**מעקב אחרי התפרצות מחלה מדבקת: שימוש ב ELISA**

**מתבסס על פרוטקול ELISA Immuno ExplorerTM**

1. על כל שולחן עומדת אות A עד D. העבודה תתבצע ברביעיות.
2. לפניך שלוש מבחנות אפנדורף צהובות: שתי מבחנות ריקות ואחת המכילה 1 מ"ל מדגימת "**נוזלי הגוף**" שלך.
3. בעזרת עט סימון רשום את שם קבוצתך (**האות שלך**) וכן מספרים 0-2 על **המבחנות הצהובות.** כאשר מבחנה 0 היא מבחנת נוזלי הגוף.

העבר **למבחנה 1** 400 מיקרוליטר ממבחנת "נוזלי גוף".

החלף טיפ

העבר **למבחנה 2** 200 מיקרוליטר ממבחנת "נוזלי גוף".

החלף טיפ

הוסף **למבחנה 2** 600 מיקרוליטר ממבחנה העומדת במגש העבודה ועליה כתוב PBS. כך יצרת דוגמא מהולה (פחות מרוכזת) של "נזלי הגוף" המדמה שמירה על מרחק בעת תקשורת עם אדם.

**חלק א': הדמיית התפשטות המגפה תוך קרבה בין הנדבקים**:

בהתאם להנחיות המדריך, כל תלמיד ייקח את **מבחנה מספר 1** וייגש בתורו לקבוצה משולחן אחר:

**תלמיד A :**

1. גש אל תלמיד B. בעזרת פיפטור העבר 400 מיקרוליטר (את כלל הדגימה שלכם) אל המבחנה של תלמיד **B** (בעלת המספר הזהה). **ערבב** בעדינות את הדגימה.
2. לאחר הערבוב **חלק** את הנוזל המעורבב באופן שווה בין שתי המבחנות - כך שיהיו 400 מיקרוליטר בכל מבחנה.
3. הוסיפו את שם **(אות)** הקבוצה איתה חלקתם נוזלים על הכיתוב של המבחנה. לדוגמא: **A&B-1**
4. העבר 150 מיקרוליטר מהתערובת למבחנה נקיה שקופה שעל המגש, סמן גם אותה בכיתוב  **A&B – 1a** . מבחנה זו תלקח ע"י תלמיד **D**.

**תלמיד B :**

1. גש אל תלמיד C. בעזרת פיפטור העבר 400 מיקרוליטר (את הדגימה שלכם לאחר ערבוב עם קבוצה A) אל המבחנה של קבוצה **C** (בעלת המספר הזהה). **ערבב** בעדינות את הדגימה.
2. לאחר הערבוב **חלק** את הנוזל המעורבב באופן שווה בין שתי המבחנות - כך שיהיו 400 מיקרוליטר בכל מבחנה.
3. הוסיפו את שם **(אות)** הקבוצה איתה חלקתם נוזלים על הכיתוב של המבחנה.

תיווצר מבחנה עליה יש לכתוב **A&B&C- 1**

**תלמיד D :**

1. גש אל תלמיד **A**, קח ממנו את המבחנה עליה כתוב **A&B – 1a**.
2. בעזרת פיפטור העבר 150 מיקרוליטר ממבחנה 1 **שלך** אל המבחנה **A&B – 1a**.
3. **ערבב** בעדינות את הדגימה.
4. הוסיפו את שם **(אות)** קבוצתך למבחנה, תתקבל מבחנה **A&B&D-1**

**תלמיד C :**

1. גש אל תלמיד **D.** בעזרת פיפטור העבר 400 מיקרוליטר (את הדגימה שלכם לאחר ערבוב עם קבוצה B) אל המבחנה של קבוצה **D** (בעלת המספר הזהה). **ערבב** בעדינות את הדגימה.
2. לאחר הערבוב **חלק** את הנוזל המעורבב באופן שווה בין שתי המבחנות - כך שיהיו 400 מיקרוליטר בכל מבחנה.
3. הוסיפו את שם **(אות)** הקבוצה איתה חלקתם נוזלים על הכיתוב של המבחנה.

תיווצר מבחנה עליה יש לכתוב **A&B&C&D-1**



400ul

1. הניחו את המבחנה סגורה במעמד המבחנות להמתנה לשלב הניסוי הבא.

**חלק ב': הדמיית התפשטות המגפה תוך שמירה על ריחוק חברתי**:

בהתאם להנחיות המדריך, כל תלמיד ייקח את **מבחנה מספר 2** וייגש בתורו לתלמיד משולחן אחר:

**העבירו 300µl ממבחנה 2 לאפנדורף שקוף ורשמו עליה "נוזלי גוף – מהול".**

**תלמיד A :**

1. גש אל תלמיד B. בעזרת פיפטור העבר 500 מיקרוליטר (את כלל הדגימה הנותרת שלכם) אל המבחנה של תלמיד **B** (מבחנה 2). **ערבב** בעדינות את הדגימה.
2. לאחר הערבוב **חלק** את הנוזל המעורבב באופן שווה בין שתי המבחנות- כך שיהיו 400 מיקרוליטר בכל מבחנה.
3. הוסיפו את שם **(אות)** הקבוצה איתו חלקתם נוזלים על הכיתוב של המבחנה. לדוגמא: **(A&B)**
4. העבר 150 מיקרוליטר מהתערובת למבחנה נקיה, סמן גם אותה בכיתוב  **A&B – 2** . מבחנה זו תלקח ע"י תלמיד **D**.

**תלמיד B :**

1. גש אל תלמיד C. בעזרת פיפטור העבר 500 מיקרוליטר (את כלל הדגימה הנותרת שלכם) אל המבחנה של תלמיד **C** (מבחנה 2). **ערבב** בעדינות את הדגימה.
2. לאחר הערבוב **חלק** את הנוזל המעורבב באופן שווה בין שתי המבחנות- כך שיהיו 400 מיקרוליטר בכל מבחנה.
3. הוסיפו את שם **(אות)** הקבוצה איתו חלקתם נוזלים על הכיתוב של המבחנה. תיווצר מבחנה **A&B&C-2**

**תלמיד D :**

1. גש אל תלמיד **A**, קח ממנו את המבחנה עליה כתוב **A&B – 2**.
2. בעזרת פיפטור העבר 150 מיקרוליטר ממבחנה 2 **שלך** אל המבחנה **A&B – 2**.
3. **ערבב** בעדינות את הדגימה.
4. הוסיפו את שם **(אות)** של קבוצתך למבחנה. תתקבל מבחנה **A&B&D - 2**

**תלמיד C :**

1. גש אל תלמיד D. בעזרת פיפטור העבר 500 מיקרוליטר (את כלל הדגימה הנותרת שלכם) אל המבחנה של תלמיד **D** (מבחנה 2). **ערבב** בעדינות את הדגימה.
2. לאחר הערבוב **חלק** את הנוזל המעורבב באופן שווה בין שתי המבחנות- כך שיהיו 400 מיקרוליטר בכל מבחנה.

הוסיפו את שם **(אות)** הקבוצה איתו חלקתם נוזלים על הכיתוב של המבחנה. תיווצר מבחנה

 **A&B&C&D-2**



400ul

1. הניחו את המבחנה סגורה במעמד המבחנות להמתנה לשלב הניסוי הבא.

**ביצוע תגובת ה ELISA**:

1. כל קבוצה תקבל שתי רצועות באריות ויש לסמנה באופן הבא:

**עבור רצועה ראשונה:** על הנייר הלבן מתחת לבאריות סמן: שלוש באריות בסימן "+" לבקרה החיובית; שלוש באריות בסימן "–" לבקרה השלילית; שלוש באריות עבור "נוזלי הגוף" ושלוש באריות מדגימת התערובת שיצרתם בשלב א' של הניסוי.

דגימה שלך – ממבחנה נוזלי גוף

ביקורת חיובית

דגימת התערובת

ביקורת שלילית

שם התלמיד



**עבור רצועה שניה:** על הנייר הלבן מתחת לבאריות סמן: שלוש באריות ממבחנה לה קראתם "ביקורת" בחלק ב' של הניבוי (אלה הם נוזלי הגוף תוךשמירת מרחק) ושלוש באריות מדגימת התערובת שיצרתם בשלב ב' של הניסוי.

דגימה שלך – ממבחנה נוזלי גוף (שמירת מרחק)

דגימת התערובת תוך שמירת מרחק

1. שימו לב, הסטריפים הינם במעמד, **לא להוציאם**!!
2. כוונו פיפטור של 20-200 מיקרוליטר ל-50 מיקרוליטר והלבישו טיפ לבן
3. העבירו 50 מיקרוליטר מהבקרה החיובית הנמצאת **במבחנה הסגולה** לכל אחת משלוש הבאריות המסומנות "+".
4. **החליפו טיפ**
5. העבירו 50 מיקרוליטר מהבקרה השלילית הנמצאת **במבחנה הכחולה** לכל אחת משלוש הבאריות המסומנות "-".
6. **החליפו טיפ**
7. העבירו 50 מיקרוליטר מהדגימה שלכם – הנמצאת **במבחנה הצהובה (מספר 0) – "נוזלי גוף"**, לכל אחת משלוש הבאריות הייעודיות.
8. **החליפו טיפ**
9. העבירו 50 מיקרוליטר ממבחנה צהובה המכילה את ***התערובת שיצרתם*** **בחלק א' (מבחנה מספר 1).** לכל אחת משלוש הבאריות הייעודיות.
10. **החליפו טיפ**
11. העבירו 50 מיקרוליטר מהדגימה הנמצאת **במבחנה הנקראת ביקורת – "נוזלי גוף תוך שמירת מרחק"**, לכל אחת משלוש הבאריות הייעודיות.
12. **החליפו טיפ**
13. עבירו 50 מיקרוליטר ממבחנה צהובה המכילה את ***התערובת שיצרתם*** **בחלק ב'** לכל אחת משלוש הבאריות הייעודיות.
14. **ספיחת החלבון לבארית**: כוונו סטופר ל 5 דקות והמתינו. ההמתנה נחוצה ע"מ לאפשר לחלבון להספח לבאריות הפלסטיק.
15. עם השמע הצלצול הפכו את כל מעמד הבאריות על ערמת מגבות הנייר. תפחו קלות עם המעמד על המגבות כך שכל הנוזל יצא מהן. המנעו מהתזה של נוזל חזרה לבאריות. (**בקשו הדגמה מהמדריך**)
16. **חסימת אתרים לא ספציפיים**: הוסיפו 50 מיקרוליטר 1% ג'לטין לכלל הבאריות.
17. כוונו סטופר ל 15 דקות והמתינו.
18. עם השמע הצלצול הפכו את כל מעמד הבאריות על ערמת מגבות הנייר. תפחו קלות עם המעמד על המגבות כך שכל הנוזל יצא מהן. המנעו מהתזה של נוזל חזרה לבאריות.
19. **קשירת נוגדן ראשוני:** קחו עם טיפ חדש 50 מיקרוליטר מהנוגדן הראשונן (PA) הנמצא **במבחנת אפנדורף ירוקה** לכל אחת מהבאריות. החליפו טיפ בין כל שלשת באריות. כוונו סטופר ל 5 דקות והמתינו. ההמתנה נחוצה ע"מ לאפשר לנוגדן הראשוני להתקשר לחלבון.



1. עם השמע הצלצול הפכו את כל מעמד הבאריות על ערמת מגבות הנייר. תפחו קלות עם המעמד על המגבות כך שכל הנוזל יצא מהן. המנעו מהתזה של נוזל חזרה לבאריות.
2. **שטיפות**:
3. הכינו ערימה של מגבות נייר
4. כוונו פיפטור של 1000 מיקרוליטר ל 200 והלבישו טיפ כחול.
5. מלאו כל אחת מהבאריות ב 200 מיקרוליטר **"בופר שטיפה"**. הפכו את המעמד מעל מגבות נייר ותפחו קלות עם המעמד על המגבות
6. א.השליכו את 4-5 המגבות העליונות
ז. חיזרו על סעיף 22 **פעם נוספת**.
7. **קשירת נוגדן שניוני:** קחו עם טיפ חדש 50 מיקרוליטר מהנוגדן השניוני (SA) הנמצא **במבחנת אפנדורף הכתומה** לכל אחת מהבאריות. כוונו סטופר ל 5 דקות והמתינו. ההמתנה נחוצה ע"מ לאפשר לנוגדן השניוני להתקשר לנוגדן הראשוני.
8. ערכו שטיפות כמופרט בסעיף 22 הפעם כך שתבצעו **שלוש שטיפות** סה"כ.

הנוגדן השניוני קשור לאנזים הנקרא פראוקסידאז (HRP). פעולת האנזים על הסובסטרט מביאה ליצירת תוצר כחול. כיתבו באילו באריות אתם מצפים להופעת צבע כחול?
\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

1. קחו עם טיפ חדש 50 מיקרוליטר מהסובסטרט (SUB) הנמצא **במבחנת אפנדורף חומה** לכל אחת מהבאריות. כוונו סטופר ל 5 דקות והמתינו. ההמתנה נחוצה ע"מ לאפשר לאנזים לפעול
2. רישמו את תוצאותיכם.

(הערה: הסובסטרט רגיש לאור וע"כ התוצאות הקובעות הן התוצאות המתקבלות לאחר 5-10 דקות. מעבר לזמן זה יכולה להתפתח תגובת צבע לא ספציפית. בנוסף: 20-30 דקות לאחר התגובה הצבע הכחול דוהה)

**ניתוח התוצאות**

1. 

הוספת הסובסטרט;
הדגרה 5 דקות

הוספת נוגדן שניוני SA;
המתנה 5 דקות;
שטיפות X 3

הוספת נוגדן ראשוני PA;
המתנה 5 דקות;
שטיפותX 2

הכנסת דגימת התלמיד לבאריות;
המתנה 5 דקות;
שטיפות

מעקב אחרי עוצמת הצבע המתפתח בבאריות

הכנסת בקרה חיובית ל 3 באריות ובקרה שלילית ל 3 באריות

סימולציה של תהליך הדבקה במחלה