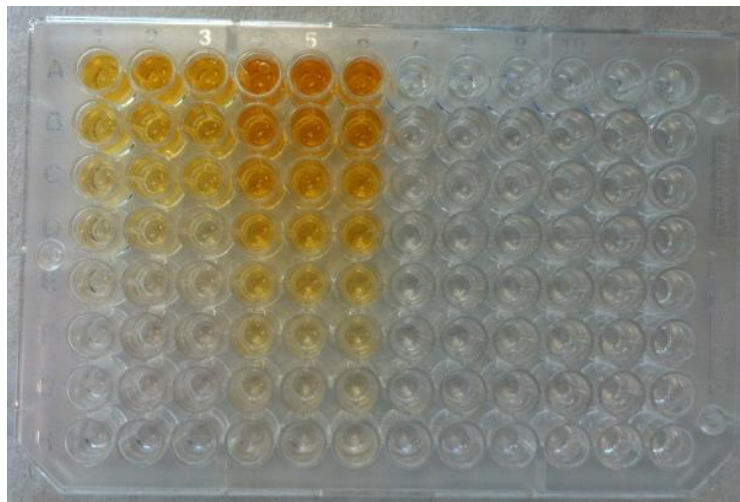


ELISA

Kvantitativ bestemmelse af human IgA i brystmælk

Elevvejledning.



Professionshøjskolen University College Nordjylland

Laborantafdelingen

2012



Indledning

En kvinde føder og bliver mor til sit barn. På fødeafdelingen anbefales kvinden at amme sit barn, og det er der mange gode grunde til. Dels er det en nem, bekvem og billig måde at give barnet mad på, dels får amningen kvindens livmoder til at trække sig sammen til normal størrelse, og endelig giver modermælken barnet antistoffer der beskytter barnet mod infektioner, indtil barnet opbygget sit eget immunforsvar. Hvis barnet ikke udvikler sit eget immunforsvar, vil det ikke kunne leve en normal tilværelse, da det ustandseligt vil blive sygt og ikke selv være i stand til at komme over de forskellige sygdomme. Immunforsvaret er på en måde barnets indre læge. Barnet vil igennem sin tilværelse blive udsat for mange sygdomsfremkaldende mikroorganismer og afhængigt af immunforsvarets effektivitet, vil barnet forblive rask eller sygt. (Fysiologibogen- den levende krop)

Sikkerhed:

Biologisk smittefare: da der arbejdes med humant serum og kropsvæsker (brystmælk) **skal eleverne arbejde med handsker hele tiden**. Væskerne der arbejdes med er dog meget fortyndede og dermed er risiciene reduceret.

Human serum protein calibrator: produktet indeholder natrium azid, NaN_3 . Skyl efter med rigeligt vand for at undgå metal-azid ophobning i afløb.

Affaldsbehandling:

Indtil pkt. 2.7 i øvelsesvejledningen (tilsætning af enzymsubstrat til brøndene) kan vaskeaffaldet blot skylles ud i vasken og behøver ikke blive opsamlet.

Efter at enzymsubstratet er tilsat brøndene skal **væsken opsamles i passende og tilgængelig affaldsbeholder**. Der medfølger en affaldsbeholder, som affaldet kan sendes retur i, hvis skolen ikke

selv ønsker at bortskaffe affaldet. Den opsamlede væske skal bortskaffes som affald af kategori H (OPD er et organisk molekyle)

Tips og tricks:

- 1) Eleverne skal forsøge i videst muligt omfang at holde overfladen af titerpladen tør således, at de kan påkludre plastfolien uden, at der trækkes væske ud under folien. Derved kan man kontaminere brøndene.
- 2) Eleverne instrueres grundigt i brugen af pipetterne og understreg kraftigt, **at pipetterne ikke må vendes på hovedet, når der er væske i pipettespidsen**. Herved løber væsken ind i pipettens mekanik og beskadiger denne.
- 3) Det er vigtigt, at man ikke kontaminerer brøndene ved at få væske fra en brønd ført over i en anden.

1. Princip

Der opstilles et enzym immun assay kaldet ”direkte sandwich ELISA”.

Fortyndinger af prøver og standarder udføres i en titerplades brønne, som i forvejen er coatede med specifikt antistof, Kanin Anti-Human IgA.

Prøvens/standardens antigener bindes til det coatede antistof.

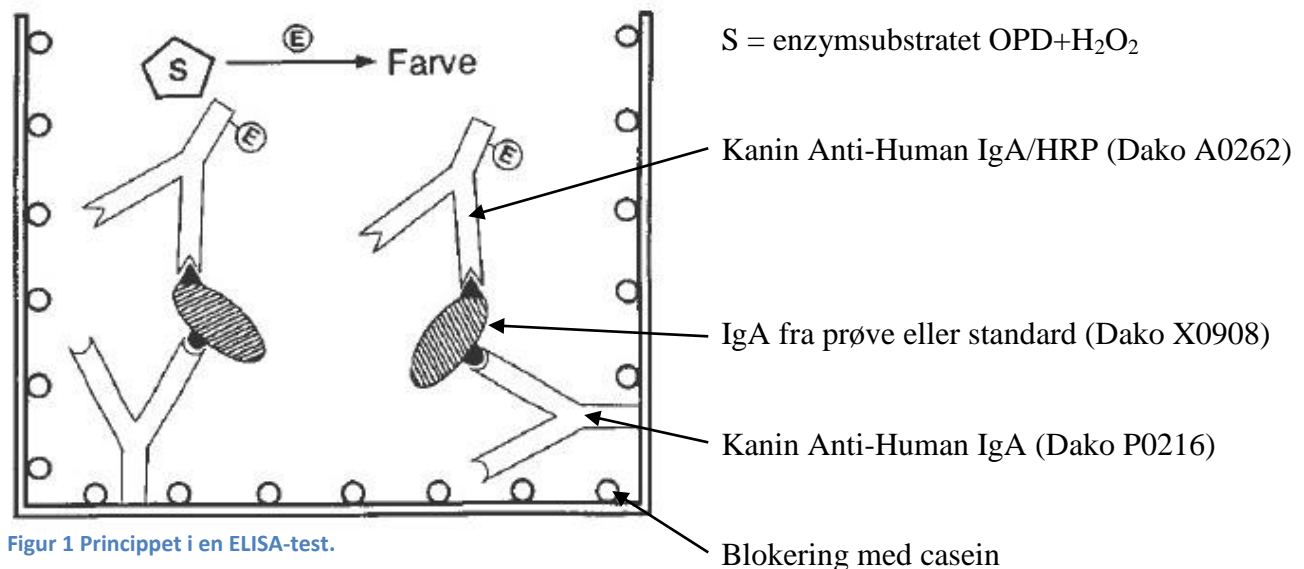
Ubundet materiale fjernes ved vask af brønden.

Herefter tilsættes endnu et antistof med et tilknyttet enzym, Kanin Anti-Human IgA/HRP (HRP = Horseradish Peroxidase).

Efter inkubation fjernes overskydende enzymkonjugat ved vask.

Mængden af bundet enzymkonjugat bestemmes ved at tilsætte et substrat, OPD (1,2-phenylen-diamin dihydrogenchlorid) med H_2O_2 , som sammen med stopreagens ($0,5\text{ M }H_2SO_4$) udvikler en orange farve.

Farvesignalet aflæses spektrofotometrisk. Denne farveudvikling er direkte proportional med den oprindelige mængde af IgA i prøven.



Figur 1 Princippet i en ELISA-test.

Figur 1 viser en brønd med antistoffer og antigen bundet til hinanden.

2. Fremgangsmåde:

1. BLOK.

SIKKERHED !!

Da der arbejdes med humant serum, benyttes handsker gennem hele analyseforløbet.

2.1. Coatning af titerplade

Koncentrationen af antistof i den medfølgende coatningsbuffer er ca. 10 mg/L protein (Dako A 0262).

Brøndene fyldes med coatningsbuffer, dette gøres med en 8-kanals pipette. Der kommer i alt 320 µL coatningsbuffer i hver brønd (det kan være en fordel af putte lidt mindre i hver brønd eks. 300 µL coatningsbuffer, da det kan være svært ikke at få det til at skumme og flyde over i andre brønde).

Titerpladen dækkes med plastfilm, og sættes ved 4⁰C natten over (pladen kan godt stå et par dage i køleskab).

Efter coatning vaskes titerpladen på den måde som beskrives i det følgende.

2. BLOK:

2.2. Vaskeprocedure

Der vaskes med vaskebuffer og alle brøndene skal vaskes 5 gange.

Vaskeren suger, når der ikke trykkes på den sorte knap og vaskeren fylder buffer i brøndene, når der trykkes på den sorte knap. Vask de 8 brønde i kolonne 1 fem gange først, vask dernæst de 8 brønde i kolonne 2 fem gange o.s.v. Sørg for **IKKE** at få væske fra brøndene i én kolonne med over i den næste kolonne ved at trække væske fra forrige brønde hen over titerpladen.

2.3. Blokering af titerplade

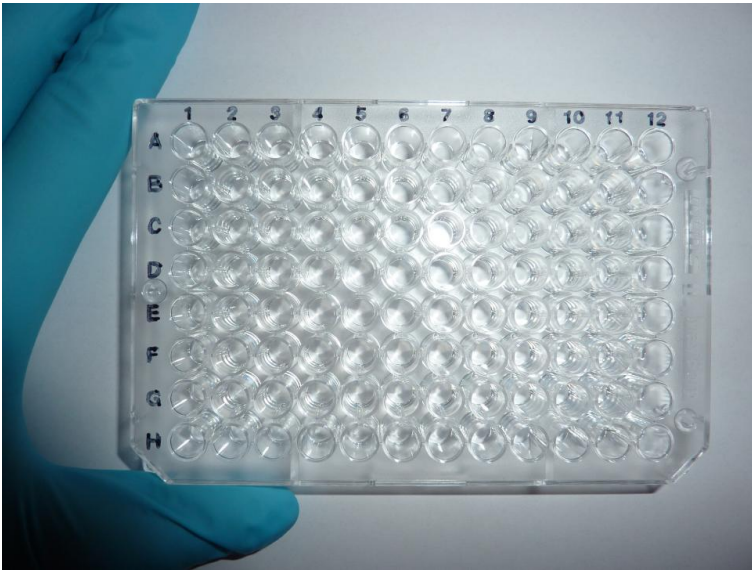
Brøndene fyldes med blokeringsbuffer (opvarmet til stuetemperatur). Titerpladen dækkes med plastfilm, og inkuberes under omrystning (200 rpm) i 15 min. ved stuetemperatur.

Efter blokering gentages vaskeproceduren i pkt. 2.2.

2.4. Standardrække

Der fremstilles en standardrække ved fortynding af Human Serum Protein Calibrator (Dako X 0908) med IgA-koncentrationen 385 ng/mL.

Herfra udtages 280 µL og overføres til brønd A1-A4. Se figur af nedenstående titerplade.



Figur 2 Billedet viser en ubrugt titerplade.

I kolonne 1-4, række B-H afpipetteres 120 μL fortyndingsbuffer (se figur 2).

Det er nu muligt at foretage en fortynding af standardrækken ned gennem titerpladen, ved at udtage 160 μL fra brønd A1 og overføre det til brønd B1, herefter udtages 160 μL fra brønd B1 og overføres til brønd C1, således fortsættes det ned gennem kolonnen, samt i kolonne 2, 3 og 4.

Husk! at udtage 160 μL til spild ved den sidste brønd i hver kolonne.

Dermed bliver koncentrationen af IgA 7,7 ng/mL i brønd H1-H4.

2.5. Prøve

Prøven (brystmælk) er fortyndet 1200 gange for at kunne lave en fortynding ned gennem titerpladen. Den samlede fortynding bliver 60.000 gange i brøndene i række H.

Der er mulighed for at køre to forskellige prøver i denne analyse, ved at anvende brønd A5, A6 og A7 til én prøve (brystmælk) og brønd A8, A9 og A10 til en anden prøve. Den anden prøve kan fx være modermælksersstatning eller rå komælk, fortyndet på samme måde som brystmælk.

Fra den fortyndede prøve udtages 280 μL og overføres til brønd A5-A10.

I kolonne 5-10 række B-H afpipetteres 120 μL fortyndingsbuffer.

Det er nu muligt at foretage en fortynding af prøven ned gennem titerpladen, ved at udtage 160 μL fra brønd A5 og overføre det til brønd B5, herefter udtages 160 μL fra brønd B5 og overføres til brønd C5, således fortsættes det ned gennem kolonnen, samt i kolonne 6-10.

Husk! at udtage 160 μL til spild ved den sidste brønd i hver kolonne.

Kolonnerne 11 og 12 bruges til henholdsvis negativ kontrol og substrat-blind. I kolonne 11 afpipetteres 120 µL fortyndingsbuffer, således dette er den negative kontrol. Kolonne 12, som er substrat blind, forbliver tom indtil pkt. 2.7.

Efter påsætning af standardrække og prøver dækkes titerpladen med plastfilm og inkuberes under omrystning (200 rpm) i 2 timer ved stuetemperatur. Alternativt kan der i stedet inkuberes natten over ved 4⁰C (uden omrystning).

3. BLOK:

Herefter gentages vaskeproceduren pkt. 2.2.

2.6. Enzymkonjugat

Enzymkonjugatet (Dako P 0216) er fortyndet 4000 gange.

Der afpipetteres 200 µL enzymkonjugat-fortynding til brøndene, undtagen substrat blind.

Der inkuberes under omrystning (200 rpm) i op til 90 min. ved stuetemperatur (70 min kan gå an, hvis man er tidspresset).

Herefter gentages vaskeproceduren pkt. 2.2

4. BLOK:

2.7. Enzymsubstrat

Der afpipetteres 100 µL enzymsubstrat til brøndene (også til substrat blind).

Tilsætning af enzymsubstrat foretages med faste intervaller, fx. med 30 sek's interval.

Der vil ske en farverektion, således at en gul farve vil opstå i standardrækken og i prøver der indeholder IgA.

Der tilsættes stopreagens efter en reaktionstid på ca. 7 min. Måden det tilsættes på er beskrevet i det følgende.

2.8. Stopreagens

Der afpipetteres 100 µL stopreagens til alle brøndene (også til substrat blind). Tilsætning af stopreagens sker efter samme tidsinterval som anvendt i pkt. 2.7.

Der vil ske en farve ændring fra gul til orange.

Der inkuberes få sekunder i ryster for at sikre at enzymsubstrat reaktionen stoppes helt.

2.9. Spektrofotometrisk måling (ELISA-reader)

Titerpladen aftørres grundigt på undersiden med en kleenex.

Der måles på ELISA-readeren ved 450 nm.

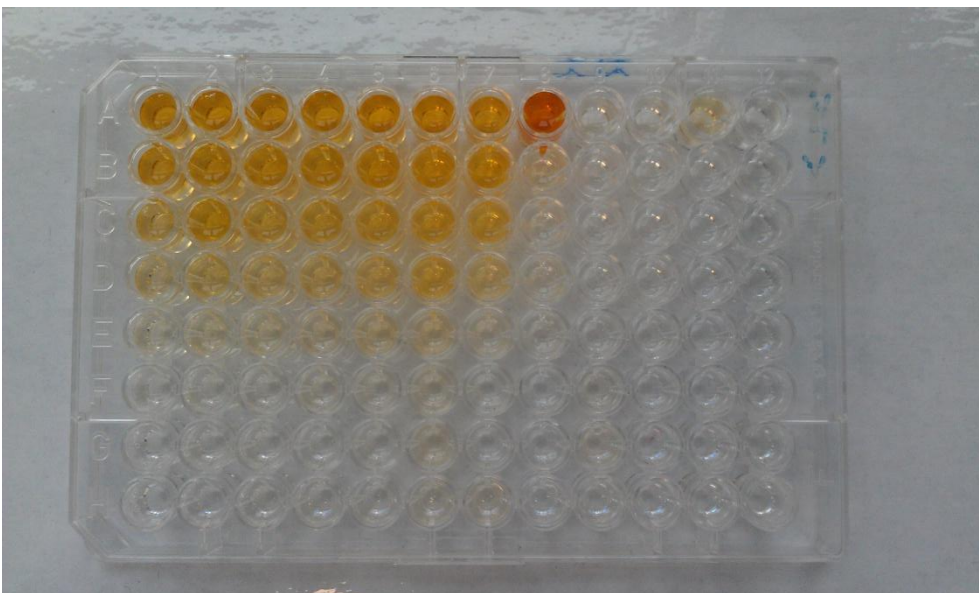
O.B.S.

Efter målingen på ELISA-readeren skal væsken i brøndene bortskaffes som affald af **kategori X ?**. Det hældes i den opstillede og afmærkede affaldsbeholder. Titerpladen og pipettespidser kan bortkastes i affaldsspand.

3. Resultatbehandling

Data eksporteret fra ELISA-readeren kopieres over i Excel, og der tegnes en graf med log koncentration af IgA som abcisse (x-aksen) og gennemsnit af de målte absorbanser som ordinat (y-aksen). IgA-koncentrationen i alle standarderne skal beregnes ud fra stamopløsningens koncentration og fortyndingsfaktoren. Find de punkter som udgør en ret linje og angiv måleområdet. Lav lineær regression og angiv linjens ligning. Beregn prøvens koncentration af IgA ud fra linjens ligning.

Det er desværre ikke altid at standardkurven er så pæn, men hvis den er god nok til videre beregning, så kan det anbefales at man kun beregner resultat for prøverne ved den fortynding med højest absorbans indenfor standardkurvens område. Hvis man beregner prøvens koncentration ud fra alle fortyndingerne stemmer resultaterne sandsynligvis ikke overens, da fejlen pga. fortynding bliver større og større ned gennem fortyndingsrækken.



Figur 3 Et eksempel på hvordan en titerplade kan se ud, når den er færdigbehandlet. Her er der påført to prøver. Én prøve i kolonne 5-7 og en anden prøve i kolonne 8-10.

4. Reagensliste

Man bør være opmærksom på sikkerheden ved at arbejde med serum, samt ved anvendelse af konc. HCl, konc. H₂O₂, OPD tabletter og konc. H₂SO₄.

Til alle reagenser anvendes frisk destilleret milliporevand.

Alle reagenser opbevares ved 4⁰C.

4.1. 1000 mL coatningsbuffer pH 9,6

Der afvejes følgende:

4,29 g Na₂CO₃ · 10 H₂O

2,93 g NaH CO₃

Opløs i ca. 800 mL vand og juster pH til 9,6 med 0,1 M NaOH/HCl.

Fyld op til 1000 mL mærket.

4.2. 500 mL 1M tris/HCl pH 7,8

Der afvejes følgende:

60,55 g tris

Opløs i ca. 400 mL vand og juster pH til 7,8 med ca. 30 mL konc. HCl.

Fyld op til 500 mL mærket.

4.3. 5000 mL vaskebuffer (tris-tween) pH 7,8

Der afvejes/afmåles følgende:

100 mL 1M tris/HCl pH 7,8

25,0 g tween-20

Opløs i ca. 4500 mL vand og juster pH til 7,8 med 1 m NaOH/HCl.

Fyld op til 5000 mL mærket.

OBS! Der bruges ca. 1 Liter pr. plade

4.4. 500 mL blokeringsbuffer pH 7,4

Der afvejes følgende:

60,55 g tris

2,5 g casein

Opløs i ca. 400 mL vand og juster pH med ca. 35 mL konc. HCl.

Fyld op til 500 mL mærket.

4.5. 500 mL fortyndingsbuffer pH 7,4

Der afvejes følgende:

60,55 g Tris

0,5 g casein

Opløs i ca. 400 mL vand og juster pH med ca. 35 mL konc. HCl.

Fyld op til 500 mL mærket.

4.6. 12 mL enzymsubstrat

Der afmåles følgende:

4 OPD tabletter

12 mL vand

5 µL konc. H₂O₂

Tabletterne opløses i vandet inden der tilsættes H₂O₂.

Vær opmærksom på at enzymsubstratet skal bruges indenfor én time.

Bemærk indlægsseddel for OPD tabletter.

4.7. 100 mL stopreagens 0,5M H₂SO₄

Der afmåles følgende:

Ca. 80 mL vand

2,8 mL konc. H₂SO₄

Fyldes op til 100 mL mærket.

4.8. Immunreagenser

Kanin Anti-human IgA

HRP-konjugeret Kanin Anti-Human IgA

Human Serum Protein Calibrator

Dako A0262

Dako P0216

Dako X0908

Immunreagenserne opbevares i køleskab.