



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



Realizováno v rámci dotačního programu „Operační program výzkum, vývoj a vzdělávání“, program Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy, Výzvy č. 02_18_056 ESF výzva pro vysoké školy II

název projektu: ESF pro VŠ II na UK

reg. č.: CZ.02.2.69/0.0/0.0/18_056/0013322

studijní podpora pro volitelný kurz: CVOL0276

Laboratorní metody imunologie – příprava, zavedení, hodnocení

metoda :

Fotometrie (ELISA)

Ústav imunologie a klinické biochemie (ÚIKB), 3.LF UK

M. Hudec, P. Kučera, K. Riegerová, M. Riegerová, A. Říhová

A. Část teoretická

A.1 Fotometrie

Fotometrie = metoda využívající kvantitativní hodnocení změny intenzity záření po průchodu analytickým prostředím

- Při průchodu záření o určité vlnové délce měřeným roztokem dochází k absorpci záření
 - Poměr zářivého toku, který prošel absorpčním prostředím s a bez stanovené látky vyjadřuje **Transmitanci**:

$$\tau = \Phi / \Phi_0$$

τ = transmittance

Φ = zářivý tok, který prošel prostředím se stanovenou látkou

Φ_0 = zářivý tok, který prošel prostředím bez stanovené látky

- **Absorbanci** lze vypočítat:

$$A = -\log \tau \quad \text{dosazením transmittance}$$

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad \text{vyjádřením Lambert-Beer-Bouguerova zákona}$$

A = absorbance

ε = absorpční koeficient pro danou vlnovou délku

c = koncentrace roztoku

l = délka optické dráhy

A.1 Fotometrie

Vertikální fotometrie – využití při metodě ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

- Světelný paprsek neprochází kyvetou horizontálně, ale vertikálně.
 - Možné použití mikrotitračních destiček (více vzorků)
- Výhody:
 - potřeba menšího množství roztoku
 - Pro stejnou koncentraci je konstantní součin absorbance a délky optické dráhy roztokem
 - U vertikální fotometrie se stanovuje **Absorbance** a **Optická denzita**:

$$OD = A/l$$

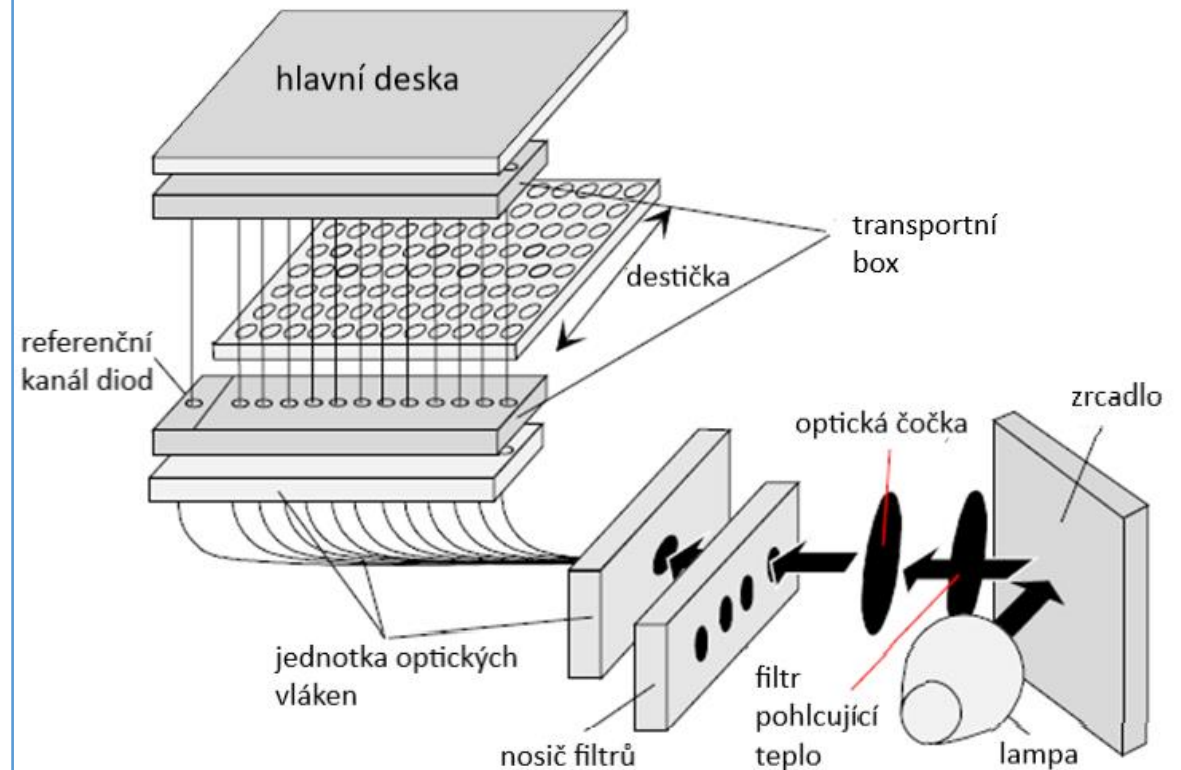
OD = optická denzita (hustota)

A = absorbance

l = délka optické dráhy

A.1 Fotometrie - Reader (čtečka)

- Reader (čtečka) je spektrofotometr upravený na odečítání absorbance v reakčních jamkách
- filtry jsou nastavené s volitelnou vlnovou délkou optimální pro určitý ELISA systém (obvykle mezi 405 až 570 nm)
- v závislosti na typu použitého konjugátu a substrátovo - chromogenním roztoku
- dochází k interakci elektromagnetického záření s analyzovaným roztokem, kdy část záření je absorbována a část projde roztokem a je detekována
- množství světla propuštěného, pohlceného nebo odraženého závisí na **vlnové délce záření a koncentraci zkoumané látky**



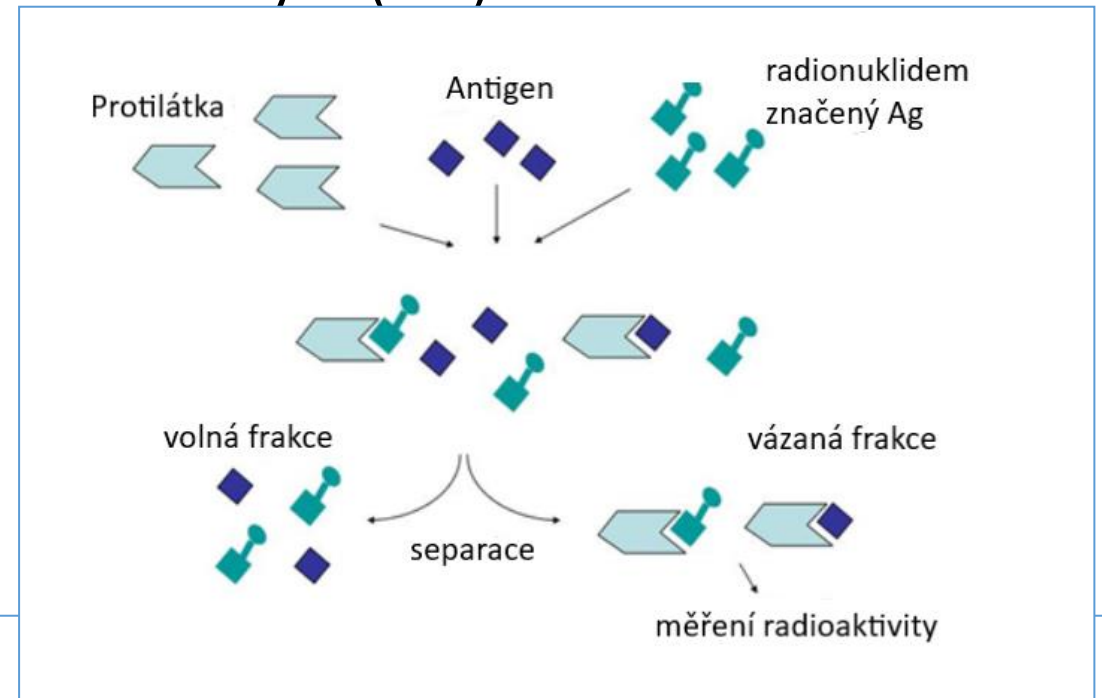
Převzato z: Technical Manual for Tecan SUNRISE

A.2 ELISA - Pojem

- Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
- antigen/protilátka našeho zájmu je adsorbována na plastovém povrchu (sorbent)
- antigen je rozpoznáván specifickou protilátkou (immuno)
- protilátka je rozpoznána druhou protilátkou (immuno) konjugovanou enzymem (Enzyme-Linked)
- substrát reaguje s enzymem za vzniku produktu, povětšinou barevného

A.2 ELISA – Trocha historie

- předchůdce enzymové imunoanalýzy- radioimunoanalýza (RIA) byla poprvé popsána v roce 1960
 - Antigen nebo protilátka značená radionuklidem
 - První metoda schopná detekovat množství hormonu v krvi (in vitro)
- 1971 se poprvé objevuje zmínka o enzymové imunoanalýze (EIA)
 - Radioaktivní značení nahrazené enzymem



A.3 Enzymová imunoanalýza (EIA)

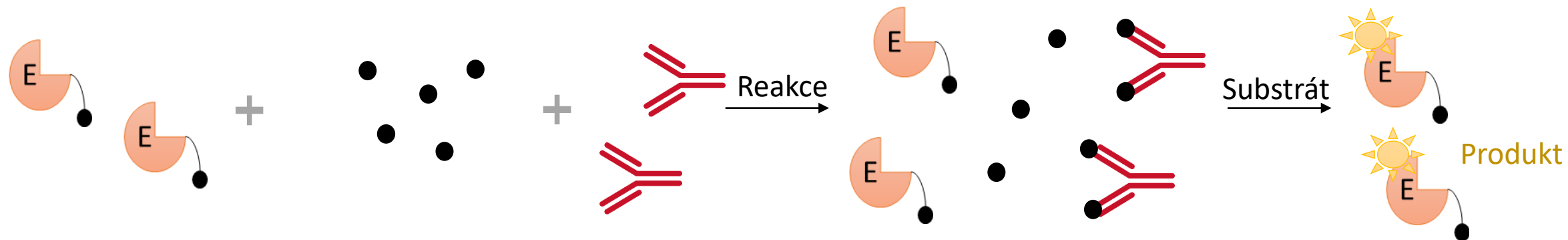
- skupina imunoanalytických metod, které ve fázi kvantifikace nebo detekce používají **enzymovou reakci**
- enzym je kovalentně vázán na některý z imunoreaktantů- antigen, haptenu, protilátka, druhá protilátka
- heterogenní versus homogenní
- rozšíření heterogenní EIA do laboratoří díky systému EIA na **pevné fázi**→ oddělení značeného imunoreaktantu v imunokomplexu od volného v roztoku (nenavázaného)

A.3 Enzymová imunoanalýza (EIA)

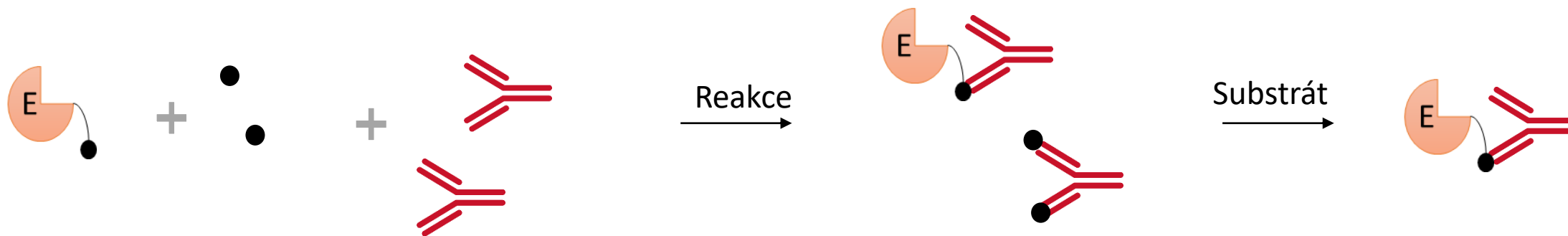
- Který reaktant se má stanovit? (Ag nebo Ab)
- Který reaktant je značený?
- Podle charakteru reakce: kompetice nebo nekompetice?
- Je třeba oddělit volný označený reaktant od vázaného v imunokomplexu? (Heterogenní x homogenní)

A.3.1 Homogenní EIA

Homogenní EIA s vysokou koncentrací stanovovaného Ag



Homogenní EIA s nízkou koncentrací stanovovaného Ag

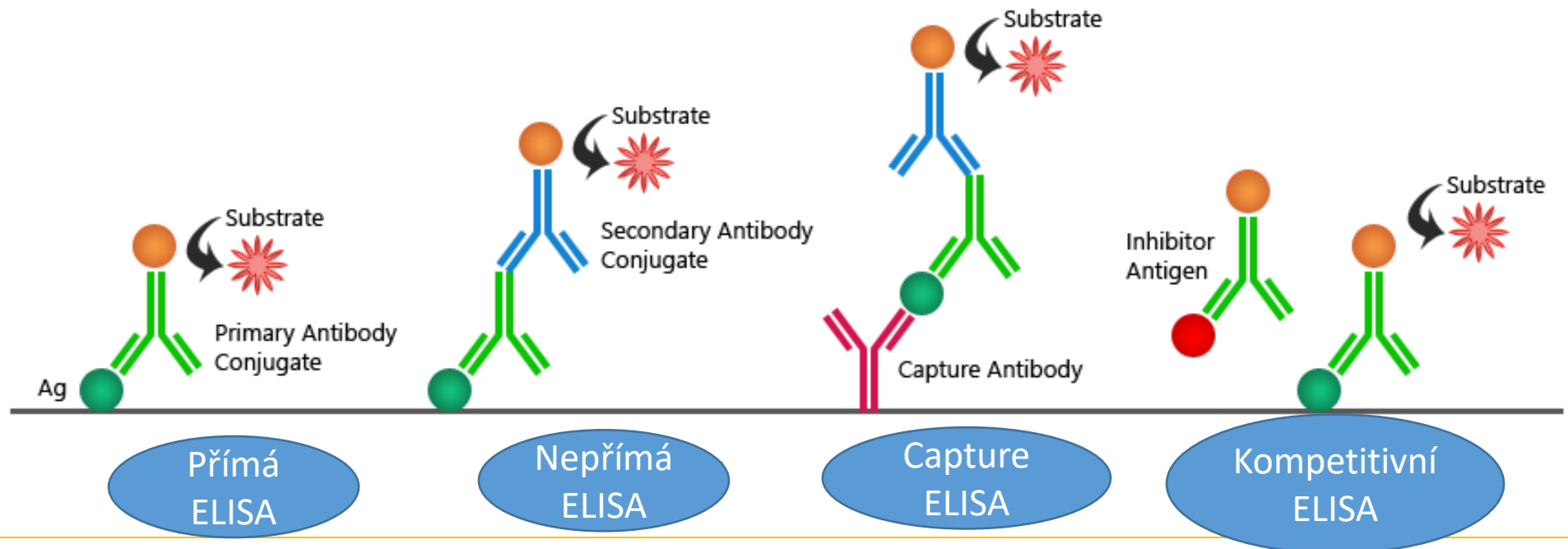


A.3.2 Heterogenní EIA na pevné fázi = ELISA

- jeden z imunoreaktantů (Ag, Ab, hapten) je navázán na pevný nosič (stěny zkumavek, stěny jamek mikrotitrační destičky apod.)
- hodnota koncentrace analytu se určuje z kalibrační křivky sestavené s pomocí standardů
- obrovská citlivost umožňuje stanovit analyt v množství 10^{-9} až 10^{-12} gramu
- nejčastější nosič je stěna jamky mikrotitračních destiček (polystyren) – větší soubor vzorků, miniaturizace analýzy, automatizace
- velmi vhodné pro screening stovek vzorků denně, málo vhodné pro ojedinělé případy (vždy potřeba kalibrace)

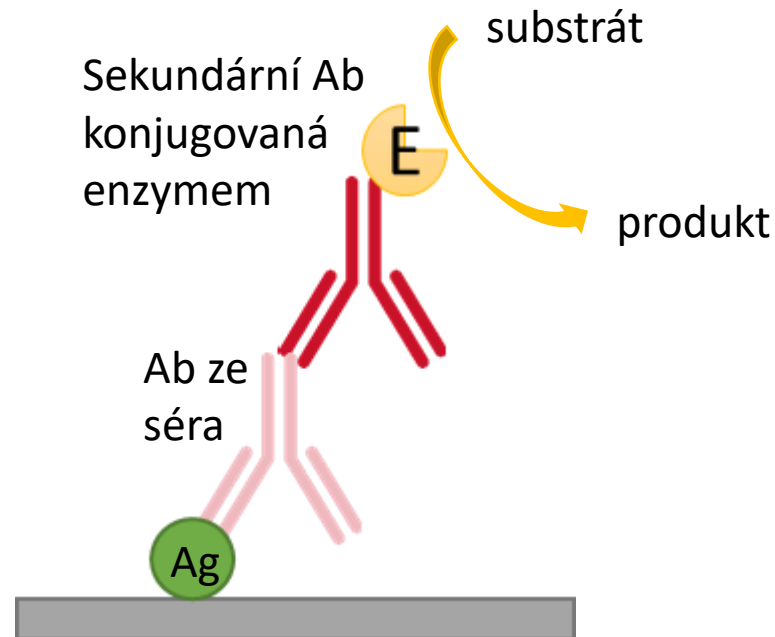
A.3.2.1 ELISA - Přímá x nepřímá stanovení

- Přímá
 - Kvalitativní stanovení Ag
 - **Ag-Ab***
- Nepřímá
 - Stanovení protilátek v séru
 - **Ag-Ab-Ab***



A.3.2.2 Nekompetitivní ELISA - stanovení protilátky

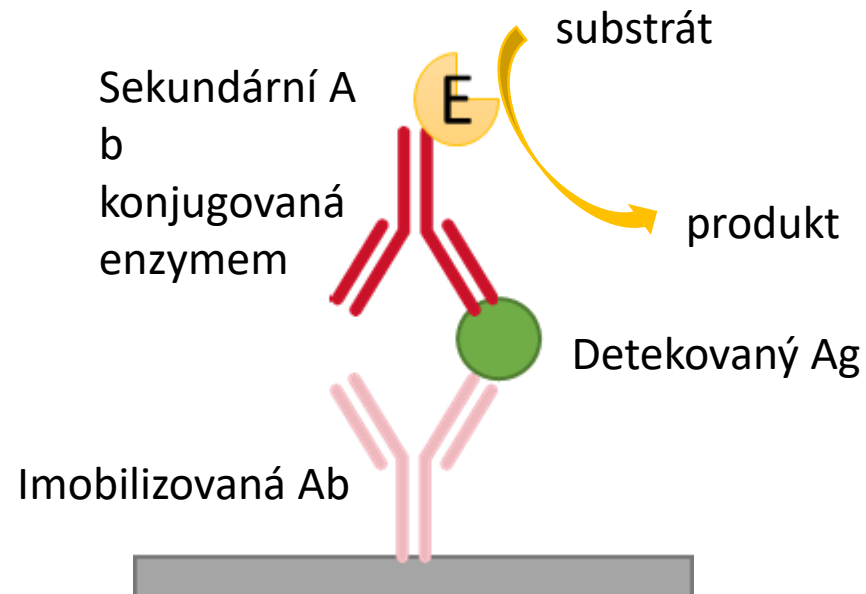
- nepřímá metoda: imobilizovaný Ag reaguje s Ab ve vzorku
- \parallel -Ag-**Ab**-Ab₂*
- imobilizovaný Ag reaguje s Ab ze séra, po navázání a vymytí je přidána druhá protilátka konjugovaná enzymem → po přidání substrátu reakce a vznik produktu, který je detekován



Stanovení protilátek po očkování, antiinfekční protilátky, detekce autoprotilátek, detekce specifických IgE

A.3.2.3 Nekompetitivní ELISA - stanovení Ag

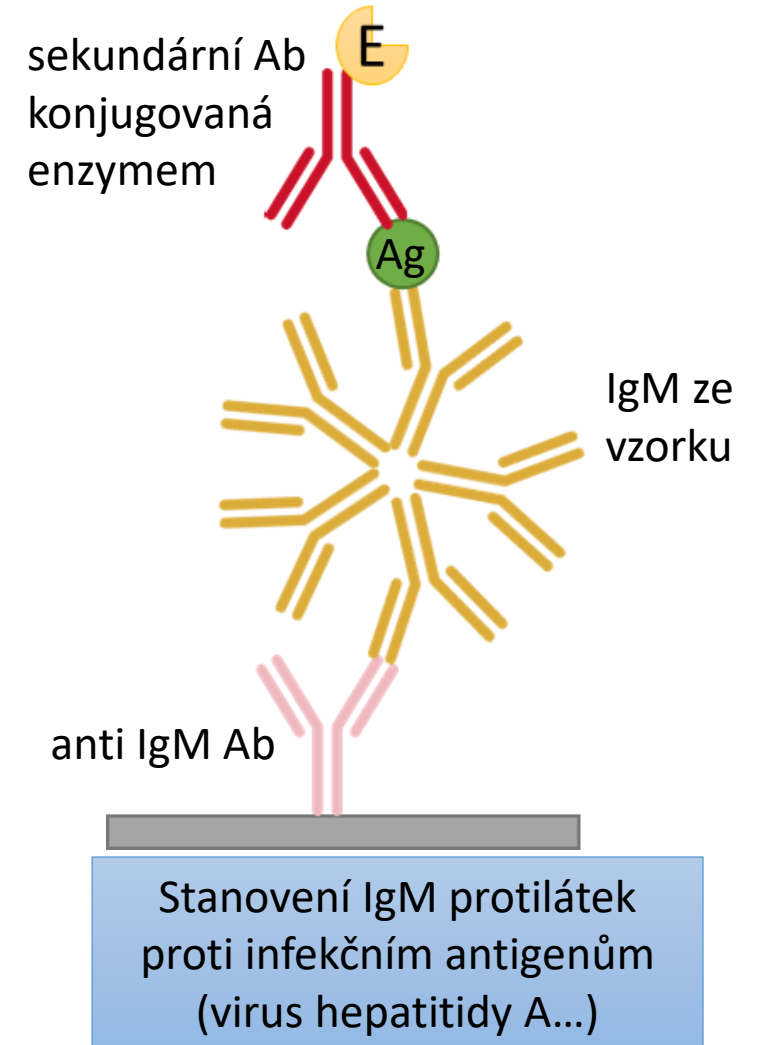
- Ab specifická pro antigen imobilizována na pevné fázi
- Ag ve vzorku reaguje s navázanou protilátkou a zbylé proteiny jsou vymyty
- druhá protilátka konjugovaná enzymem reaguje s jiným epitopem Ag
- reakce substrátu a enzymu, koncentrace produktu je přímo úměrná c Ag
- \parallel -Ab-Ag-Ab*



Stanovení cytokinů, hormonů, stanovení toxinů (*Clostridium difficile* toxin A+ B ze stolice)

A.3.2.4 ELISA pro zachycení IgM (IgM-capture)

- mikrotitrační destička je potažena anti IgM Ab
- anti IgM Ab slouží k zachycení IgM ze vzorku
- po přidání antigenu dojde k navázání na IgM
- sekundární protilátka konjugovaná enzymem přidaná do reakční směsi se váže na antigen navázaný na IgM
- po přidání substrátu pro enzym zaznameneáme barevnou reakci
- ||-Ab-IgM-Ag-Ab*E

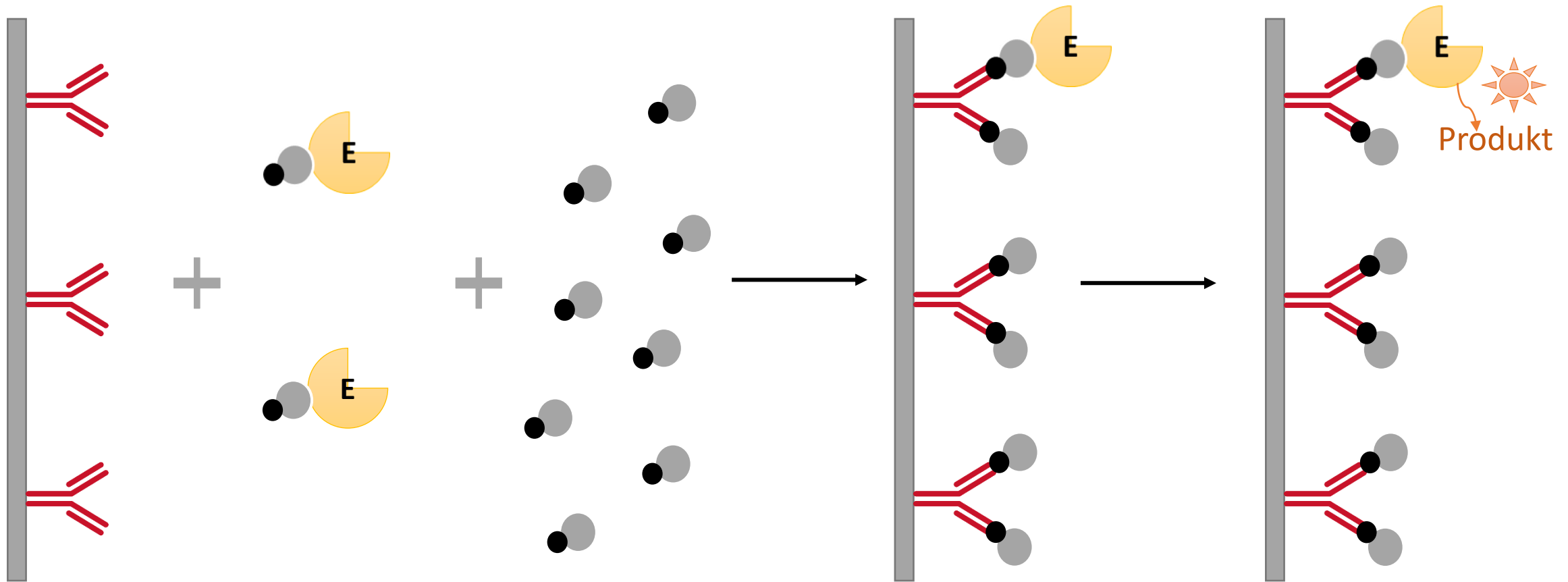


A.3.2.5. Kompetitivní ELISA- stanovení Ag

- soutěž (kompetice) Ag značeného enzymem s Ag ve stanovovaném vzorku o omezený počet vazebných míst ukotvených Ab
- ukotvená protilátka reaguje zároveň s Ag značeným a Ag detekovaným ze vzorku
- čím více Ag vzorek obsahuje, tím menší enzymatická aktivita bude naměřena
- Ag má malou molekulovou hmotnost a má omezený počet vazebných epitopů

stanovení hormonů:
tyroxin, trijódtyroxin,
prolaktin, inzulin atd,
léků: teofylin, dioxin
aj., a proteinů: AFP
alfa fetoprotein, CEA
cefalosporin A

A.3.2.5 Kompetitivní ELISA- stanovení Ag



A.3.3. Enzymy používané v EIA - ELISA

Stabilní a snadno dostupný

- Křenová peroxidáza:

- Substrátem je peroxid vodíku, ze kterého je účinkem enzymu uvolňován kyslík a ve spřažené reakci oxiduje chromogen (př. o- fenylendiamin) na jinak zbarvený produkt

vysoká katalytická aktivita

- Alkalická fosfatáza

- Substrát bezbarvý p-nitrofenylfosfát, ze kterého je odštěpován žlutý p-nitrofenol

snadno detekovatelný produkt

- β -D-galaktosidáza

Velikost molekuly nesmí ovlivňovat imunochemické interakce

enzym musí umožnit kovalentní vazbu s analytem

A.3.4 Přehled vlastností chromogenních a substrátových systémů

Enzym	Chromogen či substrát	Barva produktu	Rozpustnost produktu	Aplikace v imunometodě
Peroxidasa	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin dihydrochlorid (TMB)	modrá	rozpustný	ELISA
	o- fenylendiamin (OPD)	oranžová	rozpustný	ELISA
	diamonná sůl kyseliny 3-etylbenzo-tiazolin-6-sulfonové (ABTS)	zelená	rozpustný	ELISA
	3,3'- diaminobenzidin (DAB)	hnědá	nerozpustný	Blotting histochemie
	3-amino-9- etylkarbazol (AEC)	červená	nerozpustný	Blotting histochemie
	4-chlor-1-naftol (4C1N)	modrá	nerozpustný	Blotting
Alkalická fosfatáza	p-nitrofenylfosfát (pNPP)	žlutá	rozpustný	ELISA
	5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát/ nitro-bluetetrazolium (BCIP/NBT)	fialová	nerozpustný	Blotting histochemie
	naftolfodfát/Fast Red	červená	nerozpustný	Blotting histochemie

A.3.5 Použití EIA - ELISA v imunologii

- Detekce specifických protilátek (nepřímý průkaz infekce)
- Detekce autoprotilátek
- Diagnostika imunodeficiencí protilátek
- Detekce specifických protilátek proti očkovacím antigenům
- Stanovení cytokinů
- Stanovení hormonů

A.4. Opakování – ověření znalostí

Nekompetitivní

Nekompetitivní

Nekompetitivní

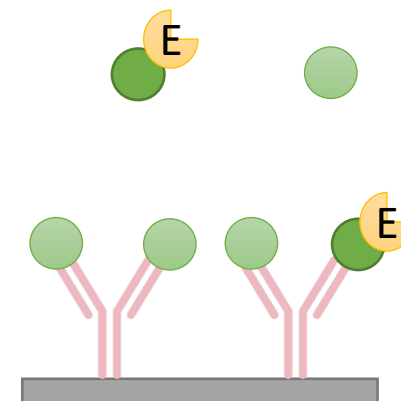
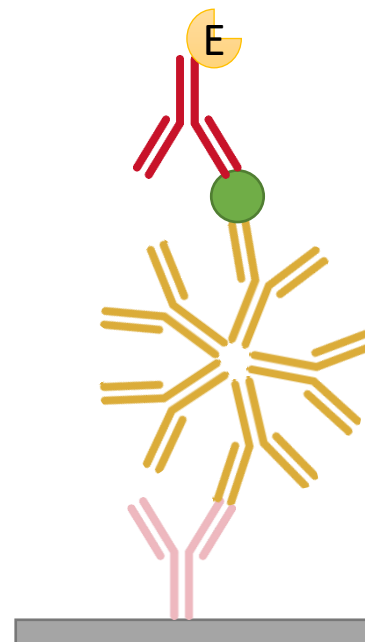
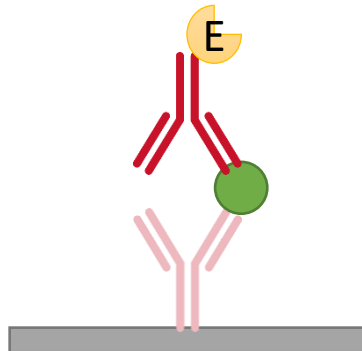
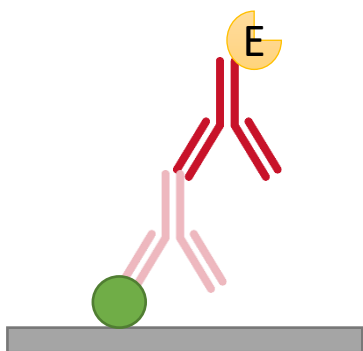
Kompetitivní

Stanovení Ab

Stanovení Ag

Zachycení IgM

Stanovení Ag



B. Část praktická – Stanovení IgG CMV

B.1 Princip testu – informace o soupravě

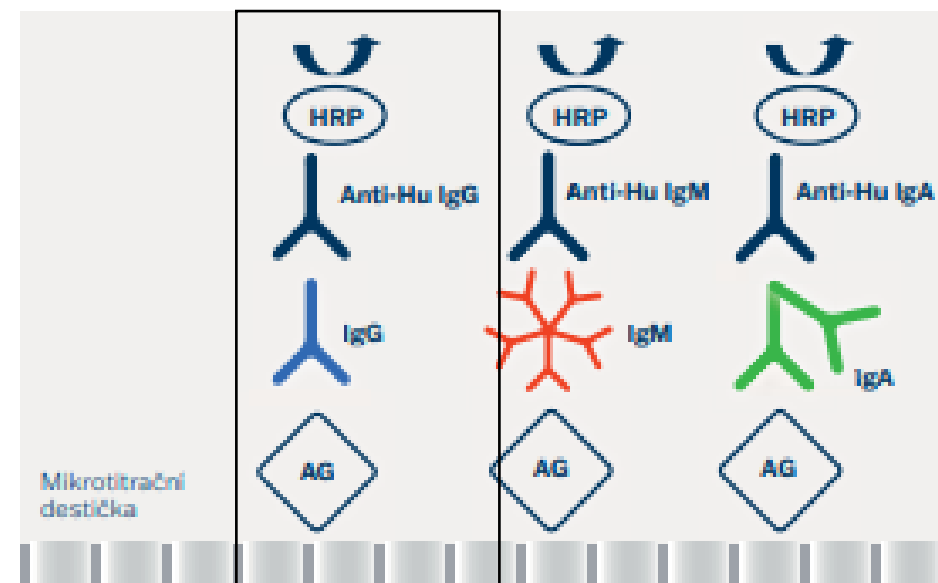
- Purifikovaný a inaktivovaný antigen z kmene AD 169 je navázán v jamkách mikrotitrační destičky.
- V případě přítomnosti specifických protilátek dochází k jejich vazbě na antigen, v následujících krocích k označení Konjugátem a k detekci barevnou reakcí se substrátem (TMB-Complete).
- Součástí soupravy je Aviditní roztok, který umožňuje kvantitativní stanovení pevnosti vazby komplexu protilátka-antigen; na základě tohoto údaje je možné přesněji určit fázi onemocnění.
- Souprava umožňuje 96 testů včetně kontrol v dělené mikrotitrační destičce s barevně odlišenými stripami a odlamovacími jamkami
- Celková doba vyšetření je asi 1,5 hod.
- Vysoká citlivost a specifita testu.
- Souprava obsahuje kalibrátory (5, 20, 80, 160 U/ml).

<https://www.testlinecd.cz/eia-cmv-igg>

ELISA

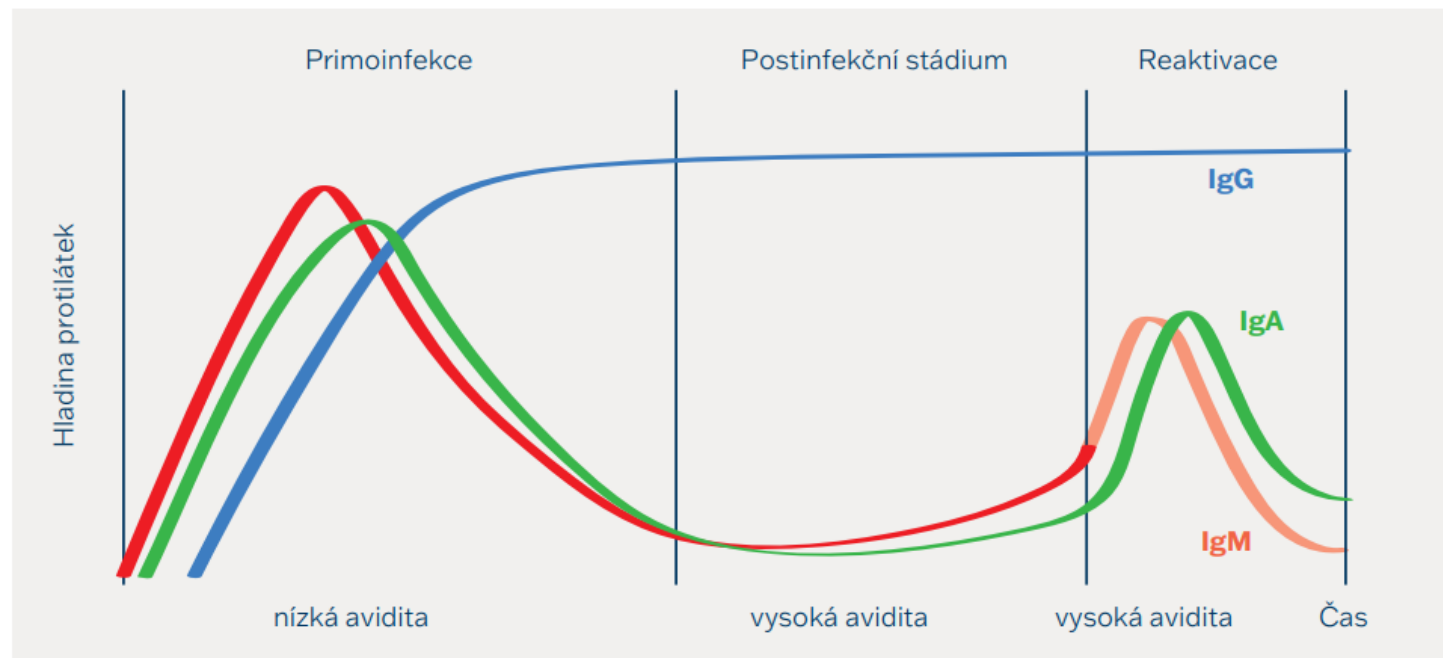
Princip testu

Soupravy jsou založeny na sendvičovém typu ELISA metody.





Protilátková odpověď



B.2. Schéma pracovního postupu

charakterizace, příprava vzorků

- fixou označte destičku – Vaše jméno
- Ředění sér:
- označte zkumavky na ředění sér (č. 1, č. 2)
- zkumavky se séry promíchejte na vortexu
- šetrně promíchejte ředící roztok (diluent)
- pipetujte: 1ml ředícího roztoku +10 μ l séra, promíchejte na vortexu
- rozložení vzorků na destičce (stripu) :

	1	2
A	0 – blank, PONECHAT PRÁZDNOU JAMKU	0
B	Negativní kontrola = kalibrátor 1, nanést 100 μ l	Negativní kontrola
C	Cut-OFF – kalibrátor 2, nanést 100 μ l	Cut-OF
D	Cut-OFF – kalibrátor 2, nanést 100 μ l	Cut-OF
E	Pozitivní kontrola – kalibrátor 3, nanést 100 μ l	Pozitivní kontrola
F	naředěné sérum č. 1, nanést 100 μ l	sérum č. 1
G	naředěné sérum č. 2, nanést 100 μ l	sérum č. 2
H		

1. inkubace

destičku přikryjte víčkem, inkubujte 30min/37°C

promývání

obsah jamek vyklepněte a 5x promyjte promývacím roztokem, položte na buničinu (dno stripu nahoře) a poté ještě 2x promyjte, znovu položte na buničinu

konjugát

do každé jamky pipetujte 100μl konjugátu (anti Hu-IgG + peroxidáza) – VYNECHTE BLANK = A (1,2)

2. inkubace

destičku přikryjte víčkem, inkubujte 30min/37°C

promývání

obsah jamek vyklepněte a 5x promyjte promývacím roztokem, položte na buničinu (dno stripu nahoře) a poté ještě 2x promyjte, znovu položte na buničinu

substrát

do každé jamky pipetujte 100μl substrátu (TMB + peroxid vodíku)

3. inkubace

destičku přikryjte alobalem, inkubujte 30min/37°C

zastavovací roztok

přidejte do každé jamky 100μl zastavovacího roztoku (0,5M H₂SO₄)

měření a analýza

měření + analýza vzorků na fotometru

B.3. Fotometrické měření, analýza

Kim32

Soubory Akce Nástroje Definice Okna Nápověda

CMV IgG 050522.ptt

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk 0.000	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004
B	Neg 0.035	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004
C	Cut 0.357	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004
D	Cut 0.354	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004
E	Pos 1.035	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004
F	Qv 3.210	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004
G	Qv 3.304	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004
H	Qv -0.003	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004	Qv -0.004

EIA_CMV_IgG 15:08 May 05,2022 VALID CAPS NUM

Zdroj: ÚIKB

C. Použitá literatura a internetové zdroje

- <https://www.biosciencenotes.com/radioimmunoassay-ria/>
- Technical manual for Tecan SUNRISE
- Adedokun, Kamoru. (2018). Re: What the differences between direct and in direct ELISA? Převzato z: https://www.researchgate.net/post/what_the_differences_between_direct_and_in_direct_ELISA/5bcca2de979fdc61c719fb04/citation/download
- Bartůňková, Jiřina. (2005) Vyšetřovací metody v imunologii.
- <https://www.testlinecd.cz/eia-cmv-igg>

