

## Stanovení nízkých hladin IgM v lidském séru metodou ELISA (imunoesej – EIA – nekompetitivní ELISA)

### Teorie:

Hladiny celkových imunoglobulinů G, A, M se v laboratoři běžně měří nefelometricky. U imunodeficientních pacientů se často stává, že hladiny těchto protilátek leží pod mezí detekce nefelometru. Ten nám nahlásí hodnotu IgM < 0,05 g/l nebo třeba IgA < 0,01 g/l. V tomto případě nás zajímá, jestli má pacient 0,049 g/l celkového IgM a nebo zda jeho hladina je téměř nulová.

Metoda ELISA slouží k průkazu protilátek i antigenů nízkých koncentrací. Na pevnou fázi (povrch jamek mikrotitrační destičky) se naváže příslušný antigen, přidá se vyšetřované sérum, ve kterém chceme prokázat protilátky. Pokud jsou tyto protilátky přítomny, naváží se na antigen a při následném promytí nedojde k odplavení. V další fázi přidáme konjugát, tj. protilátku proti lidským globulinům značenou enzymem křenovou peroxidázou. Tento konjugát se naváže na komplex antigen – protilátka, vzniklý v první fázi reakce. K vizualizaci enzymové aktivity peroxidázy použijeme tzv. substrát. Za přítomnosti sledovaných protilátek dojde ke zbarvení obsahu jamek. Množství produktu enzymové reakce vyhodnotíme fotometricky při vlnové délce 450 nm na ELISA – readeru.

### Provedení:

#### 1. Potažení jamek mikrotitrační destičky:

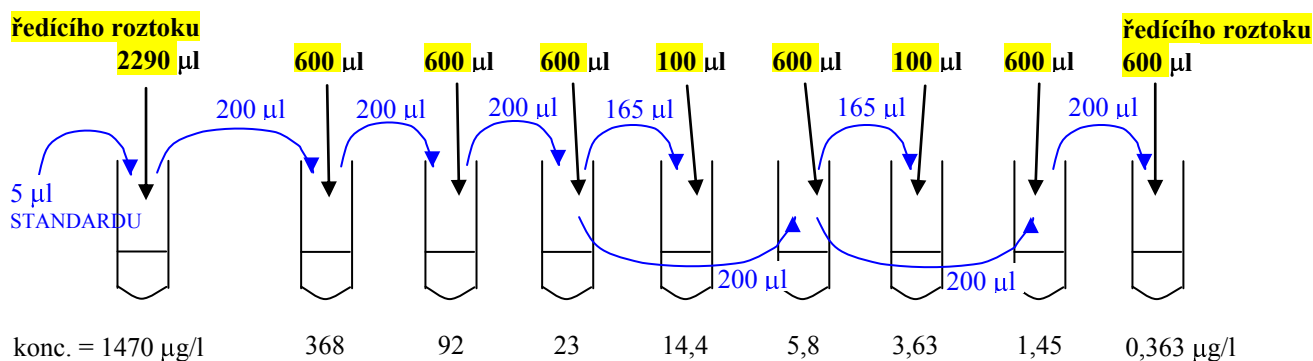
- 18  $\mu\text{l}$  králičí protilátky namířené proti lidské IgM protilátce + 12 ml potahovacího roztoku o pH 9,6
- pipetovat 100  $\mu\text{l}$  tohoto připraveného roztoku do každé jamky mikrotitrační destičky NUNC
- nechat inkubovat 2 – 3 noci při 4 °C ve tmě

#### 2. Promytí: 3x promýt roztokem Tris-NaCl-Tween

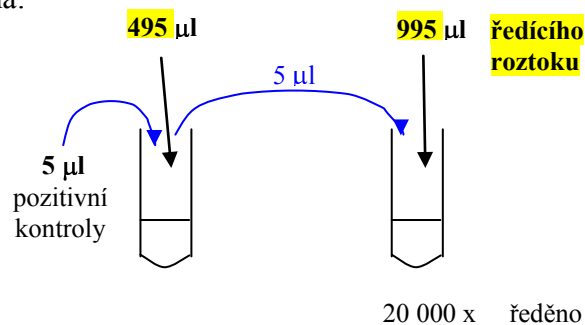
#### 3. Blokování: 100 $\mu\text{l}$ blokovacího roztoku Tris-NaCl-BSA do každé jamky, inkubace 1,5 h při 37 °C

#### 4. Promytí: 3x promýt roztokem Tris-NaCl-Tween

#### 5. Kalibrace: - viz schéma:

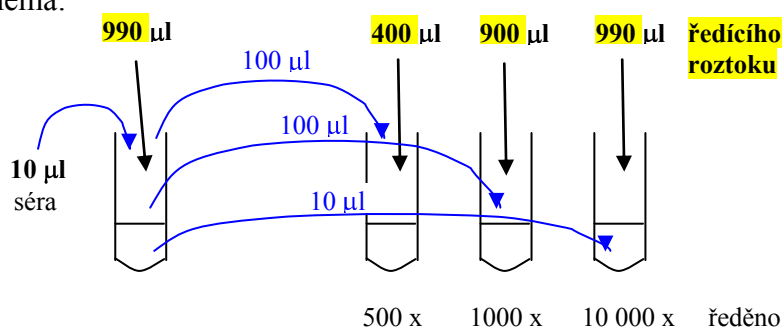


6. Pozitivní kontrola: - viz schéma:



7. Negativní kontrola: ředící roztok Tris-NaCl-BSA

8. Ředění séra: - viz schéma:



9. Pipetovat: v dubletech: **100 µl** na jamku dle pipetovacího protokolu a inkubovat 2 h při 37 °C

10. Promytí: 3x promýt roztokem Tris-NaCl-Tween

11. Konjugát:

- **20 µl** králičí protilátky (namířené proti lidské IgM protilátce) s křenovou peroxidázou + **12 ml** ředícího roztoku Tris-NaCl-BSA
- pipetovat **100 µl** na jamku
- inkubovat 60 min. při pokojové teplotě ve tmě

12. Promytí: 3x promýt roztokem Tris-NaCl-Tween

13. Substrát:

- **4 ml** substrátu TMB + **8 ml** PBS o pH 7,6
- pipetovat **100 µl** na jamku
- inkubovat 7 min. při pokojové teplotě ve tmě

14. Stop činidlo: **100 µl** do každé jamky 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

15. Reader: **450 nm** (program č. 57 IgME)

16. Výsledky: v **mg/l**

Ref. rozmezí nad 13 roků: 0,46 g/l – 3,04 g/l IgM