

## Einführung zum ELISA – Test



### I. INHALT

Dieser Versuch kann von 10 Arbeitsgruppen durchgeführt werden.

- A – Antigene
- B – Primär-Antikörper
- C – Anti IgG, gekoppelt an Peroxydase
- D – stabilisiertes Wasserstoffperoxyd (für S1)
- E – Co-Substrat Peroxyd
- F – ABTS-Substrat (S2)
- G – konzentrierte Phosphatpufferlösung

- 2 Mikrotitrationsplatten
- Transferpipetten
- Mikroreagenzgläser mit Verschluss
- Plastikröhrchen (15 ml)

#### **Lagerung:**

**Sofort nach Erhalt des Kits müssen die verderblichen Bestandteile in den Kühlschrank gestellt werden.**

**Alle Bestandteile dieses Kits dienen nur der Benutzung zu pädagogischen Zwecken. Sie dürfen in keinem Fall zu Diagnosezwecken benutzt werden oder von Lebewesen konsumiert werden.**

***Keines der in diesem Kit enthaltenen Elemente ist menschlichen Ursprungs.***

## II. BENÖTIGTES ZUBEHÖR

- destilliertes Wasser
- Messbecher
- Inkubator (37°C)
- Wegwerfhandschuhe
- Schutzbrille
- automatische Mikropipetten (0-50 ml) + Spitzen

Versichern Sie sich, dass die Behälter aus Glas sauber und trocken sind und **keine Seifen-spuren** mehr aufweisen.

## III. VERSUCHSPRINZIP

### E.L.I.S.A. (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

#### **Antikörper**

(Ig, Immunglobuline) sind spezifische menschliche und tierische Proteine, die von den Lymphozyten als Reaktion auf Fremdkörper gebildet werden. Fremdkörper, die als Antigene bekannt sind, schließen infektiöse Bestandteile sowie zahlreiche aus der Umwelt stammende Materialien ein. Sie können experimentell hergestellt werden, indem ein Tier einem spezifischen Antigen ausgesetzt wird.

#### **Antigene**

Moleküle von großem Molekulargewicht, wie z. B. Proteine, Kohlenhydrate und Nukleinsäuren, die frei zirkulieren können oder Teil eines komplexeren Systems wie einer Virushülle sind. Antikörper sind die Antwort des Körpers auf die Antigene. Sie verbinden sich mit den Antigenen und spielen in Folge eine wichtige Rolle bei der Beseitigung des Fremdmaterials.

Wenn ein Antikörper sich spezifisch an ein Antigen bindet, erkennt er bestimmte Sequenzen, Ladungen oder strukturelle Konformationen. Diese charakteristischen Strukturbindungen schaffen den genetischen Fingerabdruck der Antigene. Jedes Antikörpermolekül kann sich mit zwei Antigen-Molekülen verbinden. Die strukturelle Übereinstimmung ist spezifisch und ermöglicht es, zwischen zwei zirkulierenden Viren zu unterscheiden – diagnostisch seit kurzem auch zwischen zwei Stämmen des gleichen Virus.

Das Produkt der spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion wenn ein Antikörper und ein Antigen sich zu einem unlöslichen Komplex binden, wird als Immunpräzipitat bezeichnet.

#### **Serum oder Plasma**

wird durch die Entfernung roter Blutkörperchen aus Blut gewonnen. Es enthält: die spezifischen Tierproteine und die Antikörper-Antigene die dem Tier durch eine Infektion oder

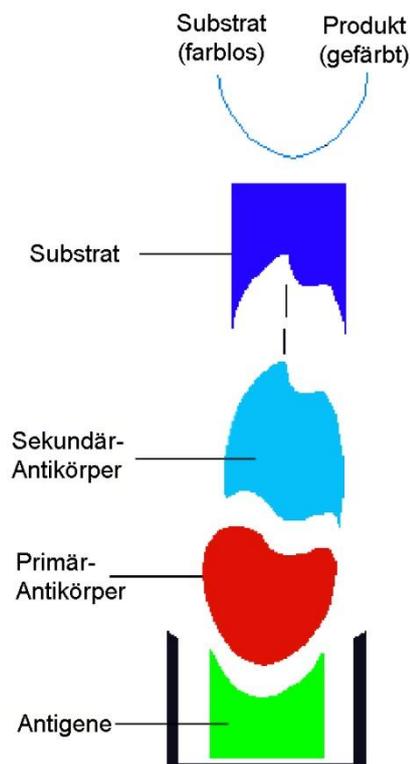
mit Absicht verabreicht wurden. Die Antikörper werden von den tierischen Serumproben getrennt, gereinigt und können nun genutzt werden um bestimmte Antigene aufzuspüren.

### Beschreibung eines Immun-Screening-Tests

Ursprünglich ist der ELISA-Test zur Bestimmung zirkulierender Antikörper entwickelt worden. Es handelt sich dabei um ein Verfahren der enzymatischen Immunabsorption, welches Antigene (die vom Körper als Fremdstoffe angesehen werden) und Antikörper durch die Verwendung eines Markers (ein Molekül, durch dessen Ortung diese Elemente identifiziert werden können) in Abgleich bringt. Bei der ELISA-Methode sind diese Marker Enzyme.

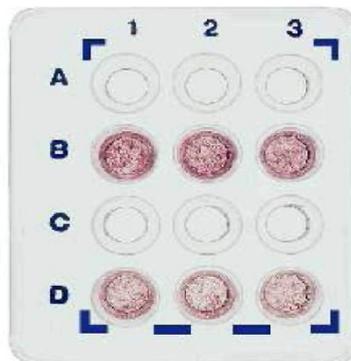
ELISA-Tests werden auf Mikrotiterplatten aus Styropor oder aus PVC durchgeführt. Diese Platten sind lichtdurchlässig und enthalten eine Vielzahl an Vertiefungen, in die die Proben gegeben werden.

Zuerst werden die Antigene in die Vertiefungen eingebracht, die danach ausgespült werden um ein Übermaß an Antigenen zu entfernen. Ein Teil der Antigene hat sich durch Anbindung hydrophober Wechselwirkung an der Wand der Vertiefungen festgesetzt. Es erfolgt die Wiederholung des Arbeitsschrittes mit Primärantikörpern, dann mit sekundären Antikörpern, die sich an die Primär-Antikörper lagern und Peroxydase-Wirkung haben. Je nach Vorhandensein des Sekundär-Antikörpers werden Proben, an die die Antikörper binden, aufgrund des Oxidations-Grads eines zudem eingebrachten Substrates eine unterschiedliche Färbung aufweisen.

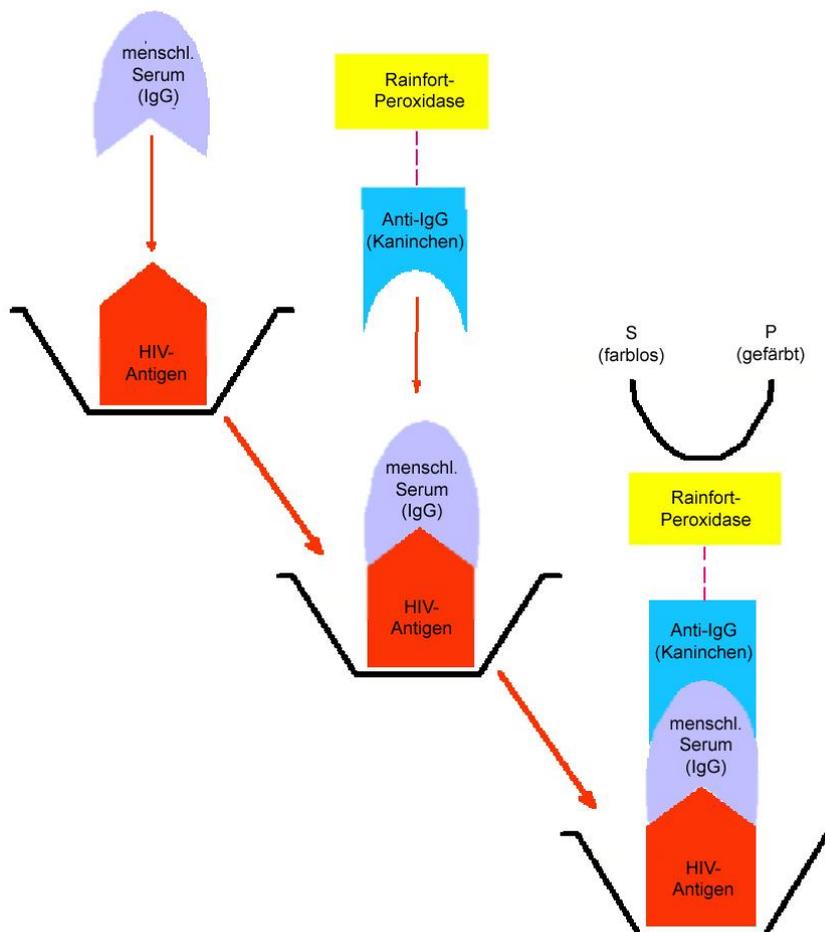


Tritt eine Färbung auf, zeigt dies, dass Enzyme anwesend und wirksam sind. Ihre Lage auf der Trägerplatte kann ermittelt werden.

Eine Einfärbung entspricht somit einem positiven Ergebnis, auf der unten gezeigten Platte zutreffend für die Vertiefungen B1, B2, B3, D1, D2 und D3.



Der ELISA-Test, der zur Ortung des HI-Virus eingesetzt wird, arbeitet nach dem gleichen Schema.



#### IV. PROTOKOLL

- Ziel dieses Versuchs ist, die experimentelle Konzeption und die Umsetzung der Methode des ELISA-Tests zu verstehen.
- Schutzbrillen und -Handschuhe müssen entsprechend der Sicherheitsbestimmungen durchgängig getragen werden.

**Bevor Sie mit dem Versuch beginnen, sollte der Inkubator auf 37°C vorgewärmt werden.**

#### **Beschriften Sie die Mikrotitrationsplatten.**

- Richten Sie die Platten aus, indem Sie senkrecht Buchstaben und waagrecht Zahlen vorsehen (Markierung der linken oberen Ecke). Schreiben Sie Ihren (Gruppen)Namen auf die Platten, so dass sie nach Beendigung der Arbeit wieder gefunden werden kann.
- Beschriften Sie Zeilen mit Ziffern und Spalten mit Buchstaben. Sind die Vertiefungen auf der Mikroplatte bereits vorbereitet, weisen sie diesen die Bezüge zu Zeilen-Buchstaben und Spalten-Nummern sorgfältig zu.

#### **Markieren der Transfer-Pipetten.**

10 Pipetten werden folgendermaßen durchnummeriert:

1	TPS (Phosphat-Salz-Puffer)
2	Ag (Antigen)
3	Ig 1 (AK 1, Primär-Antikörper)
4	Ig 2 (AK 2, Sekundär-Antikörper)
5	S 1 (Substrat 1)
6	S 2 (Substrat 2)
7	Linie 1
8	Linie 2
9	Linie 3
10	Linie 4

Die Pipetten dürfen nur zur Entnahme der Stoffe benutzt werden, für die sie gedacht sind.

#### **Richtlinien**

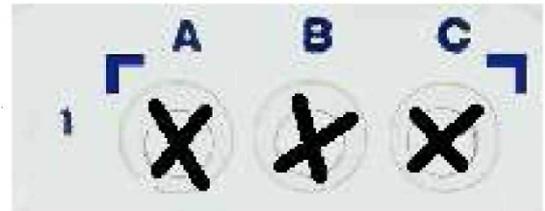
Zum Übertragen der Reagenzien in die Vertiefungen, dürfen nur markierte Pipetten oder Mikropipetten mit Wegwerfspitze verwendet werden. Darauf muss auch bei der Entnahme der Flüssigkeiten aus den Vertiefungen geachtet werden.

Zum Ausspülen der Eindellungen sollte folgendermaßen verfahren werden:

- A. Die mit "TPS" markierte Pipette sollte dazu verwendet werden, die Pufferlösung hinzuzufügen. Es soll soviel Pufferlösung hinzugefügt werden, bis die Vertiefung voll ist. Die Kapazität der Vertiefung beträgt ca. 0,2 ml. Achtung: Es sollte keine Flüssigkeit in die Nachbarvertiefung gelangen!
- B. Entnahme der Pufferlösung mit der entsprechenden Pipette.

### Antigen

- Hinzufügen von **50 µl** oder 3 Tropfen Antigen (Ag) in **jede** Vertiefung der Linien **2, 3 und 4**, jedoch nicht in die Vertiefungen der Linie 1;
- Bei gleichbleibender Temperatur für 5 min in den Inkubator stellen.
- Mit der Pipette Ag wird alle Flüssigkeit aus den Vertiefungen entnommen;
- Die 12 Vertiefungen werden gut gespült (nach der weiter oben erläuterten Methode); wenn die Bearbeitung zu diesem Zeitpunkt unterbrochen werden soll, wird die Pufferlösung in den Vertiefungen gelassen. Entfernen der Pufferlösung aus den Vertiefungen wie vorher beschrieben.



**Zu diesem Zeitpunkt des Versuchs ist es möglich, das Protokoll zu stoppen, indem man die Pufferlösung in den Vertiefungen lässt und die Temperatur beibehält. Der Versuch kann dann ab Punkt 4 wieder aufgenommen werden.**

### Primär-Antikörper

- Hinzufügen von **50 µl** oder 3 Tropfen Primär-Antikörper AK 1 (Ig 1) in **jede** Vertiefung der Linien **1, 2 und 4 nicht jedoch** in die Vertiefungen von der Linie 3.
- Bei gleich bleibender Temperatur für 5 min in den Inkubator stellen.
- Mit der Pipette Ig 1 wird alle Flüssigkeit aus den Vertiefungen entnommen;
- Die 12 Vertiefungen werden gut gespült (nach der weiter oben erläuterten Methode); wenn die Bearbeitung zu diesem Zeitpunkt unterbrochen werden soll, wird die Pufferlösung in den Vertiefungen gelassen. Entfernen der Pufferlösung aus den Vertiefungen, wie vorher beschrieben.

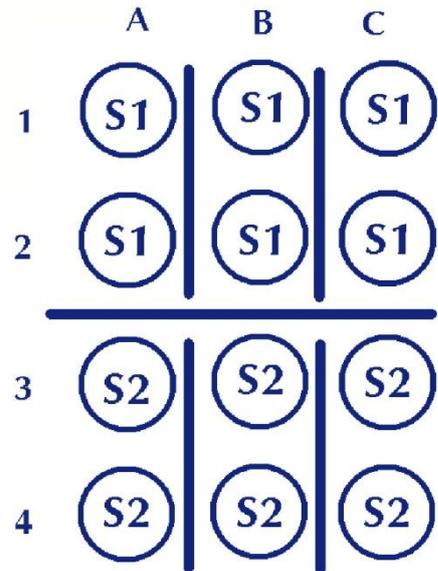
### Sekundär-Antikörper

- Hinzufügen von **50 µl** oder 3 Tropfen Sekundär-Antikörper AK2 (Ig 2) in jede Vertiefung der Linien **2, 3 und 4 nicht jedoch** in die Vertiefungen von der Linie 1;
- Bei gleich bleibender Temperatur für 5 min in den Inkubator stellen.
- Mit der Pipette Ig 2 wird alle Flüssigkeit aus den Vertiefungen entnommen;
- Die 12 Vertiefungen werden gut gespült (nach der weiter oben erläuterten Methode); wenn die Bearbeitung zu diesem Zeitpunkt unterbrochen werden soll, wird die Pufferlösung in den Vertiefungen gelassen. Entfernen der Pufferlösung aus den Vertiefungen, wie vorher beschrieben.

Vorschlag zur Abfolge der Durchführung der experimentellen Schülerarbeiten

**Substrat**

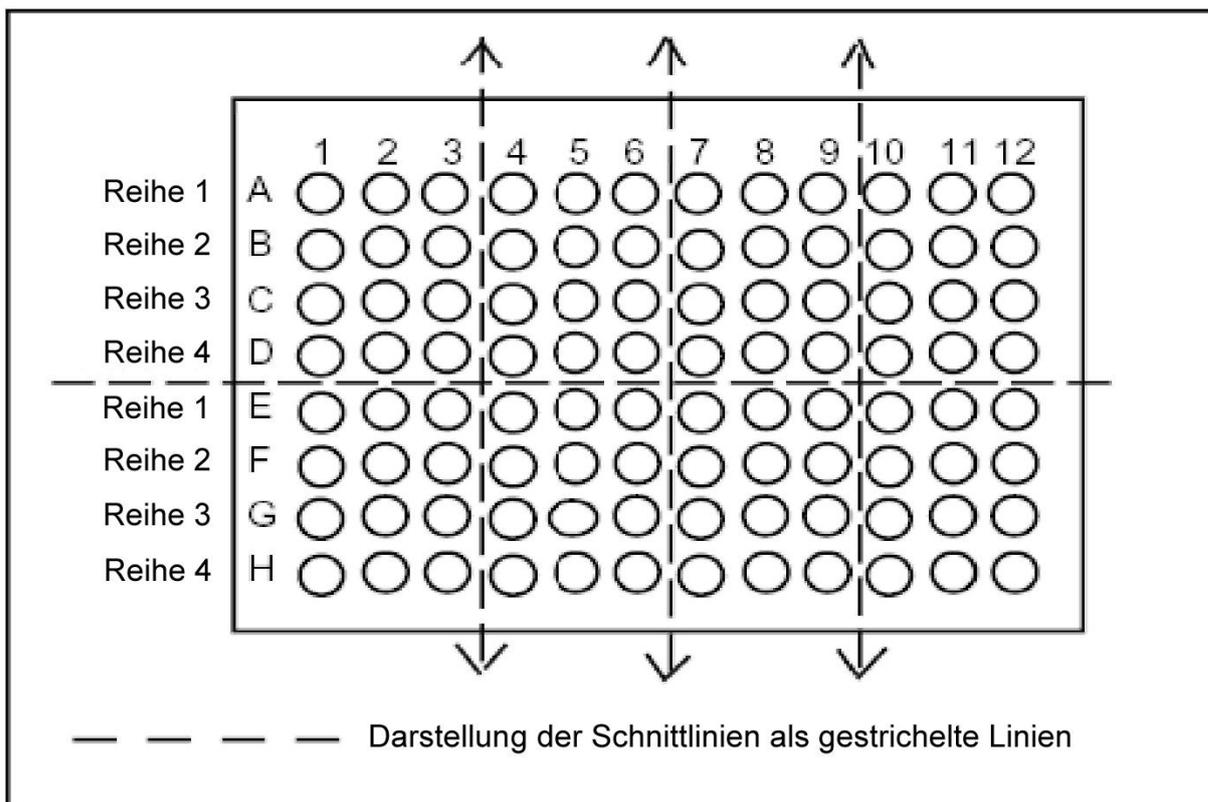
1. Hinzufügen von 0,1 ml oder 5 Tropfen Substrat S1 in jede Vertiefung der Linien 1 und 2;
2. Hinzufügen von 0,1 ml oder 5 Tropfen Substrat S2 in jede Vertiefung der Linien 3 und 4;
3. Für 5 min in den Inkubator stellen (37°C);
4. Entnahme der Platten zur Analyse.



**V. ANLEITUNG FÜR LEHRER**

**Zeiteinschätzung**

1. Für die Vorbereitung der Reagenzien benötigt man ca. 90 min.
2. Die experimentelle Arbeit des Schülers dauert ca. 60 min.



**Vorbereitung der ELISA-Arbeitsgänge**

- ⇒ Mikroplatten: die Mikroplatten werden wie im Schema (siehe Abbildung 1) aufgeteilt.
- ⇒ Zerschneiden der Mikroplatten entlang der gestrichelten Linie: jede Gruppe erhält eine Platte die 3 Spalten x 4 Linien groß ist.

## Am gleichen Tag vorbereiten!

### Depots in den Reihen A bis D:

- Es wird eine ungebrauchte Pipette (1 ml) benutzt um das Antigen (A) in die dafür vorgesehenen Röhrchen des Kits zu geben. 10 Röhrchen werden mit "Ag" markiert und je Röhrchen 0,6 ml eingefüllt.
- Es wird eine ungebrauchte Pipette (1 ml) benutzt um die Primär-Antikörper (B) in die dafür vorgesehenen Röhrchen des Kits zu geben. 10 Röhrchen werden mit "Ig 1" markiert und je Röhrchen 0,6 ml eingefüllt.

### Vorbereitung der Pufferlösung:

- Hinzufügen des Salz-Konzentrats (G) zu 135 ml destilliertem Wasser. Mischen.
- Markierung als PBS.
- Aufteilen von je 12 ml in 10 kleine Messbecher für die 10 Laborgruppen.

### Konjugat aus Peroxydase und Anti-IgG (Sekundär-Antikörper)

- 0,3 ml Pufferlösung werden zu dem konzentrierten Peroxydase-Anti-IgG-Konjugat (C) hinzugefügt. Durch Schütteln und Umdrehen vermischen.
- 6 ml Pufferlösung werden in ein bereitgestelltes Plastikröhrchen übertragen
- Der gesamte Inhalt des Röhrchens G (in Schritt 4 hergestellt) wird in das Röhrchen mit den 6 ml Pufferlösung gegeben. Markieren des Röhrchens als " Ig 2" (Sekundär-Antikörper). Mischen.
- Jede Gruppe erhält 0,6 ml des verdünnten Peroxydase-Anti-IgG-Konjugats.

### Vorbereitung des Peroxydase-Substrats (15 – 30 min vor der letzten Inkubation)

- 9 ml Pufferlösung werden in das zweite 15ml-Röhrchen gegeben.
- Hinzufügen des Peroxid-Co-Substrats (E) zu den 9 ml Pufferlösung. Schließen und schütteln (von Hand oder elektrisch mittels Vortex-Rüttler). Meistens löst sich nicht alles.
- Hinzufügen von 1 ml Wasserstoff-Peroxydase (D). Schließen und Schütteln.
- Jede Gruppe erhält 0,75 ml des Peroxydase-Substrats (S1).

### Aufteilen der Bestandteile F

1. Jede Gruppe erhält 0,75 ml des ABTS-Substrats.

A*	Antigen	Ag	0.6 ml
B*	Primär-Antikörper	Ig 1	0.6 ml
C + PBS	anti IgG-Peroxydase-Konjugat	Ig 2	0.6 ml
PBS + D + E	Substrat-Enzym-Peroxydase **	S1	0.75 ml
F	ABTS-Substrat	S2	0.75 ml

G + Wasser	Phosphat-Salz- Pufferlösung	PBS	12 ml
------------	--------------------------------	-----	-------

- ⇒ \* Die Substrate A und B sollen am Tag des Versuchs Zimmertemperatur haben.
- ⇒ \*\* Die Substrat-Enzym-Peroxydase soll 15-20 min vor der letzten Inkubation vorbereitet werden.

**Jede Gruppe benötigt:**

- 1 Abschnitt der aufgeteilten Mikroplatte
- 1 Röhrchen "Ag"
- 1 Röhrchen "Ig 1"
- 1 Röhrchen "Ig 2"
- 1 automatische Pipette (optional)
- 10 Transferpipetten
- 1 Messbecher mit Pufferlösung
- 1 leerer Messbecher mit der Aufschrift Abfälle
- 1 Röhrchen "S1" (vor der letzten Inkubation)
- 1 Röhrchen "S2" (vor der letzten Inkubation)

**Ergebnis-Erwartungen**

Siehe den englischsprachigen Teil der Anleitung, **Seite 14** "*expected results*"