



Virusinfektion hos pelargonier

Laborationen visar en immunologisk metod som är mycket använd på laboratorier för identifikation av antikroppar eller antigener. Det kan t.ex. handla om att på ett sjukhuslaboratorium undersöka om en kvinna är gravid eller om en patient är infekterad med HIV. Metoden kallas Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).

I denna laboration påvisas en infektion av PFBV-virus (Pelargonium Flower Break Virus) som kan förekomma hos pelargonier. Till laborationen används ett kit som är avsett för 14 laborationsgrupper.

Syftet med laborationen är att praktiskt arbeta med en mycket använd laboratoriemetod. I fördjupningsuppgifterna visas på medicinska användningsområden för metoden.

Tidsåtgång

Att ställa i ordning och genomföra försöket tar ca 1 timme.

Säkerhet

Provbufferten och konjugatet innehåller stabiliseringsmedlet Bronidox. Substratet innehåller tetrametylbenzidin och väteperoxid.

Reagensen är endast måttligt hälsofarliga och inga speciella säkerhetsåtgärder behövs. Undvik att få reagensen i munnen och på huden. Skölj med vatten om reagens hamnar i ögon eller på hud. Reagensen kan efter användning spolas ut i vasken. Alla fasta beståndsdelar kan slängas som normalt hushållsavfall.

Använd skyddskläder och skyddsglasögon.

Materiel

- en specialbehandlad pistill för att mala bladen (det går också bra att använda vanliga mortelpistiller),
- 14 trattar och 14 provrör,
- provrörsställ,
- sax,
- kallt kranvatten.

Innehåll i testkittet

- reaktionerna sker i 16 brunnar, som är ordnade i två rader. (Dessa kommer förpackade tillsammans med torkmedel i en plastpåse),
- 14 extraktionspåsar,
- 14 filter,
- flaska med 50 cm³ provbuffert (gul),
- 14 pipetter för proven, 1 märkt pipett för provbufferten, 1 pipett märkt för konjugatet och 1 pipett märkt för substratet,
- flaska med 2,5 cm³ konjugat (röd),
- flaska som skyddar substratet mot ljus (svart) med 2,5 cm³ substrat (färglöst). Sista förbrukningsdag anges på förpackningen. Lösningarna förvaras vid ca +4 °C.



PRINCIP FÖR LABORATIONEN

De 16 brunnarna (2 · 8 brunnar) är preparerade med en polyklonal antikropp, som reagerar specifikt med PFBV. I de två yttersta brunnarna finns ett negativt (PFBV-fritt) och ett positivt (PFBV-innehållande) immobiliserat prov. Detta är kontrollerna (märkta med grönt respektive rött).

Första reaktionen:

Brunnarna (förutom kontrollerna) fylls med provet (extrakt från pelargonieblad). Om det finns PFBV-antigen binds detta till de immobiliserade antikropparna. Det bildas alltså ett antigen-antikropp-komplex.

Andra reaktionen:

Efter att allt prov som inte bundits till antikroppar tvättats bort, tillsätts en andra antikropp (även till kontrollbrunnarna). Denna andra antikropp är konjugerad med peroxidas ("enzym-konjugat") och binder till det immobiliserade antigen-antikropp-komplexet.

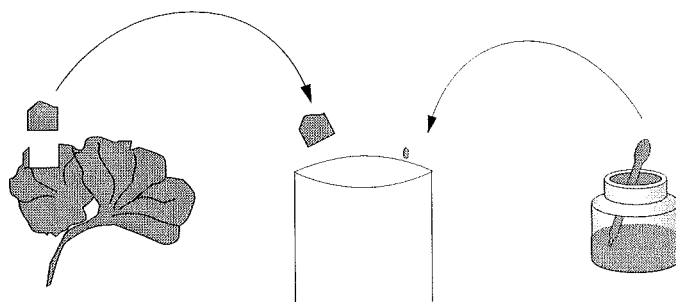
Tredje reaktionen:

När det konjugat som inte har bundits tvättats bort, tillsätts ett färglöst substrat (även till kontrollbrunnarna). Det reagerar med konjugatet och bildar en blåfärgad produkt (som i den positiva kontrollen). PFBV-infekterade växter ger alltså blåfärgning i brunnarna, medan växter som inte är infekterade behåller sin färglöshet i brunnarna (som i den negativa kontrollen).

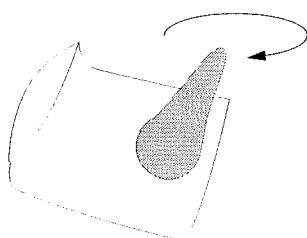
Utförande

Förberedelser

- 1 Skär ut 14 bitar av pelargonieblad (ca 10 cm² stora) och lägg dem i extraktionspåsar. Håll påsarerna upprätt. Numrera påsarerna enligt beteckningarna i tabellen på nästa sida (B1–H1 och B2–H2).

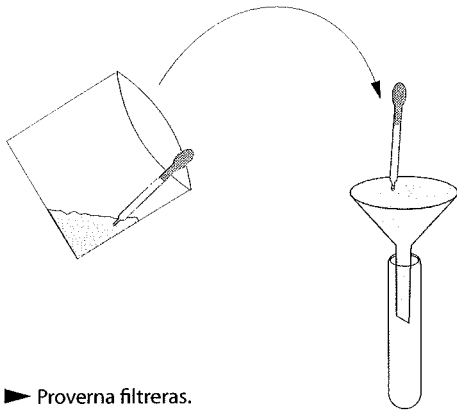


► Bitar av pelargonieblad samt provbuffert överförs till extraktionspåsar.



► Pelargoniebladen mals sönder för att frigöra cellinnehållet.

- 2 Tillsätt därefter 3 cm³ provbuffert (den översta markeringen på pipetten).
- 3 Lägg sedan en extraktionspåse på en jämn yta och håll öppningen något uppåt så att vätskan inte rinner ut. Mal pelargoniebladet genom att röra pistillen i cirkelrörelser under måttligt tryck. När extraktet har färgats grönt av det frisatta klorofyllet kan extraktionen avslutas. Fortsätt på samma sätt med resten av extraktionspåsarerna.



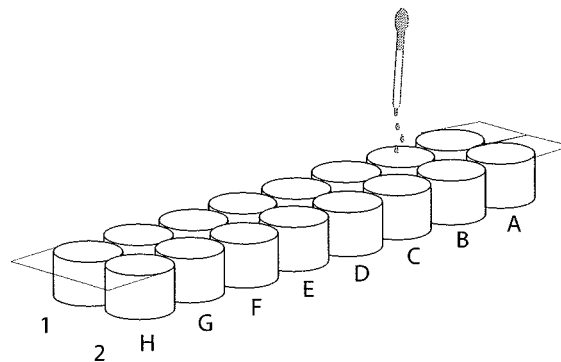
► Proverna filtreras.

- 4 De olika extrakten överförs med var sin pipett till var och en av filtertrattarna som placerats i de numrerade provrören. Filtratet som bildas är de egentliga proverna. Provpipetterna får inte blandas ihop med varandra.

Innan testet påbörjas ska alla reagensen ha antagit rumstemperatur (19–29 °C). Reaktionerna sker vid rumstemperatur.

Inkubation av proverna

- 5 Brunnarna tas fram ur påsen och placeras på den plats som finns utskuren i förpackningens inre. De röda respektive gröna kontrollerna syns ovanifrån. Droppa ned filtratet (tre droppar) i resp. brunn och med rätt pipett. Kontrollbrunnarna ska vara tomma vid första reaktionstillsatsen. Inkubera under tio minuter.



► Tillsats av provlösningar.

Notera i tabellen nedan varifrån provet kommer.

Rad\Spalt	1	2
A	Negativ kontroll (grön)	Positiv kontroll (röd)
B		
C		
D		
E		
F		
G		
H		

Tvätt av brunnarna

- 6 Ta brunnarna i handtaget och töm vätskan som finns i brunnarna i en vask. Spola ur brunnarna med kallt kranvatten i fem sekunder, vänta ca en halv minut, töm innehållet i vasken, skaka ut allt vatten och sug bort överskottsvatten med filterpapper. Upprepa tvätten ytterligare minst två gånger. **OBS!** Det är viktigt att skölja ordentligt!



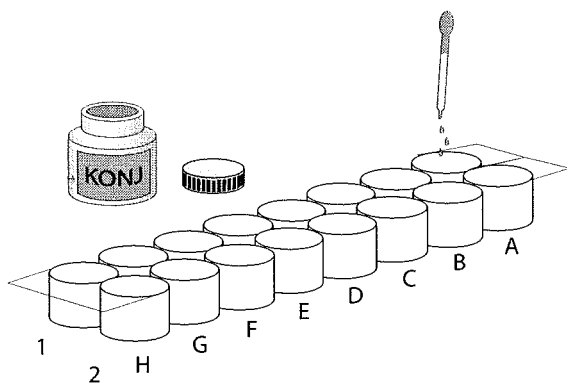
Inkubation med konjugat

- 7** Tillsätt tre droppar konjugat (röd vätska) i brunnarna, även kontrollerna, med hjälp av ”konjugat-pipetten”. Inkubera under tio minuter. Tvätta brunnarna enligt punkt 6.

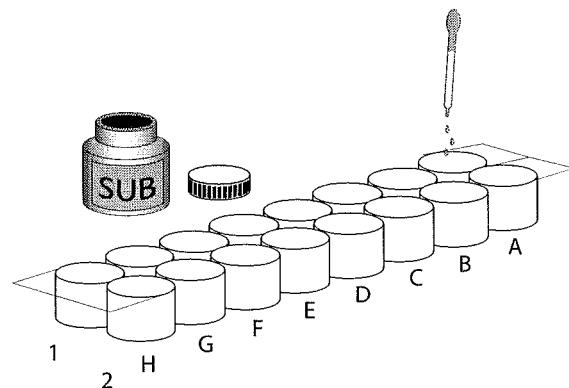
Inkubation med substrat

- 8** Tillsätt tre droppar substrat (färglös vätska) i brunnarna, även kontrollerna, med substratpipetten. Inkubera under tio minuter.

Substratet är ljuskänsligt – undvik därför stark belysning (t.ex. direkt solljus).



► Tillsats av konjugat.

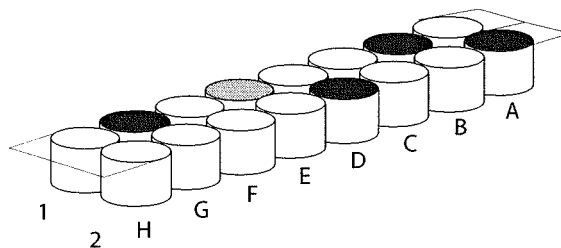


► Tillsats av substrat.

Resultat och utvärdering

Testet fungerar som avsett när den positiva kontrollen visar en intensiv blåfärgning, medan den negativa kontrollen fortfarande är färglös.

Nedan visar hur ett resultat kan se ut: Prov 1B, 1G och 2D är starkt infekterade, medan 1E är svagt infekterat och övriga växter är helt oinfekterade.



► Exempel på resultat av ett test.

Fördjupningsuppgifter

- ELISA-metoden används även till graviditetstest som kan köpas på apotek. I förpackningen finns anvisningar för hur testet ska utföras. Försök att få urinprov från en gravid respektive ej gravid kvinna att använda för demonstration. Se läroboken *Helix* s. 117 för figur och beskrivning av graviditetstest.
- Ge fler exempel på hur sjukhuslaboratorier använder ELISA-metoden till analys av ämnen. Beskriv hur analyserna går till.