**Protokol ELISA**

Metodika se sestává ze čtyř částí: 1. Stanovení koncentrace antigenu

 2. Navazování antigenu na destičku

 3. Optimalizace metody ELISA – jsmše nedělali

 4. Vyšetření vzorků ELISA

#### 1.Stanovení koncentrace antigenu

 Stanovení koncentrace antigenu pomocí kalibrační křivky za použití různého ředění albuminu. Ke stanovení koncentrace antigenu je nutné:

1. Přichystat 5 různých koncentrací albuminu: 2 mg/ml; 1,5 mg/ml; 1 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,1 mg/ml.
2. Na mikrotitrační destičce smíchat v triplikátech 5 l vzorku s 25 μl roztoku činidel A a 200 l činidla B. Po cca 20 min. se změří absorbance při 700 nm.
3. Vytvořit z hodnot albuminu kalibrační křivku a dopočítat koncentraci proteinů.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **průměrné koncentrace (mg/ml)** | **SS** | **A** | **G** |
|  |  |  | 1,139989 | 0,484945 | 0,727945 |

Koncentrace antigenů kmenů *B. b. sensu stricto* je 1,139989 mg/ml, *B. afzelii* je 0,484945 mg/ml *a B. garinii* je 0,727945mg/ml.

#### 2. Postup navazování antigenu na destičku

 Po zjištění koncentrace antigenu se postupuje dalším krokem - navazováním antigenu na destičku. S destičkou je po celou dobu nutno pracovat velmi opatrně a je nedotýkat se spodní strany jamek.

1. Do každé jamky mikrotitrační destičky se napipetuje 200 μl etanolu (70%). Poté je destička přikryta víčkem a nechá se stát v klidu na vodorovné ploše při laboratorní teplotě cca 2 hodiny.
2. Po uplynutí stanovené doby se etanol odsaje a jamky se 3x promyjí destilovanou vodou (200 l na každou jamku). Zbytky kapaliny z jamek je třeba odstranit mírnými údery do čistého filtračního papíru.
3. Nyní je potřeba zředit antigen na koncentraci 2-3 g/ml ve vazebným roztoku. Do každé jamky se napipetuje po 100 μl takto zředěného antigenu.
4. Takto připravená destička je v této fázi zakryta víčkem a ponechána přes noc v lednici (při 4 °C). Nezbytné je opět zachovat její vodorovnou polohu.
5. Druhý den je třeba odpipetovat obsah jamek a opět 3x promýt promývacím roztokem (200 μl na jamku), oklepat a nechat oschnout.
6. Nyní zbývá vysytit zbylou plochu na plastu, kde není navázán antigen. Do každé jamky se napipetuje po 100 μl vazebného roztoku s rozpuštěným 3% kaseinem. (Pufr musí mít teplotu laboratoře, aby se kasein v roztoku dokonale rozpustil.) Nyní se destička nechá stát při laboratorní teplotě cca 2 hodiny.
7. Odsát obsah jamek a 3x promýt 200 μl promývacího roztoku, poté je potřeba destičku opět oklepat a nechat oschnout.
8. Nyní jsou destičky připraveny k provedení ELISA testu. V této fázi také mohou být destičky uloženy v lednici po dobu 2 měsíců (důležité je zabránit přístupu vlhkosti).

#### 3. Pracovní postup ELISA

1. Nejprve je nutné naředit vyšetřovaná séra na optimální koncentraci blokovacím roztokem. Zředěná séra (100x) se pipetují v množství 100 μl na jamku. Je třeba mít na destičce v duplikátech: blank (blokovací roztok), pozitivní sérum a vyšetřované vzorky zvláš´t pro IgM a zvlášť pro IgG. To vše je třeba předem rozvrhnut na papírový vzor destičky, .
2. Destička s naředěnými séry a dobře těsnícím víčkem se nyní vloží do termostatu a inkubuje se při 37 °C 1 hodinu.
3. Po uplynutí stanovené doby se destička vyjme z termostatu, roztoky v jamkách se odsají a jednotlivé jamky se promyjí nejméně 3x promývacím roztokem (200 μl na jamku). Mírným poklepem se odstraní zbytky kapaliny z destičky do čistého filtračního papíru.
4. Do všech jamek se nanese po 100 μl konjugátu připraveného zvlášť pro IgM, zvlášť pro IgG naředěného blokovacím roztokem a celá destička se nechá inkubovat při 37 °C 1 hodinu.
5. Po inkubaci v termostatu se obsahy jamek odsají, opět nejméně 3x promyjí promývacím roztokem (200 μl na každou jamku) a celá destička se oklepe.
6. Nyní je potřeba připravit si substrátový roztok s chromogenem a substrátem v množství 100 μl na každou jamku, a to tak, že smícháme 15 ml substrátového roztoku se 7,5 mg OPD a 7,5 μl H2O2.
7. Destičku i s víčkem přemístíme do temna a necháme ve vodorovné pozici inkubovat při laboratorní teplotě cca 20 min.. Během této doby se vyvíjí barva v jamkách a větší množství především ultrafialového záření tuto barevnou reakci zintenzivňuje.
8. Po uplynutí stanovené doby je reakce zastavena přidáním 1–2M H2SO4 (50 μl na jamku). Nejlépe ihned provádíme měření při 492 nm na ELISA-readeru.

###  Výsledky ELISA – měření vzorků:

 Na každou měřenou destičku byly napipetovány v duplikátech: blank, negativní kontrola (NK), pozitivní kontrola (PK) a konkrétní vzorky jednotlivých sér. Pro účely grafického znázornění výstupů z ELISA, byl od absolutní hodnoty změřené absorbance každého vzorku odečten blank (A-B).

Je třeba vytvořit tabulku výsledků a grafy:

Grafické znázornění přepočítaných hodnot absorbance pro IgM a IgG séra:

Závěr: Je třeba posoudit výsledky z hlediska pozitivity PK a dalších vzorků z destičky.