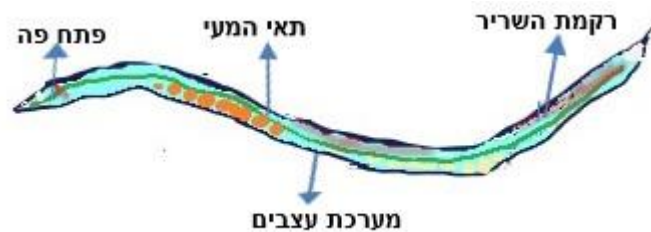




## הנושא: גנים מדווחים באורגניזם *C. elegans* תאריך עדכון: 16.5.18

*C. elegans* היא אורגניזם רב תאי השייך למערכת הנמטודות הנימיות. נמטודה זו חיה בטבע בעיקר בקרקע עשירה בחומרים אורגניים וניזונה מסוגים שונים של חיידקים וביניהם חיידקי *E. Coli*. בגופן של הנמטודות יש כמה מערכות: מערכת עיכול, מערכת עצבים, מערכת רבייה ושרירים. הנמטודות מתרבות באופן עצמי ובקצב מהיר (רוב הפרטים הם בעל מערכת רבייה זכרית ומערכת רבייה נקבית הפועלות בו זמנית). הפרטים קטנים (אורך הבוגר כ-1 מ"מ) ושקופים ולכן כאשר צופים בהם במיקרוסקופ אפשר להבחין באיברים וברקמות שלהם.

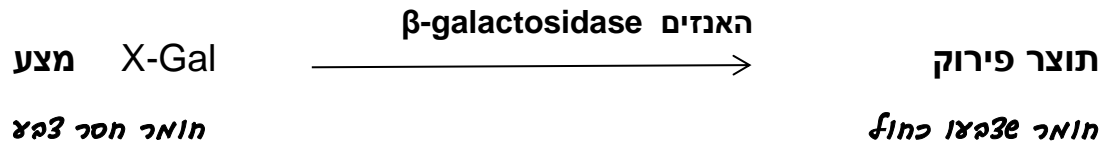


### בניסוי תזהו התבטאות של גנים מדווחים בתאים של רקמות שונות בנמטודות טרנסגניות.

**נמטודות טרנסגניות**, הן נמטודות אשר בתהליך רב שלבי הוחדר אל הגנום שלהם DNA זר. בניסוי שתבצעו ה-DNA הזר כולל מספר מרכיבים: גן מדווח, אתר מקדם ורצף של נוקלאוטידים (NLS).

**גן מדווח** הוא גן המקודד לחלבון שמאפשר להבדיל בין תאים המכילים את הגן לבין תאים שאינם מכילים את הגן. חלבון זה הוא **חלבון מדווח** שאת כמותו או את פעילותו אפשר למדוד בניסוי. בניסוי שתבצעו הגן המדווח הוא LacZ. גן זה שמקורו בתאי חיידקים, מקודד ליצירת האנזים  $\beta$ -galactosidase שהוא החלבון המדווח.

האנזים  $\beta$ -galactosidase מזרז פירוק מולקולה של דו סוכר לקטוז לשתי מולקולות חד סוכר, גלוקוז וגלקטוז. נמצא כי האנזים יכול לפעול גם על סובסטרט מלאכותי הדומה במבנהו ללקטוז, ושמו X-Gal. החומר X-Gal הוא חסר צבע, וכתוצאה מפעולת האנזים עליו נוצר חומר שצבעו כחול. בנמטודות הטרנסגניות, החומר X-Gal חודר לגרעיני התאים, והאנזים  $\beta$ -galactosidase המצוי בהם מזרז את פירוקו ונוצר חומר שצבעו כחול.



**רצף נוקלאוטידים (NLS)** המתורגם לחלבונים קצרים המאפשרים את כניסת האנזים  $\beta$ -galactosidase לגרעין.

**אתר מקדם (promoter)** הוא רצף בסיסים ב DNA שצמוד לגן המדווח ואליו נקשר האנזים RNA פולימראז המזרז את התעתוק של הגן הסמוך, (בניסוי הגן LacZ). אתר זה הוא חלק מאזור הבקרה ב DNA והודות לו יתבטא הגן המדווח וייוצר החלבון המדווח. בניסוי תשתמשו בנמטודות טרנסגניות משני זנים שבכל אחד מהם יש גן מדווח LacZ. בפרטים מן אחד יש אתר מקדם ייחודי המאפשר התבטאות של הגן המדווח ברקמת שריר ובזן האחר- יש אתר מקדם ייחודי אחר המאפשר התבטאות הגן המדווח ברקמת מעי. בניסוי, הנמטודות יודגרו עם מצע X-Gal וכל תא שלהן בו נזהה צבע כחול יצביע על כך שהגן המדווח התבטא בו. על פי עוצמת הצבע ניתן להסיק על מידת הביטוי של הגן.



3/....

## זיהוי הביטוי של חלבון מדווח בתאי מעי ובתאי שריר בנמטודות טרנסגניות

### מסוג *C. elegans*

#### חלק א

#### היכרות עם הפנוטיפ<sup>1</sup> של זן בר של נמטודות מסוג *C. elegans*

בחלק זה תצפו בנמטודות, בשבילי הזחילה שלהן על פני האגר ובביציהן.

- א. לרשותכם צלחת פטרי המסומנת "1" ובה אגר מזין שעליו זרעו חיידקי *E. Coli*. על האגר יש נמטודות זעירות שקשה לראות אותן בעין והן ניזונות מהחיידקים.
    - לבשו כפפות.
    - העבירו את המיקרוסקופ להגדלה קטנה.
    - הניחו את הצלחת על שולחן המיקרוסקופ, הסירו את המכסה של הצלחת והניחו אותו על המגש. התבוננו בנמטודות מבעד להקטנה קטנה של המיקרוסקופ.
    - לאחר שתבחינו בנמטודות הזיזו את הצלחת כך שהאזור בו הן נמצאות יהיה במרכז שדה הראיה.
    - עברו להגדלה בינונית והתבוננו שוב בנמטודות.
- שימו לב לכך שבתכשיר יש:**
- נמטודות בגדלים שונים,
  - שבילי זחילה של הנמטודות על האגר,
  - ביצים עגולות שהנמטודות הטילו על האגר ומהן יתפתחו נמטודות צעירות.

#### חלק ב

#### איסוף נמטודות טרנסגניות

- בחלק זה תכינו משקע של נמטודות טרנסגניות ובהמשך תבדקו אותן במיקרוסקופ.
- ב. לרשותכם מבחנה המסומנת "מים" ופיפטת פסטר. בעזרת פיפטת פסטר העבירו כ- 1.5 מ"ל מים לצלחת פטרי "A1" או "A2" שבה מצויות הנמטודות. הניחו את הפיטה במגש.

<sup>1</sup> פנוטיפ ביטוי תכונה או תכונות הפרט כתוצאה מפעילות הגנוטיפ שלו בתנאי סביבה נתונים



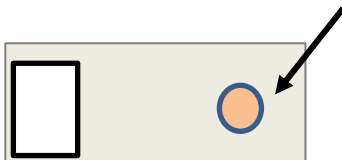
- ג. ערבבו בעדינות את הנוזל בצלחת בעודה על השולחן (ע"י סיבוב עדין של הצלחת) כך שהנמטודות ישטפו מפני הצלחת אל תוך הנוזל.
- ד. הטו מעט את הצלחת. השתמשו בפיפטה ומבלי לגעת באגר שאבו את רוב הנוזל שבצלחת והעבירו אותו למבחנת אפנדורף. הניחו את הפיפטה במגש.
- ה. העבירו את המבחנה לכן המתאים והמתינו במשך כדקה עד לשקיעת הנמטודות במבחנה. אין לטלטל את המבחנה בעת ההמתנה.
- ו. בעזרת הפיפטה, הוציאו בעדינות את רוב הנוזל העליון שבמבחנה מבלי לגעת במשקע הנמטודות. העבירו את הנוזל ואת הפיפטה לכלי פסולת.
- כך יישאר במבחנה מעט נוזל ובו משקע הנמטודות.

## חלק ג

### הכנת התכשיר להסתכלות במיקרוסקופ

בחלק זה תחשפו את הנמטודות שבתכשיר לקרח יבש ולאצטון.

- ז. לרשותכם זכוכית נושאת שבקצה שלה יש מדבקה.
- רשמו את צבע המדבקה .....
  - רשמו **בעפרון** את שמכם על המדבקה.
- ח. באמצעות הגלגלת של הפיפטר כווננו את נפח הנוזל ל- 20 מיקרוליטר.
- העבירו 20 מיקרוליטר ממשקע הנמטודות שהכנתם בסעיף ו אל הקצה **המרוחק** מהמדבקה שעל הזכוכית נושאת (קצה המסומן בחץ).
  - העבירו את הטיפ מהפיפטר לכלי פסולת.
- ט. כסו בזכוכית מכסה את הטיפה עם הנמטודות.
- י. גשו לשולחן המורה והניחו את הזכוכית נושאת על גבי קרח יבש כך שהצד עם הזכוכית המכסה יהיה כלפי מעלה. רשמו את השעה.....
- יא. בעודכם ממתנים קראו את המידע בקטע "לידיעתכם 1" ואת ההוראות להמשך העבודה עד לסעיף יז.



### לידיעתכם 1:

**קרח יבש** הוא פחמן דו חמצני במצב מוצק שהטמפרטורה שלו נמוכה בהרבה מהטמפרטורה של קרח רגיל. חשיפה לטמפרטורה זו מסייעת להידבקות הנמטודות אל הזכוכית הנושאת.

**אצטון** הוא חומר ממיס שומנים הפוגע במבנה המעטפת החיצונית של גוף הנמטודות ויוצר חרירים בקרומים שבתאיהם. פגיעה זו מאפשרת את חדירת המצע "X-Gal" לתוך התאים וגם לתוך גרעיני התאים.



- יב. לאחר שחלפו לפחות 5 דקות מהשעה שרשמתם בסעיף י קחו את הזכוכית נושאת וגשו **מיד** אל המורה. המורה יעזר בלהב של סכין חד ויסיר בעדינות את הזכוכית המכסה.
- יג. המורה יעביר את הזכוכית הנושאת לכלי ובו אצטון קר ויפקוק את הכלי. רשמו את השעה..... והשאירו את הזכוכית בכלי למשך 5 דקות.
- יד. לאחר שחלפו 5 דקות מהשעה שרשמתם בסעיף יג, היעזרו במלקטת (פינצטה) והוציאו את הזכוכית נושאת מהאצטון שבכלי. פקקו את הכלי.
- טו. הניחו את הזכוכית על גבי צלחת חד פעמית כך שהכיתוב במדבקה יפנה כלפי מעלה. הניחו את הצלחת בקרבת חלון פתוח כדי שהאצטון יתנדף.

## חלק ד

### חשיפת הנמטודות למצע "X-Gal"

- בחלק זה תוסיפו את המצע המלאכותי "X-Gal" לתכשיר הנמטודות.
- טז. המתינו כדקה מהשעה שרשמתם בסעיף טו והעבירו את הצלחת אל השולחן. הניחו את הזכוכית נושאת על גבי פיסה של נייר בריסטול כהה כך שהכיתוב במדבקה יפנה כלפי מעלה.
- גשו לשולחן המורה והניחו את הזכוכית נושאת על גבי השולחן.
  - החזיקו בכלי / במבחנת אפנדורף המסומן "X-Gal".
  - העבירו 30 מיקרוליטר מתמיסת X-Gal אל האזור בזכוכית נושאת שעליו טפטפתם את משקע הנמטודות (סעיף ח).
  - כסו בעדינות עם זכוכית מכסה את הנמטודות והנזל שעל הזכוכית הנושאת.



**יז.** החזיקו בשולי הזכוכית נושאת **המכוסה** מבלי לגעת באזור בו נמצאות הנמטודות.  
- העבירו בזהירות את הזכוכית למורה, והוא יעטוף אותה ברדיד אלומיניום.  
המורה ירשום את שמכם על המדבקה כדי שתוכלו לזהות את התכשיר שלכם בהמשך הניסוי.

**לידיעתכם 2:**

**א.** "X-Gal" הוא חומר חסר צבע המתפרק מעצמו בחשיפה לאור.

**ב.** "X-Gal" הוא המצע של האנזים  $\beta$ -galactosidase (חלבון מדווח המקודד על ידי הגן lacZ). תוצר התהליך הוא חומר בצבע כחול.

האנזים  $\beta$ -galactosidase

→

<b>מצע</b>	X-Gal		<b>תוצר פירוק</b>
	<i>חומר חסר צבע</i>		<i>חומר בצבע כחול</i>

**יח.** המורה יעביר את כל הזכוכיות העטופות לאינקובטור בטמפרטורה של 37 °C  
למשך 15 - 20 דקות.  
רשמו את השעה.....  
בעודכם ממתנים עברו לתצפית ועבדו על פי ההוראות שבהמשך.

### תצפית: זיהוי פנוטיפים בנמטודות מזנים שונים

- הנמטודה היא יצור רב תאי קטן. עד היום זהו במין *C. elegans* כ-2000 פנוטיפים שלכל אחד מהם תכונות שונות כגון: גודל, אורך, תנועה, התנהגות והתפתחות.
- בתצפית זו תעקבו אחרי 3 פנוטיפים שונים:
- זן בר – הן נמטודות המתפתלות בזמן תנועתן.
  - זן unc-13 – הן נמטודות שלהן מוטציה במערכת העצבים המתבטאת בחוסר תיאום תנועתי (קואורדינציה) וכתוצאה מכך תנועתן פגומה.
  - זן rol-6 – הן נמטודות שלהן מוטציה בתאי השריר, הן מסתובבות סביב עצמן ונעות במעגל במקום לנוע קדימה.

העתיקו את הטבלה למחברתכם:



מספר צלחת	שם הפנוטיפ	תיאור מילולי של מאפיין ייחודי	ציור
1	זן בר		
2			
3			

יט. העבירו את המיקרוסקופ להגדלה קטנה.

- הניחו שוב את צלחת 1 על שולחן המיקרוסקופ והתבוננו בנמטודות מבעד להגדלה קטנה של המיקרוסקופ.

- לאחר שתבחינו בנמטודות הזיזו את הצלחת כך שהאזור בו הן נמצאות יהיה במרכז שדה הראיה עברו להגדלה בינונית והתבוננו שוב בנמטודות.

- ציירו את הנמטודות והשלימו את התיאור המילולי בשורה המתאימה בטבלה.

כ. חזרו על כל הוראות ההסתכלות במיקרוסקופ שבסעיף יט עם נמטודות שבצלחת אחרת המונחת במגש שלפניכם (צלחת 2 או צלחת 3).

- זהו את הפנוטיפ של הנמטודות בצלחת זו והשלימו במקום המתאים בטבלה את שם הפנוטיפ, התיאור המילולי והציור המתאים.

כא. החליפו עם תלמידים בקבוצה אחרת את הצלחת שברשותכם (צלחת 2 או 3) וחזרו על כל ההוראות שבסעיף כ.

- לאחר שחלפו כ- 20 דקות מהשעה שרשמתם בסעיף יח, חזרו לחלק ה של הניסוי.

## חלק ה

### תצפית בתוצאות פעילותו של הגן המדווח

בחלק זה תתבוננו במיקרוסקופ בנמטודות הנבדלות זו מזו ברקמות שנצבעו בכחול לאורך גופן.

כב. קבלו מהמורה את התכשיר שלכם העטוף ברדיד אלומיניום.

- הסירו בזהירות את העטיפה והניחו את התכשיר על שולחן המיקרוסקופ. כווננו תחילה את המיקרוסקופ להגדלה הקטנה.

- לאחר שתבחינו בנמטודות, העבירו את האזור בו הן נמצאות למרכז שדה הראיה והתבוננו בתכשיר מבעד למיקרוסקופ.

- העבירו להגדלה בינונית, שפרו את איכות התמונה על ידי סיבוב הבורג הקטן עד שתראו את הנמטודות בבירור.



- היעזרו בתרשים של הנמטודה (עמ' 1) וזהו את האזור הצבוע בכחול בגופה של הנמטודה.  
ענו על שאלות I – III תוך צפייה בתכשיר שבמיקרוסקופ:

I. ציירו את התרשים של הנמטודה וסמנו עליו את האזור שנצבע בצבע כחול.

II. הגן המדווח בא לידי ביטוי בתאים \_\_\_\_\_

III. האם הצבע הצטבר בציטופלסמה של התאים או בגרעין? \_\_\_\_\_

ג. חזרו על הוראות סעיף כב עם זן נמטודות שניתן לאחד מחבריכם לכיתה והוא שונה מזה שאתם  
קיבלתם (לזן זה צבע המדבקה שעל הזכוכית הוא שונה משלכם).  
זהו את האזור בנמטודה שנצבע בכחול.

ענו על שאלות I – III תוך צפייה בתכשיר שבמיקרוסקופ:

I. ציירו את התרשים של הנמטודה וסמנו עליו את האזור שנצבע בצבע כחול.

II. הגן המדווח בא לידי ביטוי בתאים \_\_\_\_\_

III. האם הצבע הצטבר בציטופלסמה של התאים או בגרעין? \_\_\_\_\_

- קבלו מהלבורנט צמר גפן טבול באלכוהול ונקו את משטח העבודה שלכם.
- השליכו את הכפפות לכלי הפסולת ורחצו היטב ידיים במים וסבון.

## שאלות

1. בניסוי השתמשנו בנמטודות טרנסגניות שלהן גן מדווח.

א. הסבירו מהו גן מדווח.





- ב. מהו הגן המדווח בנמטודות שבניסוי?
- ג. מהו החלבון המדווח בניסוי? מהו תוצר הפעולה של החלבון המדווח?
2. התבססו על התוצאות שנצפו במיקרוסקופ (סעיפים כב ו-כג) והסבירו מה גרם לכך שבנמטודות טרנסגניות מזנים שונים הגן המדווח התבטא ברקמות אחרות.
3. לנמטודות הטרנסגניות החדירו בנוסף לגן lacZ גם רצף נוקלאוטידים הקרוי NLS. רצף זה מתורגם לחלבון קצר המוביל את האנזים  $\beta$ -galactosidase לגרעיני התאים.
  - א. באיזה חלק של התא נוצר החלבון המדווח (האנזים  $\beta$ -galactosidase)?
  - ב. התבססו על תשובותיכם בסעיפים כב ו-כג, על תשובתכם לסעיף א בשאלה, על המידע בפתיח לשאלה ועל הקטע "לידיעתך 1" וקבעו באיזה חלק של התא האנזים פעיל? נמקו את תשובתכם.
4. בניסוי חשפתם את הנמטודות ל"תמיסת X-Gal" במשך כ-20 דקות. בניסוי דומה לזה שבצעת, חשפו נמטודות במשך שעתיים לתמיסת X-Gal שריכוזה גבוה יותר מזה שהשתמשתם בניסוי. מהן התוצאות הצפויות בניסוי הדומה? נמקו קביעתכם.
5. בטבע יש מגוון גדול של מיני נמטודות הגדלות בבתי גידול שונים כגון קרקע, מים מתוקים ומי ים. נמטודות ניזונות ממגוון של מזונות כגון פטריות, חיידקים, שורשים של צמחים וחומרים אורגניים שבקרקע. במחקרים נמצא כי צמחים שנמטודות חדרו אליהם, הביימסה שלהם קטנה יותר בהשוואה לצמחים שלא חדרו אליהם נמטודות. מהם סוגי יחסי הגומלין המתוארים בקטע זה? הסבירו.
6. חוקר פיתח חיידקים מהונדסים שמייצרים רעלנים הפוגעים בנמטודות. החוקר החליט להשקות צמחים שנפגעו מנמטודות בתרבית נוזלית של חיידקים מהונדסים. האם לדעתכם יש להתיר לחקלאים להשתמש בטיפול זה?  
נמקו תשובתכם בעזרת טיעון בעד ונגד השימוש בחיידקים מהונדסים בחקלאות.