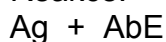


PŘÍMÝ TEST ELISA

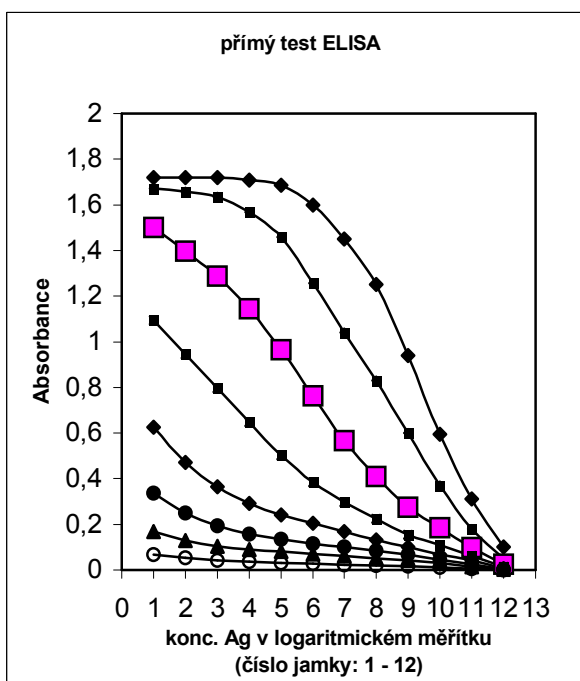
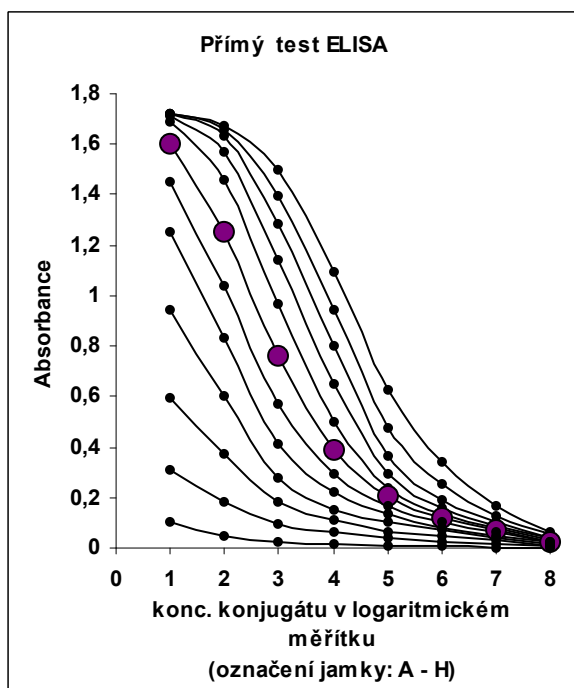
Slouží pro zjištění max. množství Ag, který se může navázat do jamek destičky, pro zjištění ideálního zředění konjugátu

Reakce:



Například:

AbE ↓	Ag →	5 μg →	2,5 μg →	1,25 μg →	0,675 μg →	0,337 μg →	0,169 μg →	0,084 μg →	0,042 μg →	0,021 μg →	0,010 μg →	0,005 μg	bez Ag
1/400	A	1,720	1,720	1,720	1,709	1,686	1,600	1,450	1,250	0,941	0,595	0,311	0,100
1/800	B	1,671	1,658	1,635	1,568	1,459	1,256	1,040	0,829	0,600	0,369	0,179	0,050
1/1600	C	1,500	1,396	1,287	1,144	0,964	0,764	0,568	0,410	0,275	0,185	0,097	0,025
1/3200	D	1,095	0,946	0,797	0,649	0,503	0,385	0,297	0,225	0,154	0,108	0,062	0,013
1/6400	E	0,626	0,472	0,365	0,293	0,24	0,205	0,169	0,132	0,101	0,067	0,041	0,007
1/12800	F	0,338	0,251	0,194	0,158	0,136	0,116	0,100	0,083	0,068	0,046	0,025	0,004
1/25600	G	0,167	0,128	0,105	0,090	0,080	0,071	0,063	0,051	0,042	0,03	0,014	0,002
blank	H	0,066	0,054	0,043	0,036	0,032	0,027	0,023	0,020	0,017	0,011	0,006	0,001
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12



Příprava Ag:

Jako Ag vystupuje sérum a proti němu reaguje sekundární protilátka s enzymem (konjugát) nebo jakýkoliv antigen a proti němu protilátky s navázaným enzymem

- 50 μg karbonátového pufru do každé jamky předem
- naředit Ag v karbonátovém pufru do výsledné koncentrace 10 μg/ml
- dát 50 μl ředěného Ag do sloupce 1 (8x promíchat)
- přenos 50 μl do sloupce 2, atd až do sloupce 11
- 12. sloupec neobsahuje Ag - blank.
- nechat přes noc

Příprava AbE:

- konjugát naředit v poměru 1/200 v blokovacím roztoku (1 ml blokovacího pufru + 5 μ l konjugátu)
- do každé jamky nanést 50 μ l blokovacího roztoku
- do řady A nanést 50 μ l ředěného konjugátu 1/200 (výsledná koncentrace je 1/400 v řadě A)
- přenášet 50 μ l z řady A \rightarrow B \rightarrow C atd.
- nezapomenout na BI
- BI = bez AbE nebo Ag, jen s fyziologickým roztokem

Pozn: Osa x, kde ve skutečnosti nevynášíme koncentraci, ale číslo jamky, je vlastně z hlediska koncentrace v logaritmické škále a hodnoty 1-12 jsou vlastně úměrné přirozenému logaritmu koncentrace (jde o biologický materiál, kde se průběh podobá růstové křivce; jde o široký rozptyl hodnot, proto byly použito logaritmické měřítko. Za těchto podmínek by byl výpočet neznámé koncentrace Ag nebo Ab obtížný, proto se tento model využívá jen na zjištění ideální křivky). Kdybychom chtěli vynášet opravdu koncentraci Ag či AbE, bylo by to vhodné v logaritmické škále.

Vyhodnocení:

Křivky reprezentují titraci rozdílného ředění konjugátu proti každému ředění Ag. Můžeme zjistit:

- Maximální množství Ag, které se může navázat na stěnu jamek (vazebná kapacita plastu – kolísá od proteinu k proteinu).
- Konečný bod titrace konjugátu v určitém ředění ukazuje stejná hodnota při nejnižší koncentraci Ag.
- Ve sloupci bez Ag barva znamená nespecifické adsorpce konjugátu (při nižších ředěních vznikají problémy nespecifických vazeb, hodnoty skoro jako blank). V ostatních koncentracích hodnoty A charakterizují pozadí destiček.
- Při nízkých koncentracích Ag dochází ke ztrátě citlivosti (schopnost reagovat s Ab).
- Logaritmické křivka se nevyhodnocuje, jen se vybírá ideální křivka z těch výsledných

Vyžaduje se:

1. vysoké hodnoty (absorbance kolem 1,5)
2. hodnoty bez nespecifických vazeb konjugátu, ideální je v rozmezí 1 – 1,5 OD
3. odečte se optimální ředění konjugátu
4. optimální ředění Ag dává A v rozmezí 1 – 1,5 OD

Takto můžeme zjistit optimální ředění Ag a Ab pro nepřímý test ELISA. Konjugát však musí být zaměřen proti Ag nebo antigenem musí být sérum.