

# Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

## Infectieziekten opsporen

## INHOUDSTABEL: Handleiding ELISA-kit

1. Inleiding	p.3
1.1. Infecties en epidemieën	
1.2. Principe	
1.3. Praktisch	
2. Materiaal	p.4
2.1. Chemicaliën	
2.2. Plastic labomateriaal	
2.2.1. Pipetten	
2.2.2. Epjes	
2.2.3. Andere	
3. Gebruik materiaal	p.5
4. Voorbereiding (voor de leerkracht)	p.6-7
4.1. Buffers bereiden	
4.2. Verdunnen van de reagentia	
4.3. Klaarmaken reagentia voor de werkstations	
4.4. Klaarmaken gele epjes	
4.5. Foto werkstation	
5. Werkwijze proef	p. 8-9
6. Overzichtstabel	p.10
7. Extra	p.11
7.1. Veiligheidsmaatregelen	
7.2. Meer informatie?	

**De ELISA-kit is gratis te ontlenen bij VIB**

## **Met ELISA de verspreiding van een ziekte opsporen**

De leerlingen krijgen elk hun eigen gesimuleerde 'lichaamsvocht, één van hen is 'besmet'. Ze wisselen in verschillende stappen hun lichaamsvochten uit, waardoor de besmetting zich in de klas verspreidt. Wie uiteindelijk besmet is, wordt opgespoord met ELISA.

### **1. Inleiding**

#### **1.1. Infecties en epidemieën**

We worden voortdurend bedreigd door ziekteverwekkers die ons in verschillende mate ziek kunnen maken. Zij gebruiken ons om zich te vermenigvuldigen en te transporteren. In het ergste geval veroorzaken ze zo een epidemie die razendsnel om zich heen kan grijpen.

Met deze proef kunnen we de snelheid van de verspreiding van een epidemie nabootsen. We testen daarenboven welke leerlingen uiteindelijk ziek worden door contact met medeleerlingen.

#### **1.2. Principe**

Wanneer vreemde stoffen (antigenen) ons lichaam binnendringen zal het immuunsysteem specifieke antilichamen aanmaken die zich binden aan de antigenen. Dit is het signaal voor andere cellen om de indringers te vernietigen.

Deze specificiteit van antilichamen maakt hen interessant voor diagnostiek en dit vormt ook de basis voor ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). ELISA detecteert de aanwezigheid van een bepaalde stof in een te testen staal met behulp van antilichamen die gericht zijn tegen deze stof.

Dit is dan ook de eerste belangrijke reactie in de ELISA-test: binding van het antigen met het (primaire) antilichaam. In een volgende stap voegt men (secundaire) antilichamen toe die gericht zijn tegen het primaire antilichaam. Deze secundaire antilichamen zijn geconjugeerd met een enzym ('enzyme-linked'). Dit enzym brengt een kleurreactie teweeg als het in contact komt met zijn substraat (TMB). Toevoeging van het substraat is de allerlaatste stap van de test. Enkel daar waar het antigen – en via de bindingen van de antilichamen ook het enzym – aanwezig is, zal zich een kleurverandering voordoen. Blauwkleuring wijst dus op de aanwezigheid van antigen.

#### **1.3 Praktisch**

Deze kit werd uitgewerkt voor een klas van 24 leerlingen.

De leerlingen werken in groepjes van 4 leerlingen. Elk groepje heeft een eigen 'werkstation'. In het totaal kan je 6 werkstations maken met deze kit.

Bij klassen met een oneven aantal moet je als leerkracht dus deelnemen aan het experiment.

## **2. Materiaal**

Ingesloten vind je al het nodige materiaal uitgezonderd papieren doekjes, een lege waterfles en gedistilleerd water.

### **2.1. Chemicaliën (bewaren in de koelkast)**

- 50 mL (10x) PBS in een ronde 50 mL- buis (met blauwe schroefstop) met label "10x PBS buffer"
- 2,5 mL Tween (detergent) in buisje (gele stop) gelabeld "TWEEN 20"
- 150 µL opgelost antigeen in epje met label "Ag"
- 200 µL opgelost primair antilichaam in epje met label "PA"
- 200 µL opgelost secundair antilichaam in epje met label "SA"
- 8 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) in buisje (blauwe stop, verpakt in aluminiumfolie) gelabeld "TMB"

### **2.2. Plastic labomateriaal**

#### **2.2.1. Pipetten**

- 40 x 1ml wegwerpbaar plastic pipetten – enkel voor de proef zelf te gebruiken, niet voor de voorbereiding
- 12 x 50 µL vast volume pipetten (Accumax) 1 zakje filtertips, te gebruiken op de 50 µL-pipettes

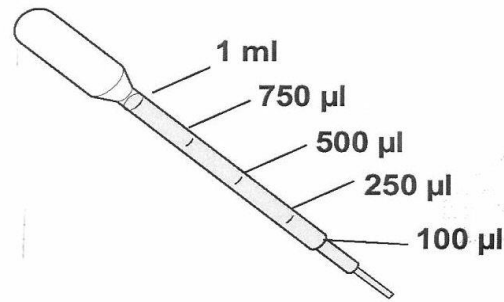
#### **2.2.2. Epjes**

- 24 gele epjes
- 30 gekleurde epjes (6 van elke kleur: paars, blauw, groen, oranje, bruin)

#### **2.2.3. Andere**

- 1 x 50 mL- buis (blauwe schroefstop)
- 2 x 10 mL-buisje (blauwe stop)
- 1 x 3 mL-buisje (gele stop)
- 12 microstrips
- Voorgefrankeerde enveloppe (terugzenden pipetten)
- 1 protocol

### 3. Gebruik materiaal



- **50 mL buis:** gegradueerd per 5 mL, steeds gebruiken met schroefdop tijdens mengen
- **50 µL vaste volume pipet:** deze pipet pipetteert steeds exact 50 µL. Deze pipetjes werken zeer nauwkeurig. De accuraatheid van de pipet kan alleen gegarandeerd worden als ze met omzichtigheid behandeld wordt. Laat ze dus nooit vallen en gebruik steeds filtertips!
  - Neem de pipet in de palm van je hand, waarbij de ronde haak over je wijsvinger hangt en je met je duim makkelijk op de paarse knop kan duwen.
  - Plaats een filtertipje (met wit blokje erin) op het fijne uiteinde van de pipet.
  - Druk de knop in, tot je een eerste weerstand voelt: op dit moment is de juiste hoeveelheid lucht uit de pipet gedrukt.
  - Houd de paarse knop ingedrukt (niet harder duwen!) en plaats de pipet in de op te zuigen vloeistof. Opgelet: alleen de punt van het filtertipje dient in de op te zuigen vloeistof gedoopt worden!
  - Laat de paarse knop voorzichtig naar boven komen: de vloeistof wordt in de tip opgezogen. Neem de pipet uit de vloeistof.
  - Laat de vloeistof er uitlopen door de paarse knop volledig in te drukken (voorbij de eerste weerstand) tot je niet verder kan. Hierdoor wordt er een extra hoeveelheid lucht door de pipet gestuurd waardoor zeker al de opgezogen vloeistof uit de pipet wordt geduwd.
  - Verwijder het gebruikte filtertipje.
- **1 ml wegwerpbare plastic pipet:** zie afbeelding boven rechts

#### 4. Voorbereiding (voor de leerkracht) - Tijdsduur: ongeveer 30 minuten

##### 4.1. Buffers bereiden

Hiervoor heb je gedistilleerd water (aquad.) en een lege waterfles nodig.

<b>1x PBS</b>	50 mL-buis	4,5 mL (10x) PBS aanvullen/verdunnen met gedistilleerd water tot 45 mL.
<b>Wasbuffer</b>	waterfles	44 mL 10x PBS aanlengen met 2,2 mL Tween (= detergent, voorzichtig toevoegen om schuim te vermijden), nadien aanvullen met gedistilleerd water tot 440 mL. Verdeel de wasbuffer over het nodige aantal wasstations.

##### 4.2. Verdunnen van de reagentia

<b>Positieve controle (+)</b>	buisje met gele stop	Label het buisje "+" en voeg 2,5 mL (1x) PBS toe. Voeg 50 µL antigen(Ag) toe. Sluit de tube en schud lichtjes om te mengen.
<b>Primair Antilichaam (PA)</b>	buisje met blauwe stop	Doe de inhoud van het epje 'PA' in het buisje met de blauwe stop en voeg wasbuffer toe tot 10mL. Sluit het buisje en schud lichtjes om te mengen. Label met PA.
<b>Secundair Antilichaam (SA)</b>	buisje met blauwe stop	Doe de inhoud van het epje 'SA' in het buisje met de blauwe stop en voeg wasbuffer toe tot 10mL. Sluit het buisje en schud lichtjes om te mengen. Label met SA.

##### 4.3. Klaarmaken reagentia voor de werkstations

(5 epjes per werkstation, deze kit bevat materiaal **voor maximum 6 werkstations**. Een werkstation wordt gebruikt door een groepje leerlingen.)

<b>Positieve Controle (+)</b>	paars epje	Label het epje "+" en voeg 350 µL van het buisje met gele stop (+) toe.
<b>Negatieve Controle (-)</b>	blauw epje	Label het epje "-" en voeg 350 µL van de (1x) PBS toe.
<b>Primair Antilichaam (PA)</b>	groen epje	Label het epje "PA" en voeg 1300 µL van de buis "PA" toe.
<b>Secundair Antilichaam (SA)</b>	oranje epje	Label het epje "SA" en voeg 1300 µL van de buis "SA" toe.
<b>Enzym-substraat (TMB)</b>	bruin epje	Label het epje "SUB" en voeg 1300 µL van de falcontube "TMB" toe.

#### 4.4. Klaarmaken gele epjes

<b>Nummering</b>	Nummer evenveel epjes als er leerlingen zijn.
<b>Geïnfecteerd staal</b>	Neem een willekeurig epje (noteer voor jezelf het nummer!), voeg 50 $\mu$ L antigen toe + 700 $\mu$ L (1x) PBS en meng het staal goed op.
<b>Blanco stalen</b>	Neem alle overige epjes en voeg er 750 $\mu$ L (1x) PBS aan toe.

#### 4.5. Foto werkstation voor 4 leerlingen



Zoals eerder vermeld werken de leerlingen in groep aan een werkstation.

Het experiment is oorspronkelijk uitgewerkt voor groepen van minder dan 24. Het kan ook voor grotere groepen gebruikt worden, maar dan kunnen de leerlingen zelf iets minder praktisch werk verrichten. Afhankelijk van de grootte van de klas zal het aantal leerlingen per werkstation verschillen.

- Klas  $\leq$  24 (**A**): groepjes van 4

Stel voldoende werkstations op naargelang het aantal leerlingen.

Per station voorzie je:

- Een beker met wasbuffer
- Een mousse met de 5 epjes (+, -, PA, SA en TMB)
- Twee microstrips
- Verschillende filtertips
- Twee 50  $\mu$ L-pipetjes
- Papieren doekjes
- 4 gele epjes (willekeurige nummers)
- 6 plastic 1 mL pipetten

## 5. Werkwijze proef - Tijdsduur: ongeveer 1u 30 minuten

### 5.1. Voorbereiding

1. Elke leerling neemt een genummerd epje.
2. Label de 12-koker strips:  
**Klas  $\leq$  24 (A)**
  - de eerste 3 kokers met '+' voor de positieve controle
  - de volgende 3 met '-' voor de negatieve controle
  - de laatste 6 met de nummers van 2 leerlingen (3 kokers per leerling)

### 5.2. Contactronden: verspreiding van de besmetting

1. Vraag de leerlingen om zich per twee te zetten:
  - Eén van beiden doet de inhoud van zijn epje volledig in het epje van de andere; het volle epje sluiten en rustig schudden.
  - De eerste leerling neemt de helft (750 $\mu$ l) terug OF de andere geeft de helft terug
2. De mengronde wordt herhaald. **Let op:**
  - Bij klassen met minder dan 10 leerlingen, slechts 2 mengrondes!
  - Vul elke mengronde in in de overzichtstabel (p.10)

### 5.3. Stalen laden in de 12-koker strips

1. Gebruik een nieuwe filtertip om 50 $\mu$ l van de positieve controle (paars epje) in de overeenkomstige kokers ('+') te brengen.
2. Gebruik een nieuwe filtertip om 50 $\mu$ l van de negatieve controle (blauw epje) in de overeenkomstige kokers ('-') te brengen.
3. Gebruik een nieuwe filtertip om 50 $\mu$ l van de leerling-samples (na de mengrondes) in de overeenkomstige kokers ('nummers') te brengen. Per leerling 3 kokers, dit om een fout door contaminatie te vermijden.
4. Wacht 5 minuten.

*De antigenen binden zich nu aan het polystyreen van de kokers.*

### 5.4. Wassen:

1. Maak de kokers van de strips leeg op doekjes door rustig te tikken
2. Gebruik een nieuwe plastic pipet en vul iedere koker met wasbuffer. Houd deze pipet bij voor de volgende wasstappen.
3. Maak de kokers van de strips leeg door op nieuwe doekjes te tikken. Dit mag redelijk hard.

*Op deze manier wassen we alle antigenen die in oplossing aanwezig zijn weg, waardoor enkel de gebonden antigenen aanwezig blijven in de kokers.*



5.5. Primair antilichaam (groen epje) toevoegen

1. Neem een nieuwe filtertip en breng 50 $\mu$ L PA in alle twaalf kokers
2. Wacht 5 minuten.

*De primaire antilichamen binden aan de antigenen.*

5.6. Wassen:

1. Maak de kokers van de strips leeg op doekjes door rustig te tikken
2. Gebruik de plastic pipet en vul iedere koker met wasbuffer
3. Maak de kokers van de strips leeg door rustig op nieuwe doekjes te tikken.

*Op deze manier wassen we alle antilichamen die in oplossing aanwezig zijn weg, waardoor enkel de gebonden antilichamen aanwezig blijven in de kokers.*

5.7. Secundair antilichaam (oranje epje) toevoegen

1. Neem een nieuwe filtertip en breng 50 $\mu$ L SA in alle twaalf kokers
2. Wacht 5 minuten.

*De secundaire antilichamen binden aan de primaire antilichamen.*

5.8. Wassen:

1. Maak de kokers van de strips leeg op doekjes door rustig te tikken
2. Gebruik de plastic pipet en vul iedere koker met wasbuffer
3. Maak de kokers van de strips leeg door rustig op nieuwe doekjes te tikken.
4. Gebruik de plastic pipet en vul iedere koker met wasbuffer
5. Maak de kokers van de strips leeg door rustig op nieuwe doekjes te tikken.

*Op deze manier wassen we alle secundaire antilichamen (en dus ook enzymen) die in oplossing aanwezig zijn weg, waardoor enkel de gebonden antilichamen aanwezig blijven in de kokers.*

5.9. Enzymsubstraat (bruin epje) toedienen

1. Neem een nieuwe pipettip en breng 50 $\mu$ L SUB in alle twaalf kokers
2. Wacht 5 minuten. Noteer de observaties:
  - Zie je iets veranderen? Wat?
  - Ben je geïnfecteerd (+) of niet (-)?
  - Zo ja, wie van de personen waarmee je lichaamsvocht hebt 'uitgewisseld', is ook positief?
  - Vul de overzichtstabel verder aan.
  - Vul de kolommen achter de partners ook aan.

5.10. Oefening:

1. Elke persoon achter wiens naam enkel plussen staat, komt in aanmerking als oorspronkelijke infectiebron.
2. Werk nu zelf een strategie uit om de oorspronkelijke infectiebron te zoeken.
3. **Tip voor de leerkracht:** je zal twee personen overhouden als mogelijkheden, namelijk zij die in de eerste ronde onderling hebben uitgewisseld.

## 6. Overzichtstabel

Staal	Partner 1	+ / -	Partner 2	+ / -	Partner 3	+ / -	+ / -
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28							
29							
30							
31							
32							
33							
34							
35							
36							
37							
38							
39							
40							
41							
42							
43							
44							
45							
46							
47							
48							

## 7. Extra

### 7.1. Veiligheidsmaatregelen

De gebruikte materialen vereisen geen specifieke veiligheidsmaatregelen. Je moet wel nauwkeurig en netjes werken, om het experiment te doen slagen. Indien beschikbaar, draag je best een labo jas en eventueel handschoenen.

### 7.2. Meer informatie?

VIB beschikt over verschillende brochures en informatiepakketten omtrent biotechnologie. Meer info op [www.vib.be](http://www.vib.be).