



ג' באייר תשפ"ב

4.5.22

לתלמיד

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

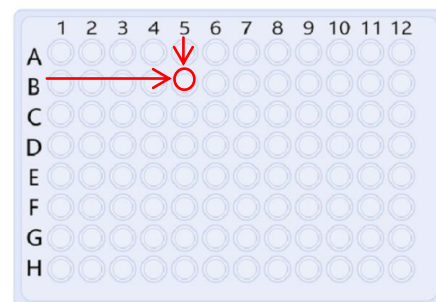
(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

אבי ודפנה הם תאומים בני 16 שנים אשר מעוניינים לחגוג את יום הולדתם יחד עם הוריהם, באחד מבתי המלון באילת. ככל הידוע, התאומים לא חלו בקורונה אף כי הוריהם חלו לפני כחודש. רופא המשפחה המליץ לתאומים להיבדק לנוכחות נוגדנים לנגיף הקורונה. הרופא הסביר כי אם בבדיקת דמם ימצאו נוגדנים כנגד הנגיף הם יחשבו כמחלימים, ואם לא, יצטרכו להתחסן או לעבור בדיקת קורונה.

באמצעות הערכה שבה תשתמשו תוכלו להעריך את ריכוז הנוגדנים בדמם של התאומים ולהמליץ להם כיצד לנהוג.

הכרת פלטת ELISA

בפלטה שעל שולחנכם יש 96 באריות (שקעים) המסודרות ב-12 טורים וב-8 שורות (ראו איור 1). הפלטה עשויה מחומרים מיוחדים אליהם נקשרים חלבונים (כגון אנטיגנים, נוגדנים). קישור החלבונים אינו ספציפי ובלתי הפיך. לכל בארית בפלטה יש "כתובת", כלומר שם השורה ומספר הטור, לדוגמה: בארית B5.



איור 1: מבנה פלטת ELISA

כלים לשני זוגות תלמידים העובדים עם אותה פלטה

- פלטת ELISA
- רצועת נייר פאראפילם המתאימה בגודלה לכיסוי הפלטה
- כלי לפסולת ובו שקית פסולת המסומנת BIOHAZARD
- מעמד למבחנות אפנדורף
- 12 מבחנות אפנדורף ריקות
- 2 עטים לסימון על זכוכית, כל עט בצבע אחר
- 2 מיקרופיפטורים המתאימים לנפח של 100µl - 1000µl וטיפים מתאימים
- משטח לשימוש חד פעמי המיועד לכיסוי שולחן, או מגבות נייר

חומרים לזוג תלמידים העובד עם אותה פלטה

- * כוס כימית המכילה תמיסת שטיפה המסומנת "תמיסת שטיפה"
- * כלי ובו קרח גרוס המסומן "זוג 1" ו- "זוג 2", כל כלי מכיל את מבחנות האפנדורף האלה:
 - מבחנה המסומנת "V" ובה תמיסה המדמה את חלבון המעטפת שלנגיף הקורונה (אנטיגן).
 - מבחנה המסומנת "M" ובה חלבון ממסך
 - מבחנה המסומנת "Ab" ובה נוגדן כנגד חלבון המעטפת של נגיף הקורונה (נוגדן ראשוני)
 - מבחנה המסומנת "Ab2-E" ובה נוגדן שאליו קשור אנזים (נוגדן שניוני)
 - מבחנה המסומנת "S" ובה מצע (סובסטרט) של האנזים
 - מבחנה המסומנת "נעלם א" ובה דגימות פלסמה מהדם של אבי
 - מבחנה המסומנת "נעלם ב" ובה דגימות פלסמה מהדם של דפנה
 - מבחנה ובה נתרן הדרוקסידי המסומנת "NaOH"

מהלך הבדיקה

1. סמנו בעט סימון על זכוכית את הגבול של כל אחת מהבאריות שבהן תעבדו (ראו תמונה 1).



התלמידים מזוג 1 יסמנו בצבע אחד את הבאריות האלה: A1-A2, B1-B6, C5-C6 שמותם בצד הפלטה.

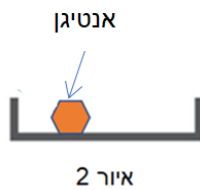
התלמידים מזוג 2 יסמנו בצבע אחר את הבאריות האלה: F7- F 8, G7-G12, H11-H12 ויוסיפו את שמותם בצד הפלטה.

תמונה 1: סימון הבאריות בפלטת ה-ELISA

שלב א: קשירת אנטיגן (חלבון המדמה את החלבון במעטפת נגיף הקורונה)

לפלטת ELISA (ראו איור 2).

הערה: בשלב זה ובשלב הבא יקרא אנטיגן.



2. בעזרת מיקרופיפטור מתאים, העבירו $100\mu\text{l}$ ממבחנת האפנדורף המסומנת "V" שבה האנטיגן (חלבון נגיף הקורונה), לכל אחת מהבאריות שסימנתם.

3. כסו את פלטת ELISA ברצועת נייר פאראפילם.

4. הניחו את הפלטה באינקובטור שהטמפרטורה בו היא 37°C . רשמו את השעה: _____

המתינו 5 דקות.

בזמן ההמתנה פָּרְסוּ על השולחן 4 שכבות של מגבות נייר והציבו את כלי הפסולת על יד המגבות.

השיבו על שאלה 1.

שאלה 1:

בשלב א הוספתם אנטיגן לבאריות שבפלטה.

א. אילו הייתם מוסיפים בנוסף לאנטיגן זה גם חלבונים מנגיפים אחרים, האם כל החלבונים שנוספו היו נקשרים? נמקו את קביעתכם.

ב. מדוע הוספנו רק את האנטיגן של נגיף הקורונה?

כעבור 5 דקות מהשעה שרשמתם בסעיף 4 בצעו את סעיף 5.

5. שטיפת הפלטה בתמיסת שטיפה והרחקת שאריות האנטיגן שלא נקשרו לבאריות.

עשו זאת כך ([העזרו בסרטון](#) המדגים את תהליך השטיפה):

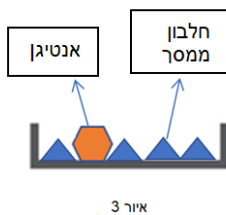


תהליך השטיפה



- א. הוציאו את הפלטה מהאינקובטור והסירו את הנייר פאראפילם.
- ב. הפכו את הפלטה מעל כלי הפסולת ושפכו לתוכו את הנוזל שבתוך הבאריות. כדי להיפטר משאריות הנוזל, החזיקו את הפלטה ביד אחת כאשר פתח הבאריות כלפי מטה ודפקו 5 פעמים עם הפלטה על גבי מגבות הנייר.
- ג. על שולחנכם כלי המסומן "**תמיסת שטיפה**". בעזרת המיקרופיפטור המתאים העבירו 370 מל של תמיסת שטיפה לכל אחת מהבאריות המסומנות ורוקנו את תמיסת השטיפה מהבאריות לכלי הפסולת כפי שמתואר בסעיף ב.
- ד. חזרו פעם נוספת על תהליך המתואר בסעיף ג.
- ה. העבירו את הנייר לכלי לפסולת.

שלב ב: קישור חלבון ממסך לפלטת ELISA (ראו איור 3)



לידיעתכם:
החלבון הממסך נקשר לפלטה במקומות אליהם לא נקשר האנטיגן ועל ידי כך מונע קשירת מולקולות חלבונות אשר תתווספה בשלבים הבאים.

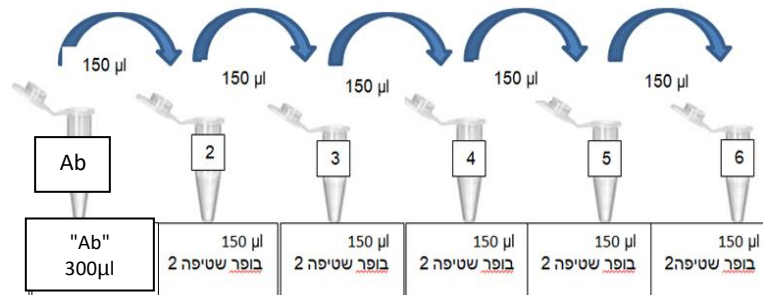
6. בעזרת מיקרופיפטור מתאים העבירו 100 מל חלבון ממסך ממבחנת אפנדורף המסומנת "M" לכל אחת מהבאריות שסימנתם. כסו את הפלטה.
 7. הניחו את הפלטה באינקובטור שהטמפרטורה בו היא 37°C .
 8. השאירו את הפלטה באינקובטור עד תום תהליך הכנת המהולים המתואר בסעיף 9.
 9. הכנת מהולים כפולים של נוגדן כנגד האנטיגן לפי הפירוט ולפי טבלה 1 בעמוד 6.
- לידיעתכם:** בשלב זה ובשלבים הבאים נוגדן זה יקרא "נוגדן ראשוני".

- א. סמנו 5 מבחנות אפנדורף ריקות במספרים 2-6.
- ב. בעזרת מיקרופיפטור מתאים העבירו 150 מל של תמיסת שטיפה לכל אחת מהמבחנות שסימנתם.
- ג. היעזרו באיור 4 והעבירו 150 מל תמיסת נוגדן מהמבחנה שבכלי עם הקרח המסומנת "Ab" למבחנה המסומנת "2".



- ד. ערבבו את הנוזל במבחנה המסומנת "2" על ידי העלאה והורדה של הנוזל באמצעות המיקרופיפטור. הכניסו את המבחנה לכלי המכיל קרח.
- ה. החליפו טיפ. העבירו $150 \mu\text{g}$ תמיסת נוגדן ממבחנת אפנדורף המסומנת "2" למבחנה המסומנת "3". ערבבו את הנוזל במבחנה, אליה העברתם את התמיסה, על ידי העלאה והורדה של הנוזל באמצעות המיקרופיפטור.
- ו. חזרו על ההוראות בסעיף ה' :

- עם מבחנה המסומנת "4" אליה תעבירו $150 \mu\text{g}$ ממבחנה המסומנת "3".
- עם מבחנה המסומנת "5" אליה תעבירו $150 \mu\text{g}$ ממבחנה המסומנת "4".
- עם מבחנה המסומנת "6" אליה תעבירו $150 \mu\text{g}$ ממבחנה מסומנת "5".

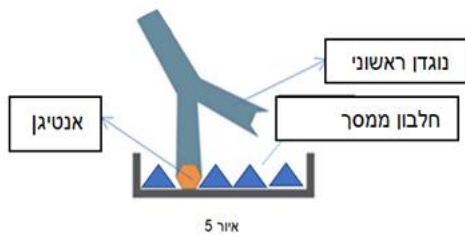


איור 4: תיאור הכנת מיהולים כפולים של הנוגדן הראשוני

טבלה 1: חישוב הריכוזים הסופיים המתקבלים במבחנות מיהול הנוגדן הראשוני.

מספר מבחנה	נפח תמיסת השטיפה במבחנה (μg)	נפח הנוגדן במבחנה (μg)	ריכוז הנוגדן המוסף ($\mu\text{g/ml}$)	ריכוז הסופי של הנוגדן המתקבל ($\mu\text{g/ml}$)
Ab	-	300	1000	1000
2	150	150	1000	500
3	150	150		
4	150	150		
5	150	150		
6	150	150		

01. **שטיפת הפלטה:** בתום תהליך הכנת המהולים בצעו את **תהליך השטיפה** כפי שמתואר בעמוד 4. תהליך זה נועד להרחיק מולקולות של חלבון ממסך שלא נקשרן לבארות.



שלב ג: הוספת נוגדן הספציפי לאנטיגן

(ראו איור 5).

בשלב זה תוסיפו לבאריות המסומנות תמיסות של הנוגדן הראשוני שריכוזן ידוע ואת תמיסות "נעלם א" ו"נעלם ב" המכילות דגימות פלסמה של אבי ודפנה.

אין להוסיף את הנוגדן לבאריות המסומנות ב-X.

טבלה 2: הבאריות אליהן תעבירו את התמיסות



11. הוראות עבודה לזוג 1

- בעזרת מיקרופיפטור מתאים, העבירו 100µl של תמיסת נוגדן מהמבחנה המסומנת Ab לבארית המסומנת Ab בשורה B.
- העבירו 100µl של תמיסת נוגדן מהול מהמבחנות המסומנות 2-6, לבאריות המסומנות 2-6 שבשורה B בהתאמה.
- בעזרת מיקרופיפטור מתאים, העבירו 100µl מהמבחנה המסומנת "נעלם א" אל הבארית המסומנת "נעלם א" שבשורה A. החליפו טיפ.



ד. העבירו $100\mu\text{m}$ מהמבחנה המסומנת "נעלם ב" אל הבארית המסומנת "נעלם ב" שבשורה A.

הוראות עבודה לזוג 2

- א. בעזרת מיקרופיטור מתאים, העבירו $100\mu\text{m}$ של תמיסת נוגדן מהמבחנה המסומנת Ab לבארית המסומנת Ab בשורה G.
- ב. בעזרת מיקרופיטור מתאים, העבירו $100\mu\text{m}$ של תמיסת נוגדן מהול מהמבחנות המסומנות 6-2, לכל אחת מהבאריות 6-2 שבשורה G בהתאמה.
- ג. בעזרת מיקרופיטור מתאים, העבירו $100\mu\text{m}$ מהמבחנה המסומנת "נעלם א" אל הבארית המסומנת "נעלם א" שבשורה F. החליפו טיפ.
- ד. העבירו $100\mu\text{m}$ מהמבחנה המסומנת "נעלם ב" אל הבארית המסומנת "נעלם ב" שבשורה F.

21. כסו אתהפלטה בנייר פאראפילם.

31. העבירו את הפלטה לאינקובטור שהטמפרטורה בו 37°C למשך 5 דקות.

רשמו את השעה: _____.

- בזמן ההמתנה פרסו על השולחן 4 שכבות של מגבות נייר והציבו את כלי הפסולת ליד המגבות.

השיבו על שאלות 2-3.

שאלה 2

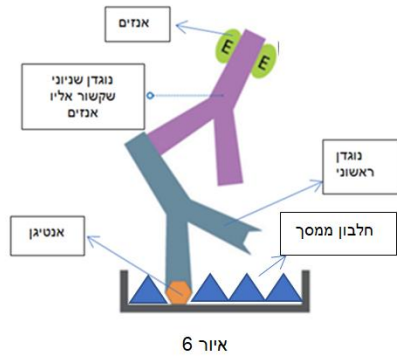
- א. מדוע חשוב להוסיף חלבון ממסך בשלב ב'?
- ב. מה היה קורה אילו היינו מוסיפים את החלבון הממסך לפני הוספת האנטיגן לפלטה?

שאלה 3

מדוע לא הוספנו נוגדן ראשוני לבאריות C5-C6 ולבאריות H11-H12?

41. **שטיפת הפלטה:** בתום 5 דקות מהשעה שרשמתם בסעיף 13 בצעו את תהליך השטיפה כפי שמתואר בעמוד 4. תהליך זה נועד להרחיק את המולקולות של הנוגדן הראשוני שלא נקשרו לאנטיגן.

שלב ד': הוספת נוגדן שניוני



איור 6

בשלב זה תוסיפו לבאריות את הנוגדן השניוני שקשור אליו אנזים, נוגדן זה יקשר לנוגדן הראשוני.
51. בעזרת מיקורפיטור מתאים העבירו $100\mu\text{m}$ של הנוגדן השניוני ממבחנת אפנדורף המסומנת "Ab2-E" לכל הבאריות המסומנות.

61. הניחו את הפלטה באינקובטור שהטמפרטורה בו היא 37°C למשך 5 דקות.
רשמו את השעה: _____.

- בזמן ההמתנה פרסו על השולחן 4 שכבות של מגבות נייר והציבו את כלי הפסולת ליד המגבות.

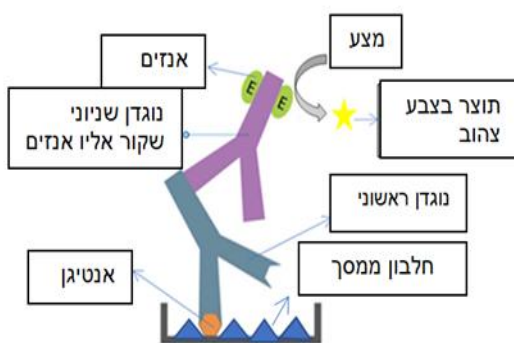
השיבו על שאלה 4.

שאלה 4

- מדוע חשוב להוסיף לכל אחת מהבאריות אנטיגן בריכוז זהה?
- הסבירו מדוע חשוב להוסיף את הנוגדן השניוני לבאריות אליהם לא הוספנו את הנוגדן הראשוני?

71. **שטיפת הפלטה:** בתום 5 דקות מהשעה שרשמתם בסיף 16 בצעו את תהליך השטיפה כפי שמתואר בעמוד 4. תהליך זה נועד להרחיק את המולקולות של הנוגדן השניוני שלא נקשר לנוגדן הראשוני.

שלב ה': הוספת מצע ייחודי לאנזים (ראו איור 7)



איור 7

לידיעתכם:

- לתוצר של פעילות האנזים צבע צהוב.
- ככל שריכוז הנוגדן הראשוני בדגימה של הנבדק גבוה יותר, כך יהיו יותר מולקולות אנזים בבארית, וכך עוצמת הצבע הצהוב תהיה גבוהה יותר.



בעזרת מיקרופיטור מתאים הוסיפו 200 מצע מהמבחנה המסומנת "S" לכל הבאריות המסומנות.

81. כסו את הפלטה בנייר פאראפילם.
91. הניחו את הפלטה באינקובטור שהטמפרטורה בו היא 37°C למשך 5 דקות.
רשמו את השעה: _____.
02. כעבור 5 דקות מהשעה שרשמתם בסעיף 20 הוציאו את הפלטה והביטו בשינויי הצבע שהתקבלו בכל הבאריות. אם טרם הופיעה הדרגתיות בעוצמת הצבע בשורות B ו-G, החזירו את הפלטה לאינקובטור והמתינו 5 דקות נוספות. (אם הצבע לא מופיע תוך 20 דקות השאירו את הפלטה באינקובטור עד ליום למחרת ובדקו שוב.
12. לאחר שתבחינו בכך שעוצמת צבע הנוזל בבאריות בשורה B וגם בשורה G היא הדרגתית, הפסיקו את התהליך האנזימטי על ידי הוספת $100\mu\text{L}$ נתרן הדרוקסידי ממבחנת אפנדרוף המסומנת NaOH לכל בארית.

שאלה 5:

מדוע לדעתכם התבקשתם להשתמש בתמיסת NaOH שלה $\text{pH} = 10$ בכדי לעצור את התהליך שהתבצע בסעיף 21.

שאלה 6:

- א. השוו את עוצמת הצבע שהתקבלה בבאריות שהכילו את דגימות "נעלם א" ו"נעלם ב" לעוצמת הצבע שהתקבלה בבאריות בשורה B או בשורה G.
 - ב. העריכו את ריכוז הנוגדן ב:
 - בארית המכילה את "נעלם א"
 - בארית המכילה את "נעלם ב"
- היעזרו בטבלה 1 והסבירו על מה מבוססת הערכתכם.

שאלה 7:

על פי הערכת ריכוז הנוגדנים בדגימות שנלקחו מהתאומים קיבעו מי מהם חלה בקורונה? נמקו את תשובתכם.

שאלה 8:

בשלבי הבדיקה התבקשתם להעביר את הפלטה לאינקובטור, הסבירו מדוע.



תרשים המסכם את תהליך הבדיקה:

מספר שלב	פעולה המבוצעת בשלב
1	הוספת אניטיגן לבאריות
2	הדגרה באינקובטור למשך 5 דקות
3	שטיפת הבאריות
4	הוספת חלבון ממסך לבאריות
5	הדגרה באינקובטור (עד תום תהליך הכנת התמיסות הנוגדן הראשוני)
6	הכנת תמיסות נוגדן ראשוני
7	שטיפת הבאריות
8	הוספת נוגדן ראשוני לבאריות
9	הדגרה באינקובטור למשך 5 דקות
10	שטיפת הבאריות
11	הוספת נוגדן שניוני לבאריות
12	הדגרה באינקובטור למשך 5 דקות
13	שטיפת הבאריות
14	הוספת סובסטרט
15	הדגרה באינקובטור עד לקבלת מדרג צבעים בבאריות

טבלה המסכמת את החומרים המוספים לכל בארית:

באריות	אניטיגן	חלבון ממסך	נוגדן ראשוני	נוגדן שניוני	סובסטרט
F1/A1	X	X	X	X	X
F2/A2	X	X	X	X	X
G1-G6/B1-B6	X	X	X	X	X
H5-H6/C5-C6	X	X		X	X