

# Gen - Welten

## Prometheus im Labor?

## Laboratorium

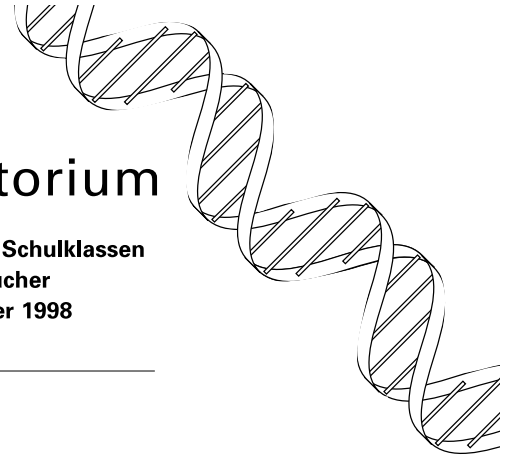
### Experiment 2

ELISA-Test am Pelargonium-Flower-Break-Virus (PFBV)

Experimente für Schulklassen

Internet für Besucher

Mai bis Dezember 1998



### Vorbereitungen

#### 1 Vortage:

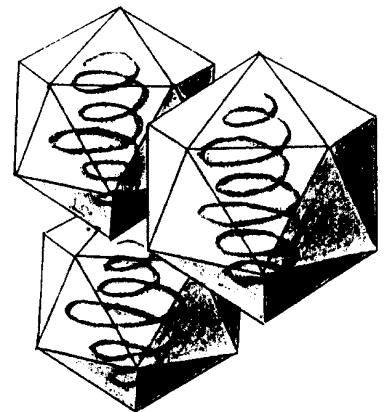
- Mit LehrerIn Kontakt aufnehmen: Schüler sollen Geranienblätter mitbringen!!
- sonst: Geranienblätter besorgen!!

#### 2 am Tag:

- alle Reagenzien aus dem Kühlschrank holen: sie sollten Raumtemperatur haben.
- Kopien der ABs, Folienstifte (?)
- Bereitstellen **und verteilen!!**:  
1 ELISA-Test - Kit, daraus verteilen:  
Beutel und Pipetten; Beutel schon nummerieren ?? Pipettierstände aus Verpackung.  
Alle 15 Pistille (evtl. + 5 Teelöffel o.ä.)  
Alle 15 Brettchen (evtl. noch 5 dazukaufen ???)  
Abfallbehälter „Restmüll“ und Zylinderglas für Flüssiges
- Die 2 x 3 Nupfröhen (Kavitäten) nummerieren oder auf ein beschriftetes Arbeitsblatt stellen;
- Die beiden Kämme im Plastikbeutel lassen? (Verunreinigungsgefahr)

#### 3 Zusatzinformationen:

- zu den Materialien:
  - Die Antikörper sind polyklonal
  - 1. PFBV-Antikörper A<sub>1</sub> auf dem Kamm immobilisiert (Lieferzustand) bindet Viren
  - 2. PFBV-Antikörper A<sub>2</sub> mit Meerrettich-Peroxidase markiert (Konjugat) bindet an die Viren, die von A<sub>1</sub> am Kamm festgehalten wurden.
  - Das Enzym, nunmehr auch am Kamm gebunden, setzt Trimethylbenzidin (Substrat) zu einem blau gefärbten Produkt um.
- Laut IPN sind hierzulande ca 25% aller Geranien infiziert.
- Das Substrat muß klar sein. Die Nachweisreaktion ist sehr empfindlich; Verunreinigungen vermeiden; schwache Blaufärbungen deuten auf geringe Infektion hin; keine Umfärbung kann auch auf Infektion unter der Nachweisgrenze hindeuten.
- Entsorgung für alle Materialien unproblematisch: Ausguß, Hausmüll und Plastikmüll (gelber Sack)



#### 4 Literatur:

Bömer, H.: Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. UTB 518. Stuttgart 1989  
Clark, M.F.; Adams, A.N.: G. Gen. Virol. 34, (475-483), 1977 (Bei Durst)  
Hollings, M.; Stone, O.M.: Description of plant viruses. CMI/AAB, No.130, 4pp., 1974

# Gen - Welten

## Prometheus im Labor?

### Experiment 2

ELISA-Test am Pelargonium-Flower-Break-Virus (PFBV)

## Laboratorium

Experimente für Schulklassen

Internet für Besucher

Mai bis Dezember 1998



### Hintergrund und Versuchsprinzip

#### 1 Hintergrund: Bedeutung des PFBV:

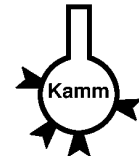
- bedeutende Treibhaus-Erkrankung
- Übertragung durch Tripse und zirkulierende Nährstofflösungen: innerhalb 14 Wochen werden auf diesem Wege 100% aller neuen Sämlinge infiziert.
- Infektions-Teilschutz durch Feinsandfilterung der Nährstofflösungen
- Verursacht Brechen der Blüten in einigen Pelargonien-Stämmen und ist in vielen Kulturen symptomlos. In Pelargonien weniger häufig als andere Viren.

#### 2 Versuchsprinzip ELISA - Test:

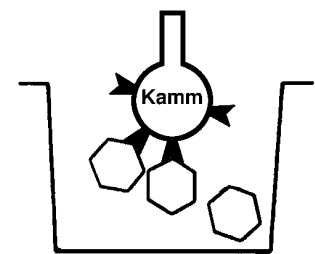
(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)  
(hier für PFBV formuliert)

- Für PFBV spezifische (monoklonale?) Antikörper  $A_1$  wurden an den Kammspitzen immobilisiert.
- Der Kamm wird in eine Lösung mit Viren getaucht: Viren (= Antigene) haften an den  $A_1$  fest!
- In die Lösung eines zweiten Antikörpers  $A_2$  „Konjugat“, der
  - ebenfalls spezifisch für den Virus
  - und beladen mit einem Enzym (Peroxidase) ist, wird der Kamm gehalten:
 Die  $A_2$  mit Enzym haften an den gebundenen Viren fest!
- Der Kamm mit  $A_1$ ,
  - darin haftenden Viren,
  - darin haftenden  $A_2$  und
  - damit verbundenen Enzymen
 wird in eine Substratlösung gehalten:  
Das Substrat wird vom Enzym umgewandelt und färbt sich blau

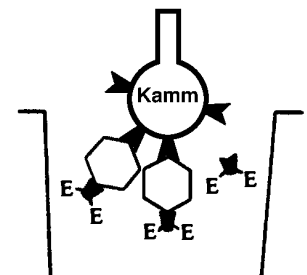
1) vorbereitet:  
Kamm mit  $A_1$



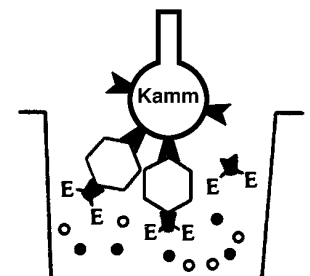
2) Viren binden an  $A_1$



3)  $A_2$  mit Enzym binden an Viren



4) Enzym setzt Substrat um



#### 3 Quellen:

Das Kit wurde am IPN, Kiel entwickelt und wird von Steffens Biotechnische Analysen GmbH, 79285 Ebringen, Tel. 07664 / 60025-4 Fax -5 vertrieben (Preis: 195,-DM)

#### 4 ergänzende Internet - Adressen:

<http://www.EIBE.reading.ac.uk:8001/EIBE/unitframes.html>  
<http://www.ws.chemie.tu-muenchen.de/elisa2/projects03.htm>

(unit 8; PDF-Datei)  
(ELISA-Tests in der Landwirtschaft)

# Gen - Welten Prometheus im Labor?

## Experiment 2

ELISA-Test am Pelargonium-Flower-Break-Virus (PFBV)

## Laboratorium

Experimente für Schulklassen

Internet für Besucher

Mai bis Dezember 1998



### Durchführung des Experimentes

- 1 Beutel mit Namen und Herkunft des Blattes beschriften sowie einer Nummer  
(vom Laboranten gegeben 2 mal Nr.1 - Nr.10)
- 2 5 ml gelben Probenpuffer in den Extraktionsbeutel pipettieren.
- 3 1 mittelgroßes Geranienblatt (ca.15 cm<sup>2</sup>) (*wissenschaftlich: Pelargonium domesticum*) abtrennen und zwischen die Baumwollgaze in den Beutel legen!
- 4 Öffnung des Beutels 2 mal falten und auf dem Brettchen mit dem Pistill homogenisieren

#### Frage 1:

Welche für den Versuch wesentlichen Bestandteile befinden sich jetzt in der Flüssigkeit des Beutels?

---

---

---

---

---

- 5 Jede(r) Schüler(in) nimmt sich eine Pipette und pipettiert 3 Tropfen in den Napf mit der ihrer/seiner Nummer. (Pipetten wegwerfen)  
Die Kontrollen (grün / rot) **bleiben leer!**
- 6 Der Kamm mit den (unsichtbaren) immobilisierten Antikörpern wird in die 1. Napfreihe gestellt.  
**10 min warten.**

#### Frage 2:

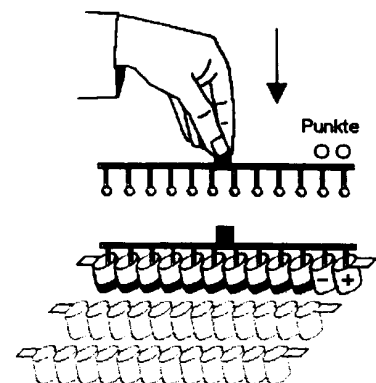
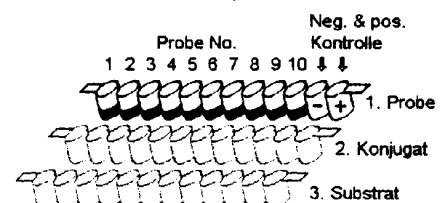
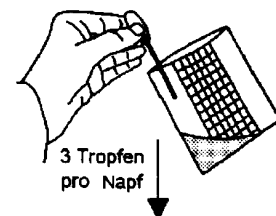
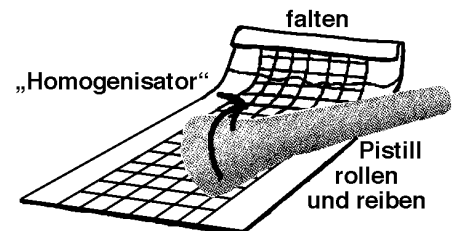
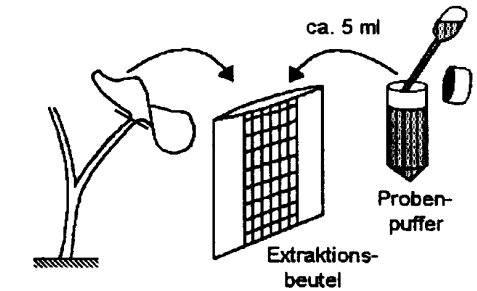
Was geschieht jetzt?

---

---

---

---



# Gen - Welten

## Prometheus im Labor?

### Experiment 2

ELISA-Test am Pelargonium-Flower-Break-Virus (PFBV)

## Laboratorium

Experimente für Schulklassen

Internet für Besucher

Mai bis Dezember 1998



- 7 „Konjugat“ ansetzen:  
Je Kit 1 Konjugat **vollständig** in den blauen Konjugatpuffer überführen.  
(Pipette mit feiner Spitze nehmen. Auf evtl. Tropfen am Deckel achten!)  
Gründlich mischen!!

#### Frage 3:

Woraus besteht das Konjugat? Welche Funktion hat es?

---

---

---

---

- 8 Je 3 Tropfen des verdünnten Konjugates in die Näpfe der zweiten Reihe („Konjugat“) pipettieren. (Neue Pipette)

- 9 Kamm unter schwach fließendem kalten Wasser spülen.

#### Achtung:

Tropfen zwischen den Zinken des Kammes vermeiden!!!  
(Kontaminationsgefahr)

Kamm durch Ausschütteln von Wassertropfen befreien.

Kamm in die 2. Napfreihe „Konjugat“ stellen.

**10 min** warten.

#### Frage 4:

Was geschieht jetzt?

---

---

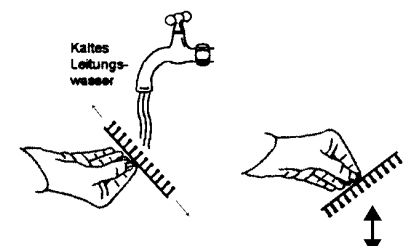
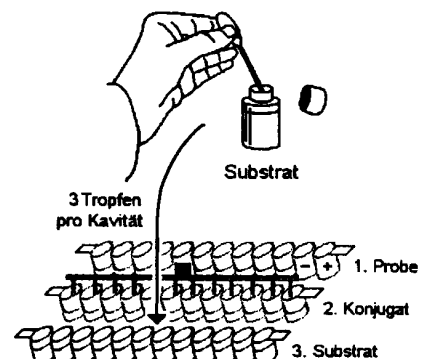
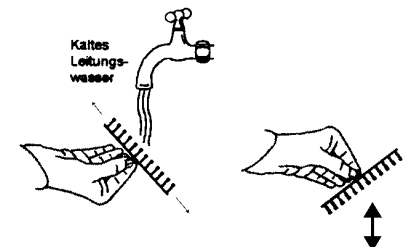
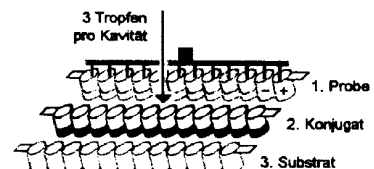
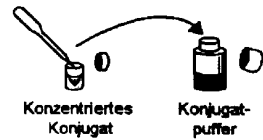
---

---

- 10 Je 3 Tropfen des „Substrates“ in die 3. Napfreihe pipettieren. (Neue Pipette!)

- 11 Kamm unter schwach fließendem kalten Wasser spülen.

Kamm durch Ausschütteln von Wassertropfen befreien.



# Gen - Welten

## Prometheus im Labor?

### Experiment 2

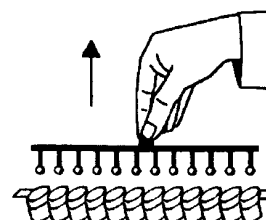
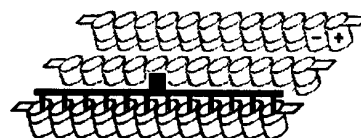
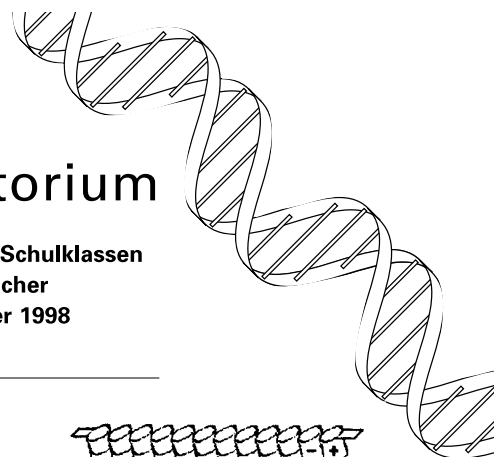
ELISA-Test am Pelargonium-Flower-Break-Virus (PFBV)

## Laboratorium

Experimente für Schulklassen

Internet für Besucher

Mai bis Dezember 1998



Farbumschläge einzeichnen!

- 12** Kamm in die 3. Napfreihe „Substrat“ stellen.  
**10 min warten.** u.U. Kamm leicht bewegen.

#### Frage 5:

Was geschieht jetzt?

- 13** Kamm aus der 3. Napfreihe nehmen.  
Beobachtung notieren, interpretieren!!

### Versuchsprotokoll

Proben-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	grün	rot
Name												
Blattquelle											-	+
Bemerkung												
Beobachtung												
Interpretation												

ergänzende Internet - Adressen:

<http://www.EIBE.reading.ac.uk:8001/EIBE/unitframes.html>

<http://www.ws.chemie.tu-muenchen.de/elisa2/projects03.htm>

(unit 8; PDF-Datei)

(ELISA-Tests in der Landwirtschaft)