

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

Ezyme Linked Immuno Sorbent Assay

zum Nachweis des

Pelargonium flower break virus (PFBV)

Kompletter Testkit für 2 x 12 Analysen; Art.-No. 04093E00.CWD. Nur für Laborzwecke. Die Reagenzien enthalten Bronidox L zur Stabilisierung. **Giftig beim Verschlucken. Von Kindern fernhalten.**

1. EINFÜHRUNG

Der PFBV ELISA ist ein Sandwich-Enzym-Immunoassay mit einem besonderen Design: der Antikörper wurde auf den Zinken eines speziellen Kamms statt in herkömmlichen Kavitäten immobilisiert. Dadurch ist der Test besonders einfach und schnell (innerhalb von **30 Minuten**) durchzuführen.

Der Kit erlaubt es, eine PFBV-Infektion in 2 x 10 Proben sensitiv und sicher nachzuweisen. Um das einwandfreie Funktionieren des Tests sicherzustellen, wurde die 11. und 12. Zinke des Kamms mit einer negativen und einer positiven Kontrolle beschichtet (grüner bzw. roter Punkt).

Die Nachweisgrenze des Tests wurde ermittelt, indem infiziertes Pflanzenmaterial (Chenopodium quinoa) in Probenpuffer extrahiert und verdünnt wurde. Das Virus konnte noch in einer 1:1.000-Verdünnung eines 10 %igen Extrakts nachgewiesen werden (>100 mOD über Gesund-Kontrolle).

Dieser Test wurde im Rahmen einer Kooperation zwischen BIOREBA AG und STEFFENS GmbH entwickelt.

2. TEST-PRINZIP

Die Zinken des Kamms sind mit einem polyklonalen Antikörper beschichtet, der PFBV spezifisch erkennt.

- 1. Reaktion:** PFBV-Antigene aus der Probe werden an den immobilisierten Antikörper gebunden; es entsteht der Antigen-Antikörper-Komplex.
- 2. Reaktion:** ein zweiter PFBV-Antikörper, markiert mit Meerrettich-Peroxidase (Enzym-Konjugat), bindet an den Antigen-Antikörper-Komplex.
- 3. Reaktion:** der Enzym-markierte Antigen-Antikörper-Komplex setzt ein Substrat zu einem blau gefärbten Produkt um. PFBV-infizierte Proben zeigen diese Blaufärbung, nicht-infizierte Proben bleiben farblos.

3. INHALT DES TESTKITS

- 2 Kämme, beschichtet mit PFBV-Antikörpern. Zusammen mit Trocknungsmittel und 3 Strips von je 12 Kavitäten in luftdichten Plastikbeuteln separat verpackt.
- 20 Extraktionsbeutel zum Homogenisieren der Proben.
- 2 Gefäße mit Probenpuffer (gelb, gebrauchsfertig, je 50 ml).
- 24 Pipetten, für 2x10 Proben, 2x1 verdünntes Konjugat und 2x1 Substrat.
- 2 graduierte Pipetten für 2x1 Probenpuffer.
- 2 Pipetten mit feiner Öffnung für 2x1 konzentriertes Konjugat.

- g. 2 Röhrchen mit konzentriertem Konjugat (farblos, je 50-250 µl, abhängig von der Kit-Charge, genau angegeben auf dem Etikett).
 - h. 2 Gefäße mit Konjugatpuffer (blau, je 2,0 ml).
 - i. 2 Gefäße mit Substratlösung (farblos, gebrauchsfertig, je 2,0 ml).
 - j. 1 Pipettier-Ständer (Teil der inneren Verpackung).
- Die Reagentien des Testkits sind bei 2-8°C mindestens bis zum angegebenen Verfallsdatum (Außenetikett) stabil.

4. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE HILFSMITTEL

- a. Ein Homogenisator; kann auf Anfrage geliefert werden.
- b. Kaltes Leitungswasser.
- c. Photometer mit 650 nm-Filter (optional; der Test kann auch rein visuell ausgewertet werden). Ein Photometer für Kavitäten-Streifen benötigt kein weiteres Zubehör; ein Microtiter-Platten-Photometer erfordert einen Rahmen, der auf Anfrage geliefert werden kann.

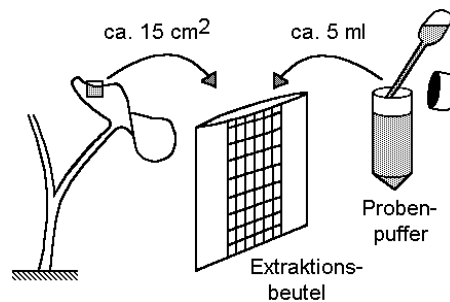
5. VORBEREITUNG

Entleeren Sie die Schachtel vollständig und entnehmen Sie den inneren Einsatz. Leeren Sie das Fach mit den Pipetten. Da der Kit für 2 Tests à 12 Analysen vorgesehen ist, enthält er alle Bestandteile doppelt. Legen Sie einen Satz der Komponenten zurück in die Schachtel und bewahren ihn bis zu seiner Verwendung gekühlt (2-8°C) auf. Der Deckel des inneren Fachs wird aufgeklappt, sodaß er die 3 Kavitäten-Streifen aufnehmen kann. Er dient als Pipettier-Ständer. Schneiden Sie den Plastikbeutel mit dem Kamm auf. Entnehmen Sie die 3 Kavitäten-Streifen und setzen Sie sie in den Pipettier-Ständer ein; Reihenfolge und Orientierung sind gleichgültig. Das Trocknungsmittel wird nicht mehr benötigt. Legen Sie den Kamm in den Plastikbeutel zurück, ohne seine Zinken zu berühren.

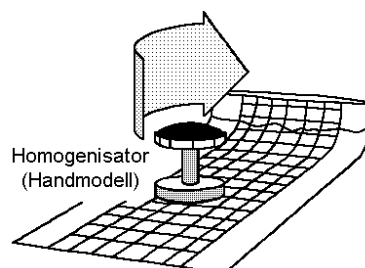
6. DURCHFÜHRUNG DES TESTS

Vor Testbeginn müssen alle Reagentien Raumtemperatur (18-24°C) erreicht haben. Alle Reaktionsschritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

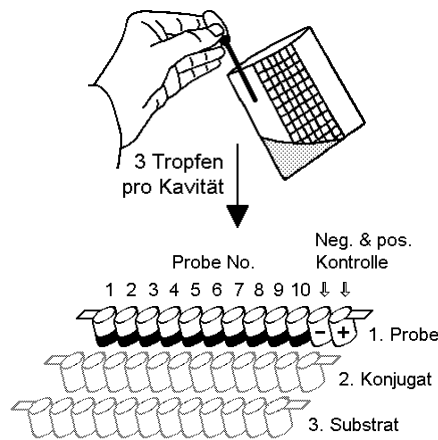
Probenvorbereitung: Legen Sie ein ca. 15 cm² großes Blattstück (etwa 0,5 g) in die Mitte des Extraktionsbeutels. Geben Sie ca. 5 ml Probenpuffer (gelb) mit der graduierten Pipette hinzu. Vermeiden Sie jede Verunreinigung des Probenpuffers durch Pflanzenextrakt.



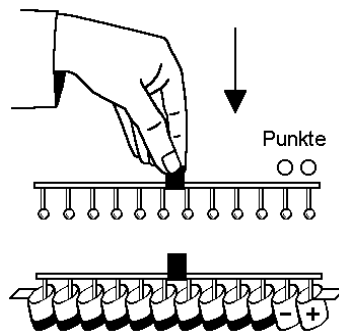
Legen Sie den Extraktionsbeutel auf eine ebene, feste Oberfläche. Mit einem Homogenisator läßt sich die Probe einfach und schnell extrahieren. Als provisorischen Ersatz können Sie auch einen stabilen, glatten Gegenstand nehmen, etwa den Griff eines Schraubenziehers. Zerkleinern Sie das Gewebe, indem Sie den Homogenisator mit etwas Druck in kreisförmigen Bewegungen über den Beutel führen, bis eine fein-homogene Suspension entstanden ist. Die Freisetzung des Chlorophylls (grüne Farbe) zeigt an, wie weit die Extraktion fortgeschritten ist.



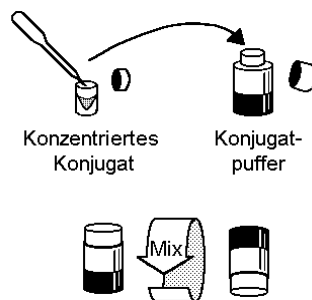
Dispensierung der Proben: Pipettieren Sie die Proben **mit separaten Pipetten** in die erste Kavitätenreihe; 3 Tropfen pro Kavität. Notieren Sie ihre Identität (Probe No. 1 - 10 von links nach rechts). Sparen Sie die Kavitäten No. 11 und 12 aus; sie bleiben während der ersten Reaktion leer.



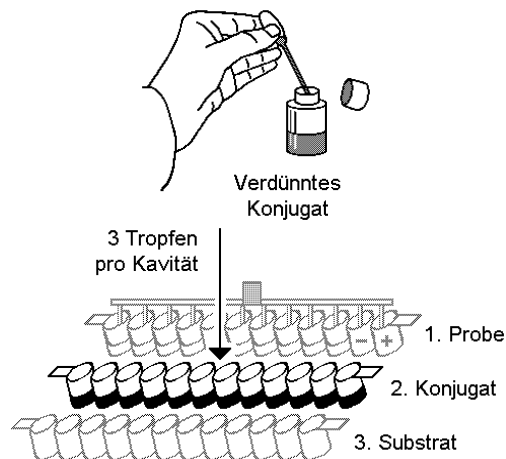
Inkubation mit Proben: Setzen Sie den Kamm so in die erste Kavitätenreihe, daß die Kontrollen (auf dem Kamm immobilisiert, s. Punkte) in die leeren Kavitäten gelangen. Damit ist die erste Reaktion gestartet; sie braucht **10 min** Inkubationszeit.



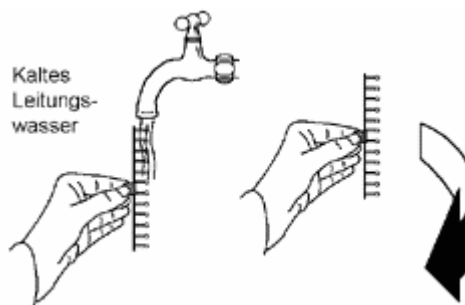
Vorbereitung des Konjugats: Überführen Sie das konzentrierte Konjugat **so vollständig wie möglich** in den blauen Konjugatpuffer. Verwenden Sie dazu die Pipette mit feiner Öffnung und werfen Sie sie anschließend weg. **Achtung:** Tropfen können am Deckel hängen. **Gründlich mischen!**



Dispensierung des Konjugats: Während der Kamm mit den Proben inkubiert, pipettieren Sie das verdünnte Konjugat in die zweite Kavitätenreihe; 3 Tropfen pro Kavität. Füllen Sie auch die Kavitäten No. 11 und 12. Verwenden Sie eine neue Pipette, die Sie anschließend wegwerfen. Vermeiden Sie jede Verunreinigung der dritten Kavitätenreihe.

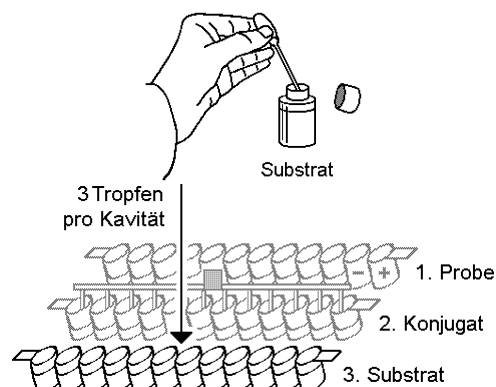


Waschen des Kamms: Nach Abschluß der Inkubation der Proben entnehmen Sie den Kamm und waschen ihn sorgfältig unter **kaltem, nicht zu kräftig fließendem** Leitungswasser, etwa 15-30 Sekunden lang. Gründliches Waschen ist wichtig, um eine geringe Hintergrundfärbung zu erzielen. Anschließend entfernt man anhaftendes Wasser mit ein paar schnellen Schleuderbewegungen des Kamms.



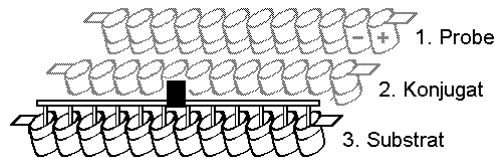
Inkubation mit Konjugat: Setzen Sie den Kamm in die zweite Reihe, erneut mit den Kontrollen (Punkten) auf der rechten Seite. Auch diese Inkubation dauert **10 min.**

Dispensierung des Substrats: Pipettieren Sie die Substratlösung mit einer neuen Pipette in die dritte Kavitätenreihe (einschließlich Kavitäten No. 11 und 12); 3 Tropfen pro Kavität.



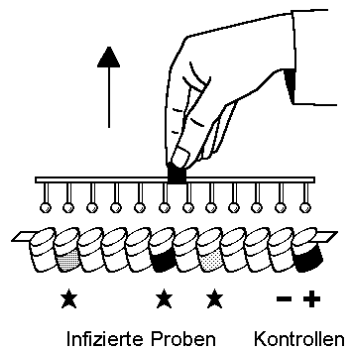
Waschen des Kamms: Nach 10-minütiger Inkubation entnehmen Sie den Kamm der Konjugat-Reihe und waschen ihn gründlich mit **kaltem** Leitungswasser, wie zuvor (S. 6) beschrieben.

Inkubation mit Substrat: Setzen Sie den Kamm in die dritte Reihe, erneut mit den Punkten auf der rechten Seite. Inkubieren Sie **10 min**. Da das Substrat lichtempfindlich ist, sollten Sie bei diesem Reaktionsschritt starke Beleuchtung (z.B. direktes Sonnenlicht) vermeiden.



7. AUSWERTUNG

Nach Entnahme des Kamms kann der Test ausgewertet werden; am besten unmittelbar nach dem letzten Inkubationsschritt. Man analysiert das Resultat entweder nur visuell oder mit Hilfe eines Microtiter-Photometers bei 650 nm.



Die Kontrollen dienen der Überprüfung des Tests. Er hat einwandfrei funktioniert, wenn die positive Kontrolle eine intensive Blaufärbung zeigt, während die negative Kontrolle farblos bleibt. Jede Probe, deren Farbreaktion wesentlich stärker ist als die der negativen Kontrolle, ist sicher infiziert. Jede Probe, die nicht intensiver als die Negativ-Kontrolle angefärbt ist, ist **sehr wahrscheinlich** nicht infiziert. Grundsätzlich kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die Virus-Konzentration der Probe unterhalb der Nachweisgrenze des Tests liegt.

Nachdem der Test ausgewertet wurde, werfen Sie den Kamm und die Kavitätenstreifen weg. Versuchen Sie nicht, die Kavitätenstreifen mehrmals zu verwenden: auch nach gründlichem Waschen könnten Sie falsch-positive Resultate erhalten.

8. 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 STEFFENS BIOTECHNISCHE ANALYSEN GmbH keinerlei Haftung für Schäden akzeptieren, die aufgrund einer unkorrekten Anwendung oder Lagerung des Produkts entstanden sind.