

ELISA Immuno Explorer

實驗目標： 通過 ELISA 免疫檢測方法，推斷班上那一位同學是帶菌源頭

實驗前資料：

請細讀以下兩段文字

H7N9 源頭發現 街市雞播毒

香港文匯報訊（記者 劉雅艷） [2013-08-23] <http://paper.wenweipo.com/2013/08/23/HK1308230010.htm>



■香港大學醫學院聯同內地及英美研究人員發現，活禽市場的家雞正是最重要的病毒源頭。 資料圖片

——帶更毒 H7N7 可致人肺炎 華東入秋或大爆發

死亡率高達 33% 的 H7N9 禽流感病毒在內地肆虐多時，昨日源頭之謎終獲拆解。香港大學醫學院聯同內地及英美研究人員發現，活禽市場的家雞正是最重要的病毒源頭。可是，禽流感陰霾仍未消散，因為研究同時發現，部分雞隻帶有一種傳播力較弱、但毒性較強的新型 H7N7 病毒，有機會感染人類而患上肺炎。研究團隊警告，內地華東地區同時面臨 H7N9 及 H7N7 禽流感威脅，雖然人傳人風險有限，但不排除入秋後會出現零星，甚或大規模人類感染個案。

H7N9 病毒源頭未明的隱憂，昨日終被消除。由香港大學李嘉誠醫學院公共衛生學院及新發傳染性疾病國家重點實驗室教授管軼，及朱華晨博士帶領的研究團隊，與汕頭大學醫學院、美國聖裘德兒童研究醫院及英國的研究人員合作，於 4 月 4 日至 18 日，在香港、浙江省溫州市、山東省日照市及廣東省深圳市，採集逾 2,300 個家禽及候鳥的樣本。

病毒候鳥傳鴨 雞感染洗牌傳人

經病毒基因排序後發現，病毒是先由候鳥傳給鴨，病毒在鴨的體內重組後，再傳給帶有 H9N2 病毒的雞隻，並進行病毒基因洗牌，產生可感染人類的 H7N9 病毒，以致內地及台灣至今共有 135 宗人類感染個案，當中 44 人死亡。研究被刊登於最新一期的學術期刊《自然》內。

朱華晨指，活禽市場的家雞是兩種病毒感染人類的重要源頭，病毒主要在口咽和呼吸道繁殖和排毒，而雞隻亦會通過鼻腔和糞便進行排毒。而目前 H7N9 及 H7N7 病毒能人傳人的機會有限，但不排除病毒會變種為高度人傳人的病毒。管軼更說：「內地華東地區至少同時面臨 2 種病毒，即 H7N9 及 H7N7 威脅，我們不排除入秋後，會出現零星人類感染個案，甚或引起流感大流行。」

2009年H1N1 新型流感是一次由流感病毒新型變體 H1N1 新型流感所引發的全球性流行病疫情。2009年3月底，該流感開始在墨西哥和美國加利福尼亞州、德克薩斯州爆發，不斷蔓延。2009年5月底，該流感在墨西哥死亡率達 2%，但在墨西哥以外死亡率僅 0.1%。持續了一年多的疫情造成約 1.85 萬人死亡，出現疫情的國家和地區達到了 214 個。世界衛生組織在 2013 年公布的數據顯示，在流感季中，全世界每 5 人中就有 1 人感染 H1N1 新型流感，但死亡率可能不到 0.02%。另據美國 CDC 估計，截至 2010 年 3 月中旬，這場疫情導致 5 千 9 百萬美國人染病，26 萬 5 千人住院，1 萬 2 千人死亡。

Quoted from http://zh.wikipedia.org/wiki/2009年H1N1_流感大流行

思考

1. H7N9 與 H1N1 的「H」和「N」代表的是甚麼？

所謂 H7N9 或 H1N1 是病毒名稱的縮寫，「H」指的是血球凝集素，而「N」則是神經氨酸酶，兩種都是病毒上**抗原**的名稱。換言之，H7N9 即是具有血球凝集素第 7 型，神經氨酸酶第 9 型的病毒。

2. 抗原是甚麼？

凡能引起免疫反應的物質都稱為抗原。外來分子可經過抗體的識別，從而誘發不同的免疫反應。而抗原抗體結合時，兩者在化學結構與空間構型上呈**互補**關係，所以抗原和抗體的結合會具有高度的**專一性**，而這種特異性質如同鎖與匙的關係。

實驗原理：

ELISA 的基本原理

ELISA(酶聯免疫吸附測試，Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)正是利用抗原抗體之間的專一性鍵結，對檢驗體進行檢測。本次實驗將使用 ELISA 間接法。

間接法(圖 1)的基本原理如下：

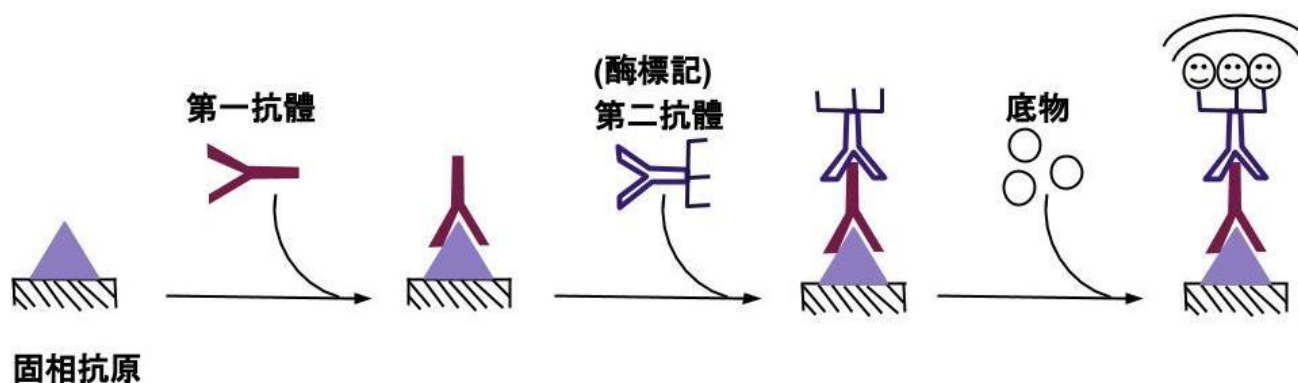


圖 1 ELISA 間接法示意圖

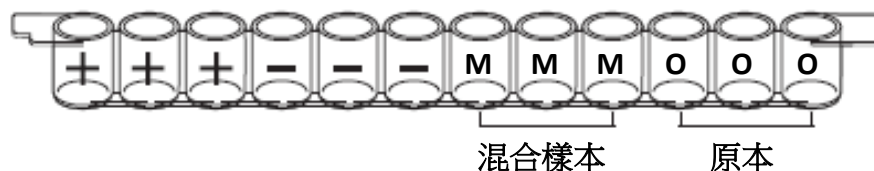
1. 讓抗原附著在承載物上（形成固相抗原）
2. 加入一抗並待之與抗原結合；清洗掉沒有結合的一抗
3. 加入標記了酶的二抗並待之與一抗結合；清洗掉沒有結合的二抗
4. 加入底物，與酶結合後會成有色產物
5. 若果沒有相應的抗原存在，則抗體會被洗掉，故加入底物後亦不會顯色
6. 因此，我們能從它有否顯色來判斷對應的抗原是否存在

實驗試劑：

測試樣本 (黃色小管), 0.75ml	4 支
陽性樣本 (紫色小管(+)), 0.25ml	1 支
陰性樣本 (藍色小管(-)), 0.25ml	1 支
第一抗體 (綠色小管(PA)), 1ml	1 支
第二抗體 (橙色小管(SA)), 1ml	1 支
酶底物 (啡色小管(SUB)), 1ml	1 支
清洗緩衝液, 45ml	1 支

實驗步驟：

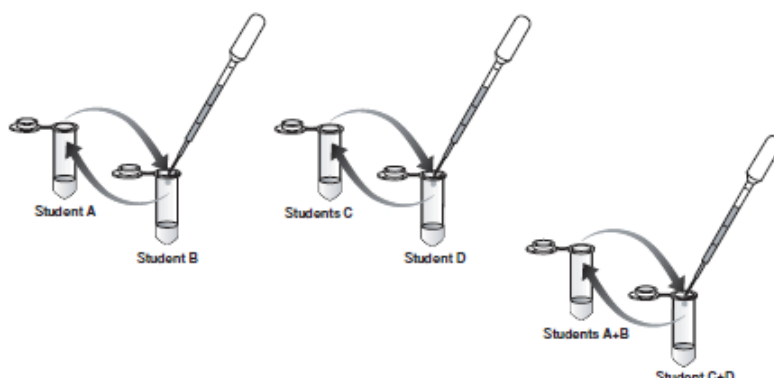
- 1) 每組取三支黃色小管，用 marker 筆在管上寫上自己組的名字
- 2) 每組使用一個 12 孔 strip，先用 marker 筆在 strip 上作出標記(如下圖)



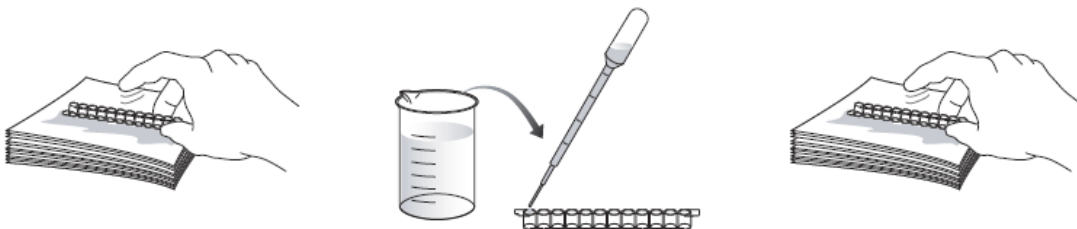
利用 20-200ul 移液槍，在標有“O”標記的孔中加入 50ul 的原測試樣本

- 3) 找一組同學，利用 100-1000ul 移液槍，把 700ul 的黃色小管中的樣本加入對方的黃色小管中，蓋上蓋子，然後輕輕搖晃，使之混合
- 4) 然後再利用 100-1000ul 移液槍，把 700ul 的對方的黃色小管中的樣本放回自身的黃色小管中，然後在右表中記錄和你交換過樣本的組別的名字
- 5) 找其它組別，重覆步驟 2 和 3 兩次，記下交換過樣本的組別名字

#1	
#2	
#3	



- 6) 利用 20-200ul 移液槍，分別在 3 個有”+”標記的孔中加入 50ul 的陽性樣本(+).
 - 7) 更換新的槍頭，分別在 3 個有”-”標記的孔中加入 50ul 的陰性樣本(-).
 - 8) 更換新的槍頭，分別在 3 個有”M”標記的孔中加入 50ul 的三支混合樣本
 - 9) 等待 5 分鐘，讓蛋白質能依附在孔上
- 10) 清洗步驟:
- a. 把 strip 上下倒轉，讓液體流在紙巾上，輕拍 strip 數次，注意不要過份用力，避免樣本濺回孔中
 - b. 丟掉頭幾張紙巾
 - c. 利用 20-200ul 移液槍，在所有孔中分別加入 150ul 的清洗緩衝液
 - [1. 不要加得太滿，避免緩衝液由一個孔流到另一個孔中
 2. 槍頭不要碰到孔壁，和不要碰到已加入孔中的緩衝液，這樣可以避免更換新的槍頭]
 - d. 重覆步驟 a 和 b

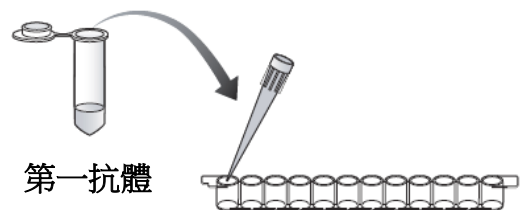


11) 重覆步驟 13

WASH

- 12) 更換新的槍頭，利用 20-200ul 移液槍，在 12 個孔中各加入 50ul 的第一抗體(PA)，靜置 5 分鐘，讓抗體和抗原結合

[槍頭不要碰到孔壁，和不要碰到已加入孔中的緩衝液，這樣可以避免更換新的槍頭]

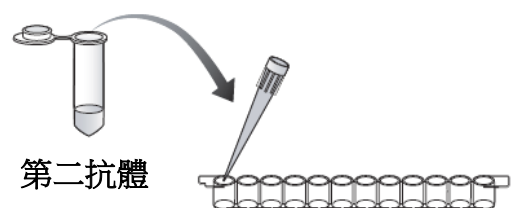


13) 重覆步驟 13 兩次，沖走未結合的第一抗體

WASH 2x

- 14) 更換新的槍頭，利用 20-200ul 移液槍，在 12 個孔中各加入 50ul 的第二抗體(SA)，靜置 5 分鐘，讓抗體和抗體結合

[槍頭不要碰到孔壁，和不要碰到已加入孔中的緩衝液，這樣可以避免更換新的槍頭]

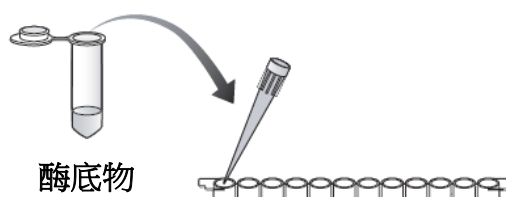


15) 重覆步驟 13 三次，沖走未結合的第二抗體

WASH 3x

16) 更換新的槍頭，利用 20-200ul 移液槍，在 12 個孔中各加入 50ul 的酶底物(SUB A)，靜置 5 分鐘，然後觀察結果。

[槍頭不要碰到孔壁，和不要碰到已加入孔中的緩衝液，這樣可以避免更換新的槍頭]



問題與討論

1. 你知道一些疾病的途徑傳播嗎？

2. 假若你的樣本對檢測呈陽性反應，這代表你與起初受感染的學生有直接交流嗎？那你可以解釋疾病如何在一個社區中傳播嗎？

3. 如何能有效地避免受到疾病感染？
