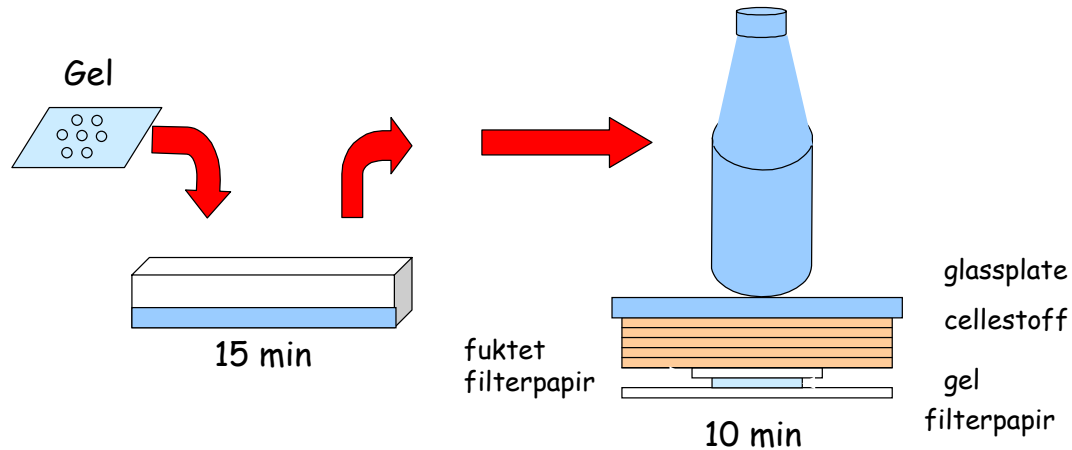


## Oppgave 16.2 fortsetter

Vask av presipiteringsgeler for å fjerne ikke-presipitert protein (bakgrunn):

Vask 3 x 15 min + 10 min press i fysiologisk saltvann /evt. over natt + 10 min. press.

Deretter 1 x vask i dest. vann i 15 min + 10 min press



**NB!** Gelen kan løsne fra glassplaten i vaskekaret. Prøv da forsiktig å manøvrere gelen tilbake på glassplaten før den legges i press.

Etter siste vask; ta forsiktig av filterpapiret, og legg gelen til tørk i inkubatoren i 1 time.

## Farging av gelene:

- Sett platene i holder  $\Rightarrow$  5 min i fargevæske (i avtrekk).
- La deretter fargen renne godt av og sett 3 min i første avfargingskar.
- Fortsett på samme måte med 3 min i hvert avfargingskar til forhold mellom bakgrunn og presipitat er bra. Pass på å ikke avfarge for mye da dette kan fjerne svake presipiteringslinjer.
- Dypp gelene i dest. vann.
- Tørk i inkubator.

## 16.3 Agglutinasjon

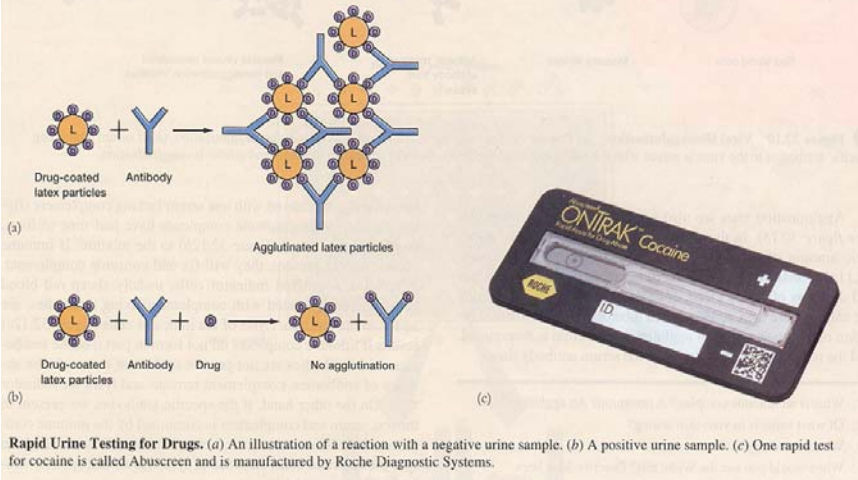
- ✿ En agglutineringsreaksjon dannes ved å kryssbinde celler eller partikler med spesifikke antistoff.
- ✿ I agglutineringsreaksjoner dannes vanligvis synlige aggregater som kan ses med det blotte øye.
- ✿ Direkte agglutineringsreaksjoner brukes bl.a. ved diagnose av noen sykdommer, og involverer direkte agglutineringsreaksjon av bakterie/celler med spesifikke antistoff.
- ✿ Hemagglutineringsreaksjon er direkte agglutineringsreaksjon av røde blodceller med antistoff mot overflatestrukturer.
- ✿ Bruk av små syntetiske partikler er nå ofte brukt i agglutineringsreaksjoner. Disse partiklene består ofte av lateks, og kan dekkes enten med antigen eller antistoff, og gjør at man lettere kan se om en agglutineringsreaksjon skjer. Eksempler på slike tester er: graviditets-tester, deteksjon av antistoffprodukter i infeksjoner, og i narkotika-testing.

## The Rapid Detection of Drugs in Urine

Historically, drug-screening assays were done by classical chemical methods such as thin-layer chromatography (TLC) or liquid chromatography (LC) which, though accurate, are laborious procedures. Assays currently employed in limited drug testing are based on antigen-antibody reactions. Some examples are the radioimmunoassay, enzyme immunoassay, and fluorescence immunoassay methods, all of which depend on sophisticated instrumentation. With the requirement for massive drug testing in sports, federal civilian employment, the military, and other fields, rapid procedures are needed.

One such rapid procedure uses a latex agglutination immunoassay for the detection of cocaine, morphine, barbiturates, THC (marijuana), methadone, pencyclidine, and amphetamines. This method provides the accuracy of the immunoassay approach without the need for expensive equipment, and gives accurate on-site "yes" and "no" results within 3 minutes.

The latex agglutination-inhibition test relies on competition for the antibody between a latex-drug conjugate and any drug that may be present in the urine. A urine sample is placed in the mixing well of a slide containing antibody reagent, buffer, and latex reagent. If the drug is absent, the latex-drug conjugate binds to the antibody and forms large particles that agglutinate. Therefore agglutination is evidence for the absence of drugs in the urine specimen (see Box figure, parts a,c). If a drug is present in the urine sample, it competes with the latex conjugate for the small amount of available antibody. A sufficient quantity of the drug will prevent the formation of particles and agglutination (see Box figure, part b), and a positive urine sample does not change the smooth milky appearance of the test mixture (see Box figure, part c).

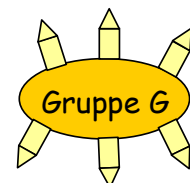
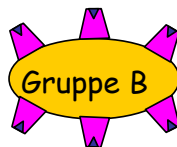
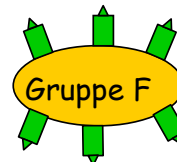
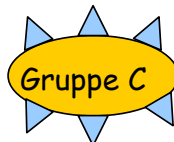


## Streptococcal grouping latex kit

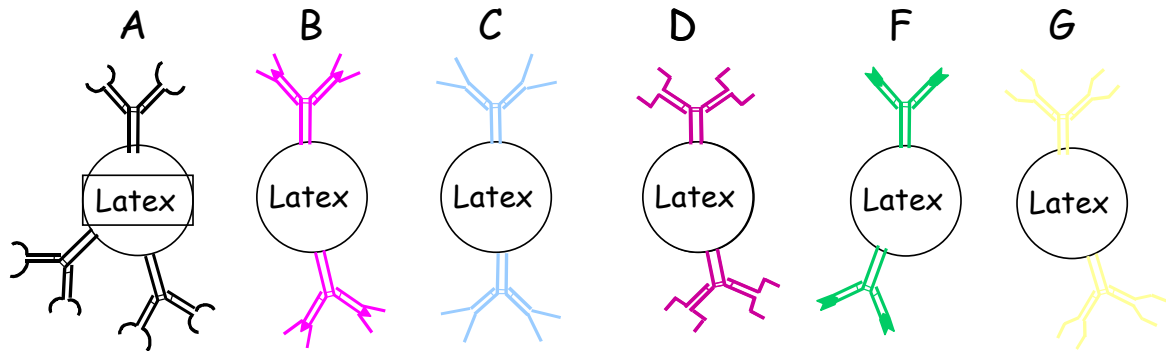
Benytter seg av gruppe-spesifikke antigener fra celleveggen hos streptokokker. Disse antigenene ekstraheres på en enkel måte.

Kit'et inneholder latekspartikler dekket med forskjellige antistoff mot disse forskjellige gruppespesifikke antigenene. Agglutinerer skjer da der latekspartikler med en type antistoff gjenkjenner sitt spesifikke antigen fra en bakterie.

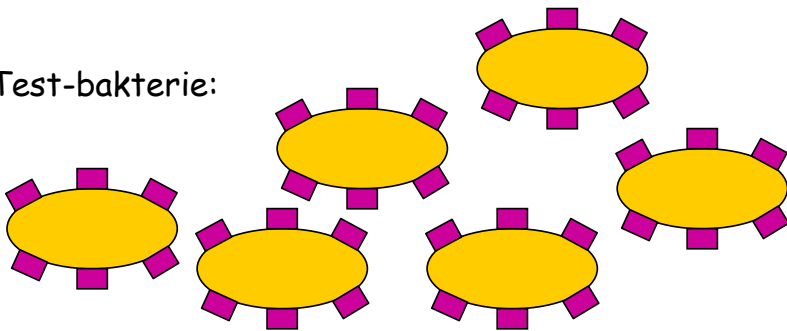
### *Streptococcus* arter



Latekspartikler med antistoff mot Lancefield gruppe:



Test-bakterie:



⇒ Agglutinerings

Bakteriene klassifiseres i Lancefield gruppe D

Bakterie 1: ●

Drypp en dråpe av latekspartikkel-løsningen for hver Lancefield gruppe i hvert sitt sorte felt på brettet.

|  |  |  |  |
|--|--|--|--|
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

Drypp deretter en dråpe av hver bakterieløsning ved siden av.

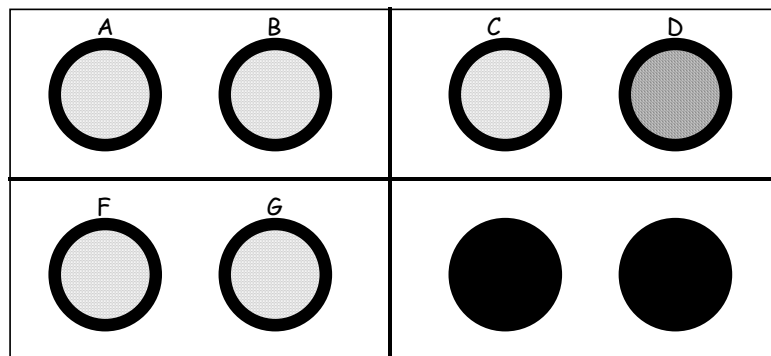
Rør sammen med pinne.

Bakterie 2: ●

|  |  |  |  |
|--|--|--|--|
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

Positiv

Vipp forsiktig på brettet og se etter aggregering av latekspartiklene



I dette eksempelet viser testen at bakterien tilhører Lancefield gruppe D

## ELISA

Enzym linked immunosorbent assay (ELISA) er en metode med høy sensitivitet brukt til deteksjon av små mengder protein - ned til 1 ng/ml.

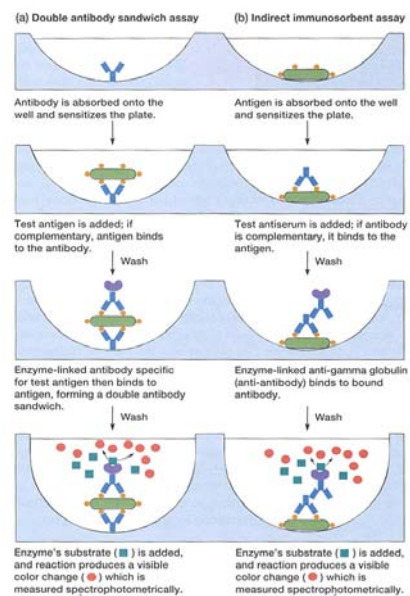
To hoved-metoder:

### 1. "Double antibody sandwich assay"

Brukes for deteksjon av antigen, ved at antistoff bindes i test-brønnen.

### 2. "Indirect immunosorbent assay"

Brukes til deteksjon av spesifikke antistoff i et testserum ved at antigenet festes i brønnen.



(c)

## 16.4 Komplement fikseringstest

NB! Utføres ikke på kurset.

Tidligere brukt bl.a. i diagnose av syfilis.

Brukes nå til diagnose av virus, sopp, og protozoa forårsakede sykdommer.

Baserer seg på interaksjon mellom Fc-delen (CH<sub>2</sub>-IgG/IgM) av antistoff og komplementproteiner (C1-kompleks). Dette fører til en autokatalyse av C1r, som starter en proteolytisk kaskade-reaksjon som ender i dannelse av MAC (membrane attack complex). MAC er et porekompleks i målmembranen, bestående av komplementkomponentene: C5b, C6, C7, C8 og flere molekyler C9.

Hvis MAC dannes på en erythrocytt-membran, vil man få hemolyse.

