



# Hur man spårar ägg i mat

Allergier mot ämnen i mat ökar bland barn och ungdomar. Vissa personer reagerar mycket kraftigt på små mängder av specifika ämnen i maten – det kan räcka med att det finns spår av t.ex. nötter i maten för att en ögonblicklig allergisk reaktion ska ske. Följden blir ett snabbt blodtrycksfall, som i tragiska fall kan leda till att personen dör.

I dag finns det så känsliga analysmetoder att även mycket små mängder av ett allergiframkallande ämne kan upptäckas.

I denna laboration används en metod som kallas dubbel immunodiffusion. Antikroppar och ett extrakt av det som ska undersökas får diffundera mot varandra i en agarosgel. Om extraktet innehåller ett antigen som passar till antikroppen bildas en fällning i form av en linje där antigen och antikropp möts.

Syftet med laborationen är att påvisa äggalbumin i olika maträtter med hjälp av dubbel immunodiffusion, samt att teoretiskt studera antikropp–antigenreaktioner och de medicinska konsekvenserna av dessa reaktioner.

**Tidsåtgång** Laborationen tar ca 60 minuter. Avläsning görs efter ca två dygn.

**Säkerhet** Undvik att andas in Tris i pulverform. Använd skydd över näsa och mun samt skyddshandskar vid beredning av lösning.

**Materiel**

- bägare,
- objektglas eller små petriskålar (5 cm i diameter),
- plastpipett eller sugrör (diameter ca 2,5 mm),
- mikropipetter (10 µl),
- fuktkammare för objektglasen (t.ex. en plastlåda med fuktad Wettexduk eller hushållspapper),
- homogenisator eller mortel,
- centrifug,
- 0,01 mol/dm<sup>3</sup> Tris-buffert (pH 8,0): Lös beräknad massa Tris i avjonat vatten. Justera pH med HCl eller NaOH. Förvaras i kylskåp.
- agaroslösning (1% agaros löst i Tris-buffert),
- referenslösning (0,01 % äggvita löst i avjonat vatten). Vispa först äggvitan en kort stund och använd därefter lite av den äggvita som fortfarande är flytande till referenslösningen.
- kaninantiserum mot äggalbumin,
- någon produkt som ska undersökas, t.ex. bröd, kokosboll, glass, sockerkaka eller hamburgare. Prova även att identifiera eventuellt innehåll av ägg i färdiga pulvermixer av t.ex. sockerkaka, petit-chou, eller våfflor.



## Utförande Provberedning

- 1 Homogenisera ca 5 g prov i 5 cm<sup>3</sup> vatten. Det kan behövas något mer vatten beroende på den substans som ska undersökas.
- 2 Centrifugera det homogeniserade provet i 15 min vid 6 000 rpm (eller i 10 min vid 9 500 rpm).
- 3 Filtrera supernatanten genom ett filter ned i ett rent provrör.

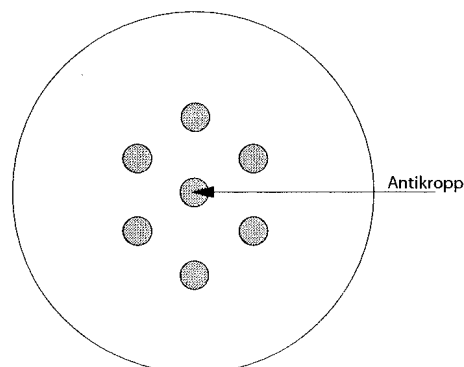
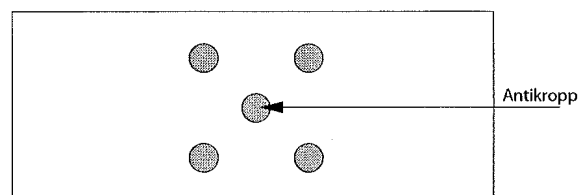
## Gjutning av gel

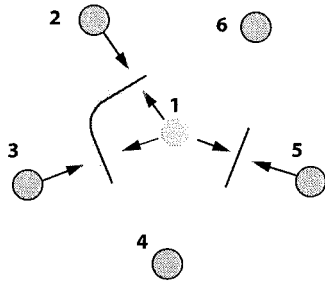
Till en liten petriskål går det åt 5 cm<sup>3</sup> agaroslösning och till ett objektglas 3,5 cm<sup>3</sup>.

- 4 Lös agaros i Tris-buffert (masshalten agaros ska vara 1 %) under uppvärmning och blanda försiktigt så att det inte bildas luftbubblor. Mikrovågsugn kan användas, men agaroslösningen kokar mycket lätt över.
- 5 Låt lösningen svalna till 60–80 °C.
- 6 Ställ petriskålarna eller lägg objektglasen på en jämn yta. Lyft av locken på skålarna.
- 7 Håll den varma gelen i skålarna eller på objektglasen. Gelskiktet ska bli 2–3 mm tjockt. Ytspänningen hindrar agaroslösningen från att rinna över kanten på objektglaset.
- 8 Låt gelen stelna i ca 5–10 min.

## Utstansning av brunnar samt påsättning av prov och antikroppar

- 9 Små brunnar stansas ut i gelen genom att suga upp gelpluggen med hjälp av pipett eller sugrör. Se till att brunnarna får jämna och lodräta sidor. Brunnarna ska bilda något av nedanstående mönster. (Det kan vara lämpligt att som träning först stansa ut en eller ett par brunnar i kanten av petriskålen eller objektglaset.)





► 7.13 Dubbeldiffusion och resultat med precipitationslinjer. I brunn nr 1 placeras antikroppar mot t.ex. äggalbumin. I brunnarna 2, 3 och 5 finns prover som innehåller antigen i form av äggalbumin. I övriga brunnar saknas albumin.

- 10 Planera försöket genom att rita en skiss över brunnarna och vad som ska finnas i brunnarna. Gör ett märke i kanten av gelskiktet för att veta orienteringen. Märk också varje brunn på undersidan av glaset med det nummer som återfinns på skissen.
- 11 Brunnarna fylls med ca 5–10 µl lösning. Se till att de inte blir överfulla.  
Fyll brunnarna enligt följande:
  - Brunnen i mitten fylls med antikroppar.
  - En av de yttre brunnarna fylls med referenslösning av äggvita (positiv kontroll).
  - En av de yttre brunnarna fylls med avjonat vatten (negativ kontroll).
  - Övriga brunnar fylls med olika provlösningar.
- 12 Sätt lock på petriskålarna eller lägg objektglasen i en fuktkammare, så att gelen inte torkar ut.
- 13 Efter ett eller två dygn syns en utfällning i form av en linje, där antigen och antikropp möts. Tiden som åtgår innan linjerna syns, beror på hur långt ifrån varandra som brunnarna ligger. Det brukar vara lättare att se de vita linjerna om skålarna eller objektglasen hålls mot en mörk bakgrund.
- 14 Gelerna kan förvaras i tätslutande låda i kylskåp under flera dygn för avläsning vid senare tillfälle.

## Fördjupningsuppgifter

- 1 Även andra proteiner kan påvisas med denna metod. T.ex. kan olika köttproteiner identifieras med hjälp av specifika antikroppar. Man kan t.ex. testa om det är oxkött eller kängurukött i en hamburgare. **OBS!** Antikropparna måste vara anpassade till det som ska testas och till metoden.
- 2 Ta reda på mer om:
  - antigeners och antikroppars byggnad,
  - antigen–antikropp-reaktioner,
  - allergiska reaktioner i kroppen,
  - anafylaktisk chock,
  - Western blotting.