

Tema immunologi

Laborationer och övningar

Måndagen den 16 november:

1. Begrepp inom immunologin
2. Fagocytos av jäst
3. Mikrosvampar i barr
4. Vilken effekt har lysozym?
5. Hur man spårar ägg i maten

Tisdagen den 17 november:

6. Hur ser gluten ut?
7. Antikroppar mot gluten i blod
8. Analys av gluten i livsmedel
9. Virusinfekterade pelargonier



Immunologiska begrepp

Immunologi innehåller ett stort antal begrepp. Klipp ut begreppen nedan och använd dem för att bygga begreppskartor och sortera i olika kategorier utifrån frågeställningar kring immunförsvaret.

Patogener

Medfött immunförsvaret

Adaptivt immunförsvaret

Hud

Slemhinnor

Flimmerhår

Magsyra

Makrofager

Immun

Histamin

MHC = Major Histocompatibility Complex)

HLA = Humana Leukocyt Antigener (= MHC)

pH

Lysosymer

Blod och lymfa

Leukocyter (vita blodkroppar)

Granulocyter

Monocyter

Mastceller

Pyrogener



Interferon

Komplementproteiner

Neutrofila granulocyter

Eosinofila granulocyter

Basofila granulocyter

Dendritiska celler

Kemotaxi

Bakterier

Virus

Parasiter

Svampar

Inflammation

Infektion

Apoptos (programmerad celledöd)

Tumörceller

Var

Feber

Lymfocyter

B-lymfocyter

Plasmacell

Minnescell

T-lymfocyter



Mördar-T-cell

Hjälpar-T-cell

Minnes-T-cell

Supressor-T-cell

(Regulatorisk-T-cell)

Antigener

Antikroppar

Immunoglobuliner,

IgG, IgA, IgE

Autoimmun sjukdom

Ledgångsreumatism

Diabetes typ 1

Multipel skleros (MS)

Förvärvad immunitet

Allergier

Allergener

Hösnuva

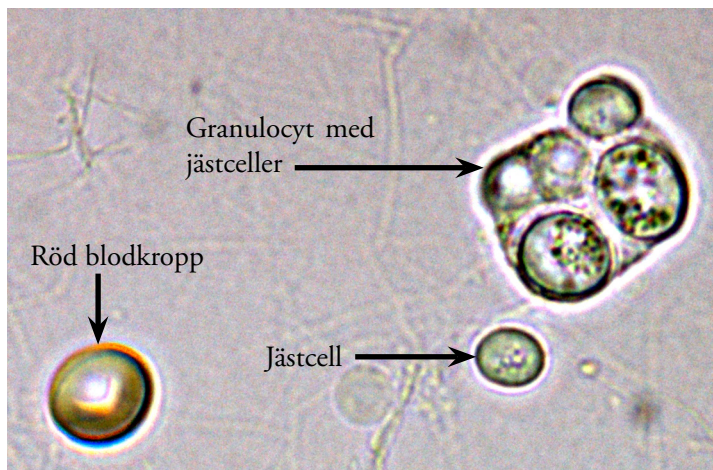
Nässelfeber

Astma

Anafylaktisk chock

Vaccination





Fagocytos av jäst

Lärarhandledning

Foto: Bioresurs

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, 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, Ca^{2+} , pH 7,3):
115 mM NaCl, 5,9 mM KCl, 1,2 mM NaH_2PO_4 , 1,2 mM MgCl_2 , 25 mM NaHCO_3 ,
2,5 mM CaCl_2 , 10 mM glukos, 1,2 mM Na_2SO_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

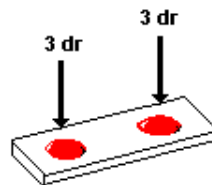
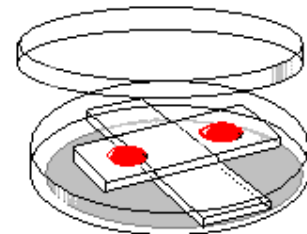


fig 3



- 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 mm³ 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 fuktammaren, 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 fuktammaren 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.

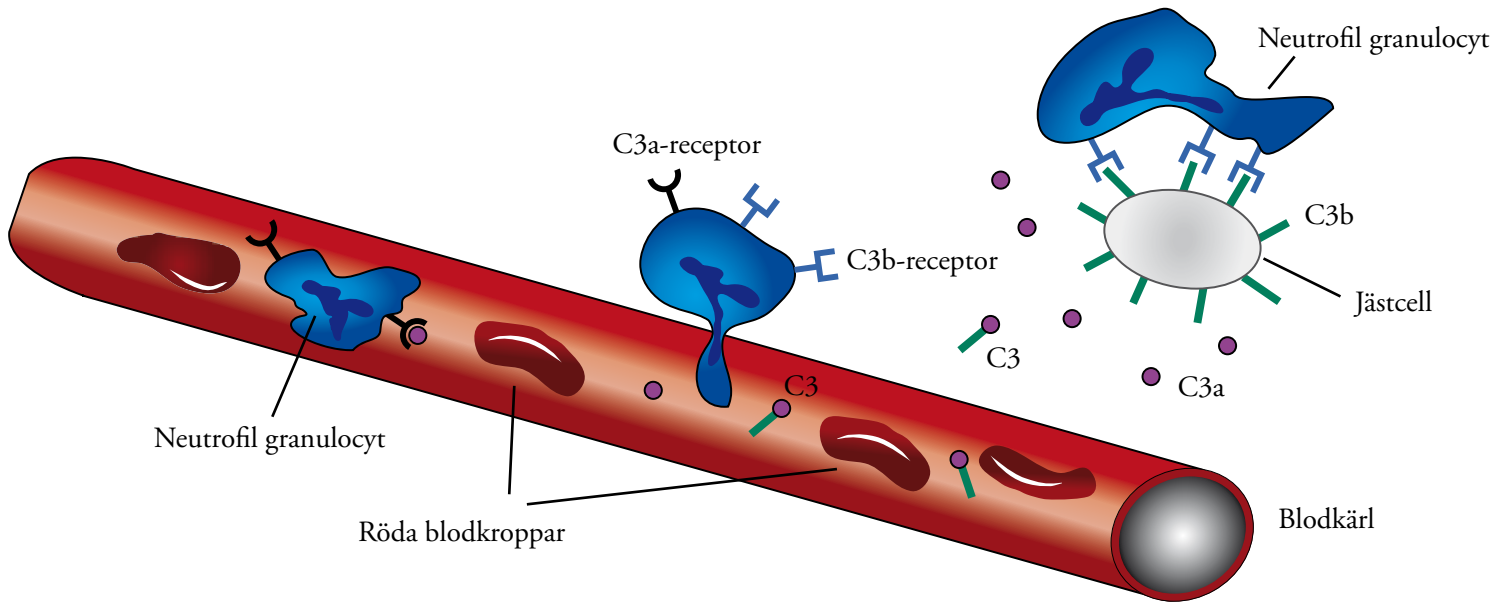


Illustration: Anna Maria Wremp

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 granulocytens C3b-receptorer.



Fagocytos

Elevinstruktion

Vid den här laborationen kan du studera hur dina egna vita blodkroppar (neutrofila granulocyter) fångar och äter upp jästceller.

Säkerhet

Tänk på att laboration med blod kan innebära smittorisk. Följ därför lärarens instruktioner för hantering av blod och om var förbrukat material ska slängas.

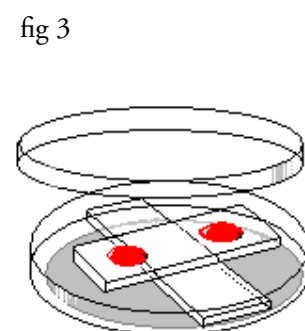
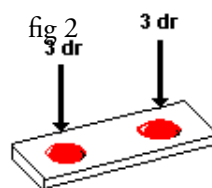
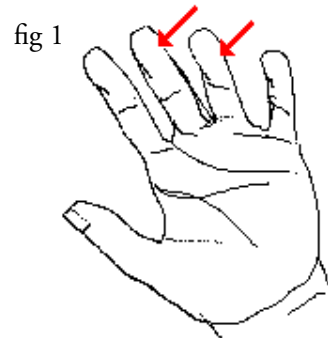
Det är självklart frivilligt att sticka sig. Om någon bär på blodsmitta får den personen inte sticka sig. Var noga med att alltid sitta ner när blodprov tas på grund av svimningsrisk. Undvik att komma i kontakt med annan persons blod. Ta själv hand om material som är blodkontaminerat. Kasta blodkontaminerat material som blodlancetter, bomullstussar mm. i en behållare som är avsedd för detta.

Material

- säkerhetsbehållare för blodkontaminerat material
- märkpenna
- objektglas (nytt och rent), täckglas, mikroskop
- autoklick för blodprov, plåster
- 25 ml Krebs-Ringer-lösning (KRG-lösning)
- fuktkammare, 37 °C
- värmeskåp, 37 °C
- ”rullar” av filterpapper
- jästsuspension med serum
- plastpipetter, 3 ml
- tandpetare eller gul pipettspets

Utförande

1. Hämta objektglas (inga fingeravtryck), fuktkammare (skriv namn på locket), autoklick och plåster. Lägg objektglaset på bordet och sätt dig på en stol framför. Stick hål i långfinger-/ringfingertoppens sida, (fig 1), där det finns mest blodkärl och minst känsel.





Låt armen hänga ner längs kroppen så att blodet rinner till bättre. Tänk på något trevligt sommarminne, t.ex. hur härligt det är att gå barfota i strandkanten. När du ser att blod kommer fram sätter du en droppe på glaset. Låt armen hänga igen, sätt sedan en till droppe 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 (fig 2). Om blodet inte räcker till två fläckar är det bättre att göra en stor. Sätt på plåster.

Lyft på locket till fuktkammaren och lägg objektglaset tvärs över det andra objektglaset (fig 3).

Sätt genast på locket och ställ in cellerna i värmeskåpet. Ta tid, cellerna inkuberas ca 25 min.

Lägg förbrukad autoklick i rätt skräpkärl.

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.

Under väntetiden ger läraren viktiga instruktioner och visar eventuellt hur man tvättar jäst.

2. Hämta en bägare med varm KRG, två plastpipetter, två ”rullar” av filterpapper, tandpetare/gul pipettspets och slutligen jästsuspensionen.
3. När inkuberingen är klar hämtas fuktkammaren, objektglaset lyfts ur och locket läggs tillbaka. Blodkoaglet lossas genom att man skrapar runt kanten med tandpetaren.
4. Håll därefter glaset snett över vasken, sug upp KRG i pipetten och skölj bort blodkoaglet genom att försiktigt spruta på glaset ovanför cellerna.
5. Torka glasets undersida med papper och lägg det på bänken.
6. Använd nu ändarna på ”rullen” av filterpapper för att torka bort KRG på glaset utanför cellfläckarna. OBS! Cellerna får inte torka!
7. Tillsätt slutligen två droppar KRG till den ena cellfläcken och två droppar jästsuspension till den andra cellfläcken. Om man endast har en cellfläck inkuberas den med jästceller.
8. Lägg tillbaka objektglaset i fuktkammaren och inkubera ytterligare ca 25 min i värmeskåpet. Släng tandpetarna och annat blodkontaminerat material i säkerhetsbehållare.
9. Ta fram mikroskop och studera jästcellerna under väntetiden. Ta ett objektglas och sätt en droppe jästsuspension på glaset. Lägg på täckglas. Studera och rita av cellerna.

Tiden kan också användas för att studera vilken betydelse serum har för fagocytosen. I serum finns komplement som är en viktig del av immunförsvaret.

Under denna inkubering sker själva fagocytosen. De neutrofila granulocyterna griper tag i jästcellerna och drar in dem i cellen.

10. När inkuberingen är klar sköljer man cellerna med KRG. Torka runt fläckarna med en filterpappersrulle 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.
11. Studera cellerna och rita och beskriv vad du ser. Jämför cellerna som ätit jäst med kontrollen. Ibland kan man även se röda blodkroppar och fibrintrådar i preparatet.



Mikrosvampar i barr



Försöket med mikrosvampar i barr kan användas för att diskutera hur individer kan skilja på "själv" och "icke-själv". Hur fungerar det när en individ identifierar och reagerar på en annan individ? Här finns många aspekter att gå vidare med och söka information om.

Det är ett begränsat antal svampar som bildar fruktkroppar på nedfallna barr och löv. På nedfallna granbarr är det framför allt granskytte (*Lophodermium picee*) och *Rhizosphaera kalkoffi*. På nedfallna tallbarr är det endofyten/saprophyten barrsprickling (*Lophodermium pinastri*) och tallskytte-patogenen (*Lophodermium seditiosum*) som dominerar. Hos granskytte och barrsprickling kan det uppträda flera svampindivider per barr. Individerna avgränsas av svarta tvärband, vilka är reaktionszonen där två svampindivider möts. (Gör gärna en bildsökning på webben på ovanstående latinska namn där utmärkt bildmaterial går att finna.)

Laborationen bygger på ett häfte "Svamp i skolan" utarbetat vid Institutionen för skoglig mykologi och patologi av Anders Dahlberg, Eva Damm och Lena Jonsson.

Uppgift

Studera barren i stereolupp. Kan du hitta svarta tvärband? Hur många individer finns det i barren?

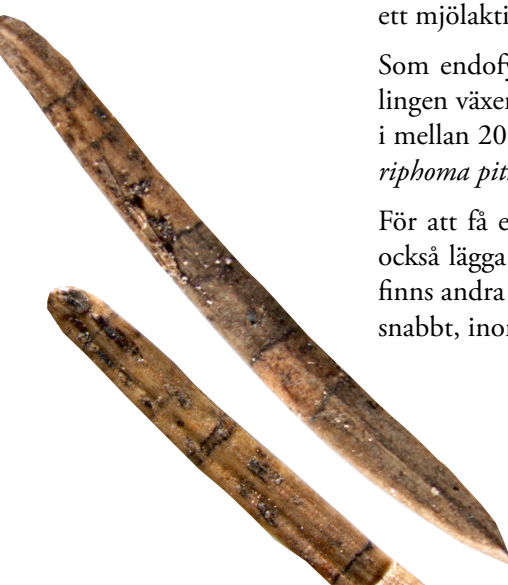
Odlinga mikrosvampar

Levande barr har en rik flora av såväl endofytiskt som epifytiskt levande svampar. Dessa kan man ganska lätt odla ut och bland annat visa att det faktiskt växer endofytiska svampar inne i barren.

Från friska granbarr växer nästan alltid granskytte (*Lophodermium picee*) ut. Denna svamp förekommer i 20-100% av en grans barr oavsett var i Sverige man befinner sig. Den bildar ett mjölkigt vitt mycel.

Som endofyt i tallbarr växer ofta barrsprickling (*Lophodermium pinastri*) ut. Barrspricklingen växer ut med ett grått mycel kringgärdat av en grå bård. Denna svamp förekommer i mellan 20-100% av alla friska tallbarr. Från både tall och granbarr växer också ofta *Scleriphoma pithyophila* ut. Dess mycel är karaktäristiskt svartglänsande.

För att få endofytiskt levande svampar att växa ut krävs att barren steriliseras. Man kan också lägga osteriliserade barr på maltagarplattor och se vad som växer ut från ytan. Där finns andra arter (annorlunda färg och form), bland annat jästsvampar. Ytsvampar växer ut snabbt, inom ett par dagar.





Ytsterilisering av barr

Ytsteriliseringen är viktig, annars kommer de epifytiskt växande svamparna helt att dominera, eftersom de är så snabbväxande.

Material

- Barr från gran och/eller tall.
- Bägare med 70% etanol
- 3 bägare med sterilt vatten (eller rent kranvatten)
- Steril pincett
- Sterilt filterpapper (eller eventuellt hushållspapper)
- Maltagarplattor (Maltagar inköps, vatten tillsätts enligt anvisning på förpackningen, blandningen autoklaveras och plattor gjuts.)

1. Doppa barren i 70% etanol i en minut.
2. Skölj barren i 3 bad med sterilt vatten. (Vatten direkt från kranen kan eventuellt användas i stället för sterilt tvatten om man spolat igenom kranen ordentligt först.)
Flytta barren med en flamberad pincett.
3. Lägg barren på sterilt filterpapper eller eventuellt hushållspapper i en steril petriskål. (Sterilisera filterpapper i 2 tim 170 °C eller dra ut ett par varv på hushållspappersrullen så att rent, okontaminerat papper kommer fram.)
4. Dela granbarren i två delar med en flamberad skalpell och lägg dem på maltagarplattor.
5. Inkubera i mörker i rumstemperatur i 1-2 veckor.

Resultat och utvärdering

Studera mycelet som växt ut från barren. Finns det skillnader i färg och struktur? Hur många svampindivider har växt ut från barren? (Det blir tydliga gränser mellan individerna.)



Vilken effekt har lysozym?

En toxikologisk testmetod används för att undersöka effekten av lysozym. Metoden innebär att en bakteriesuspension sprids ut på en agarplatta. På plattan läggs små filterpapperslappar, som doppats i de lösningar man vill undersökas. En klar zon utan bakterieväxt bildas runt de prover som är giftiga för bakterierna – ju större diameter på avdödningszonen desto giftigare.

Säkerhet

Endast klass 1-organismer ska användas i skolan. Uppodling av bakterier i vätskesuspension ska göras av lärare.

Material

1. *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* och *Bacillus subtilis* hämtas från agarplatta eller odlas upp i flytande näringsmedium över natten, t.ex. Nutrient broth (NB). Olika bakterier kan ge olika resultat.
2. Sterila plattor med ett allsidigt näringssubstrat, t.ex. Nutrient agar. (Köp in färdigt medium, tillsätt vatten enligt anvisningar på förpackningen, autoklavera och gjut plattor.)
3. Lösningar med lysozym, olika koncentrationer t.ex. 0,1 g/ml
4. Tops med långa träskaft (kan köpas på apotek.)
5. Värmeskåp, 37 °C
6. Filterpapperslappar gjorda med hålslag

Utförande

Agarplattor med näring bereds i förväg. Att göra i ordning försöket tar ca 30 minuter och avläsningen görs tidigast efter 1 dygn. Plattorna kan förvaras i kylskåp om avläsningen behöver skjutas upp.

1. Använd ympnål och skrapa bakterier från en platta. Rör ut bakterierna i ca 1 cm³ vatten i ett provrör. Ta så mycket bakterier att suspensionen blir kraftigt grumlig. Ett alternativ är att odla upp bakterier i flytande NB över natt vid 37 °C.
2. Doppa en tops i en av bakteriesuspensionerna och stryk ut bakterierna på en ren plattan med näringsagar. Låt varje streck med topsen täcka det föregående. Vänd därefter plattan och stryk ut bakterier på tvären över den första utstrykningen. Hela ytan ska täckas med täta streck – det får inte bli ett glest ruttmönster! Gör på samma sätt plattor med de andra bakteriearterna. Byt tops mellan olika bakterier. Ställ de använda topsen i en bägare med lite 70-procentig etanol.
3. Olika lösningar kan testas genom att små runda filterpapperslappar, doppas i testlösningar. Lapparna placeras sedan på agarytan med de utstrukna bakterierna. Använd steril preparernål för att placera ut lapparna. Se till att inte ett överskott av vätska följer med lappen – håll den mot kanten av kärlet så att överskottet rinner av. Om resultaten ska kunna jämföras måste alla lapparna behandlas likadant.
4. Placera plattorna i värmeskåp vid 37 °C i 1 dygn eller i rumstemperatur under 2-3 dagar.
5. Avläsning: En klar zon utan bakterieväxt runt det testade ämnet visar att det är giftigt för bakterien – ju större diameter på avdödningszonen desto giftigare. Mät diametern på avdödningszonen. Blir det någon skillnad mellan bakterierna? Vad kan det i så fall bero på?



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/dm³ 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 cm³ 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.

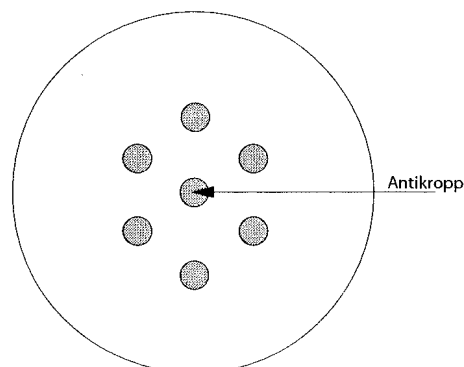
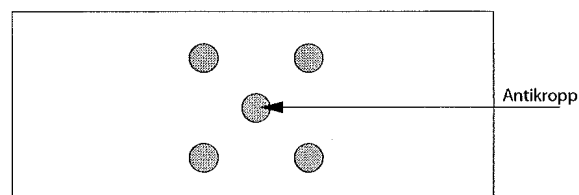
Gjutning av gel

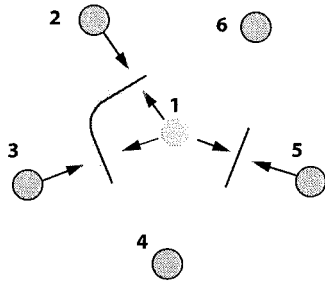
Till en liten petriskål går det åt 5 cm³ agaroslösning och till ett objektglas 3,5 cm³.

- 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.



Varför knådar man degen?

Vid knådning av en deg bildar protein som kallas gluten ett elastiskt nätverk. Detta sega nätverk förmår hålla kvar den koldioxid som jästsvamparna bildar vid sin ämnesomsättning. (I försöket nedan är det vattenånga som ger volymökningen.)

Utförande:

1. Blanda 1-2 matskedar vetemjöl med ungefär lika mycket vatten till en degklump.
2. Knåda degen med händerna i 5 minuter.
3. Låt degen vila i ca 5 minuter.
4. Tvätta degen försiktigt under rinnande vatten. Tryck degen mellan fingrarna och låt det som slammats upp i vattnet sköljas bort. Inga klumpar ska försvinna endast lösta ämnen. Fortsätt tills återstoden är en homogen seg massa av gluten utan vita partier.
5. I vanlig ugn (200 °C): Lägg glutenklumpen på t.ex. bakplåtspapper. Värm i ugnen ca 5-15 minuter.

I mikro: Lägg glutenklumpen på t.ex. ett fat. Värm i mikron ca 2-3 minuter. Släck belysningen i rummet och titta in genom ungluckan under tiden. OBS! Värm inte för länge så glutenklumpen blir svart!



Ursprunglig degklump



Enbart gluten



Samma glutenklump
värmad i mikro.



Test av antikroppar mot gluten i blod

Testet FindOut Celiac Test ger möjlighet att upptäcka antikroppar mot gluten i blod. Testet kan inköpas på apotek eller beställas via Internet.

Nedan följer introduktionen och instruktionen som medföljer testet:

Celiaki är en livslång sjukdom som orsakar kliniska symptom, t.ex. diarré, förstoppning, viktminskning, undernäring och hudirritation. Celiaki orsakas av överkänslighet mot gluten. Gluten är ett protein i vete, råg och korn.

FindOut Celiac Test är ett hemtest för påvisande av vävnadstransglutaminas antikroppar i blod. Förekomst av dessa antikroppar tyder med stor sannolikhet på celiaki. FindOut Celiac Test kan användas som ett hjälpmedel i diagnosticeringen av celiaki och kan hjälpa till att finna orsak för oklara symptom. Den slutliga diagnosen görs av läkare.

Nivån av vävnadstransglutaminas antikroppar sjunker med glutenfri diet. Effekten kan ofta observeras inom några veckor och inom 6 månader kan det vara så att antikroppar inte längre syns. Glutenfri diet ska därför påbörjas först efter läkares ordination. Det behövs endast en droppe (10 µl) blod ur fingret för att utföra testet. Celiakitestet har 96% säkerhet.

SE INSTRUKTIONSFILM



TESTKITET INNEHÅLLER:

1 TEST



1 ENGÅNGSLANSETT

HTL-STREFA S A, Adamówek 7,
95-035 Ozorków, Poland CE 0344



1 10 µL KAPILLARRÖR



1 STERIL SERVETT



1 PLÅSTER

GAUKE Healthcare (Hubei) Co, Ltd,
Gauke Industrial Park, Tuan Feng County,
Hubei Province, China



1 BUFFER 0,5 ML

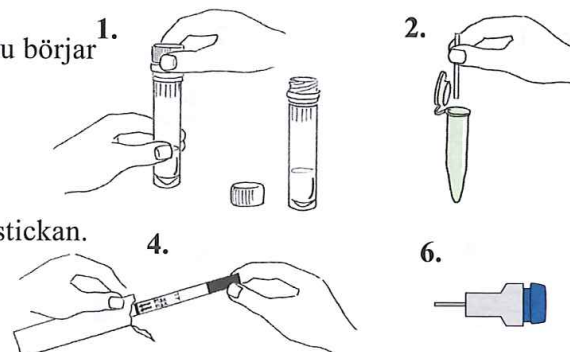


Förutom testet behöver du en klocka för tidtagning.

FÖRBEREDELSE:

Läs noggrant igenom bruksanvisningen innan du börjar testningen.

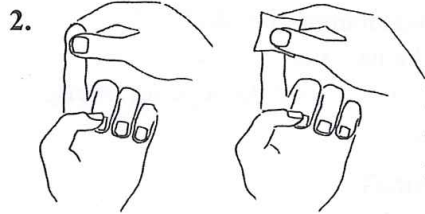
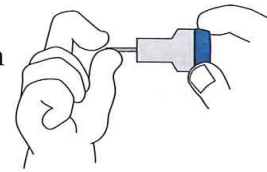
1. Förbered testet med att öppna buffern.
 2. Tag ut kapillarröret ur det gröna plaströret.
 3. Öppna påsen med rengöringsservetten.
 4. Öppna foliepåsen med testet och ta fram teststicken.
 5. Öppna påsen med plåstret.
 6. Ha engångslansetten tillgänglig.
- Testet skall nu genomföras inom 10 minuter.





SÅ HÄR GÖR DU:

1. Ta bort den tunna blå skyddshylsan genom att vrida den 1/4 varv och sen dra rakt ut. Den är nu färdig att användas.



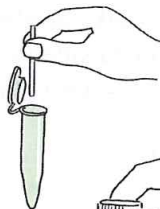
2. Massera fingret som du skall använda för testet. Använd ett finger där huden inte är för tjock. Rengör fingertoppen med den medföljande rengöringsservetten.

3. Sätt lansetten mot fingret och tryck av.

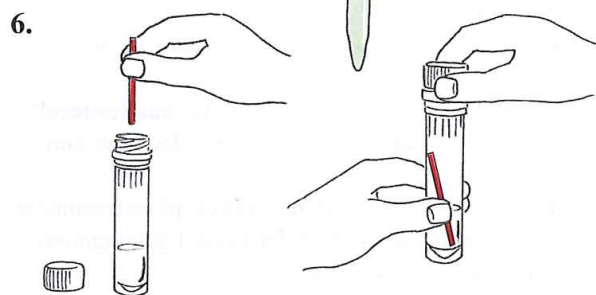
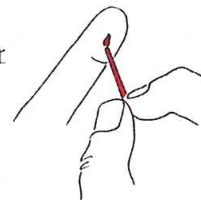


Sticket känns i princip inte alls.

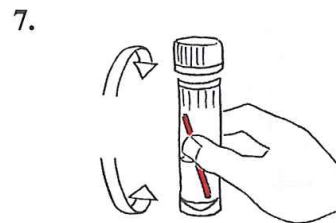
4. Ta upp kapillarröret.



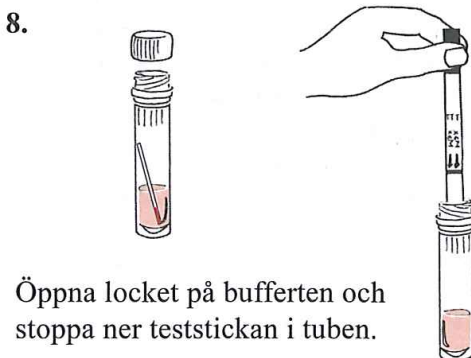
5. Sätt röret mot bloddropper och fyll röret.



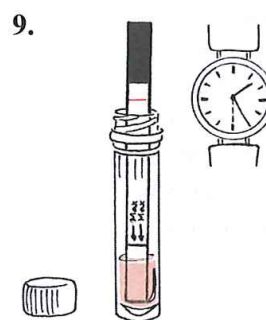
6. Placera röret i buffern och skruva på locket.



7. Vrid och vänd på buffern så att blodet blandas med vätskan.



8. Öppna locket på bufferten och stoppa ner teststickan i tuben.



9. Se till att vätskan inte kommer över maxlinjen på teststickan. Undvik att spilla ut vätska. Ta upp stickan efter 5 minuter och läs av resultatet. Testresultatet kan avläsas efter 5–10 minuter.

10. Observera att ett positivt testresultat kan avläsas omedelbart efter att test- och kontroll-linjerna har bildats, vilket i de flesta fall gör inom 2 minuter. Om testresultatet är mycket blekt eller oklart efter 5 minuter, kan du vänta ytterligare 5 minuter och avläsa testet igen. Resultatet skall dock avläsas inom 10 minuter.



AVLÄSNING AV RESULTAT:

Två röda linjer (test- och kontrollinje) indikerar **positivt testresultat**. Testlinjen kan vara blek eller stark.



En röd linje (kontrollinje) indikerar **negativt testresultat**.



Om det inte bildats någon linje i kontrollfönstret efter utförandet av testet, kan resultatet ej avläsas. Testet har antagligen skadats, alternativt har inte instruktionerna följts. Testet måste göras om. Nytt test måste användas.

Positivt resultat:

Resultatet påvisar att det finns antikroppar mot vävnadstransglutaminas i blodet. Testresultatet tyder med stor sannolikhet på celiaki. För att säkra diagnosen och för att få vidare vård ska man kontakta läkare.

Negativt resultat:

Resultatet påvisar att det inte finns antikroppar mot vävnadstransglutaminas i blodet. Testresultatet tyder inte på celiaki. Om magbesvären fortsätter, ta kontakt med läkare.

ATT OBSERVERA OCH TESTBEGRÄNSNINGAR:

- Celiakitestet får användas endast till och enligt det syfte som står i instruktionen.
- Om instruktionerna inte följs noggrant, kan testresultaten bli felaktiga! Använd testet och tillbehören endast en gång.
- Diagnosen skall inte enbart grunda sig på testresultatet av FindOut Celiac Test. Den slutliga diagnosen gör alltid en läkare.
- Glutenfri diet ska påbörjas enbart efter läkares ordination!
- Använd inte tester vars datum har gått ut.
- Använd inte testet om foliepåsen har skadats.
- Använd inte skadade tester eller tillbehör.
- Alla tillbehör är endast avsedda för användning av detta test. Tillbehören får ej användas på nytt.
- Allt testmaterial och tillbehör kan lämnas i hushållsavfallet.
- Bufferten innehåller 0,09 % natrium atsid. Undvik hudkontakt. Får ej sväljas!
- Förvara FindOut Celiac Test oåtkomligt för barn.
- FindOut Celiac Test är mycket pålitligt. I några få medicinska undantagsfall, som IgA-brist, kan testet ge falska resultat. Om testresultatet inte är enligt förväntningarna, ta kontakt med läkare.



Finns det gluten i glutenfri mat?

Den här laborationen visar en metod för att analysera mycket små mängder gluten i livsmedel. Det är en metod som utnyttjar förmågan hos en antikropp att mycket specifikt binda till en antigen, i det här fallet proteinet gliadin som ingår i gluten. Vi vill besvara frågorna:

- Hur kan vi detektera gluten?
- Vilka olika slag av livsmedel kan innehålla gluten?
- Är glutenfria livsmedel verkligen glutenfria?
- Hur kan vi koppla undersökningarna av gluteninnehåll till medicinska problem med glutenintolerans?

Bakgrund

Gluten finns i sädeslagen vete, råg och korn. Det består till lika delar av prolaminer som är lösliga i alkohol (gliadin hos vete, sekalin hos råg och hordein hos korn) och gluteniner som är lösliga i alkali. Man räknar med att gliadin motsvarar 50% av totala gluteninnehållet. Gluten skadar tarmen hos patienter som lider av sjukdomen celiaki och kosten för dessa patienter måste vara glutenfri. Havre kan ingå i kosten för de flesta som är glutenintoleranta. Havreproteinet avenin har en annan aminosyrasekvens än de proteiner som orsakar besvär.

Produkter som passar för personer med glutenintolerans är dels produkter baserade på vete-stärkelse, där man så långt det är möjligt tagit bort protein, dels produkter baserade på exempelvis majs, ris, hirs och bovete.

Det ELISA-test som vi använder är förstavalsmetod för analys av gluten i livsmedel. Den kan användas på både råvaror och upphettade produkter.

För extraktion av gluten används en särskild extraktionslösning och vid analys av produkter som innehåller kakao tillsätts skummjörkspulver till provet före extraktion. Tanniner (polyfenoler i kakao) stör annars mätmetoden.

Metodens detektionsgräns är 1,5 ppm gliadin, vilket motsvarar 3 ppm gluten. Det glutenliknande proteinet i havre (avenin) detekteras inte med metoden, inte heller majs och hirs.

Princip

Metoden är en direkt sandwich EIA (enzyme immuno assay), baserad på en monoklonal antikropp (R5) riktad mot den toxiska epitopen QQFPF i sekalin. Epitopen finns även repeterande i α -gliadin, ω -gliadin och i hordein.

Den primära antikroppen sitter fäst i botten på en mikrotiterplatta och fångar in gliadiner och motsvarande proteiner från råg och korn i provet. Ett antigen-antikropps-komplex bildas. Efter inkubation och tvätt tillsätts en peroxidämärkt sekundär antikropp. Denna antikropp är samma antikropp som den primära. Den peroxidämärkta antikroppen binder till det bundna gliadin-antikropps-komplexet.



I nästa steg tillsätts ett substrat (urea/väteperoxid) för enzymet samt en kromogen (TMB) vilket leder till att en blå färg utvecklas.

Efter tillsats av stopplösning övergår den blå färgen till gult. Färgens intensitet, som kvantifieras genom mätning i en spektrofotometer vid våglängden 450 nm är proportionell mot mängden gliadin i provet.

Gliadinkoncentrationen i provet beräknas med hjälp av en standardkurva där olika koncentrationer av gliadin avsatts mot absorbansen. Glutenhalten i provet beräknas genom att 50% av gluteninnehållet antas utgöras av gliadin.

Testkit, lösningar och utrustning

Testkitet innehåller en 96-håls mikrotiterplatta (12 strips med 8 brunnar var). Brunnarna är täckta av med monoklonala antikroppar (R5). Kitet innehåller alla reagens utom extraktionsbuffert, 2-propanol och mjölkpulver. Kitet förvaras i kylskåp (+2 °C – 8°C). Extraktionslösningen förvaras i rumstemperatur. När testet genomförs ska alla komponenter hålla rumstemperatur.

Vatten: Använd vatten som renats med jonbytare och har minst resistiviteten 18 MΩ.

Extraktionsbuffert (köps separat): Extraktion av alla prover har gjorts i förväg. Beskrivning av utförandet ingår i originalbeskrivningen, men tas inte upp här.

Tvättbuffert för tvätt av mikrotiterplattans brunnar: Spädning av den koncentrerade bufferten har gjorts i förväg (hållbar 1 månad vid förvaring i kylskåp). Eventuella kristaller löses genom att bufferten placeras vattenbad 37°C. (Spädning 1:10 med avjonat vatten.)

Sample diluent (spädningsbuffert för spädning av provextrakt): Den koncentrerade spädningsbufferten späds 5 gånger genom att ta en del spädningsbuffert och 4 delar vatten.

Referensprov: Provet innehåller ca 10 ppm gliadin. Det behandlas på samma sätt som proverna.

Gliadinstandarder: I testkitet ingår 6 standardlösningar med 0 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb, 40 ppb, och 80 ppb gliadin i lösning. Lösningarna ska inte spädas.

Konjugat: Konjugatet består av peroxidaskonjugerade anti-gliadin antikroppar. Lösningen späds med vatten i förhållandet 1 del konjugat och 10 delar avjonat vatten (1:11). För 3 strips späds 300 µl konjugat med 3 ml vatten.

Substratlösning: Lösningen innehåller urea/väteperoxid. Ingen spädnings ska göras.

Kromogenlösning: Lösningen består av TMB (tetrametylbenzidin). Ingen spädnings ska göras.

Stopplösning: Lösningen innehåller svavelsyra (1N), frätande, undvik kontakt med hud. Ingen spädnings ska göras.

Utrustning:

- Vortexmixer
- Värmesåp eller vattenbad, 50°C
- Centrifug, för 15 ml eller eppendorfrör, minst 2500 rpm
- Falconrör med skruvlock
- Eppendorfrör
- Automatpipetter, 50-1000 µl, 5 ml, 10 ml
- Mikrotiterplattläsare med ett filter för avläsning vid 450 nm



Beredning av provextrakt

1. Alla redskap som exempelvis mortlar, glasbägare och spatlar måste rengöras noggrant mellan varje prov och efter avslutad provberedning för att undvika kontamination.
2. Sätt på värmeinkubatorn med skakfunktion, $60 \pm 5^\circ\text{C}$.
3. Märk ett 15 mL Falconrör för varje livsmedel, samt ytterligare ett för positiv kontroll (referensprov).
4. Homogenisera minst 5 g eller 5 ml av livsmedelsproverna genom att exempelvis mortla och blanda så att ett homogent material erhålls med så små partiklar som möjligt.

Arbeta i dragskåp och med handskar:

- Prover i vätskeform: Blanda 0,25 ml av det homogeniserade provet + 2,5 ml av extraktionslösningen (vortexa).
 - Andra livsmedelsprover: 0,25 g av det homogeniserade provet + 2,5 ml av extraktionsbufferten blandas (vortexa).
 - Livsmedel med soja, hirs, quinoa, bovete och choklad/kakao, kaffe, kastanj och kryddor: 0,25 g av det homogeniserade provet + 0,25 g mjölkpulver + 2,5 ml av extraktionsbufferten blandas (vortexa).
 - Kött och korv: En större mängd, 50 g, homogeniseras eftersom gliadinet kan vara ojämnt fördelat. Väg upp 0,25 g homogeniserat prov och blanda med 2,5 ml extraktionsbuffert (vortexa).
5. Inkubera proverna 15 min i 60°C under skakning.
 6. Låt proverna svalna och tillsätt sedan 7,5 ml 68% 2-propanol. (Spädning: 68 ml 2-propanol + 32 ml destillerat vatten).
 7. Inkubera proverna i 10 minuter 1 timme i vattenbad vid 60°C .
 8. Centrifugera proverna vid 2500 rpm i 10 min vid rumstemperatur och eller filtrera extraktet. Alternativt kan 2 ml av extraktet centrifugeras med hög hastighet i 10 minuter i en mikrocentrifug.

Centrifugeringen kan också göras två gånger för att försäkra sig om att partiklar centrifugerats ner. Överför i så fall supernatanten från första centrifugeringen till nya Falconrör och rören vid 2500 rpm i 10 min vid rumstemperatur.
 9. Häll supernatanten i rör med skruvlock.
 10. Provextrakten (spädda 1:40) kan efter centrifugering förvaras i mörker och i rumstemperatur upp till 4 veckor. Extraktet får inte förvaras i kylskåp, då faller glutenproteinerna ut.

pre-ELISA

Ta ut ELISA-kitet från kylan och låt samtliga komponenter bli rumstempererade före användning.

Provextrakten och referensprovet måste spädas ytterligare minst 1:12,5 ggr före ELISA analysen annars stör kemikalierna i extraktionsbufferten immunoassayen. Dessa späds med sample diluent som i sin tur måste spädas (1:5) först. Se nedan.

Spädning av sample diluent:

Späd den koncentrerade sample diluent 5 gånger genom att ta 1 del spädningsbuffert och 4 delar avjonat vatten. (Ex: 10 ml sample diluent + 40 ml avjonat vatten. Gör bara den mängd, som åtgår vid analystillfället.)



Spädning av prov och referens (1:12,5):

100 µL av provextraktet späds med 1150 µL av den spädda sample diluent (1:5). Den totala spädningen blir då 500 gånger. (Om ytterligare spädningar behöver göras används extrakten (spädda 1:500) och späds med lika sample diluent i seriespädning.)

ELISA – Utförande

1. Ta ut det antal mikrotiterbrunnar som behövs till analysen.
2. Tillsätt till mikrotiterbrunnarna:
 - a. Pipettera 100 µL av vardera av gliadin standarderna (1 – 6) till resp. brunn enligt ELISA-mallen. Dessa används för konstruktion av standardkurvan.
 - b. Pipettera 100 µL av de utspädda provextrakten samt det utspädda referensprovet till respektive brunn enligt ELISA mallen.
3. Täck mikrotiterbrunnarna med aluminiumfolie och inkubera plattan i rumstemperatur i 30 min. Skaka inte.
4. Töm brunnarna genom att vända plattan upp och ner på ett mjukt underlag av pappershanddukar. Slå plattan försiktigt mot underlaget tills brunnarna tömts. Skölj brunnarna 5 ggr med den spädda tvättbufferten och töm vätskan mellan varje gång på samma sätt som ovan. Se till att brunnarna har tömts helt när sköljningen är avslutad.
5. Tillsätt 100 µL av den spädda konjugatlösning till samtliga brunnar. Blanda försiktigt med en cirkulerande rörelse. Täck brunnarna med aluminiumfolie och inkubera i rumstemperatur 30 min.
6. Töm brunnarna och skölj 5 ggr med den spädda tvättbufferten på samma sätt som ovan.
7. Tillsätt 50 µL substratlösning och 50 µL kromogenlösning per brunn. (De båda lösningarna blandas strax före tillsättningen och 100 µL av blandningen sätts till varje brunn). Blanda försiktigt genom en cirkulerande rörelse. Täck plattan med aluminiumfolie och inkubera i rumstemperatur i 30 min.
8. Stoppa reaktionen genom att tillsätta 100 µL stopplösning till alla brunnarna. Färgen i brunnarna övergår då från blått till gult. Blanda försiktigt genom en cirkulerande rörelse och avläs sedan absorbansen vid 450 nm. Avläsningen bör ske inom 30 min efter det att stopplösningen tillsatts.



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.

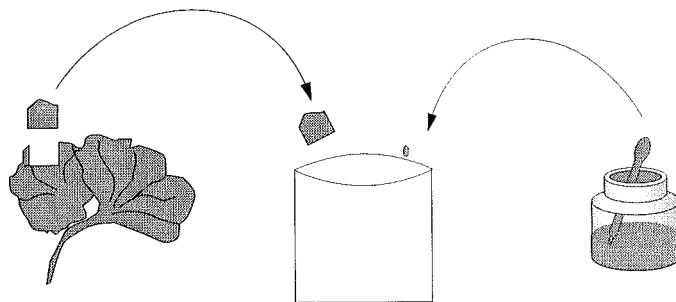
Tredje reaktionen:

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).

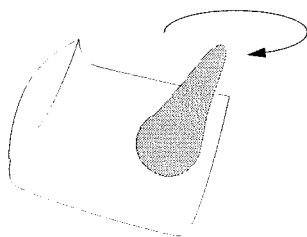
Utförande

Förberedelser

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

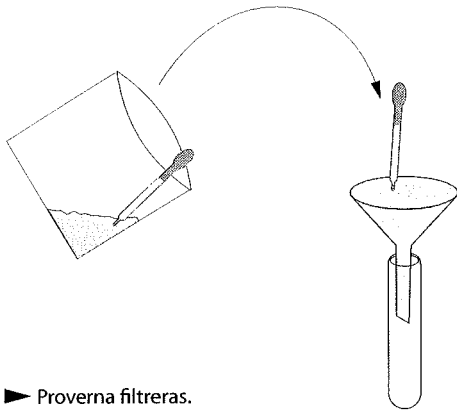


► Bitar av pelargonieblad samt provbuffert överförs till extraktionspåsar.



► 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 extraktionspåsar.



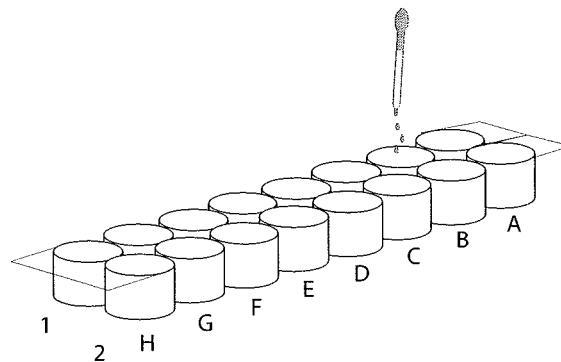
► Proverna filtreras.

- 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!



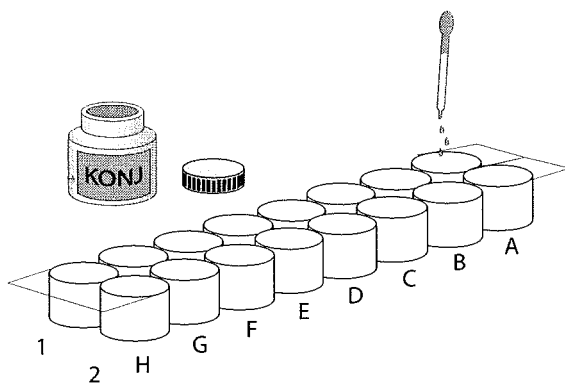
Inkubation med konjugat

- 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.

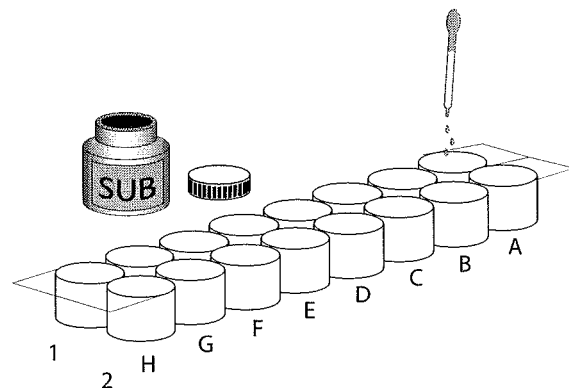
Inkubation med substrat

- 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.

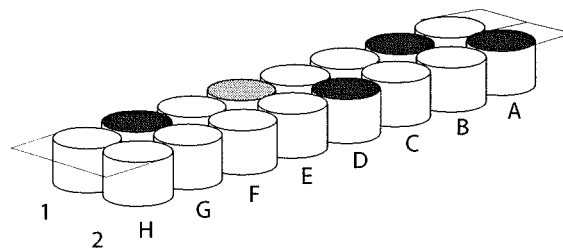


► Tillsats av substrat.

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

- 1 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.
- 2 Ge fler exempel på hur sjukhuslaboratorier använder ELISA-metoden till analys av ämnen. Beskriv hur analyserna går till.