

Lærervejledning – Forsøg med dobbelt diffusionstest

Immunforsvaret

Introduktion

Æg bruges i mange fødevarer som f.eks. hamburger, pasta og mange is-typer. Mange er allergiske overfor æg- selv i meget små mængder. Det er muligt at spore minimale mængder af både blomme og hvide ved at bruge æg-albumin-antistof. Den metode, der bruges her, er dobbelt immundiffusion.

Princippet i en immundiffusion er, at der sker en udfældningsreaktion (præcipitation), når et antigen møder et tilsvarende antistof. Ved at lade udfældningen ske i en gel, kan udfældningen ses som udfældningslinier eller buer hvor antigen og tilsvarende antistof mødes. Herved kan man teste for enkeltstoffer i forskellige blandinger (som f.eks. ovennævnte fødevarer).

Udfældningerne sker, fordi antigen og antistof har mere end et bindingssted. Derved dannes der store sammenfiltrede (cross-linked) udfældninger i de zoner, hvor de mødes. Der skal være et passende forhold mellem mængden af antigen og antistof for at danne en tydelig udfældningsreaktion.

Dobbelt-immundiffusion er meget specifik og følsom og benyttes nu til diagnoser, proteintests samt sammenligning af antigen og antistof.

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.

Formålet med forsøget er, at teste forskellige fødevarer for indhold af æg-albumin.

Eleverne kan forestille sig, at de har været til en fest hvor en af deres klassekammerater pludseligt får fødevareallergi-symptomer og kommer på hospitalet. Denne person bliver her testet for diverse allergier og der konstateres æg-albumin allergi. Eleverne i klassen skal herefter forsøge at hjælpe deres kammerat ved at finde ud af hvilke fødevarer, der indeholder æg-albumin.

Tidsforbrug

1. dag: 60 minutter plus natten over indtil der måtte være dannet linier/buer og så ca. 20 minutter til resultattest.

En eventuel farvning af præparatet tager yderligere 2t og 45min.

Apparatur

- Centrifuge
- Lille blender

Kemikalier og andre redskaber

- Agaroseopløsning (1% i TRIS-buffer)
- Eddikesyre (konc.)
- Eppendorfrør
- Filterpapir
- Fugtkammer til opbevaring af objektglas (f.eks. petriskål med fugtet filterpapir)
- Kanin-antiserum mod æg-albumin (Pharmacia AS-23)
- Methanol
- Mikropipetter: 0-10 ml
- NaCl (0,9% opløsning)
- Objektglas eller små petriskåle (5cm i diameter)
- Referenceopløsning (0,01% æggehvide opløst i ionbyttet vand)
- Tilskårne plastikpipetter (2,5mm i diameter) til brøndudstikning
- TRIS-buffer 0,01M, pH 8

Kemikalier og andre redskaber hvis præparaterne skal farves

- Coomassie Brilliant Blue G250 opløsning
- Affarver (edikesyre, methanol og ionbyttet vand i forholdet 10:70:20)
- Farveglas til gelfarvning
- Hårtørrer
- Vægt, max. 1kg

Sikkerhedskrav

Der stilles ingen særlige sikkerhedskrav.

Noter

Brøndmønster

det er nødvendigt at udstikke brøndene i et regulært mønster- se elevvejledning. Start ved kanten af gelen, så der eventuelt kan blive plads til flere tests på samme plade. Brug et sugerør eller en tilskåret plastikpipette til at udstikke brøndene.

Der dannes hurtigere udfældninger, hvis afstanden mellem brøndene er lille: 5mm afstand vil vise resultater efter ca. 24 timer mens afstand på 10mm vil vise resultater efter 48 timer.

Efter første dag

Hvis der benyttes objektglas og det er varmt i laboratoriet, må objektglassene opbevares fugtigt, f.eks. i en lukket petriskål med et fugtet filterpapir. Skal de opbevares i flere dage, anbefales det at tilsætte papiret en smule konserveringsmiddel (f.eks. Atamon) for at hæmme skimmeldannelse. Pas på ikke at skade gelen.

Objektglassene er klare efter et døgn, men kan opbevares op til en uge i køleskab.

Referenceopløsning

Da det kan være vanskeligt at lave referenceopløsningen, kan det være en god ide først at piske lidt æggehvite; det flydende herfra kan anvendes hertil.

Æg-albumin antistof

Frysetørret antistof opløses i TRIS-buffer; vejledning hertil følger med det leverede antistof. Den afmålte opløsning placeres i eppendorfrør, som opbevares i fryseren.

Affald

Alt affald skal behandles som almindeligt affald.

Farvning

Det er ikke nødvendigt at farve præparaterne, men det kan hjælpe til at se resultaterne tydeligere. Coomassie brilliant Blue-G250 kan anvendes til dette formål og kan købes i mange større kemikalievirksomheder.