

HIV-Diagnose – E.L.I.S.A.



Alle in diesem Versuchs-Kit enthaltenen Bestandteile dienen ausschließlich pädagogischen Zwecken. Sie dürfen keinesfalls zu Diagnosezwecken benutzt oder von Lebewesen konsumiert werden.

VERSUCHSZIEL

Durch selbsttätiges Arbeiten wird mit diesem Versuch sowohl die Erarbeitung als auch ein vertieftes Verständnis der Molekularbiologie des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) und der Pathogenität des erworbenen Immunschwäche-Syndroms vermittelt.

Der ELISA-Test, der zu diesem Zwecke angewandt wird, sowie die darin enthaltenen Konzepte werden im Zusammenhang mit der klinischen Untersuchung von Serum-Proben nach Antikörpern des HI-Virus eingeführt.

Lagerung:

Alle Bestandteile müssen im Kühlschrank aufbewahrt werden!

Mit diesem Kit können 10 Gruppen gleichzeitig arbeiten.

INHALT

- A HIV-Antigene (simuliert)
- B Positivkontrolle/ Kontrollmittel (Primärantikörper)
- C Serum "Spender 1" (synthetisch)

- D Serum "Spender 2" (synthetisch)
- E Anti-IgG-Peroxidase-Konjugat (Sekundärantikörper)
- F Wasserstoffperoxid (stabilisiert)
- G Aminosalicyl-Säure (Peroxid CoSubstrat)
- H konzentrierter Phosphatpuffer
- 2 Mikrotitrationsplatten
- 50 Mikropipetten
- 60 Reagenzgläschen mit Deckel
- 25 Pipetten (1 ml)
- 2 Plastikröhrchen (50 ml)

Dieser Versuch enthält weder das HI-Virus noch seine Bestandteile. Kein Inhaltsstoff ist menschlicher Herkunft.

Weiteres benötigtes Material:

- Messbecher
- Inkubator (37°C)
- Wegwerfbrillen und -handschuhe
- Es wird empfohlen Mikropipetten zu benutzen.

Vergewissern Sie sich, dass die Glaswaren sauber, trocken und frei von Seifenrückständen sind.

AIDS ist eine Krankheit, während deren Voranschreitens sich das Immunsystem eines Individuums schrittweise verschlechtert. Diese Schwächung des Immunsystems ermöglicht es Krankheitserregern wie Viren, Bakterien, Pilzen oder Parasiten leichter in den Körper einzudringen.

Des Weiteren steigt die Anfälligkeit für Krebs bei den Betroffenen, da körpereigene Zellen mit Erbschäden nicht erkannt bzw. beseitigt werden.

AIDS stellt für die gesamte Menschheit eine ernstzunehmende gesundheitliche Bedrohung dar. Daher werden intensive Nachforschungen unternommen, um neue Methoden zur Bestimmung, Behandlung und Prävention von AIDS zu entwickeln und voranzubringen. Der Überträger der syndromatischen Krankheit AIDS (HIV-1) ist der erste Typ des HI-Virus, ein Retrovirus. Retroviren enthalten ein RNA-Genom und die entsprechende reverse Transkriptase.

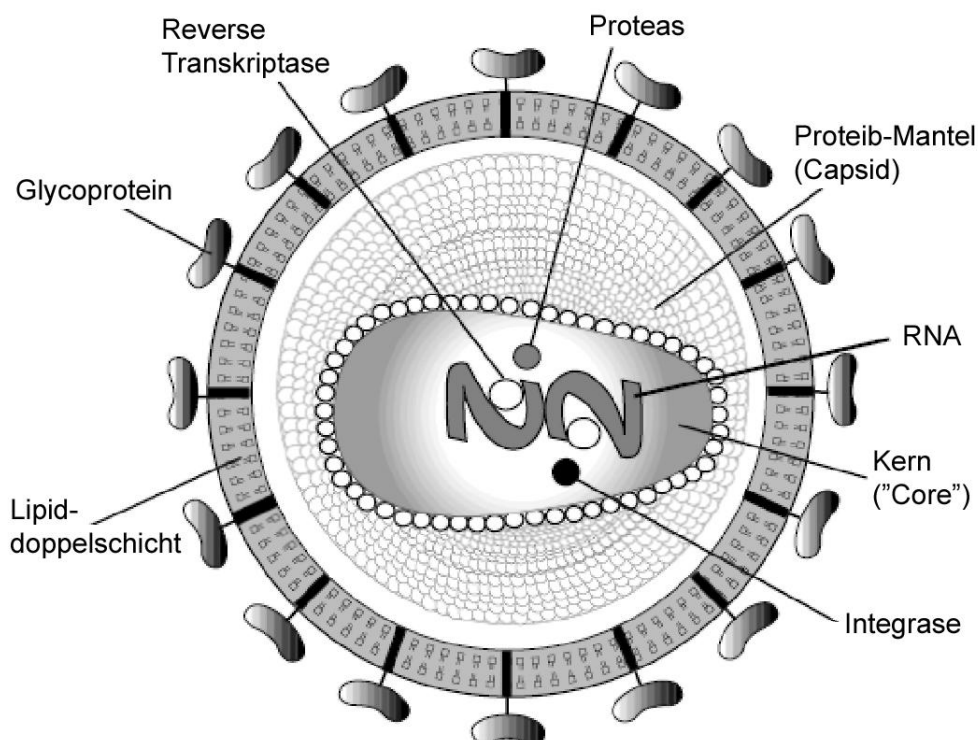
Verwandte Retroviren kommen bei verschiedenen Leukämietypen und anderen Sarkomen bei Mensch und somit auch bei Tieren vor.

Die Struktur und die Replikationsmechanismen des HI-Virus sind sehr ähnlich denen der anderen Retroviren. In einigen seiner Eigenschaften ist HIV jedoch einzigartig, so wie es spezifisch gegen Zellen gerichtet ist.

Die viralen Bestandteile des HIV sind von einer zweischichtigen Zellmembran aus Lipidderivaten umgeben, die während des Ausknospens von der Wirtszelle übernommen wird. Die viralen Proteine werden als gp (Glycoprotein) oder p (Protein) gekennzeichnet, gefolgt von einer Zahl, die das ungefähre Molekulargewicht in Kilodalton angibt. Die Lipiddoppelschicht enthält gp 160, gp 120 und gp 41. Gp 41 verankert das gp 120 in der Membran. Unter der Membran befindet sich ein Capsid, das sich aus p 17 und p 18

zusammensetzt. Innerhalb dieser Schale liegt der „Kern“ („Core“) des Virus. Die Wand des Core setzt sich aus p 24 und p 25 zusammen. Innerhalb des Core gibt es zwei identische RNA-Moleküle von etwa 9000 Nukleotiden Länge. Der Wasserstoff, der an jede RNA gebunden ist, ist ein zelluläres Molekül der tRNA. Der Core enthält zudem ungefähr 50 Moleküle der reversen Transkriptase.

Das Virus kann in größeren Mengen in einer geschlossenen Zellkultur zu Diagnose- und Forschungszwecken kultiviert werden. Mehrere virale Proteine wurden so in relativ großer Anzahl kopiert und exprimiert.



Mechanismus der HIV-Infektion

Ein Lebewesen kann durch einen Schleimhautabrieb (z.B. der Vaginal- oder Rektalschleimhäute), eine Bluttransfusion oder eine Injektion mit einer verschmutzten Nadel mit HIV infiziert werden. Das Virus oder die viralen Zellen befinden sich in Körperflüssigkeiten wie beispielsweise Sperma oder Blut. Während den Anfangsstadien der Infektion bei einer immunkompetenten Person verursacht das Virus humorale und zelluläre Antworten, die eine massive IgG-Zirkulation gegen die viralen Bestandteile zur Folge haben. Da das Virus jedoch eine sehr hohe Mutationsrate hat, entkommen immer wieder einige Varianten der Überwachung durch das Immunsystem. Im Vergleich zu anderen DNA-Polymerasen hat die DNA-Polymerase des HI-Virus (reverse Transkriptase) eine erhöhte Fehlerrate (1 von 10000). Diese Mutationen verändern kontinuierlich die viralen Protein-Epitope, was wohl der wichtigste Mechanismus des HI-Virus zur Immun-Invasion ist.

Wichtigstes Ziel des Virus sind die hämatopoetischen Stammzellen wie die Rückenmarkszellen, die Myelocyten, und die Lymphozyten. Die Infektion der Zellen, die wie die T-Zellen und die Makrophagen für Verschaltungen und Anregung der Immunantwort im Immunsystem wichtig sind, verursachen im Endeffekt die größten Probleme. Gp 129 verbindet sich mit den CD4-Rezeptoren auf der Oberfläche der T-Helferzellen (TH). Diese Rezeptoren sind an der Membran fixierte Glykoproteine und sind in den Reifungsprozess der T-Zellen involviert (von den Vorläuferzellen an). T-Helferzellen sind für die Immunantwort notwendig. Die Lipid-Doppelschicht verbindet sich mit der Zellmembranen und das virale Capsid wird durch Endocytose aufgenommen. Später dringt der Rest der CD4-Rezeptoren ein und das gp120 erscheint auf der Oberfläche der T-Zellen.

Replikation und Transkription von HIV

Mittels eines komplexen Mechanismus von verschiedenen Schrittfolgen synthetisiert die reverse Transkriptase eine Kopie eines doppelsträngigen DNA-Stranges anhand der Vorlage genomischer RNA. Ein tRNA-Molekül dient als Primer für die Synthese des ersten Strangs. Die reverse Transkriptase, die eine RNase H –Aktivität hat, stuft den RNA-Strang des Duplex RNA-DNA herab und die Polymerase synthetisiert einen zur DNA komplementären Strang. Die transkribierte reverse Transkriptase wandert in den Zellkern, wo sie kovalenter mit der zellulären DNA verbunden wird.

Die integrierte DNA wird als provirale DNA oder Provirus bezeichnet. Das Provirus befindet sich nun in einer Latenzzeit, die mehrere Jahre dauern kann. Die provirale DNA verbindet sich mit der zellulären DNA und kann folglich auch vererbt werden.

Die provirale DNA des HI-Virus enthält die für alle nicht transduktorischen Retroviren gleichen wichtigen Gene. Diese Gene sind gag., pol. und env. Des Weiteren enthält HIV 5 oder 6 andere Gene, die wesentlich kleiner sind. Die retrovirale Transkription ist ein komplexer Prozess, bei dem eine Vielzahl und große Varietät von RNAs produziert wird. Die transkribierten RNAs bleiben ungeteilt und werden in neue virale Bestandteile verpackt. Das Gen gag. wird in Polypeptide übersetzt, das von einer viralen Protease in vier Proteine aufgespaltet wird, die die inneren Schalen bilden. Spezifische Protease-Inhibitoren werden eingesetzt, das Protein zu hemmen und die Ausbreitung des HI-Virus bei dem Patienten voran zu treiben. Das Gen pol. kodiert die reverse Transkriptase und die Integrase, die für die genomische Eingliederung der DNA-Kopie verantwortlich ist. Das Gen env. kodiert für die äußeren Glycoproteine, die die Viruspartikel beim Ausknospen aus den Wirtszellen erhalten.

Immunantwort

Replikation und Transkription von HIV im Verlauf der Immunantwort: Makrophagen sind zirkulierende Monozyten, die bei der Verklumpung unspezifischer Fremdkörper und Zellresten eine wichtige Rolle spielen.

Die verfallenen Proteinpeptide werden an die Oberfläche eines Makrophage gebracht, wo sie an spezifische Rezeptoren gebunden werden. Die T-Helferzellen (immunologisch inaktive Zellen) interagieren mit den Antigen-Rezeptor-Komplexen der Membran und nehmen ihre Funktion auf.

HIV infiziert die Makrophagen, indem es sich an die CD4-Rezeptoren der Zellen bindet. Die von den T-Helferzellen aktivierten Zellen geben mehrere Proteine frei, die als Lymphokine bezeichnet werden. Viele davon sind Interleukine, die das Zellwachstum anregen und die

cytotoxischen T-Zellen aktivieren. Cytotoxische T-Zellen sind in die Vorgänge der Fremdzellenzerstörung und der Zerstörung von Viren befallener Zellen integriert. Die inaktiven vom HI-Virus infizierten T-Helferzellen bleiben in einem Ruhezustand, ähnlich dem der nicht infizierten Zellen. Wenn eine T-Helferzelle, die das Virus enthält, eine Antigen-Aktivierung durchmacht, wird die die Kopien enthaltende DNA frei für die Transkription der viralen RNA.

Die virale Replikation verursacht die Zerstörung der T-Helferzellen. Die infizierten Zellen bilden außerdem Syncytien (Zellzusammenschlüsse). Nun verbindet sich das gp 120 (auf der von T-Zellen infizierten Oberfläche) mit den CD4-Rezeptoren anderer T-Helferzellen. Die Umwandlung von gesunden Zellen zu Zellen, die das Virus enthalten breitet sich in dem Syncytium aus, ohne dass weitere Faktoren eine wichtige Rolle spielen. Die Replikation des Virus geschieht ebenfalls in den aktivierten Makrophagen, die den eigenen Zelltod einleiten und somit virale Bestandteile freisetzen. Dadurch wird der komplette Zusammenbruch des Immunsystems verursacht.

Die lange Latenzzeit nach der HIV-Infektion kann im Zusammenhang der Aktivierung der T-Helferzellen verstanden werden.

Nur bestimmte T-Helferzellen sind dazu in der Lage, auf ein bestimmtes Antigen zu antworten. Die infizierten Individuen, die keine Symptomatik für HIV zeigen, verhalten sich wie wenn sie chemischen Produkten, Viren und Bakterien ausgesetzt sind. Nach Krankheitswellen verringert sich die Menge der T-Helferzellen und Makrophagen drastisch und AIDS beginnt sich zu entwickeln. Eine kleine Anzahl von Individuen hat mehr als 15 Jahr mit dem Virus in Koexistenz gelebt. Obwohl die Gründe für diese Koexistenz nicht nachvollziehbar sind, scheint das Immunsystem intakt zu bleiben. Die Infizierten essen in der Regel gut und unternehmen Techniken zur Stressreduktion.

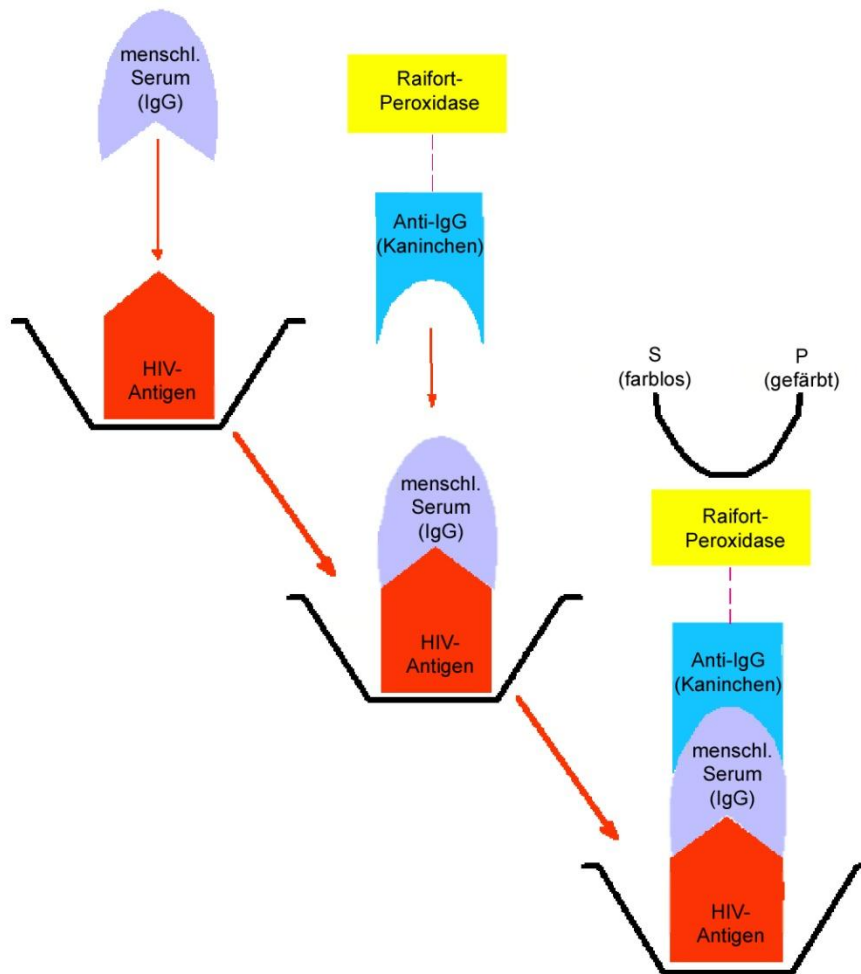
Mittels einer genetischen Analyse lässt sich bestimmen, ob nicht geringfügige genetische Unterschiede im Immunsystem signifikante Faktoren darstellen.

Beschreibung der Technik

ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) wurde ursprünglich zur Dosierung von Antikörpern entwickelt. Ebenfalls diente der Test dazu, bestimmte Proben zu bestimmen, die Antigene enthalten.

Dieser Versuch (Simulation von ELISA) ist auf die Auffindung zirkulierender IgG eines hypothetischen Patienten ausgerichtet.

ELISA-Tests werden auf Mikrotitrationsplatten durchgeführt. Die Platten sind transparent und enthalten kleine Vertiefungen, in die die flüssigen Proben eingebracht werden. Die Antigene werden ebenfalls in die Taschen gefüllt, wo sie über hydrophobe Bindung an die Wand adsorbiert werden. Die Antigene können entweder ein HIV-Lysat, spezifische Proteine des HIV oder eine Mischung aus beidem sein. Es gibt keine Spezifität bei dem Adsorptionsprozess. Es gilt nur zu beachten, dass manche Substanzen weniger gut an der Wand binden. In manchen Fällen können die Antigene mittels UV-Licht an das Plastik gebunden werden.



Nachdem das überschüssige Material entfernt wurde (welches nicht an die Wand gebunden worden ist), werden die Stellen der Vertiefungen, wo keine Antigene gebunden haben mit Proteinen blockiert (meist Gelatine- oder Rinder- Serumalbumine). Wenn bei diesem Versuch Antikörper in den Plasmaproben vorkommen, verbinden sie sich mit den in den Taschen adsorbierten Antigenen und bleiben auch nach einer Waschung dort. Eine Lösung, die an menschliche IgG bindende IgG-Antikörper enthält, wird in die Vertiefungen gegeben. Wenn der Primärantikörper in der Vertiefung geblieben ist, verbindet sich der Sekundärantikörper mit ihm und auch er bleibt nach der Waschung dort. Diese Sekundärantikörper werden meist von Kaninchen oder Ziegen entnommen, die mit menschlichen IgG immunisiert wurden. Die zweiten IgG-Antikörper sind an die Raifort-Peroxydase gebunden. Diese Modifikation beeinflusst die Spezifität und die notwendige Affinität des Antikörpers ebenso wenig wie enzymatische Peroxidase-Aktivität. Nach der Waschung wird eine Lösung hinzugegeben, die Wasserstoff-peroxyd und Aminosalicylate enthält. Die Peroxydase hat eine ausgesprochene Katalyseaktivität und kann 10^6 Turnovers pro Sekunde durchführen. Viele Wasserstoff enthaltenden Cosubstrate können von der Peroxydase umgesetzt werden. Diese Cosubstrate enthalten Osiansidine, Aminoantipyrene, Aminoslicysäure und zahlreiche Phenolverbindungen, die bei Oxidation eine Farbentwicklung zeigen.

Die zugegebene Substratlösung ist fast farblos. Die Peroxidase wandelt das Peroxid in $H_2O + O_2$ um und verwendet dabei das Salicyclat als Wasserstoffgeber. Das oxidierte Salicyclat ist braun gefärbt und kann leicht in den Taschen festgestellt werden, die anti-HIV-1 IgG (positives Plasma) enthalten.

Die unterschiedlichen Immunisierungen mit dem gleichen Antigen im gleichen Tier können gleichermaßen Affinitäten bei verschiedenen Bindungen verursachen. Der Gebrauch einfach geklonter Antikörper, die gegen ein einfaches Epitop gerichtet sind, verhindert diese Variabilität. Die Analyse der positiven Proben mittels WESTERN BLOT wird dazu eingesetzt, eine HIV-Infektion zu bestätigen.

Versuchsziel

Ziel des Versuchs ist es die Molekularbiologie des HI-Virus nachzuvollziehen. Die experimentellen Konzeption und Methodik von ELISA wird im Zusammenhang mit der Überprüfung von Serumproben nach Virusantikörpern unter Simulation klinischer Bedingungen betrachtet. Sicherheitshandschuhe und -brillen müssen immer getragen werden.

Anleitung

- Markieren der Mikrotitrationsplatten
- Platten - wie in Abb. 2 gezeigt - vertikal hinstellen (siehe Originalbeschreibung)
- Notieren der Gruppennummer; nummerieren der Reihen von 1 – 4

5 Pipetten folgendermaßen nummerieren:

- (-) (negativ)
- (+) (positiv)
- Ds 1 (Serum De Verteiler 1)
- Ds 2 (Serum De Verteiler 2)
- PBS (Salz durch Phosphat geschützt)

Die Pipetten müssen genau so eingesetzt werden, wie es angegeben ist!

Durchführung des experimentellen Nachweises

Brutschrank auf 37°C vorwärmen.

Anleitungen zum Einbringen der Flüssigkeiten und Waschen der Taschen.

Um die Reagenzien in die Taschen einzufüllen wird immer die gleiche Pipette benutzt.

Die Pipette muss immer komplett mit destilliertem Wasser gereinigt werden, bevor die nächste Reagenzie damit eingebracht werden kann.

Leerung der Taschen und Waschung:

Immer die richtige Pipette benutzen.

- a) Die mit "PBS" markierte Pipette wird benutzt um PBS in die Taschen aller Reihen zu füllen bis sie fast voll sind. Die Kapazität jeder Tasche liegt etwa bei 0,2 ml. Keine Flüssigkeit darf in die Nachbartasche gelangen.
- b) Mit den entsprechenden, zuvor markierten (und mit Spitzen versehenen) Transferpipetten wird alle Flüssigkeit (PBS) aus allen Taschen entnommen und in den Abfallbecher gefüllt.

Abfolge des ELISA-Tests

1. Hinzufügen von 0,1 ml "HIV" (virale Antigene) in jede der 12 Taschen.
2. Minuten bei gleichbleibender Temperatur inkubieren.
3. Entnahme der Flüssigkeit (virale Antigene) mit einer eigenen Pipette (Spitze).
4. Einmaliges Waschen jeder Tasche mit PBS wie oben beschrieben ("Leerung der Taschen und Waschung"). *In Forschungslaboren werden nach diesem Schritt alle freien Stellen der Wand der Mikrotitrationsplatte mit einer Blockier-Lösung saturiert, die aus einem Proteingemisch (wie Rinderserumalbumin, BSA) besteht. Um Zeit zu sparen wird hier dieser Schritt ausgelassen.*
5. Hinzufügen der Reagenzien: *(Die Pipetten müssen nach jeder Benutzung gereinigt werden.)*
 - Hinzufügen von 0,1 ml Pufferlösung zu den 3 Taschen der Reihe 1 (Negativprobe)
 - Hinzufügen von 0,1 ml "+" (positiv) zu den 3 Taschen der Reihe 2 (Positivprobe)
 - Hinzufügen von 0,1 ml des Serums "DS 1" in die Taschen der Reihe 3
 - Hinzufügen von 0,1 ml des Serums "DS 2) in die Taschen der Reihe 4
6. 15 Minuten inkubieren (37°C);
7. Alle Flüssigkeit wird mit der jeweils richtigen Pipette entnommen.
8. Waschen jeder Tasche mit PBS;
9. Hinzufügen von 0,1 ml des Peroxydase/Anti-IgG-Konjugats in jede der 12 Taschen;
10. 15 min inkubieren (37°C); *zu diesem Zeitpunkt kann das für Schritt 13 benötigte Substrat hergestellt werden. Da das Substrat erst kurz vor der Benutzung hergestellt werden sollte, erfolgt dies gegen Ende von Schritt 10.*
11. Die Flüssigkeiten werden mit der jeweils richtigen Pipette entnommen.
12. Waschen der Taschen mit PBS;
13. Hinzufügen von 0,1 ml Substrat in jede Tasche;
14. 5 min inkubieren (37°C);
15. Betrachten der Mikroplatte;
16. Wenn nach 5 min noch keine deutliche Farbentwicklung erfolgt ist, weiter inkubieren (37°C).

Zur Beachtung:

Hinzufügen der Reagenzien: Vergewissern Sie sich, dass die Pipette vor der nächsten Benutzung mit einem neuen Reagenz gereinigt wurde. (Schritte 1, 5, 9 und 13). Bei automatischen Mikropipetten muss stets eine neue Spitze aufgesetzt werden.

Leeren der Taschen:

Verwendung der richtigen Pipetten für jedes Produkt beim Füllen (Schritte 3, 7 und 11) und bei der Wachtung (Schritte 4, 8 und 12)

Pipette (-) Reihe 1

Pipette (+) Reihe 2

Pipette DS 1 Reihe 3

Pipette DS 2 Reihe 4

Die Abfallprodukte werden in einen Abfallbecher gefüllt.

Waschen der Taschen:

Die mit "PBS" markierte Pipette wird verwendet, um PBS in die Taschen aller Reihen zu füllen bis sie fast voll sind. (Schritte 4, 8 und 12).

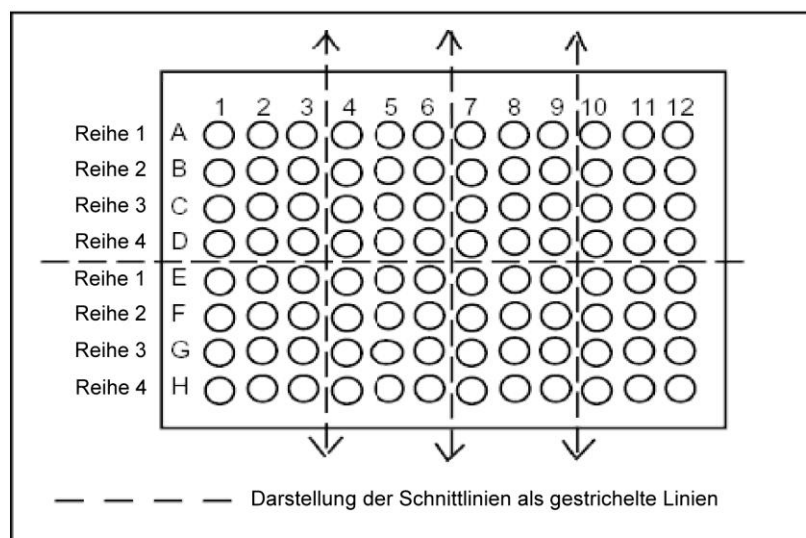
Anmerkung:

Die Positivkontrolle, die die gegen die HIV-Antigene gerichteten IgG enthält, entspricht dem Primäranti-körper. Die positiven Serumproben enthalten ebenfalls Anti-HIV-IgG, während die negativen Serumproben kein Anti-HIV-IgG enthalten.

Anleitung für den Lehrer

Schätzung der für den Versuch benötigten Zeit:

1. Vorbereitung der Reagenzien: ½ Stunde
2. Versuchsdurchführung durch den Schüler: 60 min



Vorbereitung der Durchführung

- Mikroplatten: siehe Schema oben
- Schneiden der Mikroplatten entlang der gestrichelten Linien: jede Gruppe erhält eine Platte von 3 Spalten x 4 Reihen

Depots der Reihen A-D

- Die entsprechende Pipette wird benutzt, um die Reagenzien direkt aus dem Röhrchen in die Vertiefungen zu füllen.
- Die Röhrchen sollten markiert und in den unten angegebenen Mengen aufgeteilt werden.

Vorbereitungen am gleichen Tag

Pufferlösung

1. Hinzufügen der konzentrierten Salzlösung (H) zu 270 ml destilliertem Wasser. Mischen.
2. Beschriften "PBS"
3. Für jede der 10 Gruppen werden 25 ml der Pufferlösung in kleine Becher aufgeteilt.

Peroxydase/Anti-IgG-Konjugat (Sekundärantikörper)

1. Hinzufügen von 0,3 ml PBS zu dem konzentrierten Peroxydase/Anti-IgG-Konzentrat (E). Gut mischen.
2. 15 ml PBS werden in ein Plastikröhrchen (50 ml) gefüllt.
3. Der Inhalt des Röhrchens E wird in das 50 ml Röhrchen, das bereits 15 ml PBS enthält, gefüllt. Als "2° Ab" markieren. Mischen.
4. Jede Gruppe erhält 1,4 ml des verdünnten Peroxydase/Anti-IgG-Konjugats.

Vorbereitung des Peroxydase-Substrats

(15 – 30 min nach der vor der letzten Inkubation)

1. 13,5 ml PBS werden in ein zweites Röhrchen (50 ml) gefüllt.
2. Hinzufügen von Aminosalicyl-Säure (G). Schütteln. Es sollten keine ungelösten Bestandteile übrig bleiben.
3. Hinzufügen von 1,5 ml Wasserstoffperoxyd (F). Schließen und mischen.
4. Jede Gruppe erhält 1,4 ml des Peroxydase-Substrats.

Das Substrat wird für die Peroxydase vorbereitet, die an das Peroxydase/Anti-IgG-Konjugat (Sekundärantikörper) gebunden ist. Das Substrat sollte erst 15 – 30 min vor Gebrauch vorbereitet werden.

Die Inhaltsstoffe A-D können bereits am Vorabend aufgeteilt und im Kühlschrank aufbewahrt werden. Wenn sie am gleichen Tag vorbereitet werden, können sie bis zum Gebrauch bei Zimmertemperatur stehen bleiben.

Jede Gruppe benötigt:

A HIV ag HIV 1,4 ml

B Positivprobe + 0,4 ml
C Serum # 1 DS 1 0,4 ml
D Serum # 2 DS 2 0,4 ml
E + PBS Anti-IgG-Peroxydase-Konjugat 2°Ab 1,4 ml
PBS + F + G Peroxydase-Enzym Substrat Substrat 1,4 ml
H + Pufferlösung PBS 25 ml

Außerdem:

- 1 Stück der Mikroplatte
- 1 Röhrchen "HIV"
- 1 Röhrchen "+"
- 1 Röhrchen "DS 1"
- 1 Röhrchen "DS 2"
- 1 Röhrchen "2Ab"
- 1 Pipette (1ml)
- 5 Transferpipetten
- 1 Becher mit 16 ml PBS
- 1 Becher mit 100 ml destilliertem Wasser
- 1 leerer Becher "Abfall"
- 1 Röhrchen "Substrat" (kurz vor der letzten Inkubation)