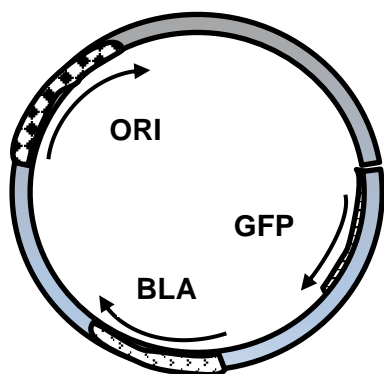




הנושא: טרנספורמציה בתאי חיידק E.Coli (א. קולי) תאריך עדכון: 9.5.18

טרנספורמציה היא שינוי מכוון במטען התורשתי של תא. השינוי נוצר כתוצאה מהחדרת DNA שמקורו בתא שיש לו גנוטיפ אחר¹.

בניסוי תעבירו את הפלסמיד "pGFP" לתאיהם של חיידקי E.Coli ותקבו אחר ביטוי של הגנים שבפלסמיד.



מפת הפלסמיד:

- GFP - גן המקודד לחלבון זוהר, מקורו מבע"ח ימיים זוהרים.
- BLA - (β לקטאמאז) גן המקודד לאנזים המזרז פירוק אמפיצילין.
- ORI - אזור בקרה ממנו מתחיל שכפול הגנים בפלסמיד.

בניסוי תכינו את החיידקים לביצוע טרנספורמציה, תבצעו טרנספורמציה על ידי הוספת פלסמידים לחיידקים, תזרעו את החיידקים על אגר ותבדקו את תוצאות הניסוי.

חלק א

הכנת החיידקים לטרנספורמציה

בחלק זה תגרמו להגדלת חדירות הקרומים של תאי החיידקים כדי שתתאפשר כניסה יעילה של פלסמידים לתוך תאים אלו. החיידקים יהיו בסביבה של טמפרטורה נמוכה המונעת התרבות של חיידקים ומסייעת בחדירת דנ"א.

- לבשו כפפות והרכיבו משקפי מגן.
- בקשו מהלברנט קרח גרוס והכניסו אותו לקערה המסומנת "אמבט קרח".
- קבלו מהלברנט מבחנה המסומנת "תרחיף חיידקים" שבה יש חיידקי E.Coli במצע מזון נוזלי (LB). הכניסו את המבחנה לאמבט הקרח למשך 10 דקות. היעזרו בשעון קיר שבמעבדה ורשמו את השעה.....

לידיעתכם 1

LB הוא מצע מזון עשיר המכיל מינרלים וחומרי הזנה כגון חלבונים, החיוניים לגדילת חיידקי E.Coli.

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



בעודכם ממתנינים להוצאת המבחנה מאמבט הקרח בצעו את הוראות סעיף ד.
ד. לרשותכם שתי מבחנות אפנדורף (מבחנות פלסטיק קטנות עם מכסה) באמצעות עט לסימון על זכוכית כתבו על כל אחד מהמכסים של המבחנות את האות הראשונה בשמו של אחד מחברי הקבוצה.

שימו לב: בהמשך הניסוי תוסיפו פלסמיד למבחנה "pGFP+" ואילו למבחנה "pGFP-" לא תוסיפו פלסמיד.

מבחנת אפנדורף בצבע תשמש ל "pGFP+" ומבחנת אפנדורף בצבע
תשמש ל "pGFP-".

לרשותכם פיפטת פסטר סטרילית מפלסטיק.
- פתחו את האריזה מהקצה שבו נמצא הטפטף של הפיטה. החזיקו בטפטף והוציאו את הפיטה.



- פתחו גם את צידי האריזה ופרסו אותה כך שצידה החיצוני יהיה מונח על השולחן. הניחו את הפיטה על האריזה.

- באמצעות עט לסימון על זכוכית הדגישו בקו על הפיטה את הסימן של 1 מ"ל - בסעיף ו תשתמשו בפיטה שהכנתם.

ה. **משחלפו 7 דקות מהשעה שרשמתם בסעיף ג, המשיכו לעבוד לפי ההנחיות בסעיף ה.**
לרשותכם מבחנה המסומנת "TRAN" ובה תמיסת טרנספורמציה.
- העבירו את המבחנה מהכוס לאמבט הקרח.

ו. משחלפו 10 דקות מהשעה שרשמתם בסעיף ג, הוציאו את המבחנה "TRAN" מאמבט הקרח לכוס.

- הוציאו את המבחנה "תרחיף חיידקים" מאמבט הקרח, **מבלי** לטלטל את התרחיף.
- בעזרת פיטה פסטר הסטרילית שסימנתם העבירו בזהירות 1 מ"ל מהנוזל העליון שבמבחנה "תרחיף חיידקים" לכלי המסומן "פסולת".
- הניחו את הפיטה בכלי הפסולת.
במבחנה "תרחיף חיידקים" יש כעת תרחיף מרוכז של חיידקים.



קראו את סעיפים ז - ח ובצעו בזריזות את ההוראות.

- ז. לרשותכם פיפטה סטרילית בנפח 5 מ"ל ופרופיטה מתאימה.
- העבירו 5 מ"ל מתמיסת ה- TRAN למבחנה "תרחיף חיידקים" שיש בה חיידקים בתמיסת LB. פקקו את המבחנה.
- ערבבו קלות את המבחנה. הכניסו את המבחנה לאמבט הקרח למשך 20 דקות.
- רשמו את השעה.....

לידיעתכם 2:

- תמיסת טרנספורמציה היא תמיסה מימית של המלח $CaCl_2$.
- יוני הסידן (Ca^{+2}) מונעים דחייה חשמלית בין יונים שלילים (יוני הפוספט) שנמצאים ב DNA של הפלסמיד לבין יונים שליליים הנמצאים בחומרים שבונים את הקרום החיצוני של חיידקי E.Coli.
 - יוני הסידן גם מרחיבים את התעלות היוניות בקרום התא דרכן עוברים יונים אלה והודות לכך גדלה חדירות הקרום.

בעודכם ממתינים בצעו את סעיף ח, השיבו על שאלה 1, קראו את סעיפים ט - י ואת המידע בקטע לידיעתכם 3.

שאלה 1:

- I. התאים של כל היצורים החיים מוקפים בקרום בררני הסבירו את הקשר בין מבנה קרום התא לבין תפקודו.
- II. בניסויים קודמים נמצא שחשיפת החיידקים לטמפרטורת נמוכות מאד (כמו זו שמבוצעת בסעיפים ג, ז ו- יג) מונעת את התרבותם ומאפשרת לקרום החיידקים להישאר חדיר, כך שגם פלסמידים יכולים לעבור דרכו. היעזרו במידע שבשאלה, במידע שבפתיח ובקטע לידיעתך 2 והסבירו כיצד הטיפולים המתוארים מסייעים להצלחת תהליך הטרנספורמציה בחיידקים?
- III. ידוע כי בתאים של יצורים חיים קיימים מנגנוני הגנה. אחד המנגנונים הוא הימצאות אנזימים החותכים DNA זר שחודר לתאיהם. בהמשך הניסוי תחשפו את החיידקים לטמפרטורה של $42^{\circ}C$, טמפרטורה שהיא גבוהה מהטמפרטורה האופטימלית לפעילות אנזימים אלה בתאי החיידקים, אך אינה פוגעת בחיוניותם. הציעו הסבר אפשרי לחשיבותו של הטיפול ב- $42^{\circ}C$ להצלחת הטרנספורמציה.



משחלפו 20 דקות מהשעה שרשמתם בסעיף ז המשיכו לעבוד לפי ההנחיות בסעיף ח.

- ח. לרשותכם פיפטת פסטר סטרילית מפלסטיק.
- חיזרו על ההוראות בסעיף ד וסמנו על הפיטה סימן על נפח של 0.5 מ"ל.
-טלטלו בעדינות את הנוזל שבמבחנה "תרחיף חיידקים" שאליה הכנסתם גם נוזל טרנספורמציה.
- פתחו את המכסה של מבחנת האפנדורף בצבע..... ("pGFP+"), ובאמצעות פיפטה פסטר סטרילית העבירו 0.5 מ"ל נוזל מהמבחנה "תרחיף חיידקים" למבחנת האפנדורף.
- סגרו את מכסה מבחנת האפנדורף.
ט. פתחו את המכסה של מבחנת אפנדורף בצבע..... ("pGFP-") וחזרו על הוראות סעיף ח עם הפיטה, הנוזל שבמבחנה ועם מבחנת אפנדורף.
- הציבו **מיד** את מבחנות האפנדורף ("pGFP+", "pGFP-") בכן המבחנות, ואת הכן הניחו במיכל הקרח.
- הניחו את הפיטה בכלי הפסולת.

סעיף זה יתבצע בעזרת המורה

- י. התבוננו במורה המחזיק את הבקבוקון שבו נוזל ופלסמידים.
המורה מאיר באור UV על הבקבוקון שבו נמצאים פלסמידים.
האם היה שינוי בצבע הנוזל שבבקבוקון? _____

לידיעתכם 3:

הפלסמיד הוא מולקולת DNA טבעתית שיכולה להתרבות ללא תלות בכרומוזום החיידק ומכילה מידע חיוני לגדילתו. ניתן להשתמש בפלסמיד כאמצעי להעברת קטעי גנום זר מאורגניזם אחד לאורגניזם אחר.

בפלסמיד נמצא אזור בקרה ORI ממנו מתחיל שכפול ה-DNA בפלסמיד.
בניסוי תשתמש בפלסמיד המהונדס המכונה "pGFP".

לפלסמיד המהונדס הוכנסו הגנים האלה:

- גן GFP המקודד לחלבון זוהר. גן זה שכיח בבע"ח ימיים כגון זואופלנקטון, מדוזות, ודגים.
- גן BLA המקודד לחלבון "בטא לקטמאז" ומעניק לחיידקים תכונת עמידות בפני אנטיביוטיקה מסוג אמפיצילין.



שאלה 2:

התבססו על התוצאות שרשמתם בסעיף י' וקבעו האם הפלסמיד שבבקבוק מייצר חומר זוהר. הסבירו מדוע.

יא. הוציאו את מבחנת האפנדורף בצבע ("pGFP+") מהקרח וגשו לשולחן המורה.
- המורה יעביר 0.002 מ"ל תרחיף פלסמידים מבקבוקון בו מצויים פלסמידים למבחנה "pGFP+".

- סיגרו בזהירות את המכסה של מבחנת האפנדורף.

יב. החזיקו את המבחנה מעל שולחן והקישו קלות באמצעות האצבע בחלק התחתון של המבחנה על מנת לוודא כי כל הנוזלים נמצאים בתחתית המבחנה.

יג. החזירו את המבחנה "pGFP+" לכן המבחנות שבמיכל הקרח שבו נמצאת מבחנה "pGFP-" רשמו את השעה.....

שימו לב: במשך 10 דקות המבחנות צריכות להיות טבולות בקרח, כך שרק המכסה יראה. בעודכם ממתנינים להוצאת המבחנות מאמבט הקרח השיבו על שאלה 3 ובצעו את סעיף יד.

שאלה 3

הסבירו מדוע חשוב היה לכלול בניסוי את המבחנה "pGFP-", מבחנה ללא פלסמיד?

לידיעתכם 4:

LB הוא מצע מזון עשיר המכיל מינרלים וחומרי הזנה כגון חלבון, החיוניים לגדילת חיידקים וביניהם חיידקי E.Coli.

LB/AMP הוא מצע מזון LB שהוסיפו לו חומר אנטיביוטי מסוג אמפיצילין.

יד. לרשותכם צלחות פטרי המסומנות בספרות 1 – 3. על תחתית כל צלחת רשום גם הרכב האגר שבה. בצלחות אלה תשתמש בסעיף יח. באחת הצלחות מצע המזון הוא LB ובשתי הצלחות האחרות מצע המזון הוא LB/AMP.

- רשמו בשולי המכסה של כל אחת מהצלחות את שמו של אחד מחברי הקבוצה.

- האגר שבצלחת 1 הוא LB/AMP. רשמו בשולי המכסה "pGFP+".

5



- האגר שבצלחת 2 הוא LB. רשמו בשולי המכסה "pGFP-".
 - האגר שבצלחת 3 הוא LB/AMP. רשמו בשולי המכסה "pGFP+".
- לאחר שחלפו 10 דקות מהשעה שרשמתם בסעיף יג עברו לסעיף טו. עבדו בזריזות ובדייקנות.**

טו. על שולחן המורה הוכן עבורכם אמבט מים בטמפרטורה של 42°C .
העבירו את מבחנות האפנדורף הצבעוניות "pGFP-" ו-"pGFP+" לכן המבחנות והכניסו אותן לאמבט למשך 60 שניות בדיוק.

טז. בתום 60 שניות החזירו במהירות את המבחנות לאמבט הקרח למשך 2 דקות.
שימו לב: הכניסו את המבחנות לעומק הקרח, כך שרק המכסה של המבחנות יראה.

חלק ב

זריעת חיידקים בצלחות עם מצע מזון

בחלק זה תזרעו את החיידקים שעברו טיפול להגדלת חדירות הקרומים. בחלק מהחיידקים התרחשה טרנספורמציה.

- יז.** לרשותכם כלי המסומן "LB" ובו תמיסת מזון LB לגידול חיידקים.
 - בתום 2 דקות הוציאו מהקרח את הכן והמבחנות שבתוכו.
 - לרשותכם פיפטת פסטר סטרילית מפלסטיק.
 - חיזרו על ההוראות בסעיף ד וסמנו על הפיטה סימן על נפח של 1 מ"ל.
 - פתחו את המכסה של מבחנת "pGFP-" ובעזרת פיפטת פסטר סטרילית העבירו 1 מ"ל תמיסת LB מהכלי למבחנת "pGFP-". פקקו היטב את המבחנה.
 - באותו אופן, העבירו עם אותה פיפטת פסטר 1 מ"ל תמיסת LB גם למבחנת "pGFP+".

לידיעתכם 5:

בחלק א של הניסוי גרמתם לחדירת הפלסמידים לתאי החיידקים. העברת החיידקים לתמיסת LB העשירה בחומרי הזנה, מאפשרת קיומם של תהליכי תעתוק ותרגום בתאיהם.

יח. וודאו ששתי מבחנות אפנדורף הנמצאות בכך המבחנות פקוקות היטב.

- החזיקו את מבחנת "pGFP-" ובעדינות הפכו אותה כ- 6 פעמים כדי לערבב ולהרחיף את החיידקים.

לרשותכם פיפטת פסטר סטרילית מפלסטיק.

- חיזרו על ההוראות בסעיף ד וסמנו על הפיטה סימן על נפח של 0.5 מ"ל.



- באמצעות הפיטה פסטר הסטרילית העבירו 0.5 מ"ל נוזל מהמבחנה "pGFP-" לצלחת 3
- ו- טפטפו 2 טיפות לצלחת מספר 2.
- הניחו את הפיטה בכלי הפסולת.

יט. לרשותכם מחט זריעה סטרילית.

- הרימו את המכסה של צלחת "pGFP-" LB (צלחת 2) בזווית של כ- 45° והעבירו בעדינות את הלולאה על פני האגר כך שהנוזל יפוזר עליו באופן שווה.
- סובבו את הצלחת 3 פעמים והמשיכו בפיזור עדין על פני האגר ולא בתוכו, כך שכל הנוזל יפוזר על פני הצלחת. סגרו את המכסה. העבירו את מחט הזריעה לכלי הפסולת.

כ. לרשותכם מקל דריגלסקי סטרילי:

- הרימו את המכסה של צלחת "pGFP-" LB/AMP (צלחת 3) בזווית של כ- 45° והעבירו בעדינות את המקל על פני האגר כך שהנוזל יפוזר באופן שווה על האגר.
- סובבו את הצלחת 3 פעמים והמשיכו בפיזור עדין על פני האגר ולא בתוכו כך שכל הנוזל יפוזר על פני הצלחת. סגרו את המכסה. העבירו את המקל לכלי הפסולת.

- כא. החזיקו את מבחנת "pGFP+" ובעדינות הפכו את המבחנה כ- 6 פעמים כדי לערבב ולהרחיף את החיידקים.

כב. לרשותכם פיפטה פסטר סטרילית מפלסטיק.

- חיזרו על ההוראות בסעיף ד וסמנו על הפיטה סימן על נפח של 0.5 מ"ל.
- באמצעות פיפטה הסטרילית העבירו 0.5 מ"ל נוזל ממבחנת "pGFP+" לצלחת 1. העבירו את הפיטה לכלי הפסולת.

- כג. השתמשו במקל דריגלסקי סטרילי וחזרו על הוראות סעיף כ עם צלחת "pGFP+" LB/AMP (צלחת 1) העבירו את המקל לכלי הפסולת.

כד. ודאו ששמו של אחד מחברי הקבוצה רשום על המכסה של כל אחת מהצלחות.

- הניחו את 3 הצלחות זו על גבי זו כשהן הפוכות (כשהמכסה של כל צלחת פונה כלפי מטה) והצמידו נייר דבק סביב 3 הצלחות.
- מסרו את הצלחות ללבורנט והוא יעביר אותן לאינקובטור שהטמפרטורה בו היא 37°C למשך 24 שעות.



השליכו את הכפפות לכלי הפסולת. החזירו את כל הציוד למגש. נקו את השולחן בעזרת אלכוהול 70% ורחצו ידיים במים וסבון.

שאלה 4

- I. הסבירו מדוע התבקשתם להכניס את מבחנות האפנדורף לקרח ולאחר מכן לאמבט בטמפרטורה 42°C ושוב לקרח.
- II. מדוע יש להשאיר את הצלחות באינקובטור בטמפרטורה של 37°C במשך כ-24 שעות עד לקבלת התוצאות?

שאלה 5

- הכינו טבלה לסיכום מערך הניסוי בה תרשמו את התכולה של כל אחת מהצלחות.
- הוסיפו שתי עמודות לרישום התוצאות שכותרתן "מספר כל המושבות" ו-"מספר המושבות הזוהרות".
 - רשמו מתחת לטבלה שני גורמים שנשמרו קבועים בניסוי.
 - הוסיפו כותרת לטבלה.

שאלה 6

מהן התוצאות הצפויות בכל אחת מהצלחות?

...המשך בעמ' 9

חלק ג

בדיקת התוצאות והסברן

- כה. לבשו כפפות. הסירו בזהירות את סרט הדבק מהצלחות והניחו אותן כך שהתחתית של כל צלחת תהיה מונחת על השולחן.
- התבוננו בתוצאות מבלי לפתוח את הצלחות.
 - רישמו את התוצאות בעמודה המתאימה בטבלה שהכנתם (שאלה 5).
- הערה: אם המושבות צפופות מאוד ולא ניתן לספור אותן – רשמו "כיסוי מלא".



- נו. על פי הנחיות המורה, גשו לחדר חשוך.
- המורה יאיר במנורת UV על צלחות חיידקים.
- סיפרו את מספר המושבות הזוהרות שגדלו בכל אחת מהצלחות.
רישמו את התוצאות בעמודה המתאימה בטבלה שהכנתם (שאלה 5).
השליכו את הכפפות לכלי פסולת.
קבלו מהלבורנט צמר גפן ספוג באלכוהול. נקו את משטח העבודה עליו עבדתם.
רחצו ידיים במים וסבון.

שאלה 7

- I. הסבירו את התוצאות שהתקבלו בכל אחת מהצלחות.
II. האם התוצאות אותן רשמתם בטבלה תואמות את תשובתכם בשאלה 6? אם התוצאות אינן תואמות את אלה שקיבלתם בניסוי, הציעו הסבר אפשרי להבדל זה.

שאלה 8

הסבירו מדוע היה חשוב לכלול בניסוי את צלחות 2 ו-3?

שאלה 9

- תלמיד החליט להוסיף לניסוי צלחת שמצע המזון בה הוא LB ועליה זרע חיידקים שהושהו עם פלסמידים (כמתואר בסעיפים א - טז).
בצלחת התפתחו מושבות רבות של חיידקים, ובהארה באור UV רק חלק מהן זוהרו.
I. הסבירו את התוצאות שהתלמיד קיבל.
II. מה חשיבותה של צלחת זו למערך הניסוי?

שאלה 10

הסבירו מדוע השפעת אור U.V שונה בהארת הפלסמיד במבחנה (תשובה לשאלה 2) מזו שצפיתם בבדיקת התוצאות?

שאלה 11

הפלסמיד בניסוי כולל את הגן GFP, שמקודד לחלבון זוהר, ומקורו מיצורים ימים זוהרים. הסבירו כיצד יתכן שגן מיצורים ימיים אאוקריוטיים כגון מדוזות ודגים מתבטא בחיידקים פרוקריוטיים.



שאלה 12

- I. בניסוי יצרתם חיידקים עמידים לאנטיביוטיקה מסוג אמפיצילין באמצעות שיטות עבודה של הנדסה גנטית. מה עלולה להיות הסכנה ביצירת חיידקים מהונדסים בבתי הספר?
- II. האם לדעתכם יש להתיר ניסויים בחיידקים מהונדסים גנטית במעבדות בתי הספר? נמקו דעתכם בעזרת טיעון בעד או בעזרת טיעון נגד השימוש בחיידקים מהונדסים בבית ספר.