

## Nepřímý test ELISA

Kompetitivní inhibice mezi antigeny. Reakce:  $Ag_1 + Ag_2 + Ab + Ab_sE$

- 1.) Nanést  $Ag_1$  na celou destičku (př. *B. afzelii*) v optimální koncentraci navázat, pak 2 kroky
- 2.) 50  $\mu$ l kompetitoru  $Ag_2$  (= inhibitor, např. *B. garinii*) o různé koncentraci: 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml .... v řádcích A, B, C, ... 1 hodina kultivace
- 3.) nanést 50  $\mu$ l Ab (ve správném ředění dle předchozího pokusu) do všech jamek kromě sloupce 12, kde bude blank
- 4.) 50  $Ab_s$  (sekundární protilátka proti Ab) v optimálním ředění (ve správném ředění dle předchozího pokusu) též všude kromě blanku  
(pg = pikogram =  $10^{-12}$ g)

Hodnocení:

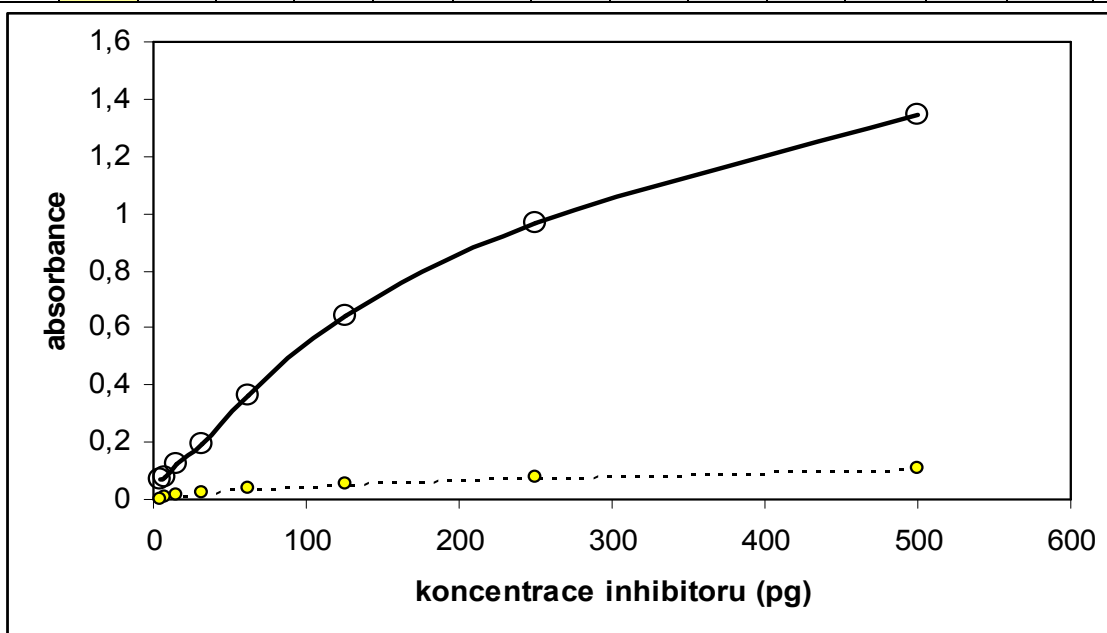
A) OD nebo B) %inhibice

Čím vyšší % inhibice (nižší OD), tím silnější druhý Ag a naopak: čím vyšší OD, tím silnější Ag na destičce už navázaný. 100% se rovná určité absorbanci pozitivní kontroly, která znamená pozitivní kontrolu, tj u pacient nakažený *B. afzelii* a pacient nakažený *B. garinii*.

Grafem je jediná standardní kalibrační křivka o 8 bodech, každý z nich je průměrem z 11 bodů, jedná se o výslednou křivku (opět logritmická škála). Do grafu vyneseme i křivku hodnot blanku.

Příklad (naměřené hodnoty absorbance zobrazeny pouze u blanku, z ostatních zobrazen pouze vypočtený průměr):

$Ag_2 \downarrow$		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	blank	průměr
500 pg	A												0,108	1,348
250 pg	B												0,081	0,966
125 pg	C												0,057	0,640
62,5 pg	D												0,039	0,360
31,2 pg	E												0,027	0,195
15,6 pg	F												0,013	0,120
7,8 pg	G												0,007	0,080
3,9 pg	H												0,003	0,072



Na osu Y patří absorbance nebo % inhibice.

