

Protokol ELISA

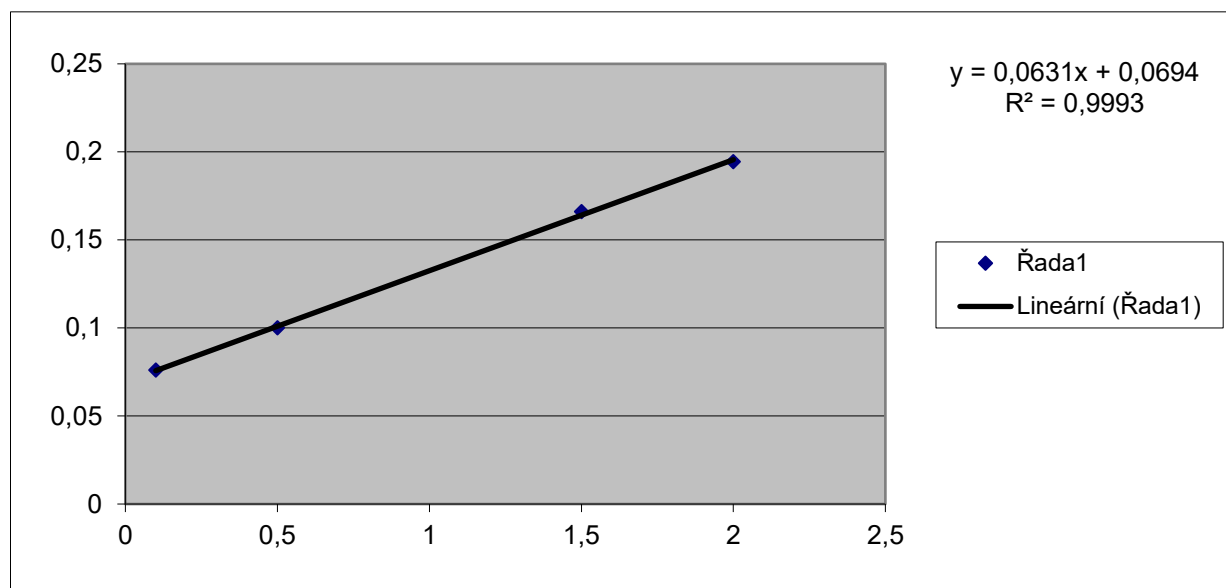
Metodika se sestává ze čtyř částí: 1. Stanovení koncentrace antigenu
2. Navazování antigenu na destičku
3. Optimalizace metody ELISA – jsmše nedělali
4. Vyšetření vzorků ELISA

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 triplicátech 5 μ l vzorku s 25 μ l roztoku činidel A a 200 μ 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 μ l 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 μ 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 μ g/ml ve vazebném roztoku. Do každé jamky se napipetuje po 100 μ l 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 μ l 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 μ l 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 μ l 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

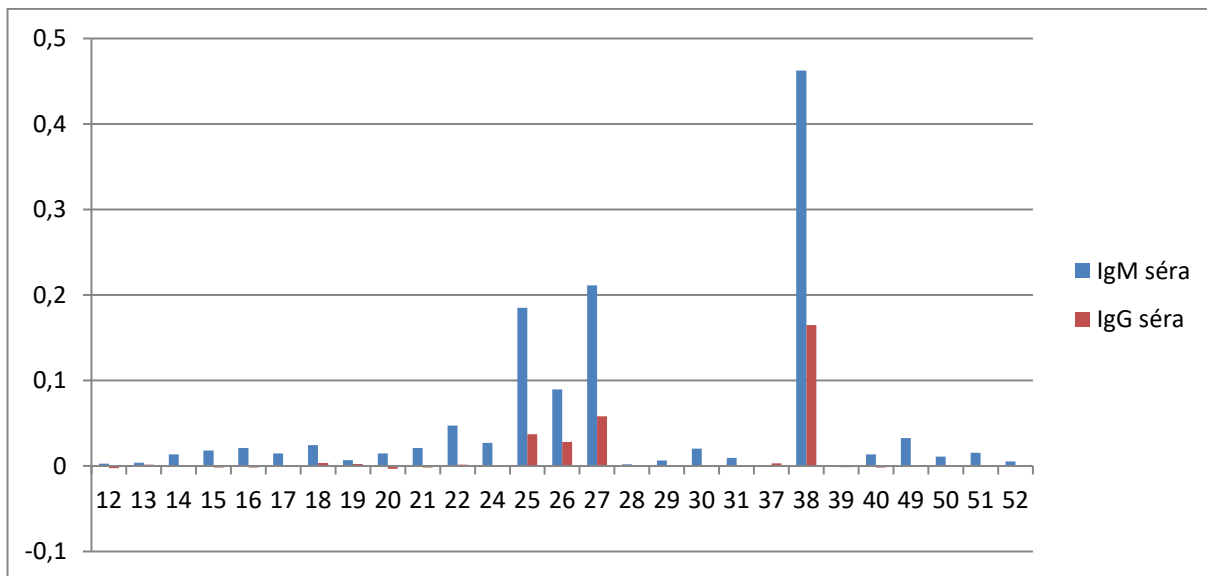
1. Nejprve je nutné naředit vyšetřovaná séra na optimální koncentraci blokovacím roztokem. Zředěná séra (100x) se pipetují v množství 100 μ l na jamku. Je třeba mít na destičce v duplikátech: blank (blokovací roztok), pozitivní sérum a vyšetřované vzorky zvlášť pro IgM a zvlášť pro IgG. To vše je třeba předem rozvrhnout 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 μ l na jamku). Mírným poklepem se odstraní zbytky kapaliny z destičky do čistého filtračního papíru.
4. Do všech jamek se nanese po 100 μ l 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 μ l na každou jamku) a celá destička se oklepe.

6. Nyní je potřeba připravit si substrátový roztok s chromogenem a substrátem v množství 100 μ l na každou jamku, a to tak, že smícháme 15 ml substrátového roztoku se 7,5 mg OPD a 7,5 μ l H_2O_2 .
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 H_2SO_4 (50 μ l 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 pozitivita PK a dalších vzorků z destičky.