



Biotechnology Explorer™

ELISA Immuno Explorer™ Kit

Instruktionsmanual

Katalognummer
166-2400EDU

explorer.bio-rad.com

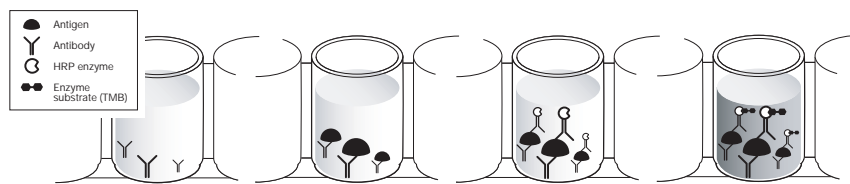
Delene i dette kit er sendt i separate æsker. Opbevar posen med reagenser i køleskab indefor 1 uge efter modtagelse. OBS: Dette kit indeholder ikke substanser af human eller patogen oprindelse

Kopiering af enhver del af dette dokument er kun tilladt til undervisningsbrug



For teknisk service bedes du ringe til dit lokale Bio-Rad kontor Office
or in the U.S. Call **1-800-4BIORAD** (1-800-424-6723)

4110175



Til læreren

Dette kit er lavet for at lette og illustrere immunologiundervisningen og kan give en øget forståelse af antigen-antistof interaktionen, men kittet skal også øge forståelsen for de forhold, der har betydet, at kendskabet til antistoffer i dag har revolutioneret moderne medicin, bioteknologi og anden forskning.

Dette er en oversættelse, der er lige til at gå til for danske undervisere. Udbyggende teori om immunsystemet, ELISA-metoden m.m. findes i forskellige lærebøger, men også i den engelske manual, der følger med kittet.

Det er således primært den praktiske del af kittet, der er oversat – såvel lærerdelene som elevdelene. Skulle der blive behov for yderligere oversættelse gives besked til BioRad.

Birgit Sandermann Justesen

November 2004

Bemærk: kittets reagenser skal opbevares i køleskab!

Indholdsfortegnelse

Tjekliste over kittets indhold	2
Hvordan kan kittet bruges?	3
Beskrivelse af ELISA – trin for trin	3
Forsøg I: En sygdoms smitteveje, lærervejledning	4
Forsøg I: Elevvejledning	7
Forsøg II: ELISA test til undersøgelse af antigener, lærervejledning	11
Forsøg II: Elevvejledning	14
Forsøg III: ELISA – antistoftest, lærervejledning	16
Forsøg III: Elevvejledning	19

Tjekliste – over kittets indhold samt andet udstyr, der er nødvendigt for forsøgenes udførelse

I kittet:

Antigen (kyllinge gammaglobulin) frysetørret	1 glas
Primært antistof (kanin anti-kyllinge polyklonalt antistof) frysetørret	1 glas
Sekundært antistof (gede anti-kanin antistof konjugeret til peberrods peroxidase (HRP)) – frysetørret	1 glas
HRP enzymsubstrat (TMB)	1 flaske
10 x fosfatbuffer (PBS)	1 flaske
10% Tween 20 (sulfosæbe)	1 flaske
Engangspipetter af plast	80
30 mL's flasker med låg	3
Mikrotiterplader 12-brøndes-rækker (8 x 12 rækker)	3
Gule 2 mL's eppendorfrør	1 pose
Farvede 2 mL's eppendorfrør (15 af hver farve)	1 pose

Nødvendigt materiale

Mikropipetter til 50 μ L	1 pr. gruppe
Pipettespidser	150
Køkkenrulle eller papirhåndklæder	
100-200 ml bægerglas	12
Markerings tusch	12
100 mL måleglas	1
1L måleglas	1
Demineraliseret vand	1L

Eventuelt

Mikrotiterplade-læser
Holdere til eppendorfrørene

Hvordan kan kittet bruges?

Kittet er bygget op således, at man kan udføre 3 forskellige ELISA forsøgsprocedurer:

	ELISA-type	Reel medicinsk anvendelse
Forsøg I	ELISA til opsporing af sygdomsudbrud Trin 1: Udveksling i klassen af simulerede kropsvæsker Trin 2: ELISA-laboratorium Trin 3: Følg smittevejene	HIV, SARS, influenza, kolera mæslinger m.fl.
Forsøg II	Analyse af antigen ELISA bruges til at finde specifikke antigener	Graviditet, narko, GMO, test for allergener Test af luft, mad og vand HIV, mæslinger, nilvirus, SARS

Forsøg III

Test for antistoffer vha. ELISA

Der testes for antistoffer i en simuleret blodprøve

HIV, doping, trichinosis, lymfesygdomme
SARS m.fl.

Beskrivelse af ELISA – trin for trin

Dette kits forsøgsprocedure bygger på indirekte antistof bundet ELISA. Læs nærmere om dette i lærebøgerne. Dette kan trin for trin beskrives således:

Trin 1: Antigen tilsættes til brøndene i mikrotiterpladen.

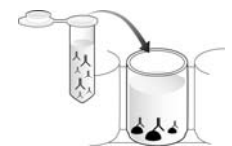
Under inkuberingen bindes antigenet til brøndenes bund og sider. Efterfølgende vaskes ubundet antigen væk med fosfatbuffer (PBS tilsat Tween20). Bufferen indeholder desuden et detergent, der sørger for, at de sidste bindingssteder i brøndene blokeres, så ikkespecifik binding af undgås.



antistoffer

Trin 2: Primært antistof tilsættes til brøndene, og der inkuberes, hvorved antistoffet bindes til antigenet.

Ikke bundet primært antistof vaskes herefter væk med fosfatbuffer.



Trin 3: Enzym-konjugeret sekundært antistof tilsættes nu til brøndene. Der inkuberes, og det sekundære antistof vil binde sig til det primære antistof. Efter inkuberingen vaskes overskydende sekundært antistof væk.



Trin 4: Der tilsættes farvende enzym-substrat til brøndene. Der inkuberes og farverreaktionen forløber.

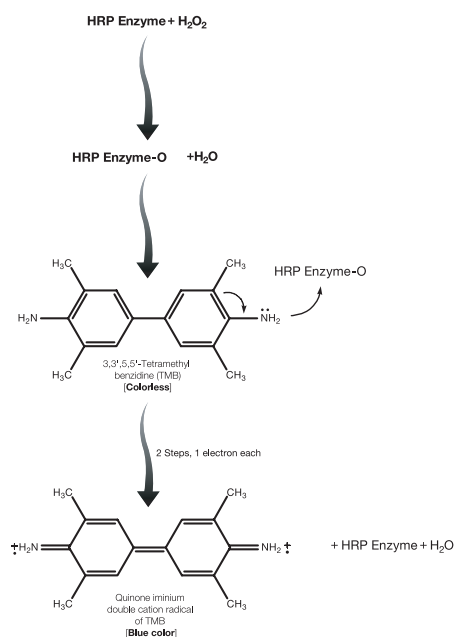
Resultatet analyseres.

De brønde, der ikke er farvede, er negative og brønde, der bliver blå, viser positivt resultat.

Om processen kan der læses mere i den engelske vejledning.



Kolometrisk Detektion:



Forsøg I:

Opsporing af sygdomsudbrud – en sygdoms smitteveje

I dette forsøg forestiller man sig en situation, der ligeså godt kunne foregå i den virkelige verden. Først simuleres en spredning af en farlig sygdom ved, at befolkningens kropsvæsker blandes (man smitter hinanden). Hver elev blander noget ”kropsvæske” med andre, og det viser sig, at en eller to af eleverne er syge. Efter denne simulation skal eleverne nu ved hjælp af ELISA finde ud af, hvem der var syg og følge smittevejen.

Resultatet vil vise, at en stor andel af eleverne bliver testet positive, altså er smittede!

Dette leder nu frem til en styret efterforskning af smittevejene. Eleverne kan sagtens forestille sig eksemplet omsat til aktuelle tilfælde som fx SARS-epidemien i Kina i 2003.

Mange andre sygdomsudbrud vil kunne bruges som eksempel fx nilvirus (West Nile feber), HIV, forkølelse, influenza, kønssygdomme.

I Appendix C i den engelske manual er nogle af de nævnte sygdomme beskrevet mere grundigt.

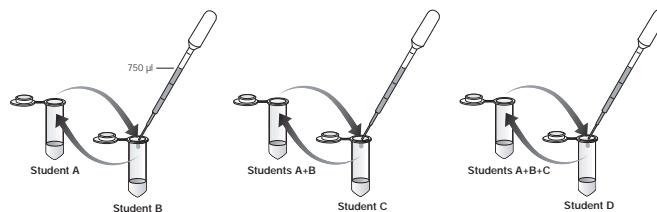
Timeforbrug:

1. lektion	Indledning	Oplæg og diskussion – fx artikellæsning
2. lektion	Blanding (smitte) af kropsvæsker	ELISA udføres
3. lektion	Analyse af ELISA-resultaterne	Klarlæggelse af smitteveje

Lærerens overblik

Trin 1 Eleverne blander deres ”kropsvæsker”. Når 2 elever har blandet, tager de hver især den halve mængde af blandingen tilbage i hver deres rør. Derefter går de videre og blander med en ny holdkammerat. Og dette gentages endnu en gang.

Bemærk: For at være sikker på at sygdommen spredes foretages blandingsprocessen over to eller tre runder.

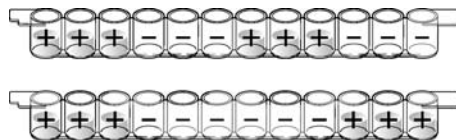


Trin 2. Fra hver elevs prøve udtages der nu 50 µL. Fyld prøverne i brøndene og lad det inkubere i 5 minutter. De antigener (proteiner), der er i prøverne (hos de smittede), vil nu binde til brøndene. Efterfølgende vaskes brøndene med fosfatbuffer (PBS tilsat Tween 20). Bufferen sørger desuden for, at de sidste bindingssteder i brøndene blokeres.

Trin 3. Der tilsættes primært antistof til brøndene og inkuberes i 5 minutter. Det primære antistof er et antistof, der genkender og binde sig til antigenet. Der vaskes efterfølgende for at fjerne overskydende primært antistof.

Trin 4: Peberrod peroxidase (HRP)-bundet sekundært antistof tilsættes til brøndene. Det sekundære antistof binder specifikt til det primære antistof. Peroxidasen er et enzym, der oxiderer substratet, hvorved der dannes farve. Brøndene vaskes atter med fosfatbuffer for at fjerne overskydende sekundært antistof.

Trin 5. Til sidst tilsættes enzym-substrat, og hvis der er peroxidase tilstede, vil indholdet i brøndene blive blå i løbet af de næste 5 minutter. Såfremt der slet ikke var antigen tilstede (dvs. personen ikke var smittet), så vil indholdet i brønden forblive farveløst.



Resultaterne gennemgås grundigt, idet hver elev fortæller resultatet af testen af sin egen kropsvæske. Desuden fortæller eleverne, hvem de har været i kontakt med. Smittevejene fastlægges.

Lærerens forberedelse – trin for trin

I denne vejledning lægges der op til, at der i alt er 12 grupper med 4 elever i hver. Dette kan naturligvis tilpasses efter egne behov.

Bemærk: Det sekundære antistof kan først klargøres, når der er mindre end 24 timer til forsøgets start.

1. Fremstilling af PBS-buffer

a. Fremstilling af 10 mL 1x PBS: Tilsæt 10 mL 10x PBS til 90 mL demineraliseret vand. Mærk flasken ”PBS 1x”.

Denne PBS skal bruges til at opløse alle de frysetørrede reagenser i trin 2 samt til fortynding af ANTIGEN i trin 3.

b. Fremstilling af 900 mL PBS-vaskebuffer: Bland 805 ml demineraliseret vand med 90 mL 10x PBS samt 4,5 mL 10 % Tween20. Mærk flasken: ”PBS-vaskebuffer”.

PBS-vaskebuffer bruges til at fortynde PRIMÆRT og SEKUNDÆRT antistof i trin 3.

2. Opløsning af frysetørret antigen, samt primært antistof og sekundært antistof:

a. Opløsning af antigen og antistoffer i 1x PBS: Fjern forsigtigt propperne på de frysetørrede reagenser og brug en mikropipette for at tilsætte 0,5 mL 1x PBS til hvert glas.

HUSK at skifte spids for hver ny opløsning! Luk og bland grundigt.

Disse opløsninger er nu **50x koncentrat**.

Bemærk: Brug **ikke** vaskebuffer til selve opløsningen.

3. Fortynding af reagenser:

a. Fremstilling af positiv kontrol. Mærk en 30 mL’s flaske ”positiv kontrol” og tilsæt 7,5 mL 1x PBS til flasken. Tag en mikropipette og tilsæt 150 µL opløst ANTIGEN. Luk flasken og ryst grundigt.

Bemærk: Tilsæt **under ingen** omstændigheder vaskebuffer til antigenet, da Tween20 vil ødelægge det!

b. Fortynding af det primære antistof med PBS-vaskebuffer. Mærk en 30 mL’s flaske ”1x primært antistof” og tilsæt 24,5 mL PBS-vaskebuffer til flasken. Brug en ny pipettespids og overfør det opløste PRIMÆRE ANTISTOF til flasken. Brug pipetten til at rense antistof-glasset efter med noget af det fortyndede antistof, så der er sikkerhed for at alt er kommet med.

Luk flasken og ryst grundigt.

c. Fortynding af det sekundære antistof med PBS-vaskebuffer. Mærk en 30 mL’s flaske ”1x sekundært antistof” og tilsæt 24,5 mL PBS-vaskebuffer til flasken. Brug en ny pipettespids og overfør det opløste SEKUNDÆRE ANTISTOF til flasken. Brug pipetten til at rense antistof-glasset efter med noget af det fortyndede antistof, så der er sikkerhed for, at alt er kommet med. Luk flasken og ryst grundigt.

Bemærk! Dette punkt skal udføres, når der er mindre end 24 timer til forsøgets start

4. Fordeling af reagenser til grupperne:

Selve mærkningen af rørene kan man evt. overlade til eleverne, så de i højere grad bliver bevidste om, hvad der er i de forskellige rør.

a. Fordeling af positiv kontrol: Mærk 12 violette rør ”+” og tilsæt 0,5 mL positiv kontrolopløsning

- til hvert rør.
- b. Fordeling af negativ kontrol: Mærk 12 blå rør ”-” og tilsæt 0,5 mL 1x PBS til hvert rør
- c. Fordeling af primært antistof: Mærk 12 grønne rør ”PA” og tilsæt 1,5 mL af den primære antistof opløsning til hvert rør.
- d. Fordeling af sekundært antistof: Mærk 12 orange rør ”SA” og tilsæt 1,5 mL af den sekundære antistof opløsning til hvert rør.
- e. Fordeling af enzym-substrat: Mærk 12 brune rør ”SUB” og tilsæt 1,5 mL HRP enzym substrat (TMB) til hver.
Bemærk: TMB er lyssensitiv, derfor er det **vigtigt** at benytte de mørke rør til opbevaring af dette reagens.
- f. Fordeling af ”inficerede” elev/er: Sørg for at få fordelt en vis del ”inficerede” elever.
 Mindst én ”inficeret” elev pr. 16. Det ”inficerede” er et rør med 100 µL opløst ANTIGEN tilsat 650 µL 1x PBS i et lille gult rør. Sørg for at det er blandet godt.
HUSK: Der må **ikke** tilsættes Tween20 til ANTIGENET:
- g. Fordeling af ”raske elever”: Tilsæt 0,75 mL 1x PBS til så mange gule rør, at det passer med det antal elever, der er ”raske”
- h. Mærk fx med numre de forskellige elev-rør, så man kan huske, hvem der havde hvilket gult rør – og noter hvilke rør der indeholder smitte.

Klargøring af gruppernes arbejdspladser:

Tjekliste – Materialer pr. gruppe.

Gule rør	4 (1 pr. elev)
Violet rør(+)	1
Blåt rør (-)	1
Grønt rør (PA)	1
Orange rør (SA)	1
Brunt rør (SUB)	1
12-brønds mikrotiterpladestrip	2
Mikropipetter 20-200 µL	1
Gule pipettespidser	20
Engangsplastikpipetter	5
70-80 mL PBS-vaskebuffer	1
Papirhåndklæder/køkkenrulle	
Sort markeringstusch	

Hvor kan forsøget afbrydes?

Selv om forsøget er tilpasset, således at det kan køres på en lektion, er det muligt at afbryde det på hvert trin. Sørg for, at der er vaskebuffer i brøndene og stil materialet i køleskab til næste dag/gang.

Elevguide – Forsøg I:

Opsporing af sygdomsudbrud – en sygdoms smitteveje.

I dette forsøg skal I prøve at kortlægge smittevejene for en farlig sygdom. Der kunne fx være tale om SARS. For at stoppe sygdommens fremmarch mest muligt, ønsker man at finde smittekilden.

Blandt de gule rør, som skal simulere fx blod eller spyt fra jer, findes der ét, der indeholder smitten – dvs. antigenet for sygdommen – de andre rør er fra starten ”raske”.

Det første I gør, er at blande jeres ”kropsvæsker” – først med én person, og derefter med en ny og eventuelt med en tredje. Denne del simulerer, at I kommer i kontakt med en smittet person og muligvis bliver smittet med antigenet.

Når I har blandet jeres kropsvæsker, analyseres disse ved hjælp af ELISA for indhold af antigener.

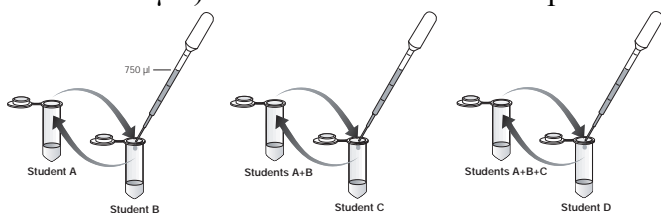
Afhængig af mængden af antigener vil farvereaktionen blive mere eller mindre blå. Er der ikke antigener tilstede, fremkommer der ikke nogen farvereaktion.

Tjekliste – Materialer pr. gruppe.

Gule rør	4 (1 pr. elev)
Violet rør(+)	1
Blåt rør (-)	1
Grønt rør (PA)	1
Orange rør (SA)	1
Brunt rør (SUB)	1
12-brønds mikrotiteterpladestrip	2
Mikropipetter 20-200 µL	1
Gule pipettespidser	20
Engangsplastikpipetter	5
70-80 mL PBS-vaskebuffer	1
Papirhåndklæder/køkkenrulle	
Sort markeringstusch	

Hvad skal vi gøre:

1. Mærk hvert af de gule rør med jeres initialer eller noter jer rørenes numre. Der er et rør pr. medlem af gruppen. Rørene indeholder ”kropsvæske ” fra hver af jer, og det er disse ”kropsvæsker”, der nu skal blandes tilfældigt i klassen.
2. Hver elev i gruppen mærker derefter en klar plastikpipette med sine initialer eller nummer – denne pipette skal bruges til at foretage blandingerne med
3. Find en anden elev i klassen, som du kan blande ”kropsvæske” med. Overfør med pipetten den enes kropsvæske til den andens rør. Sørg for at blande godt. Derefter tager den ene elev halvdelen tilbage (halvdelen er ca. 750µL). Noter hvem du delte ”kropsvæske” med i første omgang.



Blandet med: _____ (1. blandingsrunde)

Blandet med: _____ (2. blandingsrunde)

Blandet med: _____ (3. blandingsrunde)

4. Gentag blandingsprocessen med 2 andre elever fra klassen, således at du i alt har blandet ”kropsvæske” med 3 og noter med hvem, du har blandet. Gå derefter til næste punkt, eller lad de blandede prøver stå i køleskabet til næste øvelsesgang.

ELISA-testen udføres:

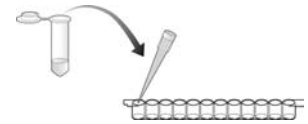
Mærkning af brøndene

5. To og to arbejder I nu sammen om en række med 12 brønde. Mærk de enkelte brønde som vist på figuren, først 3 brønde med ”+”, derefter 3 brønde med ”-” og de sidste brønde med jeres initialer eller numre.



Antigenerne bindes til brøndene:

6. Antigenerne tilsættes
 - Overfør 50 μ l fra den positive kontrol (+) i det violette rør til hver af de med ”+” mærkede brønde. Skift pipettespids og overfør 50 μ L fra den negative kontrol (-) i det blå rør til hvert af de med ”-” mærkede brønde
 - Skift pipettespids – og overfør nu 50 μ L af din prøve til hver af de brønde, der er mærket med dine initialer
7. Vent 5 minutter mens antigenerne binder sig til brøndenes sider



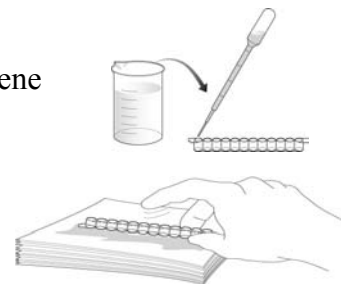
Ikke bundne antigener vaskes væk

8. Vaskning
 - Vend bunden i vejret på rækken med brøndene og lad overskydende væske suges ud på et stykke køkkenrulle eller papirhåndklæde. Dup op og ned et par gange.



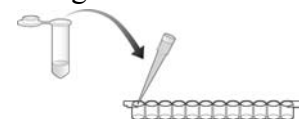
- Smid papiret væk
- Tag en almindelig plastikpipette og fyld vaskebuffer i hver af brøndene

- Tøm brøndene for væske som beskrevet i første underpunkt
- Smid det benyttede køkkenrulle/papirhåndklæde ud



Primært antistof tilsættes

9. Med en NY pipettespids overføres der 50 μ L primært antistof (PA) fra det grønne rør til hver af de 12 brønde



10. Vent 5 minutter, mens antistofferne bindes

Overskydende antistof vaskes væk:

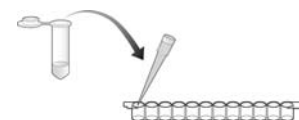
11. Vask overskydende ikke bundet antistof væk ved at gentage punkt 8.

VASK

Sekundært antistof tilsættes

12. Med en NY pipettespids overføres 50 μ L sekundært antistof fra det orange rør til hver af de 12 brønde i rækken.

13. Vent 5 minutter, mens det sekundære antistof bindes i brøndene



(SA)

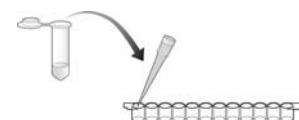
Overskydende antistof vaskes væk

14. Vask overskydende ikke bundet antistof væk, idet trin 8 gentages **to gange!**

VASK 2x

Det sekundære antistof er bundet til et enzym – peroxidase, som kemisk er i stand til at ændre enzymsubstratet fra farveløs til blå. Skriv ned i hvilke brønde, I forventer en farvereaktion.

15. Med en NY pipettespids overføres 50 μ L substrat (SUB) fra det brune rør til hver af de 12 brønde i rækken



Observation af resultater

16. Vent 5 minutter og noter resultatet.

Bearbejdning af resultaterne:

Saml klassens resultater og følg udviklingen af sygdommens ”fremmarch” i klassen.

Nogle eksempler på spørgsmål, der kan indgå ved rapportskrivningen:

- Hvis du blev testet positiv, hvor har du så fået sygdommen fra?
- Havde du været i direkte kontakt med en af de smittede?
- Hvis ikke, hvordan kan du så forklare det positive resultat?
- Hvis ELISA-testen gav negativt resultat, betyder det så, at du ikke har sygdommen?
- Hvad kan være årsagen til negativt resultat?
- Hvorfor benyttes der enzymer i dette ELISA forsøg?

Forsøg II:

ELISA test til undersøgelse af antigener

Forsøget her skal simulere, hvorledes ELISA benyttes til test for sygdomsantigener hos patienter.

Patienterne testes måske for kopper. Kopper er et godt eksempel på en sygdom, der, hvis den opdages i tide, kan behandles med vaccine, således at patienten undgår at blive syg. Andre sygdomme, der testes for med ELISA er HIV, SARS og miltbrand. Derudover kan det nævnes, at testen også bruges til at teste for sygdomme relateret til fødevarer og vand, men også graviditetstest, illegale stoffer, tilstedeværelsen af genetisk modificerede organismer og meget andet.

I Appendix C (side 90-98 i den engelske manual) findes der god information om forskellige sygdomme, hvor ELISA bruges.

Timeforbrug:

1. lektion	Indledning	Oplæg og diskussion
2. lektion	ELISA øvelsen udføres	
3. lektion	Tolkning og diskussion af resultaterne	

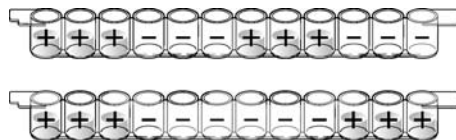
Lærerens overblik

Trin 1. Der udtages 50 µL fra hver elevs prøverør og disse fyldes i brøndene, ligesom der fyldes negative og positive kontrolprøver i de respektivt mærkede brønde.. Der inkuberes i 5 minutter. De proteiner dvs. antigener, der er i prøverne, vil nu binde til brøndene. Efterfølgende vaskes brøndene med fosfatbuffer (PBS tilsat Tween 20). Bufferen sørger desuden for, at de sidste bindingssteder i brøndene blokeres.

Trin 2. Der tilsættes primært antistof til brøndene og inkuberes i 5 minutter. Det primære antistof er et antistof, der genkender og binde sig til antigenet. Der vaskes efterfølgende for at fjerne overskydende primært antistof.

Trin 3: Peberrod peroxidase (HRP)-bundet sekundært antistof tilsættes til brøndene. Det sekundære antistof binder specifikt til det primære antistof. Peroxidasen er et enzym, der oxiderer substratet, hvorved der dannes farve. Brøndene vaskes atter med fosfatbuffer, for at fjerne overskydende sekundært antistof.

Trin 4. Der tilsættes nu enzym-substrat og hvis der er antigen tilstede, vil indholdet i brøndene blive blå i løbet af de næste 5 minutter. Såfremt der slet ikke var antigen tilstede (dvs. personen ikke var smittet), så vil indholdet i brønden forblive farveløst.



Resultaterne gennemgås nu grundigt, idet hver elev fortæller om sit resultat.

Lærerens forberedelse – trin for trin

I denne vejledning lægges der op til, at der i alt er 12 grupper med 4 elever i hver. Dette kan naturligvis tilpasses efter egne behov.

Bemærk: Det sekundære antistof kan først klargøres, når der er mindre end 24 timer til forsøgets start.

1. Fremstilling af buffere

a. Fremstilling af 10 ml 1x PBS: Tilsæt 10ml 10x PBS til 90 mL demineraliseret vand. Mærk flasken ”PBS 1x”.

Denne PBS skal bruges til at opløse alle de frysetørrede reagenser i trin 2 samt til fortynding af ANTIGEN i trin 3.

b. Fremstilling af 900 mL PBS-vaskebuffer: Bland 805 mL demineraliseret vand med 90 mL 10x PBS samt 4,5 mL 10 % Tween20. Mærk flasken: ”PBS-vaskebuffer”.

PBS-vaskebuffer bruges til at fortynde PRIMÆRT og SEKUNDÆRT antistof i trin 3.

2. Opløsning af frysetørret antigen, samt primært antistof og sekundært antistof:

a. Opløsning af antigen og antistoffer i 1x PBS: Fjern forsigtigt propperne på de frysetørrede reagenser og brug en mikropipette for at tilsætte 0,5 mL 1x PBS til hvert glas. **HUSK** at skifte spids for hver ny opløsning! Luk og bland grundigt. Disse opløsninger er nu **50x koncentrat**.

Bemærk: Brug **ikke** vaskebuffer til selve opløsningen, **kun** til fortyndingen.

3. Fortynding af reagenser.

a. Fortyding af af det opløste antigen til 1x i 25 mL PBS. Mærk en 30 mL’s flaske ”1x antigen” og tilsæt 24,5 mL 1xPBS til flasken. Brug en ny pipettespids og tilsæt indholdet af det opløste ANTIGEN til flasken. Brug noget af PBS’en til at ”skylle” ANTIGENet effektivt ud af det lille glas. Luk flasken og ryst grundigt.

Bemærk: Tilsæt under **ingen omstændigheder** vaskebuffer til antigenet, da indholdet af Tween20 vil ødelægge forsøget!

b. Fortyding af det primære antistof med PBS-vaskebuffer. Mærk en 30 mL’s flaske ”1x primært antistof” og tilsæt 24,5 mL PBS-vaskebuffer til flasken. Brug en ny pipettespids og overfør det opløste PRIMÆRE ANTISTOF til flasken. Brug pipetten til at rense antistof-glasset efter med noget af det fortyndede antistof, så der er sikkerhed for, at alt er kommet med.

Luk flasken og ryst grundigt.

c. Fortynding af det sekundære antistof med PBS-vaskebuffer. Mærk en 30 mL's flaske "1x sekundært antistof" og tilsæt 24,5 mL PBS-vaskebuffer til flasken. Brug en ny pipettespids og overfør det opløste SEKUNDÆRE ANTISTOF til flasken. Brug pipetten til at rense antistof-glasset efter med noget af det fortyndede antistof, så der er sikkerhed for, at alt er kommet med. Luk flasken og ryst grundigt.

Bemærk: Vær opmærksom på, at punkt 3.c skal udføres, når der er **mindre end 24 timer** til forsøgets start

4. Fordeling af reagenser til grupperne

a. Fordeling af positiv kontrol. Mærk 12 violette rør "+" og tilsæt 0,5 mL 1x antigen-opløsning til hvert rør.

b. Fordeling af negativ kontrol: Mærk 12 blå rør "-" og tilsæt 0,5 mL 1x PBS til hvert rør.

c. Fordeling af primært antistof: Mærk 12 grønne rør "PA" og tilsæt 1,5 mL af det primære antistof til hvert rør.

d. Fordeling af sekundært antistof: Mærk 12 orange rør "SA" og tilsæt 1,5 mL af det sekundære antistof til hvert rør.

e. Fordeling af enzym-substrat: Mærk 12 brune rør "SUB" og tilsæt 1,5 mL HRP-enzym-substrat (TMB) til hver.

Bemærk: TMB er lyssensitiv, derfor er det **vigtigt** at benytte de mørke rør til opbevaring af dette reagens.

f. Fordeling af elevernes tests: Vi anbefaler at forsøget designes således, at 50 % af eleverne testes positive og 50 % testes negative. Dette kan naturligvis varieres. Lav en test pr. elev. Til en 50:50 fordeling: Tilsæt 0,25 mL 1x antigen opløsning til 24 gule ikke mærkede rør og 0,25 mL 1x PBS til 24 andre ikke mærkede gule rør – bland rørene. (Bemærk der regnes med 48 elever i alt!)

Tjekliste – Materialer pr. gruppe.

Gule rør	4 (1 pr. elev)
Violet rør(+)	1
Blåt rør (-)	1
Grønt rør (PA)	1
Orange rør (SA)	1
Brunt rør (SUB)	1
12-brønds mikrotiteterpladestrip	2
Mikropipetter 20-200 µL	1
Gule pipettespidser	20
Engangsplastikpipetter	5
70-80 mL PBS-vaskebuffer	1
Papirhåndklæder/køkkenrulle	
Sort markeringstusch	

Hvor kan forsøget afbrydes?

Selv om forsøget er udformet således, at det kan køres på en lektion, er det muligt at afbryde det på hvert trin. Sørg for, at der er vaskebuffer i brøndene og stil materialet i køleskab til næste dag/gang.

Elevguide – Forsøg II

ELISA-test til undersøgelse af antigener

Forsøget her skal simulere, hvorledes ELISA benyttes til at teste for sygdomsantigener hos patienter. Patienterne testes måske for kopper. Kopper er et godt eksempel på en sygdom, der, hvis den opdages i tide, kan behandles med vaccine, således at patienten undgår at blive syg. Andre sygdomme, der testes for med ELISA, er eksempelvis HIV, SARS og miltbrand. Derudover kan det nævnes, at ELISA også bruges til at teste for sygdomme relateret til fødevarer og vand, til graviditetstest, for tilstedeværelsen af genetisk modificerede organismer og illegale stoffer samt meget andet.

Tjekliste – Materialer pr. gruppe.

Gule rør	4 (1 pr. elev)
Violet rør(+)	1
Blåt rør (-)	1
Grønt rør (PA)	1
Orange rør (SA)	1
Brunt rør (SUB)	1
12-brønds mikrotitelerpladestrip	2
Mikropipetter 20-200 μL	1
Gule pipettespidser	20
Engangsplastikpipetter	5
70-80 mL PBS-vaskebuffer	1
Papirhåndklæder/køkkenrulle	
Sort markeringstusch	

Forsøgsstart:

1. Hver elev mærker et gult rør med sine initialer.

ELISA-testen udføres:

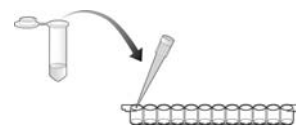
Mærkning af brøndene

2. I arbejder I nu sammen to og to om en række med 12 brønde. Mærk de enkelte brønde som vist på figuren, først 3 brønde med ”+”, derefter 3 brønde med ”-” og de sidste brønde med jeres initialer.



Antigenerne bindes til brøndene:

3. Antigenerne tilsættes
 - Overfør 50 μL fra den positive kontrol (+) i det violette rør til hver af de med ”+” mærkede brønde.
Skift pipettespid og overfør 50 μL fra den negative kontrol (-) i det blå rør til hver af de med ”-” mærkede brønde.
 - Skift pipettespid og overfør nu 50 μL af hver jeres prøve til de brønde, der er mærket med jeres initialer.
4. Vent 5 minutter, mens antigenerne binder sig til brøndenes sider.



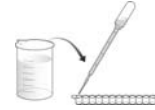
Ikke bundne antigener vaskes væk

5. Vaskning
 - Vend bunden i vejret på rækken med brøndene og lad overskydende



væske suges ud på et stykke køkkenrulle eller papirhåndklæde.

- Dup op og ned et par gange.
- Smid papiret væk
- Tag en almindelig plastikpipette og fyld vaskebuffer i hver af brøndene

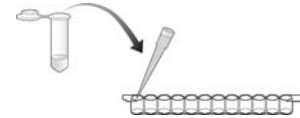


- Tøm brøndene for væske, som beskrevet i første underpunkt.
- Smid det benyttede køkkenrulle/papirhåndklæde ud.



Primært antistof tilsættes

6. Med en NY pipettespids overføres der 50 µL primært antistof (PA) fra grønne rør til hver af de 12 brønde.



det

7. Vent 5 minutter mens antistofferne bindes.

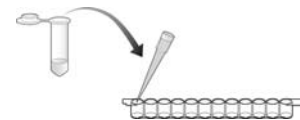
Overskydende antistof vaskes væk:

8. Vask overskydende ikke-bundet antistof væk ved at gentage punkt 5.

VASK

Sekundært antistof tilsættes

9. Med en NY pipettespids overføres 50 µL sekundært antistof (SA) fra det orange rør til hver af de 12 brønde i rækken.



10. Vent 5 minutter, mens det sekundære antistof bindes i brøndene.

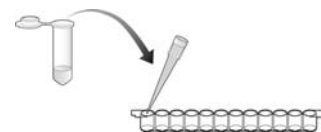
Overskydende antistof vaskes væk

11. Vask overskydende ikke-bundet antistof væk, idet trin 8 gentages **to gange!**

VASK 2x

Det sekundære antistof er bundet til et enzym – peroxidase, som er i stand til at ændre enzymsubstratet fra farveløs til blå. Noter i hvilke brønde, I forventer en farvereaktion.

12. Med en NY pipettespids overføres 50 µL substrat (SUB) fra det brune rør til hver af de 12 brønde i rækken.



Observation af resultater

13. Vent 5 minutter. Noter resultatet.

Resultatbearbejdning.

- Noter resultaterne og forklar disse.
- Indeholdt din prøve antigener?
- Hvorfor skulle du lave 3 brønde med dine tests?
- Hvilke antistofbaserede tests kan du købe på apoteket?

Forsøg III:

Antistoftest

I dette forsøg simuleres de situationer, hvor der tages en blodprøve på en patient, og hvor denne prøves serum testes for tilstedeværelsen af antistoffer, der kan indikere, at personen er smittet/har været smittet med en bestemt sygdom. Testen bruges således efter selve infektionen, efter at det ikke længere er muligt direkte at spore antigenet. Indtil for nylig blev testen brugt i forbindelse med AIDS, da det tidligere ikke var muligt at teste direkte for HIV-virus, men kun for de antistoffer, patienten havde produceret.

Timeforbrug:

1. lektion
2. lektion

Indledning
ELISA øvelsen udføres

Oplæg og diskussion

Beskrivelse af Forsøg III – trin for trin

Trin 1: Med en pipette overføres 50 µL oprenset sygdomsantigen (simuleret) til mikrotiterpladens brønde. Der inkuberes i 5 minutter, hvorved antigenerne får mulighed for at binde sig til plastikbrøndenes inderside. Efterfølgende vaskes ikke-bundet antigen i brøndene væk med vaskebuffer. Vaskebufferen indeholder desuden et detergent, der binder sig til ikke optagne bindingssteder i brøndene.

Trin 2: Serumprøver og positive og negative kontroller tilsættes nu til de respektive mærkede brønde, og der inkuberes i 5 minutter. I dette forsøg er serumprøverne i virkeligheden primært antistof, som altså skal forestille at være primært antistof fra patienternes blod. Hvis der er antistof mod den pågældende sygdom i prøven, vil disse binde til de antigener, der allerede er bundet til brøndene. Efterfølgende renses brøndene atter, denne gang for overskydende ikke-bundet antistof.

Trin 3: Peberrod peroxidase (Horseradish peroxidase (HRP))-mærket sekundært antistof tilsættes til brøndene, og der inkuberes i 5 minutter ved stuetemperatur. Det sekundære antistof er et antistof, der genkender og binder til det primære antistof. I dette forsøg repræsenterer det sekundære antistof et anti-humant antistof (fremstilles oftest ved at indsprøjte antistof i fx kaniner, der derefter producerer antihumant-antistoffet).

HRP er et enzym, der oxiderer substratet, hvorved der dannes farve. Brøndene vaskes for at fjerne ubundet overskydende sekundært antistof.

Trin 4: Enzym-substratet tilsættes til brøndene, og der ses en farvereaktion. Såfremt HRP er til stede (dvs. at antistoffet mod det oprensede antigen var til stede i serummet), vil opløsningen blive blå inden for 5 minutter. Hvis der ikke var noget antistof mod antigenet, vil indholdet i brøndene forblive farveløst.

Lærerens forberedelse - trin for trin

I denne vejledning lægges der op til, at der i alt er 12 grupper med 4 elever i hver. Dette kan naturligvis tilpasses efter egne behov.

Bemærk: Det sekundære antistof kan først klargøres, når der er mindre end 24 timer til forsøgets start.

1. Fremstilling af buffere

a. Fremstilling af 10 ml 1x PBS: Tilsæt 10mL 10x PBS til 90 mL demineraliseret vand. Mærk flasken "PBS 1x".

Denne PBS skal bruges til at opløse alle de frysetørrede reagenser i trin 2 samt til fortynding af ANTIGEN i trin 3.

b. Fremstilling af 900 mL PBS-vaskebuffer: Bland 805 mL demineraliseret vand med 90 mL 10x PBS samt 4,5 mL 10 % Tween20. Mærk flasken: "PBS-vaskebuffer".

PBS-vaskebuffer bruges til at fortynde PRIMÆRT og SEKUNDÆRT antistof i trin 3.

2. Opløsning af frysetørret antigen, samt primært antistof og sekundært antistof:

a. Opløsning af antigen og antistoffer i 1x PBS: Fjern forsigtigt propperne på de frysetørrede reagenser og brug en mikropipette til at tilsætte 0,5 mL 1x PBS til hvert glas.

HUSK at skifte spids for hver ny opløsning! Luk og bland grundigt.

Disse opløsninger er nu **50x koncentrat**.

Bemærk: Brug **ikke** vaskebuffer her.

3. Fortynding af reagenser.

a. Fortynding af det opløste antigen til 1x i 25 mL PBS. Mærk en 30 mL's flaske "1x antigen" og tilsæt 24,5 mL 1xPBS til flasken. Brug en ny pipettespids og tilsæt indholdet af det opløste ANTIGEN til

flasken. Brug noget af PBS'en til at "skylle" ANTIGENet effektivt ud af det lille glas. Luk flasken og ryst grundigt.

Bemærk: Tilsæt **under ingen omstændigheder** vaskebuffer til antigenet, da indholdet af Tween20 vil ødelægge forsøget!!

b. Fortynding af det primære antistof med PBS-vaskebuffer. Mærk en 30 mL's flaske "1x primært antistof" og tilsæt 24,5 mL PBS-vaskebuffer til flasken. Brug en ny pipettespids og overfør det opløste PRIMÆRE ANTISTOF til flasken. Brug pipetten til at rense antistof-glasset efter med noget af det fortyndede antistof, så der er sikkerhed for, at alt er kommet med. Luk flasken og ryst grundigt.

c. Fortynding af det sekundære antistof med PBS-vaskebuffer. Mærk en 30 mL's flaske "1x sekundært antistof" og tilsæt 24,5 mL PBS-vaskebuffer til flasken. Brug en ny pipettespids og overfør det opløste SEKUNDÆRE ANTISTOF til flasken. Brug pipetten til at rense antistof-glasset efter med noget af det fortyndede antistof, så der er sikkerhed for, at alt er kommet med. Luk flasken og ryst grundigt.

Bemærk: Vær opmærksom på, at dette punkt skal udføres, når der er **mindre end 24 timer** til forsøgets start

HUSK! – I punkt b mærkes flasken "1x serum"!

4. Fordeling af reagenser til eleverne/grupperne

a. Fordeling af positive kontroller. Mærk 12 violette rør med "+" og tilsæt 0,5 mL "1x serum" til hvert rør

b. Fordeling af negative kontroller: Mærk 12 blå rør med "-" og tilsæt 0,5 mL vaskebuffer til hvert rør.

c. Fordeling af antigen. Mærk 12 grønne rør "AG" og tilsæt 1,5 mL 1x antigenopløsning til hvert rør.

d. Fordeling af sekundært antistof. Mærk 12 orange rør "SA" og tilsæt 1,5 mL sekundært antistofopløsning til hvert rør.

e. Fordeling af enzymsubstrat. Mærk 12 brune rør "SUB" og tilsæt 1,5 mL HRP enzymsubstrat (TMB) til hvert rør.

Bemærk: TMB er lysfølsomt, hvorfor det er **vigtigt** at bruge mørke rør til opbevaring af dette reagens.

f. Fordeling af primært antistof (simulerede serumprøver). Det anbefales at halvdelen af eleverne får prøver, der testes positive og den anden halvdel får prøver, der testes negative. Fremstil et prøverør pr. elev i klassen. De rør, der indeholder positive prøver, fyldes med 0,25 mL 1x serum opløsning, - de rør, der indeholder negative prøver fyldes med 0,25 mL vaskebuffer. Bland rørene, før de gives til eleverne. Nummerer eventuelt og noter, hvilke numre der er "syge" = facitliste.

Tjekliste – Materialer pr. gruppe.

Gule rør	4 (1 pr. elev)
Violet rør (+)	1
Blåt rør (-)	1
Grønt rør (AG)	1
Orange rør (SA)	1
Brunt rør (SUB)	1
12-brønds mikrotiteterpladestrip	2
Mikropipetter 20-200 µL	1
Gule pipettespidser	20
Engangsplastikpipetter	5
70-80 mL PBS-vaskebuffer	1
Papirhåndklæder/køkkenrulle	
Sort markeringstusch	

Elevguide - Forsøg III:

Antistoftest

I dette forsøg simuleres de situationer, hvor der tages en blodprøve på en patient og hvor denne prøves serum testes for tilstedeværelsen af antistoffer, der kan indikere, om personen er smittet/har været smittet med en bestemt sygdom. Testen bruges således efter selve infektionen, efter at det ikke længere er muligt direkte at spore antigenet. Indtil for nylig blev testen brugt i forbindelse med AIDS, da det tidligere ikke var muligt at teste direkte for HIV-virus, men kun for de antistoffer patienten havde produceret.

Tjekliste – Materialer pr. gruppe.

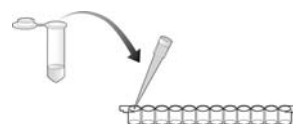
Gule rør	4 (1 pr. elev)
Violet rør (+)	1
Blåt rør (-)	1
Grønt rør (AG)	1
Orange rør (SA)	1
Brunt rør (SUB)	1
12-brønds mikrotiteterpladestrip	2
Mikropipetter 20-200 μL	1
Gule pipettespidser	20
Engangsplastikpipetter	5
70-80 mL PBS-vaskebuffer	1
Papirhåndklæder/køkkenrulle	
Sort markeringstusch	

1. I de gule rør er der serumprøver, der nu skal testes for tilstedeværelse af et bestemt antistof. Mærk det rør du får med dine initialer.
2. Eleverne deler en brøndrække 2 og 2. Mærk de første 3 brønde med ”+”, de næste tre med ”-” og de næste tre med den ene elevs initialer og de sidste 3 brønde med den anden elevs initialer.



Tilsætning af oprenset antigen til brøndene:

3. Med en pipette overføres der nu 50 μL oprenset antigen (AG) fra det grønne rør til hver af brøndene.
4. Lad opløsningen stå i brøndene i 5 minutter.

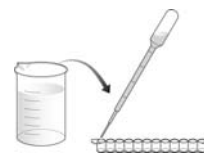


Ikke bundne antigener vaskes væk

5. Vask
 - Vend bunden i vejret på rækken med brøndene og lad overskydende væske suges ud på et stykke køkkenrulle. Dup op og ned et par gange.

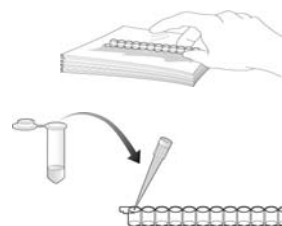


- Smid papiret væk.
- Tag en almindelig plastikpipette og fyld vaskebuffer i hver af brøndene.
- Tøm brøndene for væske som beskrevet i første underpunkt.
- Smid det benyttede køkkenrulle/papirhåndklæde ud.



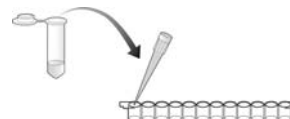
Tilsætning af kontrol- samt serumprøver

6. Med en NY pipettespids overføres 50 μ L positiv kontrol (+) fra det violette rør til de med ”+” mærkede brønde.



7. Med en NY pipettespids overføres 50 μ L negativ kontrol (-) fra det blå rør til de med ”-” mærkede brønde.

8. Med en NY pipettespids overføres 50 μ L fra din serum prøve til de tre brønde, der er mærket med dine initialer.



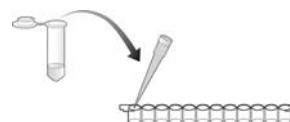
9. Vent 5 minutter, idet du lader serumantistofferne binde til antigenet.

10. Ikke bundne serumantistoffer vaskes væk. Gentag punkt 5.

VASK

Sekundært antistof tilsættes

11 Med en NY pipettespids overføres 50 μ L sekundært antistof (SA) fra det orange rør til hver af de 12 brønde i rækken.



12 Vent 5 minutter, mens det sekundære antistof bindes i brøndene.

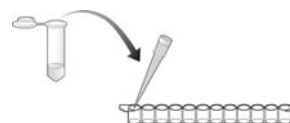
Overskydende antistof vaskes væk

13. Vask overskydende ikke bundet antistof væk, idet trin 5 gentages **to gange!**

VASK 2x

Det sekundære antistof er bundet til et enzym – peroxidase, som kemisk er i stand til at ændre enzymsubstratet fra farveløs til blå. Skriv ned i hvilke brønde, I forventer en farvereaktion.

14. Med en NY pipettespids overføres 50 μ L substrat (SUB) fra det brune rør til hver af de 12 brønde i rækken.



Observation af resultater

15 Vent 5 minutter. Noter resultatet.