

Lærervejledning – Forsøg med ELISA

Immunforsvaret

Introduktion

Denne øvelse tager udgangspunkt i anvendelsen af ELISA immuno explorer kit fra BIO-RAD, katalognummer 166-2400EDU. Øvelsesvejledningen knytter sig til Biotech Academy projektet ”Immunforsvaret” som kan findes på www.biotechacademy.dk.

Kittet skal bestilles fra Bio-Rad for at forsøget kan udføres: [Kittet kan købes her](#)

Kittet 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 det teoretiske undervisningsmateriale, 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: www.Bio-Rad.com.

Der er mulighed for at udføre 3 forskellige forsøg med ELISA med dette kit men det er kun det ene (I) der er designet til dette Biotech Academy undervisningsmateriale med direkte relationer til det teoretiske materiale.

Hvis du har spørgsmål af enhver art til øvelsen, er du meget velkommen til at skrive en mail til biotech@bio.dtu.dk med dit spørgsmål. Så vil vi forsøge at hjælpe bedst muligt, hurtigst muligt.

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.

I det følgende gives en liste over apparatur og kemikalier samt andre redskaber, som skal anvendes under forsøget.

Materialer

ELISA immuno explorer kit fra BIO-RAD. Katalognummer 166-2400EDU

Kittet indeholder:

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 mikrocentrifugerør	1 pose
Farvede 2 mL's mikrocentrifugerør (15 af hver farve)	1 pose

Bemærk at alle reagenser skal stå på køl!

Andet 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 mikrocentrifugerørene

Lærereens forberedelse – trin for trin

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 100 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. Den "inficerede kropsvæske" 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.

Sikkerhedskrav

Generelt almindelige laboratorieregler.