

ELISA

Cíl práce: Stanovení antiborreliových protilátek v séru člověka. Stanovení protilátek proti *Francisella tularensis* a *Coxiella burnetii* v séru hlodavců

Materiál: sonifikovaný celobuněčný antigen *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu strigo (Bbsl), pozitivní séra na Bbsl pacientů, *Francisella tularensis* a *Coxiella burnetii*, séra studentů, séra odchycených hlodavců z různých lokalit, kit na stanovení koncentrace proteinů (Biorad), albumin, kasein, mikrotitrační destička, ELISA reader, pipety, špičky, kádinky, roztoky (fyziologický, vazebný, promývací), konjugát a substrát, H₂SO₄.

Postup práce:

Stanovení koncentrace antigenu

1. Vytvořit kalibrační křivku naředěním albuminu ve fyziologickém roztoku (koncentrace: 2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml).
3. Na mikrotitrační destičce smíchat v triplicátech 5 µl vzorku/standardu + 25 µl roztoku A + 200 µl roztoku B. Změřit absorbanci při 700 nm.
3. Změřené hodnoty dosadit do kalibrační křivky (lineární) a vypočítat koncentraci proteinů.

Navazování antigenu na destičku

1. Do každé jamky mikrotitrační destičky nanést pipetou 200 µl etanolu. Nechat v klidu stát na vodorovné ploše při laboratorní teplotě 2 hodiny. Přikrýt víčkem.
2. Po uplynutí stanovené doby pipetou odsát etanol a 3x promýt 200 µl destilované vody na každou jamku. Zbytky kapaliny z jamek odstranit mírnými údery do čistého filtračního papíru.
3. Zředění Ag Bbsl a *Francisella tularensis* a *Coxiella burnetii* na koncentraci 2 µg/ml vazebným (karbonátovým) roztokem, přidáme 100 µl do každé jamky
4. Zakrýt víčkem a nechat přes noc v lednici (4°C). Opět zachovat vodorovnou polohu.
5. Druhý den odpipetovat obsah jamek a 3x promýt promývacím roztokem (200 µl/jamku). Destičku oklepat a nechat oschnout.
6. Nyní zbývá vysytit zbylou plochu na plastu, kde není navázán Ag. Do každé jamky pipetovat 100 µl vazebného roztoku s rozpuštěným kaseinem (3%).

7. Nechat stát při laboratorní teplotě 2 hodiny.

8. Odsát, 3x promýt každou jamku 200 µl promývacího roztoku, oklepat a nechat oschnout.

Nyní jsou destičky připraveny k provedení ELISA testu nebo mohou být uloženy v lednici na dobu max. 2 měsíců (zabránit přístupu vlhkosti). Nejlepší k použití jsou asi měsíc staré.

Nepřímý test ELISA

1. Naředit vyšetřovaná séra na optimální koncentraci ředicím (blokovacím) roztokem s 0,3% kaseinem (normálně se ředí 1:100, tzn. 1 + 99). Rozvrhnout si umístění vyšetřovaných sér studentů, pozitivních pacientů na LB (1 destička do dvojice) a hlodavců na různé destičky (destička do čteřice). Ředěná séra pipetovat v duplikátech v množství 100 µl/jamku.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	1	1	2	2	Blank	Blank	1	1	2	2
B	4	4	5	5	6	6	4	4	5	5	6	6
C	7	7	8	8	9	9	7	7	8	8	9	9
D	10	10	11	11	12	12	10	10	11	11	12	12
E	13	13	14	14	15	15	13	13	14	14	15	15
F	16	16	NK	NK	PK	PK	16	16	NK	NK	PK	PK
G	↑ IgM ↑						↑ IgG ↑					
H												

2. Destičku s naředěnými séry a dobře těsnícím víčkem vložit do termostatu a inkubovat při 37 °C/1 hod.

3. Po uplynutí stanovené doby destičku vyjmout z termostatu, odsát roztoky v jamkách. Promýt 3x promývacím roztokem (200 µl/jamku) a mírným poklepem odstranit zbytky kapaliny do čistého filtračního papíru.

4. Do všech použitých jamek nanést 100 µl konjugátu (polovina - Anti-IgM, polovina - Anti-IgG). Inkubovat při 37 °C/1 hod.

5. Po inkubaci v termostatu obsahy jamek odsát, 3x promýt promývacím roztokem - 200 µl na každou jamku. Oklepat.

6. Do všech použitých jamek nanést 100 µl substrátového roztoku obsahujícího OPD.

7. V této fázi už se nesmí obsahy jamek odsávat. Destičku i s víčkem nechat v temnu minimálně 10 minut při laboratorní teplotě. Během této doby se vyvíjí barva v jamkách a větší množství především ultrafialového záření tuto barevnou reakci zintenzivňuje. Po uplynutí stanovené doby reakci zastavit přidáním 1M H₂SO₄ (50 μl/jamku). Nejlépe ihned měřit absorbanci při 492 nm na ELISA-readeru.

Vyhodnocení:

Uvést výpočet koncentrace antigenů (*Bbsl*, *F. tularensis*, *C. burnetti*) na destičku a graf. Do tabulky a grafu uvést/vynést zprůměrované hodnoty absorbance všech vzorků mínus zprůměrovaná hodnota blanku (**uvést!, musí se pohybovat mezi 0,050-0,100**) a pro oba konjugáty (IgM/IgG) a zhodnotit výsledek. Tzn. jak moc si odpovídají popř. se liší hodnoty absorbance různých vzorků při použití stejného konjugátu (IgM/IgG) a hodnoty stejných vzorků při použití různých konjugátů (IgM a IgG). Které vzorky se v porovnání s ostatními jeví spíše jako pozitivní a které spíše jako negativní (Jde o hrubý odhad, na stanovení hranice positivity bychom museli mít podstatně větší počet vzorků.). Uvést hodnoty blanku, ale neodečítat je od hodnot vzorků. Typicky negativní vzorek (negativní kontrola) dosahuje hodnot kolem 0,100-0,300. Hodnota absorbance pozitivní kontroly optimálně bývá 1,000 a výše. **Při hodnocení všech vzorků je nutné brát v úvahu jak hodnotu blanku, která se v závislosti na ředění příliš nemění (pouze je vyšší při nedostatečném promytí atd.) a pozitivní kontroly.**