



הנדסה גנטית בחיידקים: טרנספורמציה של חיידקים באמצעות פלסמיד

בסל הקרח שלפניך 3 מבחנות:

תכולת המבחנה	סימון המבחנה
-	0
DNA פלסמידי	+
חיידקים המסוגלים לקלוט DNA	C

בדוק שהנוזל במבחנה C הפשיר. במידה ולא, הוצא את המבחנה מסל הקרח לזמן קצר, ככל האפשר, ומיד החזר לקרח.

שלב א: ערבוב החיידקים עם ה-DNA הפלסמידי:

1. כוון את הפיפטור של ה-100 מיקרוליטר (סגול/צהוב) ל 60 מיקרוליטר והלבש טיפ.
2. הוסף למבחנה + 60 מיקרוליטר חיידקים ממבחנה C.
3. הוסף למבחנה 0 60 מיקרוליטר חיידקים ממבחנה C.
4. ערבב את שתי המבחנות בעדינות ע"י תיפוף באצבע. היזהר מיצירת בועות או פיזור התערובת על גבי דפנות המבחנות.
5. שים את המבחנות במעמד "סירה" עגול והדגר את המבחנות בקרח במשך 20 דקות.

שלב ב: החזרת ה-DNA לחיידקים

6. קרב את סל הקרח עם המבחנות אל אמבט 42°C . הכנס את הסירה עם המבחנות לאמבט למשך 90 שניות בדיוק (=שוק חום).
7. העבר מיד את הסירה עם המבחנות לקרח והדגר במשך 60 שניות בדיוק (=שוק קור).

שלב ג: התאוששות החיידקים:

8. כוון את הפיפטור של 1000 מיקרוליטר (כחול) ל- 400 מיקרוליטר והלבש טיפ כחול.
9. הוסף לכל אחת מהמבחנות 400 מיקרוליטר של מצע גידול LB (נמצא במעמד שעל השולחן).
10. ערבב בעדינות רבה ע"י נקישת אצבע בדופן המבחנה.
11. שים את המבחנות בתוך סירה. הנח את הסירה באמבט של 37°C .
12. הדגר במשך 15-30 דקות.

שלב ד': זריעת חיידקים על פלטות מצע מוצק:

- לפניך ארבע צלחות פטרי המכילות מצע גידול מוצק.
- שתי צלחות מתוך הארבע עטופות בנייר כסף. צלחות אלו הן צלחות סלקטיביות המכילות במצע הגידול את החומרים: אמפיצילין ו-X-gal. הסובסטרט (X-gal), שתוצר הפירוק שלו כחול, רגיש לאור ולכן תמיד יש להגן עליו בעזרת נייר כסף.
- שתי הצלחות הנוספות, המשמשות כצלחות ביקורת, ואינן מכילות אמפיצילין ו-X-gal.



סימון הצלחות :

13. סמן את הצלחות המכילות אנטיביוטיקה בתחתיתן :

"DNA – מצע סלקטיבי". "0 – מצע סלקטיבי". הוסף את שמך ותאריך.

14. סמן את צלחות הביקורת בתחתיתן :

"-DNA - מצע ביקורת", "0" – מצע ביקורת". הוסף את שמך ותאריך.

זריעה :

15. כוון את הפיפטור של 100 מיקרוליטר (סגול/צהוב) ל- 100 מיקרוליטר והלבש טיפ.

16. העבר 100 מיקרוליטר של חיידקים מהמבחנה המסומנת כ- 0 לתוך מרכז צלחת "0 – מצע ביקורת".

17. העבר 100 מיקרוליטר מאותה מבחנה לצלחת "0 – מצע סלקטיבי" וזרוק את הטיפ.

18. בעזרת מקל זריעה מרח היטב את החיידקים שזרעת על צלחת "0 – מצע ביקורת". סגור את הצלחת.

19. בעזרת מקל זריעה מרח היטב את החיידקים שזרעת על צלחת "0 – מצע סלקטיבי". סגור את הצלחת.

20. העבר 100 מיקרוליטר של חיידקים מהמבחנה המסומנת כ- + לתוך מרכז צלחת "DNA - מצע ביקורת".

21. העבר 100 מיקרוליטר מאותה מבחנה לצלחת "DNA – מצע סלקטיבי" וזרוק את הטיפ.

22. בעזרת מקל זריעה מרח היטב את החיידקים שזרעת על צלחת "DNA – מצע ביקורת". סגור את הצלחת.

23. בעזרת מקל זריעה מרח היטב את החיידקים שזרעת על צלחת "DNA - מצע סלקטיבי". סגור את הצלחת.

24. הדבק את כל הצלחות יחדיו בעזרת סלטייפ. אל תדביק את הצלחות מסביב.

25. הדגר את הצלחות ב- 37°C למשך 24 שעות וצפה בהופעת מושבות חיידקים.

לאחר 24 שעות תוכל לבדוק לנוכחות מושבות חיידקים ולצבען של המושבות (לבנות או כחולות) ע"ג הפלטות.



הפקת DNA מבננה:

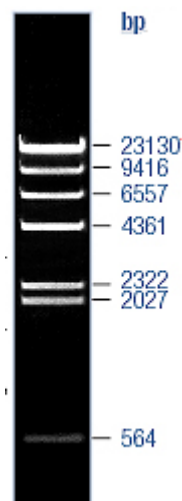
1. קלפו את פרוסת הבננה
2. הכניסו את הבננה הקלופה לתוך צלחת פטרי
3. מעכו היטב את הבננה עם המזלג עד לקבלת מחית חלקה. שימו לב שלא יישארו גושים
4. שפכו 15-20 מ"ל מים מהמבחנה של 50 מ"ל לתוך צלחת הפטרי
5. ערבבו היטב את מחית הבננה והמים עם המזלג. וודאו שהמחית חלקה ואחידה
6. קחו פיפטת פלסטיק נקייה
7. הוסיפו 1 מ"ל **תמיסת מלח** למחית, והמשיכו לערבב
8. זרקו את הפיפטה לפח הביולוגי
9. קחו פיפטת פלסטיק חדשה, נקייה
10. הוסיפו 1 מ"ל **מתמיסת הדטרגנט** למחית וערבבו היטב. שימו לב שלא ליצור קצף
11. המתינו 1-2 דקות, ואז ערבבו שנית. וודאו שהמחית חלקה ואחידה
12. הניחו משפך על המבחנה של 50 מ"ל והניחו את המסננת הדקה מעל המשפך
13. שפכו בעדינות את מחית הבננה מצלחת הפטרי לתוך המסננת
14. תנו לנוזל לטפטף דרך המסננת אל תוך המבחנה. ניתן לטלטל קלות את המסננת ע"מ להעביר את הנוזל
15. לאחר שבמבחנה נאספו 10-12 מ"ל של נוזל, הניחו את המשפך והמסננת בתוך צלחת הפטרי
16. על השולחן תמצאו מבחנה ובה האלכהול- איזופרופנול קר. העבירו את האלכהול למבחנה ע"י מזיגתו **לאט על דופן המבחנה, תוך הטיית המבחנה**. האלכהול ייצור שכבה מעל לשכבת הנוזל התחתונה. **אל תערבבו** את שתי השכבות! הדני"א יצטבר בגבול שבין שתי השכבות.
17. המתינו עוד 1-2 דקות וצפו בדני"א היוצא מהשכבה התחתונה אל השכבה העליונה.
18. לאחר כ-10 דקות, ואחרי שראיתם את הדני"א, אתם יכולים לנסות להפיק יותר דני"א על ידי העלאת השכבה התחתונה אל תוך השכבה העליונה בעזרת קיסם. תוכלו גם לנסות להוציא את הדני"א מהמבחנה ע"י ליפופו על גבי הקיסם ומשיכתו החוצה.



גיל אלקטרופורזה

אנחנו נריץ דגימה של פלסמיד מעגלי ושל פלסמיד חתוך פעם אחת באנזים הגבלה.
אין לגעת בגיל בידיים חשופות - הגיל מכיל חומר מסרטן!!

1. פתיחת הגיל: בעזרת המדריך פתח את עטיפת הגיל היבש והנח אותו במתקן הגילים.
צד ימין של הקסטה נכנס ראשון. יש לפתוח את עטיפת הגיל סמוך ככל האפשר לזמן ההטענה - למניעת ייבוש.
2. העמסת הדגימות: הוצא את המסרק והעמס את שתי הדגימות שלך. אל תשכח להחליף טיפ בין דוגמא לדוגמא. רשום לעצמך איזו דגימה העמסת בכל בארית.
3. העמסת דגימות ביקורת: העמס את סמן הגודל.
4. אתחול הרצת הגיל: להתחלת הריצה, לחץ לחיצה קצרה על הכפתור. אור ירוק קבוע יעיד על הפעלה נכונה. תן לגיל לרוץ בין 15 ל- 30 דקות. התבונן בריצת הצבע, אך אל תגע במכשיר.
5. סיום ההרצה: בתום ההרצה, האור הירוק יהפוך לאדום וישמע צפצוף מקוטע.
6. צילום הגיל: המדריך יוציא את הגיל ממתקן ההרצה ויעבירו לשולחן UV. לאחר שנקבל תמונה טובה, יצלם המדריך את הגיל.



סמן הגודל: