

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ELISA

- Biochemická metoda
- Detekce protilátky (Ab) nebo antigenu (Ag)

Historie:

- 1960 - Radioimunoassay – použití radioaktivně značených Ag nebo Ab
- 1966 – radioaktivita → neradioaktivní signál: ENZYM (peroxidáza)-SUBSTRÁT (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) – barevná změna = signál
- 1971 - ELISA

Využití:

- Stanovení sérových Ab (HIV test), cytokinů...
- Potravní alergenů (mléko, ořechy, vejce...)
- Toxikologie (léky, drogy...)

ELISA

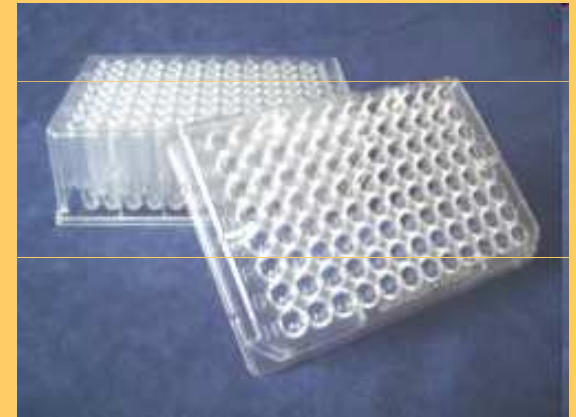
- 1. IMUNOLOGICKÁ REAKCE

Ag +

Ab → IK

- 2. POVRCH
(imobilizace Ag a Ab)

- Biomolekuly se vážou k povrchu prostřednictvím různých mechanismů. Důležitou roli hrají chemické vlastnosti povrchu, fyzikální vlastnosti, pH, teplota



Medium Binding Polystyren

- nemodifikovaný polystyren (hydrofóbní) – vazba biomolekul pouze *pasivní interakcí*
- Imobilizace velkých molekul – biomolekuly s velkou hydrofóbní oblastí reagující s povrchem (>20 kDa)

High Binding Polystyren

- Radiací modifikovaný polystyren – vazba biomolekul *pasivní interakcí* hydrofóbními a iontovými interakcemi
- Imobilizace středních a velkých molekul s iontovými skupinami nebo hydrofóbními oblastmi – (>10 kDa)

Aminated Polystyren

- Modifikovaný polystyren s pozitivně nabitými aminovými skupinami – NENÍ hydrofóbní (pouze iontový charakter)
- Vazba malých, negativně nabitých molekul nebo molekul s aminovými, karboxylovými nebo thiolovými funkčními skupinami
- Imobilizace molekul rozpuštěných v detergentech (Triton X-100, Tween 20)

Tissue Culture Treated Polystyren

- Modifikovaný polystyren s hydrofilním a negativně nabitým povrchem
- Vazba buněk

Základní složky systému ELISA

Imunosorbční povrch (pevná fáze):

- používá se upravený polystyrén ve formě mikrotitračních destiček, kuliček, hřebenů, pruhů. Důležitá je vhodná *polymerizační teplota a délka polymerizace*. Při přehnaně vysokých sorpčních vlastnostech by docházelo k navázání nežádoucích látek, a tím ke snížení citlivosti a specifiity reakce. Nízké sorpční vlastnosti by nezabezpečovaly dostatečně souvislý a stabilní imunosorpční povrch (nestabilita a nespolehlivost systému vede ke snížení citlivosti a reprodukovatelnosti).

Konjugát:

- *specifická Ab* (mono- nebo polyklonální) navázaná na enzym tak, aby nebyla porušena původní schopnost Ab vázat se na Ag. Lze použít *enzym*, který po reakci se substrátem vytváří v přítomnosti vhodného chromogenu dostatečně intenzivní reakci (nejvhodnější enzymy: HRP – křenová peroxidáza a ALP)

Vlastnosti enzymů

- Malá reaktivní hmotnost
- Vysoká stabilita a enzymová aktivita
- Kovalentní vazba na Ab a Ag
- Produkt enzymové reakce musí být barevný či jinak detekovatelný

Substrát:

- Při použití konjugátu s HRP jako *chromogen* slouží ortofenylén-diamin hydrochlorid = OPD, který v přítomnosti peroxidu vodíku jako *substrátu* (katalyzátoru) vyvolá barevnou reakci.

Přístroje:

- *ELISA reader* = spektrofotometr upravený na odečítání absorbance v reakčních jamkách. Filtry jsou nastavené s volitelnou vlnovou délkou optimální pro určitý ELISA systém ($405 - 570 \text{ nm}$) v závislosti na typu použitého konjugátu a substrátovo-chromonenního roztoku.



TYPY ELISA

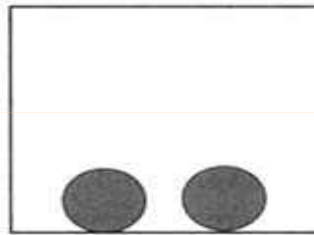
- **NEPŘÍMÁ ELISA PRO Ag (kompetitivní)**

Ag se naváže na tuhou fázi a reakční prostor se promyje. Pokud je Ag malý, naváže se předem na větší nosič (např. BSA)

Zkoumaný roztok, ve kterém se předpokládá přítomnost Ag, se míchá se specificky značenou Ab a směs se inkubuje s imobilizovaným Ag

Inkubace, promytí a přidání substrátu, čímž se vyvolá barevná reakce

-určuje množství Ag ve zkoumaném vzorku – o vazbová místa Ab soutěží Ag ve zkoumaném vzorku (volný) a Ag imobilizovaný. Čím víc Ag bude ve vzorku, tím méně Ab se může navázat na imobilizovaný Ag a tím menší barevná intenzita bude v reakčním roztoku. Nejvíce zbarvený roztok bude v kontrolní jamce, kde reakční směs neobsahovala volný Ag.

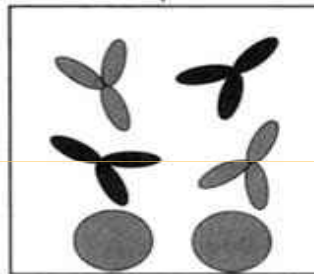


COAT PLATES WITH RINDERPEST ANTIGEN

Incubate at 37°C for 1 hour



WASH



ADD TEST SERUM FOLLOWED BY ANTI-RINDERPEST MONOCLONAL Ab

Incubate at 37°C for 1 hour

TEST Ab AND MAb COMPETE FOR Ag



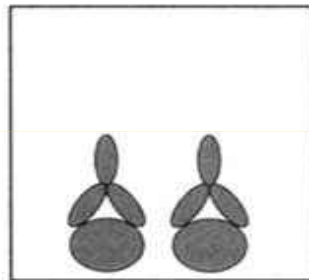
WASH

ADD ANTI-MOUSE HRPO CONJUGATE

Incubate 37°C 1 hour, wash, add substrate/chromogen



POSITIVE TEST SERUM



TEST ANTIBODY BINDS TO ANTIGEN

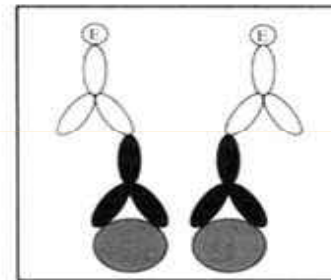
DETECTING Ab (MAb)
CANNOT BIND
CONJUGATE (ANTI-MOUSE)
CANNOT BIND

NO ENZYME PRESENT

NO COLOUR



NEGATIVE TEST SERUM



TEST ANTIBODY DOES NOT BIND

DETECTING Ab (MAb)
BINDS TO ANTIGEN
CONJUGATE (ANTI-MOUSE)
BINDS

ENZYME PRESENT

COLOUR

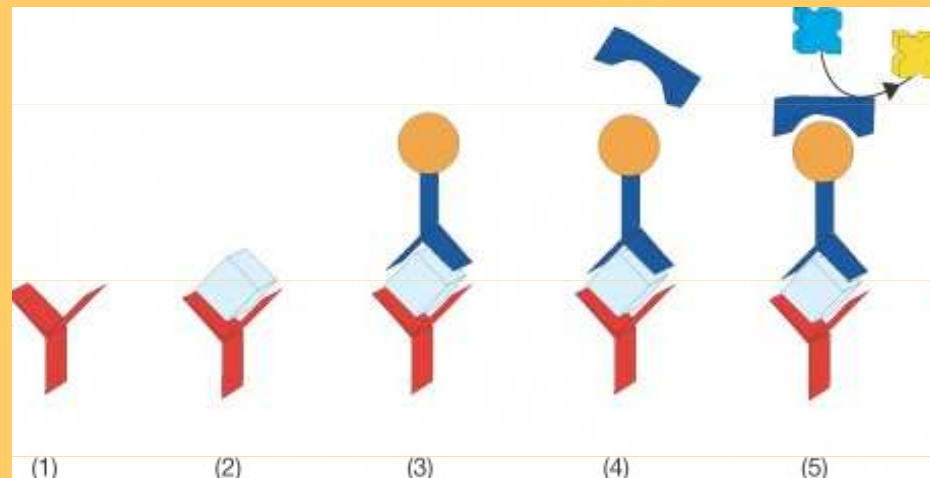
• SENDVIČOVÁ ELISA PRO Ag

Na tuhou fázi se naváže Ab

Na ni se potom navazuje známé nebo neznámé množství Ag a promyje se to. Přidá se enzymem značená volná Ab, která reaguje s volnými Ag immobilizovanými vazbou do komplexu s Ab. Přidá se substrát na detekci enzymové aktivity.

Z naměřených hodnot standardních vzorků se sestrojí kalibrační křivka, podle které se vyhodnotí vzorky s neznámou koncentrací zkoumaného Ag.

- Je nezbytně nutné, aby obě Ab měly stejnou specifitu a Ag musí mít nejméně 2 determinanty, protože s ním reagují 2 molekuly Ab



- **KOMPETITIVNÍ ELISA PRO Ag A HAPTENY – STANOVENÍ Ag**

Na tuhou látku se naváže Ab specifická pro Ag, který se má stanovit. Pak se přidá známé množství enzymem značeného Ag (AgE) a buď známé množství nebo analyzované množství neoznačeného Ag. V průběhu inkubace soutěží značený AgE s neoznačeným Ag a po promytí zůstávají jen Ag vázané na Ab. Pak se přidá substrát, který rozloží enzym přítomný v IK za vzniku barevného produktu.

-intenzita zbarvení roztoku s produktem enzymové reakce se měří spektrofotometricky. Sestrojí se kalibrační křivka z hodnot známého množství Ag a určí se podle ní koncentrace analyzovaného Ag ve vzorku.

-použití: kvantitativní stanovení nízkomolekulárních látek (hormonů, proteinů, léků)

- **SENDVIČOVÁ ELISA PRO Ab =
NEPŘÍMÁ ELISA PRO DETEKCI Ab**

Ag se naváže na tuhou fázi a promyje. Přidá se zředěné sérum, ve kterém se má určit přítomnost Ab. Následuje inkubace a promytí, dochází při tom k navázání na imobilizované Ag. Přidá se enzymem značená sekundární Ab (AbE) a promyje se to. Přidá se substrát a změří se intenzita barevné reakce.

-slouží na důkaz specifických Ab (IgG a IgM) pro určitý Ag.

Praktické cvičení

Stanovení myšního IL-6 v médiu

1000	1000	1A	2	3	5	6	7	9	10	11	12
500.	500	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
250	250	23	24	25	26	27	29	30	31	33	34
125	125.	35	37	38	39	41	42	43	45	46	47
62,5	62,5	1B	2	3	5	6	7	9	10	11	12
31,3	31,3	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
15,6	15,6	23	24	25	26	27	29	30	31	33	34
0	0	35	37	38	39	41	42	43	45	46	47

Protokol:

- Zpracování výsledků:

Sestrojit kalibrační křivku – rovnici kalibrační křivky a hodnotu spolehlivosti

Vypočítat koncentraci IL-6 z rovnice kalibrační křivky pro každý vzorek

Sestrojit graf

Závěr