

ELISA

Cíl práce: Stanovení antiborreliových protilátek v lidském séru

Materiál: sonifikovaný celobuněčný antigen *Borrelia garinii*, kit na stanovení koncentrace proteinů (Biorad), albumin, kasein, mikrotitrační destička, ELISA reader, pipety, špičky, kádinky, roztoky (fyziologický, vazebný, promývací), konjugát a substrát (Bioplus), H₂SO₄.

Postup práce:

Stanovení koncentrace antigenu

1. Vytvořit kalibrační křivku naředěním albuminu ve fyziologickém roztoku (koncentrace: 2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml).
3. Na mikrotitrační destičce smíchat v triplicátech 5 μ l vzorku/standardu + 25 μ l roztoku A + 200 μ l roztoku B. Změřit absorbanci při 700 nm.
3. Změřené hodnoty dosadit do kalibrační křivky (lineární) a vypočítat koncentraci proteinů.

Navazování antigenu na destičku

1. Do každé jamky mikrotitrační destičky nanést pipetou 200 μ l etanolu. Nechat v klidu stát na vodorovné ploše při laboratorní teplotě 2 hodiny. Přikrýt víčkem.
2. Po uplynutí stanovené doby pipetou odsát etanol a 3x promýt 200 μ l destilované vody na každou jamku. Zbytky kapaliny z jamek odstranit mírnými údery do čistého filtračního papíru.
3. Zředění Ag na koncentraci 2 μ g/ml vazebným (karbonátovým) roztokem, přidáme 100 μ l do každé jamky
4. Zakrýt víčkem a nechat přes noc v lednici (4°C). Opět zachovat vodorovnou polohu.
5. Druhý den odpipetovat obsah jamek a 3x promýt promývacím roztokem (200 μ l/jamku). Destičku oklepat a nechat oschnout.
6. Nyní zbývá vysytit zbylou plochu na plastu, kde není navázán Ag. Do každé jamky pipetovat 100 μ l vazebného roztoku s rozpuštěným kaseinem (3%).
7. Nechat stát při laboratorní teplotě 2 hodiny.
8. Odsát, 3x promýt každou jamku 200 μ l promývacího roztoku, oklepat a nechat oschnout.

Nyní jsou destičky připraveny k provedení ELISA testu nebo mohou být uloženy v lednici na dobu max. 2 měsíců (zabránit přístupu vlhkosti).

Nepřímý test ELISA

1. Naředit vyšetřovaná séra na optimální koncentraci ředicím (blokovacím) roztokem (1:100 tzn. 1 + 100). Rozvrhnout si umístění vyšetřovaných sér na destičce. Ředěná séra pipetovat v duplikátech v množství 100 μ l/jamku. (Každý vzorek včetně pozitivní kontroly se naředí na objem 2x t.j. 2x 13 μ l séra + 1300 μ l ředicího roztoku.)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	1	1	2	2	Blank	Blank	1	1	2	2
B	4	4	5	5	6	6	4	4	5	5	6	6
C	7	7	8	8	9	9	7	7	8	8	9	9
D	10	10	11	11	12	12	10	10	11	11	12	12
E	13	13	14	14	15	15	13	13	14	14	15	15
F	16	16	17	17	PK	PK	16	16	17	17	PK	PK
G	↑ IgM ↑						↑ IgG ↑					
H												

2. Destičku s naředěnými séry a dobře těsnícím víčkem vložit do termostatu a inkubovat při 37 °C/1 hod.

3. Po uplynutí stanovené doby destičku vyjmout z termostatu, odsát roztoky v jamkách. Promýt 3x promývacím roztokem (200 μ l/jamku) a mírným poklepem odstranit zbytky kapaliny do čistého filtračního papíru.

4. Do všech použitých jamek nanést 100 μ l konjugátu (polovina - Anti-IgM, polovina - Anti-IgG). Inkubovat při 37 °C/1 hod.

5. Po inkubaci v termostatu obsahy jamek odsát, 3x promýt promývacím roztokem - 200 μ l na každou jamku. Oklepat.

6. Do všech použitých jamek nanést 100 μ l substrátového roztoku obsahujícího TMB.

7. V této fázi už se nesmí obsahy jamek odsávat. Destičku i s víčkem nechat v temnu minimálně 10 minut při laboratorní teplotě. Během této doby se vyvíjí barva v jamkách a větší množství především ultrafialového záření tuto barevnou reakci zintenzivňuje. Po uplynutí stanovené doby reakci zastavit přidáním 1M H₂SO₄ (50 μ l/jamku). Nejlépe ihned měřit absorbanci při 450 nm na ELISA-readeru.

Vyhodnocení:

Do tabulky a grafu uvést/vynést zprůměrované hodnoty absorbance všech vzorků minus zprůměrovaná hodnota blanku (**uvést! musí se pohybovat mezi 0,050-0,100**) a pro oba konjugáty (IgM/IgG) a zhodnotit výsledek. Tzn. jak moc si odpovídají popř. se liší hodnoty absorbance různých vzorků při použití stejného konjugátu (IgM/IgG) a hodnoty stejných vzorků při použití různých konjugátů (IgM a IgG). Které vzorky se v porovnání s ostatními jeví spíše jako pozitivní a které spíše jako negativní (Jde o hrubý odhad, na stanovení hranice positivity bychom museli mít podstatně větší počet vzorků.). Uvést hodnoty blanku, ale neodečítat je od hodnot vzorků. Typicky negativní vzorek (negativní kontrola) dosahuje hodnot kolem 0,100-0,300. Hodnota absorbance pozitivní kontroly bývá 1,000 a výše. **Při hodnocení všech vzorků je nutné brát v úvahu jak hodnotu blanku, která se v závislosti na ředění příliš nemění (pouze je vyšší při nedostatečném promytí atd.) a pozitivní kontroly.**