



אבחון המחלה "לייפת כיסייתית" - Cystic Fibrosis (C.F.) ע"י ריאקצית PCR

וחיתוך באנזים הגבלה:

במהלך מעבדה זו תבצעו ריאקצית PCR על דוגמאות DNA של 4 בני משפחה:

1. אב.
2. אם.
3. ילד חולה C.F.
4. עובר.

מאחר והריאקציה נמשכת כשעה, תתחילו מיד בהעמדת הריאקציה, ובזמן שמכשיר ה-PCR עובד תעסקו ברקע הביולוגי של המעבדה בדרך מתוקשבת.

כלי עבודה:

הכוח שבטכנולוגיית ה-PCR טמון ביכולתה ליצור מיליארדי עותקים של מקטע DNA בודד. אולם יכולת זו היא גם חולשה, שכן כל מולקולת DNA זרה שתחדור למבחנת הריאקציה ותתאים להיצמדות התחלים (פריימרים) עלולה להיות מוכפלת פי מיליארד ולתת תוצר שאיננו ספציפי למרכיבי הריאקציה המקוריים. תוצאה שכזו תגרום לטעות בנייתוח התוצאות. מולקולת DNA זרה שכזו יכולה להגיע משאריות DNA שנמצאות על הידיים, מכניסה של חיידיקים למבחנת הניסוי, וכדומה.

לאור כל זאת חשוב להקפיד במהלך המעבדה על הכללים הבאים:

1. הקפד לעבוד בצורה מסודרת ונקיה.
2. יש ללבוש כפפות ולהמנע מנגיעה בגוף בכל זמן העבודה.
3. יש לעבוד עם כלים סטריליים.
4. יש להכין מבחנת בקרה, בה יהיו כל מרכיבי ריאקצית ה-PCR מלבד DNA. במבחנה זו לא אמור להתקבל תוצר. אם יתקבל תוצר במבחנה זו, לא ניתן יהיה להסיק דבר מן התוצרים שבמבחנות האחרות.

מרכיבי ריאקציית ה-PCR:

1. דוגמת ה-DNA
A – דוגמת ה-DNA שנתרמה על ידי האב.
B – דוגמת ה-DNA שנתרמה על ידי האם.
C – דוגמת ה-DNA שנתרמה על ידי הילד החולה.
D – דוגמת ה-DNA שנלקחה מהעובר.
 1. תערובת ריאקציה המכילה את האנזים המתעתק - Taq DNA polymerase; $MgCl_2$; dNTPs, צבע ובופר. (מבחנה המסומנת - MIX)
 2. מים (מבחנה המסומנת - H_2O)
 3. תחל (פריימר) 1 + תחל (פריימר) 2 (מבחנה המסומנת - P1/P2)
- שימו לב שכל מרכיבי הריאקציה, מלבד דוגמת ה-DNA, זהים בכל הבדיקות. כדי לעבוד בצורה יעילה ומדויקת תכינו תערובת MIX מלאה המכילה את כל המרכיבים (ללא ה-DNA) ואותה תחלקו למבחנות השונות.



מהלך העבודה:

במעמד המבחנות שבקרח תמצא 5 מבחנות המכילות דוגמאות DNA שונות, כמפורט להלן:

- A – אב
- B – אם
- C – ילד חולה
- D – עובר
- E – מים (=ביקורת, ללא דנ"א)

הכנת תערובת הריאקציה המלאה:

שים לב! הקפד להכניס את החומרים על פי הסדר הרשום למטה, להשתמש בטיפים בעלי פילטר המתאימים לפיפטור בו אתה משתמש, ולהחליף טיפ לאחר הוספת כל אחת מהתמיסות.

1. כוון פיפטור של 100 מיקרוליטר ל-48 מיקרוליטר והלבש טיפ נקי מתאים לפיפטור של 200.
2. הוסף למבחנת MIX $48 \mu\text{m}$ מים - H_2O .
3. כוון פיפטור של 20 מיקרוליטר ל-6 μm והלבש טיפ חדש מתאים לפיפטור של 20.
4. הוסף למבחנת MIX $6 \mu\text{m}$ מתחל (פריימר) 1 ($\text{P1} =$).
5. החלף טיפ.
6. הוסף למבחנת MIX $6 \mu\text{m}$ מתחל (פריימר) 2 ($\text{P2} =$).
7. סגור את המבחנה וערבב אותה היטב ע"י נקישה באצבעך על דופן המבחנה.

הכנת מבחנות הריאקציה:

- הקפד לעבוד מהר, מדויק ובלי להוציא לזמן ארוך את המבחנות מהקרח.
8. כוון פיפטור של 200 מיקרוליטר ל-25 מיקרוליטר והלבש טיפ.
 9. הוסף לכל אחת מהמבחנות A, B, C, D ו-E, $25 \mu\text{m}$ מהתערובת במבחנת MIX. שימו לב להחליף טיפ לכל דוגמא!
 10. סרכז את המבחנות סרכז קצר במהירות 13500 rpm

ביצוע ריאקציה ה-PCR:

11. הכנס את המבחנות (בעזרת המדריך) למכשיר ה-PCR. (זכור את צבע המבחנות של קבוצתך!)



ייחודו של מכשיר ה-PCR הוא ביכולת שלו לחמם ולקרר את המבחנות הנמצאות בתוכו בצורה אוטומטית ובמהירות רבה.

המדריך יתכנת את המכשיר לתנאים הבאים:

שלב ראשון – היפרדות הגדילים – דקה בטמפרטורה של 94°C .

שלב שני – היצמדות התחלים (פריימרים) – דקה בטמפרטורה של 55°C .

שלב שלישי – בניית הגדיל המשלים – דקה בטמפרטורה של 72°C .

המכשיר חוזר על שלושה שלבים אלו 30 פעמים.

לאחר מכן תשהה הריאקציה עשר דקות נוספות בטמפרטורה של 72°C , על מנת לאפשר לאנזים להשלים את שכפול מקטע ה-DNA המבוקש.

בסיום הריאקציה המכשיר יקרר את המבחנות לטמפרטורה של 7°C . המכשיר ישמור על טמפרטורה זו עד אשר נסגור את המכשיר ונוציא את המבחנות. (כך נשמר תוצר ה-DNA).

בזמן פעולת המכשיר בצע את הפעילות המתוקשבת העוסקת ברקע הביולוגי של המעבדה.

12. בסיום עבודת המכשיר הוצא את מבחנות הניסוי בעזרת המדריך, והנח אותן במעמד.

חיתוך תוצרי ה-PCR:

13. סמן 4 מבחנות אפנדורף כך: **A1, B1, C1, D1**.

14. כוון פיפטור של 20 מיקרוליטר ל- $8\ \mu\text{l}$ והלבש טיפ.

15. הוסף למבחנה A1 $8\ \mu\text{l}$ של תוצר DNA ממבחנה A. **החלף טיפ!**

16. הוסף למבחנה B1 $8\ \mu\text{l}$ של תוצר DNA ממבחנה B. **החלף טיפ!**

17. הוסף למבחנה C1 $8\ \mu\text{l}$ של תוצר DNA ממבחנה C. **החלף טיפ!**

18. הוסף למבחנה D1 $8\ \mu\text{l}$ של תוצר DNA ממבחנה D.

19. כוון פיפטור של 20 מיקרוליטר ל- 16 מיקרוליטר והלבש טיפ חדש.

20. הוסף לכל אחת מהמבחנות A1, B1, C1, ו-D1 $16\ \mu\text{l}$ מים.

21. כוון פיפטור של 20 מיקרוליטר ל-3 מיקרוליטר והלבש טיפ חדש.

22. הוסף לכל אחת מהמבחנות A1, B1, C1, ו-D1 3 מיקרוליטר של בופר חיתוך (cut buf). שימו לב להחליף

טיפ לכל דוגמא!

23. בקש מהמדריך להוסיף 3 מיקרוליטר של אנזים הגבלה לכל אחת ממבחנות A1-D1.

24. **סרכז** את המבחנות סרכז קצר במהירות $13500\ \text{rpm}$

25. העבר את המבחנות להדגרה באמבט של 37°C למשך חצי שעה לפחות.



בזמן ההדגרה המשך בפעילות המתקשבת.

הרצת הדוגמאות בג'ל אלקטופורזה:

אין לגעת בג'ל בידיים חשופות - הג'ל מכיל חומר מסרטן!!

פתיחת הג'ל:

המדריך יפתח את עטיפת הג'ל היבש ויניח אותו במתקן הג'לים. צד ימין של הקסטה נכנס ראשון. יש לפתוח את עטיפת הג'ל סמוך ככל האפשר לזמן ההטענה - למניעת ייבוש.

ביצוע prerun :

□ בצע prerun (לקסטה עם מסרק בפנים) על ידי לחיצה ממושכת על הלחצן (שתי שניות).

צפצוף קצר ואור ירוק מהבהב יאשרו הפעלה תקינה.

□ כעבור שתי דקות האור יהפוך לאדום מהבהב וישמע צפצוף מקוטע. יש ללחוץ על הלחצן, עד להופעת אור אדום קבוע.

העמסת סמן גודל:

המדריך יוציא את המסרק ויעמיס את סמן הגודל.

העמסת הדגימות:

העמס 20 מיקרוליטר מכל אחת מ-5 הדגימות של קבוצתך: מבחנות A1-D1 ומבחנה E. אל תשכח להחליף טיפ בין דוגמא לדוגמא. רשום לעצמך איזו דגימה העמסת בכל בארית.

אתחול הרצת הג'ל:

להתחלת הריצה, לחץ לחיצה קצרה על הכפתור. אור ירוק קבוע יעיד על הפעלה נכונה. תן לג'ל לרוץ בין 15 ל-30 דקות. התבונן בריצת הצבע, אך אל תגע במכשיר.

סיום ההרצה: בתום ההרצה, האור הירוק יהפוך לאדום וישמע צפצוף מקוטע.

צילום הג'ל: המדריך יוציא את הג'ל ממתקן ההרצה ויעבירו לשולחן UV להסתכלות ולצילום.