



Praktische Immunologie

EINHEIT **8**

European Initiative for Biotechnology Education

Verfasser dieser Einheit

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



Die Europäische Initiative für den Unterricht (EIBE) hat sich die Aufgabe gestellt, durch einen neuartigen Unterricht in Schule und Lehrerbildung das Verständnis der Biotechnik zu fördern sowie Beiträge zu einer fundierten öffentlichen Debatte über dieses Gebiet zu liefern.

EIBE



BELGIEN

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



DÄNEMARK

| Dorte Hammelev, Biotechnology Education Group, Foreningen af Danske Biologer, Sønderengen 20, DK-2860 SØBORG.
| Lisbet Marcussen, Biotechnology Education Group, Foreningen af Danske Biologer, Lindevej 21, DK-5800 NYBORG.



DEUTSCHLAND

| Horst Bayrhuber / Eckhard R. Lucius / Regina 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-35394 GIEßEN.



FRANKREICH

| Gérard Coutouly, LEGTP Jean Rostand, 18 Boulevard de la Victoire, F-67084 STRASBOURG Cedex.
| Laurence Simonneaux / Jean-Baptiste Puel, Ecole Nationale de Formation Agronomique, Toulouse-Auzeville, Boîte Postale 87, F-31326 CASTANET TOLOSAN Cedex.



IRLAND

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



ITALIEN

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



LUXEMBURG

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



NIEDERLANDE

| 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.



ÖSTERREICH

| Rainhart Berner, Höhere Bundeslehr- und Versuchsanstalt für Chemische Industrie Wien, Abt. für Biochemie, Biotechnologie und Gentechnik, Rosensteingasse 79, A-1170 WIEN.



SPANIEN

| María Sáez Brezmes / Angela Gómez-Niño, Rosa Villamañán, Facultad de Educación, Universidad de Valladolid, Geologo Hernández Pacheco 1, ES-47014 VALLADOLID.



SCHWEDEN

| Margareta Johansson, Föreningen Gensyn, PO Box 37, S-26881 SVALÖV.
| Elisabeth Strömberg, Östrabo Gymnasiet, S-45181 UDDEVALLA.



VEREINIGTES KÖNIGREICH

| 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.

EIBE Koordinator

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



Praktische Immunologie

EINHEIT 8

European Initiative for Biotechnology Education

INHALT

Inhaltsverzeichnis

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

| | | |
|---|--|----|
| I | Entwicklungsteam, Copyright | 04 |
| I | Über diese Unterrichtseinheit Einführung | 04 |
| I | Sicherheitsbestimmungen | 05 |
| I | <i>Trichem</i> ELISA - kit | 06 |
| I | Doppelimmunodiffusionstest | 11 |
| I | <i>Steffens</i> ELISA kit | 14 |

World Wide Web

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

Wenige Gebiete entwickeln sich so schnell wie die Biotechnologie. Damit sie ständig überarbeitet und auf dem neuesten Stand gehalten und dann möglichst preiswert verbreitet werden können, werden die EIBE - Unterrichtseinheiten mit Hilfe elektronischer Medien verbreitet.

Die vorliegenden Seiten (und auch alle anderen EIBE-Unterrichtseinheiten) stehen in ganz Europa und weltweit im World Wide Web zur Verfügung. Sie sind zu finden unter:

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

Alle EIBE Unterrichtseinheiten im World Wide Web sind Portable Document Format (PDF) - Dateien. Das bedeutet, daß die hohe Qualität der Abbildungen, der farblichen Darstellung, des Schriftbildes und des Layouts der Materialien unabhängig von der Verwendung des Systems erhalten bleibt (Macintosh - einschließlich Power PC, Windows, DOS oder Unix).

PDF-Dateien sind ebenfalls kleiner als ihre Ursprungsdateien, so daß Sie sie schneller laden können. Damit Sie sich die EIBE Unterrichtseinheiten ansehen können, benötigen Sie jedoch eine geeignete Kopie des Adobe Acrobat- Leseprogramms.

Das Adobe Acrobat- Leseprogramm ist kostenlos in mehreren Sprachen (Holländisch, Englisch, Französisch, Deutsch, Spanisch, Schwedisch und Italienisch) erhältlich. Es kann geladen werden von:

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

Mit Hilfe dieser Software können Sie sich die EIBE Unterrichtseinheiten ansehen oder ausdrucken. Außerdem können Sie damit "surfen" und die Materialien leicht finden.

ZUR BEACHTUNG: *Adobe* und *Acrobat* sind eingetragene Warenzeichen der Adobe Systems Incorporated und sind urheberrechtlich geschützt. *Macintosh* ist als Warenzeichen der Apple Computer Incorporated registriert.

Unit 8DE 10/982

Entwicklung

Der TriChem ELISA Kit, der in dem ersten Versuch dieser Einheit verwendet wird, wurde von der folgenden Firma entwickelt und kann dort auch gekauft werden:

TriChem
Bernhard Olsensvej 23
DK-2830 Virum, DENMARK
Telephone : + 45 45 85 82 83

TriChem besitzt das Copyright für dieses Produkt.

Dieser Kit wurde von der "dänischen Arbeitsgruppe für Immunologie" für den schulischen Gebrauch umgestaltet. Diese Bearbeitung wurde veröffentlicht in: Immunologiske Småforsøg, Nucleus Forlag ApS (1994). ISBN: 87 87661 83 7.

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

Dieser Kit wurde mehrere Jahre lang sowohl im Unterricht der weiterführenden Schulen Dänemarks eingesetzt als auch bei Lehrertreffenden in Newbridge (Irland) und in Fortbildungsveranstaltungen für Biologielehrer in Schweden und Dänemark getestet.

Der STEFFENSElisa-Kit, der im dritten Teil dieser Unterrichtseinheit vorgestellt wird, kann bei der Firma: STEFFENS BIOTECHNISCHE ANALYSEN GmbH
Baumgartenstr. 5
D-79285 Ebringen (FRG)

bestellt werden.

Dieser Kit wurde für den Einsatz in der Schule von Eckhard R. Lucius, Ute Steffens und Christine Labahn-Lucius am Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften (siehe Sekretariats-Anschrift) überarbeitet. Zeichnungen: Erika-Ann Kolaczinski.

EIBE - Mitarbeiter

- **Lisbet Marcussen** (Kordinatorin der Einheit), Nyborg Gymnasium og HF, Nyborg, Dänemark.
- **Birgit Sandermann Justesen**
Bjerringbro Gymnasium, Bjerringbro, Dänemark.
- **Elisabeth Strömberg**
Östrabo Gymnasiet, Uddevalla, Schweden.
- **Eckhard R. Lucius, Ute Steffens, und Christine Labahn-Lucius**
IPN an der Universität Kiel, Deutschland

Wir bedanken uns bei Christel Ahlf-Christiani für die Übersetzungen ins Deutsche.

Entwurf, Illustration und Satz:

Dean Madden and Caroline Shearer, NCBE, The University of Reading, Whiteknights, Reading RG6 6AJ. U.K.

© Copyright

Diese EIBE - Einheit ist urheberrechtlich geschützt. Die Autoren dieser Einheit haben ihr Recht, als Urheber anerkannt zu werden, bei der Section 77 of the Designs, Patents and Copyright Act, UK (1988) geltend gemacht

Einsatz im Unterricht. Für den Einsatz im Unterricht dürfen elektronische Kopien oder Papierkopien dieser EIBE- Einheit bzw. Teile dieser Einheit hergestellt werden, wenn sie kostenlos oder zum Selbstkostenpreis verteilt werden und wenn die Autoren dieser Einheit als Urheber genannt werden.

Andere Verwendungsmöglichkeiten. Die Einheit darf zu nichtkommerziellen Zwecken von Person zu Person weitergegeben werden, allerdings weder mit Hilfe elektronischer Verteilungslisten, Postlisten (listserv), Newsgroups, Nachrichtenbrettern oder nichtautorisierten World Wide Web Seiten, noch irgendwelchen anderen Massenverteilungs-, Zugriffs- oder Reproduktionsmechanismen, die ein Bezugsrecht oder einen autorisierten individuellen Zugang ersetzen, noch auf irgendeine Weise, die wissentlich gegen diese Beschränkungen verstößt.

Kommerzielle Nutzung. Die Nutzung dieser Arbeitsmaterialien zum Zwecke eines kommerziellen Gewinns ist ohne die vorherige Zustimmung der Urheber strengstens untersagt. Sollten Sie dieses Material oder Teile davon kommerziell nutzen oder es in irgendeiner Form veröffentlichen wollen, wenden Sie sich bitte an:
EIBE Sekretariat (Regina Rojek)
c/o Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften an der Universität Kiel
Olshausenstraße 62
D-24098 KIEL 1
Telefon : + 49 431 880 3166
Facsimile : + 49 431 880 3132
eMail : rojek@ipn.uni-kiel.de

Über diese Einheit



Diese Materialien wurden von aktiven Lehrern und Erziehungswissenschaftlern mehrerer europäischer Länder entwickelt und mit Hilfe von finanzieller Unterstützung und Förderung durch die Europäische Kommission (DGXII) unter der Federführung von EIBE, der Europäischen Initiative für Biotechnik im Unterricht, zusammengestellt.

Die EIBE Materialien wurden in Arbeitstreffen für Lehrer und Studenten in ganz Europa ausgiebig getestet.

Die in dieser Einheit formulierten Meinungen und die vorgeschlagenen Experimente sind die der Autoren und nicht die der Europäischen Kommission.

Besonders beachtet werden sollten die allgemeinen Sicherheitsbestimmungen in der Einleitung zu dieser Einheit und die besonderen Sicherheitsbestimmungen im Text.

Sicherheitsbestimmungen

Wir haben in allen EIBE-Unterrichtseinheiten versucht, alle bekannten Risiken zu überprüfen und angemessene Vorsichtsmaßnahmen vorzuschlagen.

Wo es möglich ist, entsprechen die vorgeschlagenen Verfahrensweisen den allgemein üblichen Risikobeurteilungen allgemeiner Art. Falls eine besondere Risikobeurteilung nötig ist, ist dies zusätzlich vermerkt worden.

Benutzer sollten sich jedoch der Tatsache bewußt sein, daß Irrtümer und Fehler

möglich sind und daß unterschiedliche Arbeitgeber und Behörden des Erziehungswesens unterschiedlichen Richtlinien unterliegen. Aus diesem Grunde sollten Anwender vor Beginn der Versuche immer ihre eigene Beurteilung des Risikos vornehmen. Insbesondere MÜSSEN alle Regeln der Arbeitgeber oder Erziehungsbehörden vor Ort befolgt werden, unabhängig davon, was in den EIBE - Unterrichtseinheiten vorgeschlagen wird.

Falls nicht ausdrücklich anders vorgegeben, wird vorausgesetzt, daß:

- die praktische Arbeit in einem angemessen ausgestatteten und gewarteten wissenschaftlichen Labor durchgeführt wird;
- alle Geräte, die durch Hauptwasser-, -gas oder -stromleitungen betrieben werden, ordnungsgemäß gewartet werden;
- bei normalen Labortätigkeiten wie z. B. dem Erhitzen von Substanzen sorgfältig vorgegangen wird;
- gute Labortechnik beim Umgang mit Chemikalien oder lebenden Organismen beachtet wird;
- Augenschutz bei jedem bekannten Risiko für die Augen getragen wird;
- Schülern und / oder Studenten Sicherheitsverfahren z. B. für den Umgang mit Chemikalien und Mikroorganismen vermittelt werden.

Der *Trichem* Elisa Kit für die Verwendung im Klassenraum



Einführung

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ist ein empfindlicher Immuntest, der ein Enzym verwendet, das an einen Antikörper oder ein Antigen gekoppelt wird, um als Marker für die Entdeckung eines spezifischen Proteins, vor allem eines Antigens oder eines Antikörpers zu wirken.

- die Feststellung von Drogenmißbrauch;
- die Diagnose verschiedener Infektionskrankheiten, wie z.B. eine HIV-Infektion oder die Lyme-Krankheit;
- die Lokalisation von Genen verschiedener Mutanten (z. B. solchen, die gentechnisch erzeugt wurden);
- die Genforschung in der Medizin.

Diese Unterrichtseinheit hat es sich zum Ziel gesetzt, sowohl Schülerinnen und Schülern als auch Lehrkräften Möglichkeiten zur eigenen Forschung mit ELISA zu eröffnen. Wenn sie ein besseres Verständnis dieser oft genutzten und wichtigen modernen Testmethode entwickelt haben, sollten sie auch besser qualifiziert sein für eine Diskussion über ihre Anwendung.

Wenn Sie weitere Informationen über diese Arbeit wünschen, wenden Sie sich bitte an The Danish Immunology Group oder TriChem (die Adresse finden Sie am Anfang dieser Einheit).

Die folgende Untersuchung benutzt das ELISA Testverfahren zur Analyse von Blutproben von Schweinen, um festzustellen, ob die Tiere von ganz bestimmten Bakterien befallen sind.

Durch die Produktion eines Toxins verursacht das Bakterium *Pasteurella multocida* verschiedene Deformationen der Knochen im Schnauzenbereich der infizierten Schweine. Dieses führt zu gestörtem Biß, Niesen und verschiedenartigen Störungen der Atmungsorgane. Dieser Attacke folgt oft ein Angriff von *Bordetella bronchiseptica*, welches den Gesundheitszustand noch verschlechtert. Langsames Wachstum und ökonomische Verluste für den Bauern sind die Folge. Daher ist es wichtig, die Infektion so schnell wie möglich zu beseitigen. Das ELISA Testverfahren kann sowohl für den Nachweis des Toxins als auch des Bakteriums *Bordetella bronchiseptica* verwendet werden.

In diesem Experiment werden Antigene des Bakteriums *Bordetella bronchiseptica* (*Bb*) verwendet. Am ersten Tag werden die Antigene des Bakteriums in die Vertiefungen der ELISA Testplatten gebracht (Beschichtung). Am nächsten Tag sind die Platten für die Analyse des Schweinebluts fertig. Wenn ein Schwein mit *Bb* infiziert ist, wird der Bluttest eine positive Reaktion mit den Antigenen in den Taschen zeigen, die durch eine Farbreaktion sichtbar wird.

Hinweise für Lehrkräfte

Ziel

Die Analyse von Blutproben von Schweinen mit Hilfe des ELISA Testverfahrens.

Planung

1. Tag - ungefähr 15 Minuten
2. Tag - ungefähr 2 x 45 Minuten



Sicherheitshinweis

5-Aminosalicylsäure ist nicht toxisch und wird in Grammdosierungen für die Behandlung menschlicher Krankheiten angewandt, aber verwandte Verbindungen sind als mutagen bekannt. Deshalb ist ein vorsichtiges Hantieren mit 5-Aminosalicylsäure unbedingt nötig - benutzen Sie Gummihandschuhe.

Ablauf

1. Tag

Die Vorbereitung des PBS Reagenz:
Lösen Sie den Inhalt der mit "PBS" beschrifteten Flasche in 2,5 l destilliertem Wasser auf. Überprüfen Sie den pH-Wert - er sollte zwischen 7,2 und 7,5 betragen. Fügen Sie, falls nötig, 5 M NaOH oder 5 M HCl hinzu.

Stellen Sie 30 cm³ dieser Lösung für die Herstellung der Beschichtungslösung beiseite.

Fügen Sie zum Rest des PBS den Inhalt der mit "TWEEN 20" beschrifteten Flasche. Waschen Sie die Flasche mit ein wenig PBS aus, damit der gesamte Inhalt herauskommt. Vermischen Sie die Inhalte gründlich und beschriften Sie die erhaltene Lösung mit "Waschpuffer". Decken Sie den Behälter ab.

Fügen Sie dann den Inhalt der mit "Bb ANTI-GEN" beschrifteten Flasche zu den 30 cm³ PBS. Vermischen sie beides gut! Dieses ist die BESCHICHTUNGSLÖSUNG.

Die Mikrotiterplatten bestehen aus Plastik und sind bestrahlt worden, um ihre Bindungsfähigkeit zu erhöhen und Sterilität zu gewährleisten.

Das Antigen ist ein abgetöteter (abgekochter) Extrakt des Bakteriums *Bordetella bronchiseptica* (Bb).

2. Tag

Vorbereitung der Seren

Serum 1: Negatives Serum von einem nicht mit Bb infizierten Schwein.

Seren 3 - 10: Unbekannte Seren von Schweinen. Davon sind vier negativ, die übrigen vier mehr oder weniger positiv.

Serum 12: Positives Kontrollserum.

Alle positiven Seren kommen von gesunden Schweinen, die mit abgetöteten Bb geimpft wurden.

Vorbereitung des Konjugats

Das Konjugat muß wie folgt frisch hergestellt werden:

Fügen Sie 25 cm³ des Waschpuffers zu der mit BSA beschrifteten Flasche und schütteln Sie die Lösung, bis sie klar ist, fügen Sie dann den Inhalt der mit "Konjugat" beschrifteten Flasche hinzu. Spülen Sie die Flasche mit BSA Waschpuffer aus, um den gesamten Inhalt herauszubekommen. Vermischen Sie beides gut.

Das Konjugat ist ein Anti-Schwein-Immunglobulin G des Kaninchens, das an das Enzym Peroxidase gebunden ist. (Dieses Enzym wurde aus Meerrettich gewonnen).

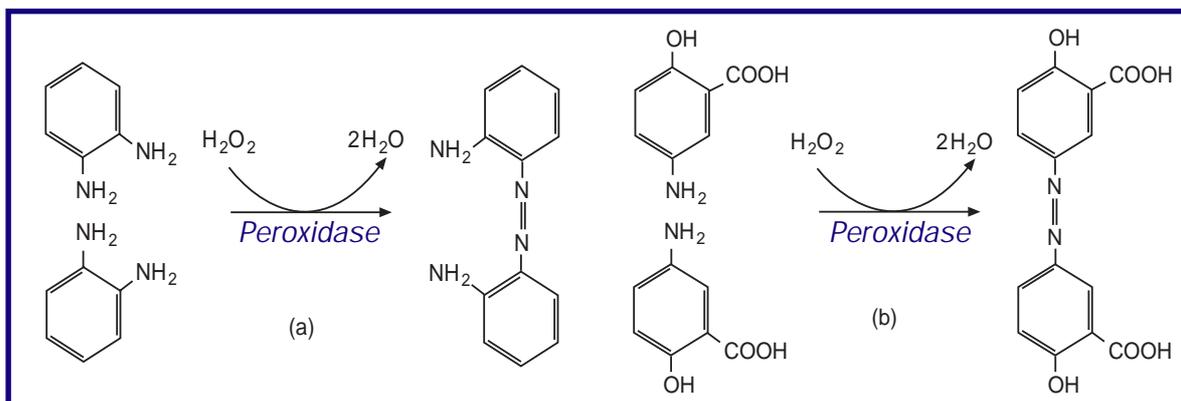
BSA (Bovine Serum Albumin, vom Rind)

BSA wird verwendet, um eine unspezifische Bindung von Antikörpern oder des Konjugats an die Oberfläche der Löcher zu verhindern.

Substratlösung

Wichtig - diese Lösung muß frisch hergestellt werden!

Lösen Sie 5-Aminosalicylsäure aus der mit "Substrat" beschrifteten Flasche mit dem Inhalt der mit "Substratpuffer H₂O₂" beschrifteten Flasche auf. Vermischen Sie beides, bis alles gelöst ist. **Benutzen Sie Handschuhe.**



Oben: a) Oxidation des o-Phenylendiamins

b) Oxidation der 5-Aminosalicylsäure

Lösungshinweis für Lehrkräfte

Beantwortung der Fragen

1. Die Negativseren sind 4, 5, 8 und 9.
Positive Seren sind (in abnehmender Reaktionsstärke): 6, 7, 10 und 3.
Serum Nr. 1 ist eine Negativkontrolle, das einem nicht mit Bb infizierten Schwein entnommen wurde.
Serum Nr. 12 ist ein positives Kontrollserum.
3. Als Antigene werden Masernviren benutzt.
Im Konjugat wird ein Anti-Human-Immunoglobulin G verwendet.
4. Selbst abgetötetes menschliches pathogenes Material kann gefährlich sein.
Menschliches Serum, das völlig frei von pathogenen Erregern wie Hepatitisviren oder HIV ist, ist nur sehr schwer verfügbar.

Bemerkung:

Ein positiver Titer bedeutet nicht notwendigerweise, daß das Tier infiziert ist. Ebenso gut könnte das Tier gerade von einer Infektion genesen sein.

Ausrüstung und Materialien

Bitte beachten Sie, daß nach dem Kauf des Arbeitssatzes einige Reagenzien im Gefrierschrank aufbewahrt werden sollten.

Mikropipette mit einer Skala bis 100 µl
Becherglas 100 cm³
Meßzylinder 20 cm³, 100 cm³
Magnetrührer
3 l Glasflasche
2, 5 l destilliertes Wasser
5 M HCl
5 M NaOH
Gummihandschuhe (extrastark)
Markierstifte (wasserfest)
1 Flasche Antigen (abgekochter Extrakt des Bakteriums *Bordetella bronchiseptica*)*
1 Kasten mit 10 Röhrchen Schweineserum*
1 Flasche mit Substrat: 5-Aminosalicylsäure (30 mg) *
1 Flasche Konjugat: Anti-Schwein-Immunglobulin G des Kaninchens, gebunden an das Enzym Peroxidase*
1 Röhrchen Substratpuffer mit H₂O₂*
Mikrotiterplatten mit Deckel*
1 Flasche mit Salzen zur Herstellung von PBS (Phosphatpuffer)*
1 Flasche (2,5 cm³) Tween 20 (synthetisches Waschmittel)*
Plastikpipetten*
Gummihandschuhe*
1 Flasche mit BSA (Bovine Serum Albumin)*
Plastiklöffel*
Abfallbeutel*

* im Kit enthalten

Anleitung für Schülerinnen und Schüler



Ablauf

1. Tag

Beschichtung der Vertiefungen mit Antigen

1. Geben Sie 100 ml Antigen-Lösung in alle mit A, B und C beschrifteten Vertiefungen (insgesamt 36).
2. Decken Sie die Vertiefungen ab und lassen sie die Platten bis zum nächsten Tag bei Zimmertemperatur stehen. Wenn Sie das Experiment nicht am nächsten Tag fortsetzen können, stellen Sie die Platten in den Kühlschrank.

2. Tag

Entfernen des überschüssigen Antigens

1. Entfernen Sie den Inhalt der Vertiefungen (durch ein schnelles Ausschütten über dem Ausguß).
2. Schwenken Sie die Platte, um die Vertiefungen zu trocknen.

Waschen

3. Füllen Sie die beschichteten Vertiefungen mit Waschpuffer. Warten Sie eine Minute!
4. Entleeren Sie sie dann vollständig (trocken schwenken, wenn nötig).
5. Wiederholen Sie die Schritte 3 und 4 zweimal.

Zufügen der Seren

6. Schütteln Sie die aufgetauten Lösungen der verschiedenen Seren.
7. Geben Sie 100 ml des Serums 1 in die mit A, B und C beschrifteten Vertiefungen in der 1. Reihe (3 Löcher).
WECHSELN SIE DIE PIPETTENSPIITZE!
8. Geben Sie 100 ml des Serums 3 in die mit A, B und C beschrifteten Vertiefungen in der 3. Reihe.
Die zweite Reihe bleibt unberührt.
WECHSELN SIE DIE PIPETTENSPIITZE!
9. Füllen Sie auf die gleiche Weise die

Vertiefungen in Reihe 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 und 12.

Die Reihen 2 und 11 werden nicht benutzt.
DENKEN SIE DARAN, BEI JEDEM NEUEN SERUM DIE PIPETTENSPIITZE ZU WECHSELN!

10. Inkubieren Sie die Platten 15 Minuten lang bei Zimmertemperatur.

Entfernen des überschüssigen Serums

11. Entleeren Sie alle Vertiefungen gleichzeitig. Schwenken Sie sie trocken, wenn nötig.
12. Waschen, entleeren und trocknen Sie die Vertiefungen dreimal wie in Schritt 3 und 4 beschrieben.

Zufügen des Konjugats

13. Geben Sie 100 ml des Konjugats in alle mit A, B und C beschrifteten Vertiefungen.
14. Inkubieren Sie die Platten 15 Minuten lang bei Zimmertemperatur.
15. Waschen, entleeren und trocknen Sie die Vertiefungen wie in Schritt 12 beschrieben.

Zufügen des Substrats

16. Geben Sie 100 ml der Substratlösung in alle Vertiefungen.
17. Warten Sie, bis sich die Farbreaktion entwickelt. Notieren Sie die Ergebnisse in einer Tabelle mit einer der Farbtintensität entsprechenden Skala von 0 bis 5. 0 bedeutet negativ und 5 ist die am meisten positive Reaktion. Sie können auch die Farben beschreiben.

Abfallentsorgung

Packen Sie Pipetten und Platten in eine Plastiktüte und werfen Sie sie weg. Die übriggebliebenen Lösungen können in den Ausguß gegossen werden.

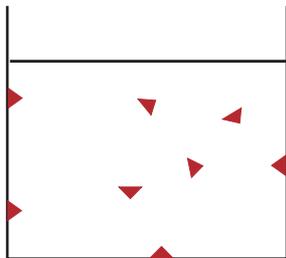
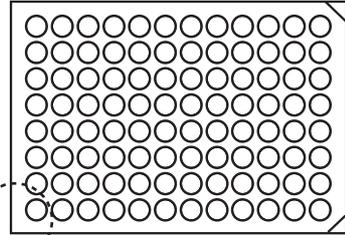
Ergebnisse und Evaluation

1. Welche der unbekanntes Seren waren positiv? Ordnen Sie die Seren in einer Reihenfolge mit zunehmend positivem Ergebnis.
2. Welche möglichen Fehler können in der Analyse aufgetreten sein?
3. Welches der Reagenzien muß ausgewechselt werden, wenn sie einen ähnlichen Test durchführen möchten, um Antikörper des menschlichen Masernvirus festzustellen?
4. Warum benutzen wir in dieser Untersuchung keinen Maserntest?

ELISA Proteintest

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

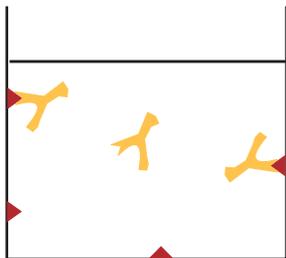
Nach jedem Hinzufügen eines Reagenz wird die Platte inkubiert, dann werden die Vertiefungen ausgewaschen, um Material zu entfernen, das nicht reagiert hat.



1. Protein (Antigen) zugefügt, das an die Vertiefungen gebunden wird.



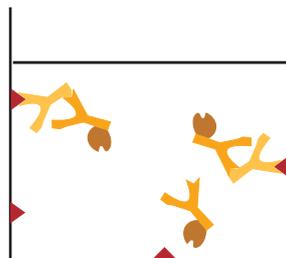
WASCHEN, um ungebundene Moleküle zu entfernen.



2. Probe zugefügt. Antikörper verbinden sich mit den gebundenen Antigenen.



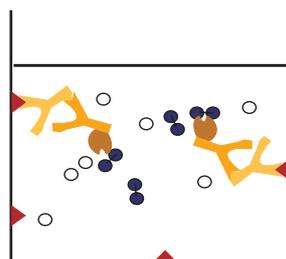
WASCHEN, um ungebundene Moleküle zu entfernen.



3. Antikörper-Konjugat mit Enzym zugefügt. Konjugat bindet sich an die gebundenen Antikörper.



WASCHEN, um ungebundene Moleküle zu entfernen.



4. Farblose Enzyme zugefügt, in Gegenwart des gebundenen Enzyms entwickelt sich eine Farbe.

Wie man Ei - Albumin in verschiedenen Lebensmitteln durch den Doppelimmunodiffusionstest nachweist



Eier werden in vielen verschiedenen Lebensmittelprodukten verwendet, so z. B. in Hamburgern, Nudelgerichten und manchmal in Speiseeis. Viele Menschen sind selbst gegen kleine Mengen von Ei allergisch. Es ist möglich, durch Verwendung von Antikörpern gegen Albumin selbst kleine Spuren von Eiweiß oder Eigelb nachzuweisen. Die verwendete Methode wird Doppelimmunodiffusionstest genannt.

Wenn Antigen und Antikörper nahe ihres Äquivalenzpunktes miteinander reagieren, bilden sie oft vernetzte Ausfällungen. Wenn die Reaktion in einem Nährmedium wie Agargel passiert, bilden die Reaktionspartner Ausfällungsbögen oder -linien, die zur Identifikation der Antigen-Antikörper-Komplexe dienen können.

Die Ausfällungen werden gebildet, weil Antikörper und Antigene mehr als eine Bindungsstelle aufweisen und aus diesem Grunde große vernetzte Strukturen gebildet werden. Je weiter sie von ihrem Äquivalenzpunkt entfernt sind, desto weniger fällt aus.

Die Methode der Doppelimmunodiffusion wurde vor 30 Jahren von dem Schweden Örjan Uchtermann entwickelt. Seine Methode wird "Doppel" genannt, weil bei diesem Vorgang Antigen und Antikörper in einem Gel aufeinander zuwandern können und bei ihrem Aufeinandertreffen ein Bogen oder eine Linie gebildet wird.

Diese Ausfällungsreaktion ist hochspezifisch und empfindlich. Er wird heute in der Diagnostik, beim Nachweis von Proteinen oder dem Vergleich von Antigenen und Antikörpern angewandt.

Hinweise für Lehrkräfte

Ziel

Nachweis von Ei-Albumin in verschiedenen Lebensmitteln

Planung

1. Tag: 60 Minuten plus eine Nacht, bis sich die Linien gebildet haben (s. Einführung für den Lehrer), 20 Minuten für die Analyse des Ergebnisses. (Wenn Sie anfärben möchten, werden weitere 2 Stunden und 45 Minuten benötigt).

Sicherheitshinweis

Es sind keine besonderen Sicherheitsmaßnahmen nötig.

Bemerkungen

Stanzmuster

Möglicherweise wird ein gleichmäßiges Stanzmuster im Gel nötig sein. Deshalb könnte es sinnvoll sein, die erste Tasche nah an den Rand zu stanzen und Platz für einen zweiten Versuch zu lassen.

Benutzen Sie dazu einen Strohhalm oder eine Plastikpipette.

Die Ausfällungslinien bilden sich schneller, wenn der Abstand zwischen den Taschen verringert wird. Bei einem Abstand von 5 mm wird nach 24 Stunden ein Ergebnis sichtbar und bei einem Abstand von 10 mm erst nach 48 Stunden.

Nach dem ersten Tag:

Wenn sie Objektträger benutzen und es im Labor sehr warm oder trocken ist, müssen die Objektträger bis zum nächsten Tag feucht gehalten werden, z. B. in einer

Petrischale mit einem feuchten Papierhandtuch oder Filterpapier und Plastikfolie. Wenn die Objektträger mehrere Tage lang aufbewahrt werden müssen, empfiehlt sich die Aufbewahrung in der feuchten Plastiktüte mit Konservierungsmittel, um Schimmelbildung vorzubeugen. Achten Sie darauf, das Gel nicht zu verletzen.

Die Objektträger sind nach einer Nacht fertig, können aber bis zu einer Woche im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Referenzlösung

Um die Herstellung der Referenzlösung einfacher zu machen, könnte man zuerst etwas von dem Eiweiß aufschlagen und dann mit dem flüssigen Anteil des Eiweißes die Referenzlösung herstellen.

Ei-Albumin - der Antikörper

Gefriergetrocknete Antikörper werden nach Anweisung in TRIS-Puffer aufgelöst. Diese Lösung kann restlos in Eppendorfgefäße gefüllt und im Tiefkühlschrank aufbewahrt werden.

Abfall

Alles kann wie normaler Abfall entsorgt werden.

Färben

Das Anfärben ist nicht nötig, kann aber zu einem deutlicheren Ergebnis beitragen. Amido Schwarz und Coomassie Brillant Blau können für das Anfärben benutzt werden.

Ausrüstung und Materialien

Objektträger oder kleine Petrischalen von 5 cm Durchmesser

1 Strohhalm oder eine Plastikpipette mit einem Durchmesser von 2,5 mm, um Taschen in das Gel zu stanzen

Mikropipetten: 0 - 10 cm³

feuchte Kammer für die Objektträger, z.B. eine Plastikdose mit feuchtem Papierhandtuch oder kleine Plastikpetrischalen von 5 cm Durchmesser

Mixer / Rührstab

Zentrifuge

Haartrockner *

Filterpapier

Gewicht - ca. 1 kg *

Kasten für das Anfärben des Gels *

TRIS-Puffer 0.01M, pH 8.0

AgaroseLösung, 1 % in TRIS-Puffer

Referenzlösung: 0,01 % Eiweiß, gelöst in destilliertem Wasser

Kaninchen-Antiserum gegen Ei-Albumin (Pharmacia AS-23)

Essigsäure

Methanol

Amido - Schwarz -Lösung (0,1 g/100cm³)

Amidoschwarz gelöst in einer Mischung von Essigsäure, Methanol und destilliertem Wasser im Verhältnis 10:70:20) *

Natriumchloridlösung - 0,9 %

Entfärbungslösung mit Essigsäure (10 %), Methanol (70 %) und destilliertem Wasser (20 %) *

* wird nur bei Anfärbung benötigt

Anleitung für Schülerinnen und Schüler



Ablauf

Vorbereitung der Proben

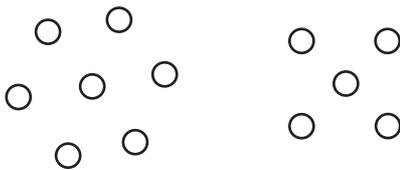
1. Homogenisieren Sie 5 g der Probe so gut wie möglich in 5 cm³ Wasser.
2. Zentrifugieren Sie die vermischte Probe 15 Minuten bei 6000 Umdrehungen/Minute (oder 10 Minuten lang bei 9500 Umdrehungen/Minute).
3. Filtern Sie den Überstand durch ein Tuch in ein sauberes Teströhrchen.

Gießen des Gels

4. Lösen Sie die richtige Menge Agarose in TRIS-Puffer (1 %). Rühren. Für eine Petrischale (5 cm) benötigen Sie 3-5 cm³ und für einen Objektträger 3, 5 cm³. VORSICHT! ES KOCHT LEICHT AUF!
5. Lassen Sie es auf 60 - 80°C abkühlen.
6. Stellen Sie die Petrischalen (oder Objektträger) randnah auf einen waagerechten Tisch. Entfernen Sie die Deckel.
7. Gießen Sie das heiße Gel in die Schalen oder auf das Glas - eine Schicht von ungefähr 2 - 3 mm ist ausreichend. Legen Sie die Deckel wieder auf.
8. Lassen Sie das Gel fest werden - das wird ungefähr 5 - 10 Minuten dauern.

Stanzen der Taschen

9. Benutzen Sie einen Strohhalm oder eine Pipette mit einem Durchmesser von ungefähr 2,5 mm, um Taschen in das Gel zu stanzen. Arbeiten Sie vorsichtig und stanzen Sie senkrechte Wände. Entfernen Sie Gelpfropfen durch Ansaugen mit der Pipette oder mit Hilfe einer Nadel. Stellen Sie eines der folgenden Taschenmuster her.



Hinzufügen des Antikörpers

Anm. Beschriften Sie jede Tasche vor dem Befüllen deutlich auf der Unterseite der

Petrischale oder des Objektträgers.

10. Befüllen Sie die mittlere Tasche mit dem Antikörper (Anti-Eialbumin) - 5 - 10 ml dürften genug sein.
ÜBERFÜLLEN SIE DIE TASCHE NICHT.

Hinzufügen der Antigene

11. Befüllen Sie jede zweite äußere Tasche mit der Referenzlösung.
ÜBERFÜLLEN SIE DIE TASCHE NICHT.
12. Befüllen Sie die übrigen äußeren Taschen mit ihren Testproben. Beschreiben Sie auf, welche Probe sich in den verschiedenen Taschen befindet.
ÜBERFÜLLEN SIE DIE TASCHE NICHT.

Lassen Sie für die Diffusion die Petrischalen / Objektträger über Nacht in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur oder im Kühlschrank stehen.

13. Später können Sie die weißen Ausfällungslinien oder -bögen dort ansehen, wo eine positive Reaktion erfolgt ist. Wenn Sie die Objektträger / Petrischalen vor einen dunklen Hintergrund halten, könnten die Linien besser erkennbar sein.

Färben (fakultativ)

14. Entfernen Sie nicht ausgefällte Proteine, indem Sie das Gel 60 Minuten lang in 0,9 % NaCl-Lösung bei Zimmertemperatur einweichen.
15. Entfernen Sie die Salzlösung und füllen Sie den Kasten mit destilliertem Wasser.

Lassen Sie ihn 60 Minuten bei Zimmertemperatur stehen.

16. Entfernen Sie das Wasser. Pressen Sie das Gel 10 Minuten lang unter einer Lage von 10 Filterpapieren und einem Gewicht von ca. 1 kg.
17. Trocknen Sie das Gel mit einem Haartrockner.
18. Bedecken Sie das Gel mit Färbungslösung und lassen Sie sie 10 Minuten lang einwirken.
19. Entfernen Sie die Färbungslösung. Entfärben Sie 10 Minuten lang mit der Entfärbungslösung. Möglicherweise muß der Entfärbungsvorgang wiederholt werden.

Ergebnisse

Die Nachweisgrenze für Eiweiß beträgt 2,5 mg in 100g. Wenn sich genügend Hühnereiweiße in der Probe befinden, werden Sie Vernetzungsreaktionen bemerken. Eigelb enthält ebenfalls genügend Eiweißproteine, um einen Nachweis zu ermöglichen.

Steffens Elisa Kit für den Schulgebrauch



Einleitung

Der *STEFFENS*-ELISA-Kit erlaubt eine Viruserkrankung bei Pelargonien (die gemeinhin als Geranien bezeichnet werden), eine *PFBV* (*Pelargonium flower break virus*)-Infektion, nachzuweisen. Die Immobilisierung des Antikörpers (der spezifisch mit dem Hüllprotein des *PFBV* reagiert) an einem Spezialkamm ermöglicht es, den Test besonders einfach und zeitökonomisch durchzuführen, nämlich innerhalb einer Schulstunde. Zur experimentellen Vor- und Nachbereitung des Unterrichts sollte eine Doppelstunde zur Verfügung stehen.

Der Kit erlaubt es, eine *PFBV*-Infektion in 2 x 10 Proben sensitiv und sicher nachzuweisen. Um das einwandfreie Funktionieren des Tests sicherzustellen, wurde die 11. und 12. Zinke des Kamms mit einer negativen und einer positiven Kontrolle beschichtet (grüner bzw. roter Punkt).

Die Nachweisgrenze des Tests wurde ermittelt, indem infiziertes Pflanzenmaterial (*Chenopodium quinoa*) in Probenpuffer extrahiert und verdünnt wurde. Das Virus könnte noch in einer 1:1000-Verdünnung eines 10 %igen Extrakts nachgewiesen werden (> 100 mOD über Gesund-Kontrolle).

Die Reagenzien des Testkits sind bei 4°C mindestens bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil.

Literaturhinweise

- 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.

Hinweise für Lehrkräfte

Materialliste

Für den Versuch wird benötigt:

Direkt vom STEFFENS ELISA Kit (Bestellnr. 04093P00):

- In einem luftdichten Plastikbeutel zusammen mit Trocknungsmittel separat verpackt: 1 Spezialkamm mit 12 Zinken, auf denen der *PFBV*-Antikörper immobilisiert ist, 3 Streifen mit je 12 Reaktionsnäpfen (Kavitäts-Streifen).
- 10 Extraktionsbeutel (Plastikbeutel mit Baumwollgaze).
- 1 Gefäß mit 50 ml gebrauchsfertigem Probenpuffer (gelb).
- 12 Einwegpipetten für 10 Proben, 1 für verdünntes Konjugat und 1 für das Substrat.
- 1 graduierte Einwegpipette für den Probenpuffer.
- 1 nicht graduierte Einwegpipette mit feiner Öffnung für das konzentrierte Konjugat.
- 1 Röhrchen mit 0.05 ml konzentriertem Konjugat (farblos).
- 1 Schraubfläschchen mit 1,6 ml Konjugatpuffer (blau).
- 1 Schraubfläschchen mit 1,6 ml gebrauchsfertiger Substratlösung (farblos).
- 1 Pipettierständer (Teil der inneren Verpackung).

Vom Kit, aber vorher vorbereitet:

Alle Reagenzien müssen vor der Untersuchung auf Raumtemperatur gebracht werden. Die 3 Streifen mit den Reaktionsnäpfen

(Kavitäten-Streifen) werden in den Pipettierständer gestellt, der aus der Pappe des inneren Einsatzes gebogen wird. Das konzentrierte Konjugat wird so vollständig wie möglich in den blauen Konjugatpuffer überführt. Dazu wird die nicht gradierte Einwegpipette mit feiner Öffnung verwendet. Der Inhalt wird gründlich gemischt.

Zusätzlich wird benötigt:

Bis zu 10 Geranienpflanzen verschiedener Standorte.

1 Schere

1 Homogenisator (bzw. Schraubenzieher-Griff oder anderen harten Gegenstand).

Kaltes Leitungswasser.

Nicht unbedingt nötig: 1 Mikrotiter-Photometer (650 nm), falls vorhanden; andernfalls erfolgt eine visuelle Auswertung.

Entsorgung: Abfalleimer, Kunststoffsammlbehälter, Ausguß.

Planung

Ein möglicher Unterrichtsgang:

Unterrichtsstunde 1

- Einführung in das Thema
- Antigen-/Antikörperreaktionen
- Viruserkrankungen
- Hausaufgabe: Schüler besorgen Pflanzenmaterial (vollständige Geranie oder vor der Schule frisch geerntete Blätter).

Unterrichtsstunde 2 und 3 (Doppelstunde)

- Homogenisieren von 10 Proben in den Extraktionsbeuteln (Schüler-Gruppenarbeit).
- Vorbereitung der Kavitätenstreifen sowie der Lösungen. Anschließendes Einfüllen der Proben durch Schüler.
- Durchführung der einzelnen Reaktionsschritte durch Schüler oder den Lehrer.
- Auswertung der Ergebnisse

Unterrichtsstunde 4

- Diskussion der Ergebnisse
- Welche Faktoren können Viruserkrankungen begünstigen?
- Ziele der Pflanzenzucht

Hinweise und Tips

Aufteilung des Kits: Da der ELISA Kit für 2 Tests à 12 Analysen vorgesehen ist, enthält er

alle Bestandteile doppelt. Der halbe Satz der Komponenten kann daher in der Schachtel belassen und bis zu seiner weiteren Verwendung gekühlt (4 OC) aufbewahrt werden.

Pipetten: Die Pipettenspitzen sollen nicht unnötig berührt werden.

Homogenisator: Mit einem Homogenisator läßt sich die Probe einfach und schnell extrahieren. Seine Bezugsquelle kann bei der Firma STEFFENS Biotechnische Analysen GmbH erfragt werden. An seiner Stelle läßt sich als provisorischer Ersatz ein stabiler, glatter Gegenstand verwenden, z.B. ein Pistill oder der Griff eines Schraubenziehers.

Spezialkamm: Ein für den Antigen-/Antikörperversuch notwendiger Spezialkamm befindet sich zusammen mit drei Kavitäten-Streifen (Kunststoffstreifen mit je 12 Reaktionsnäpfen) in einem separaten Plastikbeutel, der ein Tütchen mit Trocknungsmittel enthält. Auf den Zinken des Kamms ist ein polyklonaler Antikörper immobilisiert, der den Geranien-Blüten-Bruch-Virus (Pelargonium Flower Break Virus, PFBV) spezifisch erkennt. Die 11. Zinke des Kamms wurde zusätzlich mit einer negativen Kontrolle (grüner Punkt), die 12. Zinke mit einer positiven Kontrolle beschichtet (roter Punkt). Der Kamm sollte nur an seinem grünen Griff angefaßt werden. Es muß vermieden werden, seine Zinken zu berühren.

Vorbereitung der Kavitäten-Streifen: Der Deckel des inneren Einsatzes der Schachtel wird aufgeklappt. Die Hälfte der Extraktionsbeutel und der Pipetten werden entnommen. Der Deckel des inneren Faches wird abgetrennt und aufgefalted, so daß er die 3 Streifen mit Reaktionsnäpfen (Kavitäten-Streifen) aufnehmen kann. Er dient als Pipettier-Ständer. Der Plastikbeutel mit dem Kamm wird aufgeschnitten. Die 3 Kavitäten-Streifen werden entnommen und in den Pipettier-Ständer eingesetzt. Die Reihenfolge und Orientierung sind gleichgültig. Der Kamm wird am besten im Beutel belassen, damit seine Zinken nicht unnötig berührt werden. Das Trocknungsmittel wird nicht mehr benötigt und in den Hausmüll entsorgt.

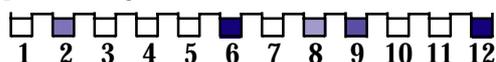
Konjugat: Das konzentrierte Konjugat wird so vollständig wie möglich in den blauen

Konjugatpuffer übergeführt. Dazu wird die nicht graduierte Einwegpipette mit feiner Öffnung verwendet. Hinweis: Tropfen des konzentrierten Konjugates können am Deckel hängen. Die Pipette wird anschließend im Plastikmüll entsorgt. Konjugat und Puffer werden gründlich gemischt.

Entsorgung: Nachdem der Test ausgewertet wurde, werfen Sie den Kamm und die Kavitätenstreifen in den Kunststoffsammlbehälter. Versuchen Sie nicht, die Kavitätenstreifen mehrmals zu verwenden; auch nach gründlichem Waschen könnten sie Resultate erhalten, die scheinbar positiv reagiert haben, in Wirklichkeit aber negativ sind.

Modellresultat

Die folgende schematische Darstellung des dritten Kavitäten-Streifens (Substrat) zeigt ein typisches Ergebnis.



Im Nöpfchen 11 der negativen Kontrolle (entsprechend dem grünen Punkt am Kamm) darf in keinem Fall eine Farbreaktion auftreten.

Im Nöpfchen 12 der positiven Kontrolle (roter Punkt am Kamm) ist immer eine intensive Blaufärbung zu erkennen.

Diese beiden Ergebnisse werden mit den Ergebnissen der Proben verglichen (Nöpfchen 1 bis 10). Die Farbtönungen variieren je nach Befall des eingesetzten Pflanzenmaterials zwischen schwach und stark Blau.

Sicherheit

Chemikalien

Probenpuffer-Zusammensetzung: Tris-/HCl-Puffer, Polyvinylpyrrolidon, NaCl, Tween 20, Natriumazid, Lebensmittelfarbstoff E 102. Na-Azid: R-Satz 28,32, S-Satz 28.1.

Konjugat-Zusammensetzung: Phosphatpuffer, Merrettichperoxidase, Rinderserumalbumin, Tween 20, Bronidox L, Lebensmittelfarbstoff E 131. Keine R- und S-Sätze.

Substrat-Zusammensetzung: TMB (Tetramethylbenzidin), Puffer, H₂O₂. R-Sätze: 23, 25, 36/37/38, S-Sätze: 7, 16, 24, 45.

Die Reagenzien enthalten Na-Azid und Bronidox L zur Stabilisierung. Giftig beim Verschlucken!

Entsorgung: Keine Besonderheiten.

Garantie und Haftung

EIBE übernimmt keine Garantie und Haftung bezüglich der Materialien und Chemikalien des Kits. STEFFENS Biotechnische Analysen GmbH garantiert, daß das ausgelieferte Produkt gründlich getestet wurde, um sicherzustellen, daß es seine Spezifikationen erfüllt und der hier gegebenen Beschreibung entspricht. Weitergehende Garantien werden nicht gegeben. Insbesondere kann STEFFENS Biotechnische Analysen GmbH keinerlei Haftung für Schäden akzeptieren, die aufgrund einer unkorrekten Lagerung und Anwendung des Produkts entstanden sind.

Bestellung des Steffens-ELISA-Kits

Der Kit kostet ca. 200 DM. Er kann direkt von der Firma STEFFENS bezogen werden: STEFFENS Biotechnische Analysen GmbH, Baumgartenstr. 5, 79285 Ebringen, Tel.: 07664-600-254, Fax: -255

Arbeitsblatt

| Proben Nr. | Identität (Herkunft, Name etc.) | Bemerkungen (Versuchsablauf etc.) | Ergebnis |
|-------------------|---|---|-----------------|
| 1 | | | |
| 2 | | | |
| 3 | | | |
| 4 | | | |
| 5 | | | |
| 6 | | | |
| 7 | | | |
| 8 | | | |
| 9 | | | |
| 10 | | | |
| 11 | negative Kontrolle | | farblos |
| 12 | positive Kontrolle | | blau |

Anleitung für Schülerinnen und Schüler



Einführung

Die Immunbiologie ist heute einer der bedeutendsten Forschungsbereiche der angewandten Biologie. Bereits Anfang dieses Jahrhunderts entdeckte Paul Ehrlich (Nobelpreis 1908) die Rolle von Antikörpern bei der Immunabwehr von Infektionskrankheiten.

Der Immunabwehr liegt die Entstehung eines spezifischen Antigen-Antikörper-Komplexes zugrunde, den zu bilden jedoch nur Wirbeltiere befähigt sind. Unter "Antigene" werden Stoffe verstanden, die sich gegen einen Organismus richten. Dies können praktisch alle körper-fremden organischen Verbindungen sein wie Polysaccharide, Proteine, Peptide oder Nukleinsäuren. Bestimmte körpereigene, globuläre Proteine, sogenannte Immunglobuline, wirken als "Antikörper". Diese "erkennen" bestimmte Oberflächenstrukturen der Antigene auf molekularer Ebene und verbinden sich mit ihnen zu einem Komplex, der unlöslich wird und ausfällt.

In immunologischen Diagnoseverfahren wird diese Eigenschaft von Antikörpern eingesetzt. So können Spuren von Antigenen im Nanogramm-bereich (10^{-8} g/ml Probe) nachgewiesen werden. Antikörper wurden früher aus Tieren gewonnen, denen bestimmte Antigene injiziert worden waren. Die Ausbeute war jedoch sehr gering. Heute bedient man sich des biotechnischen "Hybridom"-Verfahrens, mit dessen Hilfe sich Klone von gleichen, "monoklonalen" Antikörpern erzeugen lassen. Dazu verwendet man sogenannte Hybridzellen. Diese wurden durch Verschmelzung von tierischen, antikörperbildenden Lymphozyten und Tumorzellen erzeugt, und sind in der Lage, in Nährkulturen ständig weiter zu wachsen und dabei "monoklonale" Antikörper zu produzieren.

Für einen Diagnostest müssen die Antikörper markiert werden, um den Antigen-Antikörperkomplex sichtbar zu machen. Dies geschieht heute meist durch chemische Kopplung des Antikörpers an ein Enzym. Das Enzym reagiert in der Folge mit einem Substrat, das zu einem Farbstoff umgesetzt wird. Die Farbreaktion deutet auf eine positive Probe hin, die damit Träger des gesuchten Antigens ist. Der Name des ELISA-Tests beruht auf dem beschriebenen Prinzip: Enzyme linked immunosorbent assay.

Mit dieser Methode lassen sich eine Vielzahl von Antigenen untersuchen, z.B. solche, die viraler Herkunft sind. Viruserkrankungen können nicht nur Tiere und Menschen betreffen, sondern auch Pflanzen. Die vegetative Vermehrung, die häufig bei bestimmten Kulturpflanzen in der Landwirtschaft oder in Gärtnereien eingesetzt wird, begünstigt die Ausbreitung infektiösen Materials. Selbst durch Samen können in einigen Fällen Viren übertragen werden. Die ELISA-Technik gewinnt daher für alle vermehrungs-fähigen Kulturpflanzen zunehmend an Bedeutung.

Der Test erlaubt es, eine Viruserkrankung von Pelargonien, die gemeinhin als Geranien bezeichnet werden, zu analysieren. Die Erkrankung führt dazu, daß sich die Blütenfarbe unerwünscht ändert. Der Krankheitserreger heißt *Pelargonium Flower Break Virus (PFBV)*. Hierzulande sind etwa 25 % aller Geranien infiziert. Man findet also praktisch in jedem viertem Haushalt, der Geranien kultiviert, geeignetes, d.h. positives Untersuchungsmaterial. Das Prinzip des Tests beruht auf der sogenannten "Sandwich"-Technik: Ein bereits vorgegebener Antikörper bindet das in infizierten Proben vorhandene Antigen, das wiederum einen Antikörper bindet: Antikörper-Antigen-Antikörper. Der zweite Antikörper ist mit einem Enzym markiert, das das Substrat - den Farbstoff - umsetzt. Im Test ist der Ausgangs-Antikörper auf den Zinken eines Spezial-Kamms immobilisiert, der spezifisch PFBV erkennt.

1. Reaktion

PFBV-Antigene aus der Probe werden an den immobilisierten Antikörper auf dem Kamm gebunden; es entsteht der Antigen-Antikörper-Komplex auf den Zinken des Kamms.

2. Reaktion

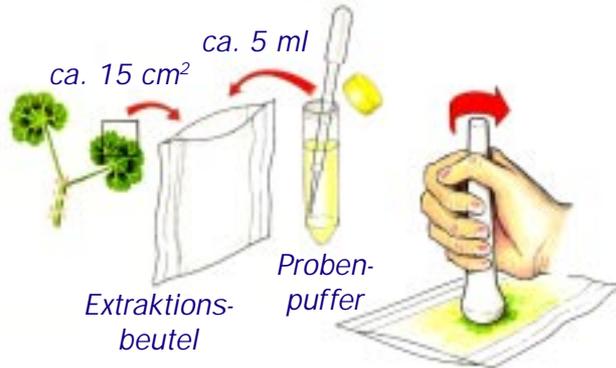
Ein zweiter PFBV-Antikörper, markiert mit Meerrettich-Peroxidase (Enzym-Konjugat), bindet an den Antigen-Antikörper-Komplex, wieder auf den Kamm-Zinken.

3. Reaktion

Der Enzym-markierte Antigen-Antikörper-Komplex setzt das Substrat Trimethylbenzidin zu einem blau gefärbten Produkt um. PFBV-infizierte Proben zeigen diese Blaufärbung, nicht-infizierte Proben bleiben farblos.

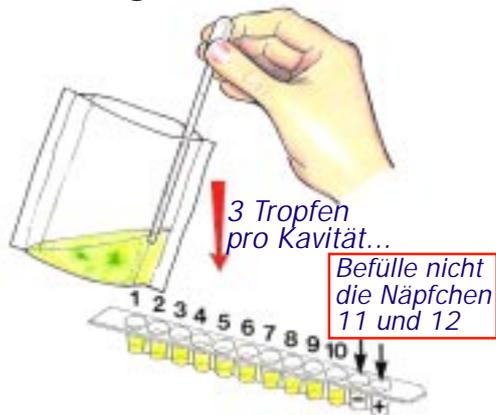
Durchführung

1. Probenvorbereitung (10 min).



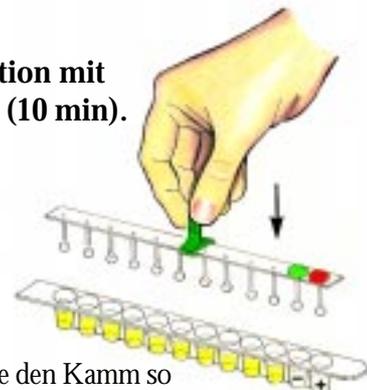
- 1.1 Legen Sie ein ca 15 cm² großes Blattstück (etwa 0,5 g) in die Mitte des Extraktionsbeutels zwischen die Baumwollgaze.
- 1.2 Geben Sie ca. 5 ml Probenpuffer (gelb) mit der graduierten Pipette hinzu. Vermeiden Sie dabei jede Verunreinigung (Rückkontamination) des Probenpuffers durch Pflanzenextrakt.
- 1.3 Legen Sie den Extraktionsbeutel auf eine ebene, feste Oberfläche. Zerkleinern Sie das Blattgewebe, indem Sie den Homogenisator mit etwas Druck in kreisförmigen Bewegungen über den Beutel führen bis eine fein-homogene Suspension entstanden ist. Die Grünfärbung zeigt die Freisetzung des Chlorophylls an. Sie können daran erkennen, wie weit die Extraktion fortgeschritten ist.

2. Verteilung der Proben (5 min).



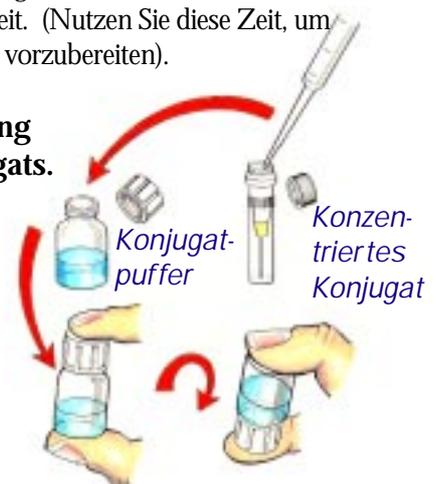
- 2.1 Notieren Sie die Identität der Proben (Probe Nr. 1 - 10 von links nach rechts). Pipettieren Sie jede einzelne Probe mit je einer separaten Pipette in jeweils ein Reaktionsnäpfcchen der ersten Kavitätenreihe von links nach rechts. Es werden je 3 Tropfen pro Näpfcchen eingefüllt.
- 2.2 Sparen Sie die Kavitäten Nr. 11 und 12 ganz rechts aus; sie bleiben während der ersten Reaktion leer. Werfen Sie die gebrauchten Pipetten in den Plastiksammelbehälter.

3. Inkubation mit Proben (10 min).



- 3.1 Setzen Sie den Kamm so in die erste Kavitätenreihe, daß die Kontrollen (auf dem Kamm immobilisiert, grüner bzw. roter Punkt) in die leeren Kavitäten 11 und 12 gelangen. Damit ist die erste Reaktion gestartet; sie braucht 10 min Inkubationszeit. (Nutzen Sie diese Zeit, um das Konjugat vorzubereiten).

4. Vorbereitung des Konjugats.



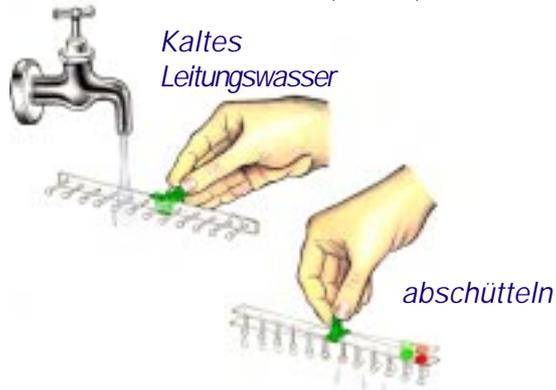
- 4.1 Überführen Sie das konzentrierte Konjugat so vollständig wie möglich in den blauen Konjugatpuffer. Verwenden Sie dazu die Pipette mit feiner Öffnung und werfen Sie sie anschließend in den Kunststoffsammlbehälter. Vorsicht: Tropfen können am Deckel hängen. Sie dürfen nicht verloren gehen. Gründlich mischen!

5. Verteilung des Konjugats.



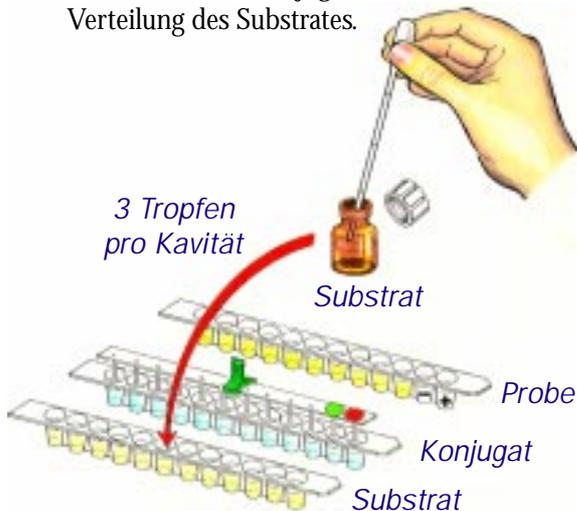
- 5.1 Pipettieren Sie das verdünnte Konjugat mit einer neuen Pipette in die zweite Kavitätenreihe, und zwar 3 Tropfen pro Kavität. Füllen Sie auch die Kavitäten Nr. 11 und Nr. 12. Arbeiten sie möglichst sauber, d.h., vermeiden Sie jede Verunreinigung der dritten Kavitätenreihe. Werfen Sie anschließend die Pipette in den Kunststoffsammlbehälter.

6. Waschen des Kammes (30 sec).



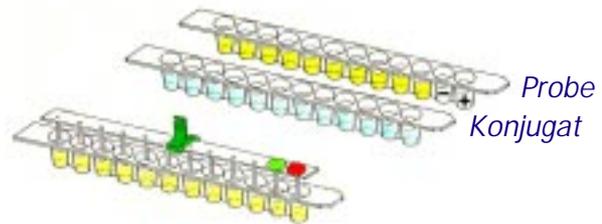
- 6.1 Nach Inkubation der Proben entnehmen Sie den Kamm aus der ersten Reihe.
- 6.2 Spülen Sie die Zinken unter kaltem, nicht zu kräftig fließendem Leitungswasser, etwa 15 bis 30 sec. Vorsicht: den Kamm nicht senkrecht unter den Wasserstrahl halten, um eine Probenkontamination zwischen einzelnen Zinken zu vermeiden. Gründliches Waschen ist wichtig, um eine geringe Hintergrundfärbung zu erzielen.
- 6.3 Entfernen Sie anschließend anhaftendes Wasser mit ein paar schnellen Schleuderbewegungen des Kammes.

7. Inkubation mit Konjugat (10 min) und Verteilung des Substrates.



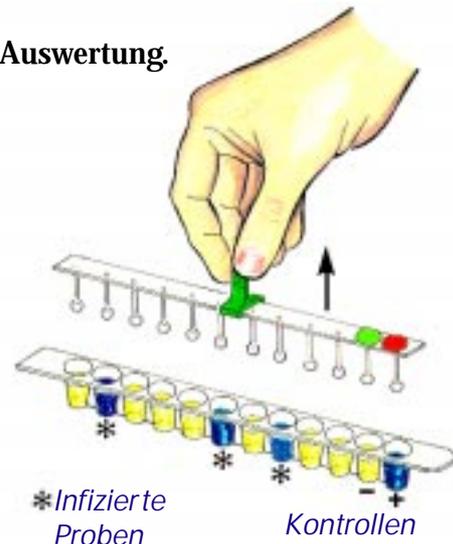
- 7.1 Setzen Sie den Kamm in die zweite Reihe, wieder mit den Kontrollen (Punkte) auf der rechten Seite.
- 7.2 Inkubieren Sie 10 min.
- 7.3 Pipettieren Sie die Substratlösung mit einer neuen Pipette in die dritte Kavitäten-Reihe, und zwar einschließlich der Kavitäten 11 und 12 (ganz rechts); 3 Tropfen pro Kavität. **Hinweis: Das Substrat ist lichtempfindlich; direkte Sonneneinstrahlung ist unbedingt zu vermeiden.** Werfen Sie anschließend die Pipette in den Kunststoffsammlbehälter.

8. Inkubation mit Substrat (11 min).



- 8.1 Entnehmen Sie den Kamm der Konjugat-Reihe und waschen ihn gründlich mit kaltem Leitungswasser, wie zuvor (Punkt 6) beschrieben.
- 8.2 Überführen Sie den Kamm in die dritte Reihe, die das Substrat enthält, und zwar wieder mit den Punkten auf der rechten Seite. Inkubieren Sie 10 min. Da das Substrat lichtempfindlich ist, sollten Sie bei diesem Reaktionsschritt starke Beleuchtung (z.B. direktes Sonnenlicht) vermeiden.

9. Auswertung.



- 9.1 Nach Entnahme des Kammes kann der Test ausgewertet werden; am besten unmittelbar nach dem letzten Inkubationsschritt. Man analysiert das Resultat entweder rein visuell oder mit Hilfe eines Microtiter-Photometers bei 650 nm.
- 9.2 Die Kontrollen dienen der Überprüfung des Tests. Er hat einwandfrei funktioniert, wenn die positive Kontrolle eine intensive Blaufärbung zeigt, während die negative Kontrolle farblos bleibt. Jede Probe, deren Farbreaktion wesentlich stärker ist als die der negativen Kontrolle, ist sicher infiziert. Jede Probe, die nicht intensiver als die Negativ-Kontrolle angefärbt ist, ist sehr wahrscheinlich nicht infiziert. Grundsätzlich kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die Virus-Konzentration der Probe unterhalb der Nachweisgrenze des Tests liegt.