



על פטריות, בננות ודינוזאורים - הכרות עם הביולוגיה

המחקר הביולוגי עוסק ברמות ארגון שונות של עולם החי – ממחקר מולקולרי של חומרים ותהליכים הקיימים בגוף החי ועד מחקר אקולוגי הבודק את השפעתו של היצור החי על סביבתו. מטרת המעבדה לתת "מבט על" על רמות הארגון השונות בביולוגיה- להדגים אותן ולהראות את הקשר ביניהם.

חלק ראשון - פעילויות ברמת המולקולה וברמת הביוספרה: נפתח במבט אקולוגי קצר. בחלק זה נפיק אנזימים מפטריות ונבדוק את פעילותו, תוך מתן דגש לחשיבותו של אנזימים זה במחזור חומרים בביוספרה - האנזימים מאפשר פירוק ומחזור הפחמן "האגור" בתאית (צלולוז). בהמשך נבצע הפקה של DNA מבננה.

חלק שני- פעילות ברמת האיבר, האורגניזם והחברה:

נתחיל מדיון קצר בנושא רמות ארגון בביולוגיה; ברמת האורגניזם – נכיר את הנחש. ברמת האיבר וברמת החברה – נעסוק ביחסי גומלין בין אורגניזמים שונים תוך מתן דגש למבנה הלסת והשיניים בבעלי חיים שונים וכיצד הם מעידים על יחסי הגומלין שלהם עם אורגניזמים אחרים.

כיתות המעוניינות בחקר: ניתן להגיע לפעילות חקר בנושא האנזימים המופק מפטריות.

רמת המולקולה: הפקת אנזימים מפרקי צלולוז מפטריות

לפניכם על השולחן:

1. פיטריות
 2. מבחנה עם **בופר מיצוי**
 3. מבחנה עם **בופר סיום תגובה**
 4. מבחנה עם **סובסטרט**
1. רשמו את סוג/מין הפטרייה איתה אתם עובדים _____
 2. הסירו בעדינות את "הרגל" של הפטרייה אם אתם משתמשים בפטריית שמפניון או שי-טאקי; אם אתם משתמשים בפטרייה עם "רגל" רכה, אין צורך להוריד את "הרגל".
 3. באמצעות הסכין, חתכו את הפטרייה לשניים.
- הכנת מיצוי פטרייה:**
4. חתכו מתוך החלק השרני של הפטרייה. מפטריית שמפניון- חיתכו פטרייה אחת גדולה; שי-טאקי- שתי פטריות. שימו לב להימנע מלחתוך את ה"דפים" בתחתית הפטרייה.
 5. שיקלו את כמות החומר שחתכתם מהפטרייה _____ אתם זקוקים ל 1-2 גרם. אם יש לכם משקל קטן מ 1 גרם- התייעצו עם המדריכים.
 6. הכניסו את חלקי הפטרייה למכתש
 7. סמנו פיפסת פלסטיק נקייה של 3 מ"ל: **בופר מיצוי**
 8. **עבור כל גרם** של פטרייה הוסיפו 2 מ"ל **בופר מיצוי** (אם שקלתם 2 גרם הוסיפו 4 מ"ל בופר מיצוי וכו'). היזהרו שהבופר לא יקציף
 9. כתשו היטב את הפטרייה באמצעות העלי.



10. הניחו גזה במשפך, וסננו את כתש הפטרייה והנוזל הנמצאים במכתש דרך הגזה לתוך המבחנה. **סחטו** היטב את הגזה מעל המבחנה.
11. הניחו גזה נקיה במשפך וסננו את הנוזל פעם נוספת למבחנה נקייה
12. בעזרת פיפטה נקייה, העבירו את הנוזל שסונן לתוך 1-2 מבחנות אפנדורף. שימו לב להכניס נפח זהה לשתי המבחנות.
13. סרכזו את הנוזל במהירות של 13500 סל"ד למשך 5 דקות.
14. בזמן הסרכוז, כתבו על מבחנת אפנדורף נקייה "**מיצוי פטרייה**".
15. בתום הסרכוז, העבירו את הנוזל הצלול, **ללא חלקיקי פטרייה** למבחנת האפנדורף שסימנתם "**מיצוי הפטרייה**".

הכנת מבחנות הניסוי : (שימו לב להחליף פיפטות/טיפים כנדרש)

1. מספרו 5 מבחנות זכוכית קטנות באותיות A,B,C,D,E
2. באמצעות פיפטה המסומנת **בופר מיצוי** העבירו רק למבחנה E 1.8 מ"ל של **בופר מיצוי**.
3. זרקו את הפיפטה לפח הביולוגי
4. כווננו פיפטור של 200 מיקרוליטר ל $200 \mu\text{l}$.
5. הלבישו טיפ לבן.
6. הכניסו רק למבחנה E $200 \mu\text{l}$ של **מיצוי פטרייה**. זרקו הטיפ.
7. ערבבו את מבחנה E היטב באמצעות הוורטקס.
8. סמנו פיפטת פלסטיק נקייה של 3 מ"ל : **בופר סיום תגובה**
9. העבירו 2 מ"ל **בופר סיום תגובה** למבחנה E. ערבבו היטב על הוורטקס.
10. כסו את מבחנה E בפארפילם, והשאירו אותה על מעמד המבחנות עד לסיום הניסוי.
11. העבירו באמצעות אותה פיפטה 2 מ"ל **בופר סיום תגובה** לכל אחת משאר המבחנות : מבחנה A, מבחנה B, מבחנה C ומבחנה D.
12. זרקו את הפיפטה לפח הביולוגי.

בסעיפים הבאים נבצע את התגובה האנזימטית:

13. כווננו את הסטופר ל 8 דקות.
14. סמנו פיפטת פלסטיק נקייה של 3 מ"ל "**תערובת התגובה**". הפיפטה תשמש אתכם עד סוף הניסוי.
15. כווננו את הפיפטור של 1000 מיקרוליטר ל $850 \mu\text{l}$.
16. הלבישו טיפ כחול.
- מכאן יהיה עליכם לעבוד במהירות- קראו את סעיפים 17-25 לפני תחילת העבודה, ושימו לב שאתם נ.מבינים מה עליכם לעשות:**
17. פתחו את מבחנת הפלסטיק של 15 מ"ל (מבחנה עם פקק כתום) המסומנת "**סובסטרט**".
18. הוסיפו למבחנה $850 \mu\text{l}$ של "**מיצוי פטרייה**". זרקו את הטיפ.
19. ערבבו היטב בוורטקס.



בשלב זה המבחנה שסומנה כ**סוטבסטרט** מכילה את **תערובת התגובה** האנזימטית, ונתייחס אליה כ"**תערובת התגובה**"

20. הפעילו את הסטופר.
21. הוציאו **מינז** "**תערובת התגובה**" 2 מ"ל באמצעות פיפטת הפלסטיק שסימנתם "תערובת התגובה" והעבירו למבחנת הזכוכית המסומנת A.
22. ערבבו את מבחנה A היטב בוורטקס. זו דגימת "זמן אפס".
23. לאחר דקה (השעון יעמוד על 7 דקות) הוציאו בעזרת אותה פיפטה 2 מ"ל מתערובת התגובה למבחנה B **וערבבו היטב בוורטקס**.
24. לאחר עוד 3 דקות (השעון יעמוד על 4 דקות) הוציאו בעזרת אותה פיפטה 2 מ"ל למבחנה C **וערבבו היטב בוורטקס**.
25. עם צפצוף השעון- לאחר 8 דקות הוציאו בעזרת אותה פיפטה 2 מ"ל למבחנה D **וערבבו היטב בוורטקס**.

קריאת התוצאות וחישוב כמות התוצר:

26. כווננו את הספקטרופוטומטר לאורך גל של 410 ננומטר.
27. אפסו את הספקטרופוטומטר עם מבחנת האיפוס (מבחנה עליה כתוב 0).
28. קראו את עוצמת הצבע בכל המבחנות.

OD 410 nm	זמן הוצאת הדגימה (דקות)	מספר מבחנה
	0	A
	1	B
	4	C
	8	D
	-	E

סיכום התוצאות:

הכניסו את התוצאות לגיליון האקסל.

השוו בין שני סוגי הפטריות איתם עבדתם בכיתה. האם קצב הפעילות בהן זהה?
חשבו את כמות התוצר- כמות p ניטרופנול בכל אחת מהמבחנות בעזרת עקום הכיול.
למה משמשת מבחנה E? ומה חשיבותה?



רמת המולקולה: 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 האלכחול- איזופרופנול קר. העבירו את האלכחול למבחנה ע"י מזיגתו **לאט על דופן המבחנה, תוך הטיית המבחנה**. האלכחול 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.