



Praktisk immunologi

UNIT 8

European Initiative for Biotechnology Education

Bidragydere til denne Unit

Lisbet Marcussen (Unit koordinator)

Birgit Sanderman, Benny Silvert (Dansk oversættelse), Elisabeth Strömberg, Eckhard R. Lucius, Ute Steffens, Christine Labahn-Lucius.



EIBE (The European Initiative for Biotechnology Education) søger at fremme viden og forståelse, og facilitere en nuanceret offentlig debat gennem forbedret undervisning i bioteknologi på det gymnasiale niveau i hele den europæiske union.

EIBE Contacts



BELGIË/BELGIQUE

Prof. Dr. Vic DAMEN/ Marleen van STRYDONCK, Universitaire Instelling Antwerpen (U.I.A.), Department Didactiek en Kritiek, Universitätsplein 1, 2610 Antwerpen, email vdamen@uia.ua.ac.be, mvstryd@uia.ua.ac.be
Dr. Maurice LEX, EC, GD XII E-1, SDME 9/38, Rue de la Loi 200, 1049 Bruxelles, Fax 0032/2/299-1860



BULGARIA

Prof. Raycho DIMKOV, University of Sofia "St. Kliment Ohridski", Faculty of Biology, Dr. Tzankov blvd. No. 8, 1421 Sofia, email ray@biofac.uni-sofia.bg



ČZECHÁ REPUBLIKA

Dr. Hana NOVÁKOVÁ, Pedagogprogram co-op Pedagogiká Fakulta UK, Konevova 241, 13000 Praha 3. Fax +420/2/684 5071



DANMARK

Dr. Dorte HAMMELEV, Association of Danish Biologists, Sønderjyllands Alle 2, 2000 Frederiksberg, email dorte@centrum.dk
Mrs Lisbet MARCUSSEN, Association of Danish Biologists, Skolebakken 13, 5800 Nyborg, email lisbetma@post2.tele.dk



DEUTSCHLAND

Prof. Dr. Horst BAYRHUBER/ Dr. Jens FRIEDRICH/ Dr. Eckhard R. LUCIUS/ Mrs Renate GLAWE, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften (IPN) an der Universität Kiel, Olshausenstr. 62, 24098 Kiel, email csec@ipn.uni-kiel.de, friedrich@ipn.uni-kiel.de, lucius@ipn.uni-kiel.de, glawe@ipn.uni-kiel.de

Dr. Ognian SERAFIMOV, INCS-Centre of UNESCO, c/o Jörg-Zürn-Gewerbeschule, Rauensteinstr. 17, 88662 Überlingen, email joergzuern.os@t-online.de, ognian.serafimov@t-online.de

Prof. Dr. Eberhardt TODT, Universität Giessen, FB Psychologie, Otto-Behagel Str. 10, 35394 Giessen, email Eberhard.Todt@psychol.uni-giessen.de

Prof. Dr. Michael SCHALLIES, Pädagogische Hochschule, Heidelberg, FB Chemie, Im Neuenheimer Feld 561, 69120 Heidelberg, email schallie@ph-heidelberg.de



EESTI

Prof. Dr. Tago SARAPUU, Science Didactics, Dept., University of Tartu, Vanemuise 46-211, Tartu 51014, email tago@ut.ee.



EIRE

Dr. Catherine ADLEY, University of Limerick, Biotechnology Awareness Centre, Dept. of Chemical and Environmental Sciences, Limerick, email Catherine.Adley@ul.ie

Mrs. Cecily LEONARD, University of Limerick, Dept. of Life Sciences, Limerick, email cecily.leonard@ul.ie



ELLADA

Prof. Vasilis KOULALDIS/ Ass. Prof. Vasiliki ZOGZA-DIMITRIADI, University of Patras, Dept. of Education, Rion, 26500 Patras, email zogza@upatras.gr, Koulaidi@upatras.gr



ESPAÑA

Dr. María J. SÁEZ, Dr. Angela GÓMEZ-NIÑO/ Rosa VILLAMANAN, Universidad de Valladolid, Dept. de Biología Celular y Farmacología, Geologo Hernandez Pacheco 1, Valladolid 47014, email mariaj@redestb.es, Angela@biocel.uva.es, rvillama@dce.uva.es



FRANCE

Prof. Gérard COUTOULY, LEGPT Jean Rostand, 18, Boulevard de la Victoire, 67084 Strasbourg Cedex, email coutouly@cybercable.tm.fr

Prof. Laurence SIMONNEAUX, ENFA, Toulouse, Boîte Postale 87, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, email laurence.simonneaux@educagri.fr



ITALIA

Prof. A. BARGELLESI-SEVERI/ Dr. Stefania UCCELLI/ Dr. ssa. A. CORDA-MANNINO, Centro di Biotecnologie Avanzate, Largo Rosanna Benzi 10, 16132 Genova., email dcs@ist.unige.it



LUXEMBOURG

Mr. John WATSON/ Mr. Laurent KIEFFER, European School, 23 BLVD Konrad Adenauer, 1115 Luxembourg, email laurent.kieffer@euroschool.lu, john.watson@ci.educ.lu



NEDERLAND

Dr. David J. BENNETT, European Federation of Biotechnology Working Party on Education, Cambridge Biomedical Consultants, Oude Delft 60, NL-2611 CD Delfte, email efb.cbc@stm.tudelft.nl

Dr. Fred BRINKMAN, Hogeschool Holland, Communication Project, P.O. Box 261, 1110 AG Diemen, email f.brinkman@hsholland.nl

Drs. Liesbeth van de GRINT, Hogeschool van Utrecht, Coördinatiecentrum van het Landelijk Network voor Educatiecentra voor Biotechnologie, Postbus 14007, 3508 SB Utrecht, email Liesbeth.vd.Grint@feo.hvu.nl

Dr. Jan F.J. FRINGS, Pr. Marijkelaan 10, 7204 AA Zutphen, email j.frings@hccnet.nl

Dr. Ana-Maria BRAVO-ANGEL, Secretariat of the Task Group on Public Perceptions of Biotechnology, Oude Delft 60, NL-2611 CD Delfte, email efb.cbc@stm.tudelft.nl



RZECZPOSPOLITA POLSKA

Dr. Anna STERNICKA, University of Gdansk, Dept. of Biology, AL. Legionow 9, 80952 Gdansk, Fax +48/58/341 20 16



SCHWEIZ

Dr. Kirsten SCHLÜTER, ETH, Institut für Verhaltenswissenschaften, ETH Zentrum TUR, Turnerstr. 1, 8092 Zürich, email schluer@ifv.huwi.ethz.ch



SVERIGE

Mrs. Margareta JOHANSSON, Föreningen Gensyn, P.O. Box 37, 26821 Svalöv, email margareta.johansson@gensyn.svalov.se

Dr. Elisabeth STRÖMBERG, Östrabogymnasiet, Kämpegatan 36, 451 81 Uddevalla, email es@ostrabo.uddevalla.se



THE UNITED KINGDOM

Dr. John GRAINGER/ Mr. John SCHOLLAR/ Dr. Caroline SHEARER, National Centre for Biotechnology Education, The University of Reading, Whiteknights, P.O. Box 228, Reading RG6 6AJ, email j.m.grainger@rdg.ac.uk, j.w.schollar@rdg.ac.uk, c.shearer@rdg.ac.uk

Mr. Wilbert GARVIN, The Queen's University of Belfast, School of Education, 69 University Street, Belfast BT7 1HL, email w.garvin@qub.ac.uk

Dr. Jill TURNER, The Queen's University of Belfast, School of Nursing and Midwifery, 1-3 College Park East, Belfast BT7 1LQ, email Jill.Turner@Queens-Belfast.ac.uk

Dr. Paul WYMER, 6 Park Way, Whetstone London N20 0XP, email paul.wymer@virgin.net

Dr. Jenny LEWIS, University of Leeds, Centre for Studies in Science and Mathematics Education, Leeds LS2 9JT, email j.m.lewis@education.leeds.ac.uk

Mr. Adam HEDGE COE, University College London, Dept. of Science and Technology Studies, Gower Street, London WC1E 6BT, email a.hedgecoe@ucl.ac.uk

EIBE Koordinator

Prof. Dr. Horst BAYRHUBER, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften (IPN) an der Universität Kiel, Olshausenstr. 62, 24098 Kiel, Deutschland. Tel.: ++49-431-880-3129, Fax: +49-431-880-3132 email: csec@ipn.uni-kiel.de.

EIBE Sekretariat

Dr. Jens FRIEDRICH/ Renate GLAWE, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften (IPN) an der Universität Kiel, Olshausenstr. 62, 24098 Kiel, Deutschland. Tel.: +49-431-880 3151 and +49-431-880 5151, Fax +49-431-880 3132, email: friedrich@ipn.uni-kiel.de, glawe@ipn.uni-kiel.de.



Praktisk Immunologi

UNIT 8

European Initiative for Biotechnology Education

Inhold	
★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★	
I Udviklingshold, copyright	04
I Om denne Unit	05
I Sikkerhed	05
I <i>TriChem</i> ELISA-kit 1. forsøg	06
I Dobbelt immun-diffusion 2. forsøg	11
I <i>Steffens</i> ELISA-kit 3. forsøg	14

World Wide Web

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

Der er ikke mange teknologiske områder, hvor udviklingen går så hurtigt, som indenfor bioteknologien. Bl.a. derfor distribueres EIBE Units elektronisk, så opdateringer kan udbredes hurtigt og billigst muligt.

Disse sider (samt andre EIBE Units) er tilgængelige i hele verden via WWW. De findes på:

<http://www.rdg.ac.uk/EIBE>

Alle www EIBE Units findes som PDF-filer (Portable Document Format). Det giver en høj kvalitet på illustrationer, farver, skrift og layout, uanset om du bruger Mac (inkl. Power PC), Windows, DOS eller Unix-platforme.

PDF filer er mindre end almindelige tekst-filer, så det er hurtigere at hente (down load) dem. De kan læses og udskrives i programmet *Adobe Acrobat Reader 3.0®*, der er gratis at bruge. Det fås gennem flere computerblade eller kan hentes på:

<http://www.adobe.com/>

Udvikling

TriChem ELISA-kittet, der bruges i denne Units første forsøg, er udviklet af og forhandles gennem:

TriChem
Bernhard Olsensvej 23
DK-2830 Virum, Danmark
Tlf.: +45 4585 8283

Rettighederne til dette sæt ejes af *TriChem*.

Det er bearbejdet til klassesæt af "Immunologigruppen" og er udgivet i *Immunologiske Småforsøg* hos Nucleus Forlag Aps (1994), ISBN: 87 87661 83 7.

Lisbet Marcussen
Educational Biotechnology Group
Nyborg Gymnasium
Skolebakken 13
DK-5800 Nyborg
e-post: lisbetma@post2.tele.dk

TriChem ELISA-kittet, der bruges i denne Units tredje forsøg, er udviklet af og forhandles gennem:

STEFFENS BIOTECHNISCHE
ANALYSEN GmbH
Baumgartnerstr. 5
D-79285 Ebringen (FRG)

Det er bearbejdet til klassesæt af Eckhard R. Lucius, Ute Steffens og Christine Labahn-Lucius ved Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften (se EIBE sekretariatets adresse s. 2).

Bidragydere

- **Lisbet Marcussen** (Unit koordinator)
Nyborg Gymnasium og HF, Nyborg, DK.
- **Birgit Sandermann Justesen**
Bjerringbro Gymnasium, Bjerringbro, DK.
- **Benny Silvert** (Dansk oversættelse)
Kr. Hyllinge, DK.
- **Elisabeth Strömberg**
Östrabro Gymnasiet, Uddevalla, Sverige.

- **Eckhard R. Lucius, Ute Steffens og Christine Labahn-Lucius**
IPN, Universität Kiel, Tyskland.

Design, illustration og opsætning:
Caroline Shearer, NCBE, The University of Reading, Whiteknights, Reading, RG6 6AJ, UK.

© Copyright

Denne EIBE Unit er beskyttet, og bidragyderne har rettighederne ifølge Section 77 of Designs, patents and Copyright Act, UK (1988).

Undervisningsbrug. Hel eller delvis gengivelse af denne Unit (elektronisk eller på papir) til undervisningsbrug er tilladt med kildehenvisning.

Anden brug. Denne Unit må spredes fra person til person i ikke-kommercielt øjemed. Den må ikke spredes elektronisk via adressekartoteker, nyhedsgrupper, opslagstavler eller uautoriserede www-forsendelser eller masseudbredes på anden måde, der strider imod ånden i disse begrænsninger.

Kommerciel brug. Uden forudgående tilladelse fra rettighedsholderne er det strafbart at bruge denne Unit eller dele deraf i kommercielt øjemed.

Tilladelsen til kommercielt brug kan indhentes:

EIBE Sekretariat
c/o Institut für die Pädagogik
der Naturwissenschaften (IPN)
an der Universität Kiel
Olshausenstraße 62
D-24098 KIEL 1
Tyskland

Tlf: +49 431 880 3129
Fax: +49 431 880 3132
E-post: glawe@ipn.uni-kiel.de

Om denne Unit



Dette materiale er udviklet af lærere og undervisere fra flere europæiske lande. Det er fremstillet med økonomisk støtte fra DG XII under EU-kommissionen, der er rådgivet af EIBE, the *European Initiative for Biotechnology Education*.

EIBE materialet er blevet grundigt testet i workshops af lærere og studerende fra hele Europa.

Holdninger, der fremsættes og aktiviteter, der foreslås i denne Unit, stammer fra udgiverne. EU-kommissionen deler ikke nødvendigvis disse udtryk.

Vær især opmærksom på sikkerhedsforskrifterne, som er beskrevet både i teksten og i de enkelte forsøg.

Sikkerhed

Der er taget højde for alle risikomomenter i forsøgene i EIBE Units, ligesom der er foreslået passende sikkerhedsforanstaltninger.

Hvor det er muligt, er der foreslået fremgangsmåder efter almindelige sikkerhedsforskrifter. I nogle tilfælde er særlige sikkerhedsforanstaltninger anbefalet.

Under alle omstændigheder skal brugeren være opmærksom på, at der kan ske fejl, og at ansatte og ledere kan have forskellige sikkerhedsopfattelser. Derfor skal brugeren, som første skridt i et nyt forsøg, *altid* danne sig et overblik over eventuelle risikofaktorer. Lokale regler omkring sikkerhed skal ALTID overholdes, uanset hvad der foreslås i EIBE Units.

Medmindre andet foreskrives, forudsættes det, at:

- praktisk arbejde udføres i et veludstyret laboratorium;
- al elektrisk udstyr behandles med respekt;
- laboratoriearbejde som f.eks. opvarmning, udføres roligt og omhyggeligt;
- god laboratorieskik overholdes, når der benyttes kemikalier eller levende organismer;
- sikkerhedsbriller benyttes, hvis der på nogen måde kan være risiko for synet;
- elever/studerende undervises i sikkerhed når der skal arbejdes med kemikalier og mikroorganismer.

Trichem

ELISA-kit til undervisningsbrug



1. forsøg

Indledning

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) er en følsom immunprøve. Den bruger et enzym, som bindes enten til et antistof eller et antigen, som derved virker som markør for et specifikt protein, der enten kan være et antigen eller et antistof.

ELISA testen er enkel og let at udføre til hurtig bestemmelse af f.eks.:

- undersøgelse for påvirkning af narkotika
- test for forskellige infektionssygdomme som f.eks. HIV eller Lymes sygdom (Borreliose)
- sporing af fremmede gener (indført ved f.eks. gemmanipulation)
- medicinsk genetik

Denne Units hensigt er at give både den studerende og læreren mulighed for at udføre deres egen ELISA-undersøgelse. Når man har fået en bredere forståelse for denne nye og vigtige metode, har man bedre mulighed for at deltage i debatten om dens anvendelse.

Yderligere information om teknikken kan fås hos *Immunologigruppen* eller *TriChem* (Se adressen på s. 4).

Den følgende undersøgelse benytter ELISA-testprincippet til at undersøge blodprøver fra svin, der har været udsat for forskellige bakterier.

Bakterien *Pasteurella multocida* laver et toxin, der forårsager forskellige deformiteter i næseknoglen på smittede svin. Det medfører dårlige tandstilling, nysen og forskellige

andre angreb på luftvejene. Angrebet efterfølges ofte af en infektion af bakterien *Bordetella bronchiseptica* (*Bb*), der forværrer svinets tilstand yderligere. Resultatet er nedsat vækst og økonomisk tab for landmanden. Derfor er det vigtigt at stoppe infektionen så tidligt som muligt. ELISA-testen kan bruges både til at undersøge for toxinet og for bakterien (*Bb*).

I dette forsøg bruges antigener fra bakterien *Bb*. Den første dag tilsættes bakteriens antigener til nogle brønde på ELISA-coatingpladen. Den næste dag er pladerne klar til at analysere blodprøver fra svinene. Hvis et svin er smittet med *Bb*, viser brøndene med antigenet en positiv farvereaktion, når blodprøven tilsættes.

Lærervejledning

Formål

At undersøge blodprøver fra svin ved hjælp af ELISA-metoden.

Tidsforbrug

1. dag ca. 15 minutter,
2. dag ca. 2 lektioner.

Sikkerhedskrav



5-aminosalicylsyre er ikke giftig. Det bruges ved forskellige sygdomme. Beslægtede stoffer vides at være mutagene. Det er derfor vigtigt at behandle 5-aminosalicylsyre varsomt - brug gummihandsker.

Fremgangsmåde

1. dag

Fremstilling af reagenser

PBS (Fosfatbuffer)

Indholdet i glasset mærket "PBS" opløses under omrøring i 2,5 L demineraliseret vand. pH justeres evt. med 4M NaOH eller 4M HCl, så det ligger i intervallet 7,1-7,5.

30 mL PBS coating-opløsning!

Tilsæt indholdet af glasset mærket "Bb ANTIGEN" til de 30 mL PBS, der blev taget fra. Rør omhyggeligt. Dette er nu COATING-OPLØSNINGEN.

Til den resterende PBS sættes indholdet af glasset mærket "TWEEN 20". Skyl glasset med PBS, så hele indholdet kommer med. Rør omhyggeligt, tildæk og mærk glasset "VASKEBUFFER".

Pladerne er fremstillet af plast og strålebehandlet for at øge bindingskapaciteten og sikre sterilitet.

Antigenet er kogt ekstrakt af bakterien *Bb*.

2. dag

Fremstilling af sera

Serum 1:

Negativ kontrol fra svin, der ikke har været udsat for *Bb*.

Sera 3-10:

"Ukendte" sera fra svin. Fire af disse er negative, resten er mere eller mindre positive.

Serum 12:

Positiv kontrol.

Alle positive sera stammer fra sunde svin, der har været vaccineret med dræbt *Bb*.

Fremstilling af konjugatopløsningen

Konjugatopløsningen skal være frisklavet: Indholdet af glasset mærket "BSA" tilsættes 25 mL vaskebuffer og røres til klar opløsning. Skyl konjugatglasset med BSA-vaskebuffer, så al konjugatet kommer med. Bland omhyggeligt.

Konjugatet er kanin-anti-svine-IgG koblet til enzymet peroxidase. (Enzymet er oprenset fra peberrod).

BSA

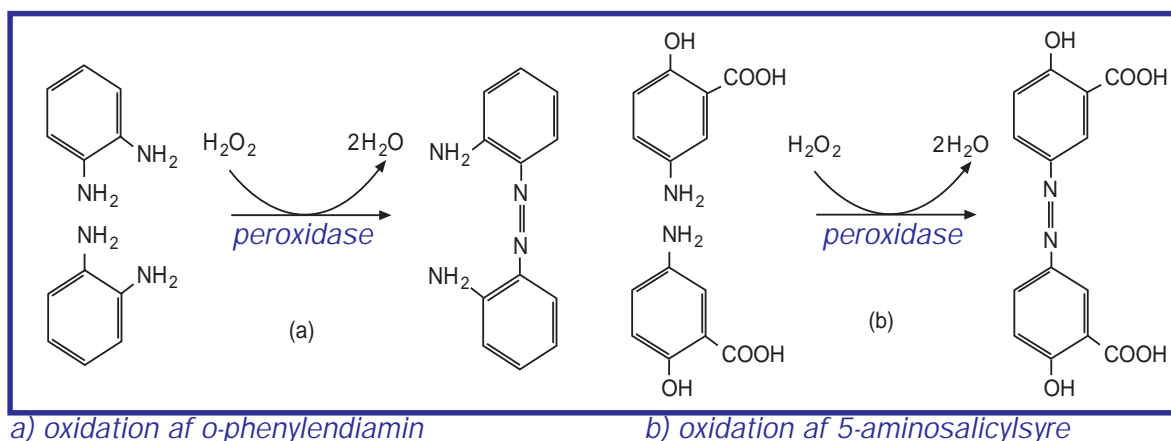
(Bovin Serum Albumin fra kvæg)

BSA anvendes til at hindre uspecifik adsorption af antistoffer eller konjugat til pladens overflade. BSA anvendes i så høj koncentration, at det udkonkurrerer andre stoffer.

Fremstilling af substratopløsning

Bemærk: Substratopløsningen skal være friskfremstillet!

Opløs 5-aminosalicylsyre fra glasset mærket "Substrat" i indholdet af glasset mærket "Substratbuffer-H₂O₂". Omrør, indtil alt er opløst. **Brug gummihandsker!**



Lærerens noter til resultater

Svar til spørgsmålene:

1. Negative sera: 4, 5, 8 og 9.
Positive sera, efter aftagende styrke: 6, 7, 10 og 3.
2. Serum 1 er en negativ kontrol, taget fra et svin, der ikke har været udsat for *Bb*-infektion. Serum 12 er en positiv kontrol.
3. Som antigen bruges mæslingeвирус. I konjugatet bruges antistof, rettet mod human-IgG.
4. Selv dræbt humant-patogent materiale kan være farligt for mennesker. Det kan være vanskeligt at fremskaffe humane sera, der er 100% fri for human-patogener som hepatitis eller HIV.

Note:

Et positivt resultat behøver ikke nødvendigvis at betyde, at dyret er smittet. Dyret kan være helbredt efter smitten.

Udstyr og materialer

Bemærk: Nogle af stofferne i kittet skal opbevares i en fryser efter indkøb.

Mikropipetter op til 100 μ L
100 mL bægerglas
20 mL og 100 mL måleglas
Magnetomrører
3 L kolbe
2,5 L demineraliseret (ionbyttet) vand
4M HCl
4M NaOH
Gummihandsker (ekstra)
Vandfast mærkepen

ELISA-kittet:

1 glas antigen (kogt af bakterien *Bb*)
1 æske med 10 glas svinesera
1 glas substrat (30 mg 5-aminosalicylsyre)
1 glas konjugat, kanin-anti-svine-IgG, koblet til enzymet peroxidase
1 glas substrat buffer med H_2O_2
ELISA-plade med låg
1 glas salte til PBS (fosfatbuffer)
1 bæger med 2,5 mL Tween 20 (sulfo-sæbe)
Engangspipetter
Gummihandsker
1 glas BSA (Bovin Serum Albumin)
Plastikskeer
Affaldspose

Elev-vejledning



Fremgangsmåde til 1. forsøg

1. dag

Brøndene coates med antigen:

1. Til hver af brøndene mærket A, B og C på ELISA-pladen sættes 100 µL antigenfortynding. Der skal fyldes 36 brønde i alt.
2. Dæk pladen med låg og stil den ved stuetemperatur til næste dag. Skal forsøget først videreføres senere, stilles pladen i køleskab.

2. dag

Overskydende antigen fjernes:

1. Hæld indholdet i brøndene ud i vasken.
2. Ryst pladen forsigtigt over vasken for at fjerne den sidste væske. Bank evt. pladen forsigtigt mod et par fingre.

Vask

3. Fyld de coatede brønde med vaskebuffer og lad dem stå et minut!
4. Tøm omhyggeligt og ryst evt.
5. Gentag pkt. 3 og 4 endnu to gange.

Tilsætning af serumfortyndinger:

6. Omryst de optøede serafortyndinger.
7. Tilsæt 100 µL *serum* 1 til brønd A, B og C i række 1.
8. **Skift pipettespids!**
Tilsæt 100 µL *serum* 3 til brønd A, B og C i række 3.
Række 2 springes over!
9. **Skift pipettespids!**
Fortsæt på samme måde med at fylde brøndene i række 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 og 12.
Række 11 springes over!

**HUSK AT SKIFTE
PIPETTESPIDS, HVER GANG
DU SKIFTER SERUM!**

10. Lad pladerne stå for inkubation i 15 minutter ved stuetemperatur.

Overskydende serum fjernes:

11. Tøm alle brøndene samtidig. Ryst evt.
12. Vask, tøm og ryst som i pkt. 3 og 4.
Gentag 3 gange.

Konjugat tilsættes:

13. Tilsæt 100 µL konjugat til alle brøndene i A, B og C.
14. Inkuber pladerne i 15 minutter ved stuetemperatur.
15. Vask, tøm og ryst som i pkt. 12.

Substrat tilsættes:

16. Tilsæt 100 µL substratopløsning til hver af brøndene.
17. Vent, iagttag og vurder farveskift.
Notér resultaterne i et skema, idet der anvendes en skala fra 0-5 som udtryk for farvestyrken. 0 er negativ (ingen farvereaktion), 5 er den mest positive. Beskriv farvestyrken.

Bortskaffelse af affald:

Brugte plader og pipettespidser lægges i en affaldspose. Overskydende opløsninger kan hældes i vasken.

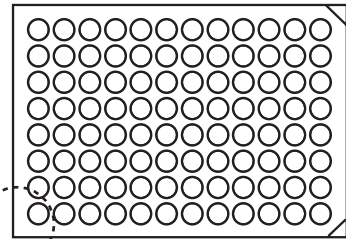
Resultatbearbejdning

1. Hvilke af de ukendte sera var positive? Opstil dem i rækkefølge efter stigende positivitet.
2. Hvilke fejlmuligheder kan der forekomme i analysen?
3. Man ønsker at opstille et lignende test til bestemmelse af antistoffer mod humant mæslingevirus. Hvilke reagenser skal man ændre?
4. Hvorfor *tror du*, vi ikke bruger mæslingetest i forsøget?

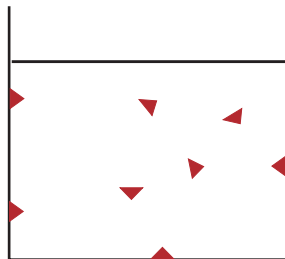
ELISA proteintest

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

Skematisk oversigt til 1. forsøg



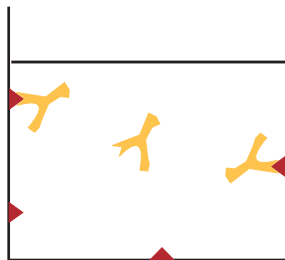
*Pladen inkuberes, når alle reagenser er tilsat.
Derefter vaskes brøndene for at fjerne overskydende reagenser.*



1. Tilsat protein (antigen) bindes i brøndene.



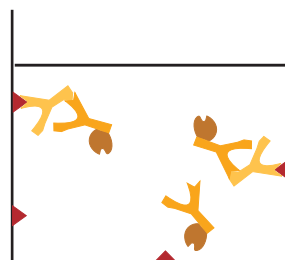
VASK for at fjerne ubundne molekyler.



2. Prøven tilsættes. Antistof bindes til antigen.



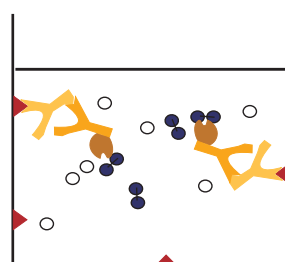
VASK for at fjerne ubundne molekyler.



**3. Enzytbundet antistof-konjugat tilsættes.
Konjugatet hæftes til det bundne antistof.**



VASK for at fjerne ubundne molekyler.



4. Farveløs enzym-substrat tilsættes. Hvis der er bundet enzym, iagttages en farveraktion.

Dobbelt immundiffusionstest for fødevarers indhold af æg



2. forsøg

Æg bruges i mange forskellige fødevarer som f.eks. hamburger, pasta og visse istyper. Mange er allergiske overfor æg, selv i ret små mængder. Det er muligt at spore minimale mængder af både hvide og blomme ved at bruge æg-albumin-antistof. Den metode, der bruges hertil, kaldes dobbelt immundiffusion.

Princippet i immundiffusion er, at der sker en udfældningsreaktion (præcipitation), når et antigen møder et tilsvarende antistof. Ved at lade udfældningen ske i en gel, kan reaktionen ses som udfældningslinier eller -buer hvor antigen og tilsvarende antistof mødes. Herved kan man teste for enkeltstoffer i forskellige blandinger (som f.eks. ovennævnte fødevarer).

Udfældningerne sker, fordi antistof og antigen har mere end et bindingssted. Derved dannes der store sammenfiltrede (cross-linked) udfældninger i de zoner, hvor de mødes. Der skal være en passende forhold imellem mængden af antistof og antigen for at danne en tydelig udfældningsreaktion.

Dobbelt immundiffusion-metoden er udviklet af svenskeren Örjan Ouchterlony for ca. 30 år siden. Metoden kaldes "dobbelt", fordi den henviser til, at antistof og antigen kan bevæge sig mod hinanden i en gel, hvor der dannes en linie eller bue i den zone, hvor de to reaktanter mødes.

Denne udfældningsreaktion er meget specifik og følsom. Den benyttes nu til diagnoser, proteintests samt sammenligning af antistof og antigen.

Lærervejledning

Formål

At teste forskellige fødevarer for indhold af ægalbumin.

Tidsforbrug

1. dag: 60 min. plus natten over, indtil der evt. er dannet linier/buer, og 20 min. til resultattest.

En evt. farvning af præparatet tager yderligere ca. 2 t. 45 min.

Sikkerhedskrav



Der stilles ingen særlige sikkerhedskrav.

Noter

Brøndmønster

Det er nødvendigt at udstikke brøndene i gelen i et regulært mønster (se s. 13, pkt. 9). Start ved kanten af gelen, så der evt. kan blive plads til flere tests på samme plade. Brug et sugerør eller en tilskåret plastikpipette til at udstikke brøndene. Der dannes hurtigere udfældninger, hvis afstanden imellem brøndene er lille: 5 mm afstand vil vise resultater efter ca. 24 t. mens 10 mm vil vise resultater efter ca. 48 t.

Efter 1. dag:

Hvis der benyttes objektglas og det er varmt i laboratoriet, må objektglassene opbevares fugtigt, f.eks. i en lukket petriskål med et fugtet stk. filterpapir. Skal de opbevares i flere dage, anbefales det at tilsætte papiret en smule konserveringsmiddel (f.eks. Atamon) for at hæmme skimmel-dannelse. Pas på ikke at skade gelen.

Objektglassene er klare efter et døgn, men kan opbevares op til en uge i køleskab.

Referenceopløsning

Da det kan være vanskeligt at lave referenceopløsningen, kan det være en god ide først at piske lidt æggehvide; det flydende herfra kan da bruges hertil.

Ægalbumin - antistof

Frysetørret antistof opløses i TRIS-buffer; vejledning hertil følger med det leverede antistof.

Den afmålte opløsning placeres i eppendorfrør, som opbevares i fryseren.

Affald

Al affald behandles som almindeligt affald.

Farvning

Det er ikke nødvendigt at farve præparaterne, men det kan hjælpe til at se resultaterne tydeligere.

Amido-black* eller Coomassie Brilliant Blue* kan benyttes til farvning.

* Disse farvestoffer forhandles af større kemikaliefirmaer i DK.

Udstyr og materialer

Agaroseopløsning (1 % i TRIS-buffer)

Centrifuge

Eddikesyre (Konc.)

Eppendorfrør

Filtrerpapir

Fugtkammer til opbevaring af objektglas (f.eks. petriskåle med fugtet filtrerpapir)

Kanin-antiserum mod ægalbumin (Pharmacia AS-23)

Lille blender

Methanol

Mikropipetter: 0 - 10 mL

NaCl (0,9% opløsning)

Objektglas eller små (5 cm diameter) petriskåle

Referenceopløsning (0,01 % æggehvide opløst i ionbyttet vand)

Tilskårne plastikpipetter (2,5 mm diameter), til brøndudstikning

TRIS-buffer 0,01 M, pH 8,0

Følgende ting skal kun bruges, hvis du vil farve dine præparater

Amido-black opløsning (0,1 g amido-black opløst i 100 mL blanding af eddikesyre, methanol og ionbyttet vand (i forholdet 10:70:20), eller

Coomassie Brilliant Blue opløsning Affarver (eddikesyre, methanol og ionbyttet vand i forholdet 10:70:20)

Farveglas til gelfarvning

Hårtørrer

Vægt (max. ca. 1 kg)

Elev-vejledning



Fremgangsmåde til 2. forsøg

Tilberedning af prøver

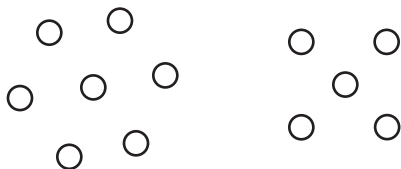
1. 5 g prøve i 5 mL vand blendes grundigt.
2. Centrifuger blandingen i 15 min. ved 6000 omdr./min. (eller 10 min. v. 9500 o/m).
3. Filtrer supernatanten igennem et stykke stof ned i et reagensglas.

Gelstøbning

4. Opløs under opvarmning og omrøring den nøjagtige mængde agarose i TRIS-buffer (1 %).
Til en 5 cm petriskål bruges 3-5 mL og til objektglas 3,5 mL.
PAS PÅ - DET KOGER LET!
5. Afkøl til 60-80 °C.
6. Placer petriskåle/objektglas på et bord tæt på kanten. Fjern lågene.
7. Hæld den varme gel i et ca. 2 mm tykt lag i skålene/objektglassene. Tildæk.
8. Lad gelen størkne, det tager ca. 5-10 min.

Udstik brøndene

9. Brug den tildannede plasticpipette til at udstikke brønde med en diameter på ca. 2,5 mm. Brøndsiderne skal være lodrette!
Fjern den udstukne gel ved hjælp af en nål eller sug med pipetten.
Lav et af disse brøndmønstre:



Tilsæt antistof

NB: Før brøndene fyldes, nummereres de med en spritpen på undersiden af skålen/-glasset.

10. Fyld brønden i midten med antistof (anti-ægalbumin) - ca. 5-10 L.
OVERFYLD IKKE BRØNDEN!

Tilsæt antigen

11. Fyld hver anden af de ydre brønde med antigen.
OVERFYLD IKKE BRØNDENE!
12. Fyld de resterende brønde med dine prøver. Noter, hvilke prøver der er i de forskellige brønde.
OVERFYLD IKKE BRØNDENE!

Lad væskerne diffundere gennem gelen natten over i fugtkammeret, enten ved stuetemperatur eller i køleskabet.

13. Derefter kan du iagttage de hvide linier/buer (udfældningszoner i positive tilfælde), når du holder skålene/glassene mod en mørk baggrund.

Farvning (hvis det ønskes)

14. Fjern de ikke-udfældede proteiner ved at placere gelen i en 0,9% NaCl-opløsning i ca. 60 min. ved stuetemperatur.
15. Erstat saltopløsningen med ionbyttet vand og lad det trække i endnu 60 min. ved stuetemperatur.
16. Fjern vandet og pres resten af vandet ud af gelen på følgende måde: Læg 10 lag filterpapir forsigtigt ovenpå gelen og giv det et pres på ca. 1 kg i 15 min.
17. Tør gelen med en hårtørret.
18. Dæk gelen med farveopløsning i ca. 10 min.
19. Fjern farveopløsningen og affarv overskudsfarve med affarvningsopløsningen i 10 min.
Gentag evt. affarvningsprocessen.

Resultater

Målegrænsen for æggehvide er 2,5 mg i 100 g prøve. Hvis der er nok kyllingeprotein i prøven, kan du iagttage udfældninger. Æggeblomme indeholder æggehvideproteiner nok til, at udfældninger også er mulige.

STEFFENS ELISA kit til undervisningsbrug

3. forsøg



Introduktion

Dette kit er både billigt, enkelt og så hurtigt at bruge, at den kan gennemføres på en lektion. Et polyklonalt antistof til en *Pelargonium blomsterspætnings virus (PFBV)* er bundet til en speciel kam med tilhørende brøndrække.

Kittet gør det muligt at teste 2 * 10 prøver både sikkert og følsomt. Der er både positive og negative kontroller på kammen. Testens følsomhed opnås ved at ekstrahere (udtrække) smittet plantemateriale af pelargonie (*Chenopodium quinoa*) i en buffer og derefter fortynde det. Virus kan stadig reagere i en 1:1000 fortynding i en 10 % ekstraktion.

Testmaterialet og dets reagenser er mærket med en holdbarhedsdato, der kun gælder, hvis det opbevares ved 4 °C.

Referencer

Bömer, H. (1989) *Pflanzenkrankheit und Pflanzenschutz* UTB 518. Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer.

Clar., M.F. and Adams, A.N. (1977) *Journal of General Virology*, 34, 475-483. Hollings, M. and Stone, O.M. (1974) *Description of plant viruses*. CMI/AAB, 130, 4. Nellen, U. (1992) The ELISA test: a universal procedure for the identification of antigens on the basis of biotechnologically produced monoclonal antibodies - information and school-experiment. *Biotechnology Education* (3) 3, 107-112.

Lærervejledning

Materialer

Til hver prøve behøves:

STEFFENS ELISA TEST KIT TIL 2 * 12 ANALYSER (direkte fra STEFFENS, Ordre nr. 04093P00):

- I en lufttæt plasticpose med fugtsuger, er følgende ting er pakket hver for sig:
- En speciel kam med 12 tænder, på hvilke der er påsat *PFVB* antistof
- 3 rækker (strips) á 12 reaktionsbrønde
- 10 ekstraktionsposer (plastikposer med gaze)
- 50 mL brugsklar prøvebuffer (gul)
- 12 engangspipetter (10 prøver, fortyndet konjugat og substrat)
- 1 engangspipette med målestreger (til prøvebuffer)
- 1 målepipette med fin spids (til koncentreret konjugat)
- 1 minirør med 0,05 mL koncentreret konjugat (farveløs)
- 1 lille flaske med skruelåg med 1,6 mL konjugatbuffer (blå)
- 1 lille flaske med skruelåg med 1,6 mL brugsklar substratopløsning (farveløs)
- 1 pipetteholder (en del af indpakningen)

Færdige præparater i kittet:

(Alle dele skal have rumtemperatur før start). De tre rækker brønde placeres i holderen, der dannes af pappet inde i kassen (se tips og tricks).

Al den koncentrerede konjugat skal overfø-

res til den blå konjugatbuffer ved hjælp af den finspidsede engangspipette. Pas på, ikke at spille på låget. Bland omhyggeligt.

Dertil skal du bruge:

- 10 pelargonier fra forskellige steder (altså ikke 10 fra samme forretning)
- 1 saks
- 1 kraftig glasspatel eller skruetrækker-skaft til knusning af plantemateriale
- Koldt vandværksvand
- Til evt. måling, et mikrotiter fotometer (650 nm)
- Affaldsspand

Arbejdsplan

Forslag til undervisningsplan:

1. dag

- Introduktion og formål
- Antigen-antistof-reaktioner
- Virussygdomme
- Hjemmearbejde (indsamling af plantemateriale - hele pelargonier eller friskplukkede blade herfra)

2. dag

- knus de 10 prøver hver for sig (gruppearbejde)
- Forbered brønde og opløsninger og tilsæt prøverne
- Elever eller lærer udfører de forskellige trin i prøven
- Resultaterne bedømmes

3. dag

- Diskuter resultaterne
- Hvilke faktorer gavner virusinfektioner?
- Formål med planteforering

Tips og tricks

Brug af kittet: ELISA kittet er konstrueret til 2 sæt á 12 analyser. Der er reserver af alle dele, derfor kan det halve sæt gemmes i kassen ved 4 °C til senere brug.

Pipetter: Rør ikke pipettespidserne. Specialkam: Kammen til antigen-antistof-test er pakket sammen med de 3 rækker brønde, og fugtsugemiddel. Et polyklonalt

antistof, der reagerer på *PFBV* er bundet til kammens tænder. Tand nr. 11 (grøn) er dertil påført en negativ kontrol, mens tand nr. 12 (rød) er tilført en positiv kontrol. Undgå at berøre kammens tænder, hold kun på håndtaget.

Forberedelse af brøndene: Toppen af kassens indsats åbnes, og halvdelen af sættet tages ud. Toppen kan bukkes, så det danner en holder til de 3 rækker brønde. Alle brøndrækker er ens, og der er ikke højre/venstre-forskel. Lad kammene ligge i posen, indtil de skal bruges. Fugtsugemidlerne skal ikke bruges mere, og kan kasseres.

Konjugat: Al det koncentrerede konjugat må overføres så omhyggeligt som muligt til den blå konjugatbuffer med den finspidsede engangspipette. Pipetten kasseres efter brug. Bland konjugat og buffer omhyggeligt.

Affald: Efter aflæsning af resultater, vaskes kam og brønde i vasken. Strips kasseres efter vask, da de kan give falske positive resultater ved genbrug.

Lærerens resultatnoter

Herunder vises skematisk en typisk reaktion i 3. brøndrække:



Brønd 11 (Negativ kontrol - svarende til kammens grønne tand) bør ikke vise nogen farvereaktion.

Brønd 12 (Positiv kontrol - svarende til kammens røde tand) bør reagere med en intens blå farve.

Sammenlign disse resultater med brøndene 1-10. Blåfarvningen har forskellig styrke, afhængig af infektionens omfang hos den tilhørende plante.

Sikkerhed



Kemikalier

Sammensætning af prøvebuffer: TRIS/HCl buffer, polyvinylpyrrolidon, NaCl, Tween 20, Na-azid, farve E 102.

Sammensætning af konjugat:

Phosphatbuffer, peberrod peroxidase, bovin serum albumin, Tween 20, Bronidox L (5-bromo-5-nitro-1,3-dioxan), farve E 131.

Substrat sammensætning:

TMB (tetramethylbenzidin), buffer, H₂O₂.

NB: Alle reagenser er stabiliseret med Na-azid og Bronidox L. Disse er farlige ved indtagelse!

Bortskaffelse

Der er ingen særlige sikkerhedsforanstaltninger.

Garanti og ansvar

EIBE giver ingen garanti og er ikke ansvarlig for indholdet af dette kit.

STEFFENS Biotechnische Analysen GmbH garanterer, at produktet testes jævnlgt under henvisning til, at det skal opfylde de angivne specifikationer. Yderligere garanti gives ikke.

STEFFENS Biotechnische Analysen GmbH har intet ansvar for skade, forvoldt ved u hensigtsmæssig brug eller lagring af produktet.

Resultatskema

Prøve nr.	Prøver (prøvenavn, oprindelse)	Bemærkninger (noter til prøven)	Resultater
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11	<i>negativ kontrol</i>		<i>farveløs</i>
12	<i>positiv kontrol</i>		<i>blå</i>

Elev-vejledning



Introduktion til 3. forsøg

Immunbiologien er en af de vigtigste forskningsområder inden for biologien i dag.

Den tager fart i starten af dette århundrede, da Paul Ehrlich (Nobelprisen 1908) opdagede antistoffes (= antibodies) rolle omkring resistensen ved infektionssygdomme.

Immunresistens hos hvirveldyr afhænger af dannelsen af specifikke antigen-antistof komplekser. Et antigen er enhver substans, der kan stimulere dannelse af antistof. Et antigen kan være ethvert fremmed organisk stof, som f.eks. polysaccharider, proteiner, peptider eller nucleinsyrer.

Bestemte endogene globulære proteiner, kaldet immunoglobuliner, fungerer som "antistof". Disse reagerer på molekylært plan med bestemte overfladestrukturer på et antigen, og danner hermed et uopløseligt kompleks.

Denne antistofreaktion bruges ved immunologisk diagnose. Minimale spor af antigen (10^{-8} g/mL pr. prøve) kan spores. Tidligere blev antistof ekstraheret fra dyr, der var injiceret med et bestemt antigen; det gav dog kun ringe antistofudbytte. Udbyttet er nu øget med udviklingen af "hybridomprocessen", som bruges til fremstilling af "monoklonalt" antistof. Bioteknologiske teknikker bruges til at producere hybridceller fra en blanding af dyreantistof, produceret i lymfocytter og cellesvulster; disse udmærker sig ved, at de vedblivende kan dele sig og danne "monoklonalt" antistof.

Antistof, der bruges i diagnostiske tests skal mærkes, så de kan danne et synligt antigen-antistof kompleks. Antistof påhæftes et enzym til formålet. Enzymet reagerer med substratet ved at farve produktet. Farveraktionen indikerer en positiv reaktion.

ELISA testen baseres på princippet: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay. En stor mængde forskellige antigener (inklusive virale antigener) kan undersøges med denne metode.

Virussygdomme kan angribe mennesker, dyr og planter. Spredning af inficeret materiale via den globale udbredelse af landbrugs- og gartneriprodukter betyder, at ELISA-diagnostikken bliver mere og mere vigtig.

Dette kit tester for en virusinfektion (*Pelargonium Blomsterspætnings Virus - PFBV*) i planter fra storkeæbfamilien, som forårsager en uønsket farveændring af blomsterne. Infektionen er almindeligt forekommende, så det skulle ikke være svært at finde positive prøver til testen. Testens princip er den såkaldte "sandwich-teknik": Et antistof, der er fæstnet til f.eks. en speciel kam, bindes til antigenet, hvis dette findes i prøven; et andet antistof bindes derefter til det fæstnede antigen, så der dannes et antistof-antigen-antistof kompleks. Det andet antistof er mærket med et enzym, som farver det ellers farveløse substrat.

I STEFFENSELISA kittet er det første anti-stof til PFBV fæstnet til tænderne af en speciel kam.

1. reaktion

PFBV antigener fra prøven bindes til antistoffet på kammens tænder; derved dannes Antigen-antistof komplekset.

2. reaktion

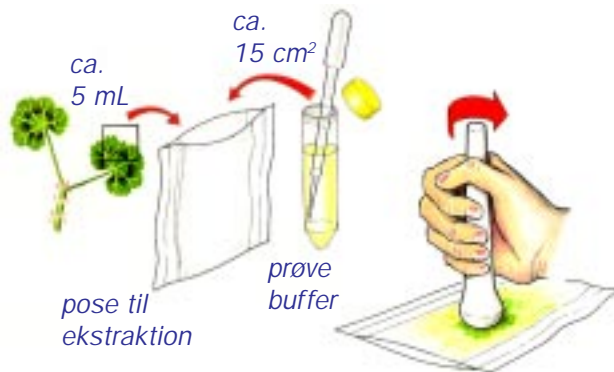
Et andet PFBV antistof, der er mærket med enzymet peroxidase fra peberrod (enzymkonjugat) bindes til antigen-antistof komplekset på kammens tænder.

3. reaktion

Antigen-antistof komplekset med enzymet blåfarver tetramethylbenzidin-substratet. PFBV inficerede prøver viser blåfarvning, mens ikke inficerede prøver forbliver farveløse.

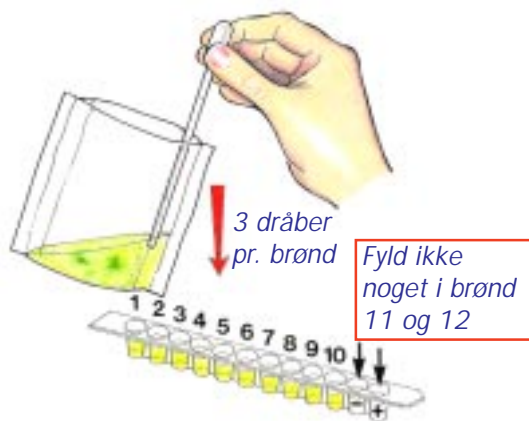
Fremgangsmåde til 3. forsøg

1. Forberedelse af prøver (10 min.)



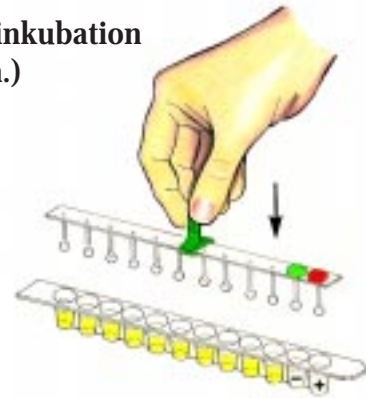
- 1.1 Læg ca. 15 cm² (ca. 0,5 g) midt i ekstraktionsposen imellem gazen.
- 1.2 Tilsæt ca. 5 mL prøvebuffer (gul) med den inddelte engangspipette. Pas på ikke at forurene prøvebufferen med planteekstrakt.
- 1.3 Læg ekstraktionsposen på et glat underlag og knus bladstykket med et let tryk og cirkulære bevægelser. Du kan bruge en kraftig glasspatel eller enden af en skruetrækker. Når gazen er kraftigt farvet af klorofylen, er ekstraktionen færdig.

2. Fordeling af prøverne (5 min.)



- 2.1 Giv prøverne nummer (1-10) og tilsæt 3 dråber af hver prøve til brøndene (1 prøve pr. brønd) i den første brøndrække. **Brug en ren pipette til hver prøve.**
- 2.2 Lad brønd 11 og 12 helt til højre være tomme til den første reaktion.

3. Første inkubation (10 min.)



- 3.1 Sæt kammen i brøndrækken således, at de to kontroller (grønt og rødt mærke) sættes i brønd 11 hhv. 12. Herved startes 1. inkubation, der varer 10 min. (Forbered i mellemtiden konjugatet).

4. Forberedelse af konjugatet



- 4.1 Pipetten med den fine spids bruges til at overføre koncentreret konjugat til den blå konjugatbuffer. Vær omhyggelig med at få overført al konjugat. Bland grundigt.

5. Fordeling af konjugatet



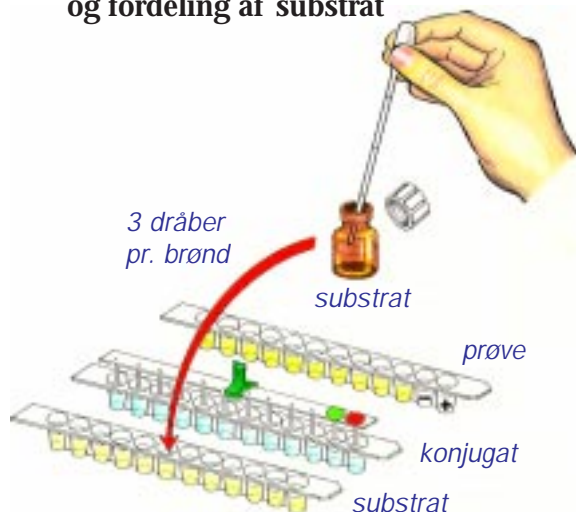
- 5.1 Med en ny pipette tilsættes 3 dråber opløst konjugat i brønd 1-12 i den anden brøndrække. Vær omhyggelig med ikke at spilde på den tredje, tomme brøndrække.

6. Kammen vaskes (30 sek.)



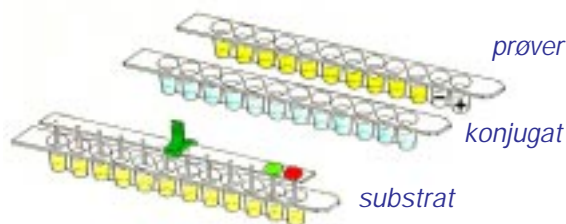
- 6.1 Kammen fjernes fra første brøndrække efter 10 min. inkubation.
- 6.2 Vask tænderne under koldt, rindende vand. Hold ikke kammen lodret under vask og afrytning; vær omhyggelig med ikke at forurene en tand med vand fra andre tænder. Omhyggelig afvaskning hindrer baggrundsfarvning.
- 6.3 Ryst overskydende vand af kammen med lette bevægelser.

7. Inkubation med konjugat (10 min.) og fordeling af substrat



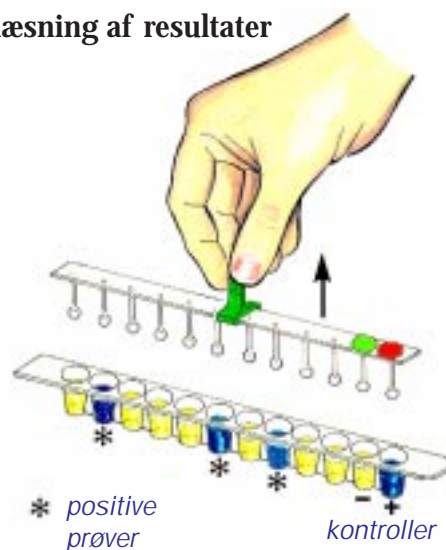
- 7.1 Sæt kammen i den anden brøndrække, igen med de to kontroller i højre side.
- 7.2 Inkuber i 10 min.
- 7.3 Med en ny pipette placeres 3 dråber substratopløsning i brønd 1-12 i den tredje brøndrække.
NB: Substratet er lysfølsomt, arbejde derfor ikke i direkte sollys.

8. Inkubation med substrat (11 min.)



- 8.1 Efter inkubation vaskes kammen igen grundigt som i trin 6.
- 8.2 Sæt kammen i tredje brøndrække (med substrat) igen med de to kontroller i højre side. Inkuber i 10 min. Beskyt imod direkte sollys.

9. Aflæsning af resultater



- 9.1 Testen aflæses bedst lige efter at kammen er fjernet efter sidste inkubation. Farveskift og styrke kan iagttages direkte eller i et mikrotiter fotometer ved 650 nm.
- 9.2 Kontrolbrøndene skal vise, om testen er korrekt udført. Testen er udført korrekt, hvis den positive kontrol er dybt blå, mens den negative er farveløs. Hver prøve, der er farvet stærkere end den negative kontrol, er inficeret. Hvis en prøve er farveløs eller mindre farvet end den negative kontrol, er den sandsynligvis ikke inficeret. Infektion kan ikke helt udelukkes, da virus-koncentrationen kan være mindre end testens følsomhed.