

# ELISPOT

TEREZIE PLUCAROVÁ

## princip

V jamce destičky monoklonální ab proti detekované látce (kautuje výrobce či laboratoř)

Do jamek buněčná suspenze (stimulované/nestimulované buňky)

Inkubace (zachycení produktů na ab)

Odmytí buněk a přebytečných produktů

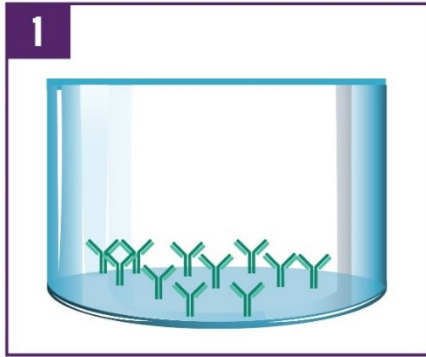
Vizualizace: ab značená enzymem-substrát

- Odmývání přebytků jednotlivých složek
- Zastavení reakce: proplach kohoutkovou vodou

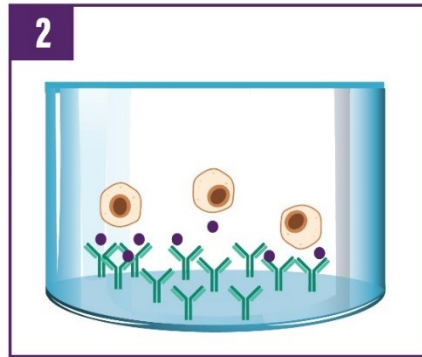
ELISpot reader (scanování desky, počítání spotů)

Na dně destičky je membrána

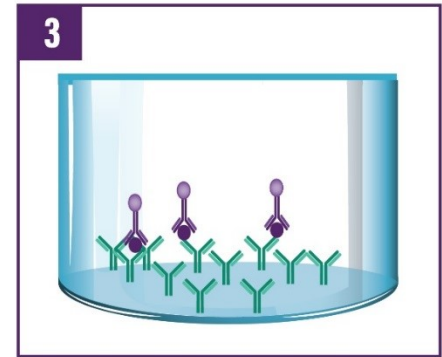
Stimulace: př. LPS, CMV, ethanol; preinkubace se stimulanciem/smíchat až v jamce ELISPOT desky



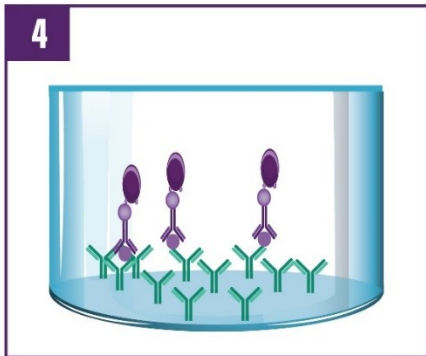
1  
Treat with ethanol, coat with capture antibody



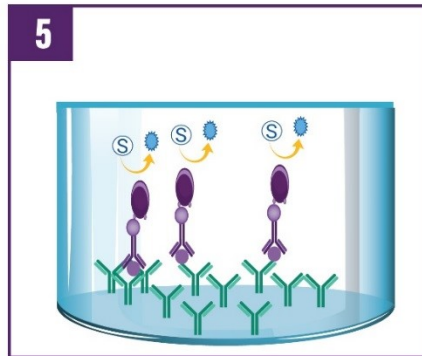
2  
Incubate cells in the presence of stimuli, cytokines are released, which bind to capture antibodies









3  
Wash plate. Incubation with biotinylated detection antibody.



4  
Wash plate. Incubate with streptavidin-alkaline phosphatase conjugated



5  
Incubate with BCIP/NBT. Precipitated product forms, results in blue/purple spots.

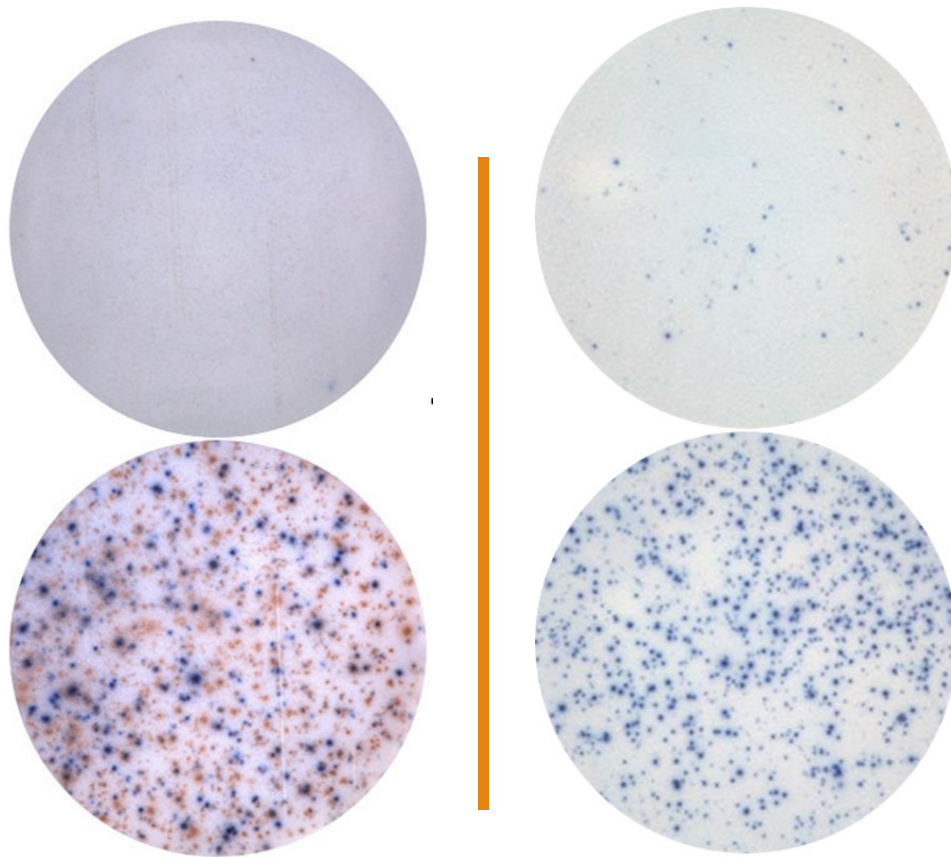
-  Capture antibody
-  Cytokines
-  Cell
-  Biotinylated detection antibody
-  Streptavidin-alkaline phosphatase
-  Substrate product

## detekce

Enzymatická: křenová peroxidáza,  
biotinylovaná ab-streptavidin-ALP

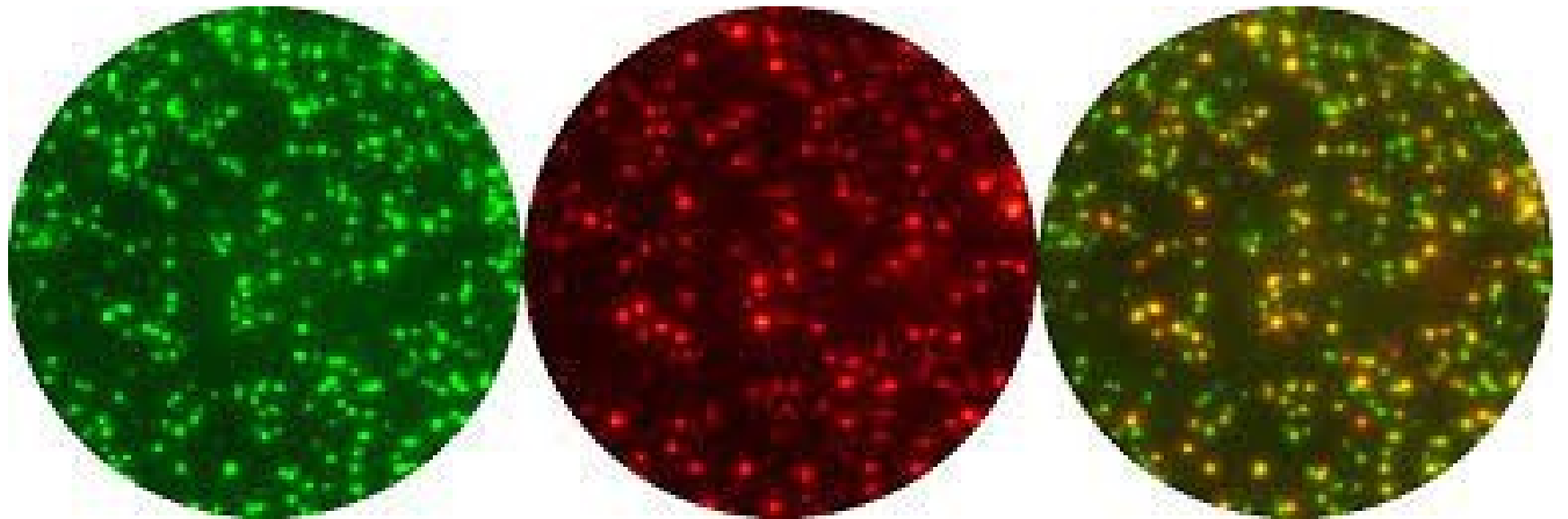
Fluorospot: fluorescenční detekce  
spotů

Double-color: detekce dvou různých  
produktů v jedné jamce, každý  
produkt značen jinou barvou



double-color vs single-color

---



fluorospot

---

## Sledování produkce protilátek (B-lymf) či cytokinů (T a B lymf)

### Příklad: detekce IL-10 a IFN $\gamma$ T-lymf

- Monitoring zánětlivé odpovědi (IFN $\gamma$  prozánětlivý, IL-10 protizánětlivý)
- Přesmyk T-lymf z produkce IFN $\gamma$  na IL-10
- U pacientů s astmatem porušena regulace této dráhy – nadprodukce IFN $\gamma$  – klinické příznaky
- Vitamin D podporuje přesmyk T-lymf na produkci IL-10 – u některých pacientů zlepšení klinického obrazu

---

Děkuji za pozornost

