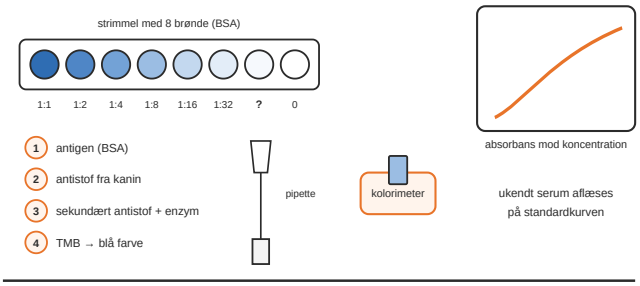
Kvantitativ ELISA: bestem mængden af antistof

Navn: Klasse: Dato:

Hvordan afhænger farveintensiteten i en ELISA af koncentrationen af antistof, og hvor meget antistof er der i den ukendte prøve?



Kvantitativ ELISA

Vores hypotese

Det skal I bruge

- Kit: ELISA, 24 par
- Mikropipette, justerbar, 20-200 µl
- Mikropipette, justerbar, 100-1000 µl
- Reagensglas 20×150 mm
- Kolorimeter og turbiditetssensor, trådløs (PASCO PS-3215)
- Kuvetter, polystyren, 10 x 10 mm
- Vand, demineraliseret
- Sprøjteflaske 500 ml
- Beskyttelsesbriller, komfort
- Nitrilhandsker, Medium
- Pipettespidser, der passer til mikropipetterne
- Køkkenrulle til at banke strimlerne tørre
- Affaldsbæger til brugte spidser
- Mobiltelefon til at fotografere strimlerne
- Tablet eller computer med SPARKvue og evt. regneark

Sikkerhed

Kittet indeholder ikke humant materiale, men antistofferne er proteiner fra dyr og skal behandles som laboratoriekemikalier: brug handsker, og spis eller drik ikke i lokalet. Fremkaldervæsken (TMB) kan irritere hud og øjne og skal holdes væk fra huden: brug beskyttelsesbriller og handsker, og skift handsker, hvis der kommer TMB på dem. Læs kittets vejledning og sikkerhedsdatablade, før forsøget forberedes, og bortskaf rester efter skolens retningslinjer.

Sådan gør I

1. Læs kittets vejledning, og mærk jeres strimmel, så I ved, hvilken brønd der er hvilken. Lav en fortyndingsrække af standardantistoffet i reagensglas: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 og 1:32 med den fortyndingsbuffer, der følger med kittet.
2. Pipettér den mængde, vejledningen angiver, af hver fortynding i brønd 1-6. Kom den ukendte prøve i brønd 7 og ren buffer i brønd 8 (negativ kontrol). Lad strimlen stå den angivne tid.
3. Tøm brøndene ved at vende strimlen over køkkenrulle, og vask dem med vaskebufferen det antal gange, vejledningen angiver. Bank strimlen let tør hver gang.

4. Tilsæt det sekundære antistof med enzym til alle brønde, lad det binde, og vask igen grundigt. Vasken er afgørende: rester af enzym giver blå farve i kontrollen.
5. Tilsæt fremkaldervæsken (TMB) til alle brønde, og følg farven. Når forskellen mellem brøndene er tydelig, fotograferes strimlen mod en hvid baggrund.
6. Mål farven: Overfør et fast volumen fra hver brønd til en kuvette, fyld op med demineraliseret vand til et fast volumen, og mål absorbansen ved rød (660 nm) i kolorimeteret. Brug brønd 8 som nulpunkt. Alternativt kan farven vurderes ud fra fotoet.
7. Plot absorbansen mod den relative koncentration af antistof (1, 1/2, 1/4 …). Find den del af kurven, der er nogenlunde lineær, og aflæs den ukendte prøves koncentration.

Vores målinger

Brønd	Fortynding	Relativ koncentration	Absorbans (660 nm)	Bemærkninger

Graf eller tegning

Spørgsmål

1. Hvordan ændrede farven sig gennem fortyndingsrækken, og hvor var kurven lineær?

2. Hvad var den ukendte prøves relative koncentration, og hvor sikker er aflæsningen?

3. Hvorfor er den negative kontrol nødvendig, og hvad betyder det, hvis den bliver blå?

4. Hvorfor skal brøndene vaskes mellem hvert trin?

5. Hvordan kan man bruge samme princip til at påvise, om en person har dannet antistoffer mod en virus?

Vores konklusion