

Forsøgsvejledning - ELISA

Immunforsvaret

ELISA forsøg – Koppe-virus udbrud på dansk gymnasium

Du befinder dig på et gymnasium hvor der er konstateret udbrud af koppe bland flere elever på mange klassetrin. Koppe-virus smitter, som du kan læse om i teoriafsnittet om virus og bakterier, ved dråbeinfektion. I fredags var der fest på skolen hvor du var med og delte drikkevarer med en masse af dine venner og generelt havde meget tæt omgang med en masse mennesker. Du har således været i kontakt med mange mennesker på en måde hvor sygdommen kan overføres. Er du blevet syg?

Er man blevet smittet med koppe-virus kan en vaccination inden for 2-3 dage modvirke udbrud af koppe-virus så det er derfor nødvendigt med en metode der hurtigt kan undersøge for koppe-virus. Da der kan være bivirkninger ved vaccinationen er det vigtigt at man ikke giver den til personer som ikke er smittede.

I dette forsøg skal din klasse "blande kropsvæsker", som er involverede i overførsel af sygdommen, og følgelig kontrollere hvem der er blevet smittet ved kontakt med hinanden. Herefter skal I forsøge, ved at afdække smittevejen, at finde frem til hvem der indførte sygdommen på skolen.

Prøver fra hver person bliver undersøgt med en ELISA test som du kan læse mere om i teoriafsnittet om immunkemiske metoder. I skal teste for tilstedeværelsen af antigener fra koppe-virus i jeres prøver og dette gøres ved at I anvender antigener fra "koppevirus" som er at finde i et test-kit I vil få udleveret fra jeres lærer.

ELISA forsøg til test af koppe-virus spredning

I dette forsøg skal I prøve at kortlægge smittevejene for koppe-virus. For at stoppe sygdommens fremmarch mest muligt, ønsker man at finde smitekilden.

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.

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
Engangspilastikpipetter	5
70-80 mL PBS-vaskebuffer	1
Papirhåndklæder/køkkenrulle	
Sort markeringstusch	

Beskrivelse af ELISA – trin for trin

Dette kits forsøgsprocedure bygger på indirekte antistof bundet ELISA som trin for trin beskrives således:

- a. Antigen tilsættes 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 uspecifik binding af antistoffer undgås.



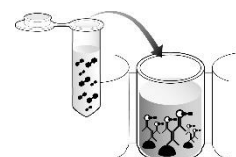
- b. Primært antistof tilsættes til brøndene, og der inkuberes, hvorved antistoffet bindes til antigenet. Ubundet primært antistof vaskes herefter væk med fosfatbuffer.



- c. 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.



- d. Der tilsættes farvende enzym-substrat til brøndene. Der inkuberes og farvereaktionen 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.

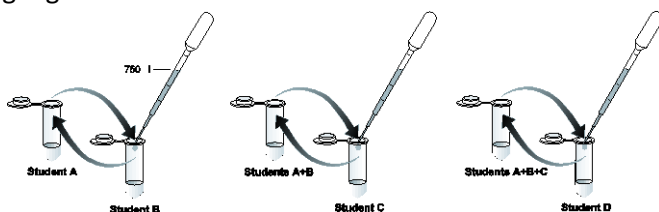


0. Generelle retningslinjer og forberedelser

- 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.
- Hver elev i gruppen mærker derefter en klar plastikpipette med sine initialer eller nummer – denne pipette skal bruges til at foretage blandingerne med

1. Blanding af "kropsvæsker"

- Find en anden elev i klassen, som du kan blande "kropsvæske" med. Overfør med pipetten den ene kropsvæske til den andens rør. Sørg for at blande godt. Derefter tager den ene elev halvdelen tilbage (halvdelen er ca. $750\mu\text{L}$). Noter hvem du delte "kropsvæske" med i første omgang.



Blandet med: _____ (1. blandingsrunde)

Blandet med: _____ (2. blandingsrunde)

Blandet med: _____ (3. blandingsrunde)

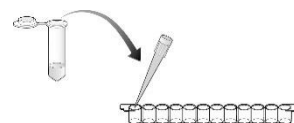
- Gentag blandingsprocessen med 2 andre elever fra klassen, således at du i alt har blandet "kropsvæske" med 3 og noter med hvem, du har blandet. Gå derefter til næste punkt, eller lad de blandede prøver stå i køleskabet til næste øvelsesgang.

2. ELISA testen udføres

- I arbejder nu to og to 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.



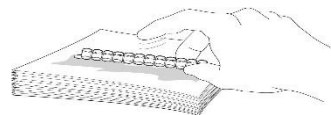
- Antigenerne tilsættes. Overfør $50\mu\text{L}$ fra den positive kontrol (+) i det violette rør til hver af de med "+" mærkede brønde. Skift pipettespids og overfør $50\mu\text{L}$ fra den negative kontrol (-) i det blå rør til hvert af de med "-" mærkede brønde. Skift pipettespids – og overfør nu $50\mu\text{L}$ af din prøve til hver af de brønde, der er mærket med dine initialer



- Vent 5 minutter mens antgenerne binder sig til brøndenes sider. Ryst jævnlgt flaskerne.

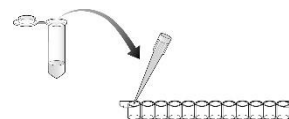
3. Ikke bundne antigener vaskes væk

- 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.
- 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



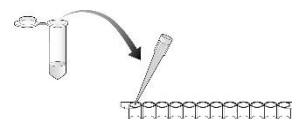
4. Tilsætning af primært antistof

- Med en NY pipettespids overføres der 50 µL primært antistof (PA) fra det grønne rør til hver af de 12 brønde
- Vent 5 minutter, mens antistofferne bindes
- Vask overskydende ikke bundet antistof væk ved at gentage punkt 8



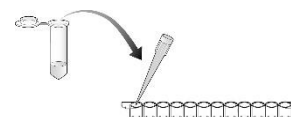
5. Tilsætning af sekundært antistof

- Med en NY pipettespids overføres 50 µL sekundært antistof (SA) fra det orange rør til hver af de 12 brønde i rækken.
- Vent 5 minutter, mens det sekundære antistof bindes i brøndene
- Vask overskydende ikke bundet antistof væk, idet trin 8 gentages **to gange!**



6. Tilsætning af substrat

- 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.
- Med en NY pipettespids overføres 50 µL substrat (SUB) fra det brune rør til hver af de 12 brønde i rækken
- Vent 5 minutter og noter resultatet.



Databehandling og analyse

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

Spørgsmål

- 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?