

STEFFENS BIOTECHNISCHE ANALYSEN GmbH

Baumgartenstr. 5

D-79285 Ebringen (FRG)

Tel.: +49 7664 600254

Fax: +49 7664 600255

Email: info@steffens-biotec.com

PFBV - ELISA

Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

zum Nachweis des

Pelargonium Flower Break Virus (PFBV)

Art.-No. 2609BE00.FWD

1. Einführung

Der PFBV-ELISA ist ein Sandwich-Enzym-Immunoassay, mit dem eine PFBV-Infektion in Pelargonien (Geranien) nachgewiesen werden kann. Er ist einfach in der Handhabung und liefert innerhalb einer Stunde das Ergebnis.

Seine Nachweisgrenze wurde ermittelt, indem infiziertes Pflanzenmaterial (*Chenopodium quinoa*) extrahiert wurde und Verdünnungen des Extrakts gemessen wurden. Das Virus konnte noch in einer 1/1000-Verdünnung eines 10%igen Extrakts nachgewiesen werden.

Der Test ist ausgelegt für 14 Analysen. Er enthält eine positive und eine negative Kontrolle; immobilisiert auf der Festphase, an der die immunologischen Reaktionen ablaufen. Mit ihnen wird das einwandfreie Funktionieren des Tests überprüft.

2. Vorsichtsmaßnahmen, Entsorgung

Der Probenpuffer und das Konjugat enthalten das Stabilisierungsmittel Bronidox. Das Substrat enthält Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid.

Alle Reagenzien sind in nur so geringem Ausmaß schädlich, daß keine Gefahrenhinweise bzw. Sicherheitsratschläge (R- bzw. S-Sätze) zutreffen. Dennoch: Reagenzien nicht verschlucken und von Kindern fernhalten! Hautkontakt vermeiden, evtl. benetzte Stellen mit Wasser abspülen.

Die Reagenzien können nach Gebrauch bedenkenlos dem Abwasser zugeführt werden. Alle festen Bestandteile des Testkits gehören in den normalen Hausmüll.

3. Inhalt des Testkits

- * Festphase: Dies ist ein Streifen aus Kunststoff mit 16 Vertiefungen, die in zwei Spalten angeordnet sind. Die Festphase ist zusammen mit einem Trockenmittel in einem luftdichten Folienbeutel hermetisch verpackt.
- * 14 Extraktionsbeutel zum Homogenisieren der Proben
- * 14 Faltenfilter zum Klären der Extrakte
- * Gefäß mit 50 mL Probenpuffer (gelb, gebrauchsfertig)
- * 14 Pipetten für die Proben, je 1 beschriftete Pipette für den Probenpuffer, das Konjugat und das Substrat. Die Pipetten sind graduert.
- * Gefäß mit 2,5 mL Konjugat (rot, gebrauchsfertig)
- * Gefäß mit 2,5 mL Substrat (farblos, gebrauchsfertig). Das Gefäß ist schwarz, um das Substrat vor Licht zu schützen.

Der Test ist mindestens haltbar bis zum Verfallsdatum, das auf der Verpackung angegeben ist. Er muß bei etwa 4°C aufbewahrt werden.

4. Zusätzlich erforderliches Material

- * 1 glasiertes Spezial-Pistill zum Zerreiben der Proben, 14 Trichter, 14 Reagenzgläser und 1 Reagenzglas-Ständer (Set: Art.-No. 2709BE00.FWD). Alle Komponenten sind für mehrfache Verwendung vorgesehen.
- * Schere, kaltes Leitungswasser, Saugpapier

5. Testprinzip

Die 2 x 8 Vertiefungen der Festphase sind mit einem polyklonalen Antikörper beschichtet, der PFBV spezifisch erkennt. In 2 Vertiefungen am Rand ist zusätzlich eine negative (PFBV-freie) und eine positive (PFBV-haltige) Probe immobilisiert. Dies sind die Kontroll-Vertiefungen; sie sind grün bzw. rot markiert.

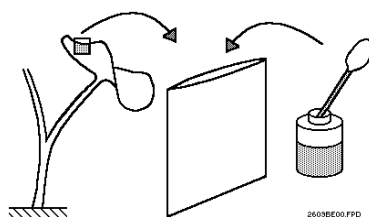
Erste Reaktion: Die Vertiefungen (außer den Kontrollen) werden mit den Proben (Geranien-Extrakte) befüllt. Eventuell vorhandene PFBV-Antigene binden an den immobilisierten Antikörper: es entsteht der Antigen-Antikörper-Komplex.

Zweite Reaktion: Nach einem Waschschrift, der alle nicht-gebundenen Probenbestandteile von der Festphase wäscht, wird ein zweiter PFBV-Antikörper zugesetzt; auch in die Kontroll-Vertiefungen. Er ist mit Peroxidase konjugiert ("Enzym-Konjugat") und bindet an den immobilisierten Antigen-Antikörper-Komplex.

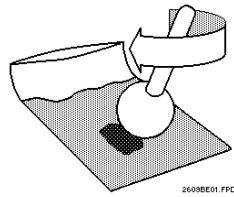
Dritte Reaktion: Nach einem Waschschrift, der nicht-gebundenes Konjugat von der Festphase wäscht, wird farbloses Substrat zugesetzt; auch in die Kontroll-Vertiefungen. Es wird von dem Konjugat in ein blaues Produkt umgesetzt. PFBV-infizierte Proben zeigen eine Blaufärbung (wie die Positiv-Kontrolle), nicht-infizierte Proben bleiben farblos (wie die Negativ-Kontrolle).

6. Vorbereitung

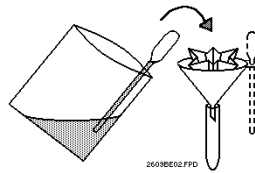
Proben: 14 ca. 10 cm² große Geranien-Blattstücke ausschneiden und in die vertikal gestellten Extraktionsbeutel legen. Die Beutel mit der Bezeichnung der jeweiligen Probe beschriften und entsprechend der Festphase (s. Tab. S. 6) durchnummerieren: B1-H1, B2-H2. Dann mit der Probenpuffer-Pipette je ca. 3 mL (oberste Graduierungs-Marke der Pipette) Probenpuffer zusetzen.



Den Extraktionsbeutel auf eine glatte Oberfläche legen und seine Öffnung nach oben halten. Mit dem glasierten Pistill und maßvollem Kraftaufwand das Blattstück im Beutel kreisförmig zerreiben. Wenn der Extrakt eine grüne Farbe angenommen hat (Freisetzung des Chlorophylls), ist die Extraktion abgeschlossen.



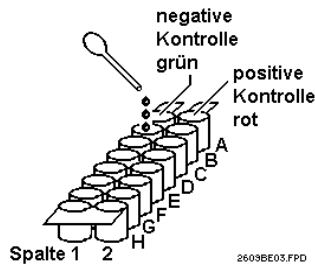
Die Extrakte einzeln mit je 1 Probenpipette in je 1 Faltenfilter überführen und die Filtrate in nummerierten Reagenzgläsern sammeln. Diese Filtrate sind die eigentlichen Proben. Die Probenpipetten werden noch einmal gebraucht und dürfen nicht untereinander verwechselt werden!



7. Testdurchführung

Vor Testbeginn müssen alle Reagenzien Raumtemperatur (19-29°C) erreicht haben. Alle Reaktionen laufen bei Raumtemperatur ab.

Inkubation mit Proben: Den Beutel mit der Festphase aufschneiden, das Trockenmittel verwerfen und die Festphase in die Aussparung des Karton-Inneneinsatzes stecken; die rot und grün markierten Kontroll-Vertiefungen weisen nach oben. Die Filtrate mit ihren zugehörigen Probenpipetten in die Vertiefungen geben; jeweils 3 Tropfen. Die Kontroll-Vertiefungen bleiben beim ersten Reaktionsschritt leer! Die Inkubation dauert 10 Minuten.



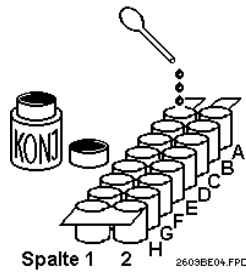
Die Identität der Proben notieren:

	Spalte 1	Spalte 2
Zeile A	Neg.-Kontrolle (grün)	Pos.-Kontrolle (rot)
Zeile B		
Zeile C		
Zeile D		
Zeile E		
Zeile F		
Zeile G		
Zeile H		

Waschen der Festphase: Die Festphase aus der Halterung nehmen und ihren Inhalt durch Ausschleudern in eine Spüle entleeren. Dann die komplette Festphase **gründlich** (3 mal für ca. 5 Sekunden) mit **kalt** Leitungswasser

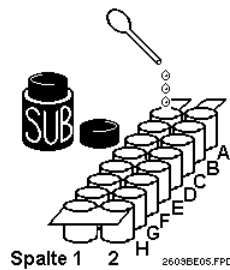
spülen. Zum Schluß entleeren, Haftwasser abschleudern, die Festphase auf Saugpapier ausklopfen und wieder in ihre Halterung einsetzen.

Inkubation mit Konjugat: Mit der Konjugat-Pipette das rote Konjugat in die Vertiefungen geben, auch in die Kontroll-Vertiefungen; jeweils 3 Tropfen. Die Inkubation dauert 10 Minuten.



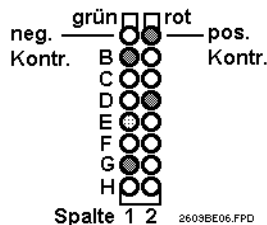
Waschen der Festphase: wie zuvor beschrieben.

Inkubation mit Substrat: Mit der Substrat-Pipette das farblose Substrat in die Vertiefungen geben, auch in die Kontroll-Vertiefungen; jeweils 3 Tropfen. Die Inkubation dauert 10 Minuten. Das Substrat ist lichtempfindlich; daher starke Beleuchtung (z. B. direktes Sonnenlicht) vermeiden.



8. Auswertung

Der Test hat einwandfrei funktioniert, wenn am Ende der Substrat-Inkubation die positive Kontrolle eine intensive Blaufärbung zeigt, während die Negativ-Kontrolle farblos bleibt. So könnte das Ergebnis aussehen:



Hier sind die Proben 1B, 1G und 2D stark mit dem PFBV infiziert, Probe 1E ist schwach infiziert und alle übrigen Proben stammen von wahrscheinlich gesunden Pflanzen.

9. Garantie und Haftung

Steffens Biotechnische Analysen GmbH garantiert, daß das ausgelieferte Produkt gründlich getestet wurde, um sicherzustellen, daß es seine Spezifikationen erfüllt und der hier gegebenen Beschreibung entspricht. Weitergehende Garantien werden nicht gegeben. Insbesondere kann keinerlei Haftung für Schäden akzeptiert werden, die aufgrund einer unkorrekten Anwendung oder Lagerung des Produktes entstanden sind.