

6.1a VU ELISA - Test am Pelargonium-Flower-Break-Virus (PFBV)

AB 1 für LehrerInnen

Seite 1/5

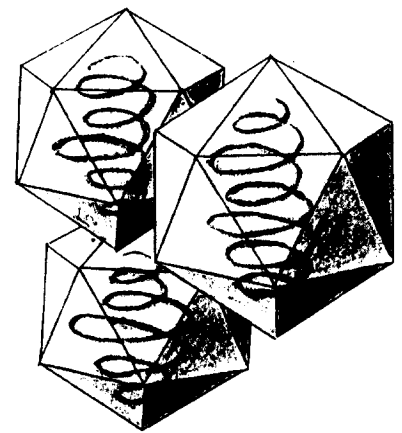
Vorbereitungen

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 ?? Pipettier-
ständer 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 Napfreihen (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 A₁ auf dem Kamm immobilisiert (Lieferzustand) bindet Viren
 - 2. PFBV-Antikörper A₂ mit Meerrettich-Peroxidase markiert (Konjugat) bindet an die Viren, die von A₁ 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
<http://www.biology.arizona.edu/immunology/activities/elisa/main.html> (10.2.01)
<http://www.rdg.ac.uk/EIBE/> (10.2.01)

6.1a VU ELISA - Test am Pelargonium-Flower-Break-Virus (PFBV)

AB 2 für LehrerInnen

Seite 2/5

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

- Für PFBV spezifische (monoklonale) Antikörper A₁ wurden an den Kammspitzen immobilisiert.
- Der Kamm wird in eine Lösung mit Viren getaucht: Viren (= Antigene) haften an den A₁ fest!
- In die Lösung eines zweiten Antikörpers A₂ „Konjugat“, der
 - ebenfalls spezifisch für den Virus
 - und beladen mit einem Enzym (Peroxidase) ist, wird der Kamm gehalten: Die A₂ mit Enzym haften an den gebundenen Viren fest!
- Der Kamm mit A₁,
 - daran haftenden Viren,
 - daran haftenden A₂ und
 - damit verbundenen Enzymen
 wird in eine Substratlösung gehalten: Das Substrat wird vom Enzym umgewandelt und färbt sich blau

3 Quellen:

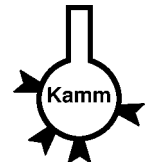
Das Kit wurde am IPN, Kiel entwickelt und wird von Steffens Biotechnische Analysen GmbH, 79285 Ebringen, Tel. 07664 / 60025-4 Fax -5 vertrieben (Preis: 195,-DM; 3/2000)

4 ergänzende Internet - Adressen:

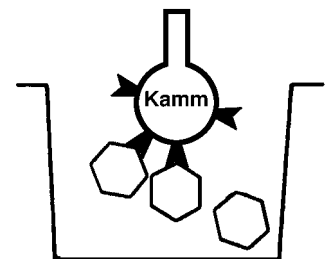
<http://www.rdg.ac.uk/EIBE/DEUTSCH/DU8.HTM> (10.2.01)

<http://www.biology.arizona.edu/immunology/activities/elisa/main.html> (10.2.01) (Anwendung bei HIV, Simulation)

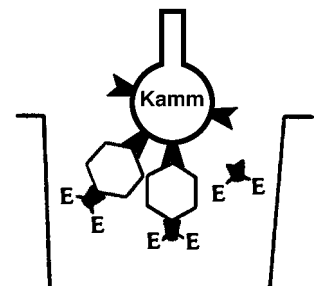
1) vorbereitet:
Kamm mit A₁



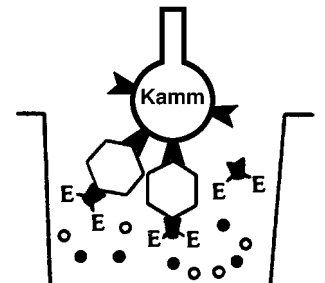
2) Viren binden an A₁



3) A₂ mit Enzym binden an Viren



4) Enzym setzt Substrat um



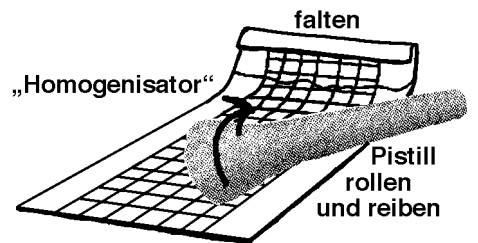
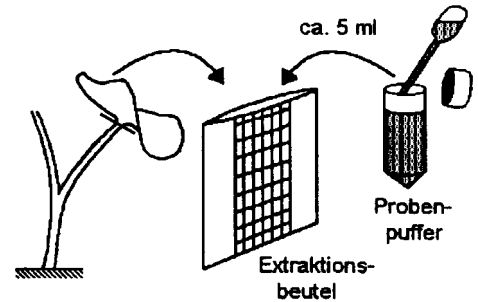
6.1a VU ELISA - Test am Pelargonium-Flower-Break-Virus (PFBV)

AB 1 für SchülerInnen

Seite 3/5

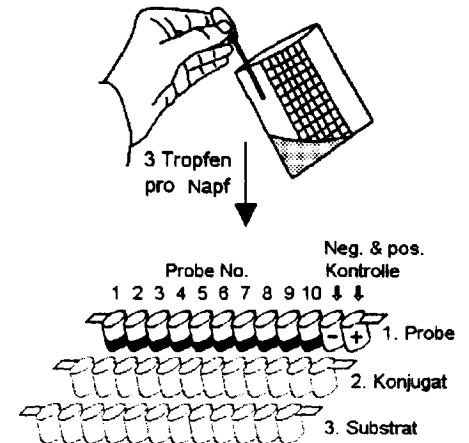
Durchführung des Experimentes

- 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 cm²) (*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



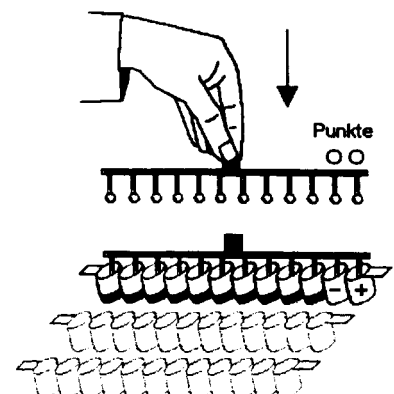
Frage 1: Welche für den Versuch wesentlichen Bestandteile befinden sich jetzt in der Flüssigkeit des Beutels?

- 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?

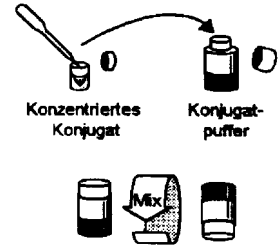


6.1a VU ELISA - Test am Pelargonium-Flower-Break-Virus (PFBV)

AB 2 für SchülerInnen

Seite 4/5

- 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?

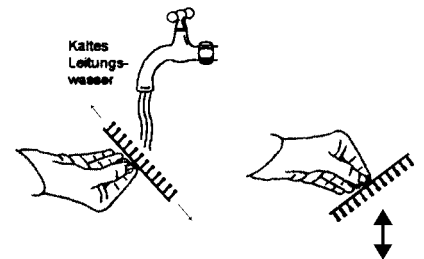
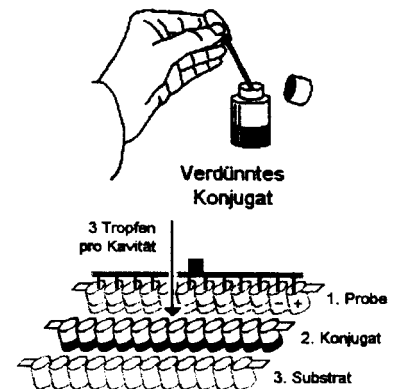
- 8 Je 3 Tropfen des verdünnten Konjugates in die Näpfe der zweiten Reihe („Konjugat“) pipettieren. (Neue Pipette)
- 9 Kamm unter schwach fließendem kaltem Wasser spülen.

Achtung:
 Tropfen zwischen den Zinken des Kamms vermeiden!!!
 (Kontaminationsgefahr)

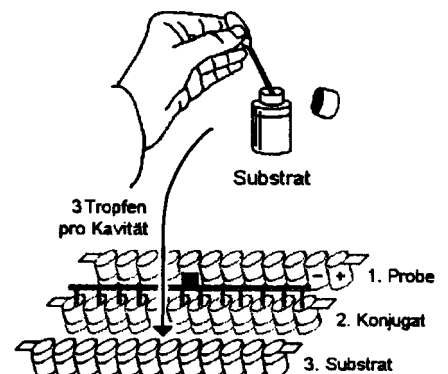
Kamm durch Ausschütteln von Wassertropfen befreien.

Kamm in die 2. Napfreihe „Konjugat“ stellen.

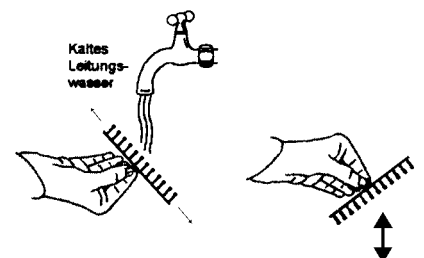
10 min warten.



Frage 4: Was geschieht jetzt?



- 10 Je 3 Tropfen des „Substrates“ in die 3. Napfreihe pipettieren. (Neue Pipette!)
- 11 Kamm unter schwach fließendem kaltem Wasser spülen.
- Kamm durch Ausschütteln von Wassertropfen befreien.
- Achtung!!! (s. 9)**

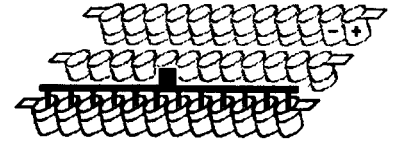


6.1a VU ELISA - Test am Pelargonium-Flower-Break-Virus (PFBV)

AB 3 für SchülerInnen

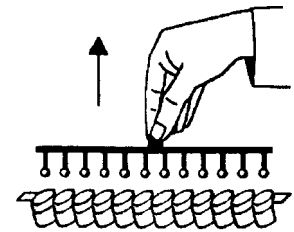
Seite 5/5

- 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!!



Farbumschläge einzeichnen!

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.rdg.ac.uk/EIBE/> (3 Versuche zu ELISA: unit 8; PDF-Datei; 10.2.01)

<http://www.biology.arizona.edu/immunology/immunology.html>

(Simulationen zu ELISA und HIV; 10.2.01)