

כל הזכויות שמורות לד"ר לנה משניק-אין להעתיק או להשתמש בחוברת זו ללא אישור.
תודה מיוחדת ליובל כהן ולמעבדה של ד"ר שירה אדר על עזרה בפיתוח וקידום הפרויקט.

יישומים בביוטכנולוגיה-חוברת לתלמיד

נושא פרויקט המחקר:

השפעת פוטוליאז על תיקון נזקי DNA
הנגרמים מחשיפה לקרינת UV

טיוטא-29.10.24

חוברת זו אינה סופית ויתכנו שינויים בהמשך

שמות תלמידי צוות החקר:

1. _____
2. _____
3. _____

תאריך:

תוכן עיניינים:

4.....	הוראות בטיחות.....
5.....	מבוא.....
5.....	קרינת UV.....
6.....	קרינת UVA.....
7.....	קרינת UVB.....
8.....	קרינת UVC.....
8.....	נזקי הקרינה ב-DNA.....
10.....	מנגנוני תיקון של ה-DNA.....
10.....	מנגנון ה- Nucleotide excision repair (NER).....
11.....	קסרודרמה פיגמנטוזום (Xeroderma Pigmentosum, XP).....
11.....	שורות התאים בניסוי.....
12.....	פוטוליאז.....
13.....	רציונל הניסוי.....
14.....	דף עזר לתלמיד.....
16.....	מפגש 1: ניסוי מקדים וניסוי חקר.....
	ניסוי 1 מקדים: הכרת המערכת הניסויית באמצעות התבוננות בתרביות תאים
16.....	במיקרוסקופ.....
21.....	ניסוי 2 מקדים: צביעת תאים בטרופן בלו.....
23.....	ניסוי 3 מקדים: הכנת תרבית תאים להקרנה ב-UV.....
25.....	ניסוי חקר 1-השריית נזק UV-C והפקת דנ"א.....
27.....	חלק 1: בדיקת השפעת מינון ה-UV על כמות נזקי הדנ"א הנוצרים.....
28.....	חלק 2: בדיקת השפעת אור כחול על פעילות הפוטוליאז.....
30.....	חלק 3: הפקת דנ"א.....
31.....	חלק 4: בדיקת ריכוז דנ"א לאחר ההפקה בנודרופ.....
32.....	מפגש 2: הכנת תספיג דנ"א וביצוע ניסוי מאשר לגן פוטוליאז.....
34.....	חלק 1: הכנת דוגמאות ה-DNA.....
35.....	חלק 2: הכנת הממברנה.....
36.....	חלק 3: בלוקינג ושטיפות הדנ"א שלא נקשר.....
37.....	חלק 4: הדגרה עם נוגדן ראשוני למשך לילה.....
40.....	מפגש 3: פיתוח הממברנה, אנליזת התוצאות ואימות הגן באלקטרופורזה.....

- ניסוי 1: הדגרה עם נוגדן שניוני.....40
- ניסוי 2: פיתוח הממברנה ECL.....40
- ניסוי 3: הדגרת הממברנה עם צבען SYBER gold ופיתוח הממברנה.....41
- חלק 4: הרצת ג'ל באלקטרופורזה של ה-PCR.....43

מאמר שיומני

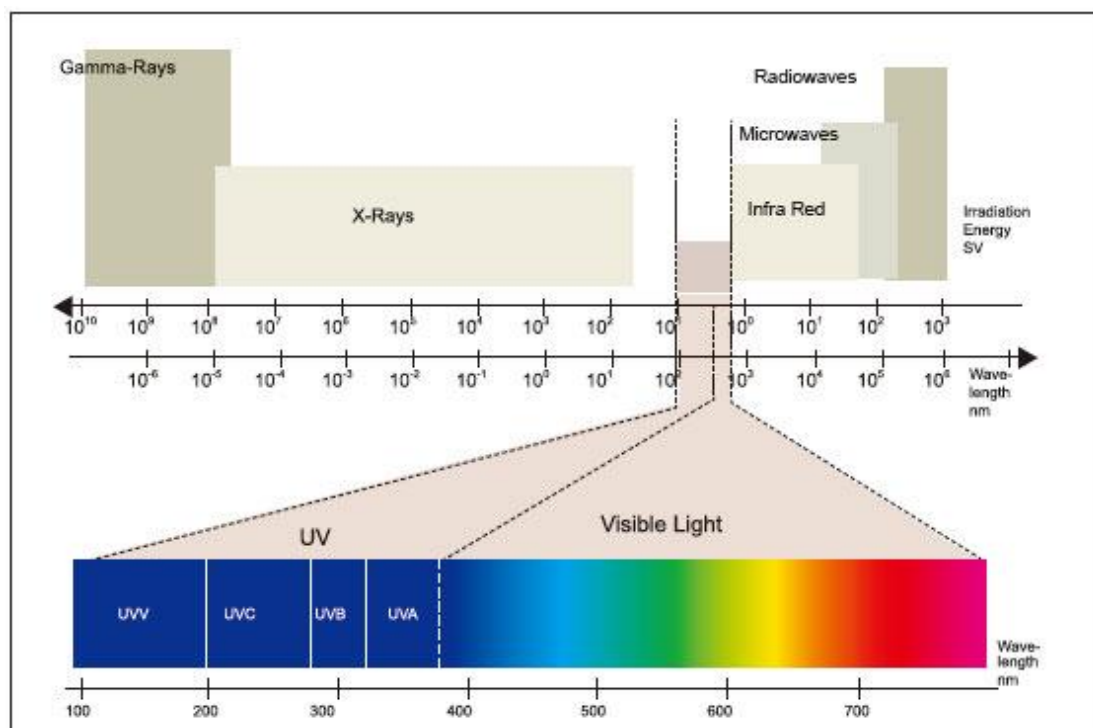
1. אין להיכנס למעבדה ללא הימצאות המורה/המדריך, או להישאר בה לאחר יציאת המורה/המדריך.
2. חובה לעבור ריענון על הוראות הבטיחות לפני תחילת העבודה ע"י המורה/המדריך בתחילת כל שנה.
3. חובה ללבוש בגדים מסודרים, ולנעול נעליים סגורות עם גפה שאינה מרשת או מאריג חדיר לנוזלים.
4. תלמידים עם שיער ארוך נדרשים לאסוף את השיער
5. חובה ללבוש חלוק מגן ארוך עם שרוולים ארוכים. שרוולים רחבים יש להדק סמוך לפרק כף היד.
6. חובה להשתמש במשקפי מגן ולעטות כפפות מגן.
7. אין להשליך מחטים או זכויות לאשפה. יש להשליך למיכל איסוף מיוחד שנועד לכך.
8. אין להשאיר מכשיר/מתקן פועל ללא השגחה, למעט מנדף.
9. אין לתלמיד לגעת ולהשתמש בחומרים ובכלים לפני קבלת הנחיות מהמורה/מדריך.
10. אין לשתות ולאכול במעבדה.
11. אין למזוג נוזלים לתוך כלי מבלי להחזיק את הכלי שאליו מוזגים את הנוזל. מזיגת הנוזל תבוצע **מתחת** לגובה העיניים.
12. אין לגעת בחומרים כימיים בידיים. חובה להשתמש בכלי מתאים, כגון כפית, מרית וכו'.
13. לפני כל שימוש במכשיר-וודא עם המדריך את תקינות המכשיר והפעלתו-אין להפעיל מכשירי מעבדה ללא אישור צוות ההוראה.

מבוא

קרינת UV

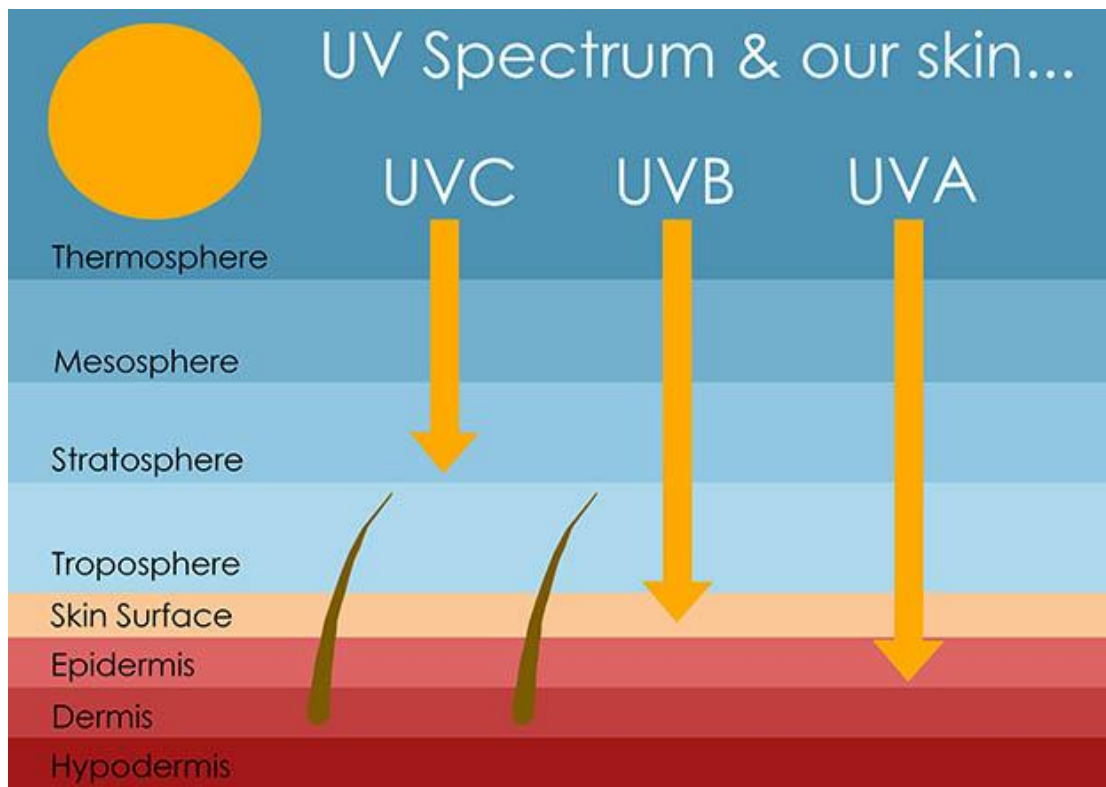
קרינה זוהי אנרגיה הנפלטת מחומר ומתפשטת לסביבה. השמש מספקת לנו אור וחום אך במקביל פולטת קרינה אלקטרומגנטית בטווח רחב. חלק מהקרינה היא קרינה על סגולה-קרינת UV (Ultra Violet). אורך הגל של קרינת UV אינו נקלט בעין האנושית והיא מהווה איום משמעותי על יציבות גנומית, פוגעת ישירות ב-DNA ועלולה להוביל לסרטן העור.

קרינת UV מתחלקת ל-3 סוגים: UVA, UVB ו-UVC, כאשר ההבדלים ביניהם הוא טווח אורכי הגל.



איור 1: קרינת UV כחלק מספקטרום הקרינה האלקטרומגנטי

מקור האיור: <http://www.resinlaminates.com/uv-tubes.asp>



איור 2: סוגי קרינה מהשמש וחדירתן לשכבות העור השונות.

מקור האיור: <https://aktinovolia.com/measurement-ultraviolet-radiations-uva-uvb-uv-c/>

קרינת UVA :

קרינה בעלת אורכי גל הארוכים ביותר, נמצאת בטווח 320 ננומטר עד 400 ננומטר. UVA היא מקור הקרינה העיקרית על פני כדור"א וחודרת לשכבות העור.

חלק מהנזקים הנגרמים מחשיפה ממושכת או חוזרת לקרני UVA כוללים:

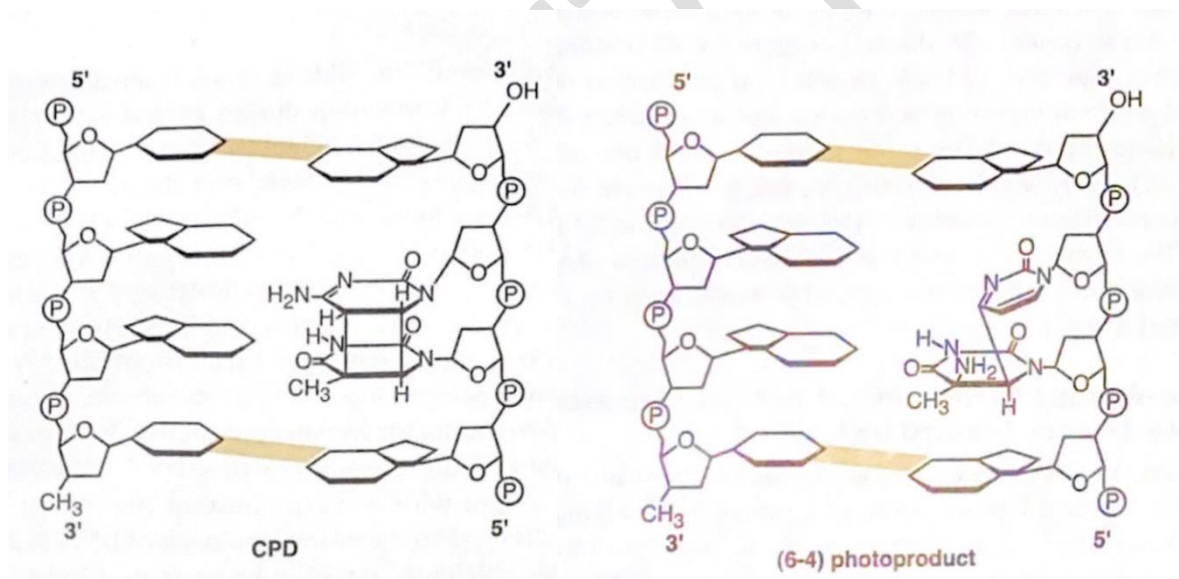
- א. **הזדקנות מוקדמת של העור:** קרני UVA פוגעות בשכבת הקולגן והאלסטין שבעור, מה שגורם לקמטים, קווים דקים, ועור רפוי ומיובש.
- ב. **פיגמנטציה:** חשיפה לקרני UVA יכולה לגרום להופעה של כתמי גיל (למשל, כתמי עור כהים) ולשינויי צבע בעור.
- ג. **סיכון לסרטן עור:** למרות שקרני UVA אינן גורמות לכוויות באותו האופן כמו קרני UVB, הן יכולות להוביל למוטציות בתאי העור, אשר עשויות להעלות את הסיכון לפיתוח סוגי סרטן עור, כולל מלנומה.
- ד. **נזקים לעיניים:** קרני UVA עלולות לפגוע גם בעיניים ולגרום לבעיות כמו קטרקט ודלקת בעין.
- ה. **נזקי DNA:** הן יכולות להוביל ליצירת רדיקלים חופשיים שמזיקים לדנ"א. רדיקל חופשי הוא אטום/מולקולה אשר מכיל מספר אלקטרונים אי זוגי ובכך מייצר אלקטרונים בלתי מזווגים. מצב זה אינו יציב כימית ומשתתף בקלות בתגובות כימיות. כאשר יש רדיקלים חופשיים הם נקשרים לדנ"א ויכולים לגרום לאי קשירה ועצירה של חלבונים שעתוק ובכך משפיעים על מוטגנזה, קרצינוגניות והזדקנות התא.

בהשוואה לשאר סוגי קרינת UV, קרינה זו היא הפחות מזיקה מכל 3 הסוגים.

קרינת UVB :

קרינה עם אורכי גל בטווח של 280 עד 320 ננומטר ובעלת אנרגיה גבוהה יותר מ-UVA. רובה לא מגיעה לכדור"א ונספגת בשכבת האוזון באטמוספירה, אך בכל זאת, הקרניים שמצליחות לחדור מספיקות כדי לעשות נזקים קשים. UVB גורמת לנזק רחב יותר מ-UVA, ובנוסף גורמת גם לכוויות בעור ופגיעות בדנ"א.

קרינת UVB גורמת לנזק ישיר לדנ"א על ידי יצירת דימרים בין שני פירימידינים סמוכים על אותו גדיל הדנ"א, דימר מסוג אחד הינו ציקלובוטאן (CPD) ודימר מסוג שני הוא קשר קוולנטי בין שני בסיסים צמודים בקשר 6-4 (6-4 Photoproduct). הדימרים גורמים לעיוותים מבניים ב DNA ולפגיעות בתהליך השכפול והתעתוק של ה-DNA. פגיעות בתהליך זה מעלות את הסיכון לשינויים גנטיים כמו מוטציות, שיכולות להשפיע על תפקוד התאים ולגרום לבעיות גנטיות שונות, כולל התפתחות סרטן.



איור 3 : תצורתם של שני נזקי הדנ"א העיקריים, שנוצרים כתוצאה מחשיפה לקרינת UV,

בתוצרה דימרים של פירימידינים. שמאל - נזק מסוג CPD. ימין - נזק מסוג 6-4PP.

מקור האיור: Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A. and Ellenberger, T. (2006) DNA Repair and Mutagenesis. Rastogi RP, Richa, Kumar A, Tyagi i

קרינת UVC :

קרינה בעלת אורך גל הקצר ביותר בטווח 10-280 ננומטר, המזיקה והמסוכנת ביותר משלושת סוגי הקרינה אבל כמעט כולה נספגת בשכבת האוזון באטמוספירה ולא עוברת לפני כדור"א. עם זאת, קרני UVC יכולות להיות מסוכנות כאשר הן נובעות ממקורות מלאכותיים, כמו מנורות UV של מכשור רפואי(לחיטוי מים ואוויר, מנורות ניאון או מכונות לחיטוי כלים רפואיים)משדרות קרני UVC שיכולות לגרום נזק אם נחשפים אליהן ישירות.חשיפה לקרני UVC יכולה לגרום לבעיות בריאותיות בדומה לאלו שגורמות קרינות UVA ו-UVB, אך באופן משמעותי יותר. (Kciuk et al., 2020; Tang et al., 2024)

חישוב כמות קרינה הפוגעת באובייקט

כמות הקרינה הפוגעת באובייקט מחושבת ע"י מכפלת זמן החשיפה בעוצמת הקרינה. היא נמדדת ביחידות המקובלות למדידת אנרגיה- ג'אול.

$$\text{Dose (mJ/cm}^2\text{)} = \text{Intensity (mW/cm}^2\text{)} \times \text{Time (s)}$$

Dose הכמות של הקרינה שהאובייקט חשוף לה.

I העוצמה הנמדדת של הקרינה.

Time הזמן שבו האובייקט נחשף לקרינה

(Graham Smith,2022)

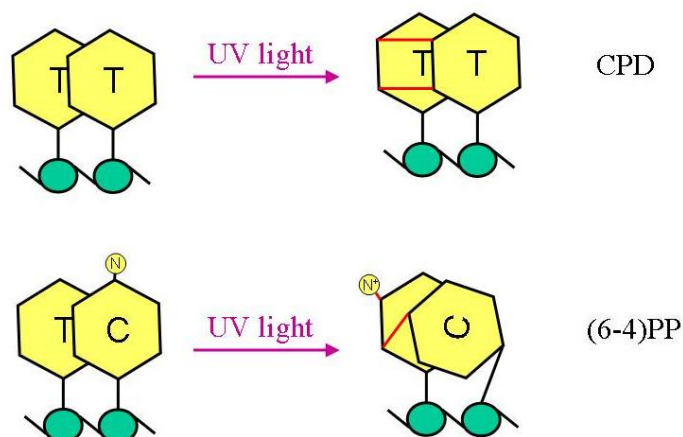
נזקי הקרינה ב-DNA

שני הסוגים הנפוצים ביותר של נזקים ב-DNA המושרים על ידי UV הם:

1. Cyclobuten pyrimidine dimers (CPDs) - נוצרים קשרים קוולנטיים בין בסיסי DNA סמוכים (איור 2 שמאלי).

2. (6-4)PPs pyrimidine pyrimidone photoproducts – נוצר קשר קוולנטי המחבר בין פחמן מספר 6 של פירימידין אחד לפחמן מספר 4 של פירימידין שני (איור 2 ימין). שני הנזקים מתוקנים על ידי מנגנוני הוצאת נוקלאוטידים (NER) בבני אדם.

UV-induced DNA lesions



איור 5: נזקים ב-DNA כתוצאה מקרינת UV.

מקור האיור: <https://www.unige.ch/medecine/nouspikel/methods.html>

נזקי דנ"א מפריעים לתפקוד התאי. מבין נזקי הדנ"א השונים, נזקים נפחיים או בהגדרתם המדויקת יותר, נזקים המעוותים את סליל הדנ"א כמו ה-PP 6-4 אשר מעוות יותר את ה-DNA מאשר CPD, אך שניהם מסוכנים מאוד לתאים היות שתוקעים באופן ישיר רנ"א פולימראזות ודנ"א פולימראזות ומפריעים לתהליך השכפול והתעתוק. (Sinha & Häder, 2002)

יציבות ה-DNA חיונית לחיי התא, הכרומוזומים, הממוקמים בגרעין התא, אמנם מוגנים יחסית, אך הם עדיין חשופים לפגיעות מגורמים חיצוניים כמו קרינה, זיהום אוויר ועישון, וכן לגורמים פנימיים כמו תוצרי לוואי של תהליכי חילוף חומרים.

כיום, אנו יודעים כי בגוף מתרחשות כ-50 אלף פגיעות ב-DNA אשר עלולות לגרום למוטציות, שינויים קרצינוגניים המובילים לסרטן והזדקנות תאית. על מנת להתמודד עם הנזקים האלו, התא פיתח מנגנוני תיקון יחודיים על מנת להתמודד עם נזקים אלו. (Dizdaroglu, 2017)

מנגנוני תיקון של DNA

מגוון הנזקים ל-DNA הינו רחב מאוד, ולכן קיימים מספר מנגנוני תיקון שונים, שכל אחד מהם מתמקד בסוגי נזק ספציפיים. המנגנונים העיקריים הם, base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER), mismatch repair (MMR), homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ). החשיבות של מנגנונים אלו מתבטאת במחלות תורשתיות שבהן פגועים הגנים האחראים על תיקון הדנ"א, מה שמוביל לשכיחות גבוהה של מוטציות ולנטייה מוגברת למחלות סרטן תורשתיות. (Dizdaroglu, 2017)

מנגנון ה-Nucleotide excision repair (NER)

אחד מהמנגנונים האחראים על תיקון נזקי DNA כתוצאה מחשיפה לנזקים סביבתיים כמו קרינת UV, עישון ועוד הינו ה-NER. את ה-NER גילה עזיז סנאגר מאוניברסיטת צפון קרוליינה ובעקבות התגלית קיבל פרס נובל לכימיה. המנגנון אחראי על תיקון והסרה של נזקים בגנום שגורמים לעיוות בסליל הדנ"א.

המנגנון מורכב יותר באאוקריוטים לעומת מנגנון דומה בפרויקריוטים אשר מכיל את האנזים פוטוליאז. באאוקריוטים ישנם 9 חלבונים עיקריים כאשר פגם באחד מהחלבונים יוביל למחלה לדוגמה מוטציה באחד מהחלבונים XPA, XPB, XPC, XPD, XPE, XPF, XPG יוביל למחלת הקסרודמה פיגמנטוזיס xeroderma pigmentosum. מוטציה בחלבונים CSA ו-CSB יוביל לסינדרום הקוקאין.

מנגנון התיקון מתחלק ל-2 מסלולים:

global genomic NER (GG-NER) ו transcription coupled NER (TC-NER). ה-GGNER אינו תלוי בתהליך השעתוק אלא יכול להתרחש בכל אזור בגנום. ה-TCNER מתרחש בגדיל המשועתק בגנים פעילים.

מערכת אנזימתית שונה ב-2 המנגנונים בעלת מספר תתי יחידות מזהה את הנזקים CPD ו 6-4PP, פותחת את גדילי ה-DNA ומסירה מקטע דנ"א חד גדילי קצר אשר מכיל את הנזק. הגדיל המשלים נשאר ומשמש כתבנית לאנזים DNA פולימראז אשר יגיע להשלים את המקטע החסר לקבלת מקטע דנ"א דו גדילי חסר נזק, במנגנון עם סיכוי נמוך מאוד לטעויות (מוטציות). (Dizdaroglu, 2017)

קסרודרמה פיגמנטוזום (Xeroderma Pigmentosum, XP)

מחלה תורשתית רציסבית (נסגנית, יש צורך בקבלת פגם גנטי משני ההורים) הנגרמת כתוצאה מפגם גנטי (מוטציה) באחד הפקטורים במסלול ה-NER. לתאים אין יכולת או שהינם בעלי יכולת ירודה לתקן נזקי DNA כתוצאה מקרינת UV. כתוצאה מכך נזקים ב-DNA אינם מתוקנים כהלכה וכל חשיפה לקרינת UV גורמת לנזקים גנטיים חמורים ולהתפתחות מהירה של גידולים סרטניים. לחולי XP יש סיכוי גבוה פי 1000 לחלות בסרטן העור מאשר לאנשים בריאים. מעבר לגידולים סרטניים, שמרבים להיות סיבת הפטירה, התסמינים העוריים הנפוצים בקסרודרמה פיגמנטוזיס כוללים הזדקנות מוקדמת של העור, הופעת נמשים רבים בגיל צעיר, כתמים כהים על פני העור, כוויות חמורות לאחר חשיפה לשמש, עור יבש מאוד, מחוספס ודק, וכן במקרים מסוימים כלי דם בצורה אופיינית של עכביש. בנוסף, רוב החולים סובלים מרגישות קיצונית של העיניים לאור. (Leung et al., 2022)



איור 6: ילד חולה בקסרודרמה פיגמנטוזיס.

מקור האיור: Xeroderma Pigmentosum Pakistan society on facebook

שורות התאים בניסוי :

א. **XP12RO**: שורת תאים אשר נוצרה מתאים מסוג פיברובלסטים (תאים ברקמת החיבור, המייצרים רכיבים סיביים כמו קולגן ואלסטין ועוד. אשר מספקים תמיכה מבנית לתאים)

שמקורם בחולה XP מסוג A. מקור המחלה בחולה זה נובעת ממוטציה תורשתית בגן המקודד לחלבון XPA, חלבון שבלעדיו לא מתאפשר תיקון באמצעות מסלול ה-NER. כלומר, תאים אלו אינם יכולים לתקן נזקי DNA כתוצאה מחשיפה ל-UV.

היות ותאים אלו אינם סרטניים, לא ניתן לגדל אותם במעבדה לאורך זמן כפי שנדרש לצורכי מחקר לאחר שהפיקו את תאים אלו מהחולה לכן יצרו מהתאים שורת תאים רציפה - קו תאים רציף כמקובל ביצירת תרבויות תאים אינסופיות. ספציפית ביצירת שורת התאים XP12RO החדירו להם גן, שגורם לכך שתאים אלו לא יפסיקו להתחלק (טרנספורמציה), בדומה לתאים סרטניים. מקור גן זה מווירוס SV40.

ב. XP12RO expressing *Potorous tridactylis* CPD photolyase: תאי XP12RO חסרי מנגנון הNER אשר להם הוחדר גן CPD photolyase (*CPDphr*) אשר נלקח מיונק הכיס ירבעון (*P. tridactylis*) ומבטא פוטוליאז המתמחה בתיקון נזקי CPD. הגן הוחדר כ cDNA באמצעות טרנספקציה (הכנסת DNA זר לתא ע"י פלסמיד) ועובר אינטגרציה (שילוב) בגנום.

ג. XP12RO expressing *Arabidopsis thaliana* 6-4PP photolyase: תאי XP12RO חסרי מנגנון הNER אשר להם הוחדר גן 6-4PP photolyase (*6-4PPphr*) אשר נלקח מהצמח תודרנית לבנה (*A. thaliana*) ומבטא פוטוליאז המתמחה בתיקון נזקי 6-4PP. הגן הוחדר כ cDNA באמצעות טרנספקציה ועובר אינטגרציה בגנום. (Nakajima et al., 2004)

פוטוליאז:

אנזים שתפקידו לתקן נזקים שנגרמים לדנ"א כתוצאה מחשיפה לקרני UV (אולטרה-סגול). נמצא בעיקר בצמחים, פטריות וחיידקים, וגם באורגניזמים כמו יונקי כיס מסוימים. הפוטוליאז פועל באמצעות תהליך שנקרא "תיקון פוטואנזימי". הוא עושה שימוש באור כחול (או אור UV באורכים מסוימים) כדי להעביר אנרגיה המשמשת לפירוק הקשרים הקוולנטיים שנוצרו בין זוגות פירימידינים, ולהחזיר את הבסיסים המתקנים ליצירתם התקינה, ובכך לתקן את הנזק שנגרם לדנ"א. התהליך מתרחש תוך כדי שהאנזים קושר את עצמו לדנ"א ומסייע בתיקון הנזק מבלי שיתקבל נזק נוסף בתהליך. אנזימים אלו מאוד ספציפיים לנזק אותו הם מזיהים. כלומר, פוטוליאז שמזהה את הנזק CPD יתקן אותו בלבד מבלי לתקן את הנזק 6-4PP, ולהיפך. (Yamamoto et al., 2017)

רציונל הניסוי:

בפרוייקט אנו נקרין תאים ב-UV מסוג XP12RO אשר להם ישנה מוטציה באחד מהחלבונים במנגנון ה-NER על מנת שלא תהיה להם אפשרות לתקן את הנזק דרך מנגנון ה-NER אך עם גן לפוטוליאז אשר יכול לתקן את הנזק שנוצר בתהליך פוטואנזימטי.

מטרת ניסוי זה היא לחקור את התועלת הפוטנציאלית של פוטוליאזות, אנזימים שאינם מתבטאים באופן טבעי בבני אדם, ככלי ביוטכנולוגי לתיקון DNA ממוקד. על ידי החדרת CPD/6-4PP photolyases לשורות תאים אנושיות החסרות ב-NER, אנו יכולים להעריך את יכולתם לתקן ספציפית נזקי DNA המושרים על ידי UV בחשיפה לאור כחול. חקירה זו לא רק שופכת אור על ההיתכנות של שימוש בפוטוליאזים לתיקון DNA ממוקד, אלא גם מספקת תובנות לגבי יעילותם בהפחתת המוטגנזה הנגרמת על ידי UV. מינוף המאפיינים של פוטוליאזות ככלי ביוטכנולוגי מבטיח יישומים בתיקון DNA ובמניפולציה.

דף עזר לתלמיד:

מחקר מדעי הוא תהליך שיטתי שבו חוקרים אוספים, מנתחים ומפרשים נתונים כדי להבין תופעות טבעיות, לפתור בעיות או לפתח תיאוריות חדשות. זהו תהליך שמבוסס על שיטות מסודרות ומדויקות כדי להבטיח שהתוצאות יהיו מהימנות וניתנות לשחזור.

השלבים העיקריים במחקר מדעי הם:

1. שאלת המחקר: כל מחקר מתחיל בשאלה או בבעיה מסוימת שדורשת הבנה או פתרון. השאלה צריכה להיות ממוקדת וברורה ויופיעו בה הקשרים בין המשתנה התלוי לבלתי תלוי.
2. סקירה ספרותית: שלב זה כולל עיון במקורות קיימים כדי להבין מה כבר נכתב על הנושא, לזהות פערים בידע ולשפר את ניסוח השאלה המחקרית.
3. ניסוי או איסוף נתונים: החוקרים מבצעים ניסויים או אוספים נתונים שקשורים לשאלה המחקרית. זהו שלב שבו נבדקות השערות ומנוסות שיטות שונות להנחות את התהליך.
4. ניתוח נתונים: הנתונים שנאספו מנותחים בעזרת שיטות סטטיסטיות או שיטות אחרות כדי להבין את משמעותם ולהסיק מסקנות.
5. תוצאות ומסקנות: החוקרים מפרסמים את תוצאות הניסוי ומסיקים מסקנות על פי המידע שנאסף. זהו שלב שבו נבדקות השערות ומבינים אם הן התקבלו או לא.
6. פרסום וביקורת עמיתים: התוצאות והמסקנות מפרסמות בכתבי עת מדעיים כדי לאפשר לחוקרים אחרים לבדוק ולהעריך את העבודה. ביקורת עמיתים עוזרת להבטיח את איכות ובקרת התהליך.
7. הרחבה ופיתוח: מחקר מדעי יכול להוביל למחקרים נוספים שיבחנו את הממצאים או יפתחו רעיונות חדשים. זהו תהליך מתמשך שבו הידע המתקבל מקדם את התחום המדעי.

נושא המחקר:

שאלת המחקר הכללית:

שאלת המחקר שלך(השתמש בתבנית "מהי השפעת X על Y") - במידה ויש מספר שאלות מחקר רשום את כולן

מהו מהו המשתנה התלוי - הגורם המושפע בניסוי? במידה וקיימים כמה ניסויים יש לפרט לגבי כל אחד מהם

מהו המשתנה הבלתי תלוי-הגורם המשפיע בניסוי? במידה וקיימים כמה ניסויים יש לפרט לגבי כל אחד מהם

השערת המחקר - מבוססת על ידע מדעי עם ציטוט מקור המידע

האם יש חזרות בניסוי? במידה וכן-כמה חזרות?

מהי חשיבותן ותרומתן של חזרות על מהימנות הניסויים?

מהי/מהן הבקורות בניסויים במחקר?

מהי החשיבות של הבקורות בניסוי מדעי?

הקדמה

פרוייקט חקר זה מחולק ל3 מפגשים.

במפגש הראשון נקיים ניסוי מקדים אשר באמצעותו נלמד את המערכת הניסויית, נלמד לעבוד עם תרבית תאים, נצבע תאים על מנת להבדיל בין תאים חיים למתים ונלמד לפצל תאים כהכנה לניסויים עתידיים.

לאחר מכן נקרין את התאים בקרינת UV-C ואת חלקם נקרין באור כחול על מנת לסייע לאנזים פוטוליאז לתקן את נזקי הקרינה ולבסוף נפיק את הדנ"א.

במפגש השני נבצע dot blot - נקבע את הדנ"א לממברנה ונוסיף נוגדן ראשוני אשר יקשר לנזק. בנוסף נעשה PCR אבחנותי לבדיקת הגן לפוטוליאז.

במפגש השלישי נסיים את dot blot ע"י הוספת הנוגדן השניוני ולאחר מכן נחשוף את הממברנה לצבע syber gold אשר יאפשר לנו לדעת מהי כמות הדנ"א הכללית שהופקה. בנוסף נבצע אלקטרופורזה להרצת הPCR.

מפגש 1: ניסוי מקדים וניסוי חקר

ניסוי מקדים- היכרות עם שיטות עבודה בתרביות תאים

מטרות המעבדה:

1. הכרת המערכת הניסויית באמצעות התבוננות בתרביות תאים במיקרוסקופ אור הפוך
2. צביעת תאים מבדלת בטריפן בלו.
3. פיצול תאים עבור הקרנת התאים בUV

ניסוי 1 מקדים: הכרת המערכת הניסויית באמצעות התבוננות בתרביות תאים

במיקרוסקופ

תרביות תאים הן שיטה בביולוגיה המאפשרת בידוד והתרבות של תאים במעבדה בתנאים מבוקרים, מה שמאפשר לחוקרים ללמוד על תפקודם, לבצע ניסויים על השפעת חומרים שונים ולפתח טיפולים רפואיים. באמצעות תרביות תאים ניתן לחקור את ההתנהגות הביולוגית של תאים, לפתח תרופות חדשות ולבצע שינויים גנטיים בתאים לצורך מחקר ויישומים רפואיים.

כאשר אנו עובדים עם תאים שים לב כי:

1. העבודה הינה סטרילית ולכן נוכל לפתוח את הצלחות רק במנדף.
2. פתיחת הצלחות תעשה באופן מבוקר עם המדריך ורק לזמן מוגבל לצורך החלפת מדיה/הוספת מדיה.
3. שים לב שהתרבית תמיד עם נוזל. ללא מדיה, לאחר מספר דק' התאים יתייבשו ויכולים למות

חומרים וכלים עיקריים בניסוי:

א.המנדף הביולוגי-

עבודה עם תרביות תאים דורשת תנאים סטריליים, סביבה חציונית מתאימה ותנאים פיזיקליים מדויקים כדי לשמור על בריאות התאים ולמנוע זיהומים. המנדף מסוג type2 מנדף המיועד לגידול תאים וכולל מערכת סינון HEPA. מערכת הסינון מאפשרת הזרמת אוויר סטרילי מחידקים ומזהמים אחרים.

ב.מיקרוסקופ אור הפוך-

במיקרוסקופ אור הפוך, מקור האור ממוקם מעל הדגימה, והאור עובר דרך הדגימה לפני שהוא מגיע לעינית או למערכת התצוגה. בניגוד למיקרוסקופים רגילים, שבהם האור מגיע מתחת לדגימה. כאשר אור פוגע בדגימה, חלק מהאור מוחזר או מנותב חזרה, והחלק הנותר עובר דרך הדגימה. המיקרוסקופ מקטין ומגדיל את האור המוחזר לצורך תצפית. כמו במיקרוסקופים אחרים, מיקרוסקופ אור הפוך כולל עדשות אובייקטיב ועינית שמביאות לתמונה ברורה ומוגדלת של הדגימה. מיקרוסקופים הפוכים מתאימים לצפייה בתאים חיים או אורגניזמים בתחתית מיכלים גדולים, כמו בקבוקי תרבות תאים, ובכך מאפשרים תנאים טבעיים יותר מאשר במיקרוסקופ רגיל



איור 7: מיקרוסקופ אור הפוך

מקור האיור: <https://www.innovabiomed.com/inverted-microscope.html>

איך נסתכל במיקרוסקופ?

1. הדליקו את המיקרוסקופ כך שתראו אור המוקרן מלמעלה
2. הניחו את צלחת תרבית התאים מעל הזכוכית העגולה קח שהאור יקרין על הצלחת
3. כווננו את העיניות כך שניתן לראות עם שתי העיניים עיגול אחיד
4. העבירו להגדלה 10X
5. כווננו עם הפוקוס הגס עד שתראו את תרבית התאים
6. כווננו עם הפוקוס העדין עד שתראו את התאים באופן ברור
- ג. תרבית תאים בפלטה/צלחת פטרי-עליה תתבצע התצפית מהלך ניסוי:

כל קבוצה תקבל תרבית תאים בפלטה לגידול תאים עם 6 באריות תאים.



איור 8: פלטת באריות לגידול תאים

מקור האיור: www.romical.com

כל שלשת באריות יכילו cell line שונה.

הערה ללבורנט/ית:

לזרוע תאים שיהיו בקונפלואנטיות נורמלית אבל גם לתת להם לבדוק צלחת שלא פוצלה ויש בה יותר מדי תאים, יהיו יותר תאים מתים וגם הצבע של המדיה יהיה כתום/צהוב יותר.

סוג התאים שאני אעבוד איתם :

_____1.

_____2.

בכל בארית יש לשים לב לפרמטרים הבאים:

1. מורפולוגיית התא – כאשר תאים נצמדים למצע (במקרה זה לצלחת הגידול) הם אינם כדוריים (בניגוד לתאים הגדלים בתרחיף, כמו תאי הדם השונים). התאים שטוחים וגדלים בשכבה אחת כאשר הם נצמדים אחד לשני. התאים בשורת התאים שבניסוי זה, בתנאי צפיפות אופטימליים, לא יוצרים צברים תלת ממדיים.

ניתן לראות מעין הילה (כתוצאה מהתאורה במיקרוסקופ) מסביב לכל תא שמאפשרת לראות את קו המתאר של הממברנה. בתוך כל תא ניתן להבחין גם בגרעין התא ובמיקרוסקופים מסוימים אף לראות עיגולים שחורים שהינם אזורים הטרוכרומטיניים (אזורים בהם הכרומטין ארוז בצפיפות רבה).

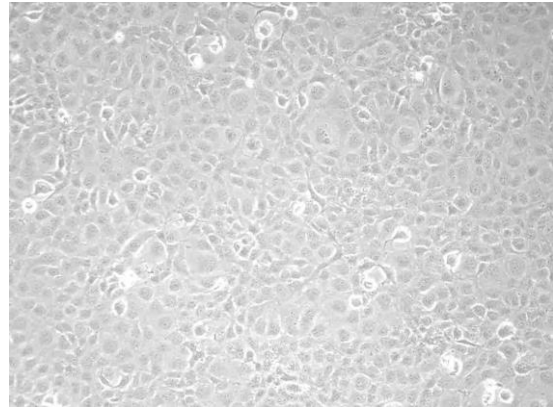
עם זאת, כן ניתן להבחין בתאים כדוריים בתרבית זו, וישנן שתי אפשרויות לזהות תאים אלו. כאשר תאים נכנסים לשלב החלוקה הם הפוכים כדוריים. אפשרות אחרת היא שמדובר בתאים מתים, שכן לאחר המוות התאים תאים אלו מתנתקים מהמצע. ניתן להבדיל ביניהם ע"י הזזת הצלחת בעדינות רבה, תאים מתים יצופו וינועו עם הנוזל ואילו תאים בחלוקה יישארו במקומם.

2. מדיית גידול – צבעה אדום-ורוד היות שאחד המרכיבים בה הוא אינדיקטור pH פנול-רד. מטרתו לאפשר מעקב אחר שינויים בpH של המדיה. לאורך גידולם, התאים צורכים נוטריינטים מהמדיה ומפרישים מטבוליטים אל המדיה. אלו יחד משפיעים על pH, במצב זה ניתן לראות שצבע המדיה משתנה בהדרגתיות לכתום ואף לצהוב. שימו לב שצבע המדיה המהווה אינדיקציה הוא כאשר התאים נמצאים באינקובטור בטמפ' הגידול האידיאלית. טמפרטורה משפיעה גם היא על pH ולכן אם תהיה קרה מדי (לאחר הוצאת הצלחת מהאינקובטור) היא תשנה את צבעה בחזרה לאדום-ורוד.

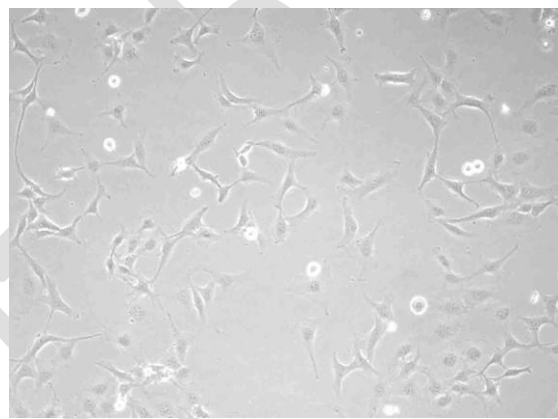
3. צפיפות התאים - התאים צריכים לכסות כ-70-80% משטח הגידול שלהם, ז"א מרבית הצלחת תכוסה בתאים אך עם מעט רווחים ביניהם (לא מרווח מדי). תאים חשים את הצפיפות וצפיפות גבוהה מהווה סטרס עבורם שיגרום לשינוי בתהליכים מטבוליים ואף לעצירת חלוקה. בנוסף, בתאים מסוימים צפיפות גבוהה תוביל ליצירת צברים ולכן טיפול בהם (הקרנתם בUV, למשל) בשלב זה תוביל להקרנה לא שווה בין כל התאים. תאים בצפיפות נמוכה מדי גם כן תורגש ע"י התאים ועלולה להוביל למוות שלהם, שכן התאים מפרישים פקטורים מסוימים למדיה שמגיעים לתאים האחרים ומעודדים גדילה וחלוקה.

תמונות תאים אשר צולמו ע"י יובל כהן במיקרוסקופ אור הפוך בהגדלה 10X

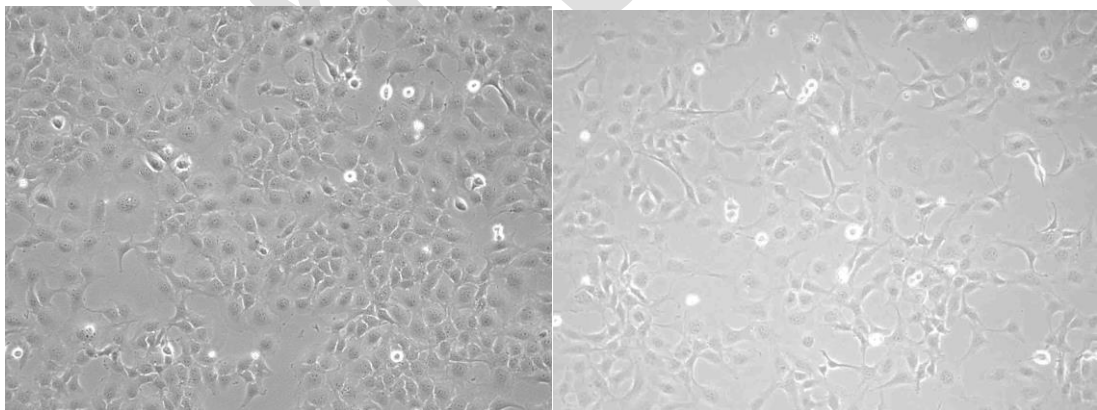
תאים בצפיפות גבוהה :



תאים בצפיפות נמוכה:



תאים בצפיפות תקינה:



איור 9: צילום תאים במיקרוסקופ בצפיפויות שונות, צולמו ע"י יובל כהן.

מה ראיתם בדגימה שלכם:

תיאור	פרמטר לבדיקה
	מורפולוגיית התא

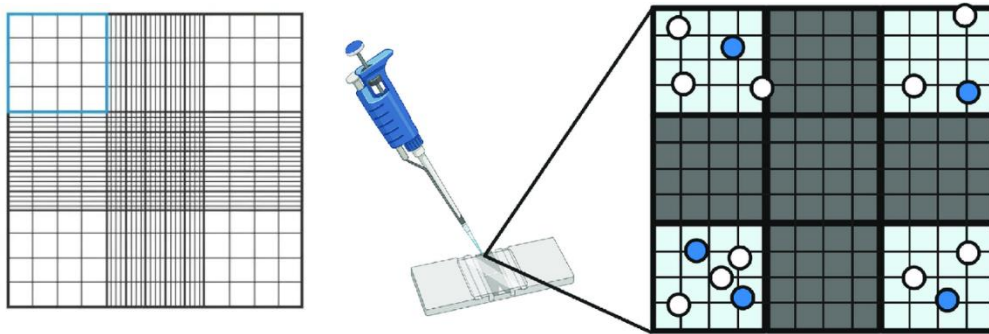
	מדיה
	צפיפות התאים על פני הצלחת

ניסוי 2 מקדים: צביעת תאים בטריפן בלו

חומרים וציוד עיקרי-

1. פיפטור חשמלי להעלאת נפחים מדויקים ופיפטות חד פעמיות- באמצעותם נעלה את המדיה ונוסיף חומרים לצלחות גידול
2. PBS*1 – בופר המכיל מלחים השומר על רמת pH בדומה לתא. הבופר מכיל נתון כלורי, נתון פוספט ואשלגן פוספט ב $pH=7$.
3. טריפן בלו הוא צבע חיוני המשמש להערכה של חיוניות התאים בתרביות תאים. הוא עוזר להבחין בין תאים חיים לתאים מתים, והמשמעות של השימוש בו היא חשובה בהקשרים שונים של מחקר והערכה ביולוגית.
כיצד הוא פועל?
- טריפן בלו הוא צבע בלתי חדיר לממברנות תאים חיוניים, אך הוא חודר לתוך תאים מתים או פגועים שהממברנות שלהם ניזוקו. כאשר התאים מתים, הממברנה שלהם מאבדת את יכולת הבררנות שלה, והטריפן בלו נכנס פנימה וצובע את התאים בצבע כחול.
4. טריפסין הוא אנזים פרוטיאוליטי שנעשה בו שימוש נרחב בתרביות תאים כדי להפריד תאים הצמודים זה לזה ומהצלחת ולשלוט בצמיחה ובחלוקה שלהם. השימוש בטריפסין חיוני לניהול תרביות תאים ונראה בעיקר בהקשרים של פרוק ותרבות תאים. הנה כיצד הוא פועל ומתי נעשה בו שימוש:
- תפקידו של טריפסין בניסוי הוא הפרדת תאים. טריפסין מפרק את הקשרים בין תאים שכנים ובין התאים למצע התרבות (במקרה זה צלחת) על ידי פירוק באמצעות מים של קשרי פפטיד. זה מאפשר לתאים להתנתק משכבותיהם ולשחרר אותם לתמיסה. התהליך הזה חשוב במיוחד כאשר התאים צברים צפופים וצריכים להתרבות בתרבית חדשה או כאשר יש צורך להעבירם למצע חדש.

5. תא ספירה המוציטומטר:



איור 10: דרכי ספירה בהמוציטומטר

- בתא הספירה (hemocytometer) ישנם שני אזורים כדוגמת התמונה. את התאים סופרים בכל אחד מארבעת הריבועים הצדדיים בנפרד (האיזורים הצבעוניים הבהירים). לאחר מכן מחשבים ממוצע לארבע הספירות. איך מחשבים כמה תאים בדוגמא?
6. נפחו של כל ריבוע כזה הוא $0.1 \mu\text{l}$ לכן יש לחלק את ממוצע ספירת התאים בנפח זה ולהכפיל ב-10,000 כדי לקבל ריכוז ביחידות של תאים למ"ל.

$$\frac{\text{ממוצע תאים}}{0.1 \mu\text{microliter}} * 10000 = ? \text{ cell/ml}$$

מהלך ניסוי:

הערה ללברונט/ית: תחילה יש לסרכז את הטריפן-בלו למשך 2 דקות במהירות מקסימלית על מנת להשקיע משקעים שנוטים להיווצר בנוזל. כאשר לוקחים נפח לצביעה, יש להקפיד לקחת מהחלק העליון של הנוזל במבחנה.

1. אספו את המדיה (7ml) מצלחת מלאה למבחנת 15 ml . את האיסוף יש לבצע בעדינות תוך הטיה קלה של הצלחת ואיסוף המדיה שהצטברה באמצעות פיפטה מדופן הצלחת (ללא גירוד או שריטה של הצלחת כדי לא לנתק תאים חיים).
 2. שטפו את הצלחת עם 2 ml של $1 \times \text{PBS}$ והעברתו למבחנה. את PBS יש להוסיף על דופן הצלחת ולא על התאים עצמם כדי לא לגרום להם להתנתק מזרם הנוזל. לאחר הוספת PBS יש להזיז את הצלחת כך שהנוזל יכסה את כולה. לאחר מכן מטים את הצלחת מעט, כמו בשלב הקודם, ושואבים את PBS באמצעות וואקום מדופן הצלחת. מטרת שלב זה היא להיפטר משאריות מדיה לפני הוספת הטריפסין. מדיית הגידול עשירה בחלבונים ואלו יכולים להוות תחרות לפעילות הטריפסין ותוריד את יעילותו בניתוק התאים.
- בשלב זה לא חייב לדייק עם הנפח, לפחות 2 מ"ל רק כדי לשטוף.
3. הוסיפו 1.5 ml טריפסין ואינקובציה ב-37 מעלות למשך 5 דקות. את הטריפסין ניתן להוסיף ישירות על התאים מפני שמטרת שלב זה היא ניתוקם מהמצע. יש להטות מעט את הצלחת לכיוונים שונים כך שהנוזל יכסה את כולה ולאחר מכן להכניס לאינקובטור.

בשלב הזה צריך לשים לב לדיוק בנפח ששמים כדי שאפשר יהיה לחשב את הנפח הסופי וכך את כמות התאים הכוללת וכו'.

4. הרחיפו את התאים היטב לניתוקם מהצלחת. באמצעות פיפטור בנפח של 1000 μ l יש להעלות ולהוריד את הטריפסין ולוודא ניתוק של התאים מהמצע ולפרק את הצברים. תאים דבוקים לצלחת יראו ככתמים (כמו לכלוך), ואילו כשהתאים מנותקים זה נראה שיש גרגרי חול בנוזל. הרימו את הנפח ושטפו את הצלחת, כך מספר פעמים.

5. הוסיפו את המדיה שנאספה לצלחת והרחפה באמצעות פיפטה לכדי ערבוב אחיד של הדוגמה.

6. קחו דוגמה לספירה (50 μ l) ומהלו עם טריפאן בלו ביחס של 1:1 (50 μ l).

הערה ללבורנטית-לקחת נפח רנדומלי למבחנת אפנדורף ואז להעביר 50 μ l למבחנה שהכינו מראש עם הטריפן. הסיבה היא שזה כנראה ייקח להם זמן ועדיף שייקחו דגימה מהתרחיף כמה שיותר מהר ואז לפני שמעבירים לטריפן בלו שיעשו וורטקס איזה 2 שניות, כי התאים שוקעים וזה לא ייצג את הריכוז.

7. כסו את תא הספירה בזכוכית מכסה והטעינו נפח של 10 μ l מתמיסת התאים שמהולה עם טריפן בלו.

8. ספירת כלל התאים ומתוכם כמה תאים כחולים (חישוב כמות תאים כוללת, תאים מתים (כחולים) והשאר חיים).

מספר התאים סה"כ

מספר התאים המתים

אחוז התאים המתים

ניסוי 3 מקדים: הכנת תרבית תאים להקרנה UV

התאים המוקרנים צריכים ליצור שכבה אחידה. במידה ויש מספר שכבות, הקרינה לא תעבור באופן אחיד לכולם ולכן אנחנו צריכים לחשב את מספר התאים ההתחלתי. על מנת להגיע לכיסוי מתאים של התאים על מצע הגידול בעת ההקרנה יש להתחשב במספר פרמטרים. 1. קצב החלוקה של תאים, בשורות תאים אלו קצב ההכפלה הוא כ-28 שעות. 2.

גודל התאים, בכל שורת תאים הגודל מעט שונה, ניתן לראות שהתאים בשורת התאים 6-4PL מהעט קטנים יותר, ולכן יידרשו יותר תאים לצורך אחוז כיסוי דומה לשורת התאים XP12RO, למשל. 3. כמות התאים שנזרע, בהתאם לשני הפרמטרים הקודמים, כמות זו מפורטת בפרוטוקול הניסוי.

מהלך ניסוי:

1. זרעו 2 צלחות 6cm עבור כל cell line כך שאחוז כיסוי התאים (קונפלואנטיות) יהיה כ-70% (ניתן לפצל צלחת מלאה ביחס של 1:3).

הערה ללבורנטית אם זורעים לפי פיצול של 1:3 ניתן שלא לספור את התאים ולאחר הוספת 2.5ml מדיה והרחפה להעביר 1ml לכל צלחת חדשה והשלמה של 3ml של מדיה חדשה לצלחת.

הוראות זריעת התאים בצלחות 6 ס"מ.

• XP12RO – 300,000 תאים.

• 6-4PL – 340,000 תאים.

• CPDPL – 280,000 תאים.

א. שאבו את המדיה.

ב. שטפו את הצלחת עם 1ml 1XPBS (לא להוריד ישירות על התאים, אלא על דופן הצלחת על מנת שלא יתנתקו).

ג. הוסיפו 0.5ml טריפסין.

ד. אינקובציה – 5 דקות ב37 מעלות.

ה. באמצעות פיפטור 1000ul בצעו פיפטציה קח שהתאים יעלו וירדו על מנת לנתק את כולם.

ו. הוסיפו של 2.5ml מדיה והרחפה (ביעילות על מנת לפרק צברים וליצור ריכוז אחיד).

ז. קחו דוגמה (50ul) לספירה במבחנת אפנדורף.

ח. ספרו את התאים (פעמיים וממוצע).

ט. זרעו נפח מתאים בהתאם לכמות התאים שיש לזרוע בכל אחת משורות התאים.

י. השלימו מדיה ל4ml.

יא. אינקובציה של כ-24 שעות.

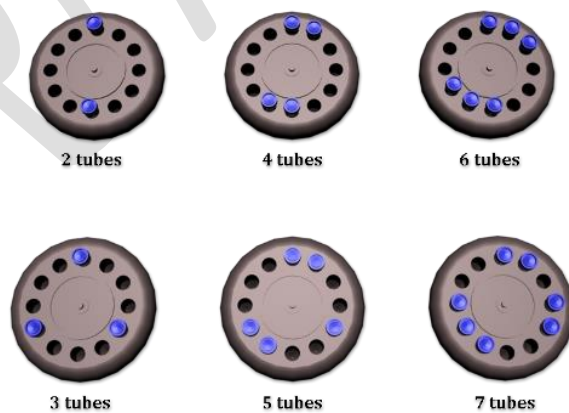
ניסוי חקר 1-השריית נזק UV-C והפקת דנ"א

מטרות המעבדה:

1. בדיקת השפעת מינון UV על כמות נזקי הדנ"א הנוצרים
2. בדיקת השפעת אור כחול על פעילות הפוטוליאז.
3. הפקת דנ"א מניסוי 1,2 ובדיקת ריכוז בנודרופ

חומרים וציוד עיקריים :

צנטריפוגה- מכשיר לסרכז חומרים והפרדת חומרים על פי משקלם וצפיפותם ז"א חומרים בעלי צפיפות גבוהה יותר/כבדים יותר יצטברו בתחתית המבחנה והקלים יותר והפחות צפופים יהיו למעלה. אנו נצטרך להכניס את הדוגמאות (בעזרת המדריך בלבד!) בצורה מאוזנת לצנטריפוגה כך שנשמור על שיווי המשקל בצנטריפוגה.



איור 11 : מבחנות בצנטריפוגה משמאל לימין-2 מבחנות, 3 מבחנות וכו'.

מקור האיור:

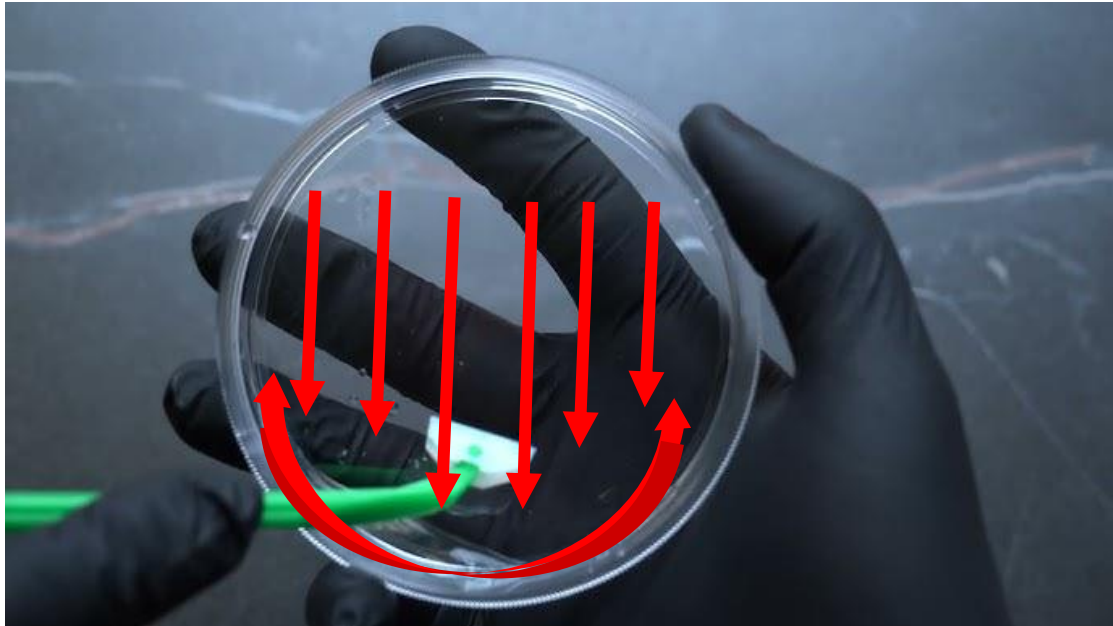
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Centrifuge_balancing_labeled%28microfuge%29.png

UV-cross linker -מערכת קרינה אשר ניתן לשלוט על עוצמות הקרינה ועל אורך הגל. נשתמש בו על מנת להקרין את התאים בUV-C בעוצמות קרינה שונות.

מגרד התאים-מכשיר חד פעמי המאפשר לגרד את התאים ובכך לנתק אותם מצלחת גידול. המכשיר חד פעמי על מנת שלא נערבב בין הדגימות.



החזיקו את הצלחת בהטיה קלה ואז החזיקו במקל וגרדו את התאים מלמעלה למטה בצלחת ובתנועות סיבוביות.



איור 12: קצירת תאים באמצעות מגרד תאים בצלחת פטרי.

אינקובטור עם אור כחול

במהלך תיקון הדנ"א ע"י הפוטוליאז, האנזים סופג אור כחול, אלקטרון מועבר למולקולה $FADH$ אשר מהווה קופקטור(מסייע) לאנזים וזה גורם לפירוק הקשר הכימי הפגום בדנ"א והחזרת הדנ"א למצבו התקין. האור הכחול משמש את הפוטוליאז כמקור אנרגיה אשר מאפשר לו לתקן את הנזק הנגרם לדנ"א כתוצאה מקרינת UV. בניסוי זה אנו נבדוק את השפעת זמני חשיפה עולים לאור כחול על תיקון הנזק כתוצאה מקרינת UV ע"י האנזים פוטוליאז.

ננו דרופ

ננודרופ הוא מכשיר מתקדם שמאפשר מדידת ריכוז דנ"א בצורה מהירה, מדויקת ונוחה. השיטה מבוססת על טכנולוגיית ספקטרופוטומטריה, המודדת את ספיגת האור על ידי דנ"א במצבים שונים. הדנ"א בולע אור בטווח ספקטרלי מסוים (260 ננומטר). הננודרופ מודד את

כמות האור הנבלע על ידי הדנ"א ומחשב את ריכוזו בהתאם לתוצאות. המדידה מתבצעת על ידי הנחת כמות קטנה מאוד של דגימת הדנ"א (בדרך כלל מיקרוליטר אחד).



איור 13: ננודרופ

האיור נלקח מ:

<https://www.news-medical.net/Thermo-Scientific284a2-NanoDrope284a2-OneOnec-Microvolume-UV-Vis-Spectrophotometer>

הערה ללבורנטית-קודם עושים את חלק 2 מכיוון שיש בו הדגרה ארוכה ואז את חלק 1

חלק 1: בדיקת השפעת מיון ה UV על כמות נזקי הדנ"א הנוצרים

מהלך ניסוי:

- א. יש לקרר את הצנטריפוגה ל 4 מעלות מראש.
 - ב. שאבו את המדיה מצלחות תרביות התאים.
 - ג. שטפו עם 1ml 1XPBS ושאו .
 - ד. הקרינו את צלחות תרביות התאים של הניסוי שלכם במינונים שונים של UV:
 - כוונו את מכשיר ה UV crosslinker למינון של 25J/m^2 .
 - הפעילו את המכשיר ללא צלחת בפנים.
 - מיד לאחר מכן הכניסו את הצלחות, הסרו את המכסה (לודא שיודעים להחזיר את המכסה לצלחת הנכונה) והקרינו את התאים.
 - מינונים להקרנה יקבעו לפי שאלת המחקר.
- המינון הקרנה של הקבוצה שלי:

גבוהה	בינונית	נמוכה	
-------	---------	-------	--

			מינון קרינה ב J/m^2
--	--	--	--------------------------

- ה. העברו את כל הצלחות לקרח מיד והוסיפו 1ml 1XPBS שקורר על הקרח מראש.
- ו. שאבו את ה-PBS בזהירות, ללא שאיבת התאים.
- ז. הוסיפו 1ml 1XPBS שקורר מראש על הקרח.
- ח. באמצעות מגרד תאים, גרדו בזהירות את התאים בהטיית הצלחת ואסוף אותם באמצעות טיפ למבחנת אפנדורף ייעודית.
- ט. סרכזו את המבחנות במהירות של 2500 rpm למשך 5 דקות.
- י. הוציאו את הנוזל העליון ושמרו את משקע התאים להמשך הפקת הדנ"א.

חלק 2: בדיקת השפעת אור כחול על פעילות הפוטוליאז.

מהלך ניסוי בקצרה:

- א. הקרנת תרבית תאים בקרינת UV-C במינון הבינוני מהניסוי הקודם לדוגמא : אם בניסוי הקודם המינונים שהקבוצה שלכם עבדה איתם הם $3,6,12 J/m^2$ אז הקבוצה שלכם תקרין את התאים ב- $6 J/m^2$
- ב. טיפול באור כחול בזמנים שונים- כל קבוצה תקבל מספר זמנים לבדיקה
- זמני ההדגרה באור הכחול לקבוצה שלי :

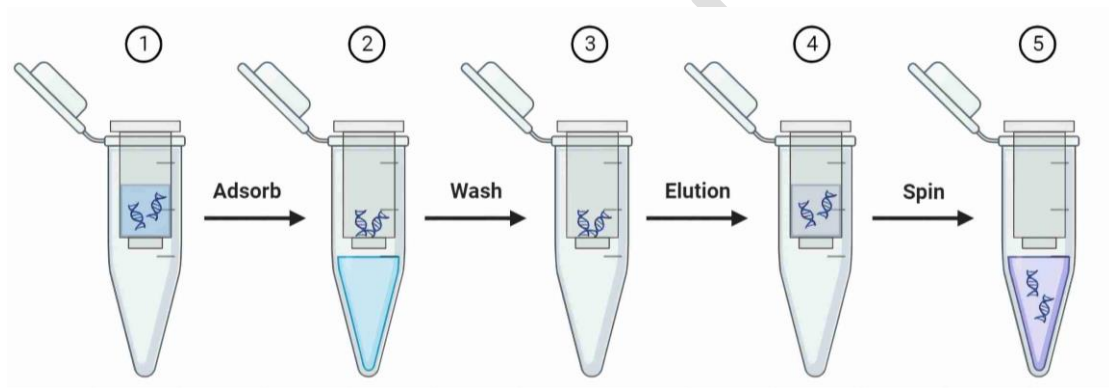
זמן הדגרה (דק')	נמוך	בינוני	גבוה

מהלך ניסוי:

- יא. הדליקו את מנורות האור הכחול מראש על מנת שיתחממו וקררו את הצנטריפוגה הקטנה ל4 מעלות.
- יב. שאבו את המדיה מצלחות הגידול.
- יג. שיטפו עם 1ml 1XPBS ושאו אותו.
- יד. עבור הביקורת ללא ההקרנה – הוסיפו 2ml מדיה וכסו בנייר אלומיניום (בזהירות, כך שלא תישפך המדיה)
- טו. הקרינו את הצלחות הנוספות בכל שורת תאים (אחת שתעבור אינקובציה בחושך והשאר באור כחול):
- טז. כווננו את מכשיר UV crosslinker למינון של 6J/m^2 .
- הפעילו את המכשיר ללא צלחת בפנים.
- מיד לאחר מכן הכניסו את הצלחות, הסירו את המכסה (ל עודד שיודעים להחזיר את המכסה לצלחת הנכונה) והקרנו את התאים.
- יז. מיד לאחר מכן, מומלץ בתנאי חושך, הוסיפו 2ml מדיה **שקופה** לכל אחת מהצלחות.
- יח. את צלחות הUV עם photorepair נדגיר באינקובטור תחת מנורות אור כחול. הדגרו את הצלחות בהתאם לזמנים שניתנו לכם.
- יט. בתום האינקובציה העבר את כל הצלחות לקרח מיד, שאבו את המדיה והוסיפו 1ml 1XPBS שקורר על הקרח מראש.
- כ. שאבו את הPBS בזהירות, ללא שאיבת התאים.
- כא. הוסיפו 1ml 1XPBS שקורר מראש על הקרח.
- כב. באמצעות מגרד תאים, גרדו בזהירות את התאים בהטיית הצלחת ואספו אותם באמצעות טיפ למבחנת אפנדורף ייעודית.
- כג. סרכזו את המבחנות במהירות של 2500 rpm למשך 5 דקות.
- כד. הוצאו את הנוזל העליון ושמרו את המשקע התאים להמשך הפקת הדנ"א.

חלק 3: הפקת דנ"א

לאחר שגירדנו את התאים מהצלחות וסירכזנו, נשארו עם משקע תאים. בכל תא ותא יש את הדנ"א שנרצה לבדוק את רמת הנזק בו לאחר ההקרנה. נבצע זאת עם קיט הפקה DNeasy. הקיט מכיל בופרים להרס הממברנה ושאר חלקי התא אשר בהם לא נצטרך כמו חלבונים (שהפרוטאינז K מפרק) ורנ"א וקולונות הפקה-מבחנות עם ממברנה אשר קושרות את הדנ"א ומסלקות את כל שאר הפסולת (ראה איור ?). לאחר מכן נפיק את הדנ"א מהקולונה ונשתמש בו בהמשך ל-dot-blot.



איור 14 : קולונות הפקה אשר קושרות את הDNA, לאחר מכן נשטוף את כל שאר חלקי התא ונפיק את הDNA הנקי.

מקור האיור:

<https://www.cd-bioparticles.com/products/silica-spin-column-1119.html>

- א. כווננו את התרמו-מיקסר מראש ל-56°C.
- ב. הרחפו את התאים ב-200ul PBS וערבבו היטב באמצעות וורטקס (כ-4 שניות).
- ג. הוסיפו 20ul פרוטאינז K.
- ד. הוסיפו 200ul ליזיס בופר (AL).
- ה. ערבבו היטב באמצעות וורטקס של כ-4 שניות.
- ו. הכנסו את הדוגמאות לתרמו מיקסר בחום של 56 מעלות למשך 10 דקות.
- ז. הוסיפו 200ul 100% אתנול.
- ח. ערבבו היטב באמצעות וורטקס ובצע סרכוז קצר (spin-down).

- ט. העברו את כל נפח הדוגמה אל הקולונה.
- י. סרכזו בצנטריפוגה (טמפרטורת חדר) במשך דקה ומהירות של 8000rpm.
- יא. העבירו את הקולונה למבחנת איסוף חדשה.
- יב. הוסיפו 500ul בופר שטיפה ראשון (AW1).
- יג. סרכזו בצנטריפוגה (טמפרטורת חדר) במשך דקה ומהירות של 8000rpm.
- יד. העברו את הקולונה למבחנת איסוף חדשה.
- טו. הוסיפו 500ul בופר שטיפה שני (AW2).
- טז. סרכזו בצנטריפוגה (טמפרטורת חדר) במשך 3 דקות ומהירות של 14,000rpm.
- יז. העברו את הקולונה למבחנת אפנדורף חדשה בה תבוצע האלוציה.
- יח. הוסיפו 150ul בופר אלוציה (הורד את הנוזל ישירות על הממברנה, מבלי לגעת בה).
- יט. המתינו דקה.
- כ. סרכזו בצנטריפוגה (טמפרטורת חדר) במשך 2 דקות ומהירות של 8000rpm.
- כא. ערבבו היטב באמצעות וורטקס ובצעו סרכז קצר (spin-down).

חלק 4: בדיקת ריכוז דנ"א לאחר ההפקה בנודרופ

מהלך ניסוי:

לכל דוגמה יש לבצע שתי מדידות ולאחר מכן לעשות ממוצע.

1. נקה את מכשיר ה-nano-drop עם DDW ונייר עדין (KIM WIPES)
2. אפס את המכשיר באמצעות 1ul blank (בופר האלוציה משלב הפקת הדנ"א).
3. הטען 1ul מהדוגמה הנמדדת במכשיר ובצע מדידה.

רשום את תוצאות ההפקה לשני הניסויים 1-2

מספר דוגמא	סוג התא	סוג הטיפול	ריכוז הדנ"א בדוגמא	ממוצע

4. הדגרה עם נוגדן ראשוני למשך לילה.

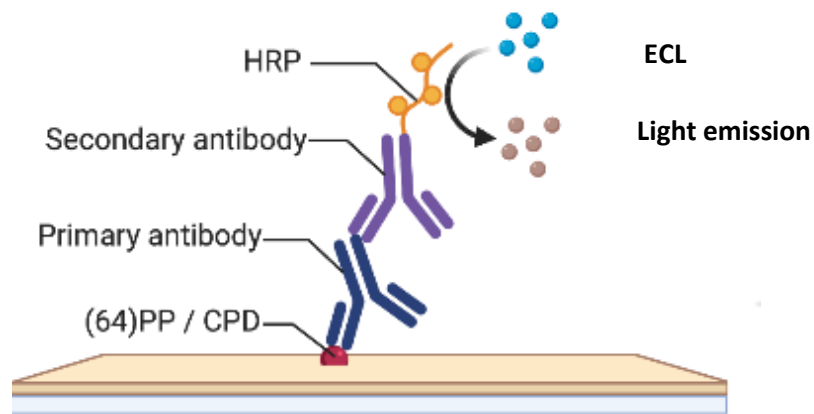
5. PCR לגן של הפוטוליאז.

רקע על שיטת DOT BLOT

שיטת **Dot Blot** בה נשתמש היא טכניקת ביולוגיה מולקולרית המיועדת לזיהוי כמותי או איכותי של חלבונים, DNA, או RNA בדגימות באמצעות נוגדנים.

כיצד Dot Blot פועלת?

1. **הכנה והטענה**: נפיק את דגימות הדנ"א אשר הוקרנו בUV ונטעין על גבי הממברנה.
2. **קיבוע**: ה-DNA מועבר לנייר דרך תהליך של קיבוע במערכת ואקום המאפשרת לשלוט על פיזור הדגימה על הממברנה. לאחר מכן חימום ויבוש הממברנה כדי להבטיח שהמולקולות ייצמדו לנייר בצורה יציבה ולא יתפזרו או יימחקו במהלך השלבים הבאים.
3. **חסימה**: כדי למנוע תגובות בלתי ספציפיות, הנייר מטופל בתמיסה חוסמת Blocking Solution ע"י skim milk (אבקת חלב) שמכילה חלבונים לא ספציפיים שמונעים את היקשרות של נוגדנים לאתרי קשירה ריקים על הנייר.
4. **נוגדן 1**: הטענה בנוגדן ראשוני אשר יקשר לאפיטופ (אתר קשירה של הנוגדן). בניסוי זה האפיטופ הוא הדנ"א עם הנזק איתו כל קבוצה עובדת.
5. **נוגדן 2**: נקשר לנוגדן הראשוני ואליו תהיה קשורה האנזים HRP (horseradish peroxidase). האנזים גורם לתגובת צבע כאשר הוא בא במגע עם סובסטר מתאים.
6. **השריה ב** enhanced chemiluminescence (ECL) - ראגנט המכיל לומינול אשר בתגובה עם האנזים HRP (אשר נמצא קשור לנוגדן השניוני) פולט אור. מכיוון שהוא גם מכיל enhancer הוא יגביר את התגובה על מנת להגביר את האור שנפלט.
7. את פליטת האור אשר הוגברה באמצעות ה-ECL נוכל לצלם במכשיר דימות יעודי כמילומנסנטי אשר לו מצלמה רגישה במיוחד במיוחד לתהליך זה אשר לפעמים מכיל כמויות מזעריות של חלבון/DNA.



איור מספר 15 : מערכת dot blot

האיור יוצר ע"י יובל כהן, המעבדה של ד"ר שירה אדר, האוניברסיטה העברית.

חומרים בניסוי:

אמוניום אצטט-שומר על גדילי ה DNA במצב דנטורטיבי(פתוחים)

- TE – בופר טריס המכיל EDTA. בופר אשר שומר על רמת חומציות תקינה ומונע מאנזימים המעכבים DNA לעבוד.

SSC- בופר סודיום ציטרט אשר משפיע על הדבקות גדילי ה DNA אחד לשני. אנו מוסיפים מלחים על מנת לשמור על הגדילים פתוחים

חלק 1: הכנת דוגמאות ה DNA

התוצאות בנודרופ הן ריכוז ביחידות של נוגרם למיקרוליטר. אנו מעוניינים בכמות של 220 נוגרם לכל דוגמא ולכן אנו צריכים לחשב כמה נפח אנחנו צריכים לקחת מכל דוגמא על מנת שתהיה לנו הכמות הרצויה של DNA.

דוגמא:

במידה וריכוז הדוגמא 19.5 נוגרם למיקרוליטר ונשתמש בנוסחא של

$$c=n/v$$

$$n/c=v$$

ולכן 220 נוגרם חלקי 19.5 = 11.28 מיקרוליטר וזה הנפח שנקח עבור ההטענה בדוט בלוט.

אנחנו נמהל עם DDW נשלים ל220 מיקרוליטר.

מספר דגימה	סוג הדוגמא	ריכוז הדנ"א בנוגרים למיקרוליטר	נפח דגימה שנקח על מנת שנקבל 220 ng DNA	נפח המים שנצטרך להשלים ל220μl
<u>1</u>	<u>ABC</u>	<u>19.5</u>	$\frac{220\text{ng}}{19.5\text{ng}/\text{microliter}} = 11.28 \text{ microliter}$	220- 11.28=208.7 2

חלק 2: הכנת הממברנה

הטענת DNA תתבצע בעזרת המדריך בבאריות המתאימות. הפלטה בעלת 96 מקומות לדגימה ומסודרת לפי טורים (מספרים) ושורות (אותיות). על מנת לזכור היכן הדוגמאות רשום כעת את סימון הבארית לדוגמא 6B ורשום מה הוטען בכל בארית.

שם הדוגמא	סימון הבארית

- א. הדליקו את התרמובלוק (מחמם דוגמאות) ל-95 מעלות צלזיוס
- ב. הכניסו תמיסת אמוניום אצטט 2M לקרח על מנת שיתקרר
- ג. הכניסו את מבחנות הדנ"א לתרמובלוק ב-95 מעלות-שלב זה יעביר את הדנ"א דנטורציה וישמור על גדילי הדנ"א פתוחים.
- ד. בשלב זה פקקי המבחנה נפתחים בגלל הלחץ שנוצר במבחנה מאידוי הנוזל. על מנת שלא לאבד מנפח הדוגמה, הקפידו לוודא סגירה של הפקקים תוך שאתם נזהרים מהחום הגבוה.
- ה. לאחר הדנטורציה שימו את מבחנות הדנ"א בקרח ל-5 דק
- ו. הוסיפו נפח זהה (220 מיקרוליטר) של האמוניום אצטט לדגימות דנ"א והשאר בקרח.
- ז. בזמן שהדגימות הדנ"א ממתירות בקרח, חתכו ממברנת ניטרצולוז עם סכין סקלפל לגודל 8X11.3cm
- ח. השרו את ממברנת ניטרצולוז וניירות ווטמן ב-6xSSC ל-10 דק.
- ט. השתמשו ב-2 חתיכות עבות של ניירות ווטמן מחברת ביו-רד או 4 ניירות ווטמן.
- י. *עבור דוט-בלוט אין צורך בהשריית ניירות ווטמן
- יא. הכניסו את נייר הווטמן ומעליו את הממברנה ואטמו את המכשיר.
- יב. שפכו TE לשוקת חד פעמית סטרילית
- יג. שטפו את הבאריות ב-TE ע"י הוספת 400μL TE לכל בארית עם פיפטור.
- יד. הדליקו את הואקום לעוצמת שאיבה נמוכה עד לשאיבת הנוזל.
- טו. סגרו את הואקום בזמן הטענת ה-DNA.
- טז. הטענו את דוגמאות ה-DNA (400 מיקרוליטר) עפ"י תכנון ידוע מראש.
- יז. הדלקו את הואקום בעוצמת שאיבה נמוכה עד לשאיבת הנוזל וכבו את הואקום
- יח. שטפו את הממברנה ב-SSC ע"י הוספת 400μL של 2xSSC
- יט. הדלקו את הואקום לעוצמת שאיבה נמוכה עד לשאיבת הנוזל.
- כ. כבו את הואקום
- כא. הפרדו את המכשיר מהואקום ופרקו את חלקיו .
- כב. שרטטו בעדינות את גבולות הממברנה ואת כיוון ההטענה בעיפרון
- כג. חתכו את הממברנה עם סקלפל יעודי
- כד. הכנסו את הממברנה לתוך מעטפת נייר ווטמן
- כה. ייבשו את המעטפה עם הממברנה ב-75 מעלות ל-40 דק
- כז. לרענון הממברנה לאחר יבוש, שטפו את הממברנה ב-PBST *1 - מאפשר לממברנה לספוג לחות ולא להישבר.

חלק 3: בלוקינג ושטיפות הדנ"א שלא נקשר.

- א. הדגירו את הממברנה באבקת חלב 5% ב-PBST *1 לשעה.
- ב. שפכו את הנוזל והוסף PBST *1 עד לכיסוי מלא ועוד קצת
- ג. שקשקו ל-5 דק
- ד. חזרו על כז-כח 3 פעמים ז"א 3 שטיפות של סה"כ 15 דק.

חלק 4: הדגרה עם נוגדן ראשוני למשך לילה.

הדגירו עם נוגדן ראשוני ללילה כהכנה לנוגדן השניוני שנגדיר למחרת.

עבור CPD: נוגדן חד שבטי מעכבר

שם הנוגדן- Anti-Cyclobutane Pyrimidine Dimers (CPDs) mAb (Clone TDM-2)

(-נדלל 1:4000 , 5% BSA ב-PBS/TBS)

עבור 6-4PP : נוגדן חד שבטי מעכבר

שם הנוגדן: Anti 6-4 Photoproducts (6-4PPs) mAb (Clone 64M-2)

(הערה ללבורנטית נדלל 1:2000 , 5% BSA ב-PBS/TBS)

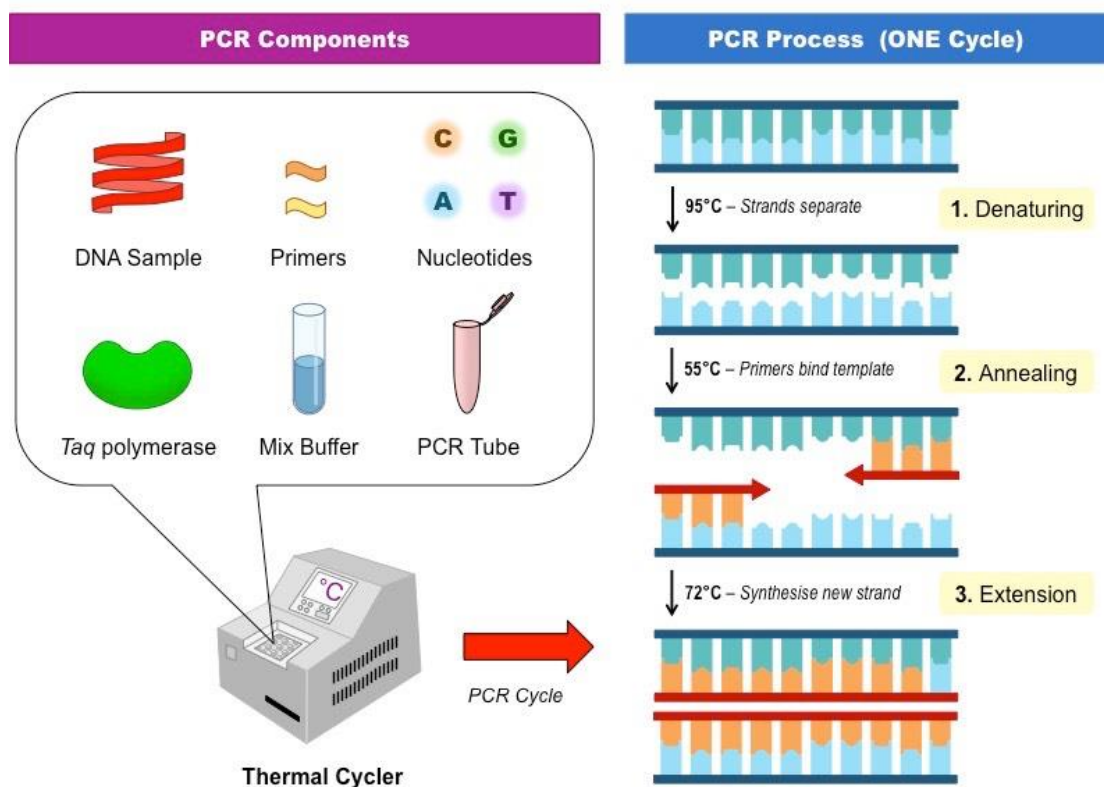
5. PCR(Polymerase Chain Reaction) לווידי נוכחות הגן של הפוטוליאז

PCR היא שיטת מעבדה נפוצה שמאפשרת הכפלה של מקטעי DNA באופן מהיר ומדויק. היא פותחה בשנות ה-80 על ידי כימאי בשם קארי מוליס, וזכתה בפרס נובל לכימיה בשנת 1993.

איך זה עובד?

PCR מתבצע באמצעות מספר שלבים חוזרים ונשנים:

1. **חימום (Denaturation):** תחילה, החומר הגנטי (DNA) מחומם לטמפרטורה גבוהה (94-98 מעלות צלזיוס) כדי לפרק את הקשרים המימיים בין שני השרשראות של ה DNA וליצור שני חד-גדילים נפרדים.
2. **קירור (Annealing):** לאחר מכן, התערובת מקוררת לטמפרטורה נמוכה יותר (כ- 50-65 מעלות צלזיוס), על מנת שהפריימרים יתחברו. הפריימרים הם מקטעי DNA קצרים (כ-20 בסיסים) שמיועדים להתחיל את תהליך השכפול באזור מסוים של ה-DNA.
3. **שלב בניית הגדילים החדשים (Extension):** התערובת מחוממת מחדש (לרוב לטמפרטורה של כ-72 מעלות צלזיוס), מה שמאפשר ל-טאק פולימראז (אנזים המשכפל את ה DNA) להוסיף נוקלאוטידים וליצור שכפול חדש של ה DNA-מהאזור שבו הוצמדו הפריימרים.



איור 16: שלבי ה-PCR.

מקור האיור:

<https://old-ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/35-genetic-modification-and/pcr.html>

תהליך זה חוזר על עצמו מספר פעמים (בין 20 ל-40 מחזורים), וכל מחזור מכפיל את כמות ה-DNA-התוצאה היא הגדלה דרמטית בכמות המקטע הספציפי של ה-DNA-שנחקר. כל קבוצת תלמידים תבצע הגברה לגן פוטוליאז של שורת התאים שלה, לשורת תאי הביקורת XP12RO ולביקורת שלילית ללא DNA.

תוכנית ה-PCR :

א.רצף הפריימרים:

לכל גן אנו צריכים זוג פריימרים- על מנת שתהיה הגברה של שני הגדילים.

עבור CPD:

F: ATTGGCCCTGAAACAGAAG

R: ACTCCTCCGCTACTTCTTC

F: GAGTCCAATCAGCTTGTTC

R: TCTCCAGTGAGCCATACTC

ב.הכנת התערובת:

נכין תערובת של כל החומרים חוץ מהדנ"א עבור סך כל המבחנות ונחלק אותו למבחנות כך שהשוני בכל מבחנה הוא רק הדנ"א שמגבירים.

נפח להוסיף עבור 5 דוגמאות (3) דוגמאות +2 דוגמאות נוספות (לביטחון) במיקרוליטרים	נפח להוסיף עבור דוגמא אחת במיקרוליטרים	
	1 מיקרוליטר של פריימרים בריכוז 10 מיקרומולר	מיקספריימרים (R+F)
	10 מיקרוליטר	מיקס PCR* 2 (מכיל את הטאק- פולימראז, בופרים, קופקטורים עם מגנזיום, נוקלאוטידים)
	5 מיקרוליטר	דנ"א (אשר הפקנו מהתאים)
	4 מיקרוליטר	DDW להשלמת הנפח
	20 מיקרוליטר	נפח סופי

למבחנה 1: הוסיפו 4 מיקרוליטר DDW במקום נפח הדנ"א

למבחנה 2: הוסיפו DNA של PP 6-4 או CPD. (לפי השאלת מחקר שלכם)

למבחנה 3: הוסיפו 4 מיקרוליטר DNA של XP12RO

ג.הגדר במכשיר ה-PCR את התוכנית:

זמן	מעלות צלזיוס	שלב
3 דק'	94	דנטורציה ראשונית
30 שניות	94	דנטורציה
20 שניות	64 cpd ל 56 6-4pp ל	אנילינג
דקה	72	פולימריזציה
10 דק'	72	פולימריזציה סופית
אין סוף	4	קירור

מפגש 3: פיתוח הממברנה, אנליזת התוצאות ואימות הגן באלקטרופורזה

מטרות המעבדה:

1. המשך שטיפות הממברנה והדגרה עם נוגדן שניוני של מערכת dot blot
2. פיתוח הממברנה של מערכת dot-blot
3. הדגרת הממברנה עם צבען SYBER gold ופיתוח הממברנה
4. הרצת דוגמאות מה-PCR באלקטרופורזה

חלק 1: הדגרה עם נוגדן שניוני

- א. לאחר השימוש איספו בחזרה למבחנה את תמיסת הנוגדן הראשוני.
 - ב. העבירו 3 שטיפות כפי שעשית בסעיף 27-28 של 5 דק' בתמיסת PBST *1
 - ג. הדגרו עם נוגדן שניוני:
 - ד. שפכו את הנוזל והדגרו עם נוגדן שניוני
- שם הנוגדן: Mouse IgG HRP Linked Whole Ab מכיבשה
- anti-mouse HRP אשר מדולל ל-1:15,000 ב-5% אבקת חלב ב PBST *1 בטמפ' החדר לשעה.
- ה. שפכו את הנוזל-נוגדן שניוני לא עובר שימוש חוזר.
 - ו. הדלקו את מכשיר ChemiDoc

חלק 2: פיתוח הממברנה ב-ECL

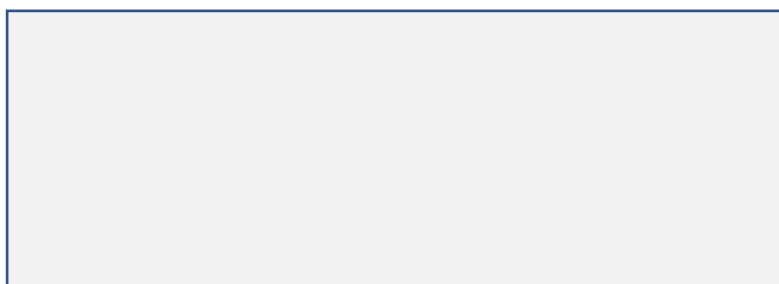
- א. הכינו את תמיסת ה-ECL (יחס של 1:1 בין Soln B ל Soln A)
- ב. עבור ממברנה גדולה נשתמש ב-6 מ"ל.
- ג. שימו לב כי אתם מחליף בין הפיטות בין תמיסה Soln B ל Soln A
- ד. מהרגע שהתמיסה מוכנה, שפכו בעדינות את התמיסה על הממברנה והדגרו 5 דק'.

ה. טפחו בעדינות עם הממברנה על נייר וטמן לספיגת שאריות ECL

ו. צלמו את הממברנה- שים לב:

לא לחשוף ביתר כך שיהיו איזורים אדומים ולא לחשוף לזמן ממושך מכיוון שמגביר את הסיכוי להגברת רעשי רקע

תמונת הממברנה:



לינק לסרטון איך לכמת ב image lab

טבלה לניתוח התוצאות:

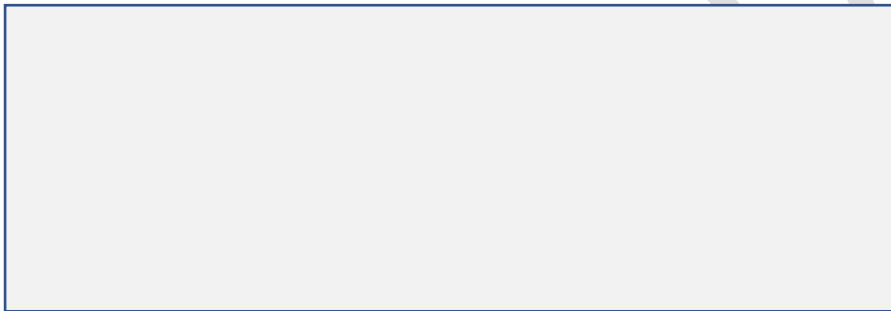
קריאת הסיגנל	קריאת הסיגנל המכומת (ביחס לדוגמא הלא מוקרנת-ללא נזק)	שורה	טור

חלק 3: הדגרת הממברנה עם צבען SYBER gold ופיתוח הממברנה

הצבען יכמת את כל הדנ"א שיש בממברנה מכיוון שנקשר באופן לא ספציפי ל DNA ולכן נוכל לכמת את התוצאות של כמות הנזק ביחס לכל הדנ"א שיש בממברנה.

- א. שטפו את הממברנה פעם אחת לאחר ECL ב-PBST *1
- ב. הפשרט מבחנת SYBRgold ודאג לכך שלא תחשף לאור.
- ג. דללו את ה-SYBRgold ל-1:5,000 ב-PBST *1 (כל 4 mL ב-20 mL)
- ד. הדגרו את הממברנה בשקשוק בנייר כסף לפחות 30 דק. (ניתן יותר-אין חשש לרעשי רקע)
- ה. שטפו את הממברנה בשקשוק 3 פעמים כמו ב-?? 5 דק' כל פעם ב-PBST *1
- ו. צלמו את הממברנה בתנאי אטידיום ברומיד.
- ז. בעזרת המדריך כמתו את התוצאות ב-image lab ע"י חישוב השטח המושחר לעומת הרקע הבהיר-ככל שהשטח כהה יותר ורחב יותר כך היה יותר נזק.

תמונת הממברנה:



טבלה לניתוח התוצאות:

קריאת הסיגנל	קריאת הסיגנל המכומת (ביחס לדוגמא הלא מוקרנת-ללא נזק)	שורה	טור

תוצאות מכומתות-

סיגנל אחרי כימות (תוצאות הממברנה ECL חלקי סה"כ הדנ"א)	סיגנל לאחר חשיפה עם syber gold (המכומת)	סיגנל לאחר חשיפה עם ECL (המכומת)	מספר דגימה

חלק 4: הרצת ג'ל באלקטרופורזה של ה-PCR

הכנת הג'ל: ע"י הלבורנטית

מוהלים TBE*5 TBE*1 (100 מ"ל של TBE*5 על 500 מ"ל DDW) ואז על 100 מ"ל TBE*1 מוסיפים 1.5 גרם אגרוז

מחממים במיקרוגל בתוך ארלנמיייר עם נייר עד להתמוססות האגרוז והופעת בועות גדולות.

מוסיפים 5 מיקרוליטר של safe view על כל 100 מ"ל של ג'ל במנדף ושמים בתבנית יעודית עד למיצוק מלא.

הרצת הדנ"א באלקטרופורזה

- חברו את מכשיר ההרצה לספק-שים לב לכיווניות ההרצה, DNA טעון שלילי ולכן ירוץ לכיוון הקצה החיובי.
 - הוסיפו בופר TAE*1 למכשיר ההרצה
 - הכניסו את מתקן הג'ל לבופר ההרצה והוציאו בעדינות (בעזרת המדריך בלבד) את המסרק הפרדה מהג'ל.
 - המדריך יטעין מרקר גדלים (Ladder)
 - הטעינו 10 UL דנ"א לכל דוגמא
- איך נטעין? נכניס את הטיפ עד לאמצע הבארית בצורה הבאה.



איור 17- הטענת בארית PCR

מקור האזור: <https://www.dreamstime.com/stock-images-loading-agarose-gel-image21181684>

ו. כוון את הספק ל 100 voltage לכ 50 דק -שים לב כי הצבע התכלת לא בורח מחוץ לג'ל. (התמונה הינה רק להמחשה)



איור 18- ריצת DNA בג'ל אלקטרופורזה

התמונה נלקחה מ: <https://www.biocompare.com/Product-Reviews/569578-6x-Orange-DNA-loading-dye-for-DNA-electrophoresis>

ז. לאחר סיום ההרצה צלמו את הג'ל בתנאי אטודיום ברומיד בעזרת המדריך.

ציירו באופן סכמטי בריבוע למטה את תוצאות הג'ל כולל את מרקר הגדלים (סמן את כל הגדלים)

וענה על השאלות-

1. מהי הביקורת

החיובית?

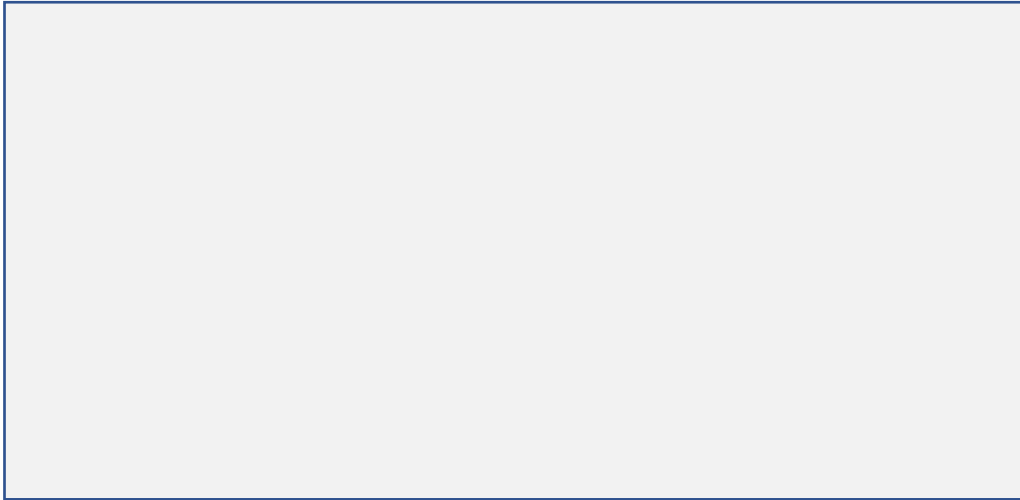
2. מהי הביקורת

השלילית?

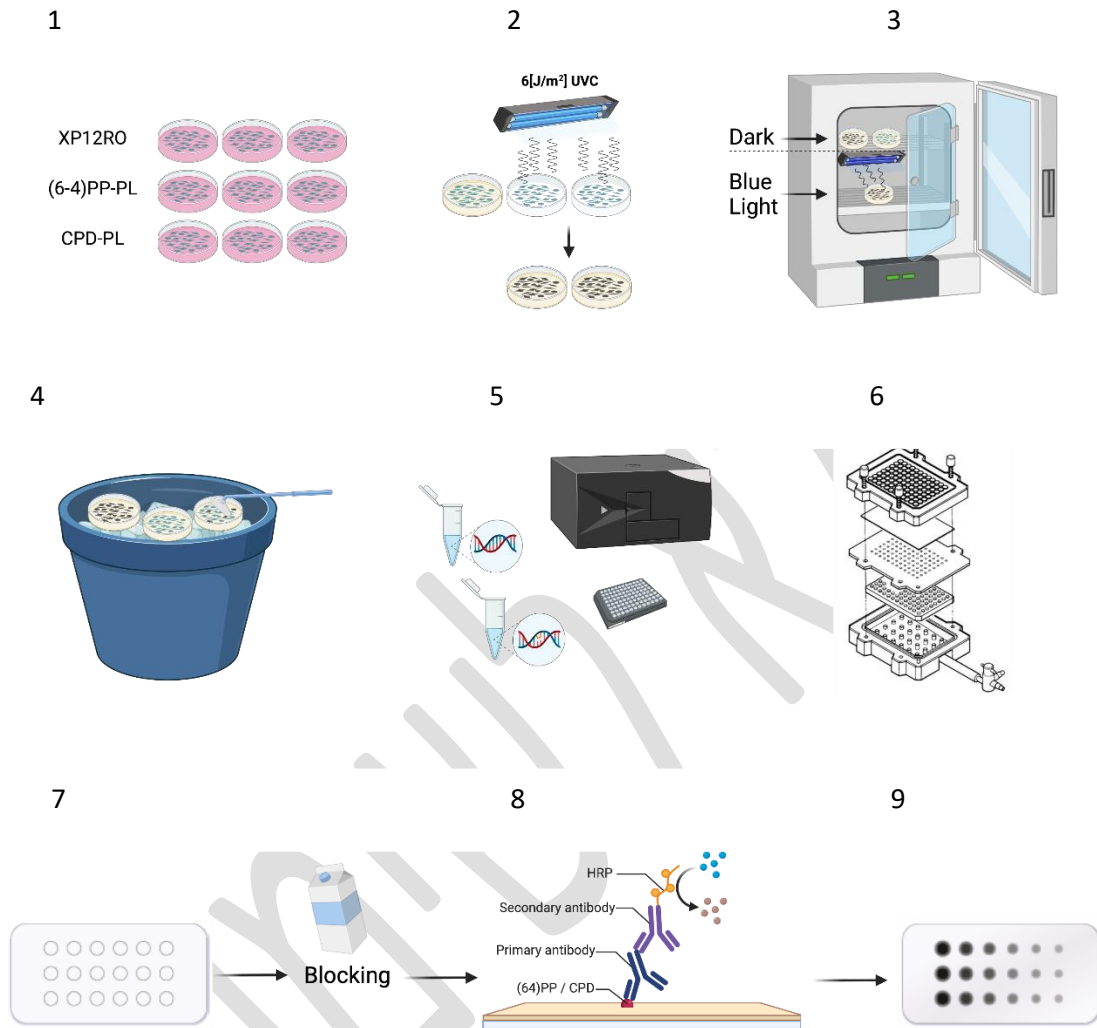
3. מהם גדלי המקטעים שניסינו

להגביר?

תוצאות הג'ל:



איור 19: תרשים זרימה לדוט בלוט



1 – זריעת צלחות

2 - הקרנה צלחות בUVC.

תנאי הניסוי: זמנים שונים לאור הכחול ודוזות שונות של UVC.

3 – אינקובציה באור כחול/ללא אור כחול

4 – קצירה של התאים והפקת דנ"א.

5 – בדיקת ריכוז דנ"א.

6 – דוט בלוט - הטענה של דוגמאות הדנ"א על ממברנה

7- בלוקינג לממברנה

8- הדגרה עם נוגדן ראשוני כנגד הנזק הספציפי שבדקים (CPD או 6-4PP) ולאחר מכן נוגדן שניוני

9- פיתוח הממברנה עם ECL וצילום

- Dizdaroglu, M. (2017). Oxidatively Induced DNA Damage and Its Repair. *Reference Module in Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.07033-3>
- Grham, S.(2022). Learn about UV intensity and UV dose
<https://www.fluidquip.com.au/about-us/education-training/learn-about-uv-intensity-and-uv-dose-1>
- Kciuk, M., Marciniak, B., Mojzych, M., & Kontek, R. (2020). Focus on uv-induced dna damage and repair—disease relevance and protective strategies. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 19, pp. 1–33). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21197264>
- Leung, A. K. C., Barankin, B., Lam, J. M., Leong, K. F., & Hon, K. L. (2022). Xeroderma pigmentosum: An updated review. *Drugs in Context*, 11. <https://doi.org/10.7573/dic.2022-2-5>
- Marx, A., & Betz, K. (2020). The Structural Basis for Processing of Unnatural Base Pairs by DNA Polymerases. In *Chemistry - A European Journal* (Vol. 26, Issue 16, pp. 3446–3463). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/chem.201903525>
- Nakajima, S., Lan, L., Kanno, S. I., Takao, M., Yamamoto, K., Eker, A. P. M., & Yasui, A. (2004). UV light-induced DNA damage and tolerance for the survival of nucleotide excision repair-deficient human cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(45), 46674–46677. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406070200>
- Sinha, R. P., & Häder, D. P. (2002). UV-induced DNA damage and repair: A review. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 1(4), 225–236. <https://doi.org/10.1039/b201230h>
- Tang, X., Yang, T., Yu, D., Xiong, H., & Zhang, S. (2024). Current insights and future perspectives of ultraviolet radiation (UV) exposure: Friends and foes to the skin and beyond the skin. *Environment International*, 185, 108535. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2024.108535>
- Yamamoto, J., Shimizu, K., Kanda, T., Hosokawa, Y., Iwai, S., Plaza, P., & Müller, P. (2017). Loss of Fourth Electron-Transferring Tryptophan in Animal (6-4) Photolyase Impairs DNA Repair Activity in Bacterial Cells. *Biochemistry*, 56(40), 5356–5364. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00366>

שאלות מחקר לפי קבוצות

סוג התאים	שאלת המחקר	מינון (j/m ²) זמן (דקות)	ביקורת
*CPD	1.בדיקת השפעת מינון הUV על כמות נזקי הדנ"א הנוצרים	1,8,13	1.ללא UV 2.ביקורת מוכנה מראש של ערכי הנזק בתאי XP12RO
		1,4,9	
		2,5,10	
		3,6,11	
		2,7,12	
		3,8,13	
	2.בדיקת השפעת אור כחול על פעילות הפוטוליאז.	15	צלחת תאים ללא הדגרה באור כחול
		30	
		45	
		60	
		90	
		120	
**6-4	1.בדיקת השפעת מינון הUV על כמות נזקי הדנ"א הנוצרים	1,8,13	1.ללא UV 2.ביקורת מוכנה מראש של ערכי הנזק בתאי XP12RO
		1,4,9	
		2,5,10	
		3,6,11	
		2,7,12	
		3,8,13	
	2.בדיקת השפעת אור כחול על פעילות הפוטוליאז.	15	צלחת תאים ללא הדגרה באור כחול
		30	
		45	
		60	
		90	
		120	

***XP12RO expressing *Potorous tridactylis* CPD photolyase**

****XP12RO expressing *Arabidopsis thaliana* 6-4PP photolyase**

אשר לשלום