

למורה: הגברת גנים ב PCR וזיהוי גנים של הנגיף SARS-CoV-2 באמצעות אנזימי הגבלה ואלקטרופורזה בג'ל

ניתן לבצע את הבדיקות בשתי רמות: א. רמת זיהוי הנגיף בלבד כלומר בדיקת זיהוי חולה / נשא או בריא באמצעות PCR בלבד. ב. בדיקת זיהוי זנים שונים של הנגיף הקורונה באמצעות PCR ושימוש באנזימי הגבלה. הניסוי משלב שיטות עבודה בביולוגיה מולקולרית להגברת קטעי DNA באמצעות מכשיר ה- PCR עם חיתוך באנזימי הגבלה והפרדת מקטעי DNA באלקטרופורזה בג'ל.	תמצית מידע על הניסוי:
• עקרונות בהנדסה גנטית, בקרה על ביטוי גנים והנדסה גנטית – נושא העמקה • ביולוגיה של נגיפים – חיידקים ונגיפים בגוף האדם – נושא העמקה • מערכות ההגנה: נוגדנים, חיסון פעיל, נגיפים, זיכרון חיסוני • התא: מבנה התא האאקריוטי והפרוקריוטי, מבנה ה-DNA, הכפלת DNA, מ-DNA לחלבון, בקרת ביטוי גנים. • תהליכים אבולוציוניים: מוטציות, שונות גנטית.	מתאים לנושאים בתכנית הלימודים:
בחטיבה העליונה (כיתות יא, יב)	מתאים לתלמידים:
1. מבנה DNA, הכפלת DNA, מ-DNA לחלבון 2. מערכות הגנה בגוף האדם 3. פלסמיד כנשא של חומר תורשתי 4. ביולוגיה של נגיפים - נגיפי RNA 5. מהי תערובת האנזים <i>hermus aquaticus</i> - TAQ 6. מהו פריימר / תחל 7. מהי תערובת הבסיסים 8. העקרונות עליהם מבוססת שיטת ה-PCR ואת המחזוריות בתהליך 9. עקרונות אלקטרופורזה בג'ל 10. עקרון הפעולה של אנזים הגבלה (רסטריקציה) היכרות עם כלים ושיטות עבודה בביולוגיה מולקולרית: שימוש במיקרופיפטורים, שימוש במכשיר PCR, שימוש במכשיר אלקטרופורזה בג'ל. <u>מושגים:</u> נגיף, בסיסים חנקניים / נוקלאוטידים, הכפלת DNA, DNA פולימראז תחלים – פריימרים, תהליך ה-PCR, הדבקה, טפילות,	ידע קודם נדרש:

חיסון פעיל, נוגדנים, מוטציות, אנזים הגבלה.	
שיעור מבוא: חומר רקע נדרש ועקרונות ה-PCR. שני שיעורים במעבדה לביצוע תהליך ה-PCR. שיעור מבוא: אלקטרופורזה בג'ל עקרונות השיטה שיעור להכנת הג'ל. שיעור הרצת תוצרי ה-PCR בג'ל. שיעור אחד עד שניים לסיכום התוצאות ולדיון בתוצאות ובמסקנות. שיעור אחד עד שניים לחיתוך באנזימי הגבלה. שיעור אחד עד שניים לניתוח תוצאות החיתוך באנזימי הגבלה.	לוח זמנים מומלץ: 8 - 10 שיעורים
שילוב חשיבת חקר על כל שלביה מהתצפית ועד להסקת מסקנות תוך מתן דגש להבנת חשיבות הבקרה, חשיבותם של גורמים קבועים וחזרות במערך ניסוי.	אסטרטגיות חשיבה מסדר גבוה:
שימוש במיקרופיטור.	מיומנויות טכניות נדרשות
- מומלץ לפתוח את הפעילות בתירגול עבודה עם מיקרופיטורים. - אנטיביוטיקה, כמוסת הקסם – שימוש ב-PCR. - צבעי הקשת – תרגיל בשימוש בג'ל אגרוז.	ניסויים מקדימים שמומלץ שהתלמיד יתנסה בהם

רקע:

- על שיטת ה-PCR ניתן בניסוי המקדים: אנטיביוטיקה גלולת הקסם.
- רקע על שיטת אלקטרופורזה בג'ל ניתן בניסוי המקדים: "קשת צבעים".
- רקע על PCR ועל אלקטרופורזה בג'ל בדף לתלמיד.
- רקע על PCR ועל אלקטרופורזה בג'ל בחומרי הלמידה המומלצים לנושא ההעמקה "בקרת ביטוי גנים והנדסה גנטית".

אתר המרכז לפיתוח ותמיכה במעבדות בית הספר- אוניברסיטת בר אילן – בקישור זה

או בסריקת קוד ה-QR הבא:



מטרות

הערכה מזמנת לתלמיד פעילות חקר החוצה רמות ארגון בביולוגיה- החל מרמת המולקולה, DNA, דרך רמת התא ועד לרמת האורגניזם.

התלמידים יבינו את הקשר שבין תגלית מדעית, נוכחות גן שמקורו בבדיקות שנעשו לחולי קורונה, לבין שיטות יישומיות בביולוגיה מולקולרית לאבחון וזיהוי החומר התורשתי של הנגיף. הבנת תהליך ההדבקה ותהליך התרבות הנגיף בתאים והבנת יחסי הגומלין בין הנגיפים לתאים המאכסנים והשלכות של יחסי גומלין אלה על הגוף.

התלמידים יבינו שבדגימה שמקורה בחולה ישנו מידע תורשתי ייחודי לנגיף ובאמצעות שיטות מולקולריות ניתן לזהות אם האדם הנבדק נדבק בנגיף הקורונה ואם כן באיזה זן נדבק.

הערכה מזמנת פעילות מעשית בכיתה ומגוון רחב של אפשרויות לעבודת חקר במסגרת הביוחקר.

רקע ליסוי – זיהוי רצפי DNA שמקורם בגנום של נגיף ה-SARS-CoV-2

הערה: כל הניסוי נערך במערכת המדמה את החומר התורשתי של הנגיף. אין כל חשש להידבקות בנגיף על ידי שימוש בערכה.

כדי לחקור את המצאות / נוכחות ה-DNA שמקורו ב-RNA הנגיפי שבדרך כלל נבדק, יש צורך בהכפלת מקטע DNA ייחודי של הנגיף ולקבל כמות גדולה של המקטע המוגבר.

מכיוון ששיצירת DNA המהווה עותק של ה-RNA של הנגיף נעשית בתהליך שלא ניתן לביצוע במעבדת בית הספר (Reverse transcription PCR), התלמיד מקבל דגימות DNA, לאחר שעברו תהליך זה. כלומר, התלמיד אינו מקבל ישירות את החומר התורשתי של הנגיף.

כדי לקבל כמות DNA משמעותית, הניתנת לזיהוי, נשתמש במכשיר ה-PCR - Polymerase Chain Reaction.

טכנולוגיה ה-PCR מאפשרת לנו בסוף התהליך לצפות ב-DNA שמקורו ב-RNA הנגיפי שאינו נראה לעין ולזהות גנים ייחודיים באמצעות שיטת האלקטרופורזה בג'ל.

מחקר המבוסס על טכנולוגיות אלו תורם להבנה של עקרונות ותהליכים ביולוגיים כמו שונות בין יצורים שונים, להבין תהליכים אבולוציוניים, לאבחן מחלות תורשתיות, ולהבין את התרומה המשמעותית להיבטים של רפואה משפטית.

במהלך התהליך התלמיד יבצע הגברת כמה מקטעים ספציפיים מתוך דגימות ה-DNA שמדמות בדיקות של אנשים שונים.

מידע על הנגיף בנושאים:

להלן מקורות מידע שניתן להיעזר בהם להקניית רקע לתלמידים. יחד עם זאת, אנו מעודדים את המורה להכווין את התלמידים למציאת מקורות רקע בעצמם, וכן את המורה לבחור במקורות מידע אלה או אחרים, התואמים את האופן בו הוא משלב את הערכה בתכנית הלימודים. **כמו כן, להיעזר במקורות מידע עדכניים (למשל אודות וריאנטים שונים) שהתפרסמו מאז פותחה הערכה ונכתב דף זה.**

מעגל החיים של נגיף הקורונה. מכון דוידסון

או בסריקת קוד ה-QR הבא:



סקירה על נגיף הקורונה באתר הידען

או בסריקת קוד ה-QR הבא:



מידע על הנגיף SARS-CoV-2 באתר ויקיפדיה

או בסריקת קוד ה-QR הבא:



מפת התפוצה של הנגיף הקורונה

או בסריקת קוד ה-QR הבא:



על אופן העריכה של בדיקות קורונה

או בסריקת קוד ה-QR הבא:



[הסברים על נגיף הקורונה, על דרכי חיסון בערוץ של Dr. Seheult ביוטיוב](#)

או בסריקת קוד ה-QR הבא:



[הסברים נוספים על נגיף הקורונה בערוץ Ninja nerd ביוטיוב](#)

או בסריקת קוד ה-QR הבא:



נהלי בטיחות:

- במהלך השיעור התלמיד ילבש כפפות וחלוק וירכיב משקפי מגן.
- הפעלת מכשיר ה-PCR והפסקת פעולתו תעשה רק באישור המורה.
- יש לנקות את שולחן העבודה בתחילת הניסוי ובסופו בצמר גפן טבול באלכוהול 70%.
- מומלץ מאוד לתרגל עבודה באופן סטרילי כדי למנוע זיהום של הדגימות על ידי חומרים ביולוגים או ריאגנטים.
- יש לנקוט משנה זהירות בעת עבודה עם ציוד חשמלי.
- יש להקפיד על שטיפת ידיים לאחר טיפול בחומרים ביולוגיים או ריאגנטים.
- בתום הניסוי יש להקפיד על טיפול נאות על פי כללי הבטיחות והנהיות של ריאגנטים וחומרים המכילים שאריות DNA.
- כל הפסולת הביולוגית מועברת לשקיות Biohazard- שיעברו טיפול באוטוקלאב בסיום הניסוי

שלב ההכנה לשלב ההגברה ב-PCR:

א. תכנות מכשיר ה-PCR בהתאם להנחיות הבאות:

תכנית 1 Corona (טבלה 2 בהוראות לתלמיד)

מספר מחזורים	טמפרטורה (°C)	זמן
1	95	300 שניות
30	94	45 שניות
	55	45 שניות
	72	45 שניות
1	72	180 שניות

משך כולל: כשעה ורבע.

תכנית 2 Corona (טבלה 3 בהוראות לתלמיד)

מספר מחזורים	טמפרטורה (°C)	זמן
1	95	300 שניות
30	94	30 שניות
	60	30 שניות
	72	45 שניות
1	72	180 שניות

מידע כללי על אנזימי הגבלה

או בסריקת קוד ה-QR הבא:

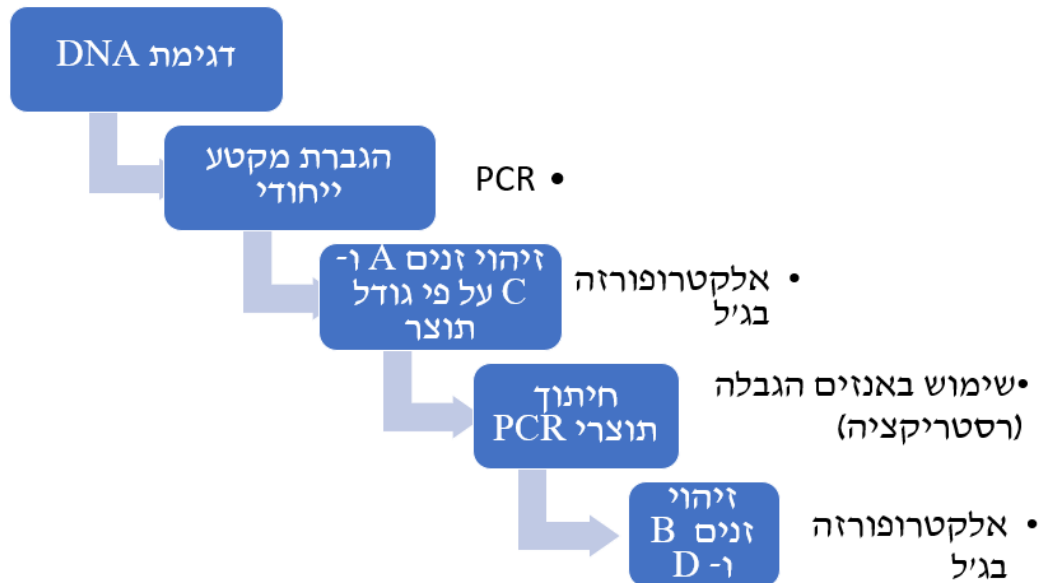


מידע על האנזים EcoR1

או בסריקת קוד ה-QR הבא:



תרשים סיכום של שלבי התהליך



הדגימות שתקבל מבר אילן

שם הדגימה	זן (עפ"י הטבלה הבאה)
DNA1	B
DNA2	D
DNA3	A או C
DNA4	A או C
DNA5	שלילי (אין קורונה)

תוצאות צפויות

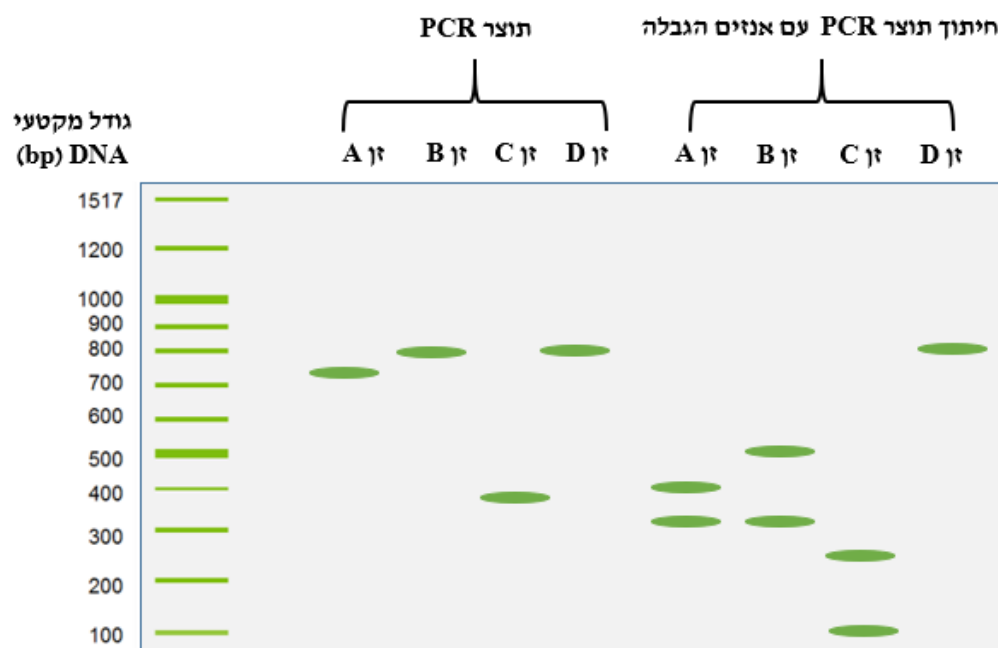
להלן טבלת הזנים המסופקים על ידי בר אילן (טבלה זו מופיעה גם בדף התלמיד).

לפניכם פרטים הודות זנים שונים של נגיף ה-SARS-CoV-2. מקור כל המקטעים המוגברים הוא בגנים המקודדים לחלבוני הקופסיד (capsid) של הנגיף.

זן	מקור	גודל מקטע PCR (זוגות בסיסים, bp)	מידע נוסף
A – זן המקור	חבל ווהאן, סין	700	נחתך על ידי אנזים ההגבלה <i>EcoR1</i> לשני מקטעים בגדלים של כ-

300bp ו- 400bp.			
נחתך על ידי אנזים ההגבלה <i>EcoR1</i> לשני מקטעים בגדלים של כ- 300bp ו- 500bp.	800	בריטניה	B
נחתך על ידי אנזים ההגבלה <i>EcoR1</i> לשני מקטעים בגדלים של כ- 100bp ו- 260bp.	360	ארצות הברית	C
לא נחתך על ידי אנזים ההגבלה <i>EcoR1</i>	800	ישראל	D

התוצאות הצפויות לאחר שכפול ה-DNA הספציפי ב-PCR, חיתוך באנזים הבגלה והפרדת המקטעים באלקטרופורזה בג'ל:



שאלות לתלמידים ותשובות:

1. האם באמצעות בדיקת נוכחות נוגדנים בדם ניתן לדעת אם הנבדק חולה בקורונה או חלה בעבר במחלה. בתשובתכם התייחסו למושגים: זיכרון חיסוני, רמת נוגדנים בדם, חיסון פעיל.

תשובה: בדיקה לנוגדנים בדם הייחודיים לנגיף הקורונה נעשית בשיטות המבוססות על קישור הנוגדנים מדם האדם לאנטיגן ייחודי של הקורונה הקשור למצע שעליו נערכת הבדיקה. אם הנוגדנים של הנבדק נקשרו לאנטיגן ניתן לזהות אותם על – ידי שימוש בנוגדנים נוספים הנקשרים לנוגדני אדם שאליהם מחובר אמצעי זיהוי בד"כ ראקציית צבע.

ניתן לזהות את הנוגדנים אם הם מסוג IgM דבר המעיד על כך שבשלב זה האדם חולה או אם הנוגדנים מסוג IgG דבר המעיד על כך שהנבדק חלה בעבר ופיתח זיכרון חיסוני.

2. רשמו דוגמה המסבירה מהי החשיבות של טכנולוגיית ה-PCR בתחום הרפואה? - הסבירו מדוע המצאת המכשיר היתה פריצת דרך טכנולוגית?

תשובה:

- זיהוי מחלות גנטיות או מוטציות בגנים.
- ניתן להפיק DNA מתאים של אדם בריא ומתאים של אדם שמשערים שחולה במחלה גנטית מסוימת, ומשווים את קטעי ה-DNA. ניתן לזהות את המוטציה אם קיימת לפי השינויים בגודל המקטעים בעקבות המוטציה ואף להתאים את הטיפול לפי סוג המוטציה. (סוג המוטציה עשוי להתבטא גם בהבדלים באורך הגן המשוכפל)
- הגברת מקטעי DNA לצורך בדיקת רקמות או לצורך זיהוי פלילי.
- בידוד מקטע גן לצורך החדרתו ליצור אחר בשיטות של הנדסה גנטית.
- דוגמאות נוספות ניתן למצוא בחומרי הלמידה המומלצים לנושא ההעקמה "בקרת ביטוי גנים והנדסה גנטית".

3. הסבר מהו תפקיד תערובת התחלים – פריימרים שהוספנו בתהליך?

- הסבירו האם התחלים ייחודיים לגן אותו רוצים לשכפל?
 - הסבירו מדוע לכל גן שני פריימרים שונים.
- תשובה: תחל הוא קטע קצר של DNA (כ-15-20 נוקלאוטידים) המסייע בתהליך שכפול של DNA במבחנה. רצף הבסיסים החנקניים בקטע זה מתאים לרצף קצר המצוי בתחילת הגן אותו רוצים לשכפל (קצה 3') ותחל נוסף מתאים לרצף בסיסים חנקניים המצוי בסופו על הגדיל הנגדי (קצה 5').
- לכל מבחנת PCR, מוסיפים תערובת של שני תחלים. מתכננים את הרצף של התחלים בהתאמה למקטע DNA רצוי. התחלים ייחודיים למקטע מסוים של DNA.
- התחל משמש כאתר להתחלת שכפול באמצעות האנזים DNA פולימראז.**
- סיום השיכפול במכשיר ה-PCR נקבע על ידי אורך המקטע – כלומר משך הזמן לשכפול מספר מסוים של נוקלאוטידים.

4. הסבר מהי החשיבות של הוספת תערובת האנזימים TAQ לתהליך?

- מהי הטמפרטורה בה פעילים האנזימים? מהו לדעתך מקור אנזימים אלו?
- תערובת זו מכילה את האנזים DNA פולימראז שמקורו בחיידק שחי במעיינות חמים ולכן האנזים מותאם לפעול בטמפרטורות גבוהות. האנזים מבצע את שיכפול מקטעי ה-DNA על ידי הוספת נוקלאוטידים מתאימים.

5. הסבר מדוע התכנות של מכשיר ה-PCR כולל שלב חימום ל-95 °C?

חימום ל- 95°C מאפשר את הפרדות שני הגדילים ב-DNA. הפרדות הגדילים היא תנאי מוקדם להמשך השיכפול וההגברה של מקטע ה-DNA הנבדק.

6. הסבר את הפעולה המחזורית במכשיר ה-PCR ?

כל מחזור PCR בודד כולל שלושה שלבים:

- שלב דנטורציה (שלב הפרימה) – הפרדת שני הגדילים ב-DNA ב- 95°C
 - שלב קישור התחלים ב- 72°C (או 68°C תלוי בחברה המשווקת).
 - שלב ההתארכות (שלב ההגברה).
- הגברה בעזרת PCR נעשית על-ידי חזרה של כל שלושת שלבי המחזור 20-30 פעמים. תבנית ה-DNA תוכפל בכל אחד מהמחזורים. אם מתחילים עם מולקולת DNA יחידה, כעבור 20 מחזורים יכולים ליצור למעלה ממילון עותקים ע"פ הנוסחה (2^n). כל אחד מהשלבים מתבצע בתנאים שונים של טמפרטורה ונמשך פרק זמן שונה. כדי להגיע למספר עותקים גדול יש צורך בפעולה מחזורית של המכשיר.

7. א. הסבירו מהו העיקרון על פיו ניתן לזהות זנים שונים של נגיף הקורונה.
ב. מהי תרומת השימוש באנזים החיתוך לזיהוי מדויק יותר של הזנים.
ג. הסבירו מהם התהליכים האבולוציוניים שתרמו ליצירת זני נגיף קורונה שונים.

- א. זיהוי זנים שונים מבוסס על שינויים גנטיים:
- המשפיעים על אורך מקטע ה-DNA המשוכפל.
 - המשפיעים על הופעה מקרית רצפים לחיתוך על-ידי אנזימי רסטריקציה בעקבות מוטציות.
 - המשפיעים על קישור התחלים למקטע ה-DNA.
- ב. בזנים שונים בעלי אורך מקטע DNA דומה כמו בדוגמאות: מבריטניה וישראל. ניתן להבדיל בין שני הזנים באמצעות שינוי גנטי שגרם רק לאחד הזנים לעבור חיתוך על ידי אנזים רסטריקציה לשני מקטעים קטנים יותר.
- ג. זיהוי הזנים השונים מבוסס על שונות גנטית בין הזנים שהיא תוצאה של מוטציות גנטיות.

8. סכם מהם השלבים השונים בבדיקה לזיהוי אדם שנדבק בנגיף בקורונה, על פי הניסוי שערכת.

השלבים לזיהוי אדם שנדבק בנגיף בקורונה:

- א. לקיחת דגימת תאים מהאדם הכוללת את תאי הנדבק ואם הוא מודבק כוללת גם את נגיפי הקורונה.
- ב. תעתוק במהופך של ה-RNA הנגיפי למקטע ה-DNA.
- ג. הגברת מקטע ה-DNA הנגיפי באמצעות PCR.
- ד. זיהוי ה-DNA הנגיפי באמצעות ג'ל אלקטרופורזה.
- ה. זיהוי זנים של הנגיף האמצעות אנזים הגבלה.

ו. ניתן במקביל לערוך גם בדיקות סרולוגיות לקיום נוגדנים לאנטיגן נגיפי ייחודי לקורונה.

תקלות אפשרויות והתמודדות ראשונית איתן

בטבלה הבאה מפורטות סיבות אפשרויות לאי קבלת תוצאות. במקרים אחרים, או אם הטבלה אינה מסוייגת בפתרון הבעיה, יש לפנות אל המרכז בבר אילן.

סיבה אפשרית	הבעיה
לא הוסף אחד מהמרכיבים או שאחד המרכיבים אינו תקין (יתכן למשל שתערובת ה-Mix tag איננה פעילה) בדוק שהמכשיר מתוכנת על פי התכנית הנדרשת לא הוספה דגימה (DNA) גל האגרוז מזוהם בנוקלאזות ה-PCR נערך יום (או יותר) לפני ההרצה והדוגמאות לא נשמרו במקרר (או בהקפאה) רצוי לוודא שכל החומרים – פריימרים ו-PCR MIX עורבבו כראוי טרם ההוספה.	בהרצה בגל לא התקבל תוצר PCR גם לא בבקורת החיובית
הפריימרים ו/או ה-PCR MIX הושארו לפרק זמן ארוך (מעל 30 דקות) בטמפרטורת החדר. יש לוודא שחומרים אלה נמצאים באמבט קרח במהלך הניסוי, במקרר בין ניסוי לניסוי באותו היום ובמקפיא לפרק זמן ארוך יותר	
הגל הוכן בריכוז נמוך / גבוה מידי ולא 1% אגרוז כנדרש הגל מזוהם בנוקלאזות (אנזימים המזרזים פירוק DNA) האגרוז הומס בתמיסת בופר שונה מ-TAE רצוי לבדוק את ה-pH של הבופר TAE	לא מתקבלים תוצרים בגל אלקטרופורזה / מתקבלות "מריחות" DNA כולל בסמן הגדלים
נפח תמיסת הבופר במכשיר גדול מידי והגל מוצף בבופר TAE. יש להפסיק את פעולת המכשיר ולהוציא מעט מהבופר באמצעות פיפטת פסטור. יש לחזור על הפעולה מספר פעמים עד שהמכשיר ישוב לפעולה, כלומר נורת ההפעלה לא תהבהב.	מכשיר האלקטרופורזה אינו פועל כראוי / נורת ההפעלה מהבהבת
יש לוודא את תקינות אנזים ההגבלה- לנסות דגימה אחרת זה אנזים אנזימי ההגבלה לא נשמרו בקרח עם הוצאתם מהמקפיא תגובת החיתוך הקיימה לפרק זמן קצר משעתיים תגובת החיתוך התקיימה בטמפרטורה שונה מ-37°C – יש לבדוק את תקינות מכשיר החימום בטעות לא הוסף אחד מהמרכיבים הנדרשים על פי הפרוטוקול המבחנות והטיפים אינם נקיים ומזוהמים בפאטאזות (אנזימים המזרזים פירוק חלבונים אשר פגעו בתפקוד האנזים)	התוצרים לא נחתכים על ידי אנזים ההגבלה

לשאלות נוספות, פתרון בעיות ועוד יש לפנות לד"ר עומר חורש – מפתח הערכה באמצעות:

1. המרכז לפיתוח ותמיכה במעבדות הביולוגיה.
2. מייל ochkgi@gmail.com