

Foto: Bioresurs

# Fagocytos av jäst

## Lärarhandledning

I denna laboration studerar vi hur de egna neutrofila granulocyterna äter jästceller. På motsvarande sätt går det till i kroppen när dessa celler oskadliggör angripande bakterier.

### Säkerhet

Tänk på att laborationer med blod kan innebära smittorisk. Det är självklart frivilligt att sticka sig. Elever som bär på blodsmitta får inte sticka sig. Var noga med att alltid sitta ner när blodprov tas på grund av svimningsrisk. Undvik att komma i kontakt med annan persons blod. Eleverna ska själva ta hand om sitt blodkontaminerade material. Se till att en säker behållare finns tillgänglig för att kasta blodkontaminerat material som blodlancetter, bomullstussar mm. Använd helst plastbelagt papper som underlag när blodet hanteras.

Se vidare den anvisning om blodlaborationer som utarbetats av Nationellt resurscentrum för biologi och bioteknik, [www.bioresurs.uu.se](http://www.bioresurs.uu.se), Säkerhet.

### Material

- säkerhetsbehållare för blodkontaminerat material
- märkpenna
- objektglas (nytt och rent), täckglas, mikroskop
- autoklick för blodprov, plåster
- centrifug för eppendorfrör
- Krebs-Ringer-lösning (KRG-lösning)
- fuktkammare, 37 °C
- värmeskåp, 37 °C
- ”rullar” av filterpapper
- jästsuspension
- humant serum, 2 ml (inköp t.ex. Sigma-Aldrich)
- ett paket färsk jäst
- plastpipetter, 3 ml
- tandpetare eller gul pipettspets
- 10 ml rör eller eppendorfrör till centrifugering

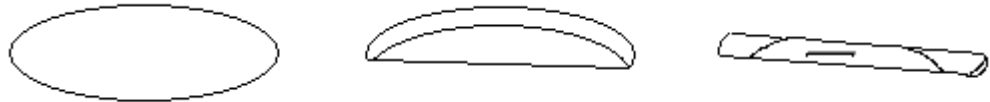
### Lärarens förberedelse

1. Se till att det finns säkerhetsbehållare för blodkontaminerat material. Förbered eleverna genom att noga gå igenom hur man handskas säkert med blod. Se ovan rubrik Säkerhet.
2. Bered 500 ml KRG-lösning enligt följande (Krebs-Ringer, med glukos,  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7,3):  
115 mM NaCl, 5,9 mM KCl, 1,2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1,2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ ,  
2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM glukos, 1,2 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   
Förvara lösningen i kylskåp. Inför laborationen ställs lösningen i värmeskåp 37 °C.



- Humant serum kan frysas i eppendorfrör (ca 2ml/rör) och tinas vid starten av laborationen.
- Ställ in värmeskåpet på 37 °C och placera en bägare med vatten + termometer i skåpet.
- Förbered en fuktkammare per elevgrupp genom att placera ett fuktat filterpapper i varje petriskål och lägga ett objektglas på botten. Sätt på locket. Ställ in fuktkamrarna i värmeskåpet innan laborationen startar (fig. 3).
- Förbered rullar av filterpapper genom att vika filterpapper upprepade gånger och häfta ihop på mitten.

*Ett rullat och vikt filterpapper med häftklammer mitt på är ett utmärkt torkredskap*



- Tvättning av jätten kan göras som demonstration enligt nedan, alternativt förberedas.
- Häll ca 25 ml KRG/grupp i 50 ml bägare (så sent som möjligt för att hindra avdunstning).

## Instruktioner till elevgruppen

Berätta kort om laborationen och informera om risken för blodsmitta. Visa eleverna följande moment:

- Ta ett nytt, rent objektglas (inga fingeravtryck), fuktkammare (skriv namn på locket), autoklick och plåster. Lägg objektglaset på bordet och sätt dig på en stol framför.

fig 1



fig 2

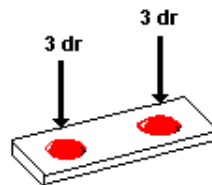
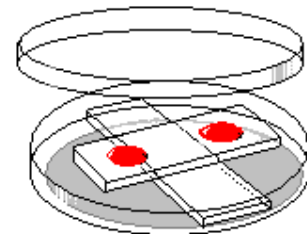


fig 3



- Stick hål i lång-/ringfingertoppens sida (fig 1), där det finns mest blodkärl och minst känsel.

Låt armen hänga ner längs kroppen så att blodet rinner till bättre. När du ser att blod kommer fram sätter du en droppe på glaset. Låt armen hänga igen, sätt sedan en droppe till på samma ställe, låt armen hänga igen och sätt ytterligare en droppe på samma ställe. Fortsätt på samma vis så att tre droppar blod sätts på nytt ställe på samma objektglas (fig2). Om blodet inte räcker till två fläckar är det bättre att göra en stor. Sätt på plåster.

Lägg förbrukad autoklick i säkerhetskärl.

Lägg objektglaset med blodet tvärs över det andra objektglaset i fuktkammaren (fig 3). Sätt genast på locket och ställ in fuktkammaren i värmeskåpet. Inkubera ca 25 min.

Under inkuberingen faller de neutrofila granulocyterna ner på glaset och fäster till ytan. Dessutom koagulerar blodet. De röda blodkropparna fångas i ett nät av fibrintrådar.

Nu kan eleverna göra samma moment.



3. Under inkubationstiden kan man visa hur man tvättar jäst:  
Cirka 1-2 mm<sup>3</sup> jäst suspenderas med hjälp av plastpipett i 5 ml KRG.  
Centrifugera 5 min (1 000 rpm). (Om eppendorfcentrifug används delas lösningen på flera rör.)  
Kasta lösningen och resuspendera pelleten i 6 ml KRG + 2ml serum.  
Håll 0,5 ml färdig jästsuspension per labgrupp i eppendorfrör.
4. Ställ fram en bägare med KRG (37 °C), två plastpipetter, ”rullar” av filterpapper, tandpetare/gula pipettspetsar och jästsuspensionen.
5. När inkuberingen är klar hämtas fuktkammaren, objektglaset lyfts ur och locket läggs tillbaka. Blodkoaglet lossas genom att man skrapar runt kanten med en tandpetare eller gul pipettspets. Byt pipettspets/tandpetare mellan de båda blodfläckarna. Koaglet samlas upp på ett papper som kastas i säkerhetsbägaren.
6. Håll därefter objektglaset snett över vasken, sug upp KRG i pipetten och skölj försiktigt bort det mesta av blodkoaglet genom att spruta på glaset ovanför cellerna. (Skölj inte för mycket, det gör inget om lite blodkoagel finns kvar.)  
Torka undersidan med papper och lägg objektglaset på bänken. Använd ändarna på ”rullen” av filterpapper för att torka bort KRG på glaset utanför cellfläckarna. OBS! Cellerna får inte torka!  
Tillsätt slutligen två droppar KRG till den ena cellfläcken och två droppar jästsuspension till den andra cellfläcken. Om man endast har en cellfläck ska man inkubera den med jästceller. Lägg tillbaka objektglaset i fuktkammaren och inkubera ytterligare ca 25 min i värmeskåpet.  
Släng tandpetaren eller pipettspetsen och annat skräp som kontaminerats med blod i säkerhetsbehållaren. Nu kan eleverna göra samma moment.  
Under denna andra inkubering sker själva fagocytosen.
7. Under väntetiden kan eleverna ta fram mikroskop, studera jästcellerna samt rita av vad de ser. Tiden kan också användas för att studera vilken betydelse serum har för fagocytosen. Rita gärna en bild på tavlan och beskriv komplementets betydelse vid fagocytos eller låt eleverna läsa en lämplig text som beskriver komplementets förmåga att bilda membran-attack-komplex som gör hål i bakterier. Se fig. nästa sida.
8. När inkuberingen är klar sköljer man försiktigt cellerna med KRG. Torka gärna runt fläckarna som tidigare. Se till att varje cellfläck har en extra droppe KRG och lägg på täckglas. Torka undersidan av glaset så att det inte ”fastnar” i mikroskopet.
9. Eleverna kan nu studera cellerna i mikroskop. Det kan vara svårt för eleverna att förstå vad de ska leta efter. Därför är det viktigt att de som lyckats bra visar sina celler för andra. Eleverna ritade både celler som ätit jäst och kontrollceller. Ibland kan de även se röda blodkroppar och fibrintrådar i preparatet.

Se även:

- Elevinstruktionen ”Fagocytos”
- Artikeln ”spana in ditt eget immunförsvar” i Bi-lagan nr 3/06
- Artikeln Blodlaborationer i skolan, Bi-lagan nr 1 mars 2013
- Resurscentrums hemsida under Säkerhet (Arbete med blod)

*Laborationen har utarbetats av Åsa Wälan, Berzeliusskolan, Linköping, och reviderats 2015 av Brittmari Lidesten, Nationellt resurscentrum för biologi och bioteknik.*



Bilden visar hur neutrofila granulocyter lämnar blodbanan för att angripa fienden.

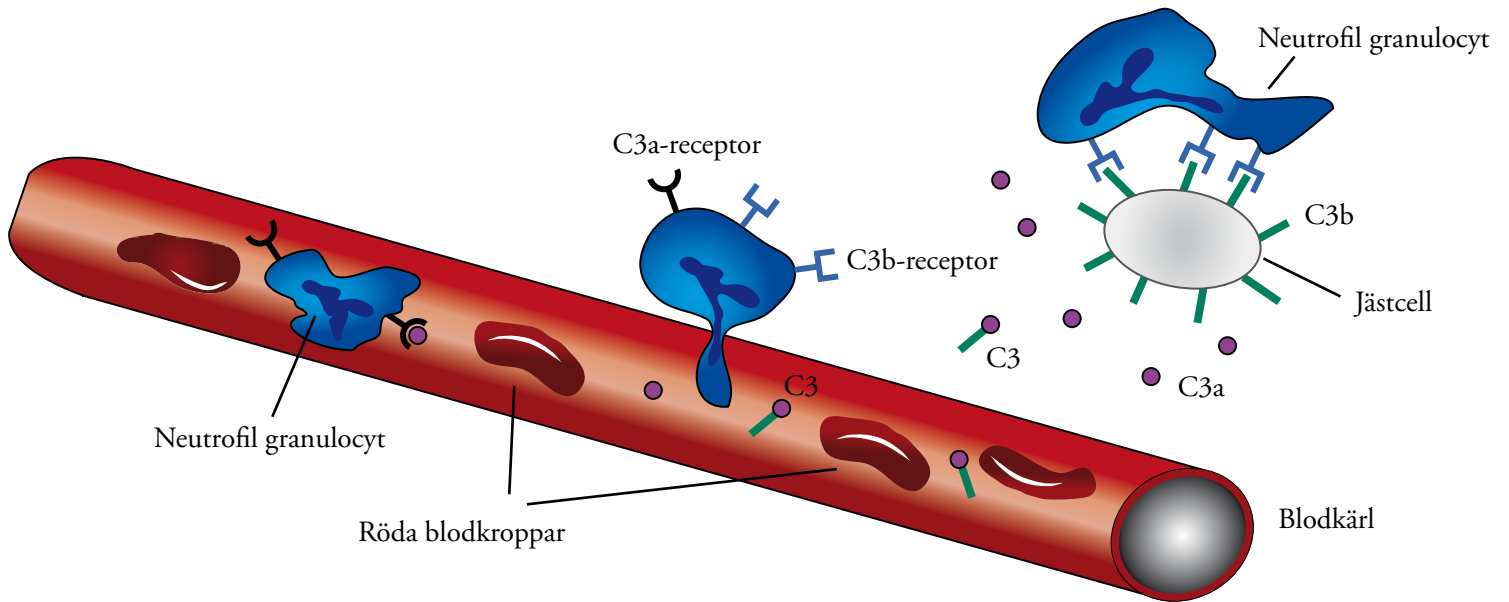


Illustration: Anna Maria Wremp

*Komplementfaktor C3 har läckt ut i vävnaden och aktiveras när den binder till jästcellen. Vid aktiveringen klyvs C3 i två delar, a och b. Den lilla delen (C3a) är en signalmolekyl som lockar till sig neutrofila granulocyter genom att binda till deras C3a-receptorer.*

*Den stora delen (C3b) binds till jästcellernas yta och underlättar fagocytosen genom att utgöra en bra fästpunkt för granulocyten C3b-receptorer.*