

Edvokit 275

AIDS Kit II: Simulering af HIV-1-test med Western Blot – immunoblotting

Kittets indhold

Kittet indeholder materiale til 6 grupper

Prøver til elektroforesen:

A	positive kontrol
B	Negativ kontrol
C	Patient 1
D	Patient 2
E	Patient 3
F	Molekylvægt standardfarve

Andre dele til elektroforesen

UltraSpec-Protein Agarose™

10x Tris-glycin-SDS-buffer (elektroforesebuffer og transfer-buffer)

10x Tris-glycin-buffer (**kun** til gelstøbningen)

Øve-gel-loadingblanding

1 mL pipette

100 mL målebæger

Dele til immunoblottingen

Skåret Western Blot membran (7x7 cm)

Skåret blottingpapirer (7x7 cm)

Western Blot farve –(Coomassie Blue)

Nødvendigt udstyr

- Horisontalt elektroforeseapparat
- Strømforsyning

- Mikropipetter med spidser – 0-20 μ L og 20-200 μ L
- Ryste- eller vippebord
- Varmeskab 65 °C
- Varmebad eller varmeplade
- Mikrocentrifugerør
- Bægerglas
- Målebægre
- Kar, hvori der kan være en 7x7 cm gel
- Handsker
- Papirhåndklæder - mange
- Plastikfolie eller styroporbakker
- Sakse
- Lineal
- Methanol 95-100%
- Iseddikesyre
- Demineraliseret vand

Sikkerhed

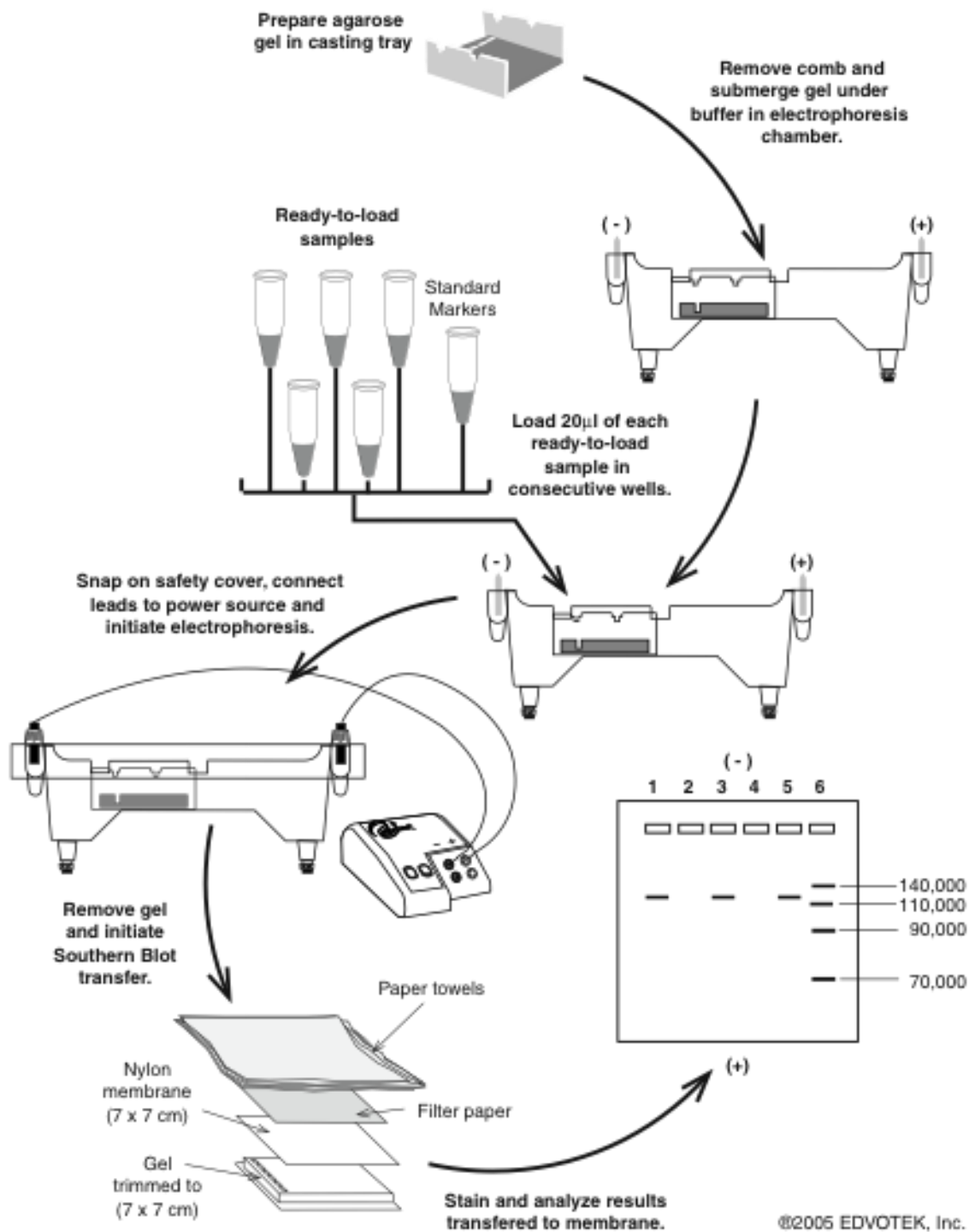
Der bæres handsker, når gelen og nylonmembranen håndteres. Bær kittel under hele forsøget

Affaldshåndtering

Affaldet kasseres til almindelig forbrænding efterfølgende

Tidsskema

Introduktion, gelstøbning og prøvepåsætning	45 minutter
Elektroforese	60-90 minutter
Klargøring af sandwich til Western Blot	30 minutter
Blotting	minimum 4 timer – natten over
Farvning af membranen og analyse af resultatet	45 minutter



Teori

Læs selv:

Om HIV og AIDS

Om immunsystemet

Om immunologiske testmetoder som ELISA, dobbelt immundiffusion, graviditetstest

Om integrase, revers transkriptase og protease

Om Western Blotting (immunoblotting)

ELISA-testen er et vigtigt diagnosticeringsredskab, når man finder lave koncentrationer af eksempelvis antistoffer. Hvis der er positiv reaktion i en ELISA-test vil det oftest være nødvendigt yderligere at tjekke dette resultat, da antistoffer af og til kan lave kryds-reaktioner, da der findes relaterede epitoper mellem flere antigener. Med immunoblotting eller Western blotting er det muligt mere specifikt at finde de antistoffer, man leder efter.

Det første skridt er at denaturere proteinerne med SDS og sikre, at de alle er negativt ladede og derefter køre dem på en polyakrylamidgel. Herved bliver proteinerne adskilt efter størrelse, idet de alle befinder sig på lineær, negativ form. De S-S-broer der har været i proteinerne brydes ved at benytte 2-mercaptoethanol.

Når de denaturerede proteiner kører gennem gelen vil de adskilles udelukkende på deres molekylvægt således at de mindste proteiner bevæger sig længst i gelen.

Efterfølgende analyseres proteinerne med Western Blotting analyse (også kaldet immunoblotting). Ved denne metode overføres proteinerne til en ladet nylonmembran enten i et særligt blotting-kammer, hvor der føres strøm igennem eller ved hjælp af kapillærkræfter. Nylonmembranen er mere håndterlig og kan tåle meget i forhold til eksempelvis gelen. De proteiner eller antistoffer, man leder efter, kan efterfølgende detekteres ved hjælp af specifikke antistoffer (immunokemisk metode kaldet immunodetektion)

For at analysere det specifikke protein, der er overført til nylonmembranen, placeres denne i en blokeringsbuffer, der indeholder en detergent samt et protein, som binder til alle ikke besatte områder i nylonmembranen. Blokeringsbufferen indeholder blokeringsproteiner, som ikke vil binde sig til de antistoffer, der binder sig til de proteiner, der skal undersøges. Blokeringsproteiner kan eksempelvis være proteiner fra skummetmælkspulver eller albumin fra køer (Bovin Serum Albumin). Efterfølgende blottes det ønskede protein ved hjælp af en blottingbuffer, som indeholder et antistof, der binder sig specifikt til det eller de protein(er), som man ønsker at undersøge. Derefter vaskes for at fjerne overskydende proteiner fra nylonmembranen.

Der tilføres nu et sekundært antistof, der binder specifikt til det første specifikke antistof og til hvilket, der samtidigt er bundet til et enzym som eksempelvis peroxidase, som efterfølgende bruges til at skabe en farverektion. Dette betyder, at der hvor det ønskede protein var overført til nylonmembranen vil opstå en farverektion.

Formålet med denne øvelse er at give eleverne indsigt i immunoblottingteorien og metoden.

Formål med forsøget

Formålet med dette forsøg er at forstå de begreber og metoder, der knytter sig til immunoblotting – også kaldet Western Blotting. I forsøget testes der for tilstedeværelsen af et hypotetisk virusprotein fra en hypotetisk cellekultur, der er inficeret med serum fra HIV-positive personer.

Lærerens forberedelser

Membranen klargøres

Brug handsker! Bemærk: Handsker med talkum kan forstyrre resultatet. Vask derfor hænderne med handskerne på før du går i gang.



Behold de beskyttende lag på membranen, men du foretager næste skridt

Med en blyant tegnes på det øverste beskyttelseslag, således at membranen deles i 6 stykker på hver 7x7cm. Hvis der støbes geler af en anden størrelse end 7x7 cm tilpasses membranstykkerne til gelernes størrelse. Hvis gelerne er større reguleres antallet af grupper ud fra, hvor mange stykker membran, der kan laves.

Klip forsigtigt stykkerne ud

Elektroforesebuffer:

Den medfølgende 10x Tris-glycin-SDS-buffer fortyndes med demineraliseret vand. Til 1 del 10x buffer tilsættes 9 dele vand. Fremstil buffer i en mængde, der sikrer, at der er nok til alle elektroforesekar. Bufferen bør fremstilles på selve forsøgsdagen eller få dage før.

Transferbuffer:

350 mL demineraliseret vand tilsættes 50 mL 10x Tris-glycin-SDS-buffer. Derefter tilsættes 100 mL 95-100% metanol. Bland ved at vende flasken nogle gange. Holdes tæt lukket. Blandingen fremstilles på forsøgsdagen eller et par dage før.

Farveblandingen

Da farveblandingen indeholder metanol, som ødelægger acryl, blandes farven i en glasflaske med glasprop. Tag 75 mL demineraliseret vand og tilsæt 125 mL absolut metanol, 25 mL iseddikesyre og 25 mL Western Blot Stain-koncentrat (Coomassie-farve). Bland godt.

Klargøring af prøverne

Hver af prøverne A-E opløses (rehydreres) ved at der tilsættes 130 μ L af den tilhørende ”Reconstitution Buffer” til hvert af rørene. Husk at skifte pipettespids fra rør til rør. Inkuber i 5 minutter ved stuetemperatur og bland grundigt! Med en vandfast tusch mærkes lågene, idet man kan risikere, at etiketterne ryger af under den senere kogning.

Sørg for at lågene er helt lukkede og overfør nu rørene til det kogende vandbad i 5 minutter. Rør F med markøren behøver ikke at blive kogt.

Tag rørene op og lad dem afkøle til stuetemperatur. Bank rørene i bordet eller centrifuger kortvarigt for at sikre, at indholdet er samlet i bunden.

Fordel prøver med 20 µL af hver af prøverne A-F til hver gruppe.

Bemærk: Der er i dette kit en såkaldt ”Practice Gel Loading Solution” som man kan bruge til at øve sig i at sætte prøver på gelen med, inden man sætter de egentlige prøver på. Øveblandingen vil ikke påvirke resultatet.

Fremstilling af 2,5% agarosegel

Fortynd 10x Tris-glycin-gelbufferen i forholdet 1:9 Fremstil den mængde, som er nødvendig for at støbe de geler, som der skal benyttes. Der tilsættes agarose, så koncentrationen bliver 2,5%. Til en gel på 7x7 cm bruges 0,5 g agarose og 20 mL 1x Tris-glycin-gelbuffer. Benyt BluCap-flasker

Hvirvl rundt for at få opløst klumperne. Undgå at ryste for kraftigt, da agarosen derved sætter sig længere oppe i flasken.

Med en pen afmærkes væskenniveauet i flasken

Luk proppen ’løst’ og varm den i mikrobølgeovn i 20 sekunder ad gangen. Tag flasken ud og hvirvl let rundt. Gentag indtil alt er opløst og væske er helt klar. **Vigtigt:** Bær varmhandsker og sikkerhedsbriller – der kan nemt opstå stødkogning. Opløsningen kan også fremstilles på en varmeplade.

Lad blandingen køle til ca. 55 °C. Hvis der er fordampet meget, kan der tilsættes demineraliseret vand op til den afmærkede linje.

Forsegl enderne af elektroforesekarret. Hvis der benyttes tape lægges med en pipette en tynd agarosekant langs forseglingen. Sæt kammen i og sørg for at karret står helt vandret. Hæld agarosen op.

Lad agarose stå og afkøle. Agarosegelen er størknet og klar til brug efter ca. 20 minutter.

Elevvejledning

Fremgangsmåde

Materialer

Dag 1:

- 20 μ L af hver af de forkogte prøver A-E
- 20 μ L markør
- Eventuelt ”Practice Gel-Loading Solution
- Elektroforeseapparat med gel m.m.
- 20-30 mL 95-100% metanol
- Tris-glycin-SDS-elektroforesebuffer
- 80 mL transfer-buffer
- 1 Western blot membran (nylonmembran med beskyttelseslag)
- 3 stykker tykt filtrerpapir
- papirhåndklæder
- En lille (ikke akryl) kasse, til at væde membran og filtrerpapirer i
- Demineraliseret vand
- 400 mL bægerglas
- pipetter

Dag 2:

- Farveblanding
- Affarvningsopløsning

Klargøring af elektroforeseapparatet og proteinprøverne

1. Fjern kammen og forseglingen og placer gelen i elektroforeseapparatet med brøndene nærmest den negative ende
2. Dæk gelen med 1x elektroforesebuffer (Tris-glycin-SDS-elektroforesebuffer)
3. Kog proteinprøverne i 5 minutter
4. Sæt prøverne på gelen i følgende rækkefølge:

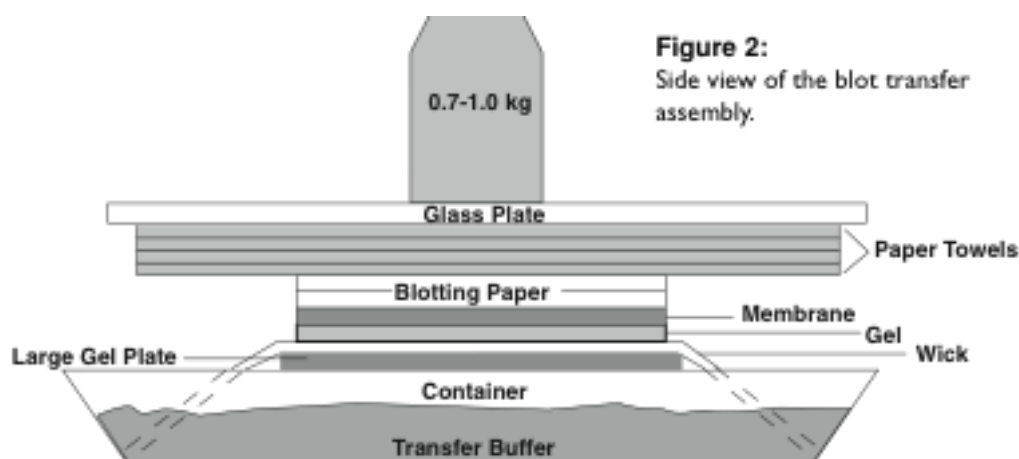
1. 20 μ L prøve A – positiv kontrol
2. 20 μ L prøve B – negativ kontrol
3. 20 μ L prøve C – patient 1
4. 20 μ L prøve D – patient 2
5. 20 μ L prøve E – patient 3
6. 20 μ L Molekylvægt standardfarve



5. Sæt forsigtigt låget på elektroforesekarret og tilslut karret korrekt til strømforsyningen
6. Start elektroforesen og kørs ved 125 V i 60 minutter – eller i så lang tid, at den blå farve, der løber forrest har bevæget sig mindst 4,5 cm. Der kan også køres ved lavere spænding fx 70V i 1½ time.

Western Blot

1. Dæk jeres bord med et stykke plastikfolie eller find en bakke, hvori I kan lave 'blotting-sandwichen'. Herpå skal den "sandwich" I nu skal lave placeres. Bakken skal have en glat bund og benyttes der plastikfolie, skal det ligge helt glat.
2. Tag handsker på! Og fjern forsigtigt beskyttelseslagene på den (hvide) nylonmembran.
3. Med en pincet flyttes membranen **forsigtigt** over i det plastkar, hvori blottingen skal finde sted.
4. Dæk membranen med ca. 20 mL 95-100% **methanol i 10 sekunder**. Hæld methanolen fra og gem den!
5. Dæk straks membranen med demineraliseret vand. Lad det stå i 5 minutter. Herved fjernes methanolen
6. Hæld vandet fra og dæk nu membranen med fortyndet transfer-buffer. Lad det stå i mindst 10 minutter indtil membranen skal bruges
7. Fjern gelen fra holderen og lad den glide ned i et separat kar med fortyndet transfer-buffer. Lad den stå i bufferen i 10-15 minutter.
8. Mæt et stykke filtrerpapir med transfer-buffer. Læg filtrerpapiret på den glatte plastikfolie på bordet eller i karret. Hvis du benytter et kar laves desuden en væge af filtrerpapir (Whatman nr. 1).
9. Tag handsker på og flyt forsigtigt gelen med bunden i vejret over på filtrerpapiret. Med en pipette eller et lille reagensglas rulles forsigtigt hen over gelen, så eventuelle luftbobler mellem filtrerpapiret og gelen fjernes.
10. Sprøjt forsigtigt 1-2 mL transfer-buffer på gelen og placer derefter forsigtigt den gennemvædede membran oven på gelen. Fjern eventuelle luftbobler ved at rulle en pipette hen over
11. Med en blyant markeres båndene ud for brønd 6. Marker deres farve (B1=blå, B2=blå, L=lilla, R=rød)
12. Mæt et stykke filtrerpapir med transfer-buffer og placer det oven på membranen. Fjern eventuelle bobler
13. Mæt endnu et stykke filtrerpapir med transfer-buffer og placer ovenpå. Fjern eventuelle luftbobler
14. Læg nu en stak tilpassede (7x7cm) papirservietter ovenpå. Denne stak skal være 4-6 cm høj.
15. Luk sandwichen til med plastikfoliet
16. Øverst placeres en plade og der stilles en vægt på 400g ovenpå plade. Lad blottingen foregå natten over eller i mindst 4 timer.



Farvning af membranen

1. Tag handsker på og fjern det, der ligger ovenpå membranen, men lad membranen ligge ovenpå gelen
2. Med en blyant markeres forsigtigt hver brønd og brøndens nummer (husk at gelen ligger med bunden i vejret)
3. Men en pincet fjernes membranen fra gelen og lægges forsigtigt ovenpå et rent stykke filtrerpapir. Den side af membranen, der vendte ned mod membranen skal vende opad nu.
5. Med en blyant noteres i et af de nederste hjørner 'O' for opad. Lad membranen inkubere i varmeskabet ved 65°C i 10 minutter. Herved fikseres prøverne i membranen.



Membranen kan gemmes i adskillige dage, når prøverne først er fikseret

6. Fugt membranen i methanol – der må ikke være nogen tørre steder.
7. Læg derefter membranen i demineraliseret vand i 5 minutter
8. Læg membranen i Western Blot Stain™ i 10-15 minutter. Ryst af og til.
9. Med en pincet overflyttes membranen til karret med methanol. Med pincetten flyttes membranen forsigtigt frem og tilbage i methanolen for at affarves. Hold øje med den positive kontrol. Når der er synlige bånd overføres membranen til et kar med demineraliseret vand.
10. Lad membranen ligge i vandet i 5-10 minutter. Tag den op og læg den på et stykke filtrerpapir

Beregning af størrelsen på det virale(sygdomsfremkaldende) protein

Sammenlign patienternes bånd med den positive og negative kontrol.

Resultatet

De to prøver, der indeholder den positive kontrol og den simulerede HIV-positive, vil vise et proteinbånd. Det vil sige, at der er bånd ved den positive kontrol samt ved patient 1 og 3.

Ud fra markøren tegnes en standardkurve som kan benyttes, når man skal beregne molekylvægten for det virale protein. Der kan benyttes semilogaritmisk papir, lommeregner, Excel e.l.

Lane	Sample	Mol. Wt. (daltons)
1	A Positive control	120,000
2	B Negative control	—
3	C Patient # 1 - positive	120,000
4	D Patient # 2 - negative	—
5	E Patient # 3 - positive	120,000
6	F Standard dye markers	
	B-1 (Blue 1)	140,000
	B-2 (Blue 2)	110,000
	P (Purple)	90,000
	R (Red)	70,000

