

## ערכה לאבחון הנגיף SARS-CoV-2

2.8.20

### סיפור רקע

נגיף ה-SARS-CoV-2 התפרץ בדצמבר 2019 וגרם לאחת מהמגפות הקשות שידע העולם במאה ה-21, עם מאות אלפי נדבקים ועשרות אלפי נפטרים מן המחלה. הנגיף גורם למחלה נשימתית המכונה קורונה (COVID-19). הנגיף התגלה לראשונה בעיר ווהאן במחוז חוביי שבסין, לאחר שבבדיקת חומצות גרעין בדגימה מחולה בדלקת ריאות, שנחשד כחולה ב-SARS, נמצא נגיף קורונה בעל רצף גנטי חדש. ב-19 בינואר 2020 הוכח כי המחלה מועברת מאדם לאדם, לאחר ששני אנשים בפרובינציית גואנגדונג שבסין נדבקו מקרובי משפחה. ב-30 בינואר הכריז ארגון הבריאות העולמי על מצב חירום בינלאומי בעקבות התפרצות הנגיף גם מחוץ לגבולותיה של סין.

SARS-CoV-2 הוא נגיף RNA חד גדילי חיובי (הגדיל שמקודד לחלבונים). בזכות קביעת רצף הנוקלאוטידים בגנום של הנגיף יש בידי צוותים רפואיים כלים לבצע אבחנה מהירה של חולים שנדבקו בנגיף. במקרה של חשד להדבקת אדם בנגיף הקורונה נוטלים ממנו דגימה לזיהוי הנגיף. הדגימה יכולה להיות נוזלים שנאספים ממערכת הנשימה (כגון ליחה או כיח) או דגימות מדרכי הנשימה העליונות (ריריות האף והגרונ) שנאספות באמצעות מְטוֹש סטרילי. כדאי שנוסיף תמונה של מטוש

הדגימה מועברת למעבדה שם מפיקים מהמטוש את כל החומר התורשתי (DNA ו-RNA) שמצוי עליו. לנגיף הקורונה חומר תורשתי מסוג RNA. ה-RNA היא מולקולה לא יציבה שמתפרקת במהירות, לכן בשלב ראשוני יש לבצע במעבדה תעתוק הפוך באמצעות אנזים מיוחד (Reverse transcriptase) אשר הופך את ה-RNA ל-DNA (Complementary DNA). כעת בשלב שני ה-DNA שהופק מן הדגימה יועבר לבדיקה המכונה **Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)**. בבדיקה זו משתמשים ברצפי פריימר (תחלים) קצרים אשר מזהים באופן ספציפי **מקטע** מסוים מה-DNA שנוצר בשלב הקודם על פי הגנום של הנגיף. אנזים מסוג DNA polymerase שמוסיפים לחומר הנבדק משכפל עותקים רבים של המקטע הזה, מה שמגביר את רגישות הבדיקה גם אם הכמות ההתחלתית של הנגיף היתה נמוכה. הבדיקה מתבצעת בנוכחות צבען מיוחד שנקשר לעותקים המשתכפלים ומאפשר זיהוי של הצבע של ה-DNA בזמן אמת. שיטות אבחון נוספות לנגיף מבוססות על שימוש בנוגדנים ספציפיים כנגד חלבוני הקופסית (capsid) של נגיף.

### מה בערכה?

בערכה זו תתנסו בעצמכם באבחון זנים שונים של נגיף הקורונה, המצויים בדגימות של אנשים שנדבקו בנגיף במקומות שונים בעולם. יש חשיבות גדולה לזיהוי זנים שונים של הנגיף, שכן זהו נגיף שעובר מוטציות. בזמן שעומלים מדענים על פיתוח תרכיב חיסון כנגד זן אחד, יתכן שיופיעו זנים חדשים, אשר התרכיב החיסוני לא יהיה יעיל כנגדם.

לפניכם פרטים הודות זנים שונים של נגיף ה-SARS-CoV-2. מקור כל המקטעים המוגברים הוא בגנים המקודדים לחלבוני הקופסית (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 EcoR1 לשני מקטעים בגדלים של כ- 300bp ו- 400bp.
B	בריטניה	800	נחתך על ידי אנזים ההגבלה EcoR1 לשני מקטעים בגדלים של כ- 300bp ו- 500bp.
C	ארצות הברית	360	נחתך על ידי אנזים ההגבלה EcoR1 לשני מקטעים בגדלים של כ- 100bp ו- 260bp.
D	ישראל	800	לא נחתך על ידי אנזים ההגבלה EcoR1.

בערכה שלפניכם מצויות דגימות cDNA שמקורן בחמישה אנשים **החשודים** כחולים בקורונה. כל אחת מהדגימות נלקחה מחולה במקום אחר בעולם, יתכן שמדובר בזנים שונים של נגיף הקורונה. בשלב ראשון עליכם לזהות האם האדם ממנו נלקחה הדגימה חיובי לנגיף קורונה, כלומר מתקבל תוצר PCR.

### שלבי העבודה - PCR

1. בכך המבחנות שלפניכם נמצאות חמש דגימות DNA המסומנות במספרים 1-5.
  2. לפניכם חמש מבחנות PCR (0.2 מ"ל).
  - סמנו את המבחנות במספרים 1-5.
  - בשלב 3 עליכם להוסיף למבחנות ה- PCR 1-5 שסימנתם, DNA ממבחנות 1-5 בהתאמה, על פי הכמויות המצוינות בטבלה.
  3. באמבט הקרח שלפניכם מצויים החומרים לריאקציית ה- PCR:
    - פריימרים (תחלים) המוסומנים באותיות C1-C5.
    - PCR Mix (תמיסה המכילה אנזים משכפל (Taq polymerase), תערובת נוקלאוטידים, בופר).
    - מים.
- הוסיפו את החומרים בכמויות המתאימות, על פי הפירוט בטבלה 1:

סה"כ ( $\mu\text{L}$ )	פריימר ( $\mu\text{L}$ )					מים ( $\mu\text{L}$ )	DNA ( $\mu\text{L}$ )	PCR Mix ( $\mu\text{L}$ )	מבחנה
	C5	C4	C3	C2	C1				
50	-	-	-	5	5	5	5	30	1
50	-	-	-	5	5	5	5	30	2
25	1	-	1	-	-	9	5	13	3
25	1	1	-	-	-	9	1	13	4
25	1	1		-	-	9	1	13	5

**הצרה: הנפחים השונים של הדגימות השונות ככל דגימה נופצים מהשימוש בפריימרים (תחלים) שונים. השינוי בפריימרים ארבע השנוי התנאים הנדרשים לדגימה.**

- השתמשו במיקרו פיפטור בנפח  $20\text{--}2\ \mu\text{L}$ .
- החליפו טיפ בכל דגימה של העברת נוזל אל מבחנות ה- PCR.
- 4. סגרו את המבחנות, ובאמצעות צינטריפוגה סרכזו אותן למשך מספר שניות על מנת לוודא כי כל התמיסות נמצאות בתחתית המבחנה (Short spin).
- 5. השאירו את המבחנות בכך המבחנות, בטמפרטורת החדר.

שימו לב: בשלב הבא עליכם להעביר את מבחנות 1-2 למכשיר PCR אחד ואת מבחנות 3-5 למכשיר PCR אחר. היעזרו בצוות ההדרכה.

6. העבירו את מבחנות 1-2 למכשיר ה-PCR המתוכנת לתכנית Corona1 :

**טבלה 2: תכנית Corona 1**

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

משך כולל: כשעה ורבע.

7. העבירו את מבחנות 3-5 למכשיר ה-PCR המתוכנת לתכנית Corona2 :

**טבלה 3: תכנית Corona 2**

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

משך כולל: כשעה.

8. בזמן ההמתנה לתום התהליך, הכינו את הגיל אגרוז שיאפשר זיהו מקטעי ה-DNA השונים בשיטת האלקטרופורזה.

9. בסיום תהליך ה-PCR ובכל השלבים הבאים יש לשמור את הדיגמות בטמפרטורת החדר.

על השימוש בשיטת האלקטרופורזה בג'ל תוכלו לקרא [בקישור המצורף](#).

## ניסוי - הרצת תוצרי PCR אלקטרופורזה בג'ל

אלקטרופורזה בג'ל<sup>1</sup> (Gel electrophoresis) היא שיטה המאפשרת להפריד קטעי DNA שונים מתוך תערובת על פי מהירות התנועה של אותם רכיבים בשדה חשמלי.

ההפרדה נעשית בתוך ג'ל אגרוז<sup>2</sup> שהוא חומר מוצק למחצה, היוצר מבנה מוצק דמוי מסננת בעלת חורים בגדלים שונים. הגורמים העיקריים המשפיעים על מהירות הנדידה של הרכיבים (מולקולות DNA) הם המטען החשמלי וגודלם, כלומר כמות הנוקלאוטידים במקטע. מולקולות ה-DNA טעונות באופן טבעי במטען חשמלי שלילי, לכן בהפעלת שדה חשמלי, הם ינדדו דרך ג'ל האגרוז מהקוטב השלילי אל הקוטב החיובי. מכיוון שג'ל האגרוז הוא רשת סבוכה המכילה חורים בגדלים שונים, מולקולות ה-DNA קצרות (קטנות) ינועו דרכו במהירות גדולה יותר בהשוואה למולקולות DNA ארוכות יותר (גדולות). כתוצאה מכך, לאורך זמן ההרצה ייווצרו פערים בין מולקולות גדולות למולקולות קטנות, כלומר תיווצר הפרדה ביניהן. לפיכך, בתום הרצת הדגימה במכשיר האלקטרופורזה תוכלו לקבוע האם דגימת ה-DNA שהופקה והוגברה בשלבי הניסוי הקודמים מכילה DNA שמקורו בנגיף ה-SARS-CoV-2. קביעה זו תעשה באמצעות זיהוי של הגנים על-ידי מדידת אורך מולקולות DNA של התוצרים.

בניסוי זה הגברתם מקטעי cDNA שהופקו מדגימות שנלקחו מאנשים החשודים שנדבקו בנגיף ה-SARS-CoV-2.

את גודל המקטעים תשוו לגודל מקטעים בדגימת DNA הנקראת סולם (Ladder) – ובה מספר מקטעי DNA בגדלים ידועים מראש. מרחק "הנדידה" בג'ל האגרוז של המקטע שהגברתם יהיה דומה למרחק הנדידה של אחד מן המקטעים בסולם וכך תוכלו לדעת האם קיבלתם את גודל המקטע המתאים.

### לידיעתכם:

דגימות ה-DNA צבועות בצבע שנקשר ל-DNA בין הבסיסים A – T. הצבע מאפשר לנו לזהות את מיקום ה-DNA בג'ל (ללא צביעה לא ניתן לראות את ה-DNA בג'ל). הצבע זורח באור ירקרק כאשר הוא מוקרן באור כחול.

### שלבי העבודה:

וודאו שמשטח הפלסטיק התחתון המונח בתחתית המכל שבמכשיר האלקטרופורזה הוא בצבע שחור (כך תוכלו לצפות בתוצאות).

- הניחו את התבנית במקום המתאים במכשיר האלקטרופורזה (תמונה 1).

א. העבירו באיטיות את הבופר למכל המכשיר, **עשו זאת כך:**

- העבירו את הבופר מהבקבוק למשורה.

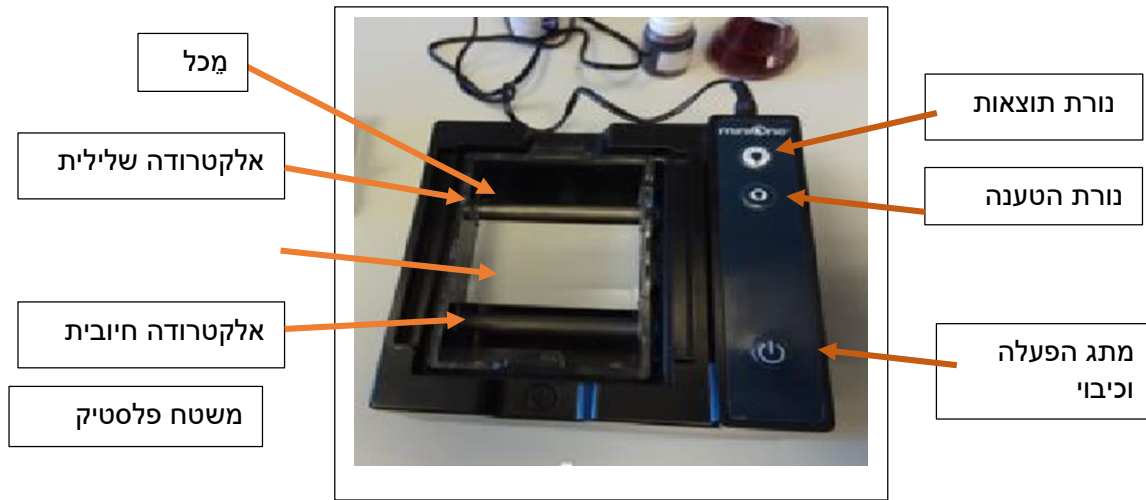
- באמצעות משורה מזגו את הבופר על פני תבנית הג'ל בצד הקרוב לאלקטרודה החיובית עד שהג'ל יהיה

טבול בתמיסה ואת יתרת הבופר מזגו בצד הקרוב לאלקטרודה השלילית. כך הנוזל במכל יהיה גבוה רק

במעט (1-2 מ"מ) מגובה הג'ל שבתבנית. **שים לב, בגלל ההערות שובש המיקום של תמונות 1, 2**

<sup>1</sup> עתידיה, י., גנטיקה עמ' 328, מילון מונחים  
<sup>2</sup> אגרוז הוא רב סוכר אותו מפיקים מאצות

**תמונה 1 : מכשיר הגיל אלקטרופורזה**



**שלב א: הטענת הבאריות בדגימות DNA**

קראו בעיון את סעיפים ג-ד, וודאו שההנחיות ברורות ורק אז התחילו בביצוע.

ב. עליכם להעביר  $5\mu\text{L}$  תמיסה ממבחנת אפנדורף המסומנת DNA LADDER לבארית המתאימה בגיל. **עשו זאת כך:**

- היעזרו במיקרופיפטור בנפח  $20\mu\text{L}$ -2 ( $p20$ ) וכוונו אותו לנפח של  $5\mu\text{L}$ . חברו טיפ מתאים.
- הדליקו את נורת ההטענה (תמונה 1).
- את ההטענה עליכם לבצע כששני המרפקים שלכם נשענים על משטח העבודה (תמונה 3). תנוחה זו תייצב את המיקרופיפטור.
- שאבו תמיסה ממבחנת האפנדורף המסומנת - סולם DNA LADDER (טבלו רק את קצה הטיפ בתמיסת הצבען כדי שלא ייצמד נוזל נוסף לצדו החיצוני של הטיפ).
- החזיקו את המיקרופיפטור מעל לבארית "1" (הראשונה מצד שמאל).
- החדירו את הטיפ בעדינות לבארית ושחררו את התמיסה אל תוך הבארית.

**תזכורת:**

- יש להשתמש בטיפ חדש לכל העברה של נוזל. לאחר העברה של כל תמיסה יש להחליף את הטיפ במיקרופיפטור. פרחי, אפשרי בהחלט בחלופה שהצעת.
- טיפ משומש יש להשליך לכלי הפסולת.

חזרו על הוראות סעיף ג עם תמיסה במבחנת PCR **אך הפעם דגמו  $10\mu\text{L}$** . כך עם כל מבחנות ה-PCR שהכנתם, אחת אחרי השנייה. **לא לשכוח להחליף טיפ ממדגימה לדגימה.**

שימו לב: אם אין מספיק באריות בג'ל לכל הדגימות, יש לחלקן לשני ג'לים, כאשר כל ג'ל חייב להכיל דגימת סולם (DNA Ladder).

טבלה 2: דוגמה לסדר שבו הדגימות ממבחנות ה-PCR נטענו בג'ל אגרוז.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	בארית
DNA	1	2	3	4	5				הדגימה
Ladder									שהוטענה

- בסיום ההטענה **כבו** את נורת ההטענה, **כסו** את מכשיר הג'ל במכסה הפלסטיק שצבעו כתום.

### שלב ב: הרצת דגימות ה-DNA בג'ל

- ג. לאחר שקבלתם אישור המורה הפעילו את מכשיר האלקטרופורזה באמצעות לחיצה על כפתור ההפעלה. **חל איסור לפתוח את קופסת המכשיר כל עוד המכשיר פועל ועובר בו זרם חשמלי!** את נורת הצפייה בתוצאות (תמונה 1) אפשר להדליק רק לזמן קצר במהלך ההרצה.
- ד. לאחר שהמכשיר פעל במשך 5 דקות שימו לב שאתם מבחינים בהתקדמות ה-DNA בג'ל. אם אינכם רואים את התקדמות הדגימות בג'ל קראו למורה.
- ה. המשכו להפעיל את מכשיר האלקטרופורזה בג'ל עד שדגימת הצבע שנעה מהר ביותר מגיעה למרחק של שני שלישי מקו סיום בקצה הג'ל. תהליך זה נמשך בערך 15 דקות.
- ו. **כבו את המכשיר ואל תסירו את המכסה הכתום.**
- ז. הדליקו את נורת התוצאות (תמונה 1) והסתכלו על הג'ל מבעד למכסה. **שימו לב לנוכחות או להעדר פסים (bands) בכל אחד מהטורים.**
- ח. הניחו את המצלמה של הטלפון הנייד על החלון שבחלקו העליון של המכסה הכתום וצלמו את התוצאות שהתקבלו בג'ל. על פי רוב, הפסים הנראים בצילום בולטים יותר בהשוואה למה שנראה בהסתכלות.
- ט. **כבו את נורת התוצאות והסירו את המכסה הכתום.**
  - הוציאו בזהירות את התבנית ובה הג'ל ממכל המכשיר (תמונה 1).
  - בעזרת הלבונט או המורה הפרידו בעדינות את הג'ל מהתבנית והשליכו את הג'ל לכלי הפסולת.
- י. ודאו כי התבנית השקופה בה היה הג'ל נמצאת על המגש.
- יא. השליכו את המבחנות והכפפות לכלי הפסולת.

י.ב. קבלו מהלבורנט צמר גפן ספוג באלכוהול. נקו את משטח העבודה עליו עבדתם. רחצו ידיים במים וסבון.

### דף איסוף נתונים

הוראות: אחרי שביצעתם את הניסוי על כל שלביו סמנו את התוצאות שהתקבלו בגיל.



ענו על השאלות:

1. קבעו אילו מהדגימות 1-5 נלקחו מאדם שנדבק בנגיף ה-SARS-CoV-2.
2. לגבי כל אחת מהדגימות החיוביות (שהתקבל בהן תוצר) – קבעו מהו מקור הדגימה. אם יש כמה אפשרויות ציינו אותן. נמקו את קביעתכם.
3. איזו בדיקה נוספת ניתן לבצע על מנת:
  - א. לוודא כי מקור התוצר הוא ב-DNA שמקורו מה-RNA הנגיפי.
  - ב. לדעת אם מקור הדגימה החיובית בה התקבל תוצר בגודל 800bp הוא בנדבק מבריטניה או שנדבק מישראל?



### חיתוך באנזים הגבלה (רסטריקציה)

בשלב זה תבצעו ריאקציית חיתוך של תוצרי ה-PCR מהשלב הקודם, באמצעות אנזים ההגבלה. מטרת הבדיקה:

1. לוודא כי מקור תוצרי ה-PCR הוא ב-DNA שמקורו בנגיף.
  2. לוודא אם מקור הדגימה החיובית בה התקבל תוצר בגודל 800bp הוא בנדבק מבריטניה או שנדבק מישראל
- EcoR1 הוא אנזים אנדונוקלאז (מנתק קשרים פוספודיאסטריים בין נוקלאוטידים בחומצות גרעין) שבודד מזנים של החיידק *E. coli*. אנזים זה הוא אנזים הגבלה המשמש את *E. coli* להגנה מפני בקטריופאגיים (נגיפים המתרבים בתוך חיידקים).
- בביולוגיה מולקולרית נעשה בו שימוש רב כאנזים הגבלה. רצף הנוקלאוטידים שאותו חותך האנזים הוא GAATTC, שהוא פלינדרום מאחר שהרצף המשלים לו הוא CTTAAG. החיתוף מתבצע באופן הבא:



מסתבר שבזנים שונים של נגיף ה-SARS-CoV-2 חלה מוטציה נקודתית, אשר הביאה ליצירת אתר חיתוך לאנזים זה, בגן המקודד לאחד מחלבוני הקופסית של הנגיף. עובדה זו מנוצלת לזיהוי זנים שונים של הנגיף.

### שלבי העבודה:

1. באמצעות עט לסימון מבחנות, סמנו 4 מבחנות אפנדורף (בנפח 1.5 מ"ל) המספרים 1-4.
2. על שלוחנכם דגימות ה-PCR, ובאמבט הקרח שלפניכם מצויים החומרים לריאקציית החיתוך:
  - מבחנה ובה תמיסת בופר.
  - מבחנת חלבון BSA (מייעל את פעילות האנזים EcoR1)
  - מים.
  - אנזים EcoR1.
3. באמצעות מיקרופיפטור בנפח 2  $\mu$ L - 20  $\mu$ L, הוסיפו למבחנה שסימנתם ב-1 את מרכיבי התגובה על פי הסדר הבא:

- 6  $\mu$ L מים מזוקקים נטולי נוקלאזות.
  - 2  $\mu$ L בופר אנזים
  - 1  $\mu$ L BSA. (מייעל את פעולת האנזים)
  - 10  $\mu$ L מדגימת PCR מהמבחנה המסומנת בספרה 1.
  - 1  $\mu$ L אנזים EcoR1.
- נפח כולל במבחנה: 20  $\mu$ L

**שימו לב: יש להחליף טיפ בכל העברה של דגימת נוזל אל מבחנות התגובה.**

4. חיזרו על סעיף 3, אך הפעם עם מבחנות 4-2 ודגימות PCR ממבחנות 4-2 בהתאמה.
5. סגרו את המבחנות. באמצעות צנטריפוגה וסרכזו אותן למשך מספר שניות, על מנת לוודא כי כל התמיסות נמצאות בתחתית המבחנה (Short spin).
6. הדגירו את המבחנות בבלוק חימום בטמפרטורה של  $37^{\circ}\text{C}$  למשך שתיים.
7. בזמן ההמתנה הכינו גיל אגרוז להרצת השגימות.
8. בתום שתיים, הטעינו  $10\ \mu\text{L}$  מכל הדוגמה בגיל, הריצו את הדגימות בגיל בעזרת מכשיר האלקטרופורזה ונתחו את התוצאות.
9. היעזרו בטבלה שבמבוא וקבעו מהו מקור כל אחת מהדגימות שניתחתם.. נמקו את קביעתכם.