

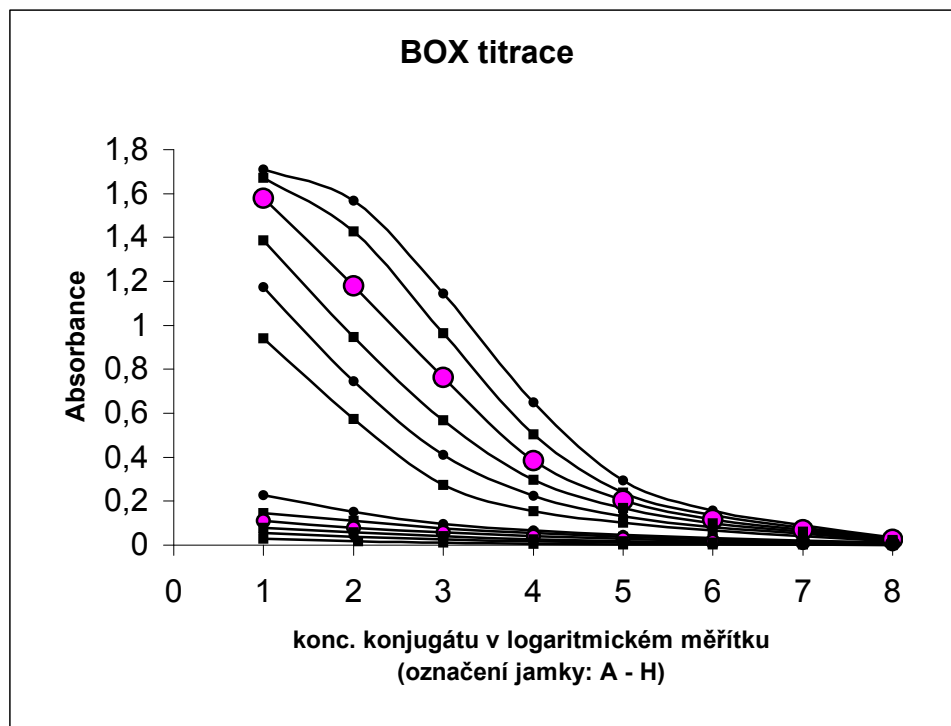
„BOX titrace“ přímý test ELISA

Reakce:

Ag + AbE neboli Ab + Ab_SE

Tato technika se používá pro stanovení optimální koncentrace vazebného Ag a konjugátu

Sérum ($\mu\text{g/ml}$) ↓	Ab _S →	1		2		3		4		5		6	
		P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
100	A	1,709	0,311	1,672	0,311	1,578	0,100	1,387	0,200	1,173	0,154	0,941	0,080
50	B	1,568	0,179	1,427	0,179	1,181	0,050	0,946	0,100	0,747	0,050	0,573	0,050
25	C	1,144	0,097	0,964	0,097	0,764	0,025	0,568	0,025	0,410	0,025	0,275	0,025
12,50	D	0,649	0,062	0,503	0,062	0,385	0,013	0,297	0,013	0,225	0,013	0,154	0,013
6,250	E	0,293	0,041	0,240	0,041	0,205	0,007	0,169	0,007	0,132	0,007	0,101	0,007
3,125	F	0,158	0,025	0,136	0,025	0,116	0,004	0,100	0,004	0,083	0,004	0,068	0,004
1,562	G	0,090	0,014	0,080	0,014	0,071	0,002	0,063	0,002	0,051	0,002	0,042	0,002
0	H	0,036	0,006	0,032	0,006	0,027	0,001	0,023	0,001	0,020	0,001	0,017	0,001
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12



tj Ab proti Ab_S (tj. primární protilátka proti sekundární protilátce)

Sérum: Ab = Ag = sérum, a to buď

P = pozitivní sérum (=primární protilátka), nebo

N = negativní sérum (=bez primární protilátky)

Každá jamka musí obsahovat 100 μl , tj 50 μl protilátky a 50 μl konjugátu.

- do řady A se aplikuje sérum v koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$
- do řady B se aplikuje sérum v koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$, atd, do poslední řady H se nedává sérum

- do sloupce 1 se dává pozitivní kontrola (Ag = sérum s primární protilátkou)
- do sloupce 2 se dává negativní kontrola (sérum) (Pozn.: pozitivní kontrola musí obsahovat poměrně málo Ab (Ag), aby jejich hodnota byla uprostřed kalibrační křivky. V praxi to bývá okolo 10 – 20 µg/ml)

-

Konjugát (Ab_sE):

- do sloupců 1 – 2 se aplikuje konjugát o určité koncentraci
- do sloupců 3 – 4 se aplikuje konjugát o poloviční koncentraci
- do sloupců 5 – 6 se aplikuje konjugát o čtvrtinové koncentraci (optimální koncentrace konjugátu se pohybuje v rozmezí 0,1 – 10 µg/ml)
- atd

Co se vyžaduje:

- musí se nalézt podmínky testu tak, aby negativní kontroly měly absorbanci 0,05 – 0,150 a maximální pozitivní hodnoty nad 1,0. Dodržování podmínek: vždy použít blank
- a) bez Ag, s Ab_s
 - b) bez Ab_s s Ag