

## Forsøgsvejledning – Dobbelt immundiffusionstest

# Immunforsvaret

## Introduktion

For et par dage siden var din klasse til fødselsdagsfest med fin middag og alt hvad der dertil hører. Til dessert blev der serveret en lækker chokolademousse som de fleste af jer spiste med stor fornøjelse.

Men lige pludseligt bliver en af dine klassekammerater utilpas og hæver kraftigt op i svælget og får derved vejrtrækningsproblemer. Personen bliver straks kørt på hospitalet og senere bliver det her konkluderet, at personen lider af allergi overfor æg.

Allergi overfor æg er blot en af de fødevareallergier mange danskere lider af. Fødevareallergi vil, ved kontakt med de indholdsstoffer som man ikke kan tåle, udløse en reaktion der kan have forskellige symptomer som kløe på hud og i øjne, astmasymptomer samt kraftige mavesmerter med opkast og diarré i slemme tilfælde.

Der findes utroligt mange fødevarer der indeholder bestanddele fra æg og det er ikke altid helt åbenlyst hvilke det drejer sig om.

I denne øvelse skal du derfor teste forskellige fødevarer for indhold af æg så din stakkels klassekammerat ved med sikkerhed, hvad der kan spises og hvad der bør udelades.

Metoden du skal anvende, er dobbelt immundiffusion, som er beskrevet i afsnittet om immunkemiske metoder. Her vil du anvende antistoffer overfor æg og direkte teste forskellige fødevarer på en agarose gel hvor antistofferne og antigenerne vil have mulighed for at diffundere mod hinanden og danne en udfældningslinje.

### Dobbelt immundiffusionstest for fødevarers indhold af æg

Allergi overfor æg er blot en af de fødevareallergier mange danskere lider af. Fødevareallergi vil, ved kontakt med de indholdsstoffer som man ikke kan tåle, udløse en reaktion der kan have forskellige symptomer som kløe på hud og i øjne, astmasymptomer samt kraftige mavesmerter med opkast og diarré i slemme tilfælde.

Der findes utroligt mange fødevarer der indeholder bestanddele fra æg og det er ikke altid helt åbenlyst hvilke det drejer sig om.

I denne øvelse skal du derfor teste forskellige fødevarer for indhold af æg så din stakkels klassekammerat ved med sikkerhed, hvad der kan spises og hvad der bør udelades.

Metoden du skal anvende, er dobbelt immundiffusion, som er beskrevet i afsnittet om immunkemiske metoder i Biotech Academy projektet "Immunforsvaret". Her vil du anvende antistoffer overfor æg og direkte teste forskellige fødevarer på en agarose gel hvor antistofferne og antigenerne vil have mulighed for at diffundere mod hinanden og danne en udfældningslinje.

## Sikkerhed

Brug beskyttelsesbriller og laboratoriekittel.

Forsøget **Dobbelt immundiffusionstest** inkluderer eddikesyre og methanol. Eddikesyre og methanol er brandfarligt. Brug handsker når eddikesyre og methanol håndteres. Ved hudkontakt af disse materialer, skyl straks med vand. Ved kontakt i øjet af disse materialet, skyl straks øjet med vand i mindst 15 minutter (fjern eventuelle kontaktlinser) og kontakt læge og Giftlinjen på 82121212. Ved indtagelse af disse materialer, ring STRAKS til Giftlinjen på 82121212.

## Fremgangsmåde

### 1. Tilberedning af prøver

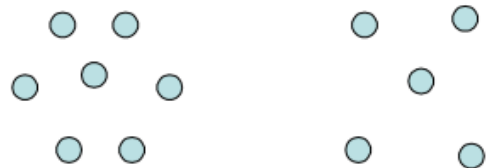
- 5g prøve i 5mL vand blendes grundigt
- Hver Centrifuger blandingen i 15 min ved 6000 omdrejninger/min (eller 10min ved 9500 omdrejninger/min)
- Filtrere supernatanten gennem et stykke stof ned i et reagensglas

### 2. Gelstøbning

- Opløs under opvarmning og omrøring den nøjagtige mængde agarose i TRIS-buffer (1%). Til en 5cm petriskål bruges 3-5 mL og til objektglas 3.5 mL. PAS PÅ- DET KOGER LET!
- Afkøl til 60-80°
- Placer petriskål/objektglas på et bord tæt på kanten og fjern låget
- Hæld den varme gel i petriskålen/objektglasset så den får en højde på ca. 2mm og tildæk
- Lad gelen størkne- det tager 5-10 min

### 3. Udstik brøndene

- Brug den tildannede plastikpipette til at udstikke brøndene med en diameter på ca. 2.5mm. Brøndsiderne skal være lodrette! Fjern den udstukne gel ved hjælp af en nål eller sug med pipetten. Lav et af disse brøndmønstre:



### 4. Tilsæt antistof

- Nummerer brøndene med en spritpen på undersiden af glasset/skålen
- Fyld brønden i midten med antistof (anti-æg-albumin). OVERFYLD IKKE BRØNDEN!

### 5. Tilsæt antigen

- Fyld hver anden af de ydre brønde med antigen. OVERFYLD IKKE BRØNDENE!
- Fyld de resterende brønde med dine prøver. Noter hvilke prøver der er i de forskellige brønde. OVERFYLD IKKE BRØNDENE!

*Lad væsken diffundere gennem gelen natten over i fugtkammeret, enten ved stuetemperatur eller i køleskabet*

- Dagen efter kan du iagttage de hvide linjer/buer (udfældningszoner i positive tilfælde), når du holder skålene/glassene mod en mørk baggrund

Side 2 af 3

## 6. Farvning (hvis ønsket)

- Fjern de ikke-udfældede proteiner ved at placere gelen i en 0.9% NaCl-opløsning i 60 min ved stuetemperatur.
- Erstat saltopløsningen med ionbyttet vand og lad det trække i endnu 60 min
- Fjern vandet og pres resten af vandet ud på følgende måde: læg 10 lag filterpapir forsigtigt oven på gelen og læg max 1kg pres på i 15 min
- Tør gelen med en hårtørrer
- Dæk gelen med en farveopløsning i ca. 10 min
- Fjern farveopløsningen og affarv overskudsfarve med affarveopløsningen i 10 min. Gentag evt. affarvningsprocessen.

## 7. Aflæsning

Målegrænsen for æggehvite er 2.5mg i 100g prøve. Hvis der er nok kyllingeprotein i prøven, kan du iagttage udfældninger. Æggeblomme indeholder æggehvideproteiner nok til, at udfældning også er mulig.

## Rapportering

Her ses forslag til spørgsmål, der kan danne baggrund for en skriftlig rapport, hørende til forsøget.

**Formål-** Hvad er formålet med at udføre forsøget?

**Teori-** Beskriv teorien bag dobbelt immundiffusion og heri også grundlæggende teori om antigener og antistoffers interaktion. Kom også ind på indhold af æg i fødevarer.

**Metode-** Beskriv hovedpunkterne forsøgsgangen til dobbelt immundiffusion- gå ikke i detaljer.

**Resultater-** Hvad er du kommet frem til?

**Diskussion-** Stemmer dit forsøg overens med de anvendte kontroller?

Hvis ikke så beskriv hvad der kan være galt.

Hvor kommer æg-indholdet fra i de testede fødevarer?

Hvad er fejlkilderne i dette forsøg?

Hvilket immunologisk-baseret forsøg kunne du ellers have anvendt til at teste dine prøver? Begrund dit svar.