

ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay

David Zeman

ELISA – historie

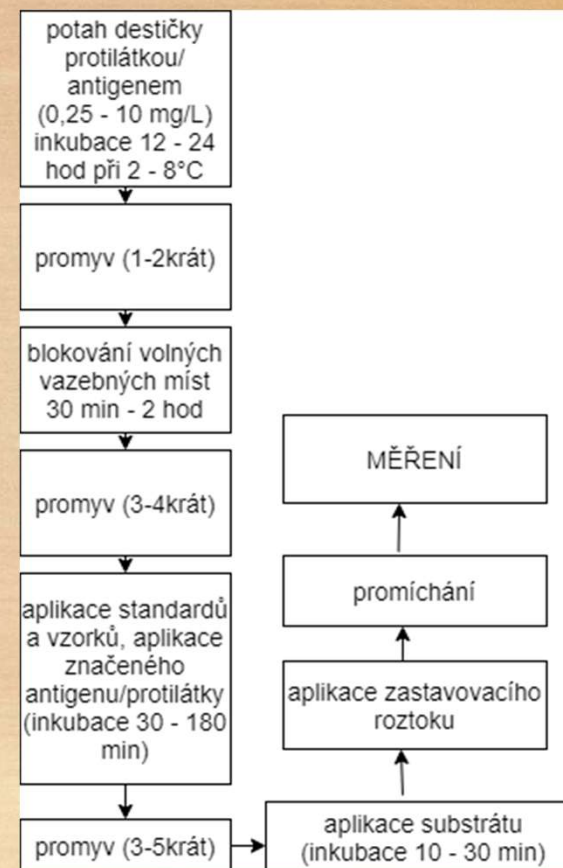
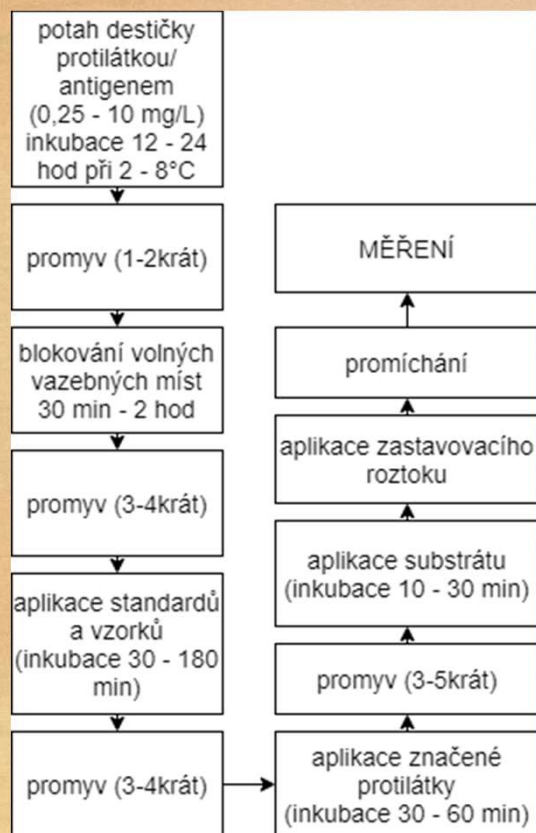
první neizotopová varianta imunoanalýzy

- E. Engvallová, P. Perlmann (Švédsko) 1971: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8: 871-874. *Pozn.: stejně jako R. Yalowová a S. A. Berson v případě RIA (1959) si princip nedali patentovat (významné historické memento, zejména pro dnešní dobu!)*
- S. Avraemas, B. Guilbert (Francie) 1971: A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. *Eur J Immunol* 1: 394-396.

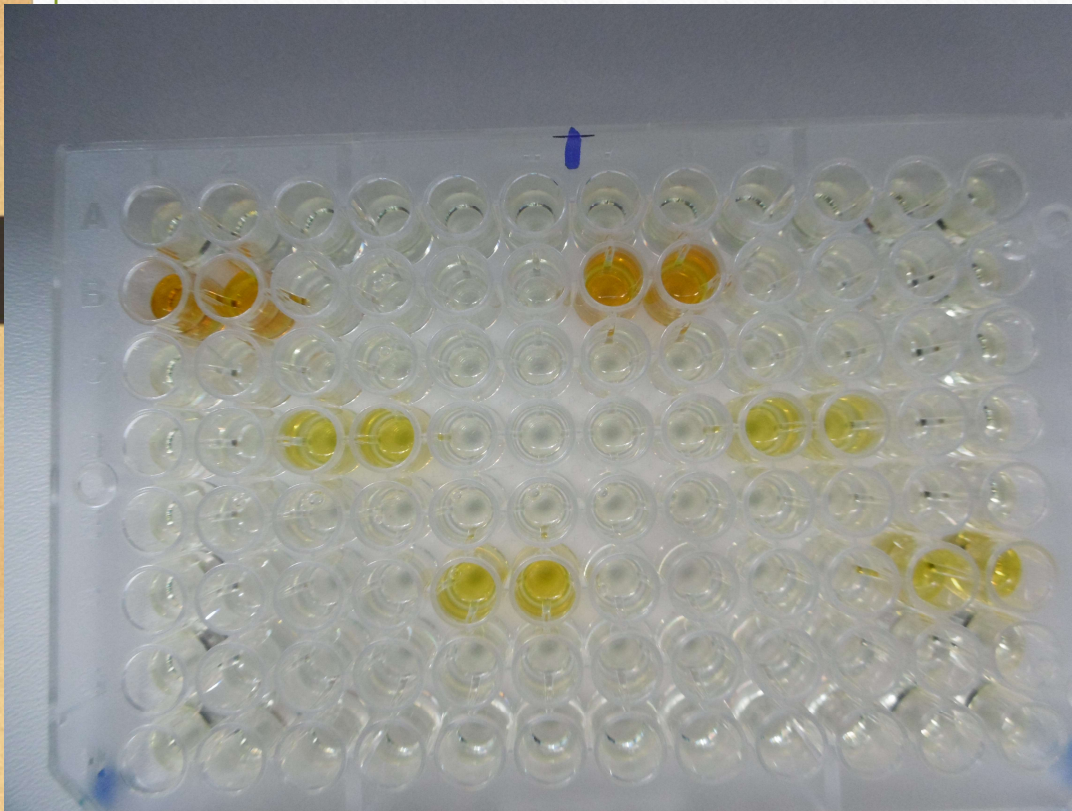
ELISA – charakteristika, varianty

- Heterogenní imunoanalytická metoda
- Jeden z imunoreaktantů je zakotvený na pevnou fázi (**i**mmun**s**orbent), zpravidla stěny jamek mikrotitrační destičky (96 jamek – řádky A-H, sloupce 1-12)
- Jeden z imunoreaktantů je značený enzymem (**E**nzyme-linked)
- V posledním reakčním kroku je přidán substrát pro příslušný enzym
- Koncentrace analytu je úměrná množství vzniklého produktu, který poskytuje signál
- Sendvičová (nejčastěji, nejnižší detekční limit; typicky přímá úměra mezi koncentrací analytu a signálem)
- Kompetitivní (přímá/nepřímá; typicky nepřímá úměra mezi koncentrací analytu a signálem)

Schéma pracovního postupu sendvičové (vlevo) a kompetitivní (vpravo) ELISA



ELISA – mikrotitrační destička po ukončení reakce přidáním stop roztoku



- Příklad: experimentální detekce protilátek proti natalizumabu – „bridging assay“ (2 různé koncentrace)
- Potah destičky: natalizumab (humanizovaná IgG4 protilátka proti $\alpha 4$ -podjednotce integrinů $\alpha 4\beta 1$ a $\alpha 4\beta 7$) v karbonát-bikarbonátovém pufru, pH 9,6
- Aplikace vzorků patientských sér jednak nativních, jednak předinkubovaných s natalizumabem
- Aplikace biotinylovaného natalizumabu
- Aplikace streptavidinu s navázanou HRP
- Substrát: TMB, stop: 1M H₂SO₄
- Vzorky obsahující protilátky proti natalizumabu vykazují pozitivitu (B1, B2 a B7, B8; D3, D4 a D9, D10; F5, F6 a F11, F12); předinkubované vzorky jsou negativní

Amplifikace signálu: systém biotin-(strept)avidin

- Protilátka značená biotinem (M.h. 244 Da) lze snadno konjugovat s proteiny v místě jejich volných aminoskupin); na jednu molekulu protilátky se může vázat několik molekul biotinu → amplifikace signálu
- Konjugát avidin (M.h. 68 kDa)-HRP nebo streptavidin-HRP
- Interakce (nekovalentní) avidinu s biotinem je velmi silná ($K_d = 10^{-15}$ mol/L)
- 1 molekula avidinu (streptavidinu) obsahuje 4 vazebná místa pro molekulu biotinu
- Vaječný avidin je glykoprotein o pI 10,5 – cave nespecifické elektrostatické interakce
- Streptavidin (ze *Streptomyces avidinii*) – pI v neutrální oblasti, neobsahuje sacharid
- Neutrální avidin – částečné odstranění sacharidů a snížení pI – redukce nespecifických vazeb
- Bližší informace viz katalogy produktů, např. firma Vector Laboratories, www.vectorlabs.com

Roztoky pro ELISA testy

Použití roztoku	Název roztoku	složení
Potah destičky	PBS pH 7,4	NaCl 8,0 g; KH ₂ PO ₄ 0,2 g; Na ₂ HPO ₄ 1,1 g; KCl 0,2 g; H ₂ O ad 1 L
	Na-karbonátový pufr, pH 9,6	Na ₂ CO ₃ 1,6 g; NaHCO ₃ 2,4 g; H ₂ O ad 1 L
	0,1M bikarbonátový pufr, pH 9,6	NaHCO ₃ 8,4 g; H ₂ O ad 1 L
Promývání	PBS/Tween 20 0,05%, pH 7,4	Tween 20 0,5 mL; PBS ad 1 L
	Fyziologický roztok/Tween 20 0,1%, pH 7,5	NaCl 9,0 g; Tween 20 1,0 mL; H ₂ O ad 1 L
Blokování volných vazebných míst	PBS/BSA 2%, pH 7,4	BSA 2g; PBS ad 100 mL
	PBS/kasein 0,1%, pH 7,4	Kasein 0,1 g; PBS ad 100 mL
	PBS/sušené mléko 2%, pH 7,4	Sušené mléko 2 g; PBS ad 100 mL

Enzymy a substráty

Enzym	M.h. (kDa)	pH optimum	substrát	Detekční limit pro enzym (mol/L)	Detekční limit pro enzymem značený IgG (μg/L)
Křenová peroxidasa (HRP) EC 1.11.1.7	44	5 - 7	H ₂ O ₂ /ABTS (c)	10 ⁻¹³	16,0
			H ₂ O ₂ /oPD (c)	10 ⁻¹⁴	2,0
			H ₂ O ₂ /TMB (c)	2·10 ⁻¹⁵	0,3
			H ₂ O ₂ /HPPA (f)	10 ⁻¹⁵	0,3
Alkalická fosfatasa (ALP) EC 3.1.3.1	86 (druhá odlišnost – 58 /garnát/ až 140 /skot/)	9 - 10	pNPP (c)	2·10 ⁻¹³	43,0
			MUP (f)	2·10 ⁻¹³	0,5
β-galaktosidasa EC 3.2.1.23	465,4 (homotetramer)	6 – 8	oNPG (c)		350,0
			MUG (f)		1,0
Glukosaoxidasa EC 1.1.3.4	160	4 - 7	S peroxidasou spřažená reakce; přídavek glukosy, peroxidasy a substrát pro peroxidasu		

(c) = chromogenní, (f) = fluorogenní substrát. ABTS = 2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonát; HPPA = kyselina 3-(*p*-hydroxyfenyl)propionová; MUG = 4-methylumbelliferyl-β-D-galaktopyranosid; MUP = 4-methylumbelliferylfosfát, oNPG = *o*-nitrofenyl-β-D-galaktopyranosid; oPD = *o*-fenylendiamin, pNPP = *p*-nitrofenylfosfát; TMB = 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin

Substrát – zastavovací roztok - měření

Substrát	Stop roztok	Vlnová délka měření
ABTS	1M kyselina citrónová + 0,05% NaN ₃	405 nm
oPD	2,5M H ₂ SO ₄	490 nm
TMB	2,0M H ₂ SO ₄	370 nm (bez stop roztoku) 450 nm (po zastavení reakce)
pNPP	3M NaOH	405 nm
oNPG	1M Na ₂ CO ₃	405 nm

Nelineární kalibrace

- Závislost koncentrace stanovované látky na signálu získaném v ELISA testu (zpravidla optické denzity) **NENÍ** lineární
- V každé analytické sérii je nutné zařadit několik standardů (nejméně 4)
- Existuje několik modelů kalibrační závislosti:
 - point-to-point: jednotlivé body kalibrační křivky jsou propojeny úsečkami
 - 4-parametrová (popř. 5-parametrová) – sigmoida
 - kvadratická funkce
 - kubická funkce

Nelineární kalibrace – kvadratický polynom, kubický polynom a 4-parametrová logistická funkce

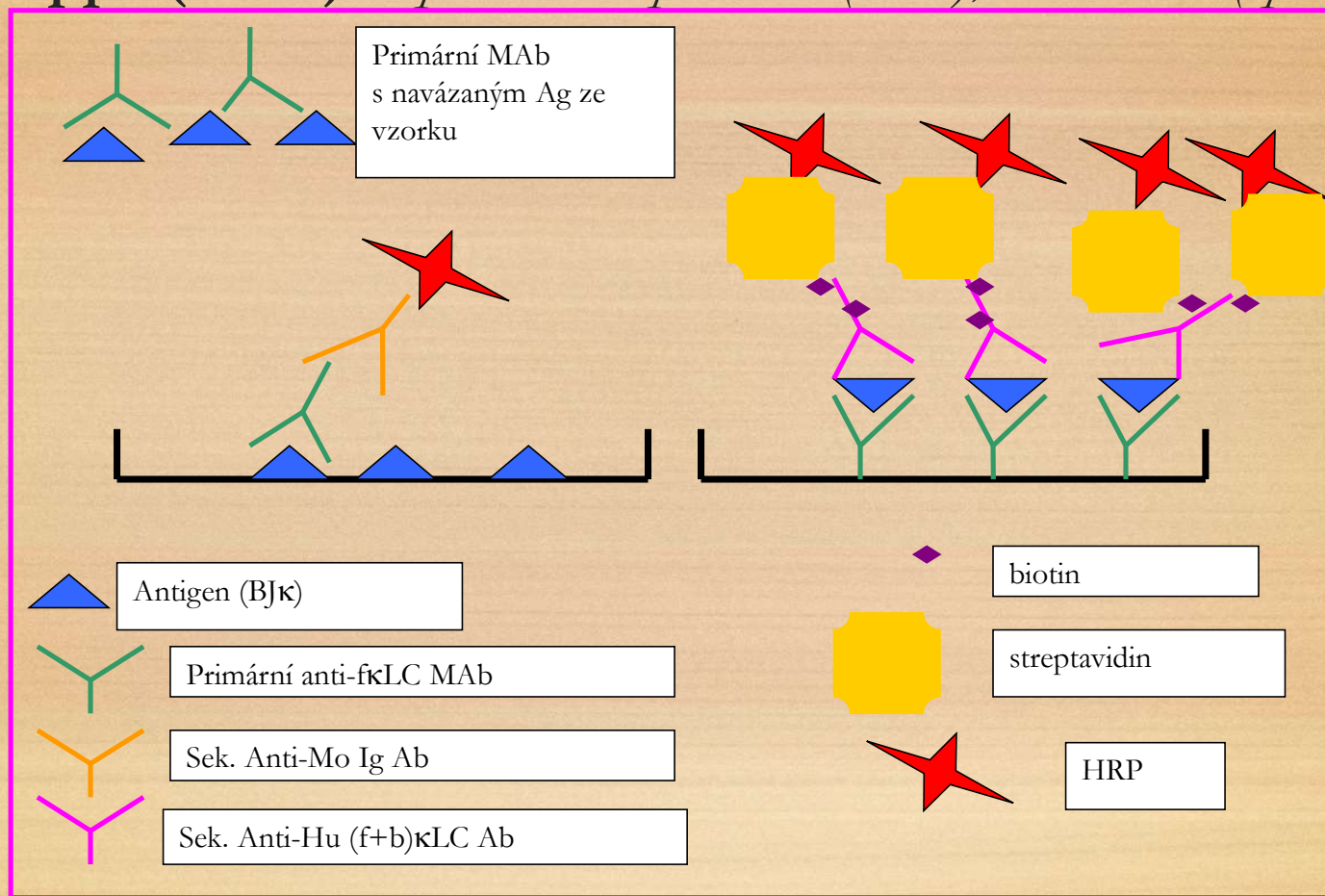
- $OD = a + b \cdot conc + c \cdot conc^2$
- $OD = a + b \cdot conc + c \cdot conc^2 + d \cdot conc^3$
- $OD = \frac{a-d}{[1+(conc/c)^b]} + d$

V polynomech jsou a , b , c a d koeficienty.

Ve 4-parametrovém modelu je a dolní asymptota, b směrnice v inflexním bodě, c koncentrace v inflexním bodě a d horní asymptota.

OD je optická denzita, $conc$ je koncentrace analytu.

Zjednodušené schéma ELISA testů pro detekci volných lehkých řetězců typu kappa (κ LC): nepřímá kompetitivní (vlevo); sendvičová (vpravo)



Příklad kalibrace

(nepřímá kompetitivní ELISA pro stanovení f_kLC)

- Kalibrátor č. 1 o koncentraci 2,56 mg/L a dále ředění dvojkovou řadou až k 0,01 mg/L (popř. 0,005 mg/L)
- 9- (10-)bodová sigmoidní kalibrační křivka za použití rovnice

$$A = C + [(D-C)/(1+e^{-2(\alpha+\beta*x)})]$$

A ... absorpance při 492 nm (proti referenční vlnové délce 620 nm)

C a D ... dolní a horní asymptota kalibrační křivky

α ... posun lineární části kalibrační křivky v systému souřadnic

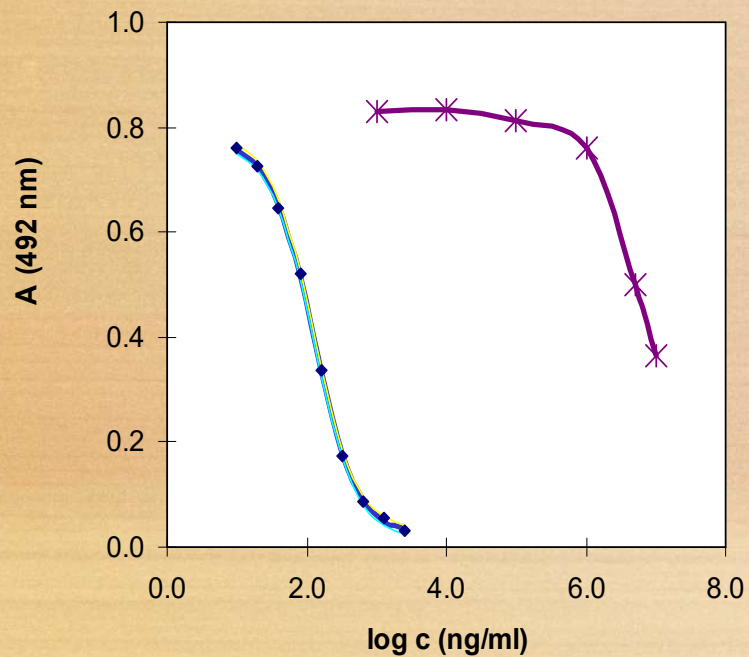
β ... směrnice lineární části kalibrační křivky

X ... log koncentrace f_kLC (μ g/L)

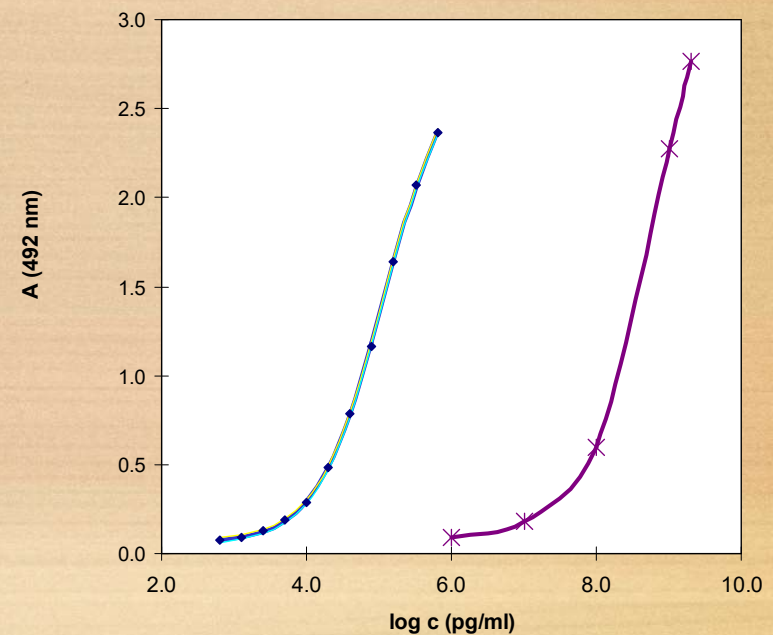
Koncentrace počítány z rovnice kalibrační křivky po vyjádření x pomocí programu Microsoft Excel

Kalibrační křivky a křížové reakce v nepřímém kompetitivním a sendvičovém ELISA testu

Nepřímá kompetitivní ELISA: kalibrace fKLC (modře);
křížová reakce: IVIgG (fialově)

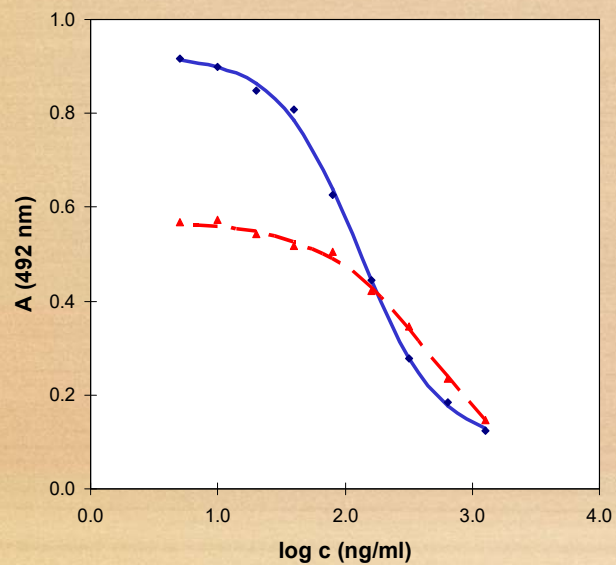


Sendvičová ELISA : kalibrace
fKLC (modře), křížová reakce: IVIgG (fialově)

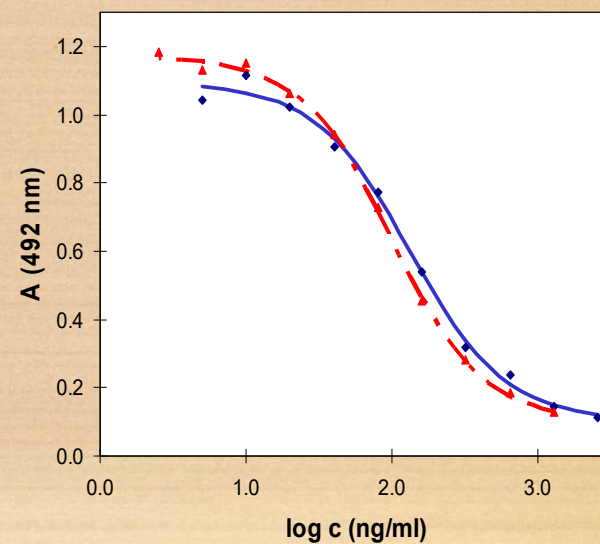


Srovnání variant použité nepřímé kompetitivní ELISA metody

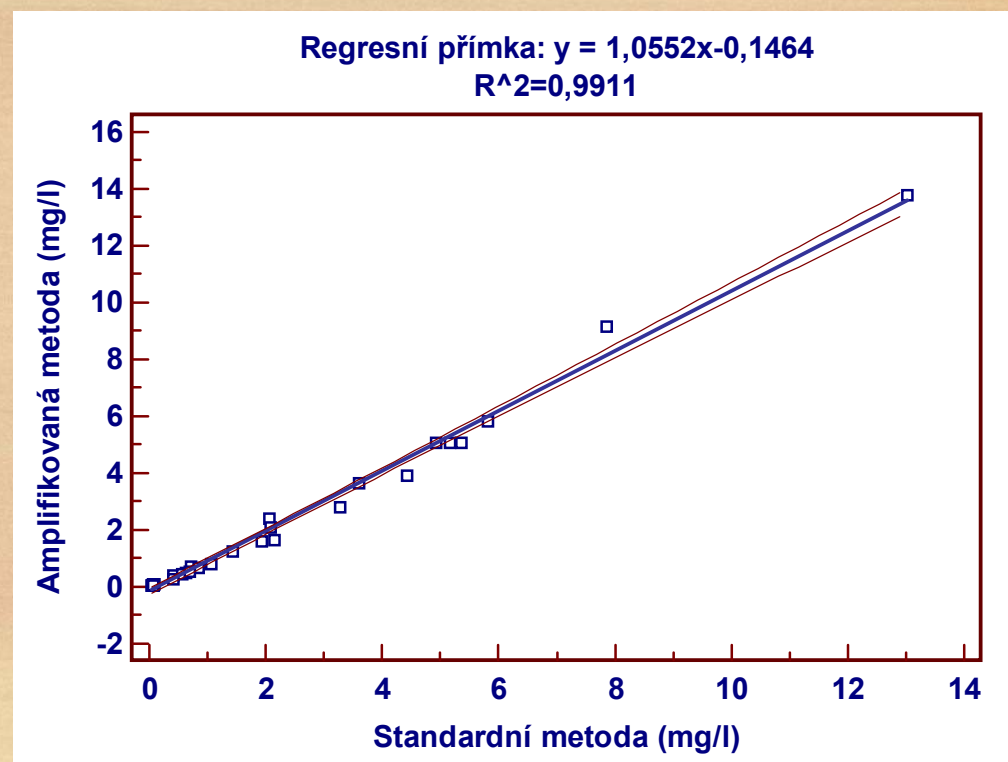
Srovnání mezi preinkubací s MAb (plná modrá křivka) a převrstvením vzorku MAb (čárkovaná červená křivka)



Srovnání standardní metody (plná modrá křivka) a metody s biotin-streptavidinovou amplifikací (čárkovaná červená křivka)



Koncentrace fκLC získané standardní ELISA metodou a metodou s biotin-streptavidinovou amplifikací v 11 vzorcích CSF, séra a moči

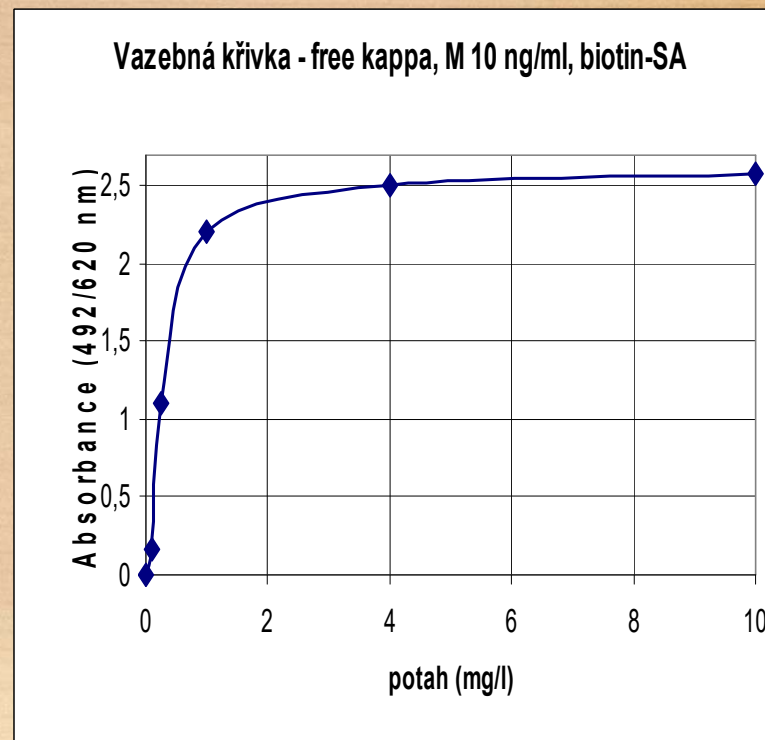
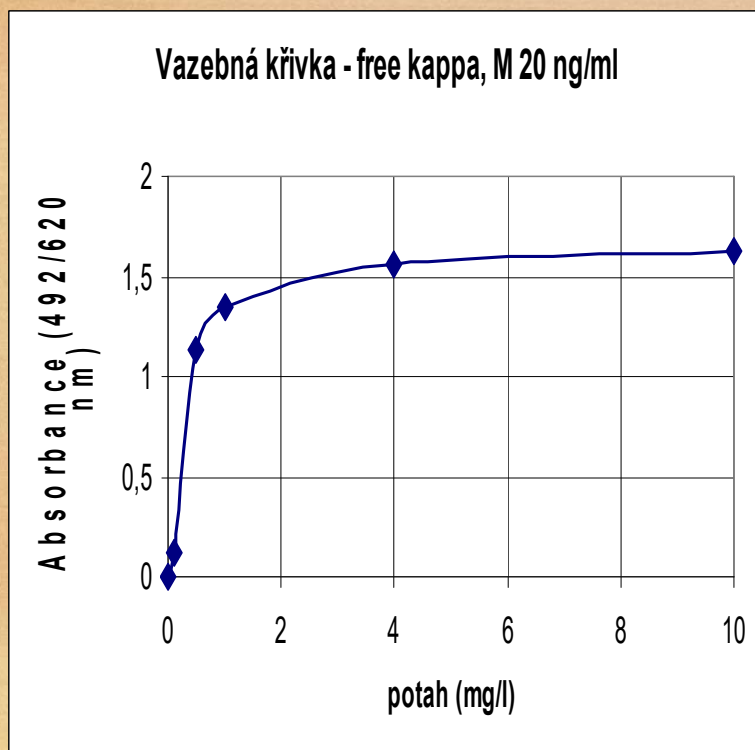


Analytické charakteristiky metody:

I50 a detekční limit

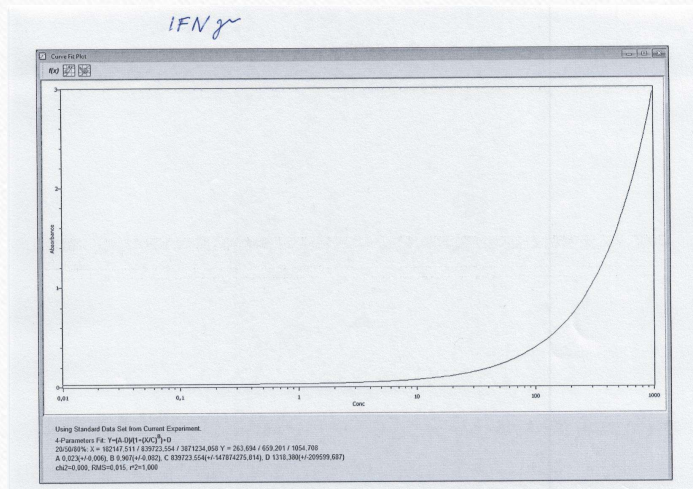
(n = 14)	Průměr (mg/l)	SD (mg/l)	Rozmezí (mg/l)
I50	0,133	0,024	0,095 – 0,169
Detekční limit = D – 0,1*(D-C)	0,024	0,008	0,012 – 0,041

Vazebná křivka



Další příklady využití ELISA testů

Stanovení IFN γ v plazmě po stimulaci krevních buněk vybraným antigenem („koncovka“ IGRA testů)



IGRA 15092022.mpl IGRA vzor.pro 09/15/2022 19:51 odp.

Title: Quan-T-Cell ELISA EQ 6841-9601
 Protocol: IGRA vzor.pro
 Date/Time: 09/15/2022 19:50:58
 Technician:
 Plate ID:
 Unit: IU/L
 Reader Setup: Endpoint Dual 450.0 - 595.0nm Mix off Temp **
 Reader Model #: iMark
 Reader Serial #: 15818
 Reader Version #: 1.04.02.E Build 00
 Comments:

Using Standard Data Set from Current Experiment.
 4-Parameters Fit: $Y=(A-D)/(1+(X/C)^B)+D$
 20/50/80%: X = 182147.511 / 839723.554 / 3871234.058 Y = 263.694 / 659.201 / 1054.708
 A: 0.023 (H=0.006), B: 0.307 (H=0.062), C: 839723.554 (H=147874275.814), D: 1316.380 (H=209599.687)
 chi2=0.000, RMS=0.015, P2=1.000

Standards Report:

Std #	Conc (IU/L)	Well	Replicates	Mean	SD	%CV
1	0.01	A1	0.026	0.026	(*)	(*)
2	12.5	B1	0.074	0.074	(*)	(*)
3	40	C1	0.173	0.173	(*)	(*)
4	100	D1	0.402	0.402	(*)	(*)
5	200	E1	0.694	0.694	(*)	(*)
6	400	F1	1.301	1.301	(*)	(*)

Sample Report:

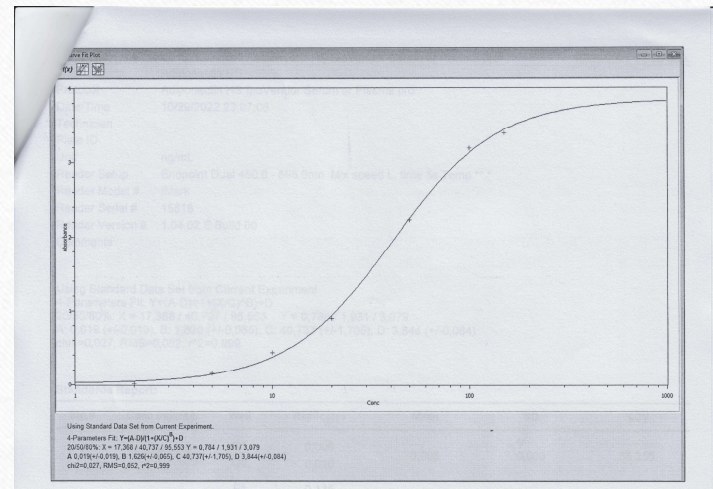
Sample ID	Well	Replicates	Mean	Conc (IU/L)	SD (Conc)
B01	A2	0.042	0.042	3,961	19,805 (*)
B02	D2	0.057	0.057	7,443	37,215 (*)
B03	G2	0.043	0.043	4,187	20,935 (*)
B04	B3	0.028	0.028	0,972	4,86 (*)
B05	E3	0.024	0.024	0,223	1,1115 (*)
B06	H3	0.035	0.035	2,421	12,105 (*)
B07	C4	0.035	0.035	2,421	12,105 (*)
B08	F4	0.034	0.034	2,207	11,035 (*)

MPM 6 build 2.8.11 Page 1

Stanovení adiponektinu v séru

kit firmy BioVendor

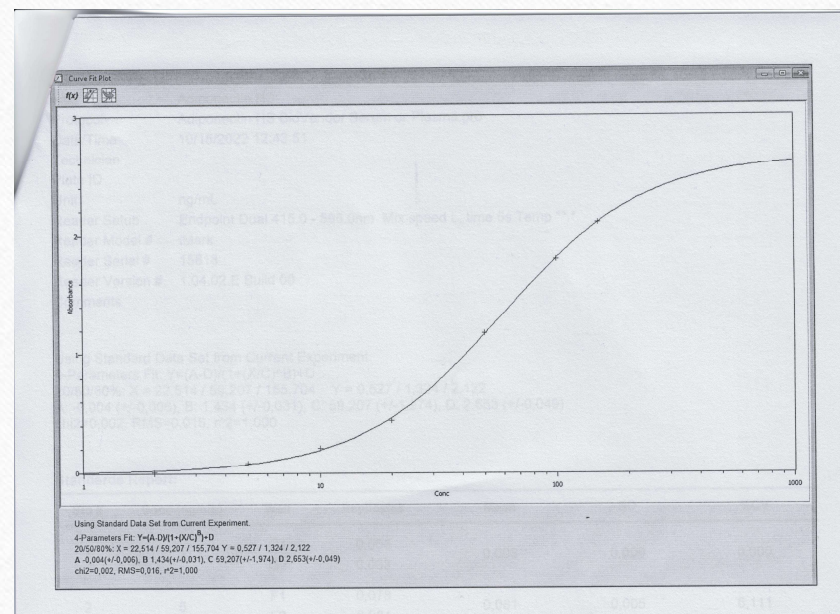
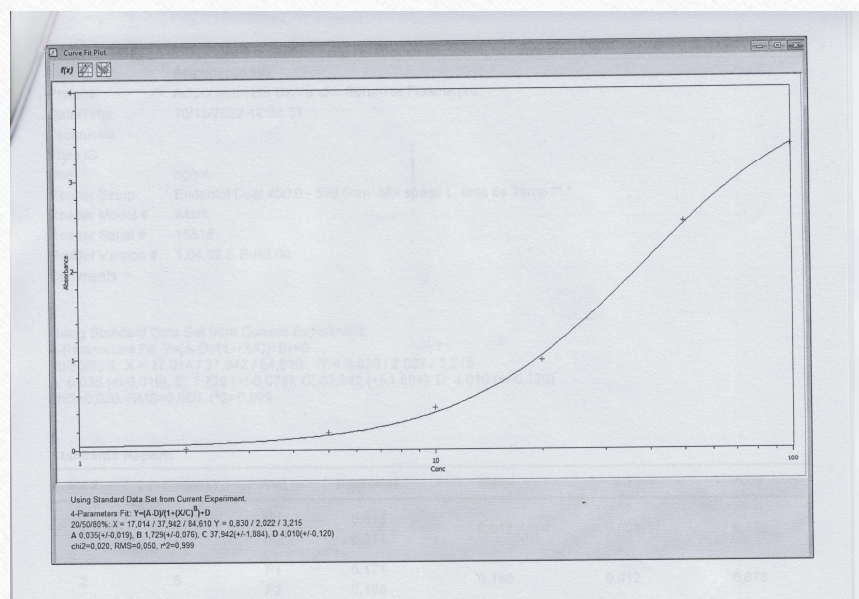
- Kalibrační rozsah 1 – 150 $\mu\text{g/L}$ – obvykle se aplikují kalibrátory 2, 5, 10, 20, 50 a 100 $\mu\text{g/L}$
- Přidání kalibrátoru 150 $\mu\text{g/L}$ může mít za následek horší přesnost stanovení v oblasti vysokých koncentrací (křivka je zde plochá, malá změna OD odpovídá velké změně koncentrace)



Stanovení adiponektinu v séru

kit firmy BioVendor

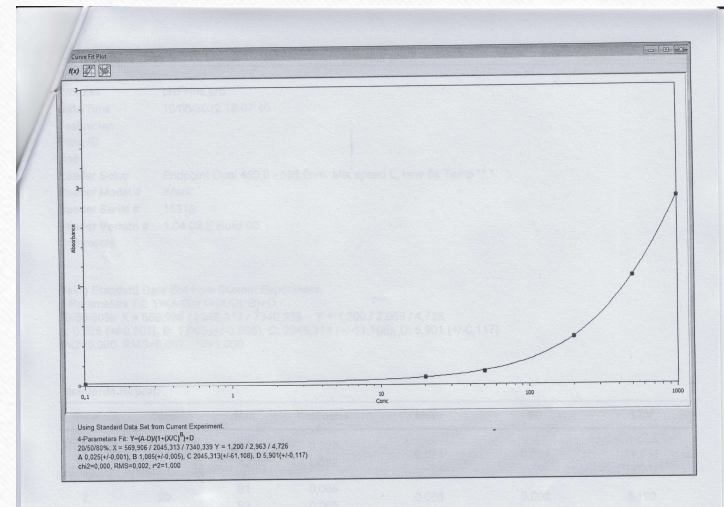
v případě OD nejvyššího kalibrátoru/vzorků nad 3,5 provedeme nové měření při 415 nm (vpravo)



Stanovení pNfH v séru

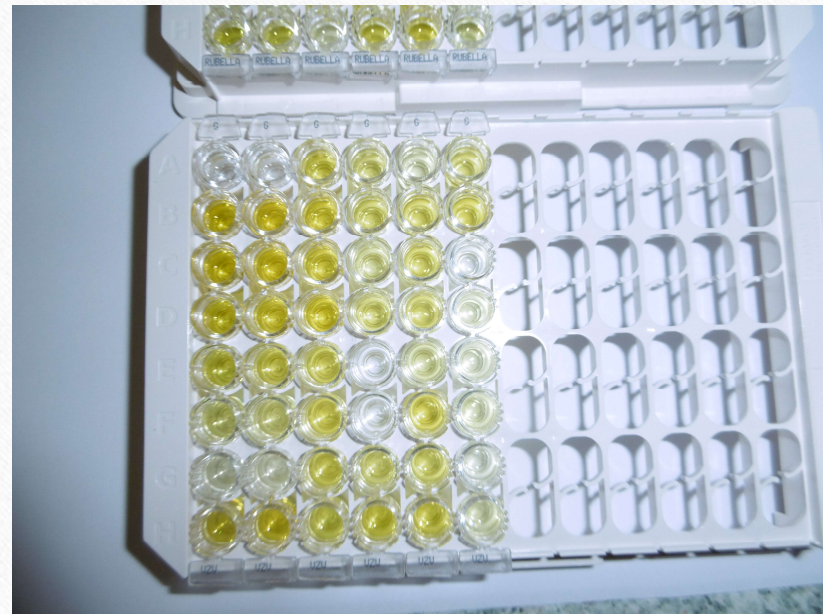
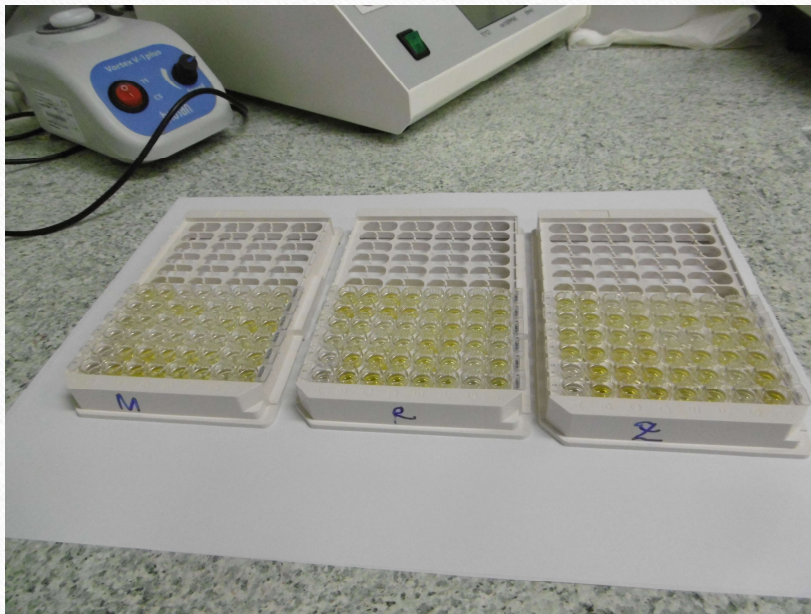
„hs“ („high sensitivity“) kit firmy Euroimmun

- 6-bodová kalibrační křivka
- „nulového“ kalibrátoru „arbitrárně“ přiřazena zanedbatelná koncentrace (0,1 ng/L) vzhledem k logaritmické ose koncentrací
- Rozsah 20 – 1000 ng/L
- Mez detekce kolem 4 ng/L



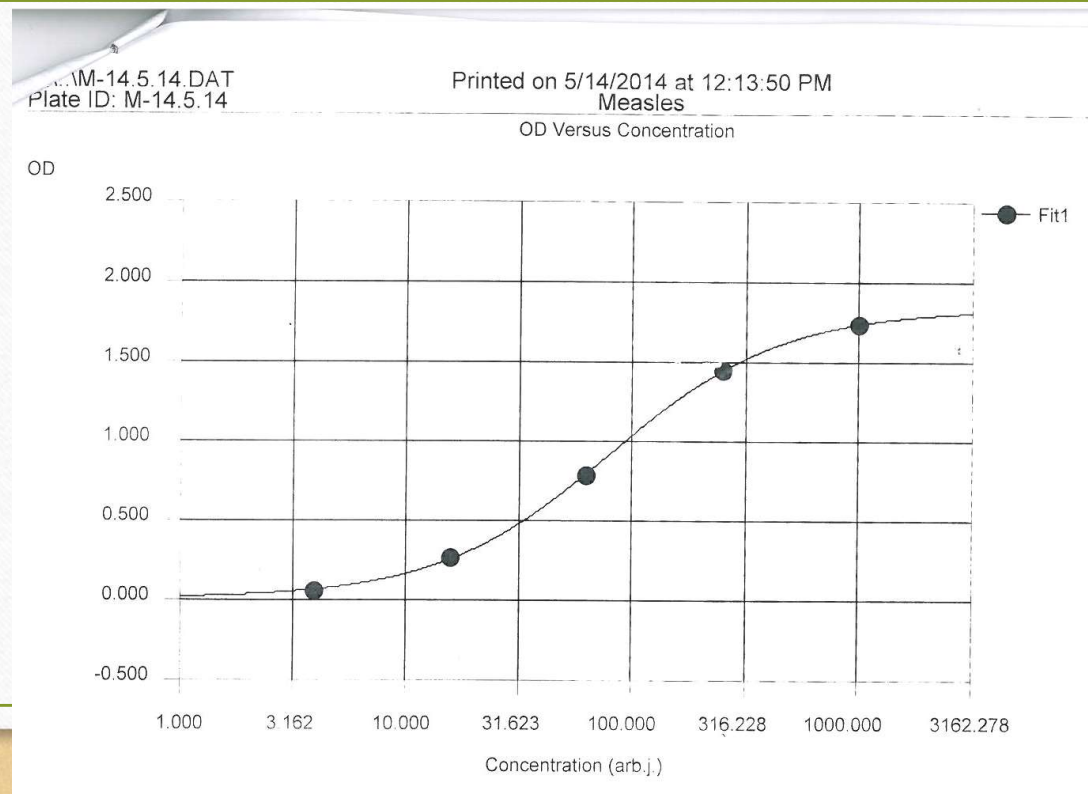
MRZ reakce

detekce specifických IgG protilátek proti virům spalniček (measles), zarděnek (rubella) a varicella zoster v likvoru a séru s výpočtem intrathekální syntézy – význam pro podporu diagnózy roztroušené sklerózy



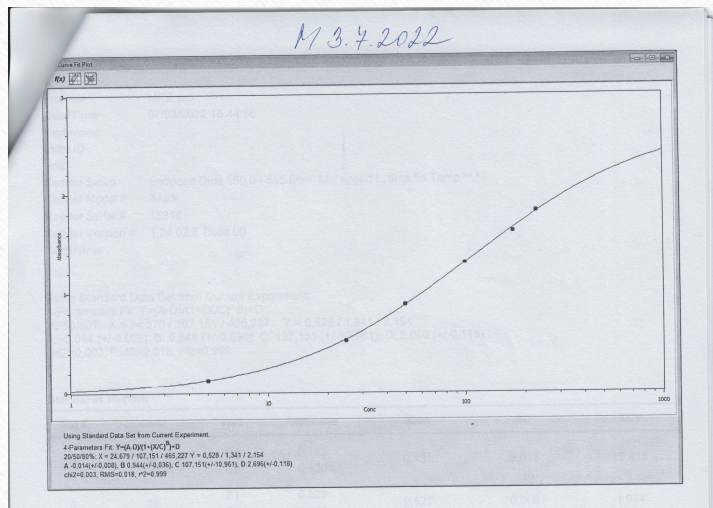
MRZ reakce – kit firmy Virotech, kalibrační křivka modifikovaná přídavkem 5. kalibrátoru

- s použitím původní čtyřbodové křivky řada vzorků neměřitelně nízkých, zejm. u anti-measles IgG
- OD 4×ředěného nejnižšího kalibrátoru $> 10 \times (\text{OD blanku} + 3 \text{ SD})$ – ověřeno opakovaně pro všechny používané kity (measles, rubella, VZV, EBV)
- arb.j. znásobeny $\times 10$ (vzhledem k logaritmické ose koncentrací)



MRZ reakce – kit firmy Euroimmun

6-bodová kalibrační křivka



Stanovení IgG protilátek proti viru spalniček (kalibrační křivka tohoto testu vlevo), zarděnek a VZV ve vzorcích likvorů ředěných 1/2 a sér ředěných 1/404; srovnáním poměru (arbitrárních) koncentrací specifických protilátek proti danému viru v likvoru a séru s poměrem koncentrací (v mg/L) celkových IgG protilátek v likvoru a séru získáme tzv. „protilátkový index“ (antibody index, AI):

$$AI = \frac{Q_{spec.IgG}}{Q_{celk.IgG}}$$

ELISA - instrumentace

promývačka



ELISA reader iMark (Bio-Rad)



Automatizace: ELISA analyzátor DSX (Dynex)

