

ג' בבאייר תשפ"ב

4.5.2022

למורה

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

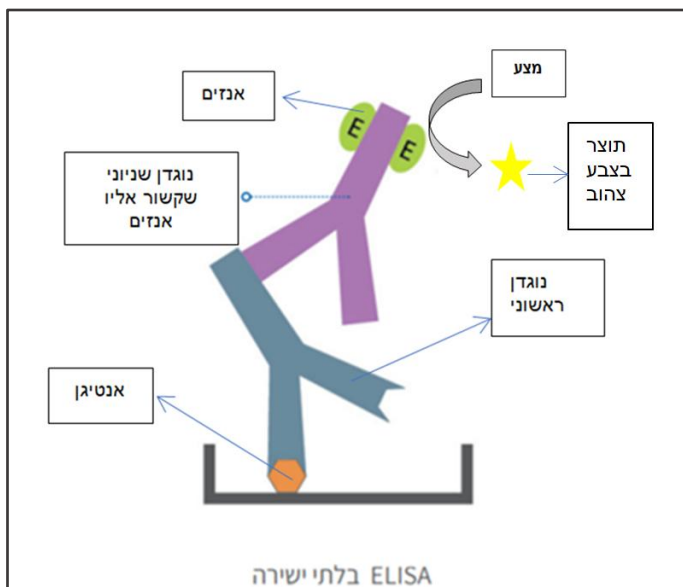
(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

מטרת הבדיקה	הכרת שיטה להערכת ריכוז של נוגדנים בתמיסה. כפי שיפורט להלן, הנוגדנים והאנטיגנים המסופקים בערכה אינם מכילים את נגיף הקורונה
מתאים לנושאים בתוכנית הלימודים	נושא הליבה: גוף האדם בדגש הומואוסטאזיס (מערכות הגנה, נוגדנים, חיסון פעיל, נגיפים, זיכרון חיסוני, תגובה חיסונית ייחודית)
מתאים לתלמידים	בחטיבה עליונה
ידע קודם נדרש	מערכת הגנה בגוף האדם (נגיף, חיסון פעיל, נוגדן ואנטיגן) אנזימים (אנזים וסובסטרט)
מיומנויות מעבדה נדרשות	- שימוש במיקורפיטור - הכנת מיהולים כפולים לתמיסת אם
לוח זמנים מומלץ:	שני שיעורים רציפים

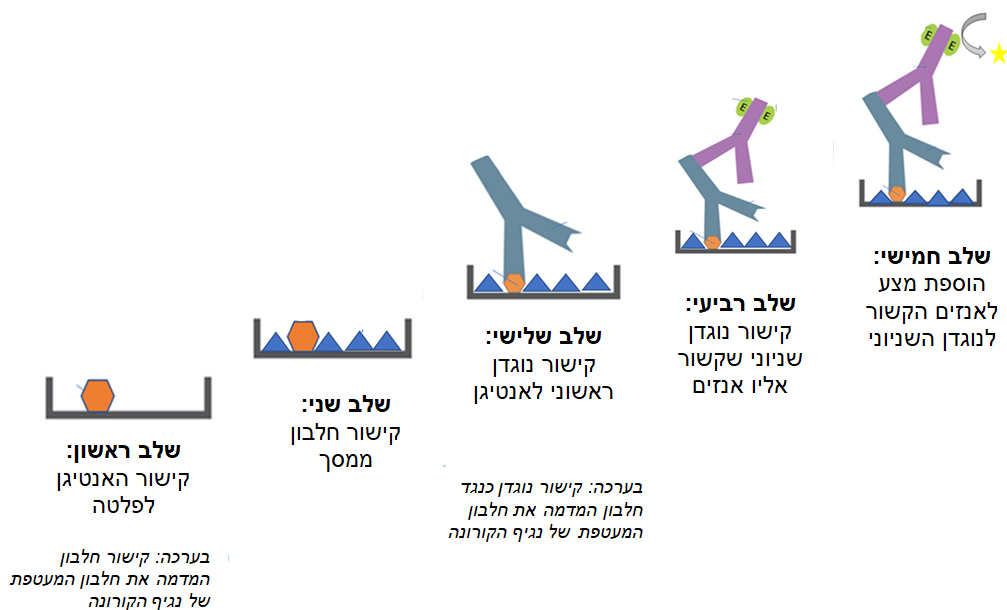
הסבר על השיטה

בשיטה זו משתמשים בפלטה מפלסטיק ובה 96 באריות (שקעים). כל בארית מצופה בחומר שאליו נקשרים חלבונים בצורה לא ספציפית.

קיימות שיטות שונות לביצוע בדיקות ELISA. בערכה שברשותכם התלמידים יבצעו בדיקה המכונה: ELISA בלתי ישירה.

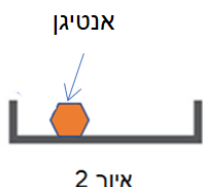


לשיטה חמישה שלבים עיקריים. תיאור של כל שלב מלווה באיור, המתאר את המתרחש בבארית אחת. האיורים נועדו להמחשה בלבד ואינם מעידים על סדרי הגודל של המולקולות ביחס לגודל הבארית.



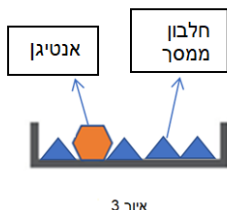
פירוט השלבים

• שלב ראשון: הוספת אנטיגן לפלטת ELISA (איור 2)



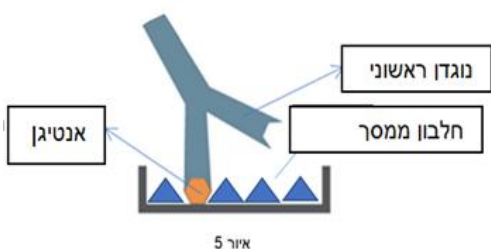
הוספת חלבון המדמה את חלבון המעטפת של נגיף הקורונה, החלבון נקשר אל הבאריות באופן לא ספציפי.

• שלב שני: הוספת חלבון ממסך לפלטת ELISA (איור 3)



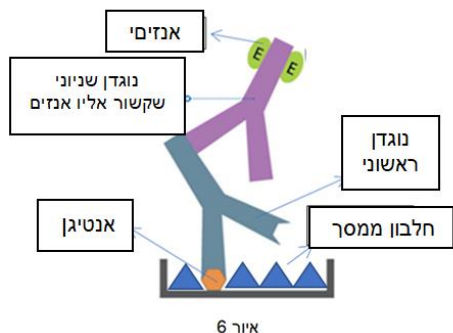
החלבון הממסך נקשר לפלטה במקומות אליהם לא נקשר האנטיגן ומונע קשירת חלבונים אשר יתווספו בשלבים הבאים.

• שלב שלישי: הוספת נוגדן ראשוני הספציפי



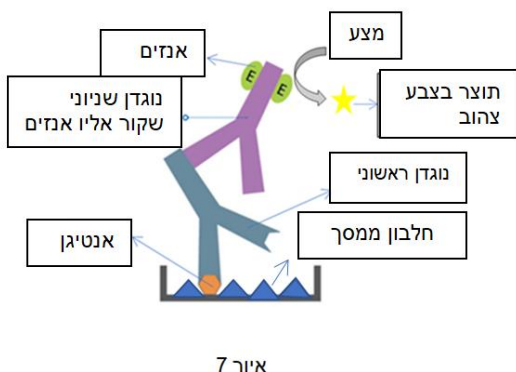
לאנטיגן (איור 5) בשלב זה הנוגדן הראשוני נקשר לחלבון המדמה את חלבון המעטפת הנגיפית ונוצר תצמיד אנטיגן נוגדן.

• שלב רביעי: הוספת נוגדן השניוני (איור 6)



הנוגדן השניוני שאליו קשור אנזים, נקשר לנוגדן הראשוני באופן ספציפי. הכמות שתתקשר נמצאת ביחס ישר לכמות הנוגדן הראשוני. מכיוון שהאנזים קשור לנוגדן השניוני, ריכוז האנזים במערכת יהיה ביחס ישר לריכוז הנוגדן הראשוני.

• שלב חמישי: הוספת המצע (איור 7)



המצע נקשר לאנזים וכתוצאה מתגובת אנזים – מצע, מתקבל תוצר, חומר שצבעו צהוב. ככל שריכוז הנוגדן גבוה יותר, כך עוצמת הצבע המתקבלת גבוהה יותר.

הסבר לשיטת המדידה

מטרת הבדיקה היא להעריך את ריכוז של הנוגדן הראשוני, אשר מדמה את הנוגדן שנוצר בגופו של מי שנדבק בנגיף הקורונה. מכון שאין אפשרות להעריך את ריכוזו באופן ישיר, נשתמש בשיטת הערכה שתאפשר זאת. הנוגדן השניוני, שקשור אליו אנזים, נקשר באופן ספציפי לנוגדן הראשוני, שמהווה עבורו אנטיגן. כתוצאה מהוספת מצע ייחודי, מתרחשת תגובה אנזימטית ומתקבל תוצר בעל צבע צהוב שלפי עוצמת צבעו ניתן להעריך את ריכוז הנוגדן הראשוני.

הערכת ריכוז חלבון בדגימות "נעלם א" ו-"נעלם ב" באמצעות שיטת ELISA

במהלך הבדיקה התלמידים ישוו את עוצמת הצבע שהתקבלה בשתי באריות המכילות דגימות של הנבדקים, לעוצמת הצבע שהתקבלה בכל אחת מהבאריות שמכילה תמיסת נוגדן שריכוזה ידוע. על פי ההשוואה, התלמידים יוכלו להעריך את ריכוז הנוגדנים אצל כל אחד משני הנבדקים.

הערה: ניתן לכמת את ריכוז הנוגדן בדגימה באמצעות בדיקה בספקטרופוטומטר מיוחד קורא פלטות אלייזה.

הערות

1. חלק מהחומרים בהם משתמשים בניסוי הינם רגישים לשינויי טמפרטורה ולכן חשוב להקפיד על שמירתם במקרר לפני הניסוי ובזמן השיעור לשמורם בכלי עם קרח.
2. השטיפות שמתבצעות לאחר כל אחד מהשלבים נועדו להסיר את עודפי החומרים שלא נקשרו באותו השלב.
3. לפני השלב השלישי, הוספת הנוגדן הראשוני, התלמידים מבצעים מהולים כפולים לתמיסת אָם לצורך קבלת תמיסות נוגדן ראשוני שריכוזן יחזק. התלמידים מוסיפים לכל בארית בשורת הבאריות המסומנות תמיסה בריכוז שונה, מה שמאפשר יצירת סקלת עוצמת הצבעים עם קבלת התוצר הסופי בתום הבדיקה. בנוסף, התלמידים מוסיפים תמיסות המסומנות "נעלם א" ו-"נעלם ב" לשתי באריות נוספות. התמיסות, על פי סיפור המקרה, מכילות דגימות דם של שני הנבדקים.
4. בכל אחת משלבי הבדיקה בו הפלטה מועברת לאינקובטור ניתן להאריך את זמן האינקובציה עד שעה.

5. בשלב האחרון, לאחר הוספת המצע והכנסת הפלטה לאינקובטור, יש לשים לב לעוצמת הצבע המתקבלת בכל בארית. צפוי שתתקבל הדרגתיות בצבע לאחר 5 דקות עד 30 דקות, לכן מומלץ להוציא את הפלטה מאינקובטור כל חמש דקות על מנת לבדוק את עוצמת הצבע. אם הצבע לא מופיע ניתן להשאיר את הפלטה באינקובטור עד ליום למחרת ולבדוק שוב.

6. כאשר מזהים את הדרגתיות בעוצמת הצבע בבאריות המכילות ריכוזי נוגדן ידועים, עוצרים את הריאקציה על ידי הוספת NaOH.
לתשומת לבכם: אי עצירה פעילות אנזימטית בזמן, תגרום לכך שלא ניתן יהיה להבחין בהדרגתיות הצבע.

תשובות לשאלות המופיעות בקובץ לתלמיד

שאלה 1:

- בשלב א הוספתם לבאריות שבפלטה חלבון המדמה את חלבון נגיף הקורונה (אנטיגן)
- א. אילו הייתם מוסיפים לחלבון זה גם חלבונים מנגיפים אחרים, האם כל החלבונים שנוספו היו נקשרים? נמקו את קביעתכם.
- ב. מדוע הוספנו רק את האנטיגן של נגיף הקורונה?

תשובה

- א. השכבה הפנימית של באריות בפלטת ה-ELISA מצופה בחומרים אליהם נקשרים חלבונים באופן לא ספציפי. לכן בשלב ההתחלתי כל חלבון יקשר לפלטה.
- ב. רצינו לצור תצמיד של אניטגן ונוגדן יחודיים לנגיף הקורונה ולכן בשלב הראשון הוספנו לפלטה רק את האנטיגן של נגיף הקורונה.

שאלה 2:

- א. מדוע חשוב להוסיף חלבון ממסך בשלב השני של הבדיקה?
- ב. מה היה קורה אילו היינו מוסיפים את החלבון הממסך לפני הוספת האנטיגן לפלטה?

תשובות

- א. חלבונים נקשרים לפלטה באופן לא ספציפי, לכן לאחר קשירת האנטיגן אנו מעוניינים למנוע את קשירת מולקולות נוגדן הקורונה במקומות אליהם לא נקשר האנטיגן.

ב. הוספת החלבון הממסך לפני הוספת האנטיגן תמנע את קשירת האנטיגן לפלטה, שכן כל חלבון יכול להיקשר לפלטה.

שאלה 3:

מדוע לא הוספנו נוגדן ראשוני לבאריות 6C-5C ולבאריות 12H-11H?

תשובה

תכולת באריות אלו משמשת כבקרה בניסוי, באמצעותה ניתן לראות שרק כאשר יש תצמיד אנטיגן עם נוגדן ייחודי (הנוגדן הראשוני) ותצמיד נוגדן ראשוני עם נוגדן שניוני שאליו קשור האנזים, מתקבל תוצר בצבע צהוב.

הבקרה מוכיחה שהנוגדן השניוני לא נקשר לאנטיגן.

שאלה 4:

- א. מדוע חשוב היה להוסיף לכל הבאריות אנטיגן בריכוז זהה?
ב. הסבירו מדוע חשוב להוסיף את הנוגדן השניוני גם לבאריות אליהן לא הוספנו את הנוגדן הראשוני?

תשובות:

- א. הוספת אנטיגן בריכוז זהה הוא חלק משמירה על הגורמים הקבועים בבדיקה. הוספת אנטיגן בריכוזים שונים תגרום לקשירת נוגדנים בריכוזים שונים, על פי ריכוזו של האנטיגן ולא תאפשר יצירת עקום כיול על פי עוצמת הצבע שתתקבל בתום הבדיקה.
ב. חשוב להוסיף את הנוגדן השניוני לכל הבאריות על מנת לוודא שמה שגורם ליצירת תוצר צהוב הוא תצמיד אנטיגן - נוגדן (הנוגדן הראשוני מהווה אנטיגן עבור הנוגדן השניוני שאליו קשור אנזים) ולא העדר של שני המרכיבים. כמו כן, העדר תוצר בצבע צהוב בבאריות שמכילות את הנוגדן השניוני מצביע על כך שהנוגדן השניוני לא נקשר לאנטיגן (חלבון המדמה את חלבון במעטפת נגיף הקורונה)

שאלה 5:

מדוע לדעתכם משתמשים בתמיסת NaOH בעלת pH 10 לעצירת התהליך בסעיף 22.

תשובה:

תהליך בו מתקבל תוצר בצבע צהוב הוא תהליך אנזימטי, כאשר נוסף תמיסת NaOH בעלת pH 10 (חומר בסיסי) תתרחש דנטורציה של האנזים הקשור לנוגדן שניוני וכתוצאה מכך התגובה תפסק.

שאלה 6:

השוו את עוצמת הצבע שתתקבל בבאריות שהכילו את הדגימות "נעלם א" ו"נעלם ב" לעוצמת הצבע שהתקבל בבאריות בשורה B או בשורה G והעריכו מהו ריכוז הנוגדן בבארית המכילה את "נעלם א" ובבארית המכילה את "נעלם ב".
ריכוז הנוגדן ב"נעלם א" _____
ריכוז הנוגדן ב"נעלם ב" _____
היעזרו בטבלה 1 והסבירו על מה מבוססת הערכתכם.

תשובה:

ריכוז הנוגדנים בדגימת ה"נעלם א" היא $500 \mu\text{g/ml}$ (בהתאם לעוצמת הצבע שהתקבלה בבארית המכילה את הדגימה) בדגימת ה"נעלם ב" לא נמצאו נוגדנים.

שאלה 7:

על פי הערכת ריכוז הנוגדנים בדגימות של התאומים קבעו מי מהם חלה בקורונה? נמקו את תשובתכם.

תשובה:

הופעת תוצר בצבע צהוב בדגימת "נעלם א" מצביעה על נוכחות הנוגדנים בדגימה, לכן ניתן להסיק שאבי, לו שייכת הדגימה, נדבק בנגיף הקורונה, לעומת זאת בדגימת ה"נעלם ב", לא נוצר תוצר צבעוני בתום הבדיקה, מה שמצביע על העדר נוגדנים בדגימה, לכן ניתן להסיק שדפנה לא נדבקה בנגיף הקורונה ועליה להתחסן או לבצע בדיקה לפני הגעתה לבית מלון.

שאלה 8:

בשלבי בדיקה השונים התבקשתם להעביר את הפלטה לאינקובטור, הסבירו מדוע.

תשובה:

טמפרטורה מעלה את מהירות התנועה של אטומים ומולקולות, מגבירה כך את הסיכוי שיתנגשו, ולכן גם את קצב הריאקציה.