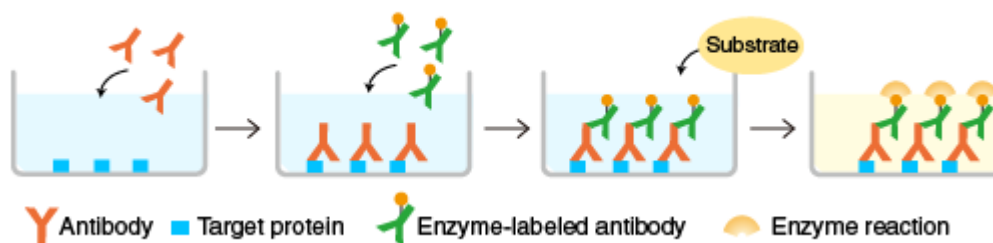


Detekce antigenu imunochemickou metodou ELISA - NEW

Teoretický úvod

Souprava je určena pro didaktické účely. Umožňuje stanovení antigenů a protilátek v neznámých vzorcích a přibližné koncentrace agens ve vzorcích. Tento test umožňuje semikvantitativní analýzu – tedy určení přibližného obsahu antigenu (v případě manuálního vyhodnocení) nebo jeho kvantitativní stanovení (použitím fotometrického stanovení absorbance). Zároveň slouží jako demonstrace imunoanalytického stanovení látky na principu přímé kompetice analytu s detekční afinitní molekulou. V návodu jsou popsány jednotlivé kroky stanovení, doplněné praktickou ukázkou testu

Obr.1 ELISA-nepřímá



<https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/elisa.html>

Princip testu

ELISA-Immuno Explorer je imunoanalytický test na pevné fázi na principu přímé kompetice. Na povrch jamek mikrotitrační destičky je již navázaný antigen, který v této soupravě kompetuje („soupeří“) s volnou protilátkou ve vzorku o vazebné místo. Nadbytek protilátky je při následném promytí jamek pomocí promývacího roztoku odstraněn. Množství zachycené protilátky je přímo úměrné koncentraci neznámého agens ve vzorku. Aby bylo možné určit množství zachyceného agens, je tento spojen (konjugován) s enzymem HRP peroxidázou. Tento enzym reakcí s chromogenním substrátem proměňuje barvu roztoku substrátu z čiré na modrou, a to v intenzitě závislé na množství přítomného komplexu HRP peroxidázy v jamce.

Promývání: Mezi jednotlivými kroky testu je potřeba odstranit z jamek nenavázané komplexy. Pokud by nedošlo k promytí jamek, na konci testu by došlo k zabarvení jamek i bez přítomnosti hledaných látek.

Substrátový roztok: Roztok na bázi barviva tetramethylbenzidin (TMB) s obsahem peroxidu vodíku. Díky enzymu (v tomto testu peroxidáza obsažená v konjugátu) dojde v substrátu ke katalytické reakci a postupně změní zbarvení roztoku do modra. Pokud v jamkách není navázaný peroxidázový konjugát, nedojde k aktivaci substrátu a jamky zůstanou bez zabarvení.

Kalibrace: Souprava obsahuje 1 standard – student sám připraví kalibrační řadu (viz obr.2 dle dvojkového ředění), dle které stanoví přibližný obsahu cizorodého agens ve vzorcích. Rozsah citlivosti je 1 až 1000 ng/ml.

Reagencie:

ELISA stripy (12 jamek) potažené polymerem STRIPS

POUŽITÍ: Výsledek lze hodnotit bez speciálního laboratorního vybavení (reader/fotometr).

Sada reagensií obsahuje:

testovaný vzorek – neznámý (0,75 ml)

pozitivní kontrola (antigen, 0,50 ml),

negativní kontrola (PBS 0,50 ml)

primární protilátku 1,5 ml (obsahuje anti –rabbit polyklonální protilátku)

sekundární protilátku s HRP (horseradish peroxidasa) enzymem (1,5 ml)

konjugát TMB chromogenní substrát (tetramethylbenzidin), r.t.u., (1,5 ml)

promývací roztok, cca 60 ml

Pasteurovy pipety 1 ml se stupnicí členěnou po 0,25 ml 10 ks, PBS (fosfátový pufr) r.t.u.

pozn.: * r.t.u. – „ready to use“ (připraveno k použití), složka je v pracovní koncentraci a nevyžaduje další ředění

Pomůcky:

destilovaná voda pro ředění promývacího roztoku

odměrný válec pro přípravu promývacího roztoku

mikropipety,

skleněné pipety

mikrozkumavky

pipetovací špičky

kádinka nebo vanička s vodou

odpadní nádoba

zkumavky eppendorf

gáza/filtrační papír/buničitá vata na osušení stripů po promývání

hodinky/stopky na měření inkubačních časů,

popisovač

Pracovní postup:

1. Příprava pufrů

1.1. Vyndejte složky soupravy na stůl a nechte je přizpůsobit laboratorní teplotě (cca 10 minut). Stripy s jamkami vyjměte ze sáčku až po vytemperování na laboratorní teplotu, aby nedošlo k orosení jamek. Všechny složky důkladně promíchejte několikanásobným otočením lahviček. Pokud provádíte test na barevném stole, je vhodné podložit si stripy bílým papírem pro lepší přehled při kapání do jamek a posouzení barvy v jamkách.

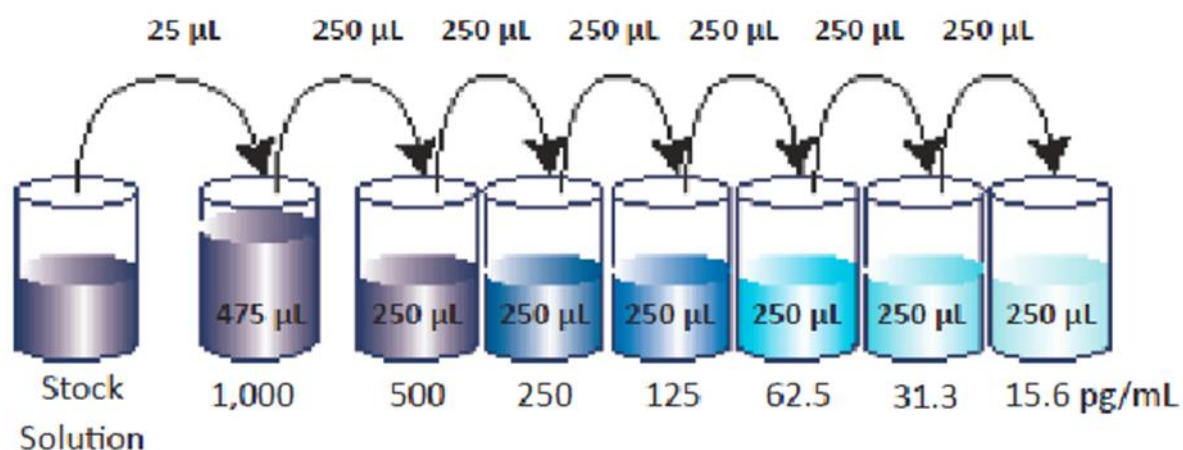
1.2. Připravte pracovní koncentraci promývacího roztoku jeho naředěním 10x ve vhodném objemu vody pomocí odměrného válce (60 ml promývacího roztoku + 540 ml H₂O). Použitý postup přípravy promývacího roztoku zaznamenejte do protokolu. Promývací roztok přelijte do vhodné kádinky/vaničky, aby se dal při promývání snadno nasávat kapátkem. Nespotřebovaný promývací roztok naředěný na pracovní koncentraci lze skladovat maximálně 2 týdny při teplotě +2 až +10 °C. V případě, že se naředěný promývací roztok skladováním zakalí nebo v něm vznikne sediment, dál ho nepoužívejte a zlikvidujte ho.

2. Detekce antigenu- postup (1 dvojstrip):

2.1. Příprava kalibrační řady 1. strip

Do protokolu si připravte rozpis vzorků. Jako negativní kontrolu použijte PBS. Kalibrační standardy a vzorky je vhodné přidat v tripletech – tři jamky. Tři jamky se používají pro minimalizování laboratorní chyby. Doporučený rozpis ředění pro kalibrační řadu je uveden ve schématu aplikace vzorků níže (Obr.2)

Obr. 2 Dvojkové ředění pro kalibraci



2.2. Příprava 2.stripu pro detekci antigenu

2.2.1. Nakapejte 2 kapky (50 µl) standardů a vzorků do jamek podle rozpisu. (viz. Obr 3):

3 jamky s pozitivní kontrolou(+), 3 s negativní kontrolou(-) a dále 3 jamky neznámého studentského vzorku. (student A a B)

Po každém vzorku pipetu důkladně propláchněte vodou popřípadě vyměňte za čistou. Pozor!!! Pipetou se nedotýkejte stěn nebo dna jamek, aby nedošlo k porušení navázané vrstvy! Stopujte 5 minut.

2.2.2. Obsah jamek vylijte na papírové ubrousky a opatrně poklepejte otočeným stripem dnem vzhůru. Promytí: Všechny jamky naplňte (ne po okraj) Wash puřem a znovu vylijte. Toto promytí zopakujte jeřtě 1x.

POZOR!!!

Vyvarujte se přetékání roztoku ven z jamek. Poté opět vyklepněte promývací roztok z jamek. Celkem provedte promytí 2x a na konci vyklepněte promývací roztok, aby jamky zůstaly před dalším krokem prázdné. Kapky na povrchu stripu můžete otřít poklepáním o kousek gázy nebo filtračního papíru.

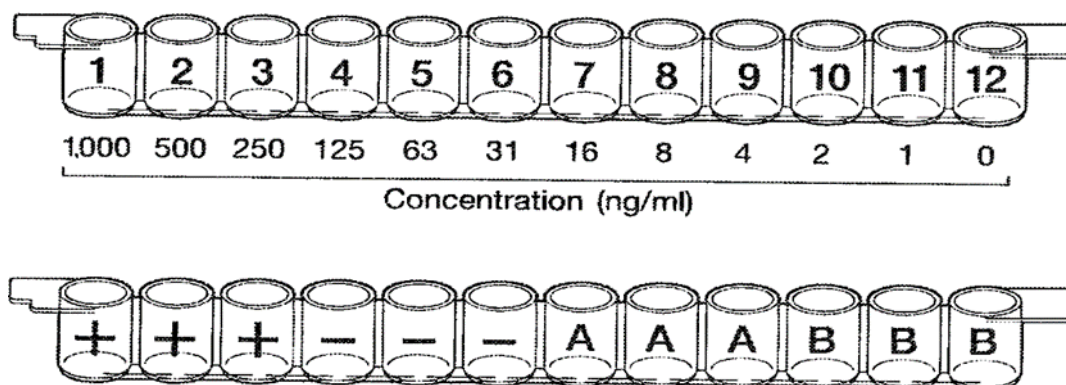
2.2.3. Nakapejte 50 μ l primární protilátky do všech jamek. Stopuj 5 minut, vyprázdni jamky a znovu proved' promytí 2x viz. bod 2.2.2.

2.2.4. Přenes (50 μ l) sekundární protilátky do všech jamek. Stopuj 5 minut, vyprázdni všechny jamky a znovu opakuj promytí (bod 2.2.2.) 3x.

2.2.5. Nakapej 100 μ l chromogensubstrátového roztoku TMB (SUB) po 3 kapkách (0,1 ml TMB/jamka). Stopujte čas od přidání substrátu do první jamky. Inkubujte 5 minut (\pm 1 min.) při laboratorní teplotě. V jamkách s nízkou koncentrací by mělo se objevit slabě modré zbarvení.

2.2.6. Zkontrolujte výsledné zbarvení jamek. V jamkách s kalibračními standardy byste měli pozorovat sniřování intenzity zbarvení v závislosti na koncentraci antigenu. Ve vzorku standardu 1000 ng/ml (nejvyšší koncentrace antigenu) by mělo dojít k maximálnímu modrému zbarvení. Podle schématu přiřaďte jednotlivým standardům odpovídající hodnotu koncentrace (intenzivně zbarvené až nezbarvené). Srovnáním intenzity zbarvení standardů a vzorků přiřaďte taktěž hodnocení jednotlivým vzorkům.

Obr.3 Schéma rozpisu umístění standardů a vzorků



Hodnocení testu:

A/ Vzorky - zakresli a zapiš pozitivitu nebo negativitu svého vzorku

B/ Odečet hodnot - odečti přibližně koncentrace u vzorků z kalibračního stripu. Výsledek zapiš.

Kontrolní otázky:

A/ Po každém kroku dané metody se musí promývat jamky proč?

B/ Proč je nutné provádět měření vzorků v tripletu?

C/ Jakou má funkci enzym v této metodě?