסגניות התוצר של פעילות החלבון המדווח β -galactosidase, החומר שצבעו כחול, אינו משמעותי לצורך הבחנה בין פרטים שעברו טרנספורמציה ובין פרטים שלא נקלט בהם הפלסמיד. הסיבה לכך ששיטת הבדיקה של התבטאות הגן המדווח גורמת למותם של הפרטים (שאלה להרחבה ויישום 2). ראו פירוט בהמשך.

ביטוי הגנים מהפלסמיד

הגן LacZ הוא גן מדווח המקודד לחלבון מדווח⁸ שהוא האנזים β -galactosidase. אנזים זה, הנפוץ בחיידקים, מזרז פירוק של דו סוכר לקטוז לשתי מולקולות של חד סוכר, גלוקוז וגלקטוז. בתנאי הניסוי, האנזים β -galactosidase שבתאי הנמטודה מזרז את פירוק X-Gal⁹ שהוא לתאים ותוצר התהליך הוא חומר שצבעו כחול (ראו פירוט בחלקים ג, ה של הניסוי). גן זה הוא דומיננטי ולכן יתבטא אצל הצאצאים של הנמטודות בהם בוצעה הטרנספורמציה גם אם הגיע רק מתא מין אחד. המקטע של הנוקלאוטידים (NLS) מקודד לחומצות אמיניות ייחודיות שמנחות את האנזים β -galactosidase לחדור אל הגרעין. כל התהליכים האלה מתקיימים בנמטודות טרנסגניות הודות לאתר מקדם (promoter)¹⁰ המצוי בפלסמיד (ראו בהמשך התייחסות להבדל בין נמטודות מצלחת "A1" לבין הנמטודות מצלחת "A2"). כדאי להסב את תשומת לב התלמידים לכך שבניסוי הגן lac Z יתבטא באופן קבוע בתאי הנמטודות בשונה מהתבטאותו באופן הלקטוז שבחיידקי E.Coli (שאלת הרחבה ויישום 3).

הגן הקובע את צורת הגוף של הנמטודה, שגם לו אתר מקדם משלו, מאפשר זיהוי צורני של הפרטים. נמטודות שבהן מתבטא גן זה נעות במעגל במקום לנוע לפנים. התלמידים יקבלו זן אחד של נמטודות C. elegans (מסומן A2) שלהן הוחדר פלסמיד עם אתר מקדם ייחודי שמקורו מתאי המעי של הנמטודה. בנמטודות מזן זה גרעיני התאים במערכת העיכול הנמצאים במרכז גוף הנמטודה יצבעו בצבע כחול. לזן אחר של נמטודות (מסומן A1) הוחדר פלסמיד עם אתר מקדם ייחודי שמקורו מתאי השריר ובו יצבעו גרעינים של תאי שריר הנמצאים בהיקף הנמטודה (תשובות לשאלות 1, 2).

⁸ **חלבון מדווח** הוא חלבון שניתן למדוד את כמותו או את פעילותו (לדוגמה - אנזים שתוצר פעילותו צבעוני או זרחני).

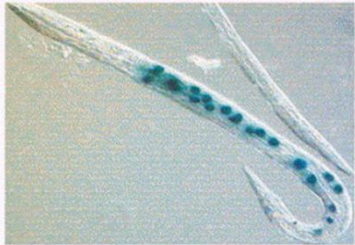
⁹ **X-Gal** מולקולה של חד סוכר בשם גלקטוז המחוברת למולקולה של אינדול.

¹⁰ **אתר מקדם** מפקח על ביטוי גנים, אליו נקשר RNA פולימראז. ביצורים אוקריוטים כל אתר מקדם מפקח על גן יחיד.



בפלסמיד, בקצה גן LacZ, קיים רצף בשם NLS (Nuclear localization sequence) שמקודד לחומצות אמיניות ייחודיות שמנחות את האנזים β -galactosidase לחזור אל הגרעין.

צילום של נמטודות טרנסגניות מסוג *C. elegans* שבהן מתבטא הגן lacZ



התבטאות בתאי מעי



התבטאות בתאי שריר

הסבר שלבי הניסוי ותוצאותיו:

הנמטודה *C. elegans* נמנית על אחת מבין שמונת האורגניזמים שנחקרו בתחום הגנטיקה בשנים האחרונות והייתה לאורגניזם הרב תאי הראשון שהגנום שלו רוצף במלואו.

בניסוי התלמידים יקבלו צלחת פטרי ובה מצע אגר המכיל חיידקי *E. Coli*. ונמטודות הגדלות על המצע וניזונות מהחיידקים. התלמידים יכירו נמטודות מזן בר ונמטודות מוטנטיות (המוטציות הקשורות לתנועת הנמטודות). התלמידים יבצעו את הניסוי עם שתי קבוצות של נמטודות טרנסגניות שבכל אחת מהן יש אתר מקדם המתבטא ברקמה אחרת.

תמצית מידע על מרכיבי הניסוי ותוצאותיו

צלחת	הנמטודות	מאפיין גנטי / הרכב הפלסמיד	ביטוי הגן / גנים	טיפול והתבוננות בתוצאות
1	זן בר	-----	תנועה המאופיינת בזחילה לפנים	חלק א, זיהוי פנוטיפים בנמטודות מזנים שונים (תצפית)
2	זן unc-13	מוטציה בתאי מערכת העצבים	תנועה פגומה	זיהוי פנוטיפים בנמטודות מזנים שונים (תצפית)
3	זן rol-6	מוטציה בתאי שריר	תנועה במעגל ולא לפנים	זיהוי פנוטיפים בנמטודות מזנים שונים (תצפית)
A1	טרנסגניות	LacZ, NLS, אתר מקדם שמקורו בתאי שריר	ביטוי הגן LacZ ליצירת β -galactosidase בתאי שריר בלבד	הוספת X-Gal ויצירת צבע כחול בגרעינים של תאי שריר (חלק ה)



הוספת X-Gal ויצירת צבע כחול בגרעינים של תאי מעי (חלק ה)	ביטוי הגן LacZ ליצירת β -galactosidase בתאי מעי בלבד	LacZ, NLS, אתר מקדם שמקורו בתאי מעי	טרנסגניות	A2
--	---	---	-----------	----

חלק א בניסוי: היכרות עם הפנוטיפ של זן בר של נמטודות מסוג *C. elegans*

בחלק זה התלמידים יצפו בתכשיר המיקרוסקופי ויכירו את האורגניזם הרב תאי שאתו הם יעבדו בניסוי. בתכשיר ניתן להבחין ב"שבילי זחילה" באגר המצביעים על צורת התנועה של הנמטודות (תכונה העוברת בתורשה). ניתן להבחין גם בביצים שהוטלו על האגר ומהן יתפתחו נמטודות בוגרות ובנמטודות באורכים שונים. יתכן שניתן יהיה להבחין גם בתאי הרבייה בגופה של נמטודה בוגרת.

חלק ב בניסוי: איסוף הנמטודות

התלמידים יוסיפו מים לצלחות הפטרי המסומנות "A1" או "A2" ובאמצעות פיפטת פסטר הם יעבירו את הנמטודות יחד עם המים שבצלחת למבחנת אפנדורף. לאחר המתנה של מספר דקות, התלמידים יסלקו את רוב הנוזל ויקבלו משקע של נמטודות.

חלק ג בניסוי: הכנת התכשיר להסתכלות במיקרוסקופ

התלמידים יעבירו 20 מיקרוליטר ממשקע הנמטודות לזכוכית נושאת שצופתה מראש בחומר Poly-Lysine הגורם לנמטודות להיצמד לזכוכית (סעיף ח). לאחר הנחת זכוכית מכסה על הנמטודות, התכשיר יועבר לקרח יבש למשך 5 דקות. החשיפה הקצרה לטמפרטורה מאד נמוכה אינה ממיתה את הנמטודות אלא מקבעת אותן לזכוכית. בתום החשיפה לקרח יבש (סעיף יב), יש להסיר את הזכוכית המכסה בעזרת סכין חד או סקלפל. מטעמי בטיחות שלב זה יעשה רק על ידי הלבורנט או המורה. בהמשך הלבורנט או המורה יצמיד גב של שתי זכוכיות נושאות (משתי קבוצות של תלמידים) (סעיף יג) ויכניס אותן אל מבחנה שיש בה אצטון קר. האצטון נמש במרכיב השומני של קרום התא ושל קרום הגרעין וגורם לפגיעה בשלמותם. החריצים שנוצרים בקרום מאפשרים את חדירת המצע המלאכותי X-Gal דרך קרום התא אל הציטופלסמה ואל גרעין התא. האצטון שחודר לתאים גורם גם לקיבוע של האברונים בתא. תכונה זו של האצטון מאפשרת לתלמידים לצפות בתכשיר המיקרוסקופי (חלק ה) ולזהות בברור אברונים ותאים. פרק הזמן הקצר שבו הזכוכיות נמצאות באצטון קר מסייע לשמור על חיוניותם של התאים והמשך קיומם של תהליכים ביוכימיים בתא, וביניהם גם התהליך המזורז על ידי האנזים β -galactosidase.



הערה: את משקע הנמטודות יש להעביר אל הזכוכית נושאת (ראו איור עמוד 4 לתלמיד) באמצעות פיפטור. אם לתלמידים יש ניסיון בעבודה עם פיפטור הם יוכלו לבצע זאת בעצמם על פי ההנחיות בסעיף ח, אם לא, המורה או הלבורנט יעשה זאת במקומם.

חלק ד בניסוי: חשיפת הנמטודות למצע "X-Gal"

לאחר חשיפת הנמטודות לאצטון ויבושן, יש להוסיף לתכשיר את המצע המלאכותי X-Gal, לכסותו ברדיד אלומיניום ולהמתין 15 – 20 דקות (סעיפים יז, יח).

תמיסת X-Gal רגישה לאור ולכן המבחנה בה תאוחסן לפני הניסוי ובמהלכו חייבת להיות עטופה ברדיד אלומיניום, וכך גם הזכוכיות הנושאות שנחשפו לתמיסה. חשיפה של תמיסת X-Gal לזמן קצר מאוד לא תאפשר פירוק בכמות הנראית לעין ולכן הגרעינים לא יצבעו בכחול.

הערות:

- את המצע יש להוסיף לתכשיר באמצעות פיפטור. אם לתלמידים יש ניסיון בעבודה עם פיפטור הם יוכלו לבצע זאת בעצמם על פי ההנחיות בסעיף טז, אם לא, המורה או הלבורנט יעשה זאת במקומם.
- אם אין ברשותכם אינקובטור או תנור בטמפרטורה המתאימה, ניתן להשאיר את התכשירים בחדר במשך כמחצית השעה.
- המצע המלאכותי רגישה לאור, ולכן יש להקפיד שהכלי בו הוא נמצא יהיה מכוסה ברדיד אלומיניום במשך כל הניסוי. אם צבעו של המצע ורוד, הוא אינו תקין ואין להשתמש בו.

תצפית: זיהוי פנוטיפים בנמטודות מזנים שונים

לנמטודות מסוג *C. elegans*, יש למעלה מ-2000 פנוטיפים שונים שמקורם ממוטציות מכוונות שנעשו בזן הבר, מוטציות שמטרתן הייתה ללמוד על מנגנונים בגופן של הנמטודות. התלמידים יבצעו תצפית במיקרוסקופ ויעקבו אחר שתי קבוצות של פרטים שיש להם מוטציות שונות וישוו ביניהם לבין פרטים מזן בר. בקבוצה אחת יש נמטודות מוטנטיות הפגועות במערכת העצבים והן חסרות קוארדינציה ובקבוצה השנייה נמטודות הפגועות בשריר ונעות במעגלים. באגר עליו גדלות נמטודות מזן בר ניתן להבחין בסימנים של שבילים מפותלים חרוצים באגר ונמטודות שנעות קדימה. באגר עליו גדלות נמטודות מזן rol-6 (קיצור של roller) התלמידים יראו נמטודות המסתובבות סביב עצמן ונעות במעגל במקום לנוע קדימה. באגר יראו מעגלים מעגלים חרוצים ולא שבילים מפותלים כמו אלה שנראו באגר בו גדלו פרטים של זן בר. באגר עליו גדלות נמטודות מזן unc-13 (קיצור של uncoordinated), התלמידים יראו נמטודות חסרות קוארדינציה הפגומות



בתנועתן. באגר יראו שבילים מעטים, הנמטודות כמעט ואינן נעות (סעיפים יט-כא).

חלק ה בניסוי: תצפית בתוצאות פעילותו של הגן המדווח

כאמור, חשיפה למשך זמן קצר לאצטון גרמה לפגיעה בשלמות קרום התא, הפוספוליפידים הבונים את קרום התא נהרסו ותמיסת X-Gal יכלה לחדור לציטופלסמה, ובהמשך גם לחדור לתוך הגרעין. האנזים β -galactosidase כמו כל חלבון נוצר בריבוזומים שבציטופלסמה (שאלה 3א) ומובל לגרעין ע"י רצף חומצות אמינות המכונה NLS (שאלה 3ב). ההשהיה של הנמטודות באצטון קר מאד גרמה ליצירת חרירים בקרום התא והודות לכך החומר X-Gal שהוסף לנמטודות (סעיף טז) שהוא סובסטרט של האנזים β -galactosidase נכנס אל הציטופלסמה ואל גרעין התא.

X-Gal מחומצנת בגרעין ע"י האנזים β -galactosidase, ונוצר חומר שצבעו כחול. מאחר והפירוק של תמיסת X-Gal נעשה בגרעין בלבד, נראה רק את גרעיני התאים צבועים בכחול ולא את הציטופלסמה. אם משך הניסוי יהיה ארוך יותר והתנאים יהיו מיטביים, כל עוד יש סובסטרט בעודף תתקיים תגובה בין האנזים לסובסטרט והצבע הכחול שיתקבל בגרעין יהיה כהה יותר מזה שהתקבל בניסוי שבצעו התלמידים (שאלה 4).

לנמטודות טרנסגניות שבצלחת A1 הוחדר פלסמיד עם אתר מקדם מתאי שריר. האנזים המזרז תעתוק, RNA פולימראז שנוצר בתאי השריר יתקשר לאתר המקדם של הגן LacZ, ויוצר RNA שליח. מולקולה זו תצא אל הציטופלסמה ובריבוזומים תתורגם לאנזים β -galactosidase. כאמור האנזים ותמיסת X-Gal מגיעים אל גרעין התא הגרעינים בתאים ההיקפיים של הנמטודה יצבעו בכחול. בנמטודות טרנסגניות שבצלחת A2 בה יש פלסמיד עם אתר מקדם מתאי מעי, יתרחש אותו תהליך בתאים אלו והגרעינים של תאי המעי המצויים בחלק הפנימי של הנמטודה (למעט בתחילתה ובסופה) יצבעו בצבע כחול (שאלה 2).

שאלות להרחבה ויישום:

שאלה 1

תלמידים רצו לבדוק את הצלחת הטרנספורמציה בחיידקים ובנמטודות. לפלסמיד שבו היה גן שמקודד לחלבון רצוי התלמידים הוסיפו גם את הגן המדווח LacZ. הסבירו מדוע שיטה זו יעילה בחיידקים אך אינה יעילה בנמטודות?



תשובה: בחיידקים, הפלסמיד נושא אתר מקדם ובו רצף של גנים המקודדים לתכונות שונות. נמטודות שהן יצורים אאוקריוטים, לכל גן נדרש אתר מקדם ייחודי ולכן לא יתבטא הגן המדווח.

שאלה II

בתהליך הכנת נמטודות טרנסגניות משתמשים בשני פלסמידים:

פלסמיד אחד ובו מצוי הגן המדווח¹¹ LacZ ובצמוד לו, מקטע של נוקלאוטידים Nuclear localization NLS (sequence) ואתר מקדם.

פלסמיד שני ובו גן מדווח הקובע את צורת הגוף של הנמטודה, צורה המשפיעה על אופן תנועת הגוף ובצמוד לו אתר מקדם.

הסבירו מדוע כדי לברור את הפרטים שעברו טרנספורמציה יש צורך בשני הפלסמידים.

תשובה: השיטה בעזרתה ניתן לעקוב אחר התבטאות הגן β -galactosidase ויצירת החומר שצבעו כחול גורמת למותן של הנמטודות. מכיוון שמחדירים לנמטודות גם את הפלסמיד השני אפשר לזהות את הפרטים שעברו טרנספורמציה על פי צורת תנועתן.

שאלה III

הגן LacZ מקודד לאנזים β -galactosidase המזרז את פירוק לקטוז. גן זה מתבטא באופן קבוע בתאי נמטודות טרנסגניות. במה שונה התבטאות זו מהתבטאות הגן בחיידקי E. Coli?

תשובה: בחיידקי E. Coli הגן LacZ הוא אחד מהגנים באופרון הלקטוז. גנים אלה מתבטאים רק בנוכחות הסוכר לקטוז שהוא המשרן.

שאלה IV

א. תנו דוגמה לגנים המתבטאים ברקמה מסוימת בגוף האדם ואינם מתבטאים ברקמה אחרת בגופו.

ב. תנו דוגמה לגנים המתבטאים ברקמה כלשהי בזמן מסוים ובאותה רקמה בזמן אחר הם אינם מתבטאים.

תשובה: א. לדוגמה: גנים המקודדים ליצירת אנזימי עיכול מתבטאים ברקמת המעי ואינם מתבטאים ברקמת עור / עצב.

¹¹ גן מדווח: גן שנמצא בסמוך לגן הנחקר בפלסמיד וביטויו מאפשר להבחין בתאים שקלטו את הפלסמיד וכן במידת התבטאות הגן.



ב. לדוגמה: גנים המקודדים ליצירת אנזימי עיכול מתבטאים בזמן האוכל ואינם מתבטאים בשעות שבין הארוחות.

שאלה V

בתהליך הכנת נמטודות טרנסגניות חוזרים פלסמידים באופן אקראי לתאי המין הראשונים של הנמטודות. תא מין נקבי בשל שהכיל פלסמיד התלכד עם תא מין זכרי שלא קלט פלסמיד. בנמטודה שהיא תוצר ההפריה התבטא הגן LacZ שבפלסמיד. הסבירו מה ניתן להסיק על אופן התבטאות גן זה?

תשובה: הגן LacZ מקודד לאנזים β -galactosidase המזרז את התגובה בה החומר X-Gal הופך לחומר אחר שצבעו כחול. אלל זה הוא דומיננטי ולכן מספיק אלל אחד כדי שהתכונה תתבטא בתאי הנמטודה.

שאלה VI

לרווח היא השלב הראשוני בהתפתחות נמטודה. השלב האחרון בהתפתחות, הוא הבוגר (בו צפיתם במיקרוסקופ). חוקרים מעוניינים לעקוב אחרי התפתחות תאים במעי של נמטודה טרנסגנית החל מבקיעת הלרווה מהביצה ועד לשלב הבוגר. הפלסמיד והשיטה לבדיקת התבטאות הגן המדווח שבו, היו זהים לניסוי שבצעתם. איזה רכיב יש להחסיר מהפלסמיד כך שניתן יהיה לעקוב אחרי התפתחות תאי המעי לאורך זמן?

תשובה: יש להוציא את רצף ה-NLS, רצף הנוקלאוטידים המקודד לחומצות אמיניות שמכניסות את האנזים β -galactosidase לגרעין. החוקרים מעוניינים שתוכן התא יצבע ולא הגרעין בלבד (הנצבע בניסוי שביצעתם). בתהליך זה מעוניינים לבחון את הרקמה ולהעריך את גודלה או לחלופין להבחין בהתפתחות רקמות כמו מעי שמשנתות במשך מחזור החיים של הנמטודה.



מילון מונחים

אתר מקדם (promoter) זהו אזור בקרה DNA, הנמצא בתחילת הגן המדווח, אליו נקשר RNA פולימראז בתעוק. בניסוי שלנו הנמטודות הטרנסגניות, נבדלות זו מזו באתרים המקדמים השונים שהונדסו בפלסמיד שהוחדר להן.

גן מדווח הוא גן לתכונה המאפשרת להבחין באופן איכותי או כמותי בין תאים או פרטים הנושאים את הגן לבין תאים או פרטים שאינם נושאים אותו.

פלסמיד שהוחדר לנמטודות, גן מדווח אחד משפיע על הפנוטיפ ועל התנועה של הנמטודות והגן המדווח השני מקודד לאנזים המזרז את פירוק ה-X-gal. לתוצר בצבע כחול.

חלבון מדווח הוא חלבון שהינו תוצר תעוק ותרגום של גן מדווח, וניתן למדוד את כמותו או את פעילותו (לדוגמה - אנזים שתוצר פעילותו צבעוני או זרחני)..

פלסמיד הוא מולקולת DNA קטנה מעגלית שנמצאת מחוץ לכרומוזום של יצורים פרוקריוטים ומכילה רצפים שמאפשרים את שכפולה בנפרד משכפול הכרומוזום של היצור.

הפלסמיד משמש אמצעי להעברת קטעי גנום זר מאורגניזם אחד לאורגניזם אחר, באמצעותו ניתן לחקור התבטאות של גנים ברקמות שונות וכך להכיר את מנגנוני הבקרה להתבטאות גנים בתא.

בקרה על ביטוי גנים בתא - בתאים מתקיימים תהליכי בקרה הקובעים בין היתר היכן יבוטאו הגנים ובאיזה מידה.

בניסוי זה השתמשו באתר מקדם ייחודי לתאים ברקמות ייחודיות ולכן התבטאות החלבון היא בתאי שריר בלבד או בתאי מעי בלבד ולא בתאי הגוף האחרים.

Nuclear Localization Signal –NLS רצף של נוקלאוטידים הנמצא בקצה של גן שמקודד לחלבון שפעיל בתוך הגרעין. רצף זה מקודד לחומצות אמיניות שמכוונות את כניסת החלבון לגרעין התא.





המלצות למקורות מידע למורה

פרסום / עדכון	הערות	מקור מידע	סוג המידע
5.2018	מידע מפורט במגוון נושאים כגון אנטומיה, גנטיקה, רבייה והתפתחות	הערך נמטודה (באנגלית)	ויקיפדיה
2009	הדגמה של הזרקת פלסמיד אל תאי מין ראשוניים	סרטון המדגים הזרקת פלסמיד לתאי מין של נמטודה	סרטון
4.2018	מאפייני אורגניזם מודל וחשיבותה של הנמטודה C. elegans	הערך "חיית מודל"	ויקיפדיה
2010	הגן DAF-16 מעורב בקביעת קצב הזדקנות ואורך החיים הממוצע ב-C. elegans ונמצא גם בבעלי חיים רבים אחרים, לרבות בני אדם. יתכן כי בעתיד ייושם ידע זה בכל הנוגע להזדקנות ועמידות למצבי עקה אצל בני אדם.	המתכון לחיים ארוכים: נמצא הגן המווסת את תוחלת החיים, החיסון ועמידות למצבי עקה. א. בליזובסקי (על פי כתב העת PLOS one)	מדע פופולרי, אתר הידען
2011	חוקרים מצאו שנמטודות ממין C. elegans שחיו בסביבת טפילים והתרבו ברבייה זוויגית בה מעורבים שני פרטים שרדו טוב יותר מפרטים שהתרבו ברבייה זוויגית שבה מעורב רק פרט אחד (פרט שהוא הרמפרודיט)	היתרון שברבייה מינית ד"ר אסף רוזנטל (על פי sciencedaily)	מדע פופולרי, אתר הידען