

## STANOVENÍ KONCENTRACE PROTILÁTEK ACLA METODOU ELISA

### Princip:

Vzorky séra jsou inkubovány v mikrotitračních destičkách v jamkách pokrytých specifickým antigenem. Jsou-li ve vzorku séra pacienta přítomny odpovídající specifické protilátky, naváží se na antigen. Nenavázaná frakce protilátek je odmyta. Poté je přidán konjugát, tj. protilátky proti lidskému imunoglobulinu konjugované s enzymem. Během následné inkubace dojde k navázání konjugátu na komplex antigen-protilátka, vzniklý v předchozím kroku. Nenavázaný konjugát je odmyt. Poté přidavek substrátu vede k enzymatické reakci s navázaným enzymem. Výsledkem je barevná reakce, která se zastaví přidáním kyseliny. Intenzita zbarvení je úměrná koncentraci vyšetřované látky.

### Pomůcky a materiál:

#### Postup:

1. Vytemperujte soupravu Aeskulisa ACLA G,M 30 min. při laboratorní teplotě.
2. Připravte si ředící roztok- 20 ml koncentrovaného ředícího roztoku doplňte destil. vodou na celkový objem 100 ml.
3. Nařed'te příslušná séra pac. 1 : 100: (před ředěním promíchat)  
do Eppendorfy napipetujte 500 ul naředěného ředícího roztoku + 5 ul séra.  
( kalibrátory a kontroly ze setu jsou již připraveny k použití )
4. Vyndejte stripy s jamkami z obalu a umístěte do prvních pozic nosiče. Připravte si:  
1 A-F : kalibrátory  
1 G: negativní kontrola  
1 H: pozitivní kontrola  
na pozice dalšího stripu naředěná vyšetřovaná séra pacientů dle počtu dalších jamek.
5. Aplikujte kalibrátory, kontroly a naředěná vyš. séra pac.do jamek á 100 ul. Před aplikací promíchat! Desku přikryjte víčkem a inkubujte 30 min. při lab. teplotě.
6. Připravte si promývací roztok: 20 ml koncentrovaného promývacího roztoku doplňte destil. vodou na celkový objem 1000 ml.
7. Desku promyjte 3x
8. Aplikujte 100 ul konjugátu anti IgG (modrý) ev. anti IgM (zelený) – dle požadavku – do každé jamky, konjugát v setu je připraven k použití.  
Desku přikryjte víčkem a inkubujte 15 min. při 37 st.C v termostatu.
9. opakujte promytí
10. Aplikujte 100 ul substrátového roztoku TMB do každé jamky,  
roztok v setu je připraven k použití.  
Desku přikryjte víčkem a inkubujte 15 min. při 37 st.C v termostatu.
11. Aplikujte 100 ul stop činidla do každé jamky, roztok v setu je připraven k použití,  
nechte 5 min. působit.
12. Na fotometru odeč'tete OD v jednotlivých jamkách destičky při 450 nm  
Pomocí kalibrační křivky jsou vypoč'tány koncentrace protilátek v PL/ml.
13. Výsledkový list podepište a označ'te pozice kontrol, kalibrátorů a měřených vzorků.  
Na prvním listu - nahoře- tabulka hodnot naměřených OD všech jamek,  
dole- hodnoty OD kalibrátorů proti jejich koncentracím do kalibrační křivky.  
Na druhém listu jsou k jednotlivým pozicím přiřazeny v prvním sloupci hodnoty OD,  
ve druhém hodnoty koncentrací.  
Referenční meze pozitivní kontroly: 30 – 70 PL/ml  
Odeč'tete hodnoty koncentrací stanovených autoprotilátek jednotlivých pacientů **v celých číslech.**

Závěr: (Popište co jste provedli za stanovení a jakou metodou, z jakého materiálu,  
Uveďte i odeč'tený výsledek koncentrace dle výsledkového listu strany 2.)