

דף ללבורנט: ערכה לאבחון הנגיף SARS-CoV-2 – ערכת דמה

הערכה מדגימה בדיקות נוכחות הנגיף SARS-CoV-2 לנבדקים שונים. ה-DNA בערכה איננו של נגיף הקורונה אלא מקטעי DNA שעברו אישור בטיחות. מידע על ציוד וחומרים הנדרשים לביצוע הגברה של מקטעי DNA שמקורם מתיעתוק במהופך של RNA נגיפי ל-DNA. ההגברה מתבצעת במכשיר PCR נזהה את הגנים הנגיפיים בשיטת האלקטרופורזה בג'ל. צריך להקפיד כל כללי הבטיחות. התלמידים יעבדו רק עם חלוקים, כפפות, משקפי מגן ושיער אסוף.

דפים ללבורנט

נושא: זיהוי גנים של זנים שונים של הנגיף SARS-CoV-2

בניסוי התלמידים יקבלו דגימות DNA שמקורם בנבדקים שונים, יגבירו גנים המאפיינים את הנגיף בעזרת PCR ויזהו את הגנים הייחודיים לנגיף בשיטת האלקטרופורזה בג'ל כך שיוכלו לקבוע איזה מהנבדקים חולה בקורונה. כמו כן יזהו זנים שונים של הנגיף על ידי הגברה של מקטעי DNA ייחודיים לכל זן ושימוש באנזים רסטריקציה.

למידע נוסף מומלץ לקרוא בדפים למורה.

הצלחת הניסוי תלויה בהקפדה על ביצוע כל ההנחיות המפורטות בהמשך ובכלל זה גם התייעצות

עם המורה והרכז לגבי מועד ביצוע הניסוי ובדיקת התוצאות.

עבודה מדויקת של הלבורנט בכל שלבי הביצוע כגון:

- הכנת תמיסות ומצעי גידול בריכוזים המתבקשים.

- הכנת החומרים לפי לוח הזמנים.

- שמירה על טמפרטורה ותנאי אחסון רצויים לפי ההנחיות.

- זריעת חיידקים ועבודה בתנאים סטריליים (ראו ["עבודה במעבדה במיקרוביולוגיה" סרט ודפי](#)

[הנחיה](#)).

ערכה לביצוע הניסוי: בתי הספר המנויים במרכז לפיתוח ולתמיכה במעבדות ביולוגיה יוכלו להזמין

ערכה שבה יהיו חלק מהחומרים ומהציוד שנדרשים לביצוע הניסוי. ניתן לבצע את הבדיקות בשתי רמות:

א. רמת זיהוי הנגיף בלבד כלומר בדיקת זיהוי חולה / נשא או בריא (בדיקות 1, 5 בלבד – ראו פירוט בדף למורה)

ב. בדיקת זיהוי זנים שונים של הנגיף קורונה (בדיקות 1 עד 5 ראו פירוט דף למורה)

הערכה מיועדת עד ל-8 קבוצות של תלמידים (ברמת זיהוי הנגיף בלבד) שבכל קבוצה יעבדו 2-4 תלמידים (ראו טבלה 2 פירוט בעמוד 3) או ל-4 קבוצות תלמידים ברמת זיהוי הזנים השונים של הנגיף.

לפני הזמנת הערכה מבר אילן, חשוב מאוד לקרוא בעיון את רשימות הכלים והחומרים אותם יש להכין ואת אלו שכלולים בערכה (עמ' 3 - 8) ולבדוק האם יש לכם בבית הספר את כל שנדרש לביצוע הניסוי. אם חסרים לכם פריטי ציוד חשוב שתרכשו אותם בהקדם אצל ספקי הציוד למעבדות או תבדקו אפשרות לשאול אותם מבית ספר אחר. כך תוכלו לבצע את הניסוי במועד סמוך לקבלת הערכה מבר אילן.

נהלי הזמנת ערכה: את הערכה יש להזמין מהמרכז לפיתוח ותמיכה בבר אילן, כשלושה שבועות לפני המועד שנבחר לביצוע הניסוי עם התלמידים. הלבורנט יתקשר למרכז ויבדוק עם הצוות מהו המועד המתאים להגעת שליח מטעם בית הספר. בהתאם להנחיות שהלבורנט יקבל, הוא יזמין שליח שיגיע לבר אילן, יקבל את הערכה וימסור אותה ללבורנט בביה"ס.

לתשומת לבכם:

- חשוב לבצע את הניסוי לא יאחר **משבוע מיום קבלת הערכה בבית הספר**.
- בית הספר יישא בהוצאות משלוח הערכה מבר אילן או שידאג לנציג מטעמו שיבצע איסוף עצמי.

תמיכה והתארגנות: בכל שאלה הקשורה להכנת הניסוי ניתן להתקשר למרכז לפיתוח ולהתייעץ עם הלבורנטיות שהתמחו בניסוי זה.

בכל שנה תתקיימנה במרכז השתלמויות למורים וללבורנטים בנושא ביולוגיה מולקולרית. אנו ממליצים לכם לעקוב באופן שוטף אחר המידע שיתפרסם בנושא זה [באתר המרכז](#).

בטיחות בעבודת ההכנה של הלבורנט ובעבודת המורה והתלמידים: כל החומרים ודגימות של ה DNA שתקבלו ממרכז הפיתוח והתמיכה עברו אישור בטיחותי

מטעמי זהירות אנו מחויבים לעבוד עם כל הערכה במשנה זהירות ובתנאים סטריליים. לפיכך, כבר בשלב תכנון הניסוי חובה עליכם לקרוא בעיון את הסעיפים הרלוונטיים [בחוזרי הבטיחות](#) המתפרסמים באתר מפמ"ר ביולוגיה ולעבוד על פי ההנחיות שהתפרסמו בהם ("חוזר המנכ"ל החדש והמעודכן לבטיחות במעבדה מרץ 2015", "הנחיות לשמירה על בטיחות בעבודה במעבדה לביולוגיה", "עבודה במעבדה במיקרוביולוגיה").

ראוי לציין כי הקפדה על ההנחיות כוללת גם את הטיפול בפסולת ביולוגית במהלך הניסוי ובסיומו, ניקוי משטחי העבודה ורחיצת ידיים בסיום העבודה.

הערה: הנחיות ייחודיות לעבודה לפי כללי בטיחות בניסוי כלולות במסמך זה ובדפים לתלמיד.

הלבורנט חייב להקפיד ולעבוד על פי הנחיות הבטיחות בזמן שהוא מכין את הכלים והחומרים לניסוי ולהדריך את המורים והתלמידים בהנחיות אלה לפני ביצוע הניסוי ובמהלכו.

בטבלאות ובנספחים שבעמודים הבאים מוצג מידע על ההתארגנות לקראת ביצוע הניסוי:

בטבלה 1, מידע על הפריטים שבערכה שתסופק על ידי המרכז לפיתוח ותמיכה בבר אילן (עמ' 3).

- בטבלה 2, מידע על הציוד שימצא על שולחן המורה בעת ביצוע הניסוי (עמ' 3).
- בטבלה 3, מידע על הכלים והחומרים שהלבורנט צריך כדי להכין את כל הנדרש לכיתה ולכל קבוצת תלמידים (עמ' 5).
- בנספח 1, רשימת כלים וחומרים לשיעור הכנה ותרגול לתלמידים.
- בנספח 2, מידע על טיפול באקונומיקה בסיום הניסוי.

לתשומת לבכם:

לפני תחילת העבודה חשוב מאד לנקות את שולחן העבודה של הלבורנט בכוהל 70%.
לאחר שהכוהל יתייבש, על פי הצורך יש לעבוד בקרבת להבה דולקת.

בתום העבודה יש לנקות את המשטח בכוהל ולעקר את הציוד על פי ההנחיות ב "[חוזר המנכ"ל החדש והמעודכן לבטיחות במעבדה מרץ 2015](#)", הבטחת הבטיחות במעבדות עמ' 48 - 50.

טבלה 1: פריטים בערכה שתסופק על ידי המרכז לפיתוח ותמיכה וישמשו

להכנת חומרים בנוסף על אלה שמצוינים בטבלאות 2,3

שימוש בפריט בטבלה 3	לוח זמנים לעבודה עם הפריט	תנאי אחסון וזמן מתאים לאחסון	לקבוצת תלמידים (ראו פרוט בטבלאות 2, 3) כלים וחומרים
	הפשרה כחצי שעה לפני תחילת הניסוי	שמירה בהקפאה עד שלושה חודשים	חמש מבחנות המסומנות: DNA1, DNA2, DNA3, DNA4, DNA5 (בדף למורה מצוי פירוט הזן המצוי ככל מבחנת DNA)
	הפשרה כחצי שעה לפני תחילת הניסוי	שמירה בהקפאה עד שלושה חודשים	מבחנה ובה Mix Taq PCR
	הפשרה כחצי שעה לפני תחילת הניסוי	שמירה בהקפאה עד שלושה חודשים	חמש מבחנות פריימרים (תחלים) המסומנות: P1, P2, P3, P4, P5
	הפשרה כחצי שעה לפני תחילת הניסוי	שמירה בהקפאה עד שלושה חודשים	מבחנה ובה תמיסת בופר לאנזים EcoR1
	הפשרה כחצי שעה לפני תחילת הניסוי	שמירה בהקפאה עד שלושה חודשים	מבחנה ובה תמיסת BSA

	הניסוי	שלושה חודשים	
	הפשרה כחצי שעה לפני תחילת הניסוי	שמירה בהקפאה עד שלושה חודשים	מבחנה ובהתמיסת אנזים EcoR1

טבלה 2: ציוד וחומרים על שולחן המורה לביצוע PCR, חיתוך באנזימי

רסטריקציה ואלקטרופורזה בג'ל

מס'	שם הפריט תאור הפריט / מידע על הפריט	מסופק על ידי:	יונח על שולחן / לקבוצה
1	אלקטרופורזה בג'ל MINIONE הערכה כוללת מכשיר אלקטרופורזה בג'ל. שתי תבניות להכנת 4 ג'לים ושני מסרקים ליצירת באריות. הנחיות בעברית להפעלת המכשיר אם המכשיר של חברה אחרת יש לבצע התאמת כמויות של החומרים	בר אילן	2
2	מכשיר PCR אחד (או שבאותו מכשיר יש להפעיל שתי תוכניות הגברה שונות)	בר אילן	1
3	מכשיר מיניצנטריפוגה וורטקס	בר אילן	1
4	פלטות חימום עם בוחש מגנטי או מיקרוגל יש להוסיף ארלנמאירים בנפח 150 – 250 מ"ל להכנת הג'ל.		
5	בלוק חימום מכון ל 37°C	בר אילן	1
6	מיקרופיפטור בנפח 0.5-10 µL	בר אילן	1

7	פח מרכזי ובו שקית Biohazard להשלכת פסולת ביולוגית		1
*8	קרח כתוש בכמות מספיקה לפי מספר הקבוצות. וקרח נוסף למילוי חוזר של		בהקפאה
9	כפפות ניטריל מדיום ולארג' במגוון מידות		
10	בקבוק עם אתנול 70% לחיטוי משטחי העבודה		
*11	מבחנת אפנדורף אטומה לאור (שחורה) מסומנת "SM" ובה צבע SMART GLOW לצביעת DNA. יש לאחסן בחושך במקרר. בזמן המתאים יש להוסיף 3 μ L צבע מסוג SMART GLOW לכל 50 מ"ל ג'ל אגרוז. <u>הסבר ראו פריט 38</u>	בר אילן	15 μ L לכל 4 קבוצות 50 מ"ל תמיסת אגרוז מספיקה להכנת שני ג'לים
*12	בקבוק ובו תמיסת בופר TAE בנפח של כ 150 מ"ל לכל קבוצה. הבופר יכול לשמש מספר הרצות במכשיר האלקטרופורזה. אם מכשיר האלקטרופורזה של חברה אחרת יש לבצע התאמת כמויות של הבופר	בר אילן	600 מ"ל או יותר תלוי במספר
*13	מבחנת אפנדורף המסומנת "BSA" ובה 10 μ L תמיסת BSA	בר אילן	לשמור בהקפאה עד לשימוש ובקרח לאורך כל השימוש
14	מבחנת אפנדורף מסומנת "בופר" ובה 10 μ L תמיסת בופר	בר אילן	לשמור בהקפאה עד לשימוש ובקרח לאורך כל השימוש
15	מבחנת אפנדורף מסומנת "EcoR1" ובה 6 μ L תמיסת האנזים EcoR1	בהקפאה	לשמור בהקפאה עד לשימוש ובקרח לאורך כל השימוש
16	מבחנה המסומנת "LADDER" ובה 7 μ L DNA LADDER	בר אילן	לשמור במקרר עד השימוש
17	מבחנה המסומנת "mix taq" ובה בכמות בהתאם למספר הקבוצות שהוזמן.	בר אילן	לשמור בהקפאה עד לשימוש ובקרח לאורך כל השימוש
18	מבחנה המסומנת "C1" ובה תמיסת פריימר C1 בנפח מתאים למספר הקבוצות שהוזמן	בר אילן	לשמור בהקפאה עד לשימוש ובקרח לאורך כל השימוש
19	מבחנה המסומנת "C2" ובה μ L תמיסת פריימר C2 בנפח מתאים למספר הקבוצות שהוזמן	בר אילן	לשמור בהקפאה עד לשימוש ובקרח לאורך כל השימוש

20	מבחנה המסומנת "C3" תמיסת פריימר C3	בר אילן	לשמור בהקפאה עד לשימוש ובקרה לאורך כל השימוש
21	מבחנה המסומנת "C4" ובה תמיסת פריימר C4 בנפח מתאים למספר הקבוצות שהוזמן	בר אילן	לשמור בהקפאה עד לשימוש ובקרה לאורך כל השימוש
22	מבחנה המסומנת "C5" ובה תמיסת פריימר C5 בנפח מתאים למספר הקבוצות שהוזמן	בר אילן	לשמור בהקפאה עד לשימוש ובקרה לאורך כל השימוש
23	מבחנת אפנדורף מסומנת "מים מזוקקים" ובה 100 μ L מים מזוקקים מעוקרים נטולי נוקלאזות (HPLC)	בר אילן	לשמור בקירור

טבלה 3: ציוד וחומרים על השולחן של כל אחת מקבוצות העבודה לביצוע PCR להגברת DNA שמקורו ב RNA נגיפי ואלקטרופורזה בג'ל לזיהוי הנגיף

מס'	שם הפריט תאור הפריט / מידע על הפריט	יונה על שולחן הקבוצה
הגברת גנים של נגיף הקורונה מנבדקים שונים ב PCR וזיהוי הגנים בג'ל		
25	מיקרופיפטור בנפח 20 μ L	בר אילן
26	מיקרופיפטור בנפח 200 μ L	בר אילן
27	כן / מעמד למבחנות אפנדורף ובו 5 מבחנות אפנדורף	1
28	כן / מעמד למבחנות PCR ובו 5 מבחנות PCR מעוקרות / סטריליות	בר אילן
29	קופסה ובה לפחות 25 טיפים המתאימים למיקרופיפטורים בנפח עד 200 μ L	1
30	נייר מגבת	3 ריבועים
31	עט לרישום על זכוכית המאפשר סימון דק ובולט	1
32	כפפות (רצוי כפפות ניטריל) כמספר חברי הקבוצה	לכל אחד מהתלמידים בקבוצה
33	משקפי מגן כמספר חברי הקבוצה	
34	חלוקים כמספר חברי הקבוצה	
35	כלי המסומן פסולת בנפח חצי ליטר ובו שקית	1

36*	כלי בנפח 300 - 400 מ"ל מסומן "אמבט קרח" ובו קרח אפשר כוס לשימוש חד פעמי גדולה		
37*	מבחנת אפנדורף מסומנת "SM" ובה צבע SMART GLOW לצביעת DNA. יש לאחסן בחושך במקרר עד לשימוש. כל קבוצה תוסיף ל 25 מ"ל לג'ל האגרוז בטמפרטורה של 50 מעלות. 2 – 3 μ L צבע SMART GLOW	בר אילן	15 μ L לכל 4 קבוצות תלמידים
38*	כלי המסומן "אגרוז" ובו 0.5 גרם אבקת אגרוז להכנת שני ג'לים בריכוז 1% אגרוז.	בר אילן	1 מספיק להכנת שני ג'לים
39	מבחנה מסומנת "TAE" ובה 50 מ"ל תמיסת בופר TAE אם מכשיר האלקטרופורזה של חברה אחרת יש לבצע התאמת כמויות של הבופר	בר אילן	מבחנה אחת לכל שני ג'לים

הסבר נוסף לפריטים המסומנים ב - *

פריט 8: קרח כתוש, להכנת כלי לקרח אפשר להשתמש בכוסות חד פעמיות לשתייה חמה (הניחו כוס בתוך כוס). ניתן לרכוש קרח שקיות עם קרח בסופר מרקט ולשמור עד לביצוע הניסוי.

פריט 12: בקבוק ובו תמיסת בופר TAE

הערה: במידה ואתם משתמשים במכשיר אלקטרופורזה שאינו מתוצרת Minione יש לבצע התאמות בנפחים של הבופר.

בופר הרצה: תמיסת בופר המשמשת למילוי מכשיר האלקטרופורזה.
לקראת ההרצה בג'ל יש להניח את הג'ל המוכן בתבנית הפרספקס במקום המתאים במכשיר.
יש למלא בזהירות בופר עד גובה הג'ל כך שיכסה את הבארות.
שימו לב: יש להקפיד על גובה תמיסת הבופר במכשיר. אין למלא מעל גובה הג'ל. עודפים ניתן לשאוב עם פיפטת פסטור.
בופר זה ניתן לשימוש חוזר עד 3 – 4 פעמים נוספות. בתום ההרצה בג'ל ואיסוף התוצאות. יש לנתק את המכשיר מהחשמל, להוציא את ההתבנית של הג'ל של המכשיר ובה הבופר ולהחזיר בזהירות לבקבוק.
יש לנגב את המכשיר היטב בעזרת נייר מגבת.

פריטים 17 – 24: מאחר והנפחים הנדרשים מאוד קטנים. המורה או הלבורנט יוסיף את הנפח הנדרש למבחנות התלמידים של כל אחד מהחומרים בצורה מרוכזת.

פריט 37*: מבחנת אפנדורף מסומנת "SM" ובה צבע SMART GLOW לצביעת DNA. יש לשמור במקרר עד השימוש במבחנה אטומה לאור.
ראו המשך בפריט 38.

פריט 38*: כלי המסומן "אגרז" ובו 0.5 גרם אבקת אגרז להכנת ג'ל אגרז.
ניתן להכין את הג'ל יום לפני הניסוי. לעטוף בנייר כסף ולשמור במקרר.

הוראות הכנה למגש אחד של ג'ל אגרז 1% המכיל שתי תבניות:

א. הכניסו 0.5 גרם אבקת אגרז לארלנמאייר בנפח 100 מ"ל והוסיפו 50 מ"ל בופר TAE. הכניסו את הארלנמאייר למיקרוגל למשך 20-30 שניות. מומלץ לכסות עם נייר (כלומר לפקוק על מנת שלא יתאדה ואז אחוזי הג'ל משתנים)
חיצרו על פעולה זו עד להמסת הג'ל וקבלת תמיסה צלולה.
אז: להוסיף בוחש מגנטי לכסות בנייר אלומיניום ולחמם על פלטת חימום עד לטמפרטורה של $90^{\circ}\text{C} - 93^{\circ}\text{C}$ בטמפרטורה זו האגרז מתמוסס.

שימו לב: בטמפרטורה גבוהה מזו התמיסה עלולה לגלוש.

ב. היעזרו בכפפות מתאימות (לכלים חמים), הוציאו את הארלנמאייר והניחו במקום חסין לחום כדי שיתקרר.

זהירות! בזמן הרתיחה לא ניתן להבחין בבועות אגרז שנשפך על היד מתקרר על היד ועלול לגרום לכוויה חמורה.

ג. יש לקרר את האגרז לטמפרטורה של 50°C ולהוסיף $5\mu\text{L}$ תמיסת צבע SMART GLOW במהירות. לערבב מעט על ידי טלטול עדין של הכלי ולשפוך במהירות לתבניות הג'ל.
בטמפרטורה מעט נמוכה יותר הג'ל נקרש. לאחר הוספת הצבע לא ניתן לחמם שוב את הג'ל.

ד. ברשותכם מסרק משותף לשתי תבניות אליהן מזגתם את הג'ל. מיזגו 25 מ"ל אגרז לכל אחת מתבניות הג'ל. הכניסו את המסרק לתבניתו והמתינו עד לקרישת הג'ל (כ- 10 – 15 דקות, תלוי בטמפרטורת החדר). **שימו לב:** אין להזיז את התבניות עד לקרישת הג'ל.

ה. כאשר הג'ל נקרש יש להוציא את המסרק בעדינות.