

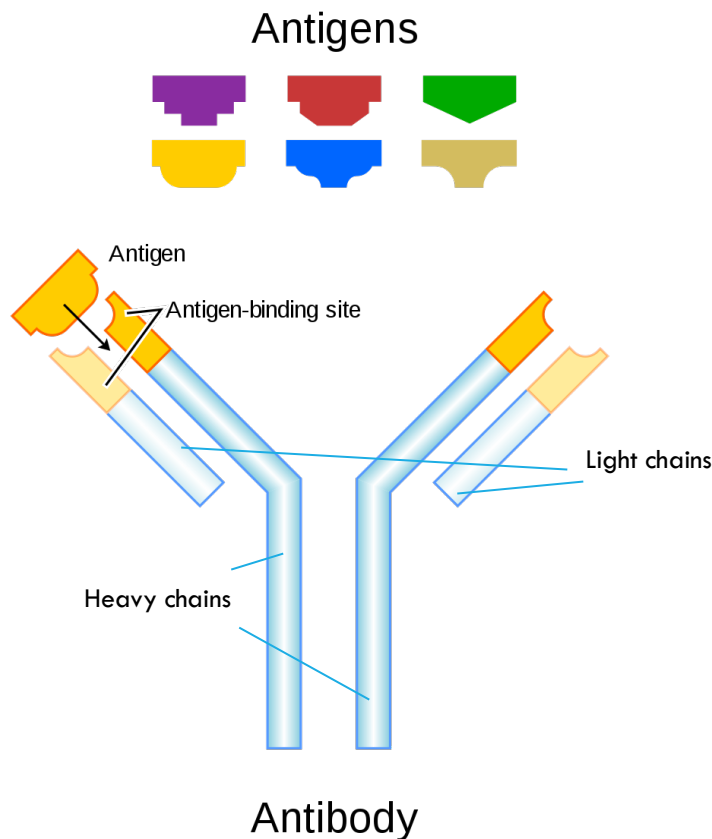
ELISA

Mgr. Radana Gurecká, PhD.

ÚLFBIaTm LF UK

Antigén – protilátka

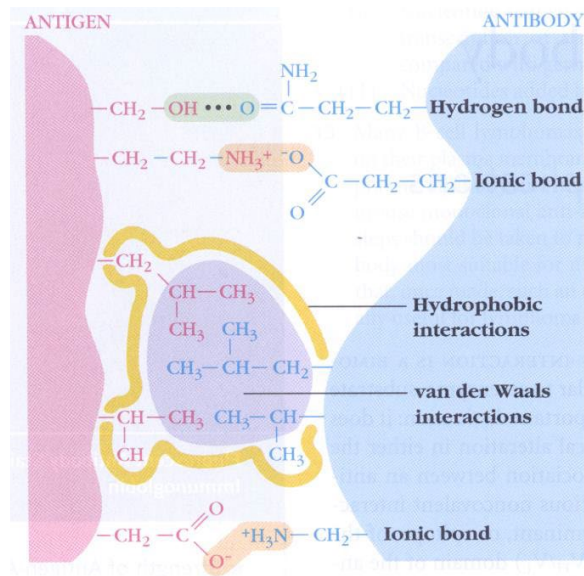
- Antigén (antibody generating) - častica rozpoznávaná protilátkou
 - Proteíny, polysacharidy (lipidy a nukleové kyseliny len v kombinácii s P a S)
 - Epitop – časť antigénu, ktorá sa viaže na väzobné miesto protilátky
- Protilátka (antibody) – veľký proteín tvar Y
 - ťažké reťazce – 5 typov → IgA, IgD, IgE, IgG, IgM
 - ľahké reťazce – λ a κ
- Biošpecifická väzba → imonukomplex



Adapted from Fvasconcellos (2007)

Nekovalentá väzba

- vodíkové väzby - atóm vodíka (len 1e, odhalené + jadro) + elektronegatívny atóm s voľným el. párom
- nepolárne hydrofóbne interakcie – molekuly proteínov sa snažia usporiadať tak, aby ich hydrofóbne skupiny boli pri sebe, čo najmenej v kontakte s vodou
- Coulombove sily – iónové interakcie, medzi + a – nabitými funkčnými skupinami
- van der Waalsove sily – vzájomné pôsobenie dipólov na molekulách



Adapted from Goldby et al. (2000)

Využitie protilátok v laboratórnych metódach

- Neznačený antigén/protilátka
 - Precipitácia
 - Aglutinácia (krvné skupiny)
- Značený antigén/protilátka
 - ELISA
 - RIA (radioimmunoassay)
 - Western blotting
 - Immunofluorescencia
 - Prietoková cytometria



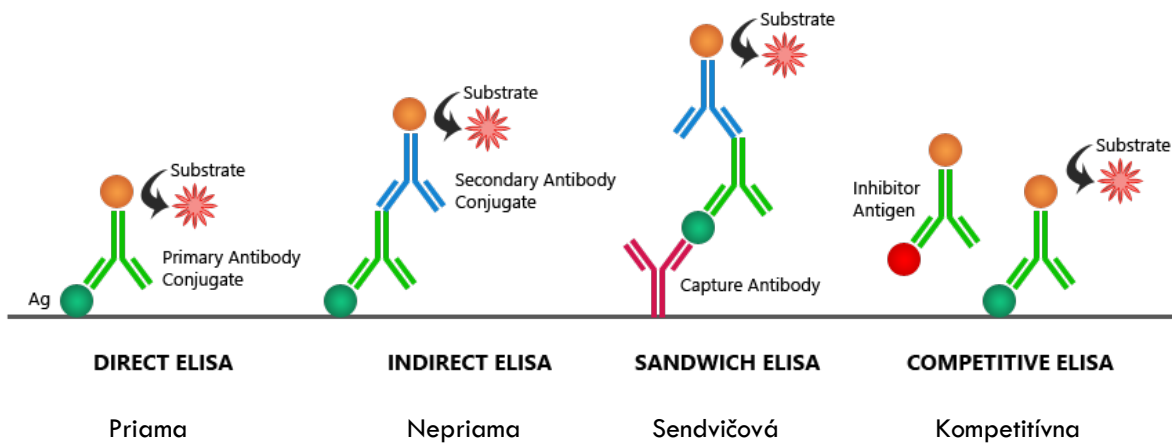
https://www.babycenter.com/609_i-failed-my-pregnancy-test-should-have-read-the-instructions_20001758.bc, 5.3.2019

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay

- Analytická metóda na kvantitatívne stanovenie protilátok a antigénov
- Značenie antigénu/protilátky enzýmom
- Enzým mení substrát na farebný produkt – spektrofotometrická detekcia
 - intenzita zafarbenia je úmerná koncentrácii enzýmu, tj. aj koncentrácii analytu vo vzorke
- Komplex Ag-Ab imobilizovaný na pevnom povrchu – mikrotitračná platnička, 96 jamiek (80 vzoriek)
- Platničkový analyzátor – ELISA reader



<https://www.ibiotech.sk/produkt/ELISA-reader-ELx800>, 5.3.2019



www.bosterbio.com/newsletter-archive/20170728-which-elisa, 5.3.2019, adapted

Detekcia (najčastejšie)

- Enzým **HRP** (horseradish peroxidase)
- Chromogénny substrát **TMB** (tetramethylbenzidine) a **H₂O₂**
 - redukcia H₂O₂, oxidácia TMB → zafarbenie na modro
- Stop solution – H₂SO₄ → zastavenie reakcie, zmena farby na žltú
- Detekcia pri 450nm (korekcia pri 540nm alebo 570nm)
- Kalibračná krivka - O.D. (optical density) ↔ koncentrácia štandardov
 - najčastejšie 4P

Summary, Pros & cons

- Vysoká citlivosť - pg/ml
- Špecifická
- Biologické materiály – sérum, plazma, moč, cerebrospinálny mok, supernatant z bunkových kultúr... Ale nie všetky na všetko
- Veľa vzoriek naraz – 80 jamiek, duplikáty – 40 vzoriek na 1 platni
- Časová náročnosť – 2 – 20 h (inkubácia cez noc)
- Vplyv na výsledok – čistota vzorky, prítomnosť bielkovín a iných látok (často nevieme, čo môže interagovať), teplota, svetlo, **presnosť pipetovania!**
- Cena – jeden kit ~ 500 eur
- Chyba v niektorých krokoch sa obvykle nedá napraviť