



Immunologia praktyczna

Zeszyt 8

European Initiative for Biotechnology Education

Autorzy niniejszego zeszytu

Lisbet Marcussen (koordynator), Birgit Sandermann, Elisabeth Strömberg, Eckhard R. Lucius, Ute Steffens, Christine Labahn-Lucius

Europejska Inicjatywa Nauczania Biotechnologii (EIBE) postawiła sobie zadanie wspomagania nowych metod nauczania w szkole i w kształceniu nauczycieli dla pogłębienia zrozumienia biotechniki jak również wniesienia wkładu w naukowo uzasadnioną, publiczną debatę w tej dziedzinie.

BELGIA

Vic Damen / Marleen Van Strydonck, R&D Groep VEO, Afdeling Didactiek en Kritiek, Universiteit Antwerpen, Universiteitsplein 1, B-2610 WILRIJK.

DANIA

Dorte Hammelev, Biotechnology Education Group, Foreningen af Danske Biologer, Sonderengen 20, DK-2860 SOBORG.

Lisbet Marcussen, Biotechnology Education Group, Foreningen af Danske Biologer, Lindevej 21, DK-5800

NIEMCY

Horst Bayrhuber / Eckhard R. Lucius / Reglana Rojek / Ute Harms / Angela Kroß, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften an der Universität Kiel, Olshausenstraße 62, D-24098 KIEL.

Ognian Serafimov, UNESCO-INCS, c/O Jörg-Zürn-Gewerbeschule, Rauensteinstraße 17, D-88662 ÜBERLINGEN.

Eberhard Todt, Fachbereich Psychologie, Universität Gießen, Otto-Behaghel-Straße 10, D-35399 GIEßEN.

FRANCJA

Gerard Coutouly LEGTP Jean Rostand, 18 Boulevard de la Victoire, F-67089 STRASBOURG Cedex.

Laurence Simonneaux / Jean-Baptiste Puel, Ecole Nationale de Formation Agronomique, Toulouse-Auzeville, Boite Postale 87,

F-31326 CASTANET TOLOSAN Cedex.

IRLANDIA

Catherine Adley / Cecily Leonard, University of Limerick, LIMERICK.

WŁOCHY

Antonio Bargellesi-Severi / Alessandra Corda Mannino / Stefania Uccelli, Centro di Biotecnologie Avanzate, Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 GENOVA.

LUKSEMBURG

John Watson, Ecole Européenne de Luxembourg, Département de Biologie, 23 Boulevard Konrad Adenauer, L-1115 LUXEMBOURG.

HOLANDIA

David Bennett, Cambridge Biomedical Consultants, Schuytstraat 12, NL-2517 XE DEN HAAG.

Fred Brinkman, Hogeschool Holland, Academy for Communication, Postbus 261, NL-1110 AG DIEMEN.

Liesbeth van de Grint / Jan Frings, Hogeschool van Utrecht, Educatie Centrum voor Biotechnologie, FEO,

Afdeling Exacte Vakken, Biologie, Postbus 14007, NL-3508 SB UTRECHT

AUSTRIA

Rainhart Berner, Höhere Bundeslehr- und Versuchsanstalt für Chemische Industrie Wien, Abt. für Biochemie, Biotechnologie und Gentechnik, Rosensteingasse 79, A-2170 WIEN.

HISZPANIA

Maria Sáez Brezmes / Angela Gómez-Nino, Rosa Villamanán, Facultad de Educación, Universidad de Valladolid, Geologo Hernández Pacheco 1, ES-47014 VALLADOLID.

SZWECJA

Margareta Johansson, Föreningen Gensyn, PO Box 37, S-26881 SVALÖV

Elisabeth Strömberg, Östrabo Gymnasiet, S-45181 UDDEVALLA.

ZJEDNOCZONE KRÓLESTWO

Wilbert Garvin, Northern Ireland Centre for School Biosciences, NIESU, School of Education, The Queen's University of Belfast, BELFAST, BT7 1NN.

John Grainger / John Schollar / Caroline Shearer, National Centre for Biotechnology Education, The University of Reading, PO Box 228, Whiteknights, READING, RG6 6AJ.

Jill Turner, Department of Science and Technology Studies, University College London, Gower Street, LONDON, WC1 6BT

Paul Wymer, Society for General Microbiology, Marlborough House, Basingstoke Road, READING RG7 1AE.

KOORDYNATOR Z RAMIENIA EIBE

Horst Bayrhuber, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften an der Universität Kiel, Olshausenstraße 62, D-24098 KIEL, Germany Telefon: + 49 431 880 3166 (EIBE Secretary: Regina Rojek). Fax: + 49 431 880 3132.



European Initiative for Biotechnology Education

Spis treści

Zespół opracowujący	
Prawa autorskie	04
O niniejszym materiale dydaktycznym	
wprowadzenie	04
Przepisy bezpieczeństwa	05
Zestaw Trichem ELISA	06
Test immunodyfuzyjny	11
Zestaw Steffens ELISA	14

World Wide Web

Niewiele dziedzin nauki rozwija się tak szybko jak biotechnologia. Aby można było je ciągle śledzić i poznawać ich najnowszy stan, a następnie możliwie tanio rozpowszechniać, zeszyty dydaktyczne EIBE rozpowszechnia się przy pomocy mediów elektronicznych.

Niniejszy zeszyt (i również wszystkie inne materiały dydaktyczne EIBE) stoją do dyspozycji w całej Europie i na świecie w World Wide Web.

Można je znaleźć pod

<http://www.reading.ac.uk:8001/>

Wszystkie zeszyty dydaktyczne EIBE w World Wide Web są plikami w formacie Portable Document Format (PDF). Oznacza to, że zachowana zostaje wysoka jakość rysunków, barwnych wykresów, czcionki i układu graficznego, niezależnie od zastosowania systemu (MacIntosh łącznie z Power PC, Windows, DOS lub Unix).

Pliki PDF są również mniejsze niż ich pliki źródłowe, tak że mogą one być ładowane szybciej. Gdybyście chcieli obejrzeć zeszyty EIBE, potrzebujecie jednak odpowiedniej  programu odczytu *Adobe Acrobat*.

Program *Adobe Acrobat* można otrzymać bezpłatnie w wielu językach (holenderski, angielski, francuski, niemiecki, hiszpański, szwedzki i włoski). Można go łądownać z:

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

Przy pomocy tego software możecie obejrzeć zeszyty dydaktyczne EIBE i wydrukować je sobie. Oprócz tego możecie przy jego pomocy „nawigować” i łatwo znaleźć materiały.

Uwaga: *Adobe* i *Acrobat* są zarejestrowanym znakiem towarowym firmy Adobe Systems Incorporated i są chronione prawem autorskim. *Macintosh* jest zarejestrowany jako znak towarowy firmy Apple Computer Incorporated.

Zespół opracowujący

Zestaw TriChem ELISA, który stosuje się w pierwszym doświadczeniu niniejszego zeszytu opracowany został przez następującą firmę i tam można go kupić:

TriChem
Bernhard Olsensvej 23
DK - 2830 Virum. DENMARK
tel. +45 45 85 82 83.

TriChem posiada prawa autorskie na ten produkt.

Zestaw ten został przekształcony przez „duńską grupę roboczą immunologii”, do użytku szkolnego. To opracowanie zostało opublikowane w:
Immunologiske Smaforsog, Nucleus Forlag Ap S (1994). ISBN: 87 87661 83 7.

Lisbet Marcussen
Educational Biotechnology Group
Nyborg Gymnasium
Skolebakken 13
DK - 5800 Nyborg
email: lisbetma@post 2. tele dk

Zestaw ten przez wiele lat stosowany był zarówno przy nauczaniu w szkołach duńskich, jak również przetestowany podczas warsztatów szkoleniowych dla nauczycieli w Newbridge (Irlandia) i w ośrodkach dokształcania nauczycieli biologii w Szwecji i w Danii.

Zestaw STEFEENSELISA, który przedstawiony jest w trzeciej części niniejszego zeszytu, można zamawiać w firmie

SEFFENS BIOTECHNISCHE ANALYSEN
GmbH
Baumgartenstr. 5
D-79285 Ebringen (Niemcy).

Zestaw zaadaptowany został do stosowania w szkole przez Eckharda R. Luciusa, Ute Steffens i Christine Labahn-Lucius w Instytucie Nauczania Przedmiotów Przyrodniczych (patrz adres sekretariatu). Rysunki: Erika-Ann Kolaczinski.

Współpracownicy EIBE

- **Lisbet Marcussen** (koordynator zeszytu),
Nyborg Gymnasium og HF, Nyborg, Dania
- **Birgit Sandermann Justesen**
Bjerringbro Gymnasium, Bjerringbro, Dania
- **Elisabeth Strömberg**
Östrabo Gymnasiet, Uddevalla, Szwecja
- **Eckhard R. Lucius, Ute Steffens i Christine Labahn-Lucius**
IPN w Uniwersytecie w Kilonii, Niemcy.

Dziękujemy pani Christel Ahlf-Christiani za przetłumaczenie tekstu na język niemiecki.

Projekt, ilustracje i skład drukarski:

Dean Madden i Caroline Shearer, NCBE, The University of Reading, Whiteknights, Reading RG6 6AJ, Wlk. Brytania

© Prawa autorskie

Niniejszy zeszyt EIBE jest chroniony prawem autorskim. Autorzy niniejszego zeszytu mają moralne prawo uznawać się za autorów zgodnie z przepisami Section 77 of the Designs, Patents and Copyright Act, UK (1988).

Stosowanie w dydaktyce. Do zastosowań dydaktycznych wolno wytwarzać elektroniczne kopie lub kopie na papierze niniejszego zeszytu względnie jego części, jeżeli zeszyt ten został udostępniony bezpłatnie lub po kosztach własnych i jeżeli autorzy zostaną wymienieni jako twórcy.

Inne możliwości stosowania. Zeszyt dydaktyczny wolno stosować do celów niekomercyjnych, przekazywany od jednej osoby do drugiej, jednakże z wyłączeniem elektronicznych systemów rozpowszechniania BBS, poczty elektronicznej (liststerv.), grup dyskusyjnych, komunikatów lub nieautoryzowanych stron internetowych i jakichkolwiek innych mechanizmów informacji masowej powielania i dostępu, które zastępują prawo do subskrypcji lub autoryzowanego dostępu indywidualnego. Dotyczy to również jakichkolwiek innych metod, które w istotny sposób te ograniczenia naruszają.

Stosowanie do celów komercyjnych

Używanie niniejszych materiałów w celu zysku handlowego bez uprzedniej zgody autorów jest surowo zakazane. Gdybyście chcieli wykorzystać niniejszy materiał lub jego część do celów komercyjnych lub w jakiegokolwiek postaci chcielibyście go opublikować zwróćcie się do:

EIBE Sekretariat (Regina Rojek)
c/o Institut für Pädagogik der
Naturwissenschaften an der Universität Kiel,
Olshausenstr. 62, D-24098 Kiel 1
tel: +49 431 880 3166
fax +49 431 880 3132
email: rojek@ipn.uni-kiel.de

O niniejszym zeszycie

Niniejsze materiały opracowane zostały przez aktywnych nauczycieli i naukowców-dydaktyków wielu krajów europejskich i zestawione zostały przy finansowym wsparciu Komisji Europejskiej (DG XII) we współpracy z EIBE - Europejską Inicjatywę Nauczania Przedmiotów Biologicznych.

Materiały EIBE zostały przetestowane podczas warsztatów szkoleniowych nauczycieli i studentów w całej Europie.

Poglądy i proponowane w niniejszym zeszycie doświadczenia są poglądami i doświadczeniami autorów, a nie Komisji Europejskiej.

We wdrażaniu materiałów niniejszego zeszytu szczególnie należy przestrzegać ogólnie obowiązujących przepisów bezpieczeństwa i osobnych przepisów zawartych w tekście.

Przepisy bezpieczeństwa

Spróbowaliśmy sprawdzić wszystkie znane zagrożenia wymienione w materiałach dydaktycznych EIBE i zaproponować odpowiednie środki ostrożności.

Tam gdzie to możliwe, zaproponowane sposoby postępowania odpowiadają ogólnie występującym zagrożeniom. W razie szczególnych zagrożeń konieczne jest, aby dodatkowo zwrócić na to uwagę.

Użytkownik powinien jednak być świadom faktu, że możliwe są pomyłki i błędy i że różni pracodawcy oraz władze uczelni wydają różne własne wytyczne. Z tego powodu użytkownik, przed rozpoczęciem doświadczeń zawsze powinien dokonać własnej oceny zagrożenia. Zwłaszcza należy stosować się do wszystkich miejscowych przepisów władz uczelni i pracodawców, niezależnie od tego, co proponuje się w zeszytach dydaktycznych EIBE.

W razie gdyby zalecenia ostrożności wyraźnie nie podawały inaczej, zakłada się, że:

- prace i doświadczenia przeprowadza się w odpowiednio wyposażonym laboratorium naukowym;
- wszystkie urządzenia zasilane przez instalację wodociągową, gazową i elektryczną, są konserwowane i podlegają przeglądom zgodnym z przepisami;
- przy zwykłych czynnościach laboratoryjnych jak np. podgrzewanie substancji, postępuje się z najwyższą starannością;

- przestrzega się dokładnego wykonywania prac laboratoryjnych przy posługiwaniu się chemikaliami lub żywymi organizmami;
- nosi się okulary ochronne i inne środki ochrony wzroku w razie każdego, znanego zagrożenia dla oczu;
- uczniowie i/lub studenci zapoznani są z bezpiecznym obchodzeniem się z chemikaliami i mikroorganizmami.

Zestaw ELISA TriChem do stosowania w szkole

Wstęp

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) jest czułym testem immunologicznym, stosującym enzym sprzężony z przeciwciałem lub antygenem, aby działał jako znacznik do wykrywania specyficznego białka, przede wszystkim antygeny lub przeciwciała. Test ELISA jest łatwy i prosty w stosowaniu do szybkiego oznaczania. Na przykład do:

- stwierdzania nadużycia leków;
- diagnozy różnych chorób zakaźnych jak np. infekcji wirusem HIV lub boreliozy (choroby Lyme)
- lokalizacji genów różnych mutantów (np. takich, które utworzone zostały metodą inżynierii genetycznej)
- genetyce medycznej

Niniejszy materiał dydaktyczny postawił sobie cel stworzenia uczniom i nauczycielom możliwości własnych badań z użyciem zestawu ELISA. Lepsze zrozumienie tej ważnej i często stosowanej metody testowania da również podstawy do dyskusji na temat jej zastosowania.

Jeżeli życzy sobie dalszych informacji o tej metodzie, zwróćcie się do The Danish Immunology Group lub do firmy TriChem (adres znajdziecie na początku tego zeszytu).

Opisane poniżej doświadczenie korzysta z testu ELISA do analizy próbek krwi świń, aby ustalić, czy zwierzęta zakażone są określonymi bakteriami. Poprzez wytwarzanie toksyny bakteria *Pasteurella multocida* powoduje różne deformacje kości w okolicy ryja zakażonej świni. Prowadzi to do deformacji zgryzu, kichania i różnego rodzaju zaburzeń funkcjonowania układu oddechowego. Po tych napadach często następuje atak *Bordetella*

bronchiseptica, co jeszcze pogarsza stan zdrowia.

Konsekwencją jest powolny wzrost zwierzęcia i straty ekonomiczne hodowcy. Dlatego ważne jest tak szybkie jak to możliwe usunięcie infekcji. Metoda testowania ELISA może być stosowana zarówno do wykrycia toksyny jak również bakterii *Bordetella bronchiseptica*.

W niniejszym doświadczeniu stosowane są antygeny bakterii *Bordetella bronchiseptica* (*Bb*). Pierwszego dnia umieszcza się antygeny bakterii w zagłębieniach płytki testu ELISA (powlekanie). Następnego dnia płytki gotowe są do analizy próbek krwi świni. Jeżeli świnię zakażoną jest bakterią *Bb* badanie krwi wykaże pozytywną reakcję z antygenami, co jest widoczne poprzez zmianę barwy.

Wskazówki dla nauczycieli

Cel

Analiza próbek krwi świni, przy pomocy metody ELISA.

Czas wykonywania testu

1. dzień - około 15 minut
2. dzień - około 2 x 45 minut

Wskazówki bezpieczeństwa

Kwas 5-aminosalicylowy nie jest toksyczny i stosowany jest w dawkach gramowych do leczenia ludzi, ale stosowane związki są znane jako związki mutagenne.

Dlatego konieczne należy posługiwać się kwasem 5-aminosalicylowym z najwyższą ostrożnością.

Używajcie rękawic gumowych.

Przebieg doświadczenia

1. dzień

Przygotowanie odczynnika PBS:

Rozpuśćcie zawartość butelki z napisem „PBS” w 2,5 l wody destylowanej. Sprawdźcie wartość pH. Powinna ona wynosić od 7,2 do 7,5. W razie potrzeby dodajcie 5 M NaOH lub 5 M HCl.

Należy zostawić 30 ml tego roztworu do wykonania roztworu opłaszającego.

Do reszty odczynnika PBS dodajcie zawartość butelki z napisem „TWEEN 20”. Przepłuczcie butelkę niewielką ilością odczynnika PBS, aby wydostać całą zawartość butelki. Zmieszajcie dokładnie oba roztwory, a otrzymany roztwór opisujecie jako „bufor płuczący”. Przykryjcie pojemnik.

Następnie dodajcie zawartość butelki opisanej „Bb ANTIGEN” do 30 cm³ odczynnika PBS. Dobrze wymieszajcie! **Jest to roztwór do opłaszania.**

Płytki do badań wykonane są z tworzywa sztucznego i zostały napromieniowane po to, aby podwyższyć ich przyczepność i zagwarantować sterylność.

Antygen jest ekstraktem bakterii *Bordetella bronchiseptica* (Bb) zabitych przez gotowanie.

2. dzień

Przygotowanie surowic

Surowica 1: surowica kontrolna negatywna ze świni nie zakażonej bakterią Bb.

Surowice 3-10: nieznane surowice świń. Z tego cztery są negatywne, pozostałe cztery mniej lub bardziej pozytywne.

Surowica 12: pozytywna surowica kontrolna.

Wszystkie surowice pozytywne pochodzą ze zdrowych świń, zaszczepionych zabitymi bakteriami Bb.

Przygotowanie koniugatu

Koniugat musi być świeżo przygotowany, w sposób następujący: wlejcie 25 cm³ buforu myjącego do butelki opisanej BSA i wstrząsajcie roztworem aż będzie klarowny. Następnie dodajcie zawartość butelki z napisem „Koniugat”.

Wypłuczcie butelkę buforem BSA do mycia, aby wydostać całą zawartość. Dobrze mieszajcie.

Koniugat zawiera królicze immunoglobuliny związane z enzymem peroksydazą chrzanową skierowane przeciwko przeciwciałom IgG świni.

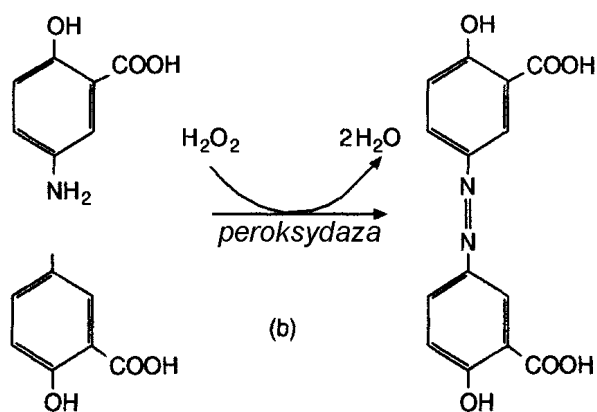
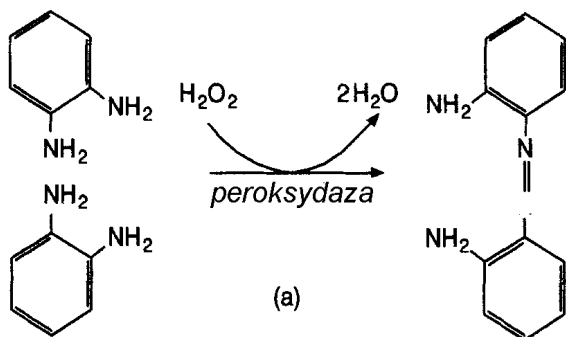
BSA (Bovine Serum Albumin, albumina z surowicy bydlęcej)

BSA stosuje się po to, aby zapobiec niespecyficznemu adsorpcji przeciwciał lub koniugatu do powierzchni dołków. BSA używa się w tak dużym stężeniu, aby mogła być zaadsorbowana do wolnych miejsc na powierzchni dołków.

Roztwór substratu

Ważne: roztwór ten musi być sporządzony na świeżo!

Rozpuśćcie kwas 5-aminosalicylowy z butelki opisanej jako „substrat”, mieszając z zawartością butelki z napisem „bufor substratu H₂O₂”). Obydwa roztwory wymieszajcie ze sobą, aż wszystko rozpuści się. **Używajcie rękawic.**



U góry: a) utlenianie o-fenylenodwuaminy

b) utlenianie kwasu 5-aminosalicylowego

Wskazówki dla nauczycieli

Odpowiedzi na pytania

1. Surowice ujemne są to surowice nr 4, 5, 8 i 9 surowicami dodatnimi są surowice nr 6, 7, 10 i 3 (w kolejności według zmniejszającej się siły reakcji).
Surowica nr 1 jest kontrolną surowicą ujemną, która pobrana została ze świni nie zakażonej bakterią Bb.
Surowica nr 12 jest kontrolną surowicą dodatnią.
3. Wirusy mogą być używane jako antygeny.
W koniugacie stosuje się przeciwciała przeciwko ludzkim IgG.
4. Nawet zabity materiał patogenny może być niebezpieczny dla ludzi. Jest bardzo trudno uzyskać ludzką surowicę całkowicie wolną od czynników chorobotwórczych jak wirusy żółtaczki lub HIV.

Uwaga:
dodatknie miano nie oznacza koniecznie, że zwierzę jest zakażone. Może to być wynikiem przebytej infekcji

Wypożyczenie i materiały

Prosimy zwracać uwagę na to, że po zakupieniu zestawu roboczego niektóre odczynniki powinny być przechowywane w lodówce.

mikropipeta ze skalą do 100 μ l
zlewka 100 cm^3
cylinder miarowy 20 cm^3 , 100 cm^3
mieszadło magnetyczne
butelka szklana 3 l
2,5 l wody destylowanej
HCL 5 M
NaOH 5 M
rękawice gumowe (bardzo mocne)
markery (wodoodporne)
1 butelka antygeny (wygotowany ekstrakt bakterii *Bordetella bronchiseptica*)*
1 pudełko z 10 fiołkami surowicy świni*
1 butelka z substratem: kwas 5-aminosalicylowy (30 mg)*
1 butelka koniugatu: królicze przeciwciała związane z enzymem peroksydazą chrzanową skierowane przeciwko IgG świni*
1 fiołka buforu substratu z H_2O_2 *
płytki do badań z pokrywkami*
1 butelka z solami do wykonania PBS (bufor fosforanowy)*
1 butelka (2,5 cm^3) Tween 20 (syntetyczny detergent)*
pipety z tworzyw sztucznych*
rękawice gumowe*
1 butelka z BSA (Bovine Serum Albumin)*
łyżeczka plastikowa*
worek na odpady*

*) wchodzi w skład zestawu

Instrukcja dla uczniów

Przebieg doświadczenia

1. dzień

Oplaszczanie dołków antygenami

1. 100 µl roztworu z antygenami wprowadź do wszystkich dołków (w sumie 36) oznaczonych literą A, B i C.
2. Przykryj płytkę i odstaw do następnego dnia, w temperaturze pokojowej. Jeżeli następnego dnia nie możecie kontynuować doświadczenia, umieście płytki w lodówce.

2. dzień

Usuwanie nadmiernej ilości antygeny

1. Usuń zawartość dołków (przez szybkie odwrócenie płytki i wylanie do zlewu).
2. Wstrząśnij odwróconą płytką, aby osuszyć dołki.

Płukanie

3. Napełnij dołki opłaszczony uprzednio antygenem wlewając bufor do płukania. Odczekaj minutę!
4. Następnie opróżnij je całkowicie (strząśnij gdy to konieczne).
5. Powtórz operację 3 i 4 dwukrotnie.

Dodawanie surowicy

6. Wstrząśnij rozmrożonymi roztworami różnych surowic.
7. Dodaj 100 µl surowicy 1 do dołków oznaczonych A, B i C w 1. rzędzie (3 otwory).

Zmieniaj końcówkę pipety!

8. 100 µl surowicy 3 dodaj do dołków A, B i C w 3. rzędzie.

Drugi rząd pozostaje nietknięty.

Zmieniaj końcówkę pipety!

9. W taki sam sposób napełnij dołki w rzędzie 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 i 12.

Rzędy 2 i 11 pozostają niewykorzystane.

Pamiętaj o tym, aby przy każdej nowej surowicy wymieniać końcówkę pipety!

10. Inkubuj płytki przez 15 minut w temperaturze pokojowej.

Usuwanie nadmiaru surowicy

11. Opróżnij równocześnie wszystkie dołki. Gdy to potrzebne, wstrząśnij płytką aż będzie sucha.
12. Płucz, opróżniaj i osuszaj dołki trzykrotnie, jak opisano w operacji 3 i 4.

Dodawanie koniugatu

13. 100 µl koniugatu wlewaj do wszystkich dołków A, B i C.
14. Inkubuj płytki przez 15 minut w temperaturze pokojowej.
15. Płucz, opróżniaj i osuszaj dołki jak opisano w operacji 12.

Dodawanie substratu

16. 100 µl roztworu substratu wlewaj do wszystkich dołków.
17. Odczekaj, aż ujawni się reakcja barwna. Zanotuj wyniki w tabeli ze skalą intensywności barwy od 0 do 5.
0 oznacza ujemną, a 5 najbardziej pozytywną reakcję. Możecie również opisać kolory.

Usuwanie odpadów

Zapakujcie pipety i płytki w plastikowy worek i wyrzućcie. Pozostałości roztworów mogą być wylane do zlewu.

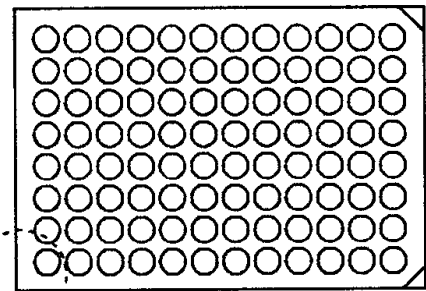
Wyniki i ich ocena

1. Która z nieznanymi surowic była pozytywną? Uszereguj surowice według wzrastających wyników pozytywnych.
2. Jakie możliwe błędy mogą wystąpić w analizie?
3. Który z odczynników musi być wymieniony, jeżeli zechcecie przeprowadzić podobny test, aby stwierdzić obecność przeciwciał wirusa ludzkiej odry?
4. Dlaczego w niniejszym badaniu nie stosujemy testu obecności antygeny wirusa odry?

Test proteinowy ELISA

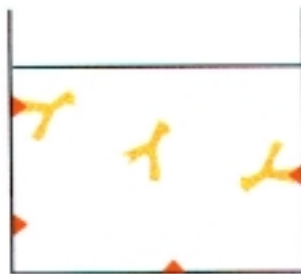
Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

Po każdym dodaniu odczynnika płytę inkubuje się, następnie przepłukuje się dołki aby usunąć materiał, który nie przereagował.



1. *Dodane białko (antygen), które wiąże się z powierzchnią dołków.*

Przemywanie, aby usunąć nie związane cząsteczki.



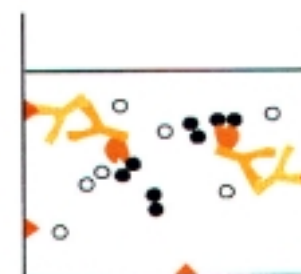
2. *Dodana próbka. Przeciwciała łączą się ze związanymi antygenami.*

Przemywanie, aby usunąć nie związane cząsteczki.



3. *Dodany koniugat przeciwciała z enzymem. Koniugat wiąże się z przeciwciałami, które są związane w dołkach.*

Przemywanie, aby usunąć nie związane cząsteczki.



4. *Dodanie bezbarwnego substratu enzymu. W obecności związanego enzymu następuje reakcja barwna.*

Jak wykrywa się albuminę jaja w różnych środkach spożywczych przez zastosowanie testu immunodyszfuzji podwójnej

Jaja kurze stosowane są w różnych wyrobach spożywczych, jak np. w hamburgerach, makaronach i czasami w lodach. Wielu ludzi uczulonych jest na niewielkie ilości jaj. Możliwe jest wykrycie już małych, śladowych ilości białka lub żółtka kurzego, przez zastosowanie przeciwciał przeciwko albuminie jaj. Stosowana metoda nazywana jest immunodyszfuzją podwójną.

Jeżeli antygen i przeciwciało reagują ze sobą w strefie równowagi, często tworzą usieciowane precypitaty. Gdy reakcja przebiega w odpowiednim podłożu jak np. w żelu agarowym, antygen i przeciwciało tworzą linie lub łuki precypitacyjne, które mogą służyć do identyfikacji kompleksów antygen-przeciwciało.

Precypitaty tworzą się dlatego, gdyż przeciwciała i antygeny mają więcej niż jedno miejsce związania i z tego powodu tworzą się duże, usieciowane struktury. Im dalej od strefy ekwiwalencji tym mniej tworzy się precypitatów.

Metoda podwójnej immunodyszfuzji opracowana została 30 lat temu, przez Szweda Örljana Ouchterlony'ego. Jego metoda zwana jest „podwójną” ponieważ przy tym procesie antygen i przeciwciało w żelu mogą migrować jeden ku drugiemu i przy ich spotkaniu się tworzy się łuk lub linia.

Ta reakcja wytrącania jest wysoce swoista i czuła. Dzisiaj stosuje się ją w diagnostyce, przy wykrywaniu białek lub porównywaniu antygenów i przeciwciał.

Wskazówki dla nauczycieli

Cel

Wykrywanie albuminy jaj w różnych środkach spożywczych.

Wymagania czasowe

1. dzień: 60 minut i inkubacja nocna, aż utworzą się linie (patrz wprowadzenie dla nauczycieli), 20 minut na analizę wyników.
(Jeżeli chcecie zabarwiać to potrzeba dalszych 2 godzin i 45 minut).

Wskazówki bezpieczeństwa

Nie potrzeba żadnych szczególnych środków bezpieczeństwa.

Uwagi

Wycinanie studzienek w żelu

Konieczny będzie regularny wzór studzienek wycinanych w żelu agarowym. Dlatego dobrym pomysłem byłoby wytłoczenie pierwszej studzienki blisko krawędzi i pozostawienie miejsca na drugie doświadczenie.

W tym celu używajcie słomki lub pipety plastikowej. Precypitaty liniowe tworzą się szybciej, gdy odstęp między studzienkami zostanie zmniejszony. Przy odstępnie 5 mm po 24 godzinach wynik jest widoczny, a przy odstępnie 10 mm dopiero po 48 godzinach.

Po pierwszym dniu:

Jeżeli używacie szkiełek podstawowych, a w laboratorium jest bardzo ciepło albo sucho, to szkiełka podstawowe muszą być przetrzymywane w wilgoci do następnego dnia np. w płytce Petriego z wilgotną ściereczką papierową lub bibułą filtracyjną i folią plastikową.

Gdy szkiełka podstawowe muszą być przechowywane przez wiele dni, zaleca się przechowywanie w wilgotnym worku plastikowym ze środkiem konserwującym, aby zapobiec pleśnieniu. Uważajcie na to, aby nie uszkodzić żelu.

Szkiełka podstawowe po jednej nocy są gotowe, jednak mogą być przechowywane w lodówce do jednego tygodnia.

Roztwór odniesienia

Sporządzenie roztworu kontrolnego białka może być trudne, więc można najpierw ubić białko, a następnie sporządzić roztwór z pozostałej płynnej części białka.

Przeciwciała przeciwko albuminie jaja kurzego

Przeciwciała liofilizowane rozpuszcza się według instrukcji w buforze TRIS. Roztwór ten można poporcjować do probówek Eppendorfa i przechowywać w zamrażarce.

Odpady

Wszystko można usuwać jak normalne odpady.

Barwienie

Zabarwienie nie jest konieczne, jednak może się przyczynić do uzyskania bardziej wyrazistych wyników.

Do zabarwienia mogą być użyte czerń amidowa i Coomassie Brilliant Blue.

Wypożyczenie i materiały

Szkiełka podstawowe lub małe płytki Petriego o średnicy 5 cm

1 słomka lub pipeta plastikowa o średnicy 2,5 mm, aby w żelu agarowym wyciąć studzienki.

mikropipety: 0 - 10 cm³

wilgotna komora dla szkiełek podstawowych np.

puszka plastikowa z wilgotnymi ściereczkami z papieru albo małe płytki Petriego o średnicy 5 cm

mikser/mieszadło

wirówka

suszarka do włosów*

bibuła filtracyjna

odważnik ok. 1 kg*

kuweta do zabarwiania żelu*

bufor TRIS 0,01 M, pH 8,0

roztwór agarowy 1% w buforze TRIS

roztwór odniesienia: 0,01% białka rozpuszczonego w wodzie destylowanej

przeciwciała królicze przeciwko albuminie jaja kurzego (Pharmacia AS-23)

kwasy octowe

metanol

roztwór czerni amidowej (0,1 g czerni amidowej rozpuszczonej w 100 cm³ mieszaniny kwasu octowego, metanolu i wody destylowanej w stosunku 10 : 70 : 20)*

roztwór chlorku sodu 0,9%

roztwór odbarwiający zawierający kwas octowy (10%), metanol (70%) i wodę destylowaną (20%)*

* potrzebne tylko przy zabarwianiu

Instrukcja dla uczniów

Przebieg doświadczenia

Przygotowanie próbek

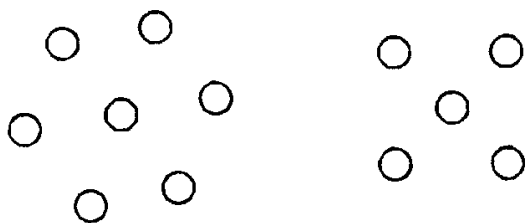
1. Homogenizujecie 5 g próbki tak dobrze jak to możliwe w 5 cm³ wody.
2. Odwirujecie wymieszaną próbkę przez 15 minut przy 6000 rpm (lub 10 minut przy 9500 rpm).
3. Przefiltrujecie supernatant przez ściereczkę, do czystej próbowki.

Wylewanie żelu

4. Rozpuśćcie właściwą ilość agarozы w buforze TRIS (1%). Wymieszajcie. Na jedną płytkę Petriego (5 cm) potrzebujecie 3-5 cm³ roztworu, a na szkiełko podstawowe 3,5 cm³. Ostrożnie! łatwo może wykipieć!
5. Pozostawcie do ochłodzenia do temperatury 60-80°C.
6. Postawcie płytki Petriego (lub szkiełka podstawowe) na wypoziomowanym stole, blisko krawędzi. Zdejmijcie pokrywki.
7. Gorący żel wlewajcie do płytek lub na szkiełka. Wystarczy warstwa grubości około 2-3 mm. Z powrotem załóżcie pokrywki.
8. Pozostawcie żel do zestalenia. Będzie to trwało ok. 5-10 minut.

Wycinanie studzienek

9. Używajcie słomki lub pipety o średnicy około 2,5 mm, aby wyciąć studzienki w żelu. Bądźcie ostrożni i zróbcie studzienki o pionowych ściankach. Korki z żelu usuwajcie przez zassanie pipetą lub przy pomocy igły. Wykonajcie następujący wzór studzienek:



Dodawanie przeciwciała

Uwaga: Każdą studzienkę przed jej napełnieniem opiszcie wyraźnie na spodniej stronie płytki Petriego lub szkiełka podstawowego.

10. Środkowe studzienki napełnijcie przeciwciałami (przeciwciała przeciwko albuminie jaja kurzego). Powinno wystarczyć 5-10 µl.
Nie napełniajcie studzienek nadmiernie, do przelewania się cieczy.

Dodawanie antygenów

11. Co drugą zewnętrzną studzienkę napełnijcie roztworem odniesienia.
Nie napełniajcie studzienek nadmiernie do przelania się cieczy!
12. Pozostałe zewnętrzne studzienki napełnijcie próbkami badanymi. Opiszcie, jaka próbka znajduje się w której studzience.
Nie napełniajcie studzienek nadmiernie do przelania się cieczy!

Płytki Petriego/szkiełka podstawowe pozostawcie przez noc w wilgotnej komorze w temperaturze pokojowej lub w lodówce, dla przedyfundowania.

13. Później możecie obejrzeć białe łuki lub linie precypitacyjne tam, gdzie nastąpiła pozytywna reakcja. Jeżeli szkiełka przedmiotowe/płytki Petriego przytrzymacie przed ciemnym tłem, linie mogą być lepiej widoczne.

Barwienie (fakultatywnie)

14. Nie wytrącone białka usuńcie mocząc żel 60 minut w 0,9% roztworze NaCl przy temperaturze pokojowej.
15. Usuńcie roztwór soli i napełnijcie kuwetę wodą destylowaną.
- Pozostawcie ją na 60 minut na temperaturze pokojowej.**
16. Usuńcie wodę. Prasujcie żel przez 10 minut pod warstwą 10 bibuł filtracyjnych z nałożonym ciężarkiem ok. 1-kilogramowym.
17. Wsuszcie żel suszarką do włosów.
18. Pokryjcie żel roztworem barwiącym i pozostawcie na 10 min do zabarwienia.
19. Usuńcie roztwór barwiący. Stosując roztwór odbarwiający odbarwiajcie przez 10 minut. Być może trzeba będzie powtórzyć operację odbarwiania.

Wyniki

Granica wykrywalności białka wynosi 2,5 mg w 100 g. Jeżeli w próbce znajduje się dostateczna ilość białka jaj kurzych to daje się zauważyć reakcja precypitacji. Żółtko jajka kurzego również zawiera dostatecznie dużo białka, aby umożliwić jego wykrycie.

Zestaw Steffens Elisa do użytku szkolnego



Wprowadzenie

Zestaw Steffens ELISA pozwala wykryć chorobę wirusową pelargonii powstałą w wyniku infekcji wirusem PFBV (*Pelargonium flower break virus*). Unieruchomienie przeciwciała (które reaguje swoiście z białkami otoczki wirusa PFBV) na specjalnym grzebieniu umożliwia przeprowadzenie testu szczególnie łatwo i oszczędnie pod względem czasowym, mianowicie w ciągu godziny lekcyjnej. Dla przygotowania i wykonania prac końcowych przy doświadczeniu powinno się zarezerwować podwójną godzinę lekcyjną.

Zestaw pozwala wykryć infekcję wirusem PFBV w 2 x 10 próbkach, w sposób czuły i pewny. Aby zapewnić działanie testu bez zarzutu pokryto 11. i 12. ząb grzebienia ujemną i dodatnią próbką kontrolą. (zielony względnie czerwony punkt).

Czułość testu wyznaczono ekstrahując buforem zakażony materiał roślinny (*Chenopodium quinoa*) i rozcieńczając ekstrakt. Wirus mógłby być wykryty jeszcze po rozcieńczeniu 10-procentowego ekstraktu w stosunku 1 : 1000 (> 100 m OD ponad próbką kontrolną zdrową).

Odczynniki zestawu przy temperaturze 4°C są stabilne co najmniej do końca podanego okresu przydatności.

Literatura

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

Clark, M.F., Adams, A.N. (1977); *J.Gen. Virol.* **34**, 475-483.

Hollings, M., Stone, O.M. (1974): Description of plant viruses. CMI/AAB, No. **130**, 4pp

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.

Wskazówki dla nauczycieli

Wykaz materiałów

Do doświadczenia potrzebne są:

Zestaw bezpośrednio z firmy STEFFENS ELISA (nr katalogowy 04093 POO):

W hermetycznym worku plastikowym ze środkiem osuszającym zapakowane oddzielnie: 1 grzebień specjalny o 12 zębach, na których opłaszczono są przeciwciała PFBV, 3 taśmy z 12 naczynkami reakcyjnymi (3 taśmy ze studzienkami).

10 woreczków ekstrakcyjnych (woreczki plastikowe z gazą bawełnianą)

1 naczynie z 50 ml buforu do próbek (żółty), gotowego do użycia

12 pipet jednorazowych (dla 10 próbek, 1 dla rozcieńzonego koniugatu i 1 dla substratu)

1 pipeta jednorazowa ze skalą dla buforu do próbek

1 pipeta jednorazowa bez skali z małym otworem dla skoncentrowanego koniugatu

1 fiołka z 0,05 ml skoncentrowanego koniugatu (bezbarny)

1 buteleczka z nakrętką z 1,6 ml buforu koniugatu (niebieska)

1 buteleczka z nakrętką z 1,6 ml roztworu substratu gotowego do użycia (bezbarny)

1 stojak do pipet (część opakowania wewnętrznego)

Części zestawu, które muszą być uprzednio przygotowane:

Wszystkie odczynniki przed badaniem muszą być sprowadzone do temperatury pokojowej.

3 taśmy z naczynkami reakcyjnymi (taśmy ze studzienkami) wstawia się do stojaka dla pipet, który wykonuje się z tektury zginając wewnętrzną wkładkę opakowania.

Skoncentrowany koniugat przenosi się bardzo dokładnie do niebieskiego buforu koniugatu. W tym celu używa się jednorazowej pipety bez skali z małym otworem. Zawartość starannie miesza się.

Dodatkowo potrzeba:

Do 10 pelargonii z różnych upraw.

1 nożyce

1 homogenizator (względnie uchwyt śrubokręta lub inny twardy przedmiot)

zimna woda wodociągowa.

niekoniecznie potrzebne: 1 fotometr (650 nm) o ile istnieje, w przeciwnym razie ocenia się wzrokowo.

kubek na odpadki, pojemnik zbiorczy z tworzywa sztucznego, zlew.

Plan lekcji

Możliwy przebieg lekcji:

1. godzina lekcyjna

- wprowadzenie w temat
- reakcje antygeny-przeciwciała
- choroby wirusowe
- zadanie domowe: uczniowie postarają się o materiał roślinny (cała pelargonii lub świeżo zebrane liście)

2. i 3. godzina lekcyjna (podwójna godzina)

- homogenizowanie 10 próbek w woreczkach ekstrakcyjnych (praca grupowa uczniów)
- przygotowanie taśm z naczynkami reakcyjnymi jak również roztworów. Na koniec wlewanie próbek wykonywane przez uczniów.
- przeprowadzanie poszczególnych operacji przez uczniów lub nauczyciela
- ocena wyników

4. godzina lekcyjna

- dyskusja wyników
- jakie czynniki mogą sprzyjać chorobom wirusowym?
- cele uprawy roślin

Wskazówki i rady

Podział zestawu: ponieważ zestaw ELISA przewidziany jest do 2 testów po 12 analiz, zawiera podwojone ilości części składowych. Połowa zestawu może dlatego pozostać w pudełku i można ją

przechować do jego dalszego zastosowania ochładzając do 4°C.

Pipety: Nie powinno się niepotrzebnie dotykać końcówek pipet.

Homogenizator: przy użyciu homogenizatora próbka daje się łatwo i szybko ekstrahować. O miejsce zakupu homogenizatora prosimy pytać się w firmie STEFFENS Biotechnische Analysen GmbH. Zamiast niego, jako prowizoryczny środek zastępczy daje się zastosować stabilny, gładki przedmiot np. tłuczek moździerza lub uchwyt śrubokręta.

Grzebień specjalny: Grzebień niezbędny do doświadczenia antygen-przeciwciała znajduje się w oddzielnym woreczku plastikowym, razem z trzema taśmami ze studzienkami (taśmy z tworzywa sztucznego z 12 naczynekami reakcyjnymi). Woreczek plastikowy zawiera środek osuszający w oddzielnej saszetce. Na zębach grzebienia unieruchomione są przeciwciała poliklonalne, które swoiście rozpoznają wirusa kwiatów pelargonii (*Pelargonium Flower Break Virus, PFBV*). Jedenasty ząb grzebienia został dodatkowo pokryty negatywną próbką kontrolą (zielony punkt), a dwunasty pozytywną (czerwony punkt). Grzebień powinno się chwytać tylko za jego zielony chwyt. Należy unikać dotykania zębów grzebienia.

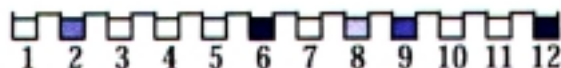
Przygotowanie taśm ze studzienkami: pokrywę wewnętrznej wkładki pudełka unosi się. Pobiera się połowę woreczków ekstrakcyjnych i pipet. Pokrywę wewnętrznej szufladki oddziela się i zgina tak, aby mogła ona przyjąć 3 taśmy z naczynkami reakcyjnymi. Służy ona jako stojak do pipetowania. Odcina się worek plastikowy z grzebieniem. Pobiera się 3 taśmy z zagłębieniami i osadza w stojaku do pipetowania. Kolejność i orientacja są obojętne. Najlepiej pozostawić grzebień w worku, aby jego zębów niepotrzebnie nie dotykać. Środek osuszający nie jest już potrzebny i można go wyrzucić do śmieci.

Koniugat: Skoncentrowany koniugat możliwie w całości przeprowadza się do niebieskiego buforu koniugatu. Stosuje się do tego pipetę jednorazową bez skali, o małym otworze. Uwaga: krople koniugatu mogą wisieć na pokrywce. Pipetę na koniec wyrzuca się do śmieci. Koniugat i bufor należy wymieszać dokładnie.

Usuwanie odpadów: po dokonaniu oceny wyników testu wyrzucić grzebień i taśmy ze studzienkami do pojemnika zbiorczego z tworzywa sztucznego. Nie próbujcie wielokrotnie stosować taśm z naczynkami; nawet po gruntownym wymyciu moglibyście otrzymać wyniki, które pozornie wskazywałyby na pozytywną reakcję, w rzeczywistości jednak byłaby to reakcja negatywna.

Typowy wynik

Poniższy schematyczny rysunek trzeciej taśmy ze studzienkami pokazuje typowy wynik.



W naczynku 11 negatywnej próbki kontrolnej (zielona kropka na grzebieniu) w żadnym razie nie może wystąpić reakcja barwna.

W naczynku 12 pozytywnej próbki kontrolnej (czerwona kropka na grzebieniu) zawsze rozpoznawalne jest intensywne zabarwienie na niebiesko.

Te obydwa wyniki porównuje się z wynikami próbek (naczynka 1 do 10). Odcienie koloru zmieniają się między słabo a silnie niebieskim, w zależności od stopnia zainfekowania materiału roślinnego.

Bezpieczeństwo

Chemikalia

Skład buforu próbek: bufor Tris/HCl, poliwinylpyrolidon, NaCl, Tween 20, azydek sodowy, barwnik spożywczy E 102.

Azydek sodowy: wskaźnik ryzyka 28, 32, wskaźnik bezpieczeństwa 28.1.

Skład koniugatu: bufor fosforanowy, peroksydaza z chrzanu, albumina z surowicy bydlęcej, Tween 20, Bronidox L (5-bromo-5-nitro-1,3-dioxan), barwnik spożywczy E 131, brak wskaźników ryzyka i bezpieczeństwa.

Skład substratu: TMB (czterometylobenzodyna), bufor, H₂O₂. Wskaźniki ryzyka: 23, 25, 26/37/38, wskaźniki bezpieczeństwa: 7, 16, 24, 45

Odczynniki zawierają azydek sodowy i Bronidox L jako stabilizatory. Trujące przy połknięciu!

Usuwanie odpadów: brak szczególnych wskazań
Gwarancja

EIBE nie przejmuje odpowiedzialności za materiały i chemikalia wchodzące w skład zestawu.

STEFFENS Biotechnische Analysen GmbH gwarantuje, że dostarczony wyrób został gruntownie zbadany, aby zapewnić to, że odpowiada wykazom i opisom prospektów. Dalej idących gwarancji nie udziela się. W szczególności firma STEFFENS Biotechnische Analysen GmbH nie może akceptować żadnej odpowiedzialności za szkody, które powstały wskutek niewłaściwego magazynowania i stosowania produktu.

Zamawianie zestawu Steffens - ELISA

Zestaw kosztuje ok. 200 DM. Może być sprowadzany bezpośrednio z firmy STEFFENS Biotechnische Analysen GmbH, Baumgartenstr. 5, 79285 Ebringen, tel. 07664-600-254, fax: - 255.

Arkusz pracy

Nr próbki	Dane identyfikacyjne (pochodzenie, nazwa itp.)	Uwagi (przebieg doświadczenia itp.)	Wynik
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11	negatywna próbka kontrolna		bezbarwna
12	pozytywna próbka kontrolna		niebieska

Instrukcja dla uczniów

Wprowadzenie

Immunobiologia jest dzisiaj jedną z najbardziej znaczących dziedzin naukowych biologii stosowanej. Już na początku tego stulecia Paul Ehrlich (nagroda Nobla 1908) odkrył rolę przeciwciał w ochronie przed chorobami zakaźnymi. Podstawą reakcji odpornościowych jest powstawanie swoistego kompleksu antygeny z przeciwciałem, do którego tworzenia zdolne są tylko kręgowce.

Antygen jest substancją wywołującą produkcję przeciwciał w organizmie. Praktycznie mogą to być wszystkie związki organiczne obce dla danego organizmu jak polisacharydy, białka, peptydy lub kwasy nukleinowe. Określone swoiste, globularne białka, tak zwane immunoglobuliny działają jako przeciwciała. „Rozpoznają” one określone struktury powierzchniowe antygenów na poziomie molekularnym i łączą się z nimi w nierozpuszczalny kompleks.

W immunologicznym postępowaniu diagnostycznym wykorzystuje się tę właściwość przeciwciał. I tak można wykryć śladowe ilości antygenów w zakresie nanogramowym (10^{-8} g/ml próbki). Przeciwciała uprzednio uzyskiwano od zwierząt, którym wstrzyknięto określone antygeny. Jednak wydajność była bardzo mała. Dzisiaj posługujemy się biotechnologiczną metodą tworzenia hybryd („hybridoma-process”), dzięki której można uzyskać przeciwciała monoklonalne. W tym celu stosuje się tak zwane komórki hybrydowe. Wytwarza się je przez fuzję limfocytów produkujących przeciwciała i komórek nowotworowych. W wyniku połączenia tych komórek powstają hybrydy mogące stale namnażać się w pożywkach i produkować przeciwciała monoklonalne.

Dla testu diagnostycznego przeciwciała muszą być znakowane, aby uwidocznili kompleks antygen-przeciwciała.

Dzisiaj odbywa się to przeważnie przez chemiczne sprzężenie przeciwciała z enzymem. Enzym z kolei reaguje z substratem, przekształcając go w barwny produkt reakcji. Reakcja barwna wskazuje na to, że poszukiwany antygen lub przeciwciała znajduje się w próbce. Nazwa testu ELISA oddaje opisaną zasadę: Enzyme linked immuno sorbent assay.

Przy pomocy tej metody daje się zbadać wiele antygenów, np. takie, które mają pochodzenie wirusowe. Choroby wirusowe atakują nie tylko

zwierzęta i ludzi lecz również rośliny. Rozmnażanie wegetatywne, które często stosuje się przy określonych roślinach uprawnych w rolnictwie lub ogrodnictwie sprzyja rozprzestrzenianiu się materiału zakaźnego. Nawet poprzez nasiona w niektórych przypadkach wirusy mogą być przenoszone. Dlatego technika testowania ELISA zyskuje dlatego coraz bardziej na znaczeniu, w zastosowaniu do wszystkich zdolnych do rozmnażania się roślin uprawnych. Test pozwala analizować chorobę wirusową pelargonii, powszechnie nazywanych geraniami. Choroba prowadzi do tego, że w sposób niepożądany zmienia się kolor kwiatów. Sprawca choroby nazywa się *Pelargonium Flower Break Virus (PFBV)*. Tu u nas ok. 25% wszystkich pelargonii jest zainfekowanych. A więc praktycznie w co czwartym domu, gdzie hoduje się pelargonie znajduje się odpowiedni tj. pozytywny materiał do badań. Zasada testu polega na tak zwanej technice „sandwich”: już wstępnie podane przeciwciała wiąże antygen istniejący w zainfekowanej próbce, który znowu wiąże przeciwciała: przeciwciała-antygen-przeciwciała.

Drugie przeciwciała oznakowane jest enzymem, który reaguje z substratem tworząc barwny produkt. W teście pierwsze przeciwciała są opłaszczane na zębach specjalnego grzebienia, który specyficznie rozpoznaje wirusa *PFBV*.

1. reakcja

Antygeny *PFBV* z próbki wiązane są do przeciwciał opłaszczonych na grzebieniu; powstaje kompleks antygen-przeciwciała, na zębach grzebienia.

2. reakcja

Drugie przeciwciała, znaczone przy pomocy peroksydazy z chrzanu (koniugat) wiąże się z kompleksem antygen-przeciwciała, znowu na zębach grzebienia.

3. reakcja

Kompleks antygen-przeciwciała znaczonego enzymem przemienia substrat trójmetylobenzydynę w niebiesko zabarwiony produkt. Próbkę zakażoną wirusem *PFBV* wykazują to zabarwienie na niebiesko, próbki nie zakażone pozostają bezbarwne.

Wykonanie doświadczenia

1. Przygotowanie próbek (10 min)



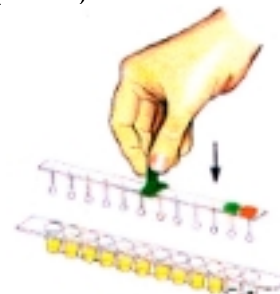
- 1.1. Włóżcie liść wielkości ok. 15 cm² (ok. 0,5 g) w środek woreczka ekstrakcyjnego, między gazę bawełnianą.
- 1.2. Dodajcie ok. 5 ml buforu do próbek (żółty) używając pipety ze skalą. Unikajcie przy tym każdego zanieczyszczenia (skażenie wtórne) buforu próbek przez ekstrakt roślinny.
- 1.3. Woreczek ekstrakcyjny połóżcie na płaską, twardą powierzchnię. Rozdrobnijcie tkankę liścia prowadząc homogenizator nad woreczkiem z naciskiem, ruchami okrężnymi, aż powstanie jednorodna zawiesina.
Zabarwienie na zielono wskazuje na uwolnienie chlorofilu. Możecie po tym rozpoznać jak dalece postąpiła ekstrakcja.

2. Rozdzielanie próbek (5 min)



- 2.1. Zanotujcie dane identyfikujące próbkę (próbki 1-10, od lewej do prawej). Odmierzajcie pipetę każdą pojedynczą próbkę do danego naczynka reakcyjnego pierwszego szeregu zagłębień w taśmie, od lewej do prawej strony. **Każdą próbkę podaje się oddzielną pipetą.** Na jedno naczynko wlewa się po 3 krople.
- 2.2. Naczynka nr 11 i 12 pozostawcie nie napełnione; podczas pierwszej reakcji pozostają one puste. Zużyte pipety wyrzucie do zbiorczego pojemnika plastikowego.

3. Pierwsza inkubacja (10 min)



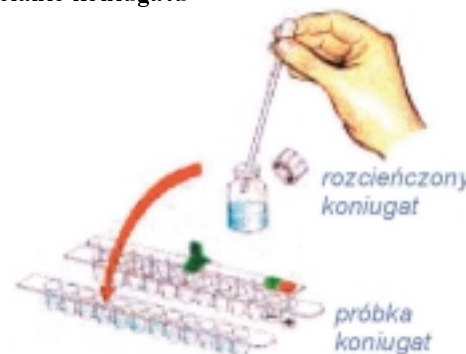
- 3.1. Osadźcie grzebień tak w pierwszym szeregu naczynek, aby próbki kontrolne (opłaszczone na grzebieniu, zielona względnie czerwona kropka) dostały się do pustych zagłębień nr 11 i 12. Tym samym następuje start pierwszej reakcji; potrzebna jest 10-minutowa inkubacja (wykorzystajcie ten czas do przygotowania koniugatu).

4. Przygotowanie koniugatu



- 4.1. Przenieście skoncentrowany koniugat, tak całkowicie jak to możliwe, do niebieskiego buforu do koniugatu.
Stosujcie do tego pipetę z małym otworem i na koniec wyrzucie ją do pojemnika plastikowego zbiorczego. Uwaga: krople mogą zwiisać z pokrywki. Nie wolno ich stracić. Gruntownie wymieszać!

5. Rozdzielanie koniugatu



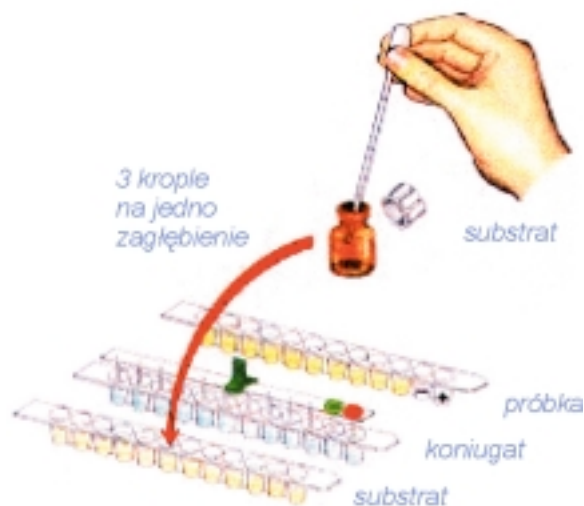
- 5.1. Rozcieńczony koniugat wkraplajcie nową pipetą w drugi szereg studzienek w taśmie, a mianowicie 3 krople na zagłębienie. Napełnijcie również naczynko 11 i 12. Pracujcie zachowując czystość tj. unikajcie każdego zanieczyszczenia trzeciego szeregu naczynek. Na koniec wyrzucie pipetę do plastikowego pojemnika zbiorczego.

6. Płukanie grzebienia (30 sek)



- 6.1. Po inkubacji próbek wyjmijcie grzebień z pierwszego rzędu.
- 6.2. Opluczcie zęby pod silnym strumieniem zimnej wody wodociągowej, przez 15 do 30 sekund. Uwaga: grzebienia nie trzymać pionowo pod strumieniem wody, aby uniknąć zakażenia próbek między poszczególnymi zębami. Gruntowne płukanie jest ważne, aby osiągnąć niewielkie zabarwienie tła.
- 6.3. Na koniec usuńcie wodę, która przywarła do grzebienia kilkakrotnie szybko strząsając ją z grzebienia.

7. Inkubacja z koniugatem (10 min) i rozdzielenie substratu



- 7.1. Włóżcie grzebień do drugiego rzędu, znów próbkami kontrolnymi (kropki) po prawej stronie.
- 7.2. Inkubujcie 10 minut.
- 7.3. Roztwór substratu wlewajcie nową pipetą do trzeciego rzędu studzienek, a mianowicie łącznie z zagłębieniem 11 i 12 (całkiem z prawej); 3 krople na zagłębienie.

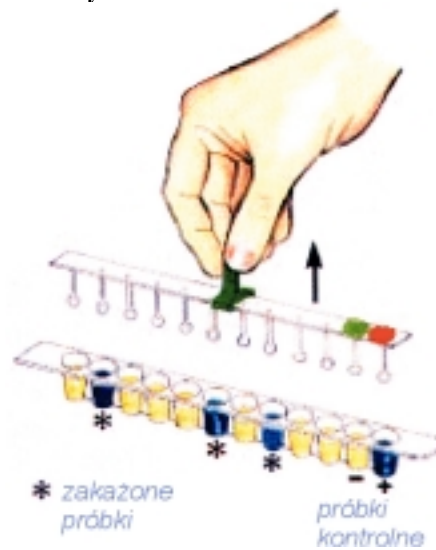
Wskazówka: substrat jest wrażliwy na światło. Koniecznie unikać bezpośredniego nasłonecznienia. Na koniec wyrzucie pipety do plastikowego pojemnika zbiorczego.

8. Inkubowanie z substratem (11 min)



- 8.1. Wyjmijcie grzebień z rzędu z koniugatem i gruntownie wymyćcie zimną wodą wodociągową jak opisano uprzednio (punkt 6).
- 8.2. Przenieście grzebień do trzeciego rzędu, który zawiera substrat, a mianowicie znów kropkami po prawej stronie. Inkubujcie przez 10 minut. Ponieważ substrat jest wrażliwy na światło powinno się przy tej operacji unikać silnego oświetlenia (np. bezpośrednie światło słoneczne).

9. Ocena wyników



- 9.1. Po wyjęciu grzebienia można dokonać oceny testu; najlepiej bezpośrednio po ostatnim inkubowaniu. Analizuje się wynik albo wzrokowo albo przy pomocy fotometru przy 650 nm.
- 9.2. Próbkami kontrolnymi służą do sprawdzania testu. Funkcjonuje on bez zarzutu wtedy, gdy próbka kontrolna pozytywna wykazuje intensywne zabarwienie na niebiesko, podczas gdy próbka negatywna pozostaje bezbarwna. Każda próbka, która wykazuje reakcję barwną silniejszą niż reakcja negatywnej próbki kontrolnej, jest z pewnością zakażona. Każda próbka, której zabarwienie nie jest intensywniejsze niż zabarwienie negatywnej próbki kontrolnej, jest prawdopodobnie nie zakażona. Zasadniczo jednak nie można wykluczyć, że stężenie wirusów jest mniejsze niż czułość testu.