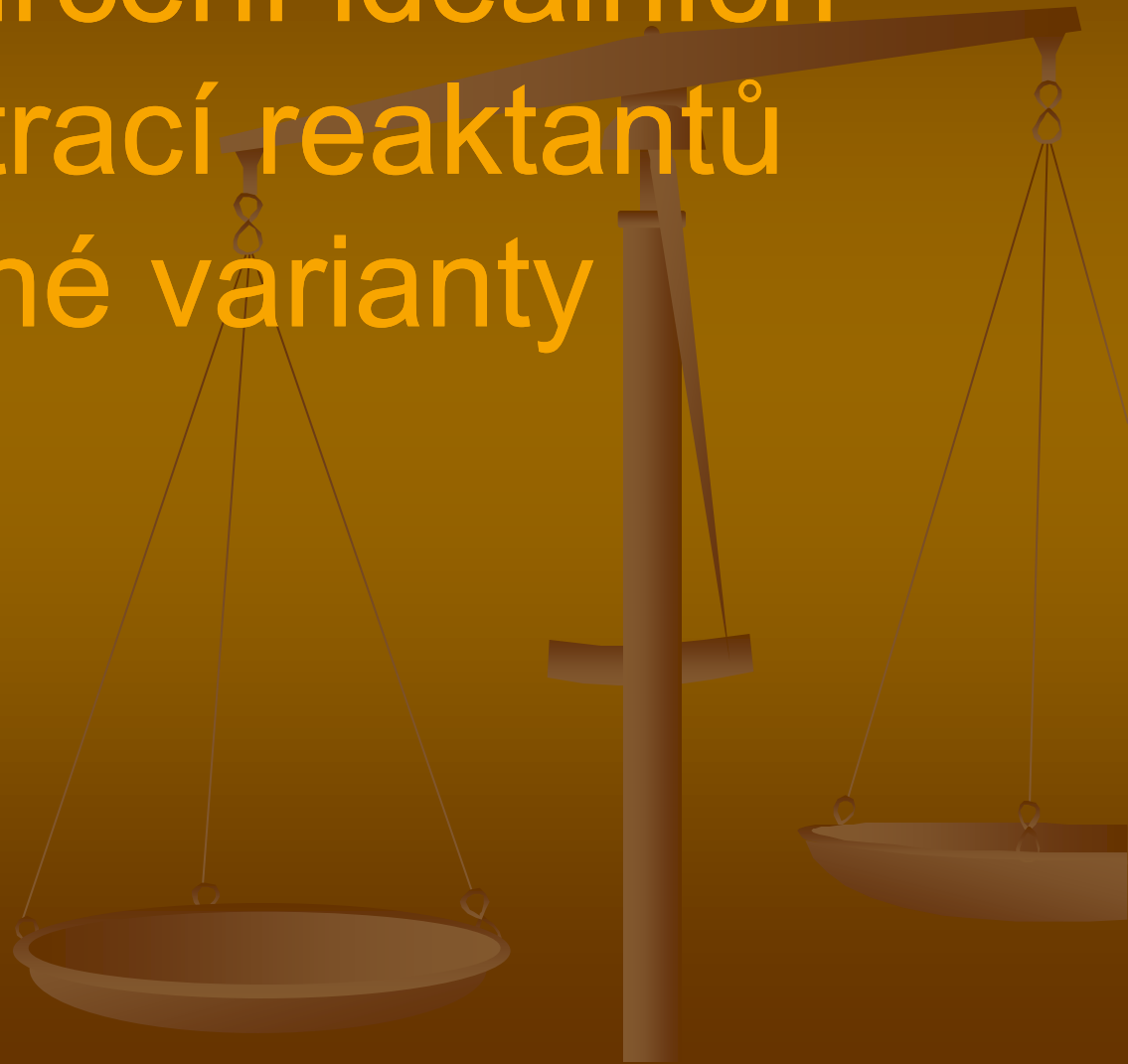


# ELISA, určení ideálních koncentrací reaktantů -různé varianty



# Přímý test ELISA

Slouží pro zjištění max. množství ag, který se může navázat do jamek destičky, pro zjištění ideálního zředění konjugátu

REAKCE: Ag + AbE

AbE ↓	Ag →	5 μg →	2,5 μg →	1,25 μg →	0,675 μg →	0,337 μg →	0,169 μg →	0,084 μg →	0,042 μg →	0,021 μg →	0,010 μg →	0,005 μg	bez Ag
1/400	A	1,720	1,720	1,720	1,709	1,686	1,600	1,450	1,250	0,941	0,595	0,311	0,100
1/800	B	1,671	1,658	1,635	1,568	1,459	1,256	1,040	0,829	0,600	0,369	0,179	0,050
1/1600	C	1,500	1,396	1,287	1,144	0,964	0,764	0,568	0,410	0,275	0,185	0,097	0,025
1/3200	D	1,095	0,946	0,797	0,649	0,503	0,385	0,297	0,225	0,154	0,108	0,062	0,013
1/6400	E	0,626	0,472	0,365	0,293	0,24	0,205	0,169	0,132	0,101	0,067	0,041	0,007
1/12800	F	0,338	0,251	0,194	0,158	0,136	0,116	0,100	0,083	0,068	0,046	0,025	0,004
1/25600	G	0,167	0,128	0,105	0,090	0,080	0,071	0,063	0,051	0,042	0,03	0,014	0,002
blank	H	0,066	0,054	0,043	0,036	0,032	0,027	0,023	0,020	0,017	0,011	0,006	0,001
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

## Příprava Ag:

Jako Ag může vystupovat sérum a proti němu reaguje sekundární protilátka s enzymem (konjugát) nebo jakýkoliv antigen a proti němu protilátky s navázaným enzymem

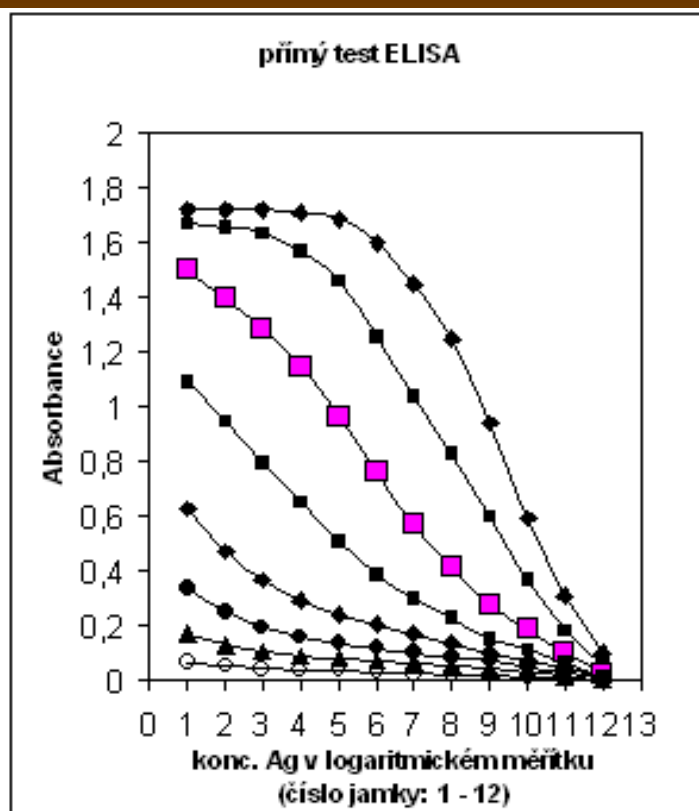
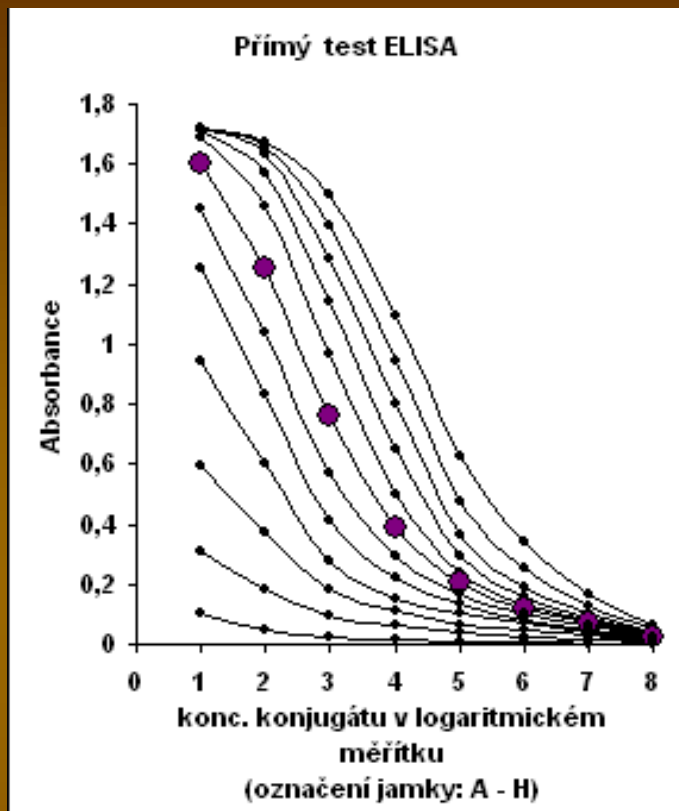
1. 50 μg karbonátového pufru do každé jamky předem
2. naředit Ag v karbonátovém pufru do výsledné koncentrace 10 μg/ml
3. dát 50 μl ředěného Ag do sloupce 1 (8x promíchat)
4. přenos 50 μl do sloupce 2, atd až do sloupce 11
12. sloupec neobsahuje Ag – blank (B11).  
nechat přes noc a vymýt

## Příprava AbE:

1. konjugát naředit v poměru 1/200 v blokovacím roztoku (1 ml blokovacího pufru + 5  $\mu$ l konjugátu)
2. do každé jamky nanést 50  $\mu$ l blokovacího roztoku
3. do řady A nanést 50  $\mu$ l ředěného konjugátu 1/200 (výsledná koncentrace je 1/400 v řadě A)
4. přenášet 50  $\mu$ l z řady A  $\rightarrow$  B  $\rightarrow$  C atd.
5. nezapomenout na BI (BI2 = bez AbE), rozhodnout kde

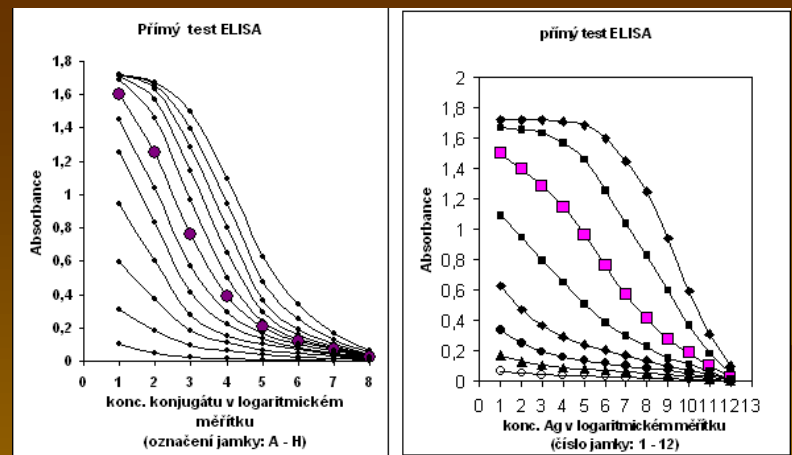
AbE ↓	Ag →	5 $\mu$ g →	2,5 $\mu$ g →	1,25 $\mu$ g →	0,675 $\mu$ g →	0,337 $\mu$ g →	0,169 $\mu$ g →	0,084 $\mu$ g →	0,042 $\mu$ g →	0,021 $\mu$ g →	0,010 $\mu$ g →	0,005 $\mu$ g	bez Ag
1/400	A	1,720	1,720	1,720	1,709	1,686	1,600	1,450	1,250	0,941	0,595	0,311	0,100
1/800	B	1,671	1,658	1,635	1,568	1,459	1,256	1,040	0,829	0,600	0,369	0,179	0,050
1/1600	C	1,500	1,396	1,287	1,144	0,964	0,764	0,568	0,410	0,275	0,185	0,097	0,025
1/3200	D	1,095	0,946	0,797	0,649	0,503	0,385	0,297	0,225	0,154	0,108	0,062	0,013
1/6400	E	0,626	0,472	0,365	0,293	0,24	0,205	0,169	0,132	0,101	0,067	0,041	0,007
1/12800	F	0,338	0,251	0,194	0,158	0,136	0,116	0,100	0,083	0,068	0,046	0,025	0,004
1/25600	G	0,167	0,128	0,105	0,090	0,080	0,071	0,063	0,051	0,042	0,03	0,014	0,002
blank	H	0,066	0,054	0,043	0,036	0,032	0,027	0,023	0,020	0,017	0,011	0,006	0,001
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

# Výsledek:



- 2 varianty grafu
- A) závislost konc. konj. na absorbanci
  - B) závislost konc. Ag na absorbanci

Pozn: Osa x, kde ve skutečnosti nevynášíme koncentraci, ale číslo jamky, je vlastně z hlediska koncentrace v logaritmické škále a hodnoty 1-12 jsou vlastně úměrné přirozenému logaritmu koncentrace (používáme tuto stupnici, protože jde o biologický materiál, kde se průběh podobá růstové křivce; jde o široký rozptyl hodnot, proto bylo použito logaritmické měřítko. Za těchto podmínek by byl výpočet neznámé koncentrace Ag nebo Ab obtížný, proto se tento model využívá jen na zjištění ideální křivky).

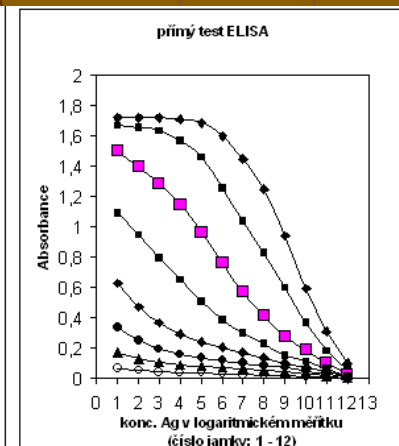
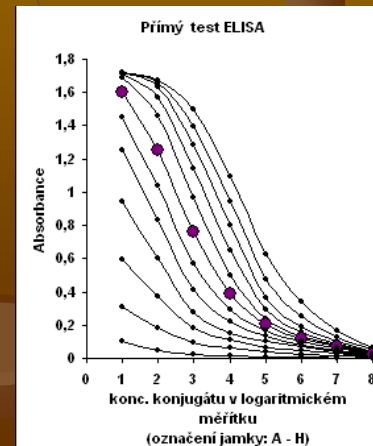


## Vyhodnocení:

- Křivky reprezentují titraci rozdílného ředění konjugátu proti každému ředění Ag. Můžeme zjistit:
- Maximální množství Ag, které se může navázat na stěnu jamek a ještě vydává signál (vazebná kapacita plastu – kolísá od proteinu k proteinu).
- Konečný bod titrace konjugátu v určitém ředění ukazuje stejná hodnota při nejnižší koncentraci Ag.
- Ve sloupci bez Ag by barva znamenala nespecifické adsorpce konjugátu (při nižších ředěních vznikají problémy nespecifických vazeb, hodnoty skoro jako blank) nebo problém pozadí destiček (třeba u vyšších konc. Znamená to zabarvení blanku).
- Při nízkých koncentracích Ag dochází ke ztrátě citlivosti (schopnost reagovat s Ab).
- Logaritmické křivka se nevyhodnocuje, jen se vybírá ideální křivka či body z těch výsledných

## Vyžaduje se:

- musí se nalézt podmínky testu tak, aby negativní kontroly měly absorbanci 0,05 – 0,150 a maximální pozitivní hodnoty nad 1,0.
- vždy použít blank
- vysoké hodnoty (absorbance kolem 1,5)
- hodnoty bez nespecifických vazeb konjugátu, ideální je v rozmezí 1 – 1,5 OD
- odečte se optimální ředění konjugátu
- optimální ředění Ag dává A v rozmezí 1 – 1,5 OD
- Takto můžeme zjistit optimální ředění Ag a Ab pro následný nepřímý test ELISA.



# BOX titrace - přímý test ELISA pro další složky (Ab, AbsE)

Sérum ( $\mu\text{g/ml}$ ) ↓	Abs. →	1		2		3		4		5		6	
		P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
100	A	1,709	0,311	1,672	0,311	1,578	0,100	1,387	0,200	1,173	0,154	0,941	0,080
50	B	1,568	0,179	1,427	0,179	1,181	0,050	0,946	0,100	0,747	0,050	0,573	0,050
25	C	1,144	0,097	0,964	0,097	0,764	0,025	0,568	0,025	0,410	0,025	0,275	0,025
12,50	D	0,649	0,062	0,503	0,062	0,385	0,013	0,297	0,013	0,225	0,013	0,154	0,013
6,250	E	0,293	0,041	0,240	0,041	0,205	0,007	0,169	0,007	0,132	0,007	0,101	0,007
3,125	F	0,156	0,025	0,136	0,025	0,116	0,004	0,100	0,004	0,083	0,004	0,068	0,004
1,562	G	0,090	0,014	0,080	0,014	0,071	0,002	0,063	0,002	0,051	0,002	0,042	0,002
0	H	0,036	0,006	0,032	0,006	0,027	0,001	0,023	0,001	0,020	0,001	0,017	0,001
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Ab vystupuje jako sérum, proti séru AbSE (konjugát),

**Sérum:** buď

**P** = pozitivní sérum (=primární protilátka), nebo

**N** = negativní sérum (=bez primární protilátky)

Každá jamka musí obsahovat 100  $\mu\text{l}$ , tj 50  $\mu\text{l}$  protilátky a 50  $\mu\text{l}$  konjugátu.

Aplikovat 50  $\mu\text{l}$  ředícího roztoku a pak

1. do řady A se aplikuje sérum (P,N) v koncentraci 200  $\mu\text{g/ml}$

2. do řady B se aplikuje sérum (P,N) v koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ , atd, do 3.

poslední řady H se nedává sérum (BI)

Sérum-kontrola musí obsahovat poměrně málo Ab (Ag), aby jejich

hodnota byla uprostřed kalibrační křivky. V praxi to bývá okolo 10 – 20

$\mu\text{g/ml}$

Sérum ( $\mu\text{g/ml}$ ) ↓	Abs →	1		2		3		4		5		6	
		P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
100	A	1,709	0,311	1,672	0,311	1,578	0,100	1,387	0,200	1,173	0,154	0,941	0,080
50	B	1,568	0,179	1,427	0,179	1,181	0,050	0,946	0,100	0,747	0,050	0,573	0,050
25	C	1,144	0,097	0,964	0,097	0,764	0,025	0,568	0,025	0,410	0,025	0,275	0,025
12,50	D	0,649	0,062	0,503	0,062	0,385	0,013	0,297	0,013	0,225	0,013	0,154	0,013
6,250	E	0,293	0,041	0,240	0,041	0,205	0,007	0,169	0,007	0,132	0,007	0,101	0,007
3,125	F	0,158	0,025	0,136	0,025	0,116	0,004	0,100	0,004	0,083	0,004	0,068	0,004
1,562	G	0,090	0,014	0,080	0,014	0,071	0,002	0,063	0,002	0,051	0,002	0,042	0,002
0	H	0,036	0,006	0,032	0,006	0,027	0,001	0,023	0,001	0,020	0,001	0,017	0,001
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Konjugát: co dva sloupce 100%, 50%, 25% atd

## Konjugát (AbSE):

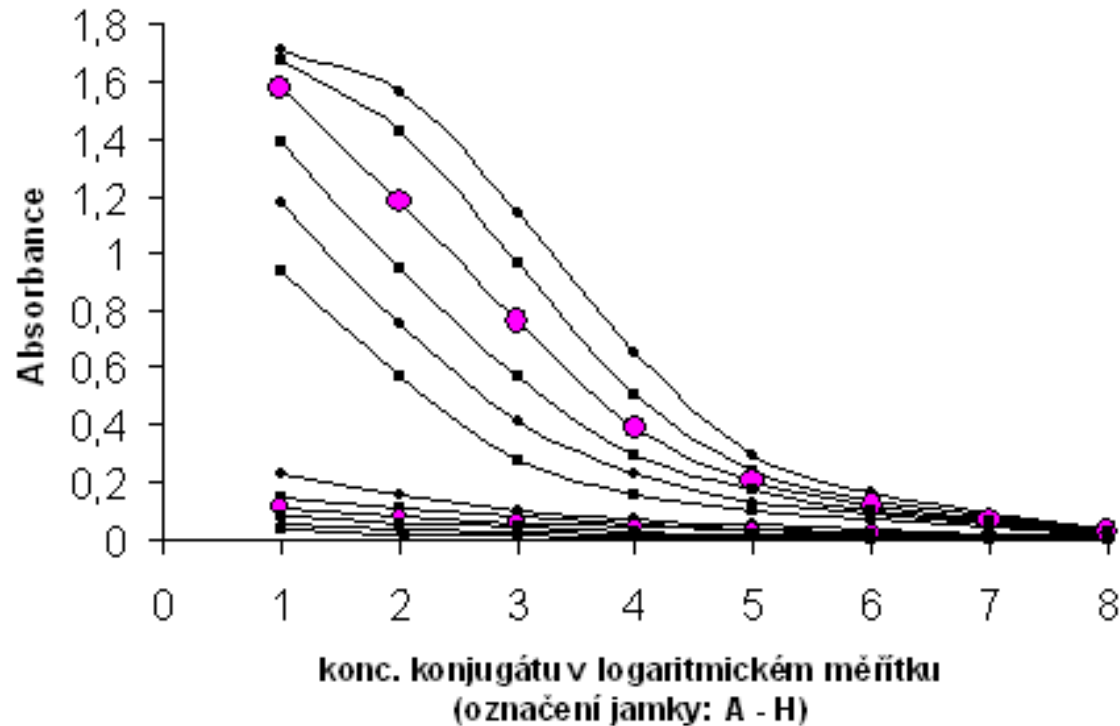
1. do sloupců 1 se aplikuje konjugát o určité koncentraci
2. do sloupců 2 se aplikuje konjugát o poloviční koncentraci
3. do sloupců 3 se aplikuje konjugát o čtvrtinové koncentraci (optimální koncentrace konjugátu se pohybuje v rozmezí 0,1 – 10  $\mu\text{g/ml}$ ) atd.



# „BOX titrace“ přímý test ELISA

Sérum ( $\mu\text{g/ml}$ ) ↓	Abs →	1		2		3		4		5		6	
		P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
100	A	1,709	0,311	1,672	0,311	1,578	0,100	1,387	0,200	1,173	0,154	0,941	0,080
50	B	1,568	0,179	1,427	0,179	1,181	0,050	0,946	0,100	0,747	0,050	0,573	0,050
25	C	1,144	0,097	0,964	0,097	0,764	0,025	0,568	0,025	0,410	0,025	0,275	0,025
12,50	D	0,649	0,062	0,503	0,062	0,385	0,013	0,297	0,013	0,225	0,013	0,154	0,013
6,250	E	0,293	0,041	0,240	0,041	0,205	0,007	0,169	0,007	0,132	0,007	0,101	0,007
3,125	F	0,158	0,025	0,136	0,025	0,116	0,004	0,100	0,004	0,083	0,004	0,068	0,004
1,562	G	0,090	0,014	0,080	0,014	0,071	0,002	0,063	0,002	0,051	0,002	0,042	0,002
0	H	0,036	0,006	0,032	0,006	0,027	0,001	0,023	0,001	0,020	0,001	0,017	0,001
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

## BOX titrace



**Co se vyžaduje:**

**musí se nalézt podmínky testu tak, aby negativní kontroly měly absorbanci 0,05 – 0,150 a maximální pozitivní hodnoty nad 1,0.**

**Dodržování podmínek: vždy použít blank**

**bez Ag, s Abs**

**bez Abs s Ag**

# Nepřímý test

Reakce: Ag + Ab + AbsE

Ab ↓	Abs →	1		2		3		4		5		6	
		1:100		1:500		1:1000		1:2000		1:5000		nic	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
10x	A												
50x	B												
100x	C												
150x	D												
200x	E												
250x	F												
300x	G												x1
350x	H											x2	x3
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Například:

Ab ↓	Abs →	1		2		3		4		5		6	
		1:100		1:500		1:1000		1:2000		1:5000		nic	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
10x	A	1,545	0,158	1,469	0,136	1,348	0,108	1,149	0,091	0,830	0,068	0,603	0,035
50x	B	1,412	0,119	1,271	0,096	1,093	0,081	0,832	0,068	0,603	0,050	0,437	0,025
100x	C	1,067	0,085	0,883	0,700	0,707	0,057	0,534	0,046	0,410	0,032	0,275	0,018
150x	D	0,608	0,062	0,470	0,050	0,385	0,039	0,297	0,030	0,225	0,021	0,154	0,012
200x	E	0,273	0,041	0,240	0,031	0,205	0,027	0,169	0,018	0,132	0,013	0,101	0,007
250x	F	0,158	0,025	0,136	0,019	0,116	0,013	0,100	0,010	0,085	0,006	0,068	0,003
300x	G	0,090	0,014	0,080	0,011	0,071	0,007	0,063	0,005	0,051	0,002	0,042	0,001
350x	H	0,036	0,006	0,032	0,005	0,027	0,003	0,023	0,002	0,020	0,001	0,017	0,001
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

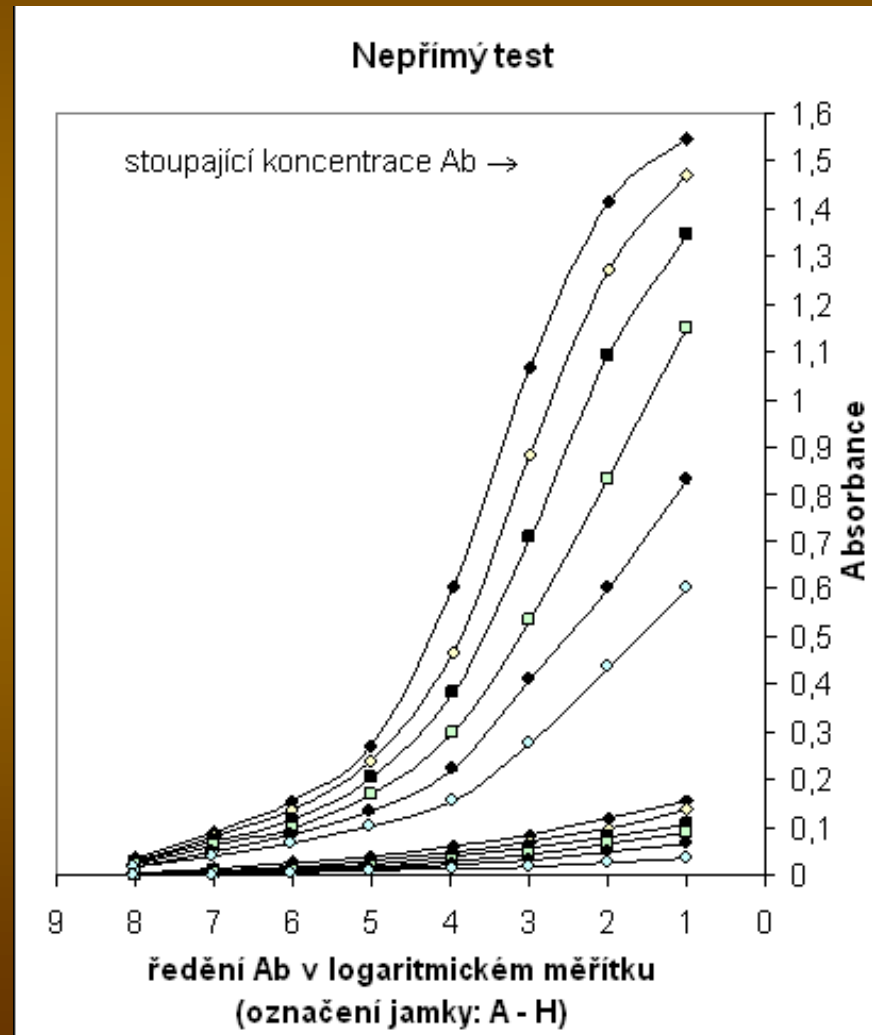
Naneseme na destičku Ag o známé konstantní koncentraci (1-2 µg/ml): + s Ag,  
- bez Ag

Ředění Ab (séra): 10x, 50x, 100x, 150x, 200x, 250x, atd. do jamek A, B, C, D

Ředění AbsE: 1:100, 1:500, 1:1000, 1:1500, 1:2000, 1:5000, bez Abs

Blank x : 1.) bez Abs, 2.) bez Ab (séra), 3.) bez Ag

**Výsledek:** pokud křivka stoupá, Ab vykazuje dostatečnou specifitu a afinitu



# Nepřímý test ELISA

**Kompetitivní inhibice mezi antigeny.** Reakce: Ag1 + Ag2 + Ab + AbsE

Nanést Ag1 na celou destičku (př. *B. afzelii*) v optimální koncentraci navázat, pak 2 kroky

50 µl kompetitoru Ag2 (= inhibitor, např. *B. garinii*) o různé koncentraci: začínáme např. 1 µg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml .... v řádcích A, B, C, ...

nanést 50 µl Ab (ve správném ředění dle předchozího pokusu) do všech jamek kromě sloupce 12, kde bude blank, 1 hod kultivace, promytí

100 µl Abs (sekundární protilátka proti Ab) v optimálním ředění (ve správném ředění dle předchozího pokusu) též všude kromě blanku

(pg = pikogram = 10<sup>-12</sup>g)

Ag <sub>2</sub> ↓		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

## Hodnocení:

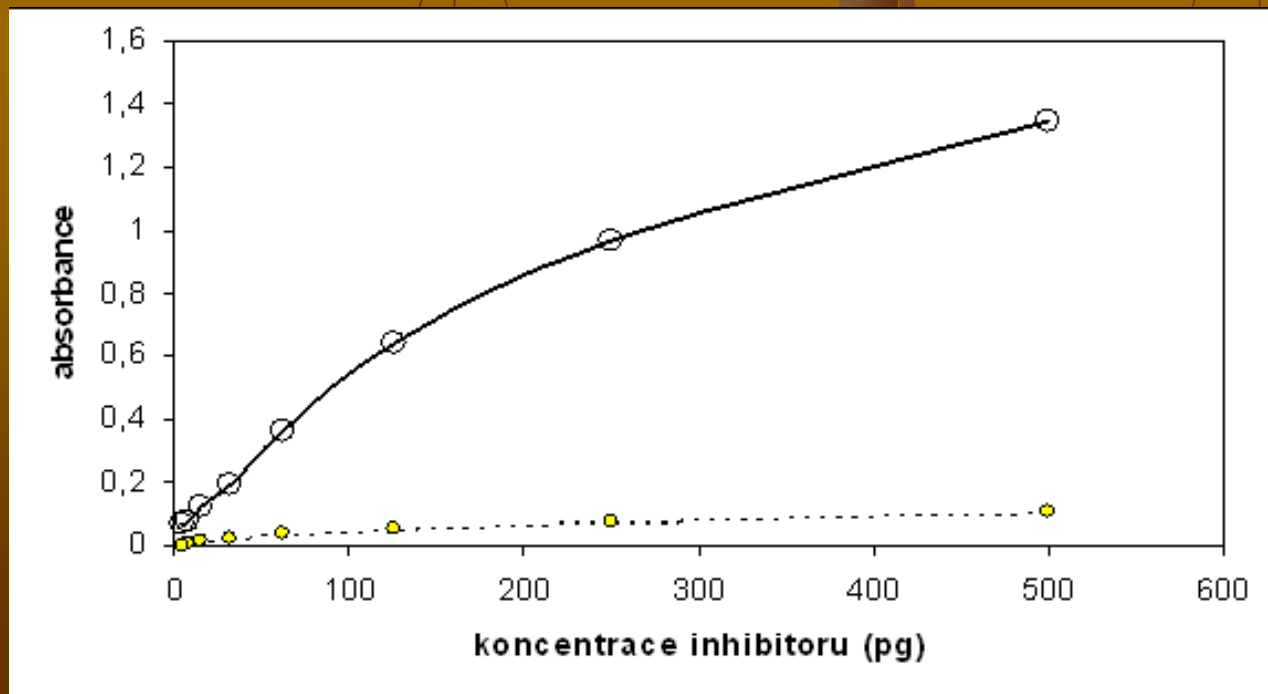
OD nebo B) %inhibice

Čím vyšší % inhibice (nižší OD), tím silnější druhý Ag a naopak, čím vyšší absorbance, tím silnější a specifitější Ag1 na destičce už navázaný.

100% se rovná určité absorbanci pozitivní kontroly, tj u pacient nakažený *B. afzelii* a pacient nakažený *B. garinii*, vykazující Ab proti těmto Ag.

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):



# Stanovení ideální koncentrace Ag nepřímou metodou ELISA

- Pozn.: v případě stanovení Ab proti borreliím a použití borrh. Ag na destičky můžeme testovat jeho optimální koncentraci pomocí nepřímé metody ELISA. Po zjištění optimální koncentrace Ab a AbsE „box titrací“ nanese na destičku s různou koncentrací Ag tyto optimální hodnoty

## Reakce

- Ag + Ab + AbsE

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	C <sub>Ag</sub>
1													10
2													μg/ml
3													5
4													μg/ml
5													2,5
6													μg/ml
7													1,25
8													μg/ml
nebo	10 μg		5 μg		2,5 μg		1,25 μg		0,6 μg		0,3 μg		