



Praktisk Immunologi

DELAVSNIITT

8

European Initiative for Biotechnology Education

Medverkande till detta delavsnitt

Lisbet Marcussen (Samordnare)

**Birgit Sanderman, Elisabeth Strömberg, Eckhard R. Lucius, Ute Steffens,
Christine Labahn-Lucius.**



The European Initiative for Biotechnology Education (EIBE) syftar till att ge en bättre förståelse för bioteknologi och underlätta en saklig debatt genom en förbättrad utbildning i ämnet i skolor och högskolor inom hela den Europeiska Unionen (EU).

EIBE-kontakter



BELGIË/BELGIQUE

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



BULGARIA

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



ČZECHÁ REPUBLIKA

Dr. Hana NOVÁKOVÁ, Pedagogprogram co-op Pedagogiká Fakulta UK, Konevova 241, 13000 Praha 3. Fax +420/2/684 5017



DANMARK

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



DEUTSCHLAND

Prof. Dr. Horst BAYRHUBER/ Dr. Jens FRIEDRICH/ Dr. Eckhard R. LUCIUS/ Mrs Renate GLAWE, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften (IPN) an der Universität Kiel, Olshausenstr. 62, 24098 Kiel, email csec@ipn.uni-kiel.de, friedrich@ipn.uni-kiel.de, lucius@ipn.uni-kiel.de, glawe@ipn.uni-kiel.de
Dr. Ognian SERAFIMOV, INCS-Centre of UNESCO, c/o Jörg-Zürn-Gewerbeschule, Rauensteinstr. 17, 88662 Überlingen, email joergzuern.os@t-online.de, ognian.serafimov@t-online.de

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

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



EESTI

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



EIRE

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

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



ELLADA

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



ESPAÑA

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



FRANCE

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

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



ITALIA

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



LUXEMBOURG

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



NEDERLAND

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

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

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

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

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



RZECZPOSPOLITA POLSKA

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



SCHWEIZ

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



SVERIGE

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

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



THE UNITED KINGDOM

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

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

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

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

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

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

EIBE-koordinator

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

EIBE sekretariat

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



Praktisk Immunologi

DELAVSNIITT

8

European Initiative for Biotechnology Education

Innehåll

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

Utvecklingsarbetet, Copyright	04
Speciellt om detta Delavsnitt	05
Säkerhetsföreskrifter	05
TriChems ELISA-kit	
Information till läraren	06
Instruktion till eleverna	09
Dubbel immunodiffusion	
Information till läraren	11
Instruktion till eleverna	13
Steffens ELISA-kit	
Information till läraren	14
Instruktion till eleverna	17

World Wide Web

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

Få områden utvecklas så snabbt som biotekniken. EIBE publicerar material elektroniskt för att lätt kunna omarbета det och hålla det aktuellt samt kunna sprida det till en minimikostnad.

Dessa EIBE sidor (liksom övrigt EIBE material) finns tillgängliga på World Wide Web. Man finner materialet under adress:

<http://www.eibe.org>

Allt EIBE material som finns på World Wide Web är i Portable Document Format (PDF) filer. Detta innebär, att den höga kvaliteten på illustrationer, färger, typer och layout som materialet har, kommer att finnas oavsett vilken ordbehandlare du har (Macintosh - inklusive Power PC, Windows, DOS eller Unix platforms).

PDF filer är också mindre än de filer från vilka de skapas, vilket innebär att det tar kortare tid att kopiera dokumenten. För att ta fram EIBE-material måste du emellertid ha en lämplig kopia av *Adobe Acrobat Reader* program.

Det senaste *Acrobat Reader* programmet får man gratis på flera språk (holländska, engelska, franska, tyska, italienska, spanska och svenska). Man kopierar det från:

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

Med denna mjukvara kan du mycket lätt "navigera" och söka i dokumenten.

OBSERVERA: *Adobe* och *Acrobat* är varumärken i Adobe Systems Incorporated, som kan vara registrerade i vissa legala sammanhang. *Macintosh* är ett av Apple Computer Incorporated registrerat varumärke.

Utvecklingsarbetet

TriChems *ELISA* kit har utvecklats och kan köpas av:

TriChem
Berhard Olsenvej 23
DK-2830 Virum, DANMARK
tel: +45 (0) 45 85 82 83

Copyright till detta kit innehas av *TriChem*. Kittet har modifierats för skolbruk. Detta har gjorts av "Danska immunologigruppen" och har också publicerats i *Immunologiske Småforsøg*

Nucleus Forlag ApS (1994)
ISBN: 87 87661 83 7.
Lisbet Marcusen
Educational Biotechnology Group
Nyborg Gymnasium
Skolebakken 13
DK-5800 Nyborg
e-post: lisbetma@post2.tele.dk

STEFFENS ELISA kit har utvecklats och kan köpas av:

STEFFENS BIOTECHNISCHE
ANALYSEN GmbH
Baumgartenstr. 5
D-79285 Ebringen (FRG)
tel: +49 (0) 76 64 600 254
fax: +49 (0) 76 64 600 255

Kittet har modifierats för skolbruk Eckhard R. Lucius, Ute Steffens och Christine Lahban-Lucius vid Institutet för Naturvetenskaplig Pedagogik (Se EIBE sekretariat för adress)

EIBE-gruppen som bearbetat detta material

- **Lisbet Marcusen** (Samordnare)
Nyborg Gymnasium och HF, Nyborg
Danmark
- **Birgit Sandermann Justesen**
Bjerringbro Gymnasium, Bjerringbro
Danmark
- **Elisabeth Strömberg**
Östrabogymnasiet, Uddevalla
Sverige

- **Eckhard R. Lucius, Ute Steffens och Christine Lahban-Lucius**
IPN, Universitetet i Kiel
Tyskland

Design, illustrationer och stiltyper:
Caroline Shearer, NCBE, The University of Reading, Whiteknights, Reading RG6 6AJ, UK.

© Copyright

Copyright till största delen av texten i detta material tillhör Experimentarium, Köpenhamn, Danmark (1994). Övrig text har skrivits av EIBE-gruppen. De som medverkat i detta delavsnitt gör anspråk på att bli erkända som bidragsgivare.

För undervisning. Från detta EIBE avsnitt får antingen hela materialet eller delar av det kopieras elektroniskt eller som papperskopior för klassrumsbruk, om materialet distribueras gratis eller till reproduktionskostnad. De som medverkat till materialet skall vederbörligen erkännas och identifieras som copyrightsinnhavare.

Andra användningsområden. Detta avsnitt får distribueras från en person till en annan för icke kommersiellt bruk, dock ej massdistribueras med hjälp av elektroniska eller andra utsändningslistor, eller via kanaler som ersätter prenumeration eller auktoriserat individuellt tillträde, eller på andra sätt som inte utgör försök att i god tro följa denna begränsning.

Kommersiell användning. Vill du använda detta material helt eller delvis för kommersiellt bruk eller nypublicering i någon form kontakta:

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

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

Speciellt om detta Delavsnitt



Detta material har utvecklats av praktiserande lärare från flera europeiska länder och sammanställts med hjälp av medel från DG XII inom den europeiska kommissionen genom EIBE (the European Initiative for Biotechnology Education).

Materialet har bearbetats noggrant i ett flertal arbetsgrupper med lärare och elever från de europeiska länderna.

Arbetsuppgifter och frågor i materialet är författarnas idéer och inte europeiska kommissionens.

Man bör lägga märke till de säkerhetsföreskrifter som finns i introduktionen till detta delavsnitt liksom till de som förekommer senare i texten.

Detta material är uppdelat i tre avsnitt; två ELISA-laborationer och en laboration om dubbel immunodiffusion.

Säkerhetsföreskrifter

Vi har försökt att i alla delavsnitt, som EIBE producerat, identifiera farliga moment. Vi har också försökt föreslå säkerhetsföreskrifter för dessa.

Där det är möjligt har vi tillämpat förfaringssätt som är vanligt accepterade. Om det förekommer speciella risker har dessa påpekats.

De som använder EIBE-material bör vara medvetna om, att olika arbetsgivare och skolor kan tillämpa olika regler. Innan man vidtar några aktiviteter skall man alltid kontrollera vilka regler som gäller oberoende av vad som föreslås av EIBE.

Om inte annat är föreslaget i en uppgift förutsätts att:

- praktiskt arbete utförs i ett väl utrustat naturvetenskapligt laboratorium;
- all utrustning omhändertas på ett riktigt sätt;
- man är försiktig vid uppvärmning av material;
- vid användning av kemikalier och levande material vanlig försiktighet vidtages;
- skydd för ögonen skall användas när sådant anses behövas;
- eleverna lär sig att handha kemikalier och mikroorganismer på ett riktigt sätt.

ELISA kits för klassrumsarbete



Introduktion

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) är en känslig immunologisk analysmetod. Man använder ett enzym, som är kopplat till en antikropp eller en antigen. Detta enzym fungerar som en markör för att kunna påvisa ett specifikt protein, framförallt en antikropp eller ett antigen.

ELISA är en enkel metod att t ex snabbt kunna

- upptäcka förekomst av läkemedel,
- testa förekomst av olika infektions sjukdomar som HIV, körtelfeber etc,
- hitta muterade gener,
- nå en del forskningsresultat inom bl a cell- och molekylärbiologi.

Detta delavsnitt skall ge eleven bättre förståelse för ELISAs användbarhet.

För ytterligare information om nedanstående försök kan danska immunologigruppen, TriChem eller Steffens Biotechnische Analyse kontaktas (se adresser i början av detta avsnitt).

Trichems ELISA-kit

I detta kit används ELISA-metoden för att analysera blodserum från gris och se om grisarna varit i kontakt med en speciell typ av bakterie.

Bakterien, *Pasteurella multocida*, producerar ett toxin, som förstör slemhinnan i näshålan på grisar, så att broskvävnaden blottas. Detta medför att näsmusslorna tillbakabildas och trynena på infekterade grisar deformeras. Luften som inandas hinner aldrig värmas upp och grisen drabbas lätt av lunginflammation. *Bordetella bronchiseptica*, en annan typ av bakterie, banar ofta väg för angrepp av *P. multocida*. Infekterade grisar har en minskad tillväxt, vilket därför leder till ekonomiska förluster för bonden. Det är

därför av vikt att kunna stoppa infektionen i ett så tidigt skede som möjligt. ELISA-metoden kan användas för att upptäcka både *P. multocidas* toxin och bakterien *Bordetella bronchiseptica*.

I detta kit används antigen från bakterien *Bordetella bronchiseptica* (*Bb*). Första dagen pipetteras antigenet ner i mikrotiterplattornas brunnar (coating). Nästa dag är plattorna färdiga att testa blodprov från grisar. Om en gris är infekterad med *Bb* kommer provet att visa en positiv reaktion. Antigenet i brunnarna binds till antikroppar från *Bb*, som finns i serum hos den infekterade grisen. Detta ger ett färgomslag.

Information till läraren

Syfte

Laborationen går ut på att analysera serumprov från grisar med hjälp av ELISA-metoden.

Säkerhet

5-aminosalicylsyra är inte giftigt och används i gramdoser vid behandling av vissa sjukdomar hos människor. Närbesläktade föreningar kan dock vara mutagena. Man skall därför hantera 5-aminosalicylsyra med försiktighet. Använd skyddshandskar.

Tidsåtgång

Dag 1 - ca 15 minuter.

Dag 2 - ca 2 x 45 minuter.

Tillvägagångssätt

Dag 1

Preparation av reagenslösningar

Lös upp innehållet i röret märkt "PBS" i 2,5 dm³ avjoniserat vatten.

Kontrollera att pH ligger mellan 7,1 och 7,5. Vid behov kan 5M NaOH eller 5M HCl tillsättas.

Tag 30 cm³ av ovanstående lösning för att tillverka en "COATING SOLUTION" (se nedan).

Till resten av PBS lösningen sätts innehållet från röret märkt "Tween 20".

Tvätta röret med lite PBS lösning, så att hela innehållet kommer med. Blanda ordentligt och märk denna lösning "TVÄTT-BUFFERT".

Tag röret märkt "Bp ANTIGEN" och sätt innehållet till de 30 cm³ PBS lösning, som märkts "COATING SOLUTION".

Blanda ordentligt!

Bp ANTIGEN är avdödat extrakt från bakterien Bordetella bronchiseptica (Bb).

Mikrotiterplattorna är gjorda av en plast, som ökar bindningskapaciteten. De är bestrålade så att de skall vara sterila.

Dag 2

Preparation av reagenslösningar sera finns färdigt i kittet

Serum 1:

Negativ kontroll, dvs serum från gris som inte är infekterad med *Bb*.

Sera 3-10: Sera från grisar med okänd status. Fyra av dem kommer att vara negativa medan övriga prover kommer att ge mer eller mindre positivt utslag.

Serum 12: Positiv kontroll, dvs serum från gris som är vaccinerad med vaccin innehållande avdödat *Bb*.

Preparation av konjugatlösningen.

Konjugatlösningen skall vara nygjord:

Tillsätt 25 cm³ TVÄTTBUFFERT till röret märkt BSA och blanda tills den har lösts ordentligt. Tillsätt därefter innehållet från det rör som är märkt "konjugat". Tvätta röret med BSA lösningen, så att allt innehåll kommer med. Blanda väl.

Konjugatet är ett kanin anti- gris IgG, som är kopplat till enzymet peroxididas. (Enzymet peroxididas är utvunnet från pepparrot).

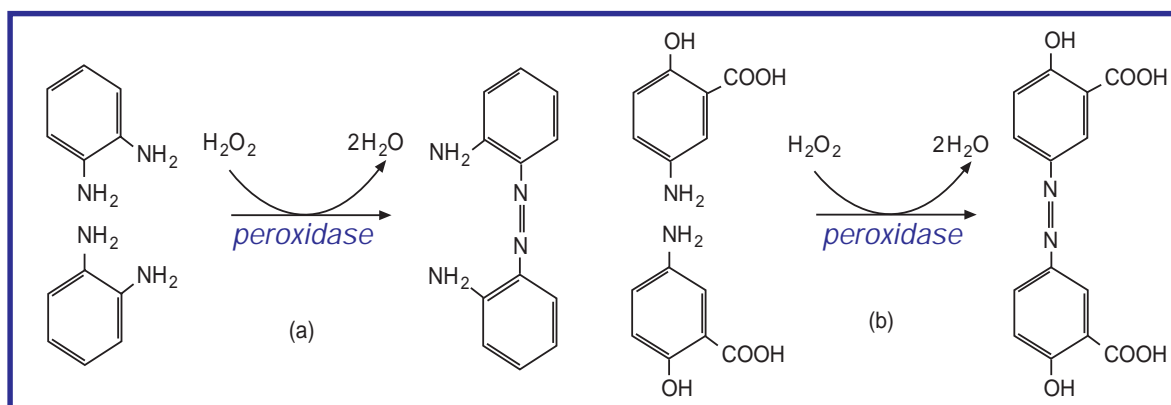
BSA (Bovint Serum Albumin, från nötkreatur)

BSA används för att täcka upp de tomma ytorna i brunnarna som inte redan är belagda med antikroppar eller konjugat; detta för att undvika en ospecifik adsorption av antikroppar eller konjugat till ytan i brunnarna. BSA används i så hög koncentration att BSA säkert adsorberas till alla tomma ytor i brunnarna.

Substratlösning

Det är viktigt att denna lösning är nygjord! Använd handskar.

Lös 5-aminosalicylsyra från provröret märkt "substrat" i innehållet som finns i provrör märkt "substrat buffert H₂O₂". Blanda tills allt har lösts.



Ovan a) oxidation av o-fenylendiamin

b) oxidation av 5-aminosalicylsyra

Svar till frågorna.

1. Negativa sera är 4, 5, 8 och 9.
Positiva sera är (från det mest positiva till det minst positiva) 6, 7, 10 och 3.
Serum 1 är negativ kontroll (taget från gris som inte är infekterad med *Bb.*)
Serum 12 är positiv kontroll.
3. Virus som orsakar mässling används som antigen.
I konjugatet används en antikropp mot mänskligt IgG.
4. Kan vara farligt för människor. Det är svårt att tillhandahålla serum från människor, som är garanterat fritt från patogener t ex hepatitvirus eller HIV.

OBS! En positiv titer behöver inte betyda att djuret är sjukt. Den kan ha återhämtat sig efter att ha varit infekterad.

Utrustning och material

Observera att en del av reagensen skall förvaras i frys.

Mikropipetter 100 µl
Bägare 100 cm³
Mätcylindrar 20 cm³ och 100 cm³
Magnetomrörare
Flaska 3 dm³
2,5 dm³ avjoniserat vatten
5M HCl
5M NaOH
Skyddshandskar (extra)
Märkpenor
1 provrör med antigen (avdödat extrakt från bakterien *Bordetella bronchiseptica*)*
1 låda innehållande 10 prover med grissera.*
1 rör med substratet 5- aminosalicylsyra (30 mg)*
1 rör med konjugat - kanin antigris IgG konjugerat med enzymet peroxidasa.*
1 prov med substrat buffert med H₂O₂
*
Mikrotiterplattor med lock*
1 rör med PBS salt (fosfat buffert)*
1 rör (2,5 cm³) med Tween 20 (syntetisk detergent)*
Plastpipetter*
Skyddshandskar*
1 rör med BSA (Bovint Serum Albumin)*
Plastskedar*
Avfallspåsar*

* Finns i satsen från *Trichem*

Instruktion till eleverna



Tillvägagångssätt

Dag 1:

Brunnarna i mikrotiterplattan skall täckas med antigen.

1. Tillsätt 100 µl antigen-lösning till brunnarna märkta A, B och C (totalt 36 brunnar).
2. Täck mikrotiterplattan med locket och låt den stå i rumstemperatur till nästa dag. Ställ mikrotiterplattan i kylskåp om du inte kan fortsätta nästa dag.

Dag 2

Avlägsna det antigen som finns i överskott:

1. Häll ut innehållet ur brunnarna. Det räcker med att skaka mikrotiterplattan över en vask.
2. Skaka mikrotiterplattan i luften så brunnarna torkar.

Tvätta:

3. Fyll brunnarna med tvättbuffert. Vänta 1 minut!
4. Töm ur ordentligt genom att skaka plattan över en vask (skaka därefter så att plattan torkar)
5. Upprepa steg 3 och 4 två gånger.

Tillsätt sera:

6. Skaka de upptinade seralösningarna.
7. Tillsätt 100 µl av serum 1 till brunnarna märkta A, B och C i rad 1 (3 brunnar).

Byt spetsen på pipetten !

8. Tillsätt 100 µl av serum 3 till brunnarna märkta A, B och C i rad 3. Rad 2 lämnas.

Byt pipettspets!

9. Fortsätt på liknande sätt att fylla brunnarna i raderna 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 och 12. Raderna 2 och 11 skall inte användas.

Glöm inte att byta pipettspets varje gång du byter serum!

10. Inkubera plattorna under 15 minuter i rumstemperatur.

Avlägsna allt överskott av sera i brunnarna.

11. Töm alla brunnarna samtidigt. Skaka så brunnarna torkar.
12. Tvätta, töm och torka enligt punkterna 3 och 4 tre gånger.

Tillsätt konjugat:

13. Sätt 100 µl av konjugatlösningen till alla brunnarna.
14. Inkubera plattorna under 15 minuter i rumstemperatur.
15. Tvätta, töm och torka enligt punkt 12.

Tillsätt substrat:

16. Sätt 100 µl av substratlösningen till alla brunnarna.
17. Vänta på färgreaktionen. Notera resultaten i en tabell i skalan 0 till 5. 0 är negativ (ingen färg) och 5 mest positiv (starkast färgreaktion). Beskriv också färgerna.

Gör rent:

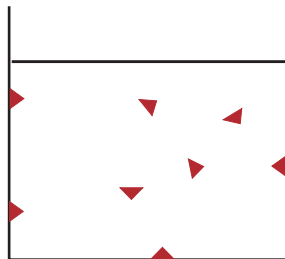
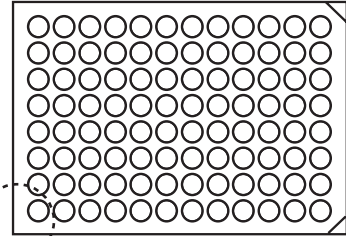
Lägg använda pipetter och mikrotiterplattor i en plastpåse och kasta denna i soporna. Resterande lösningar kan hållas ut i avloppet.

Resultat och utvärdering

1. Vilka av de okända sera var positiva? Vilket serum var mest resp minst positivt?
2. Vilka felkällor finns vid denna analysmetod?
3. Om du önskar att göra ett liknande försök för att upptäcka mässlingvirus hos människa, vilka reagens måste ändras?
4. Vilken kan anledningen vara till att vi inte gjort en ELISA för att upptäcka mässlingvirus?

ELISA

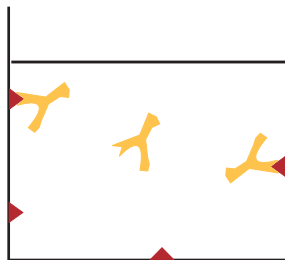
Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay



1. Protein (antigen) tillsätts. Detta binder till brunnarnas yta.



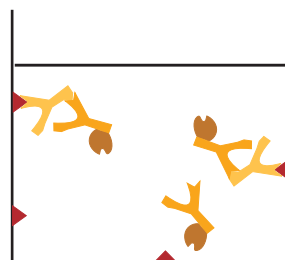
TVÄTTA för att få bort obundna molekyler.



2. Provet tillsättes. Antikroppar binder till antigenet, som sitter fast i brunnarna.



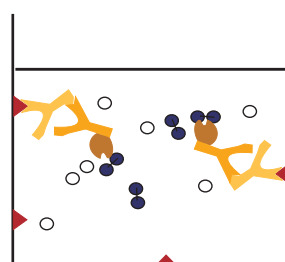
TVÄTTA för att få bort obundna molekyler.



3. Enzymbundet antikroppskonjugat tillsättes, vilket leder till att konjugatet binds till de bundna antikropparna som finns i brunnarna.



TVÄTTA för att få bort obundna molekyler.



4. Färglöst substrat tillsätts varpå en färgreaktion sker om bundet enzym finns närvarande.

Hur man upptäcker ägg i mat genom dubbel immunodiffusion



Ägg ingår i många maträtter som hamburgare, pasta och vissa glassprodukter. Många människor är emellertid allergiska mot ägg. Vissa personer kan få allergiska besvär även av mat som innehåller mycket små kvantiteter ägg. Numera har man utarbetat så känsliga analysmetoder att spår av äggvita eller äggula i en maträtt kan upptäckas.

I denna laboration ska du använda en metod som kallas dubbel immunodiffusion för att undersöka om det finns ägg i matvaror. Man låter antikroppar mot äggalbumin och ett extrakt av maten diffundera mot varandra i en agargel. Om maten innehåller äggalbumin träffar antikropparna då på albuminmolekyler varvid en fällning i form av en båge eller linje bildas. Metoden har därför fått namnet "dubbel immunodiffusion".

Analysmetoden utvecklades för 30 år sedan av en svensk läkare, Örjan Ouchterlony.

Antikroppar är mycket specifika och med hjälp av dessa kan ett speciellt protein påvisas. Metoden används i många sammanhang, t ex då det gäller att ställa vissa diagnoser eller när man vill påvisa ett visst protein eller identifiera antigener och antikroppar.

Idén till denna laboration kommer från bl a Statens livsmedelsverk.

Information till läraren

Syfte

Att påvisa äggproteiner i olika maträtter genom dubbel immunodiffusion.

Förberedelser

Dag 1: Gör i ordning provet, gjut agarosplattorna och starta försöket. Det tar ca 60 minuter. Diffusionen får pågå över en natt.

Dag 2: Undersök plattorna och notera resultaten. Det tar ca 20 minuter. Utfällningarna blir något tydligare om man färgar plattorna. Färgningen tar ca 3 timmar.

Om man inte kan undersöka plattorna efter ett dygn kan man ställa in dem i ett kylskåp. Vid 5-6 °C tar diffusionen flera dagar.

Säkerhet

Inga speciella åtgärder behövs.

Anmärkningar

Att göra mönster i plattorna.

Det är nödvändigt att göra ett regelbundet brunn-mönster i gelen. Hålen görs lämpligen med hjälp av en plastpipett eller ett sugrör. Brunnarna kan bilda ett mönster enligt figuren i elevinstruktionen. Man kan ev låta eleverna träna sig att göra något hål i kanten av gelen innan de gör experimentbrunnarna. Linjerna som bildas till följd av utfällningen uppträder olika snabbt beroende på avståndet mellan brunnarna. Ett avstånd på 5 mm ger resultat efter 24 timmar och ett avstånd på 10 mm efter 48 timmar.

Om man använder sig av objektsglas och det är varmt och torrt i laborations salen bör

man förvara dessa i en övertäckt petriskål med ett fuktat filter- eller hushållspapper i botten. På detta sätt klarar det sig över natten. Skall man förvara plattorna under längre tid bör man förvara dem fuktigt och helst i kylskåp.

Referenslösning

Som referenslösning används äggvitan från ett hönsägg. Den görs lättast om man först vispar äggvitan och sedan använder den fortfarande flytande äggvitan.

Äggalbumin - antikropparna

Frystorkade antikroppar löses i TRIS-buffert enligt de instruktioner som gäller för dessa. Denna lösning delas lämpligen upp i flera eppendorfrör och förvaras i frysen.

Avfall

Allt avfall kan hanteras som normalt avfall.

Färgning

Det är inte nödvändigt att färga, men resultatet blir något tydligare. Färglösningar som kan användas är Amido black eller Coomassie Brilliant Blue.

Utrustning och material

Objektsglas eller små petriskålar (5 cm i diameter).

Plastpipett eller liknande med en diameter på 2,5 mm. Denna skall användas till att göra brunnar i gelen.

Mikropipetter 0 - 10 µl

Fuktkammare för objektsglasen. Ex en plastlåda eller petriskål med fuktat papper i.

Homogenisator ev en mortel

Hårtork*

Filtrerpapper*

Vikt ca 1 kg*

Låda för färgning av gelen*

TRIS-buffert 0,01M, pH 8.0

Agaros lösning: 1% i TRIS-buffert

Referenslösning: 0.01% äggvita löst i avjoniserat vatten

Kanin antiserum mot äggalbumin (Pharmacia AS-23).

Amido black lösning (0.1 g amido black löst i 100 cm³ av en blandning bestående av ättiksyra, metanol och avjoniserat vatten i proportionerna 10:70:20)*

Fysiologisk NaCl lösning (0.9%)*

Avfärgningsvätska, som innehåller 10% ättiksyra, 70% metanol och 20% avjoniserat vatten.*

* endast nödvändigt vid färgning av gelen

Instruktion till eleverna



Proven

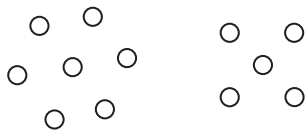
1. Homogenisera (finfördela) 5 g av provet i 5 cm³ vatten.
2. Centrifugera det homogeniserade provet vid 6000 rpm i 15 minuter (eller vid 9500 rpm i 10 minuter).
3. Filtrera supernatanten genom ett filter ner i ett rent provrör.

Gjutning av gel

4. Lös upp agaros i TRIS.buffert (1% agaroslösning) och blanda noggrant. Till en petriskål behövs 3- 5 cm³ och till ett objektglas behövs 3.5 cm³. Det går bra att använda en mikrovågsugn när man löser agarosen. Man måste passa noggrant eftersom agaroslösningen kokar upp mycket häftigt. Det är också viktigt att agarosen är ordentligt löst.
5. Låt svalna till 60 - 80 °C.
6. Lägg petriskålarna /objektglasen på en jämn yta nära en bordskant. Detta för att underlätta utstansningen.
7. Håll den heta gelen i skålarna (3-5 cm³) Fyll på så att gelen blir 2- 3 mm tjock. Lägg på locken. Om man använder objektglas brukar 3,5 cm³ vara lagom.
8. Låt gelen stelna. Detta tar 5 till 10 minuter.

Utstansning av brunnar

9. Använd en pipett eller liknande med en diameter på ca 2.5 mm för att stansa ut brunnar i gelen Man gör detta genom att suga upp en gelplugg i pipetten. Gör brunnarna med så raka sidor som möjligt Gör något av följande mönster.



Antikropparna tillsätts

OBS! Märk varje brunn på undersidan av skålen innan du fyller brunnarna.

10. Fyll brunnen i mitten med antikropp

(anti- ägg albumin). 5- 10 µl brukar vara tillräckligt. Var noga med att inte fylla brunnarna så att vätska rinner över.

Antigen tillsätts

11. Fyll varannan av de yttre brunnarna med referenslösning.
12. Fyll resterande brunnar med testlösningarna. Glöm inte att notera vilken testlösning som hamnar i vilken brunn.
Låt diffusionen äga rum över natten i rumstemperatur eller i kylan om diffusionen skall äga rum under längre tid.
13. Efter tidigast ett dygn kan du studera de vita diffusionslinjerna eller bågarna som bildas vid en positiv reaktion. Det kan vara lättare att se linjerna om du håller skålen/objektglaset mot en mörk bakgrund.

Färgning (ej nödvändigt)

14. Tvätta bort icke utfällt protein genom att dränka gelen i fysiologisk koksaltlösning under 60 minuter i rumstemperatur. Gelen placeras lämpligen i en liten låda eller i en petriskål.
15. Häll av saltlösningen och dränk gelen under 60 minuter med avjoniserat vatten.
16. Häll av vattnet och lägg gelen i press under ett lager av 10 filterpapper och en vikt av ca 1 kg i ca 15 minuter.
17. Torka gelen med hjälp av en hårtork.
18. Täck gelen med färglösning och låt denna verka i 10 minuter.
19. Häll av färglösningen. Ta bort överskottsfärg med avfärgningsmedel under 10 minuter. Det är ibland nödvändigt att avfärga ytterligare en gång.

Resultat

För att påvisa äggalbumin krävs 2.5 mg äggalbumin per 100 g mat. Om det är mycket kycklingproteiner i provet får man också en reaktion. Äggula innehåller också tillräckligt mycket med äggviteprotein för att man skall få en reaktion.

STEFFENS ELISA Kit



Introduktion

Detta kit innehåller en polyklonal antikropp mot *Pelargonium flower break virus* (PFBV). Antikroppen är immobiliserad på en special kam. Detta gör det möjligt att utföra försöket på kort tid.

I kittet finns möjlighet att påvisa en PFBV infektion i 2 x 10 stycken prover. Både positiva och negativa kontroller medföljer. Känsligheten har testats genom att extrahera infekterat växtmaterial (*Chenopodium quinoa*) i en provlösning och späda det. Virus kan upptäckas i en 10% extraktlösning spädd 1:1000 (> 100 mOD över negativ kontroll).

Testreagenserna håller sig stabila till markerad giltighetsdatum under förutsättning att de förvaras i 4 °C.

Referenser.

Bömer, H. (1989) Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. UTB 518. Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer.
Clark, M.F. and Adams, A.N. (1977) Journal

of General Virology, **34**, 475-483.

Hollings, M. and Stone, O.M. (1974)

Description of plant viruses. CMI/AAB, **130**,4.

Nellen, U. (1992) *The ELISA test: a universal procedure for the identification of antigens on the basis of biotechnologically produced monoclonal antibodies- information and school- experiment*. Biotechnology Education (3) **3**, 107-112.

Information till läraren

Material

STEFFENS ELISA test kit för 2x12 analyser (order nr. 04093P00):

I en lufttät plastpåse med torkpulver finns individuellt förpackade:

- En kam med 12 små kulor, som preparerats med PFBV antikroppar
- 3 st rader med 12 brunnar i vardera
- 10 st påsar som skall användas att extrahera saft ur pelargonieblad
- 50 cm³ provbuffert (gul)
- 12 st engångspipetter (till 10 prover, spädning av konjugat och substrat)
- 1 st graderad engångspipett (skall användas till provbuffert)
- 1 st ograderad engångspipett med tunn spets (skall användas till det konc. konjugatet)
- 1 st litet rör med 0.05 cm³ koncentrerat konjugat (färglöst)
- 1 st liten flaska med skruvkork innehållande 1.6 cm³ konjugat buffert (blå)
- 1 st liten flaska med skruvkork innehållande 1.6 cm³ substratlösning (färglös)
- 1 st pipetthållare (del av förpackningen)

Förberedelser:

Alla reagens bör ha rumstemperatur innan försöket startas.

De tre raderna med brunnar kan placeras i den hållare som kan tillverkas av pappkartongens innerväggar.

Det koncentrerade konjugatet ska pipetteras över till den blå konjugatbufferten, med hjälp av märkt pipett. Se till att inga droppar

finns kvar på locket! Blanda innehållet noggrant.

Övrigt som behövs

Pelargonieblad från olika plantor. Man kan testa upp till 20 st.

Sax.

Homogenisator (man kan använda en mortelstöt).

Kallt kranvatten.

Microtiserspektrofotometer (650 nm) om en sådan finns att tillgå. Det går annars mycket bra att avläsa resultaten visuellt.

Skräppåse.

Förslag till organisation av laborationen

(Givetvis kan man också utföra det mesta av följande förslag under ett laborationstillfälle)

Dag 1.

- Introduktion av laborationen.
- Förklara antigen-antikroppreaktioner.
- Berätta om virussjukdomar.
- Hemarbete- att ta med sig pelargonier eller nyligen plockade pelargonieblad.

Dag 2.

- Homogenisering av proverna i extraktions påsar.
- Förberedning av brunnarna, lösningarna och laddning av prover.
- Avläsning av resultat.
- Utvärdering av resultat.

Dag 3.

- Diskutera resultaten.
- Vilka faktorer gynnar en virusinfektion?

Några tips

ELISA kittet är gjort för 2 x 10 analyser. Allt finns i kittet och i dubbel uppsättning. Hälften av innehållet kan därför förvaras i kartongen på ett svalt ställe (4 °C) för senare bruk.

Pipettspetserna bör inte vidröras med händerna.

Om ingen homogenisator finns tillgänglig

kan man använda sig av ett slätt föremål t ex hand-taget på en skruvmejsel eller en mortelstöt.

Specialkammen till ELISA finns tillsammans med de tre raderna brunnar i en separat plastpåse. Den innehåller även ett torkmedel. En polyklonal antikropp finns på kammens kulor. Denna antikropp kår specifikt för *Pelargonium Flower Break Virus (PFBV)*. Kula nr 11 på kammen (grön) är en negativ kontroll. Kula nr. 12 på kammen (röd) är en positiv kontroll. Kammen bör endast hållas i det gröna handtaget. Undvik att ta på kammens kulor med händerna.

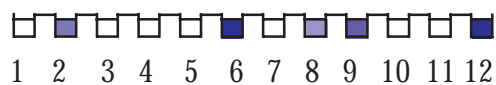
Skyddet i den inre pappkartongen öppnas och hälften eller alla extraktionspåsar och pipetterna tas ut. Skyddet av den inre delen bör ej vara vikt utan det skall bilda en hållare till de tre raderna med brunnar. När raderna brunnar tas ur plastpåsen kan de läggas i hållaren. Det har ingen betydelse åt vilket håll raderna läggs. Kammen förvaras bäst i påsen så kulorna inte rörs vid i onödan. Torkpulvret är inte nödvändigt längre och kan kastas.

Det koncentrerade konjugatet måste pipetteras över fullständigt till den blå konjugatbufferten genom användning engångspipetten med den fina spetsen. Dettur viktigt att inget av lösningen hamnar på locket. Lösningen ska blandas väl. Kasta pipetten efter att den är använd.

Efter att försöket är avslutat och resultaten noterade, tvättas kammen och brunnarna under rinnande vatten innan de kastas

Resultat

Följande schematiska illustration av tredje radens brunnar är typiskt:



Brunn nr 11 (negativ kontroll vid kammens gröna kula) ingen färgreaktion bör märkas.

Brunn nr 12 (positiv kontroll vid kammens

röda kula) en intensiv blå färg bör utvecklas. Jämför dessa brunnar med de övriga brunnarna (1-10). Färgen varierar mellan ljusblå och mörkblå beroende på i vilken grad plantan är infekterad.

Säkerhet

Kemikalier:

Provbuffertens innehåll: TRIS/HCl buffert, polyvinylpyrrolidon, NaCl, Tween 20, natriumazid, färg- E102.

Konjugatets innehåll: Fosfatbuffert, horseradish peroxidas, bovint serum albumin, Tween 20, Bronidox L (5-bromo-5-nitro-1,3-dioxan), färg E 131.

Substratets innehåll: TMB (tetramethylbenzidin), buffert, H₂O₂.

OBS! Natriumazid och Bronidox L används som stabilisatorer. Dessa är giftiga vid förtäring.

Avfallet behöver inte behandlas speciellt

Garanti och tillförlitlighet.

EIBE ger inte några garantier och är inte ansvarig för material och kemikalier i kittet. STEFFENS Biotechnische Analysen GmbH garanterar att det material som levereras har testats och uppfyller de krav som krävs samt överensstämmer med beskrivningarna. Ytterligare garantier ges ej. STEFFENS Biotechnische Analysen GmbH är inte ansvarig för de fel som kan uppstå vid felaktigt förvar och felaktigt användande av produkten.

Tabell över resultaten

Prov nr	Detaljer <i>(provnamn, ursprung)</i>	Anmärkning	Resultat
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11	<i>negativ kontroll</i>		<i>färglös</i>
12	<i>positiv kontroll</i>		<i>blå</i>

Instruktion till eleverna



Introduktion

Immunologin är ett av de viktigaste forskningsområdena inom den tillämpade biologin idag. Grunden lades i början av 1900-talet, då Paul Ehrlich (nobelpris 1908) upptäckte antikroppens förmåga att hindra infektionssjukdomar.

Immunitet hos ryggradsdjur beror på bildande av ett antigen-antikroppkomplex. Ett antigen är en substans som stimulerar produktion av antikroppar. Det kan vara en organisk förening, som till exempel en polysackarid, ett protein, en peptid eller en nukleinsyra. Vissa kroppsegna globulära proteiner, immunoglobuliner, fungerar som antikroppar. Dessa känner på molekylär nivå igen olika ytstrukturer hos antigener och kan binda till detta och bilda ett olösligt komplex.

Detta kan utnyttjas vid den immunologiska diagnostiken. Mycket små kvantiteter av antigen (10^{-8} g/cm³) kan upptäckas. Tidigare extraherades antikroppar ur djur, som man injicerat med ett antigen. Detta gav emellertid ett dåligt utbyte. Man har förbättrat metoderna och utvecklandet av hybridomceller används idag för att ta fram sk monoklonala antikroppar.

Antikropparna som används i ett diagnostiskt test måste vara märkta för att komplexen ska kunna påvisas. Antikroppar kombineras därför ofta med ett enzym, som vid tillsatts av ett substrat ger en färgreaktion. Färgreaktionen indikerar således ett positivt prov.

ELISA testet baseras på denna princip. ELISA står för Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay och många olika antigen, inklusive virus, kan påvisas med hjälp av denna metod.

Virus kan förutom att angripa djur och människor även angripa växter. De intensiva odlings- och förökningsmetoderna inom jordbruket har gjort att många växtvirusjukdomar har spridits. Detta har gjort ELISA metoden mer och mer betydelsefull inom detta område.

I nedan beskrivna försök påvisas ett virus hos pelargonier. En infektion med *Pelargonium flower break virus (PFBV)* orsakar bl a att blommorna får en annorlunda ej önskad färg. Detta är en vanlig sjukdom hos pelargonier och det bör inte vara några problem att hitta infekterat material. Principen till försöket är baserat på den sk. "smörgästekniken", vilket innebär att en immobiliserad antikropp binds till en antigen om den finns närvarande i provet, samt att en andra antikropp binder till den immobiliserade antigenen och bildar ett antikropps-antigen-antikropps komplex. Den andra antikroppen är märkt med ett enzym som orsakar en färgreaktion då ett substrat tillsätts.

I *STEFFENSELISA* kit är den första antikroppen till *PFBV* immobiliserad på kulorna av kammen.

Första reaktionen:

PFBV antigener från proven binds till den immobiliserade antikroppen på kammen. Antigen-antikropps komplex bildas på kammens kulor.

Andra reaktionen:

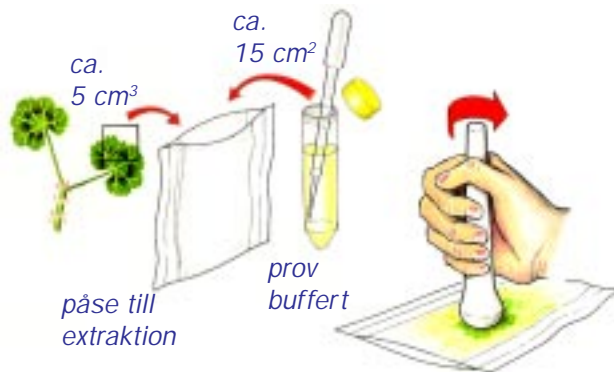
Den andra *PFBV* antikroppen som är märkt med horseradishperoxid (enzymkonjugat) binds till antigen-antikropps komplexet på kammens kulor.

Tredje reaktionen:

Antigen-antikropps komplexet som nu är märkt med enzymet omvandlar substratet tetrametylbenzidin till en blåfärgad produkt. *PFBV* infekterade prover blir blåfärgade medan icke infekterade prover förblir färglösa.

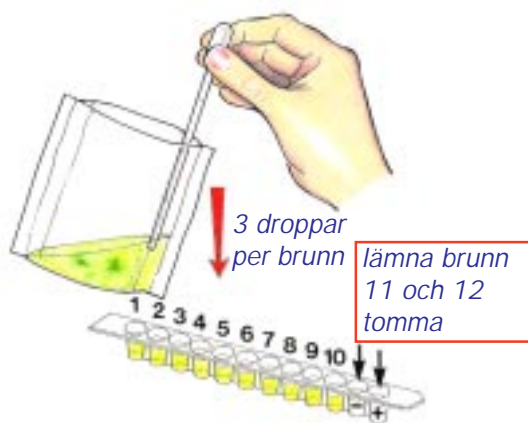
Tillvägångsätt

1. Att göra i ordning proverna (10 min.)



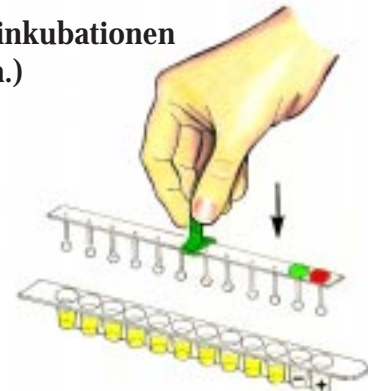
- 1.1 Placera ett blad, som är ca 15 cm², i mitten av en extraktionspåse.
- 1.2 Tillsätt 5 cm³ provbuffert (gul) med hjälp av den graderade pipetten. Undvik all kontaminering av provbufferten med växtextraktet.
- 1.3 Lägg extraktionspåsen på en jämn yta och krossa bladet genom att föra homogenisatorn med cirkulära rörelser över påsen. Vätskans färg skall bli grön vilket visar att klorofyll (grön färg) extraherats.

2. Att fördela proverna (5 min)



- 2.1 Numrera proverna 1-10 och tillsätt 3 droppar från varje prov i brunnarna på den första raden. Arbeta från vänster till höger. Använd en ren pipett för varje prov.
- 2.2 Lämna brunn 11 och 12 på höger sida tomma. De skall vara tomma under första reaktionen.

3. Första inkubationen (10 min.)



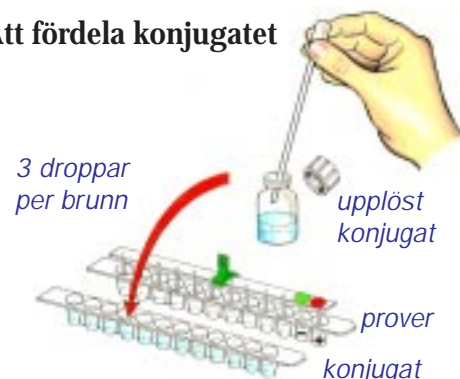
- 3.1 Placera kammen i den första raden av brunnar, så att den positiva och negativa kontrollen hamnar i brunn 11 och 12. Från och med nu startar första reaktionen, som tar ca 10 minuter. (använd denna tid till att förbereda konjugatet).

4. Att förbereda konjugatet



- 4.1 Använd pipetten med den fina spetsen och överför det koncentrerade konjugatet till den blå konjugatbufferten. Var noga med att inte lämna några droppar på locket. Blanda därefter lösningen noggrant.

5. Att fördela konjugatet



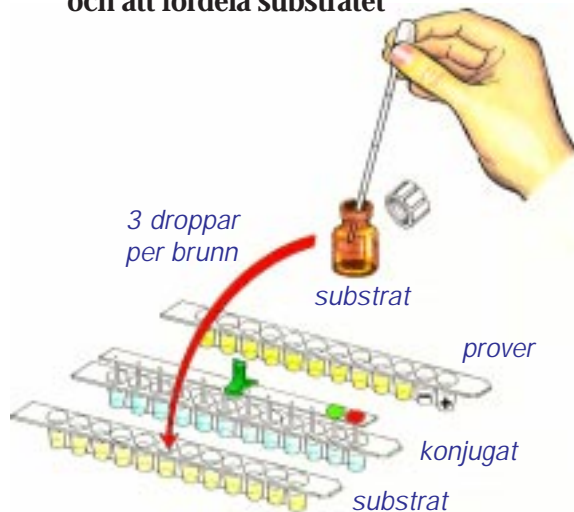
- 5.1 Använd en ny pipett och tillsätt 3 droppar av konjugatlösningen i varje brunn, inklusive brunn nr 11 och 12, av den andra raden. Undvik att kontaminera den tredje raden.

6. Att tvätta kammen (30 sek.)



- 6.1 Efter 10 minuters inkubation lyfts kammen ur den första raden av brunnar.
- 6.2 Skölj kammen under kallt rinnande vatten i 15 till 30 sekunder. Håll kammen vågrätt, så att man undviker kontaminering då man sköljer. Noggrann sköljning är viktig.
- 6.3 Skaka bort allt överskottsvatten från kammen.

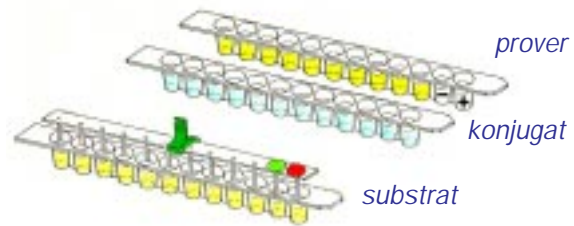
7. Att inkubera med konjugat (10 min.) och att fördela substratet



- 7.1 Placera kammen i den andra raden av brunnar och var noga med att kontrollerna, att, röd och grön är på samma sida.
- 7.2 Inkubera under 10 minuter.
- 7.3 Använd en ny pipett och tillsätt 3 droppar av substratlösningen i varje brunn på den tredje raden, inklusive brunn nr 11 och 12.

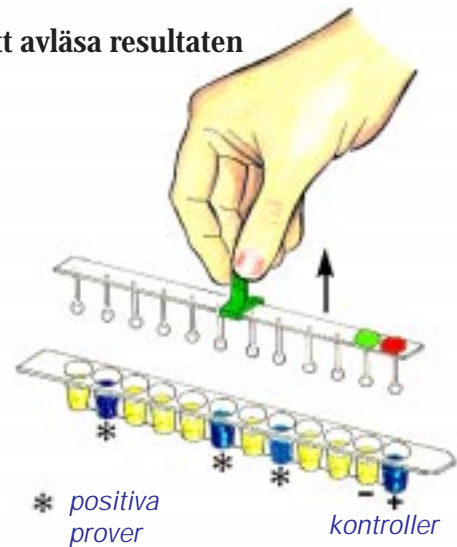
Substratet är känsligt för ljus så undvik att arbeta i direkt solljus.

8. Att inkubera i substratet (10 min.)



- 8.1 Efter inkuberingen i konjugatet tvätta kammen noggrant under rinnande kallt vatten, enligt punkt 6.
- 8.2 Placera kammen i den tredje raden av brunnar, som innehåller substrat med kontrollerna på högra sidan. Undvik direkt solljus.

9. Att avläsa resultaten



- 9.1 Försöket avläses bäst direkt efter att kammen tas upp ur den tredje raden. Avläs antingen visuellt eller med hjälp av en mikrotiterspektrofotometer vid 650 nm.
- 9.2 Kontrollerna visar om försöket har fungerat. Den positiva kontrollen skall visa en intensivt blå färg och den negativa kontrollen skall förbli färglös.

Varje prov med en färgreaktion som är starkare än den negativa kontrollen anses vara infekterad med *PFBV*.

Infektion kan inte helt uteslutas även om provet blir ofärgat, eftersom viruskoncentrationen i provet kan vara lägre än testets känslighet.