

KORONATYÖOHJE-OPPILAS

ENNEN TYÖN SUORITTAMISTA

Koronaan, koronan vaikutuksiin ja koronan oireisiin suositellaan perehdyttävän jo edellisellä tunnilla tai ennen työn suorittamista, jotta työn tekemisestä syntyisi mahdollisimman mielekäs kokemus oppilaille. Koronaan voi tutustua opettajan ohjastuksella tai oppilaat voivat omatoimisesti etsiä tietoa. Mikäli alkuun pääsyn kanssa tulee ongelmia voidaan seuraavia linkkejä käyttää hyödyksi: <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/ajankohtaista/ajankohtaista-koronaviruksesta-covid-19/tilannekatsaus-koronaviruksesta> , <https://covid19.who.int> ja <https://www.hs.fi/aihe/koronavirus/>

TARINA

Koronatestaus on ruuhkautunut. Opiskelet laboratorioanalytiikkaa ja sinut on kutsuttu avuksi tutkimaan potilasnäytteitä. Potilailta on otettu nenänielunäyte. Tehtävänäsi on tutkia, onko näytteessä COVID-19-viruksen antigeeniä eli sairastaako potilas koronaa. Sinä olet vastuussa testituloksista ja näin ollen taudin leviämisen estämisestä.

Ryhmänä teidän tehtävänne on selvittää, ketkä näistä kuudesta henkilöstä on saanut koronavirustartunnan. Potilaat on nimetty A-G kirjaimilla, ettei heidän identiteettinsä paljastu. Yksi pari saa tutkittavakseen kaksi näytettä.

Potilaan A oireet: Pitkään kestänyt päänsärky, lihaskivut ja yskiminen.

Potilaan B oireet: Kurkkukipu aamuisin herätessä.

Potilaan C oireet: Oireeton.

Potilaan D oireet: Päänsärky ja hän tietää olleensa altistunut taudille.

Potilaan E oireet: Oireeton, mutta tarvitsee testituloksen työtehtävää varten.

Potilaan F oireet: Oireeton.

Potilaan G oireet: Huomannut, että urheillessa hänen suorituskykynsä on laskenut.

TAUSTA

COVID-19 on joulukuussa 2019 Kiinasta lepakoista peräisin oleva koronavirus, joka on lähtenyt leviämään maailmanlaajuisesti. COVID-19 luokitellaan pandemiaksi, koska se on levinnyt kaikkialle ympäri maailmaa. Tällä hetkellä ei ole vielä mitään lääkettä, hoitamaan COVID-19 tartuntaa, kuin oheislääkkeet, jotka lieventävät kipua ja kuumetta. Taudin oireisiin kuuluvat kuume, yskä, hengenahdistus, lihaskivut, väsymys, nuha, pahoinvointi ja ripuli.

ELISA-menetelmä on nopea ja helppo tapa saada selville, onko joku tietty viruksen läsnäoloon viittaava proteiini tutkittavassa näytteessä. Nopeus ja helppous tulee esille siinä, ettei näytettä tarvitse pilkkoa geelielektroforeesia varten, vaan menetelmä perustuu proteiinien ominaisuuteen sitoutua helposti muovipintaan.

ELISA-menetelmiä on erilaisia, riippuen onko näytteessä viruksen antigeeniä vai vasta-ainetta. Koronavirustartunnan mahdollisuutta voidaan tutkia verikokeen tai nenänielunäytteen avulla. Verikokeessa tutkitaan sisältääkö veren seerumi koronaviruksen vasta-aineita ja nenänielunäytteestä tutkitaan suoraan viruksen antigeeniä. Tässä työssä tutkitaan COVID-19-viruksen antigeenin läsnäoloa nenänielusivelynäytteestä. Työssä viruksen antigeeni kiinnittyy muovisiin kennoihin, jos potilaalla on koronavirustartunta. Antigeeni kiinnittyy muovisiin kennoihin automaattisesti, kun kennot ovat valmistettu oikeanlaisesta muovista. Kiinnityksen jälkeen kennot huudellaan niin, että vain kiinnittyneet antigeenit jäävät kennoon.

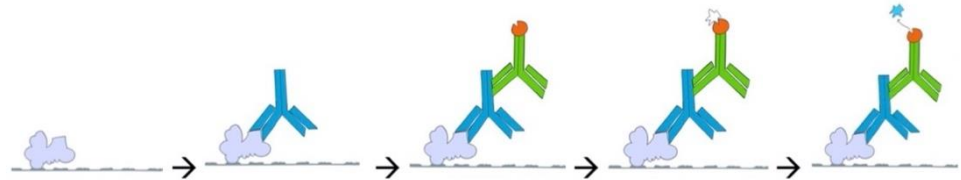
Kennoihin lisätään seuraavaksi koronaviruksen vasta-ainetta. Mikäli potilaan nenänielu sivelynäytteessä oli antigeeniä, vasta-aineet sitoutuvat kennoissa kiinnittyneisiin antigeeneihin ei-kovalenttisillä sidoksilla. Ei-kovalenttisiin sidoksiin kuuluvat esimerkiksi Van der Waalsin voima ja vetysidokset. Kennojen sisältö huuhdellaan ja kennoihin jää jäljelle antigeeni-vasta-ainekompleksi tai kennot jäävät tyhjäksi, mikäli potilaan näyte ei sisällä COVID-19 antigeeniä.

Tarvitaan vielä toista vasta-ainetta, että saadaan selville sisältääkö seerumi COVID-19 vasta-ainetta. Toinen vasta-aine on nimeltään ilmaisain vasta-aine tai sekundäärinen vasta-aine. Ilmaisain vasta-aineella on kyky ilmaista, mikäli antigeeni-vasta-ainekompleksi löytyy kennoista. Ilmaisain vasta-aine sitoutuu COVID-19 vasta-aineeseen, mikäli sellainen löytyy kennosta. Jälleen kennot huudellaan, jotta kennoihin jää jäljelle vain kiinnittyneet molekyylit/kompleksit.

Ilmaisain vasta-aineeseen on liitetty piparjuuriperoksidaasi entsyymi, johon ilmaisu perustuu. Viimeiseksi kennoihin lisätään TMB substraattia, eli yhdistettä, jonka ilmaisain vasta-aineeseen liitetty entsyymi voi muuttaa. Tässä työssä entsyymi muuttaa substraatin niin, että liuoksen väri muuttuu siniseksi.

Työssä aina ensimmäisenä kiinnitetään antigeenit kennoihin. Kiinnittymätön antigeeni huuhdellaan pois ja tämän jälkeen lisätään vasta-ainetta. Mikäli

sivelynäytteessä on COVID-19 antigeeniä sitoutuvat vasta-aineet antigeeneihin. Tapahtuu huuhtelu ja ilmaisin vasta-ainetta lisätään. Ilmaisin vasta-aineet sitoutuvat antigeeni-vasta-ainekompleksiin. Tapahtuu huuhtelu ja kennoihin lisätään substraattia. Koska kennoihin on muodostunut antigeeni-vasta-aine-ilmaisin vasta-ainekompleksi, substraatti muuttuu nesteessä ja nesteen väri vaihtuu siniseksi.



Kuva 1. kuvaa mitä vaiheita ELISA-menetelmässä tapahtuu, mikäli näytteessä on läsnä koronaviruksen antigeeniä. Kuvassa liila = antigeeni, sininen = primäärinen vasta-aine, sininen = sekundaarinen vasta-aine, oranssi = entsyymi, valkoinen = lisätty substraatti

Mikäli kyseessä on potilas, jolla ei ole COVID-19 tartuntaa, kennoihin ei kiinnity ollenkaan antigeeniä. Kennot huuhdellaan ja tämän jälkeen lisätään vasta-ainetta. Koska sivelynäytteessä ei ole COVID-19 antigeeniä ei vasta-aine pysty sitoutumaan mihinkään kiinni. Tapahtuu huuhtelu ja ilmaisin vasta-ainetta lisätään. Ilmaisin vasta-aineet eivät pysty sitoutumaan mihinkään, koska antigeeni-vasta-ainekompleksi puuttuu. Tapahtuu huuhtelu ja kennoihin lisätään substraattia. Koska kennoihin ei ole muodostunut antigeeni-vasta-aine-ilmaisin vasta-ainekompleksia, mikään ei ole muuttamassa substraattia nesteessä ja nesteen väri ei muutu.

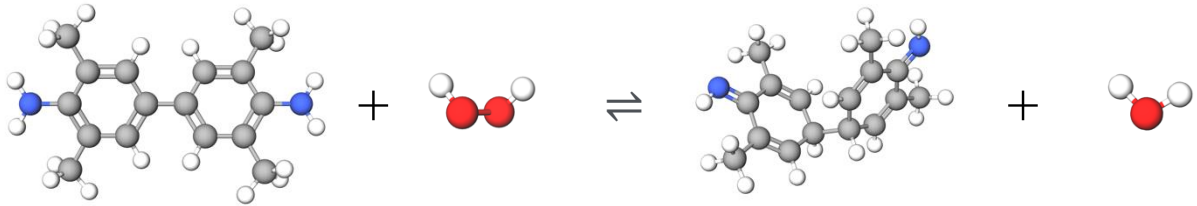


Kuva 2. kuvaa mitä vaiheita ELISA-menetelmässä tapahtuu, mikäli näytteessä ei ole läsnä koronaviruksen antigeeniä. Kuvassa sininen = primäärinen vasta-aine, sininen = sekundaarinen vasta-aine, oranssi = entsyymi, valkoinen = lisätty substraatti

ELISA-menetelmää käytetään sekä virologian kokeellisessa että diagnostisessa työssä. Menetelmä on erittäin herkkä, joka pystyy havaitsemaan proteiinit picomolaarisella (10^{-12} M) – nanomolaarisella (10^{-9} M) alueella. ELISA-menetelmä on käytetyin

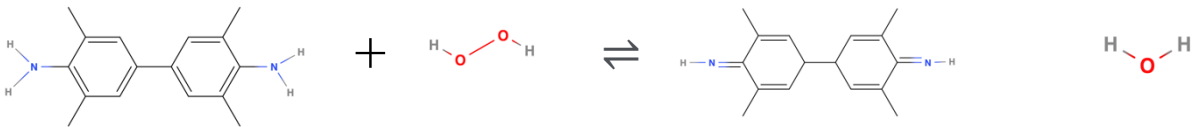
tutkimusmuoto monien vierasperäisten tautien diagnosoinnissa, kuten HIV-1 (ihmisen immuunikatovirus), HTLV-1 (human T-cell leukemia), adenovirus ja sytomegalovirus.

Piparjuuriperoksidaasi entsyymien ja TMB substraatin välinen reaktioyhtälö:



piparjuuriperoksidaasi

TMB eli 3, 3', 5, 5'-tetrametyylibentseeni + vetyperoksidi \rightleftharpoons hapettunut TMB + vesi



POHDITTAVAKSI ENNEN TYÖTÄ

1. Mikä on oma oppimistavoitteesi COVID-19 työhön liittyen?
2. Tee hypoteesi siitä, onko näytteen antaneilla henkilöillä koronatartunta

3. Täytä puuttuvat sanat tekstin joukkoon

Terveen potilaan ELISA-testin viimeisessä vaiheessa liuoksen väri on _____ ja sairaan potilaan _____. Terveen potilaan nenäsivelynäytteestä puuttuu _____, minkä vuoksi _____ ei pysty kiinnittymään kennoihin. Sen vuoksi myöskään _____ ja _____ eivät reagoi keskenään työn viimeisessä vaiheessa ja väri _____ muutu/muuttuu. Sairaalla potilaalla näytteessä on _____ mikä kiinnittyy ensimmäisenä kennoihin. Edelliseen kiinnittyy _____ ja tähän _____. Viimeiseksi lisätty _____ reagoi tai on reagoimatta ja tästä saamme selville ELISA-testin tuloksen.

4. Mikä on COVID-19?

5. Millä menetelmillä COVID-19-tartuntaa voidaan testata ja mihin se perustuu?

6. Mitä tarkoittaa antigeeni, vasta-aine, entsyymi ja substraatti?

7. Mikä on ELISA-menetelmä?

8. Mitä muita viruksia ELISA-menetelmällä voidaan tutkia?

9. Voidaanko ELISA-menetelmällä tutkia muita kuin virustartuntoja?

10. Nimeä TMB:n funktionaaliset ryhmät

11. Selitä mitä orgaanisten yhdisteiden hapettuminen ja pelkistyminen tarkoittaa?

12. Mitä kompleksit ovat?

REAGENSIT

- 100 ml 10 x PBS (Phosphate Buffer Saline)
- 4,5 ml 10 % Tween 20
- 990 ml tislattua vettä
- 1,5 ml TMB (HRP-entsyymin substraatti)
- antigeeni (Antigen Chicken Gamma-Globulin 25 µg, Lyophilized)
- primäärinen vasta-aine (Primary Antibody Rabbit Anti-Chicken, Lyophilized)
- sekundaarinen vasta-aine (Secondary Antibody Goat Anti-Rabbit Antibody-HRP, Lyophilized)

TARVIKKEET

- 12-kennoinen mikrokennolevy
- pipettejä
- Finnpiipetti 20–200 µl
- 2 lasisauvaa
- mittalaseja 100–1000 ml
- dekantterilaseja
- 3 kpl 50 ml lasipulloja
- 6 kpl erivärisiä pieniä näyteputkia
- tussi näytteiden merkitsemistä varten

TYÖTURVALLISUUS JA JÄTTEIDEN KÄSITTELY

Suojatakki, –lasit ja hanskat.

10 x PBS (Phosphate Buffer Saline): Roiskeet silmiin huuhdeltava huolellisesti runsaalla vedellä vähintään 15 minuutin ajan, nostaen ala- ja yläluomia. Otettava yhteys lääkäriin. Iho pestään saippualla ja vedellä. Mikäli esiintyy ihon ärsytystä tai allergisia reaktioita on käytävä lääkärissä. Suu huuhdellaan perusteellisesti vedellä.

Tween 20: Huolehdittava raittiin ilman saannista. Iholle saatuna, riisu saastunut vaatetus välittömästi. Huuhdo/suihkuta iho vedellä. Tuotteen jouduttua silmiin, huuhdeltava runsaalla vedellä. Poistettava piilolasit. Jos tuotetta on nieltä, annettava altistuneelle välittömästi vettä juotavaksi (korkeintaan kaksi lasillista). Jos oireita esiintyy, ota yhteys lääkäriin.

Antigeeni (Chicken Gamma-Globulin 25 µg), primäärinen vasta-aine (Rabbit Anti-Chicken) ja sekundaarinen vasta-aine (Goat Anti-Rabbit Antibody-HRP): Huolehdittava raittiin ilman saannista. Jos ainetta joutuu silmiin, huuhtelee silmiä luomet auki heti juoksevan veden alla useita minuutteja. Jos ainetta joutuu suuhun, huuhtelee suu vedellä ja ota yhteys lääkäriin. Mikäli ainetta niellään, oksennettava ja otettava yhteys lääkäriin.

Antigeeni (Chicken Gamma-Globulin 25 µg): Kontakti happojen kanssa, voi aiheuttaa myrkyllisten kaasujen vapautumista.

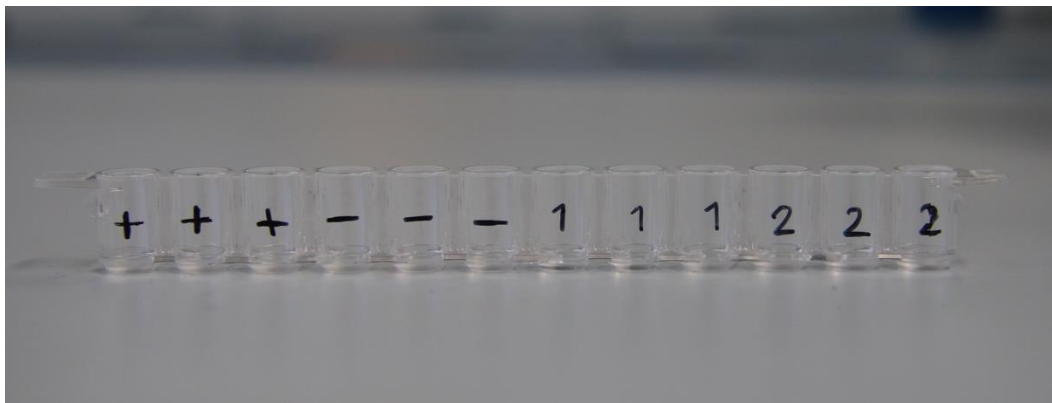
Jäte lievästi vesistöä vaarantava, ei saa päästää viemäristöön.

TYÖOHJE / TYÖN SUORITUS

1. Merkitse näyteputket (ks. kuva).
 - Violetti = 0,5 ml positiivinen kontrolli
 - Sininen = 0,5 ml negatiivinen kontrolli
 - Keltainen = tutkittavat näytteet
 - Vihreä = 1,5 ml primäärinen vasta-aine
 - Oranssi = 1,5 ml sekundäärinen vasta-aine
 - Ruskea = 1,5 ml HRP (entsyymin substraatti)



2. Merkitse kennot: + + + - - - 1 1 1 2 2 2.



3. Lisää positiivisiin kennoihin 50 μ l positiivista kontrollinäytettä (VIOLETTI).
4. Lisää negatiivisiin kennoihin 50 μ l negatiivista kontrollinäytettä (SININEN).
5. Lisää kennoihin, missä lukee 1, 50 μ l ensimmäistä näytettä (KELTAINEN 1).
6. Lisää kennoihin, missä lukee 2, 50 μ l toista näytettä (KELTAINEN 2).
7. Odota 5 minuuttia.
8. Kallista ja taputa ylimääräinen, kennoihin kiinnittymätön liuos pois paperille.
9. Pese kennot pesuliuoksella täyttämällä jokainen kenno melkein täyteen. Kiinnitä huomiota, etteivät kennojen sisällöt pääse sekoittumaan pesun aikana. Älä siis täytä kennoja liian täyteen. Taputtele kennot tyhjäksi

käsipaperille. Älä taputa samaan kohtaan paperia kahta kertaa, ettei näytteet sekoitu. Toista pesu ja taputtelu vielä kerran.

10. Lisää primääristä vasta-ainetta (VIHREÄ) pipetillä 50 µl kaikkiin kennoihin.

11. Odota 5 minuuttia.

12. Pese kennot pesuliuksella täyttämällä jokainen kenno melkein täyteen.

Kiinnitä huomiota, etteivät kennojen sisällöt pääse sekoittumaan pesun aikana. Älä siis täytä kennoja liian täyteen. Taputtele kennot tyhjäksi käsipaperille. Älä taputa samaan kohtaan paperia kahta kertaa, ettei näytteet sekoitu. Toista pesu ja taputtelu vielä kerran.

13. Lisää sekundääristä vasta-ainetta (ORANSSI) pipetillä 50 µl kaikkiin kennoihin.

14. Odota 5 minuuttia.

15. Pese kennot pesuliuksella täyttämällä jokainen kenno melkein täyteen.

Kiinnitä huomiota, etteivät kennojen sisällöt pääse sekoittumaan pesun aikana. Älä siis täytä kennoja liian täyteen. Taputtele kennot tyhjäksi käsipaperille. Älä taputa samaan kohtaan paperia kahta kertaa, ettei näytteet sekoitu. Toista pesu ja taputtelu vielä KAKSI KERTAA.

16. Lisää HRP entsyymien substraattia (RUSKEA) pipetillä 50 µl kaikkiin kennoihin.

17. Odota 5 minuuttia.

18. Havainnoi! Mitä tapahtui? Onko potilaalla koronatartunta?

POHDITTAVAKSI TYÖN JÄLKEEN

Lue artikkeli:

<https://www.aamulehti.fi/koronavirus/art-2000007485324.html>

Pohdi seuraaviin kysymyksiin vastauksia artikkelin ja nettiä käyttäen:

1. Mitä eroa on koronaviruksen antigeenitestillä ja PRC-testillä?

2. Mitä yhteistä antigeenitestillä ja PRC-testillä on?

3. Mitä koronatestin herkkyys ja tarkkuus tarkoittavat?

Lisäksi vastatkaa seuraaviin kysymyksiin työhön liittyen:

4. Jos potilas sai tekemästänne ELISA-testistä negatiivisen tuloksen, voiko hänellä silti olla tartunta? Perustele.

5. Mikä vaihe on kriittisin ELISA-testiä tehdessä?

6. Miksi kennot pestiin joka vaiheen välillä?

7. Arvioi oma teorian osaaminen ELISA-työhön liittyen

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

1 = Erittäin huono 10 = Erittäin hyvä

8. Arvioi oma käytännön osaaminen ELISA-työhön liittyen

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

1 = Erittäin huono 10 = Erittäin hyvä

9. Arvioi miten hyvin pääsit asettamaasi oppimistavoitteeseen

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

1 = Erittäin huonosti 10 = Erittäin hyvin

10. Arvioi miten paljon opit tämän työn kautta kemiaa

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

1 = Erittäin vähän 10 = Erittäin paljon

TYÖN JÄLKEEN

Työn tehneet jaetaan 4 hengen ryhmiin, niin että kaksi työtä tehnyttä paria yhdistetään. Jokaisen ryhmän tehtävänä on opettaa haluamallaan tavalla muille oppilaille yksi COVID-19n kemiaan liittyvistä aiheista sekä esitellä heidän saatuja tuloksia ja johtopäätöksiä. Opetuksen pituuden ei tarvitse olla pitkä. COVID-19ssä tulee esille esimerkiksi seuraavat aiheet: atomien väliset sidokset, molekyylien funktionaaliset ryhmät, entsyymien vaikutus reaktioon, värinmuutos reaktiot ja uusien laboratoriovälineiden käyttö.

LÄHTEET

<https://www.virology.ws/2010/07/16/detection-of-antigens-or-antibodies-by-elisa/>

<https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/ajankohtaista/ajankohtaista-koronaviruksesta-covid-19/materiaalipankki-koronaviruksesta/koronavirus-selkokielella>

<https://www.immunodiagnostic.fi/tutkimus/elisat-ja-assayt/>

<https://www.creative-diagnostics.com/ELISA-Kits.htm>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942203006551>
piparjuuriperoksidaasi kuva

Reaktioyhtälön kuvat mallinnettu molview.org sivustolla

Työohjeen uudistus: Fanny Kytölä