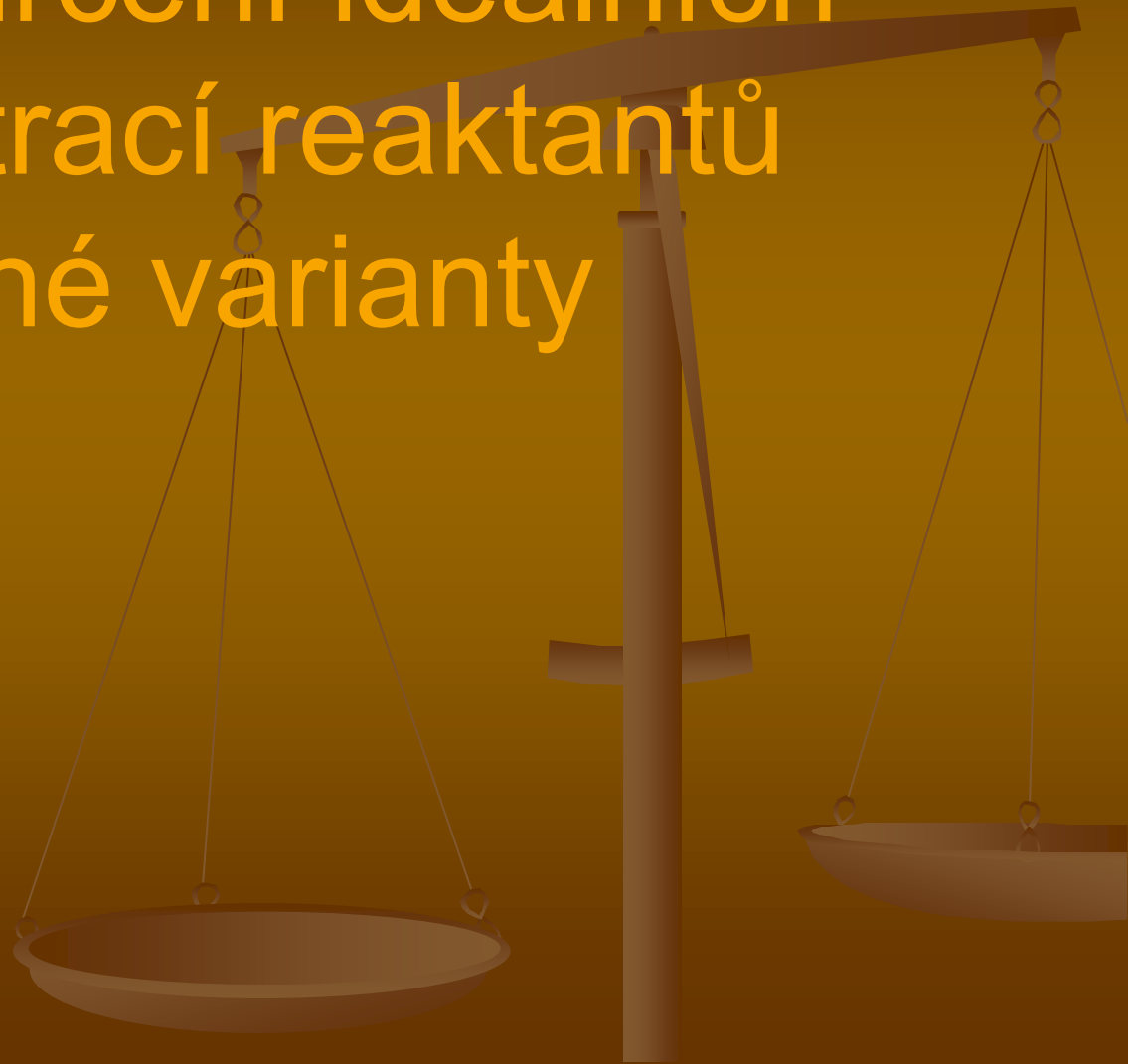


ELISA, určení ideálních
koncentrací reaktantů
-různé varianty



Přímý test ELISA

Slouží pro zjištění max. množství ag, který se může navázat do jamek destičky, pro zjištění ideálního zředění konjugátu

REAKCE: Ag + AbE

AbE ↓	Ag →	5 μg →	2,5 μg →	1,25 μg →	0,675 μg →	0,337 μg →	0,169 μg →	0,084 μg →	0,042 μg →	0,021 μg →	0,010 μg →	0,005 μg	bez Ag
1/400	A	1,720	1,720	1,720	1,709	1,686	1,600	1,450	1,250	0,941	0,595	0,311	0,100
1/800	B	1,671	1,658	1,635	1,568	1,459	1,256	1,040	0,829	0,600	0,369	0,179	0,050
1/1600	C	1,500	1,396	1,287	1,144	0,964	0,764	0,568	0,410	0,275	0,185	0,097	0,025
1/3200	D	1,095	0,946	0,797	0,649	0,503	0,385	0,297	0,225	0,154	0,108	0,062	0,013
1/6400	E	0,626	0,472	0,365	0,293	0,24	0,205	0,169	0,132	0,101	0,067	0,041	0,007
1/12800	F	0,338	0,251	0,194	0,158	0,136	0,116	0,100	0,083	0,068	0,046	0,025	0,004
1/25600	G	0,167	0,128	0,105	0,090	0,080	0,071	0,063	0,051	0,042	0,03	0,014	0,002
blank	H	0,066	0,054	0,043	0,036	0,032	0,027	0,023	0,020	0,017	0,011	0,006	0,001
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Příprava Ag:

Jako Ag vystupuje sérum a proti němu reaguje sekundární protilátka s enzymem (konjugát) nebo jakýkoliv antigen a proti němu protilátky s navázaným enzymem

50 μg karbonátového pufru do každé jamky předem

naředit Ag v karbonátovém pufru do výsledné koncentrace 10 μg/ml

dát 50 μl ředěného Ag do sloupce 1 (8x promíchat)

přenos 50 μl do sloupce 2, atd až do sloupce 11

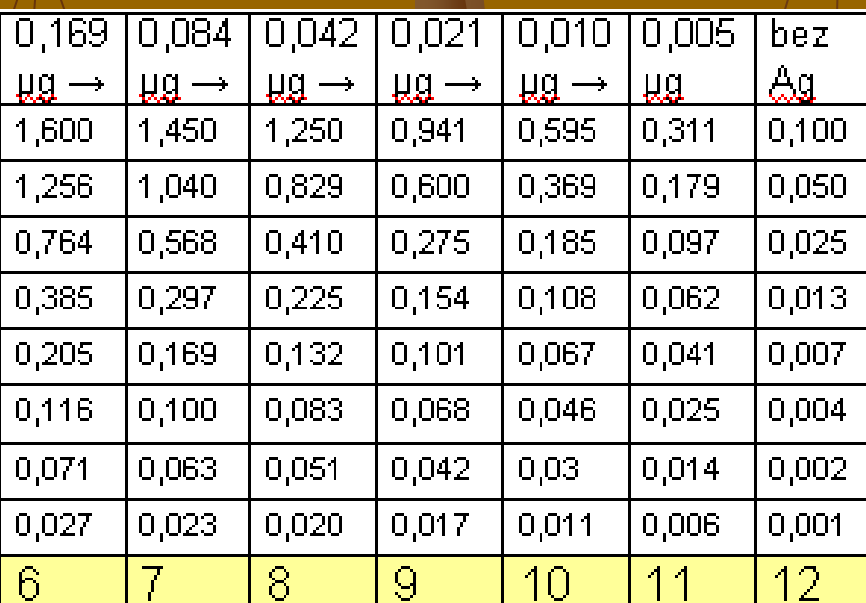
12. sloupec neobsahuje Ag – blank (Bl1).

nechat přes noc

Příprava AbE:

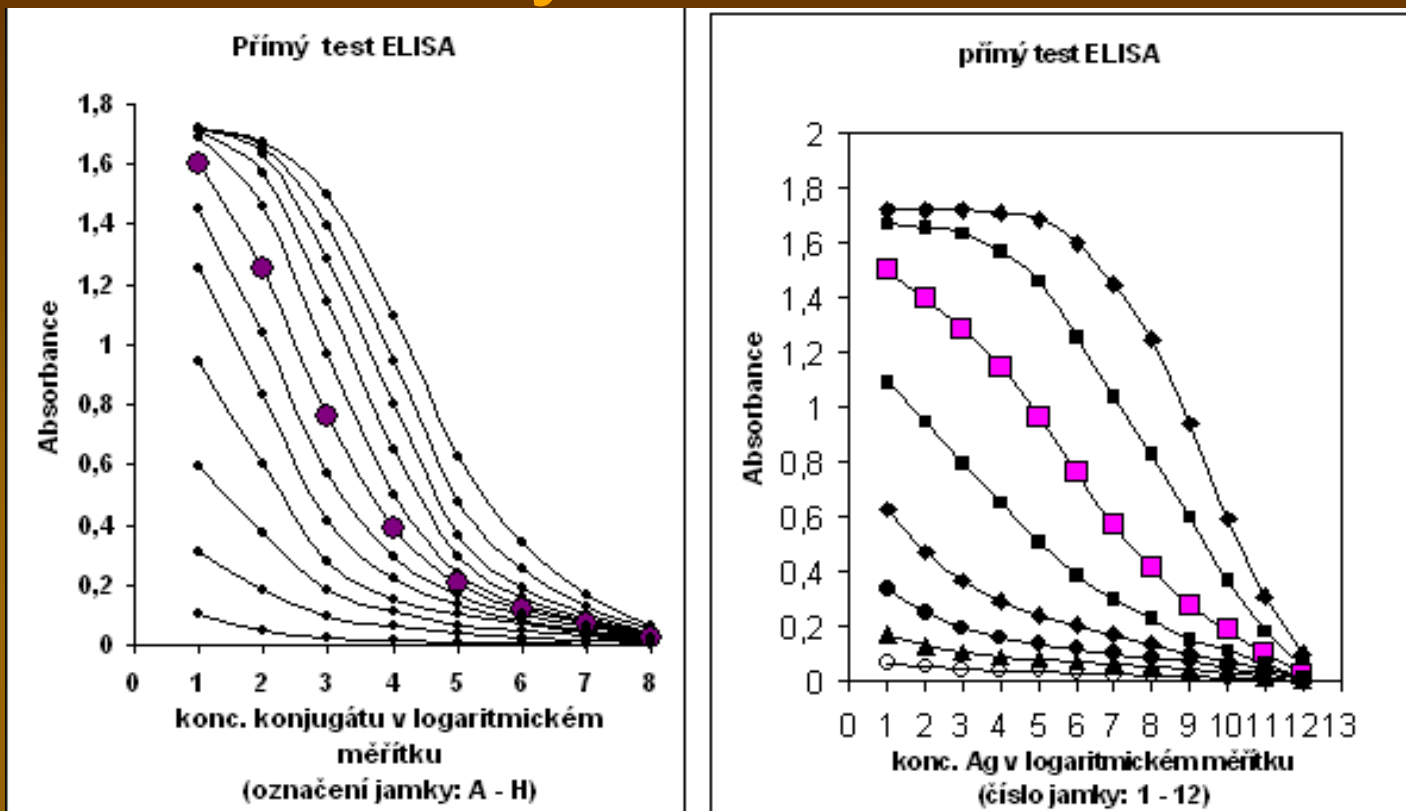
- konjugát naředit v poměru 1/200 v blokovacím roztoku (1 ml blokovačeho pufru + 5 µl konjugátu)
- do každé jamky nanést 50 µl blokovačeho roztoku
- do řady A nanést 50 µl ředěného konjugátu 1/200 (výsledná koncentrace je 1/400 v řadě A)
- přenášet 50 µl z řady A → B → C atd.
- nezapomenout na B1

B12 = bez AbE

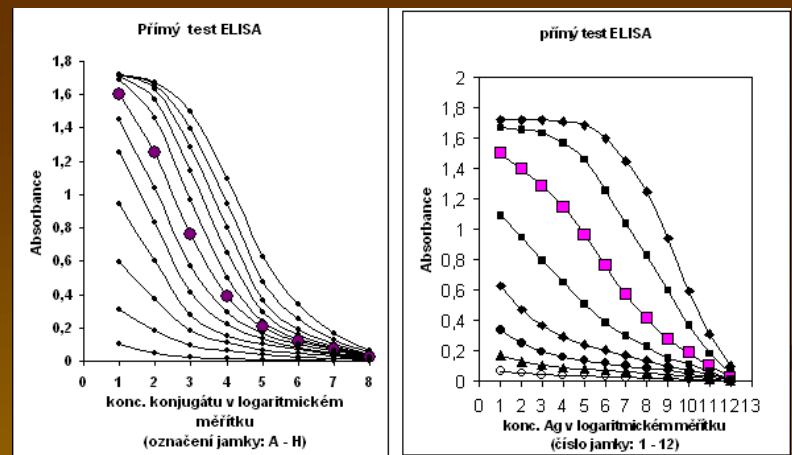


AbE ↓	Ag →	5 µg →	2,5 µg →	1,25 µg →	0,675 µg →	0,337 µg →	0,169 µg →	0,084 µg →	0,042 µg →	0,021 µg →	0,010 µg →	0,005 µg	bez Ag
1/400	A	1,720	1,720	1,720	1,709	1,686	1,600	1,450	1,250	0,941	0,595	0,311	0,100
1/800	B	1,671	1,658	1,635	1,568	1,459	1,256	1,040	0,829	0,600	0,369	0,179	0,050
1/1600	C	1,500	1,396	1,287	1,144	0,964	0,764	0,568	0,410	0,275	0,185	0,097	0,025
1/3200	D	1,095	0,946	0,797	0,649	0,503	0,385	0,297	0,225	0,154	0,108	0,062	0,013
1/6400	E	0,626	0,472	0,365	0,293	0,24	0,205	0,169	0,132	0,101	0,067	0,041	0,007
1/12800	F	0,338	0,251	0,194	0,158	0,136	0,116	0,100	0,083	0,068	0,046	0,025	0,004
1/25600	G	0,167	0,128	0,105	0,090	0,080	0,071	0,063	0,051	0,042	0,03	0,014	0,002
blank	H	0,066	0,054	0,043	0,036	0,032	0,027	0,023	0,020	0,017	0,011	0,006	0,001
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Výsledek:



Pozn: Osa x, kde ve skutečnosti nevynášíme koncentraci, ale číslo jamky, je vlastně z hlediska koncentrace v logaritmické škále a hodnoty 1-12 jsou vlastně úměrné přirozenému logaritmu koncentrace (používáme tuto stupnici, protože jde o biologický materiál, kde se průběh podobá růstové křivce; jde o široký rozptyl hodnot, proto bylo použito logaritmické měřítko. Za těchto podmínek by byl výpočet neznámé koncentrace Ag nebo Ab obtížný, proto se tento model využívá jen na zjištění ideální křivky).

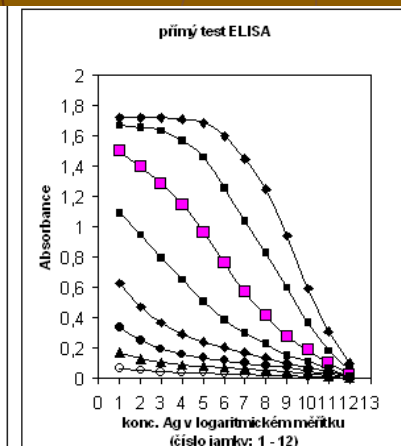
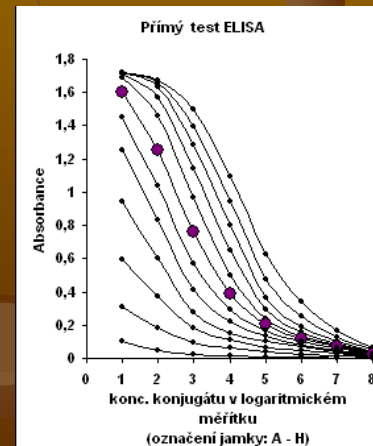


Vyhodnocení:

- Křivky reprezentují titraci rozdílného ředění konjugátu proti každému ředění Ag. Můžeme zjistit:
- Maximální množství Ag, které se může navázat na stěnu jamek a ještě vydává signál (vazebná kapacita plastu – kolísá od proteinu k proteinu).
- Konečný bod titrace konjugátu v určitém ředění ukazuje stejná hodnota při nejnižší koncentraci Ag.
- Ve sloupci bez Ag barva znamená nespecifické adsorpce konjugátu (při nižších ředěních vznikají problémy nespecifických vazeb, hodnoty skoro jako blank) nebo pozadí destiček.
- Při nízkých koncentracích Ag dochází ke ztrátě citlivosti (schopnost reagovat s Ab).
- Logaritmické křivka se nevyhodnocuje, jen se vybírá ideální křivka z těch výsledných

Vyžaduje se:

- musí se nalézt podmínky testu tak, aby negativní kontroly měly absorbanci 0,05 – 0,150 a maximální pozitivní hodnoty nad 1,0.
- vždy použít blank
- vysoké hodnoty (absorbance kolem 1,5)
- hodnoty bez nespecifických vazeb konjugátu, ideální je v rozmezí 1 – 1,5 OD
- odečte se optimální ředění konjugátu
- optimální ředění Ag dává A v rozmezí 1 – 1,5 OD
- Takto můžeme zjistit optimální ředění Ag a Ab pro nepřímý test ELISA. Konjugát však musí být zaměřen proti Ag nebo antigenem musí být sérum



BOX titrace - přímý test ELISA pro další složky (Ab, AbsE)

Sérum ($\mu\text{g/ml}$) ↓	Abs. →	1		2		3		4		5		6	
		P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
100	A	1,709	0,311	1,672	0,311	1,578	0,100	1,387	0,200	1,173	0,154	0,941	0,080
50	B	1,568	0,179	1,427	0,179	1,181	0,050	0,946	0,100	0,747	0,050	0,573	0,050
25	C	1,144	0,097	0,964	0,097	0,764	0,025	0,568	0,025	0,410	0,025	0,275	0,025
12,50	D	0,649	0,062	0,503	0,062	0,385	0,013	0,297	0,013	0,225	0,013	0,154	0,013
6,250	E	0,293	0,041	0,240	0,041	0,205	0,007	0,169	0,007	0,132	0,007	0,101	0,007
3,125	F	0,156	0,025	0,136	0,025	0,116	0,004	0,100	0,004	0,083	0,004	0,068	0,004
1,562	G	0,090	0,014	0,080	0,014	0,071	0,002	0,063	0,002	0,051	0,002	0,042	0,002
0	H	0,036	0,006	0,032	0,006	0,027	0,001	0,023	0,001	0,020	0,001	0,017	0,001
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Na destičku navážeme Ag dle ideální koncentrace zjištěné v předchozím pokusu

Ab vystupuje jako sérum, proti séru AbSE (konjugát),

Sérum: buď

P = pozitivní sérum (=primární protilátka), nebo

N = negativní sérum (=bez primární protilátky)

Každá jamka musí obsahovat 100 μl , tj 50 μl protilátky a 50 μl konjugátu.

Aplikovat 50 μl ředícího roztoku a pak

do řady A se aplikuje sérum (P,N) v koncentraci 200 $\mu\text{g/ml}$

do řady B se aplikuje sérum (P,N) v koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$, atd, do

poslední řady H se nedává sérum

Sérum-kontrola musí obsahovat poměrně málo Ab (Ag), aby jejich

hodnota byla uprostřed kalibrační křivky. V praxi to bývá okolo 10 – 20

$\mu\text{g/ml}$

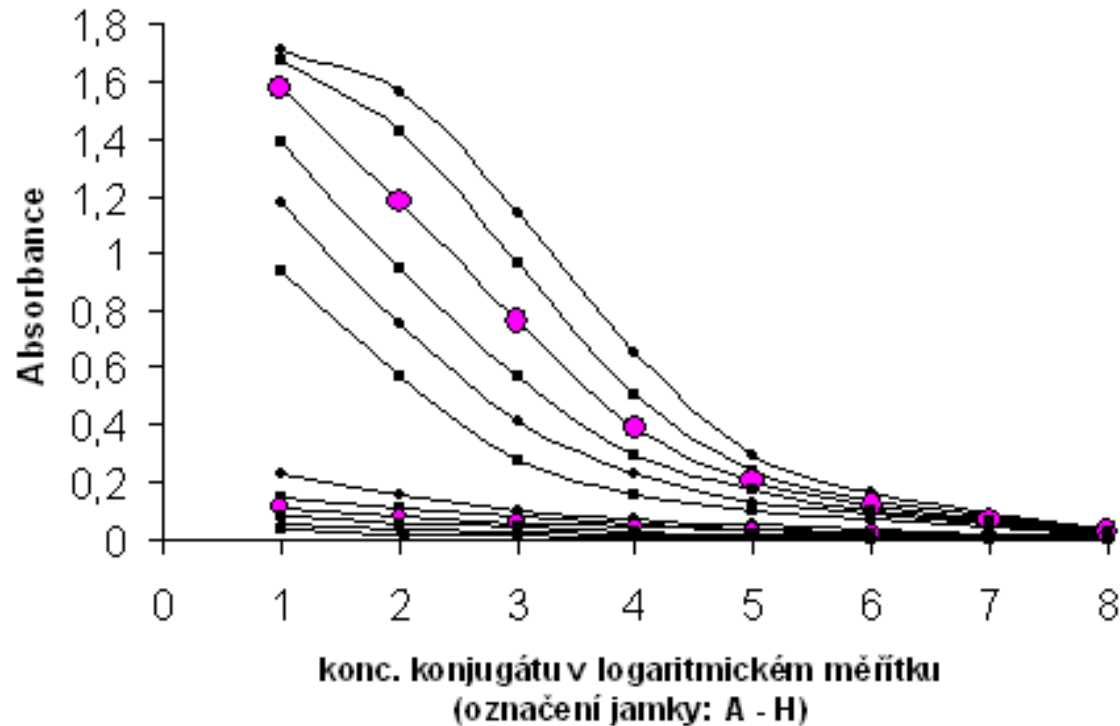
Sérum ($\mu\text{g/ml}$) ↓	Abs →	1		2		3		4		5		6	
		P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
100	A	1,709	0,311	1,672	0,311	1,578	0,100	1,387	0,200	1,173	0,154	0,941	0,080
50	B	1,568	0,179	1,427	0,179	1,181	0,050	0,946	0,100	0,747	0,050	0,573	0,050
25	C	1,144	0,097	0,964	0,097	0,764	0,025	0,568	0,025	0,410	0,025	0,275	0,025
12,50	D	0,649	0,062	0,503	0,062	0,385	0,013	0,297	0,013	0,225	0,013	0,154	0,013
6,250	E	0,293	0,041	0,240	0,041	0,205	0,007	0,169	0,007	0,132	0,007	0,101	0,007
3,125	F	0,158	0,025	0,136	0,025	0,116	0,004	0,100	0,004	0,083	0,004	0,068	0,004
1,562	G	0,090	0,014	0,080	0,014	0,071	0,002	0,063	0,002	0,051	0,002	0,042	0,002
0	H	0,036	0,006	0,032	0,006	0,027	0,001	0,023	0,001	0,020	0,001	0,017	0,001
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

- **Konjugát (AbSE):**
- do sloupců 1 se aplikuje konjugát o určité koncentraci
- do sloupců 2 se aplikuje konjugát o poloviční koncentraci
- do sloupců 3 se aplikuje konjugát o čtvrtinové koncentraci (optimální koncentrace konjugátu se pohybuje v rozmezí 0,1 – 10 $\mu\text{g/ml}$) atd.

„BOX titrace“ přímý test ELISA

Sérum ($\mu\text{g/ml}$) ↓	Abs →	1		2		3		4		5		6	
		P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
100	A	1,709	0,311	1,672	0,311	1,578	0,100	1,387	0,200	1,173	0,154	0,941	0,080
50	B	1,568	0,179	1,427	0,179	1,181	0,050	0,946	0,100	0,747	0,050	0,573	0,050
25	C	1,144	0,097	0,964	0,097	0,764	0,025	0,568	0,025	0,410	0,025	0,275	0,025
12,50	D	0,649	0,062	0,503	0,062	0,385	0,013	0,297	0,013	0,225	0,013	0,154	0,013
6,250	E	0,293	0,041	0,240	0,041	0,205	0,007	0,169	0,007	0,132	0,007	0,101	0,007
3,125	F	0,158	0,025	0,136	0,025	0,116	0,004	0,100	0,004	0,083	0,004	0,068	0,004
1,562	G	0,090	0,014	0,080	0,014	0,071	0,002	0,063	0,002	0,051	0,002	0,042	0,002
0	H	0,036	0,006	0,032	0,006	0,027	0,001	0,023	0,001	0,020	0,001	0,017	0,001
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

BOX titrace



Co se vyžaduje:

musí se nalézt podmínky testu tak, aby negativní kontroly měly absorbanci 0,05 – 0,150 a maximální pozitivní hodnoty nad 1,0.

Dodržování podmínek: vždy použít blank

bez Ag, s Abs

bez Abs s Ag

Nepřímý test

Reakce: Ag + Ab + AbsE

Ab ↓	Abs →	1		2		3		4		5		6	
		1:100		1:500		1:1000		1:2000		1:5000		nic	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
10x	A												
50x	B												
100x	C												
150x	D												
200x	E												
250x	F												
300x	G												x1
350x	H											x2	x3
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Například:

Ab ↓	Abs →	1		2		3		4		5		6	
		1:100		1:500		1:1000		1:2000		1:5000		nic	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
10x	A	1,545	0,158	1,469	0,136	1,348	0,108	1,149	0,091	0,830	0,068	0,603	0,035
50x	B	1,412	0,119	1,271	0,096	1,093	0,081	0,832	0,068	0,603	0,050	0,437	0,025
100x	C	1,067	0,085	0,883	0,700	0,707	0,057	0,534	0,046	0,410	0,032	0,275	0,018
150x	D	0,608	0,062	0,470	0,050	0,385	0,039	0,297	0,030	0,225	0,021	0,154	0,012
200x	E	0,273	0,041	0,240	0,031	0,205	0,027	0,169	0,018	0,132	0,013	0,101	0,007
250x	F	0,158	0,025	0,136	0,019	0,116	0,013	0,100	0,010	0,085	0,006	0,068	0,003
300x	G	0,090	0,014	0,080	0,011	0,071	0,007	0,063	0,005	0,051	0,002	0,042	0,001
350x	H	0,036	0,006	0,032	0,005	0,027	0,003	0,023	0,002	0,020	0,001	0,017	0,001
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

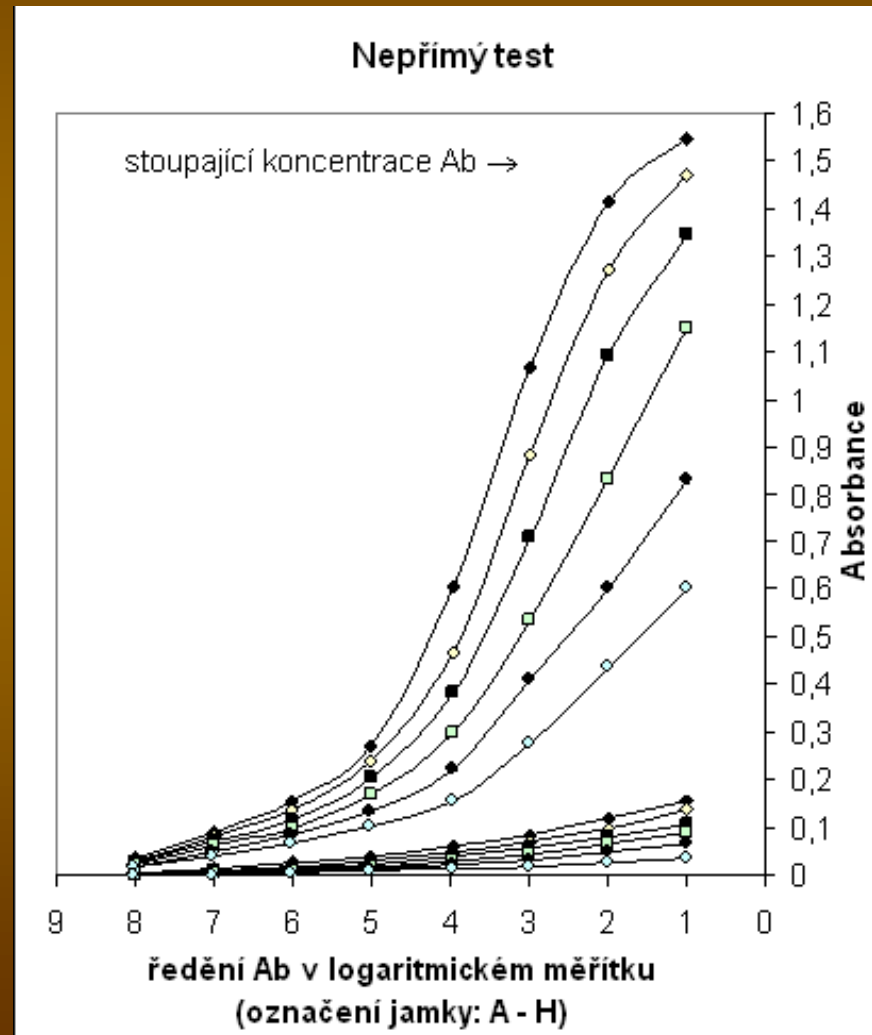
Naneseme na destičku Ag o známé konstantní koncentraci (1-2 $\mu\text{g/ml}$): + s Ag,
- bez Ag

Ředění Ab (séra): 10x, 50x, 100x, 150x, 200x, 250x, atd. do jamek A, B, C, D

Ředění AbsE: 1:100, 1:500, 1:1000, 1:1500, 1:2000, 1:5000, bez Abs

Blank x : 1.) bez Abs, 2.) bez Ab (séra), 3.) bez Ag

Výsledek: pokud křivka stoupá, Ab vykazuje dostatečnou specifitu a afinitu



Nepřímý test ELISA

Kompetitivní inhibice mezi antigeny. Reakce: Ag1 + Ag2 + Ab + AbsE

Nanést Ag1 na celou destičku (př. *B. afzelii*) v optimální koncentraci navázat, pak 2 kroky

50 µl kompetitoru Ag2 (= inhibitor, např. *B. garinii*) o různé koncentraci: 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml ... v řádcích A, B, C, ...

nanést 50 µl Ab (ve správném ředění dle předchozího pokusu) do všech jamek kromě sloupce 12, kde bude blank, 1 hod kultivace, promytí

100 µl Abs (sekundární protilátka proti Ab) v optimálním ředění (ve správném ředění dle předchozího pokusu) též všude kromě blanku

(pg = pikogram = 10⁻¹²g)

Ag2 ↓		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	blank	průměr
500 pg	A												0,108	1,348
250 pg	B												0,081	0,966
125 pg	C												0,057	0,640
62,5 pg	D												0,039	0,360
31,2 pg	E												0,027	0,195
15,6 pg	F												0,013	0,120
7,8 pg	G												0,007	0,080
3,9 pg	H												0,003	0,072

Hodnocení:

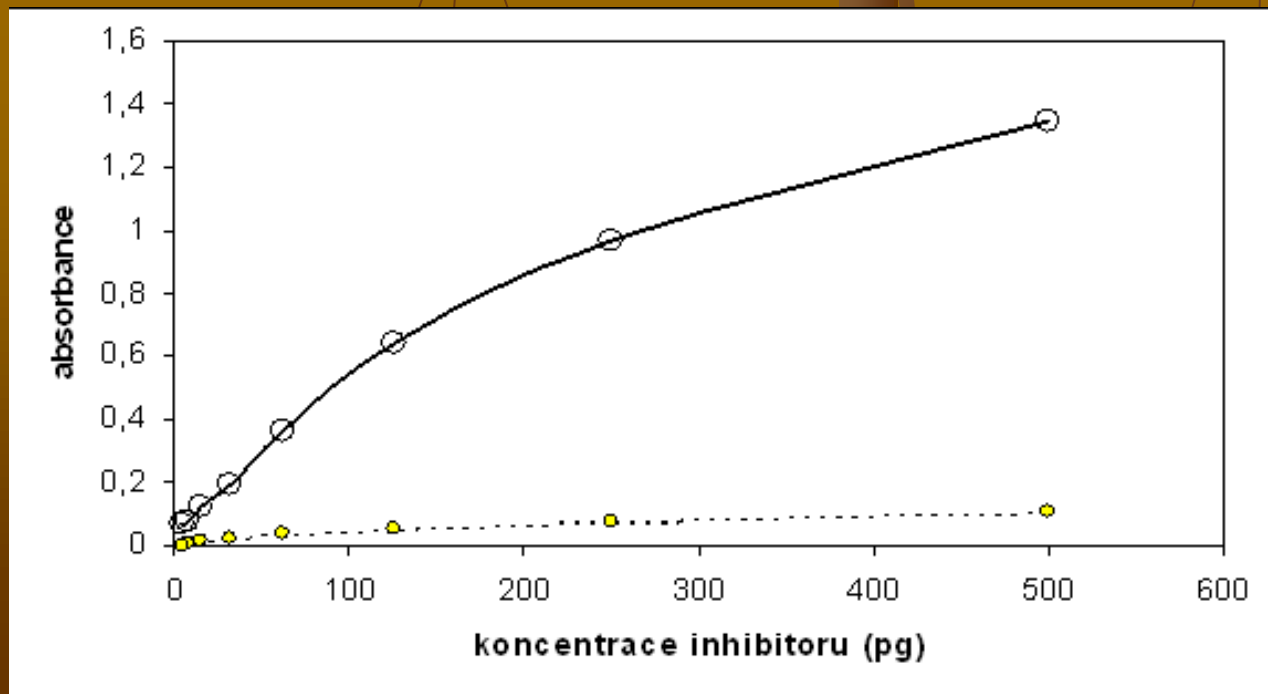
OD nebo B) %inhibice

Čím vyšší % inhibice (nižší OD), tím silnější druhý Ag a naopak, čím vyšší absorbance, tím silnější a specifitější Ag1 na destičce už navázaný.

100% se rovná určité absorbanci pozitivní kontroly, tj u pacient nakažený *B. afzelii* a pacient nakažený *B. garinii*, vykazující Ab proti těmto Ag.

Grafem je jediná standardní kalibrační křivka o 8 bodech, každý z nich je průměrem z 11 bodů, jedná se o výslednou křivku (opět logritmická škála). Do grafu vyneseme i křivku hodnot blanku.

Příklad (naměřené hodnoty absorbance zobrazeny pouze u blanku, z ostatních zobrazen pouze vypočtený průměr):



Stanovení ideální koncentrace Ag nepřímou metodou ELISA

- Pozn.: v případě stanovení Ab proti borreliím a použití borrh. Ag na destičky můžeme testovat jeho optimální koncentraci pomocí nepřímé metody ELISA. Po zjištění optimální koncentrace Ab a AbsE „box titrací“ naneseme na destičku s různou koncentrací Ag tyto optimální hodnoty

Reakce

- Ag + Ab + AbsE

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	C _{Ag}
1													10
2													µg/ml
3													5
4													µg/ml
5													2,5
6													µg/ml
7													1,25
8													µg/ml
nebo	10 µg		5 µg		2,5 µg		1,25 µg		0,6 µg		0,3 µg		