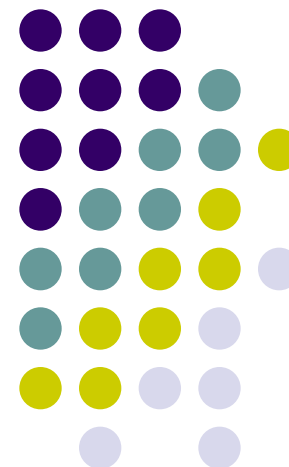




Vývoj ELISA



Mgr. Lenka Chalupová
Obor: *PřF FYZZ Fyziologie živočichů*
Biovendor- Laboratorní medicína s.r.o

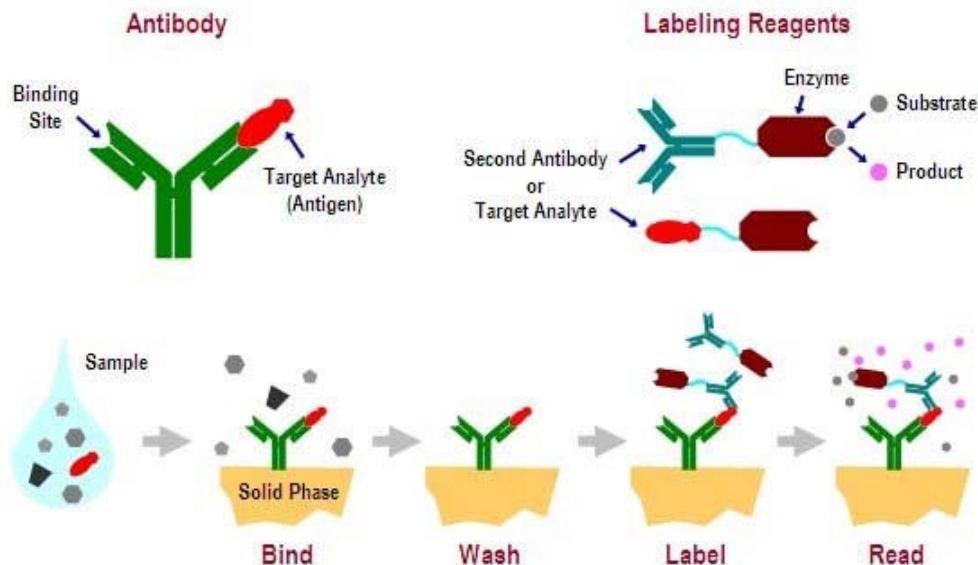
Postup vývoj CTRP-1 ELISA



- Sestavení a optimalizace ELISA
- Stabilitní testy komponent (zrychlené)
- Analytická charakteristika
- Stabilitní testy soupravy

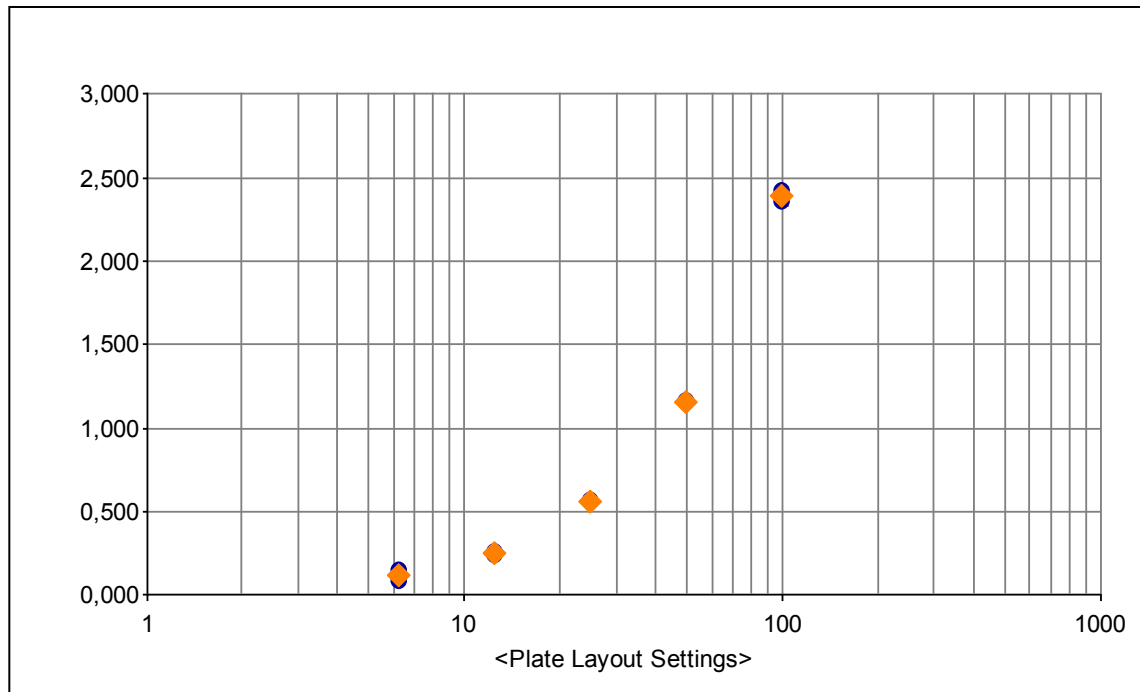
Sestavení

ELISA



- Sh Hu CTRP1
- Mikrotitr. deska: Costar H.B Ab 3µg/ml
- konjugát (Ab-HRP): 0,5 µg/ml
- vzorky sér, ředění 25x
- Substrát: TMB
– inkubace se substrátem: 10min
- Ředící roztok: (MDB)
- Standard: 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 ng/ml – rekombinantní protein
- QC High, QCLow, (IQC 1-4)

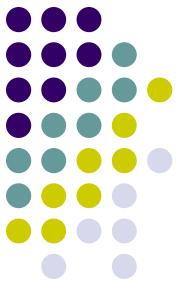
Kalibrační křivka



Stabilitní testy komponent (zrychlené)



- 7,14,28 D
- Refer. , RT, 37°C, 4°C, -20°C
- $\pm 20\%$



Analytické charakteristiky

- Správnost - Dilution linearity
 - Spiking recovery
- Sensitivity - Limit of detection
 - Assay sensitivity
- Přesnost - Intra-assay
 - Inter-assay
- Vliv matrice vzorků
- Vliv přemraž./rozmraž na koncentraci vzorků

Analytické charakteristiky

- Dilution linearity (80-120%)



QC	Dilution	Observed	Expected (unit/ml)	Recovery O/E (%)
Meds., 27/11, N:5	-	4,594	-	-
	2	2,071	2,30	90,2
	4	1,004	1,15	87,4
	8	0,61	0,57	106,2
F.M., 130181	-	2,509	-	-
	2	1,213	1,25	96,7
	4	0,6	0,63	95,7
	8	0,399	0,31	127,2
Meds., 27/11, N:E	-	3,598	-	-
	2	1,607	1,80	89,3
	4	0,816	0,90	90,7
	8	0,512	0,45	113,8
Meds., 22/11, N:O	-	44,037	-	-
	2	20,511	22,02	93,2
	4	9,612	11,01	87,3
	8	5,039	5,50	91,5

Analytické charakteristiky

- Spiking recovery (80-120%)



	Přídavek	Observed (unit/ml)	Expected (unit/ml)	Recovery O/E (%)
F.M., 26	-	3,006		-
	2,00	4,908	5,01	98,0
	5,00	7,965	8,01	99,5
	10,00	14,042	13,01	108,0
F.M., 69	-	4,313		-
	2,00	6,363	6,31	100,8
	5,00	9,266	9,31	99,5
	10,00	15,58	14,31	108,9
F.M., 181	-	2,782		-
	2,00	4,075	4,78	85,2
	5,00	7,672	7,78	98,6
	10,00	13,442	12,78	105,2
F.M., 264	-	4,031		-
	2,00	5,373	6,03	89,1
	5,00	8,209	9,03	90,9
	10,00	14,418	14,03	102,8

Analytické charakteristiky

- Citlivost



- Limit of detection
- Assay sensitivity

Dual Wavelength					
	1	2	3	4	
A	2,732	2,712	0,07	0,072	
B	1,453	1,507	0,07	0,066	
C	0,671	0,658	0,067	0,067	
D	0,328	0,359	0,066	0,067	
E	0,223	0,234	0,063	0,071	
F	0,149	0,159	0,069	0,069	
G	0,071	0,068	0,07	0,072	
H	0,069	0,069	0,07	0,073	
			Φ	0,069	
			SD	0,003	
			Φ Ablank+3xSD	0,078	
			LOD	0,044	ng/ml



Přesnost

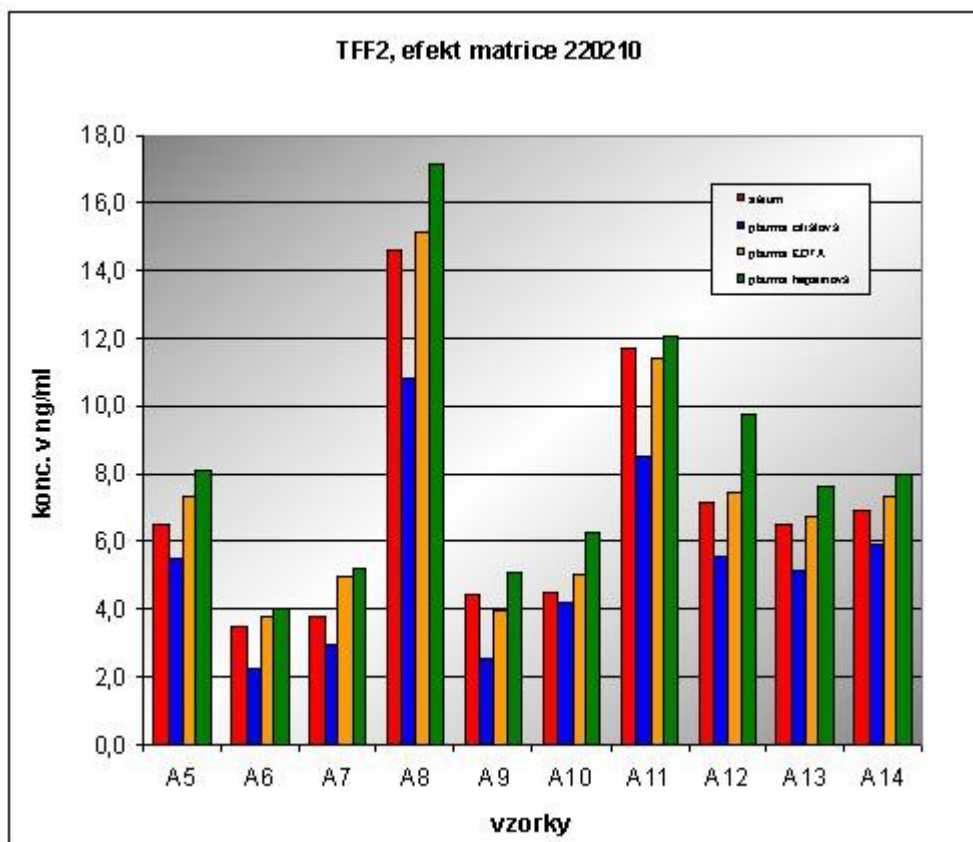
- Intra-assay (CV 15%)

- Inter-assay (CV ≤ 15%)

	115	226	44	69	DATUM
1	23,563	26,515	9,016	5,303	26.5.2010
2	22,228	26,186	8,114	4,455	27.5.2010
3	24,917	27,641	9,274	6,174	31.5.2010
4	24,188	25,655	8,314	3,983	10.6.2010
5	24,02	25,64	9,13	5,42	11.6.2010
Průměr	23,78	26,33	8,77	5,07	
SD	0,89	0,74	0,47	0,77	
CV	3,75	2,79	5,31	15,17	

Vzorek	Dual wavelen	Koncentrace (ng/ml)	Průměr	SD	CV %
FM 115	1,691	4,48	4,71	0,14	3,15
	1,816	4,868			
	1,739	4,627			
	1,746	4,649			
	1,726	4,587			
	1,78	4,755			
	1,815	4,865			
	1,816	4,868			
FM 226	1,941	5,273	5,30	0,29	5,83
	1,832	4,919			
	1,848	4,97			
	1,915	5,187			
	1,939	5,266			
	1,954	5,316			
	2,083	5,755			
	2,078	5,738			
FM 44	0,634	1,642	1,80	0,15	9,04
	0,599	1,555			
	0,662	1,712			
	0,67	1,732			
	0,765	1,969			
	0,742	1,911			
	0,768	1,976			
	0,749	1,929			
FM, 69	0,242	0,635	1,00	0,17	18,55
	0,356	0,939			
	0,36	0,95			
	0,365	0,963			
	0,372	0,981			
	0,43	1,13			
	0,459	1,203			
	0,459	1,203			

Vliv matrice vzorků

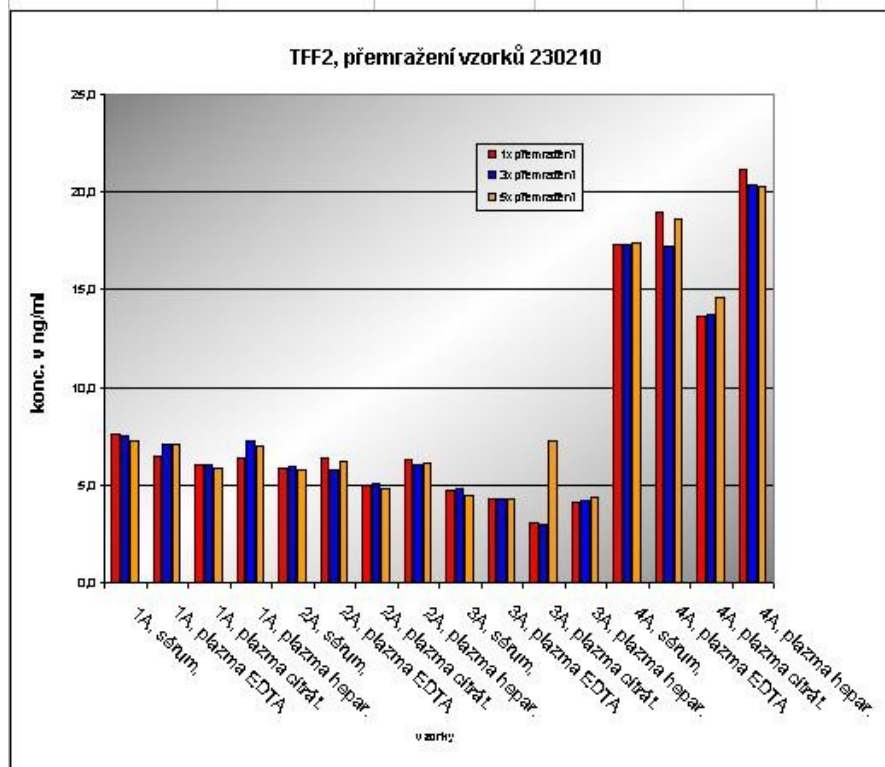


	sérum	plazma citrátová	plazma EDTA	plazma heparinová
A5	6,5	5,5	7,3	8,1
A6	3,5	2,2	3,8	4,0
A7	3,8	2,9	4,9	5,2
A8	14,6	10,8	15,2	17,1
A9	4,4	2,6	4,0	5,1
A10	4,5	4,2	5,0	6,3
A11	11,7	8,5	11,5	12,0
A12	7,1	5,6	7,5	9,8
A13	6,5	5,1	6,7	7,6
A14	7,0	5,9	7,3	8,0
Mean (ng/ml)	7,0	5,3	7,3	8,3
Coeff. of determination R ₂	-	0,96	0,98	0,95



	konc. v ng/ml		
	1x přemražení	3x přemražení	5x přemražení
1A, sérum,	7,6	7,5	7,3
1A, plazma EDTA	6,5	7,1	7,1
1A, plazma citrát.	6,0	6,0	5,9
1A, plazma hepar.	6,4	7,3	7,0
2A, sérum,	5,8	5,9	5,8
2A, plazma EDTA	6,4	5,8	6,2
2A, plazma citrát.	4,9	5,0	4,8
2A, plazma hepar.	6,3	6,1	6,1
3A, sérum,	4,8	4,8	4,5
3A, plazma EDTA	4,2	4,3	4,3
3A, plazma citrát.	3,0	3,0	7,3
3A, plazma hepar.	4,1	4,2	4,4
4A, sérum,	17,3	17,3	17,4
4A, plazma EDTA	19,0	17,2	18,6
4A, plazma citrát.	13,7	13,7	14,6
4A, plazma hepar.	21,1	20,3	20,3

Vliv přemraž./rozmraž. na koncentraci vzorků (80-120%)



Stabilitní testy soupravy



- 14D, 28D, 3M, 6M, 9M, 12M,
- Refer. , RT, 37°C, 4°C, -20°C
- $\pm 20\%$



- Děkuji za pozornost 😊