

## ELISA

**Cíl práce:** Stanovení antiborreliových protilátek v lidském séru

**Materiál:** sonifikovaný celobuněčný antigen *Borrelia garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s. kit na stanovení koncentrace proteinů (Biorad), albumin, kasein, mikrotitrační destička, ELISA reader, pipety, špičky, kádinky, roztoky (fyziologický, vazebný, promývací), konjugát a substrát, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**Postup práce:**

**Stanovení koncentrace antigenu**

1. Vytvořit kalibrační křivku naředěním albuminu ve fyziologickém roztoku (koncentrace: 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml).
3. Na mikrotitrační destičce smíchat v triplikátech 5  $\mu$ l vzorku/standardu + 25  $\mu$ l roztoku A + 200  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l destilované vody na každou jamku. Zbytky kapaliny z jamek odstranit mírnými údery do čistého filtračního papíru.
3. Zředění Ag na koncentraci 2  $\mu$ g/ml vazebným (karbonátovým) roztokem, přidáme 100  $\mu$ l 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  $\mu$ l/jamku). Destičku oklepat a nechat oschnout.
6. Nyní zbývá vysytit zbylou plochu na plastu, kde není navázán Ag. Do každé jamky pipetovat 100  $\mu$ l vazebného roztoku s rozpuštěným kaseinem (3%).
7. Nechat stát při laboratorní teplotě 2 hodiny.
8. Odsát, 3x promýt každou jamku 200  $\mu$ l 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).

### Nepřímý test ELISA

1. Naředit vyšetřovaná séra na optimální koncentraci ředícím (blokovacím) roztokem (1:100 tzn. 1 + 99). Rozvrhnout si umístění vyšetřovaných sér na destičce. 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 nařazenými 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 (na 15ml substrátového roztoku 7,5µl OPD (Ortho phenilen diamin) a 7,5µl peroxidu vodíku (2000x ředěno).

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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50 µl/jamku) (1,36 ml konc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> plus 38,64ml H<sub>2</sub>O). Nejlépe ihned měřit absorbanci při 492 nm na ELISA-readeru.

### **Vyhodnocení:**

Do tabulky a grafu uvést/vynést zprůměrované hodnoty absorbance všech vzorků minus zprůměrovaná hodnota blanku (**blank by se měl pohybovat mezi 0,050-0,100**) a pro oba konjugáty (IgM/IgG) a zhodnotit výsledek vzhledem k pozitivní kontrole. 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).. Typicky negativní vzorek (negativní kontrola) dosahuje hodnot kolem 0,100-0,200. Hodnota absorbance pozitivní kontroly optimálně bývá 1000 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.**