

דף ללבורנט

ז' בשבט תשפ"ב 09.1.22

הערכת ריכוז הנוגדנים כנגד חלבון המעטפת של וירוס הקורונה, בדגימות דם של נבדקים, באמצעות שיטת ELISA (בדיקה סרולוגית)

(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

לתשומת ליבכם: האנטיגן והנוגדנים שסופקו על ידי המרכז לפיתוח ותמיכה במעבדות ביולוגיה בבתי הספר אינם של וירוס הקורונה והם עברו אישור בטיחותי.

א. הערכת ריכוז הנוגדנים נגד וירוס הקורונה בדגימות דם שונות

התלמידים יקבלו שתי דגימות של נוזל שנלקחו מ"דם של שני נבדקים" ובעזרת שיטת ELISA יעריכו את ריכוז הנוגדנים נגד וירוס הקורונה המצויים בדגימות אלו. בשלב הסופי של הבדיקה התרחש ריאקציית צבע. ככל שהצבע הצהוב שיתקבל יהיה חזק יותר, כך ריכוז הנוגדן הנבדק גבוה יותר. התלמידים ישוו את עוצמת הצבע בבאריות שבהן ריכוז תמיסות נוגדן הקורונה לא ידוע לעוצמות הצבע שתתקבל בבאריות שבהן ריכוז הנוגדן ידוע. השוואה זו תאפשר להעריך את ריכוז הנוגדן בדגימות של הנבדקים. למידע נוסף אודות השיטה מומלץ לקרוא בדפים למורה. **להוסיף קישור באתר**

ב. הצלחת הבדיקה תלויה ב:

- התייעצות עם המורה והרכז לגבי מועד ביצוע הבדיקה ובדיקת התוצאות (ראו פירוט בהמשך).
- עבודה מדויקת של הלבורנט על פי ההוראות בכל שלבי הביצוע
- הכנת תמיסות בריכוזים המתאימים
- הכנת החומרים לפי לוח הזמנים מפורט בעמוד 2.
- שמירת הפריטים בטמפרטורה המתאימה כמפורט בטבלה 1 עמוד 3

ג. הכנות לביצוע הבדיקה

- תחילה, יש לברר עם המורה לביולוגיה ורכז המקצוע בבית הספר מהמספר התלמידים שיבצעו את הבדיקה ובאילו כיתות הם לומדים.

- אם בית ספרכם מנוי במרכז לפיתוח ותמיכה במעבדות ביולוגיה תוכלו להזמין ערכה המכילה **חלק** מהחומרים ומהצידוד שנדרשים לביצוע הבדיקה.
- **לפני הזמנת הערכה** חשוב מאד לקרוא בעיון את רשימות הכלים והחומרים (עמודים 5-7) **שימו לב, חלק מהחומרים לא כלולים בערכה.**
- במהלך הבדיקה יש צורך בשימוש באינקובטור או תנור שאפשר לכוון אותו לטמפרטורה קבועה של-37 מעלות צלזיוס
- אם חסרים פריטי ציוד או חומרים בבית הספר, חשוב לרכוש אותם בהקדם אצל ספקי ציוד/חומרים למעבדות או לשאול אותם מלבורנט בבית ספר אחר.
- **תמיכה והתארגנות:** בכל שאלה הקשורה להכנת הניסוי ניתן להתקשר למרכז לפיתוח ולהתייעץ עם הלבורנטיות שהתמחו בהכנה ובביצוע של הבדיקה.

ד. הזמנת הערכה ולוח זמנים לביצוע הבדיקה

- שלושה שבועות לפני המועד שבו ברצונכם לבצע את הבדיקה יש לבצע הזמנה באתר ולהתקשר אל גב' מיכל יעקבי או גב' רותי ירום, למספר הטלפון : 03-5318751 ולתאם את מועד איסוף הערכה (עד שלושה ימים ממועד המתוכנן לביצוע הבדיקה).
- **הערכה מיועדות ל-16 תלמידים** בהזמנת הערכה יש לציין את מספר הערכות הנדרש בהתאם למספר תלמידים שיבצעו את הבדיקה.
- את כל שלבי הבדיקה התלמידים חייבים לבצע **לא יאוחז משלושה ימים** מאיסוף החומרים בבר אילן.
- חלק מהפריטים שבערכה אינם מוכנים לשימוש ישיר על ידי התלמידים. הנחיות להכנת פריטים אלה ראו בתחתית הטבלה בעמודים 6-7 .
- אנא קראו היטב את שלבי ההכנה של התמיסות
- רשימת החומרים והציוד הנדרשים לביצוע הבדיקה מפורטים בטבלאות בעמודים 3-5
 - טבלה 1: תיאור החומרים המסופקים בערכה.
 - טבלה 2: הכלים והחומרים שהלבורנט יכין על שולחן עבור כל זוג תלמידים
 - טבלה 3: הכלים והחומרים לשני זוגות תלמידים אשר עובדים על פלטה אחת
- לתשומת ליבכם: במהלך הכנת החומרים חובה להשתמש בכפפות ובמשקפי מגן.

מספר פריט	שם החומר	שם החומר כפי שרשום בקובץ לתלמיד	סימון המבחנות בקובץ לתלמיד	טמפ' הספקה ואחסון	הכמות המסופקת
1*	BSA- Bovine Serum Albumin-Fraction V- 50g	אנטיגן - חלבון המדמה את חלבון מעטפת נגיף הקורונה	BSA	טמפ' החדר	0.6g
2*	Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	חלבון ממסך	M	טמפ' החדר	0.6g
3*	Anti-Bovine Albumin, Antibody produced in rabbit	נוגדן ראשוני - חלבון המדמה את הנוגדן כנגד חלבון מעטפת נגיף הקורונה	Ab	4°C	0.5 מ"ל
4*	Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-Alkaline Phosphatase, Antibody produced in goat	נוגדן שניוני הקשור לאנזים - חלבון שקשור אליו אנזים, חלבון זה יקשר לנוגדן ראשוני.	Ab2-E	4°C	0.8 מ"ל
5*	Phosphatase substrate	מצע (סובסטרט) - תלמידים מקבלים את הטבליה מומסת בבופרסובסטר	S	4°C	טבליה אחת
6*	בופר סובסטרט				20ml
7*	TWEEN-20		-	טמפ' החדר	0.5 ml



4 פלטות + 4 מכסים			פלטת ELISA + מכסה	8
----------------------	--	--	-------------------	---

טבלה 1: תיאור החומרים המסופקים בערכה עבור 16 תלמידים

טבלה 2: הכלים והחומרים שהלבורנט יכין על שולחן עבור כל זוג תלמידים העובדים על פלטה אחת

- לתשומת ליבכם: את החומרים 12, 14, 16, 17, 18, ו-20 יש לשמור בקירור ולהשתמש לא יאחר משלושה ימים מיום איסוף הערכה.

פריט	הכלים	כמות	הערות
9	מבחנות אפנדורף ריקות	6	
*10	כלי המכיל קרח גרוס	1	
*11	ריבועים של נייר סופג (4 ריבועים לכל שטיפה, סה"כ 4 שטיפות)	16	רצוי להכין גלילי נייר סופג נוספים
*12	מבחנת אפנדורף המכילה μ 300 תמיסת נוגדן ראשוני המסומנת "Ab"	1	את המבחנה יש לשמור בכלי עם קרח גרוס
13	מבחנת אפנדורף המכילה 1.5 מ"ל חלבון ממסך המסומנת "M"	1	לשמור בכלי עם קרח גרוס
14	כוס כימית המכילה 40 מ"ל בופר המסומנת " בופר שטיפה"	1	
15	מבחנת אפנדורף המכילה 1.5 מ"ל תמיסת נוגדן שניוני המסומנת "Ab2-E"	1	את המבחנה יש לשמור בכוס עם קרח גרוס
*16	מבחנות אפנדורף שכל אחת מכילה μ 150 תמיסת "נעלם" המסומנות "נעלם א" ו-"נעלם ב"	2	את המבחנה יש לשמור בכוס עם קרח גרוס
*17	מבחנה העשויה זכוכית או פלסטיק המכילה 2.5 מ"ל תמיסת סובסטרט. יש לפקוק את המבחנה ולסמן אותה "S"	1	יש לשמור את המבחנה בתוך קרח גרוס
18	מבחנת אפנדורף המכילה μ 1000 נתרן הדרוקסידי המסומנת "NaOH"	1	ריכוז התמיסה - 3M

19	מבחנת אפנדורף מכילה 1.5 מ"ל תמיסתחלבון וירוס הקורונה, המסומנת "V"	1	את המבחנה יש לשמור בכוס עם קרח גרוס
----	--	---	--

טבלה 3: כלים לשני זוגות תלמידים אשר עובדים על פלטה אחת

פריט	הכלים	כמות	הערות
20	פלטת ELISA + מכסה	1	
21	מיקרופיפטור בנפח של 100-1000 µl	2	
22	קופסה ובה טיפים המתאימים למיקרופיפטור בנפח של 100-1000 µl	1	
23	מעמד למבחנות אפנדורף	1	
24	עטים לסימון על זכוכית בצבעים שונים	2	צבע שונה עבור כל זוג תלמידים



פריטים 1 ו-19: חלבון וירוס הקורונה - BSA

לקבלת תמיסה בריכוז 5% יש למהול 0.6 גרם BSA, המסופק בערכה, ב-12 מ"ל בופר שטיפה (הוראות להכנת הבופר בעמוד 7).
את התמיסה המתקבלת יש לחלק ל-8 מבחנות אפנדורף, 1.5 מ"ל לכל מבחנה. הכמות המתקבלת מספיקה ל-4 פלטות (16 תלמידים).

פריטים 2 ו-13: חלבון ממסר

לקבלת תמיסה בריכוז 5% יש למהול 0.6 גרם אבקת חלב המסופקת בערכה, ב-12 מ"ל בופר שטיפה ולחלק ל-8 מבחנות אפנדורף, 1.5 מ"ל בכל מבחנה. הכמות המתקבלת מספיקה ל-4 פלטות (16 תלמידים).

פריטים 3, 12 ו-16: תמיסות המכילות נוגדן ראשוני

להכנת תמיסת נוגדן ראשוני יש למהול 0.5 מ"ל תמיסת הנוגדן ראשוני, המסופקת בערכה, ב-2 מ"ל בופר שטיפה. הכמות שתתקבל, תספיק ל-4 פלטות (16 תלמידים), 600 מ"ק עבור כל פלטה לפי החישוב הבא:
א. 600 מ"ק (300 עבור כל זוג תלמידים) המשמשים כתמיסת אם להכנת ריכוזי נוגדן שונים (פריט 12).
ב. 300 מ"ק (150 עבור כל זוג) הלבורנט יעביר למבחנה המסומנת "נעלם א" (פריט 16)
שימו לב: מבחנת אפנדורף המסומנת "נעלם ב" (פריט 16) תכיל 150 מ"ק של בופר שטיפה בלבד

פריטים 4 ו-15: תמיסות המכילות את הנוגדן השניוני

להכנת תמיסת נוגדן השניוני יש למהול 0.8 מ"ל תמיסת נוגדן, המסופקת בערכה, ב-11.2 מ"ל בופר שטיפה. הכמות שתתקבל, מספיקה ל-4 פלטות (16 תלמידים)

פריטים 5, 6 ו-17: סובסטרט

לצורך הכנת תמיסת סובסטרט יש להמיס טבליה אחת ב-20 מ"ל של בופר סובסטרט (פריט 6) ולשמור את המבחנה במקרר או בכוס המכילה קרח.
20 מ"ל בופר יספיק ל-5 פלטות (20 תלמידים).



פריט 7: TWEEN-20

פריט זה אינו מסופק לתלמידים אלא משמש להכנת בופר שטיפה

פריט 13: נייר סופג

נייר סופג משמש לספיגת שאריות הנוזל לאחר השטיפות.
לכל זוג תלמידים מומלץ להכין 4 שכבות נייר לכל שטיפה.
ניתן להשתמש במשטח החתלה חד פעמי עבור שני זוגות תלמידים. במקרה זה אין צורך להחליף את המשטח בין השטיפות.

נספח: הוראות להכנת בופרים הדרושים למהול תמיסות ושטיפת באריות

הכנת בופר שטיפה

לתשומת ליבכם: חומרים הדרושים להכנת בופר שטיפה אינם מסופקים

על ידי כך אילן

המיסו את החומרים האלה בתוך 1 ליטר מים מזוקקים:

NaCl 8g

KH_2PO_4 0.2g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.89 g

לתמיסה שהתקבלה יש להוסיף 5ml של TWEEN-20

4 תלמידים זקוקים ל-60 מ"ל מתמיסת בופר שטיפה.