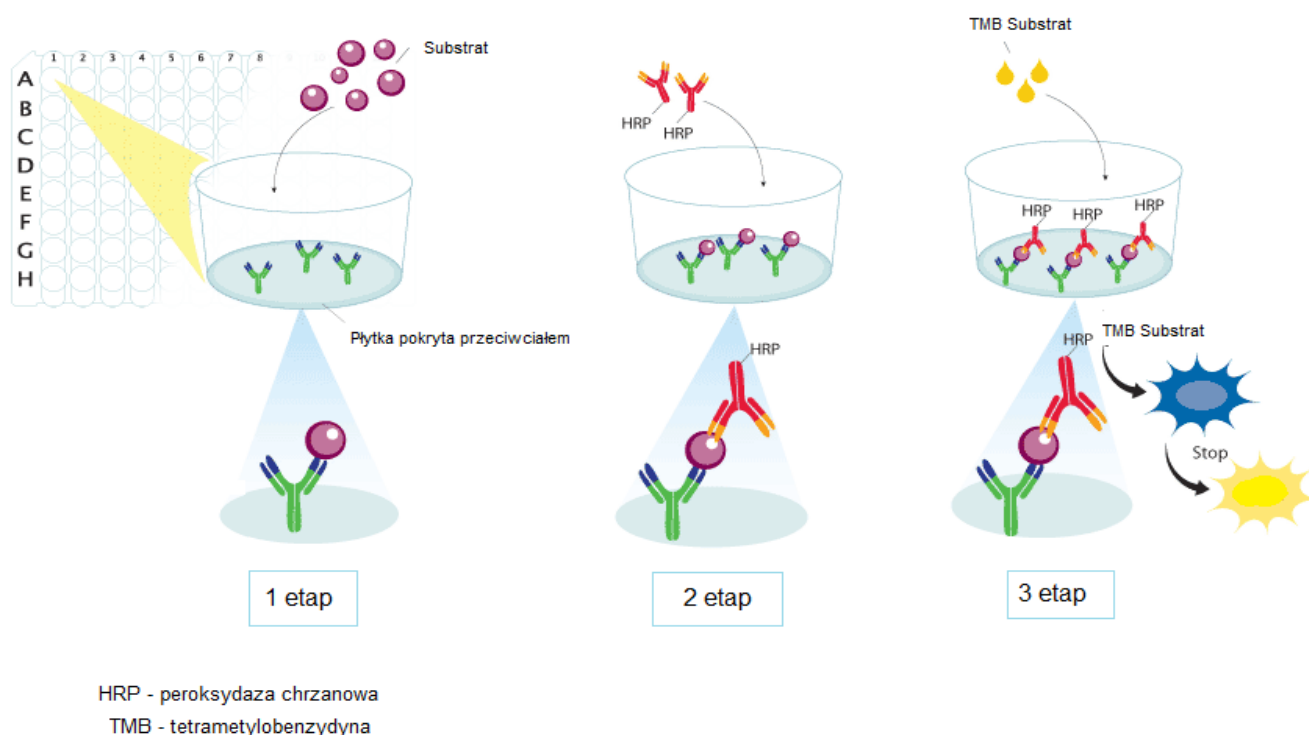


Techniki immunoenzymatycznego oznaczania poziomu hormonów (EIA)

Wstęp:

Test ELISA (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), czyli test immunoenzymatyczny (ang. *Enzyme Immunoassay* - EIA) jest obecnie szeroko rozpowszechnionym w diagnostyce laboratoryjnej i badaniach naukowych testem polegającym na wykrywaniu określonych białek w badanym materiale (np. surowica krwi, płyny ustrojowe, mocz, medium po hodowli komórkowej, homogenaty tkankowe) przy użyciu przeciwciał poliklonalnych lub monoklonalnych skoniugowanych z odpowiednim enzymem.

Ogólna zasada testu ELISA:



Rysunek 1. Ogólna zasada testu ELISA (R&D System Inc., zmodyfikowane)

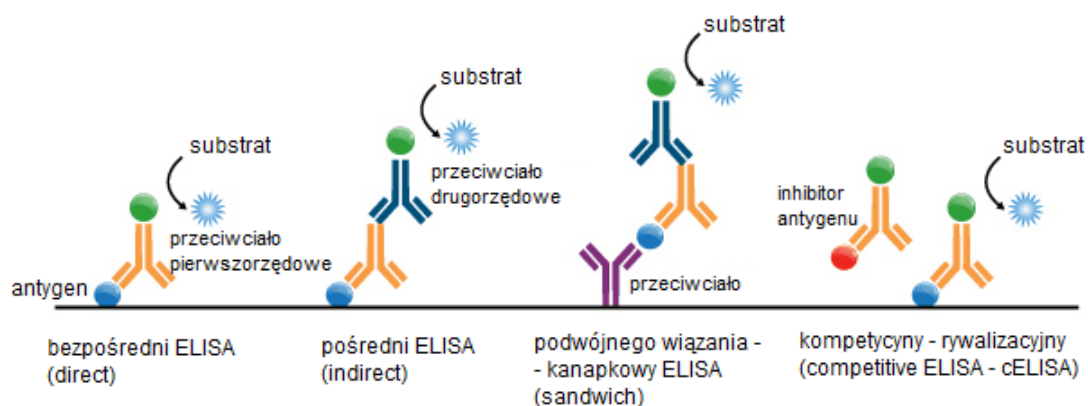
Testy ELISA standardowo wykonywane są na polistyrenowych płytkach 96-dołkowych.

1 etap - opłaszczanie płytki odpowiednim antygenem lub przeciwciałem.

2 etap - blokowanie wolnych miejsc za pomocą roztworu owoalbuminy lub odtłuszczonego mleka w celu zapobiegania nieselektywnego wiązania białek do fazy stałej.

3 etap - łączenie antygeny ze specyficznym przeciwciałem (reakcja antygen-przeciwciała) uwidacznia reakcja barwna, powstająca dzięki odpowiednim enzymom. Najczęściej stosowane enzymy to fosfataza alkaliczna, peroksydaza chrzanowa (daje niebieskie zabarwienie w obecności tetrametylobenzydyny) oraz oksydaza glukozowa. Zmiana barwy roztworu odczytywana jest w spektrofotometrze w oparciu o krzywą kalibracyjną. W celu przygotowania krzywej kalibracyjnej przygotowuje się roztworu o różnych stężeniach.

Warianty testu ELISA:



Rysunek 2. Warianty testu ELISA

1. Test bezpośredni. Do płytki opłaszczonej antygenem dodawane są specyficzne dla antygeny przeciwciała odpowiednio znakowane enzymem, przeprowadza się inkubację. W zależności od ilości antygeny przeciwciała specyficznie łączą się z antygenem, a niezwiązane są wymywane. Po dodaniu roztworu substrat/chromofor, enzym katalizuje reakcję i obserwujemy barwny produkt reakcji, który odcytujemy spektrofotometrycznie. Metoda ta jest szybka i prosta w wykonaniu. Jednak aby wykryć antygen trzeba wyznakować swoiste przeciwciała. Jest to kosztowne i nie zawsze możliwe.

2. Test pośredni. Do płytki opłaszczonej antygenem dodawane są przeciwciała pierwszorzędowe, które podczas inkubacji wiążą się specyficznie z antygenem. Przeciwciała niezwiązane są wymywane. Następnie dodaje się przeciwciała drugorzędowe znakowane enzymem, które łączy się z przeciwciałem pierwszorzędowym na zasadzie rozpoznania izotypu. Nadmiar przeciwciał zostaje wymyty. Następnie, roztwór substrat/chromofor jest dodawany na płytkę, a enzym katalizuje reakcję i obserwujemy barwny produkt reakcji, który odcytujemy spektrofotometrycznie. Jego zaletą jest to, że nie trzeba znakować swoistych dla antygeny przeciwciał pierwszorzędowych. Jest on jednak bardziej pracochłonny niż test bezpośredni.

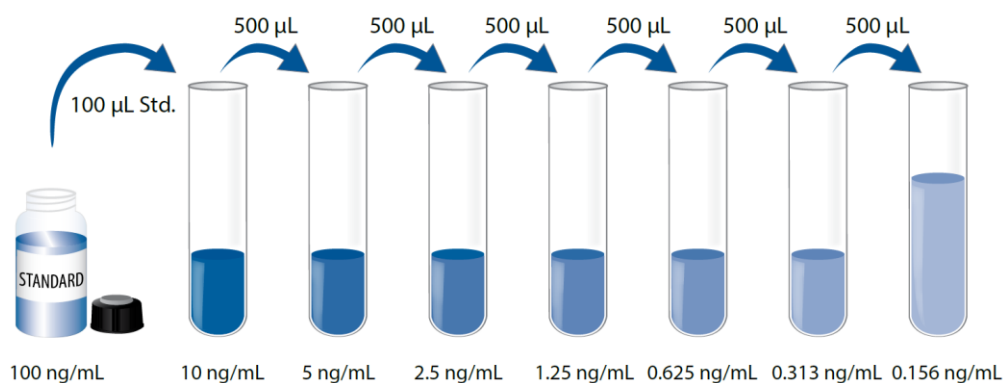
3. Test podwójnego wiązania – kanapkowy. Do płytki opłaszczonej antygenem dodajemy antygen, który jest „wyłapywany” przez związane na powierzchni płytki przeciwciała. Następnie dodajemy przeciwciała pierwszorzędowe, które także łączą się z antygenem, wypłukujemy ich nadmiar, a na końcu dodajemy przeciwciała drugorzędowe, wyznakowane enzymem. Następnie, roztwór substrat/chromofor jest dodawany na płytkę, a enzym katalizuje reakcję i obserwujemy barwny produkt reakcji, który odcytujemy spektrofotometrycznie.

4. Test kompetycyjny – rywalizacyjny. Do płytki opłaszczonej antygenem dodajemy surowicę jak i specyficzne wobec antygeny przeciwciała wyznakowane enzymem. Nastąpi wtedy współzawodnictwo pomiędzy przeciwciałami pochodzącymi z surowicy a przeciwciałami wyznakowanymi. W ten sposób określić można ilość przeciwciał w surowicy; im mniej przeciwciał wyznakowanych połączy się z antygenem, tym słabszą reakcję barwną zaobserwujemy.

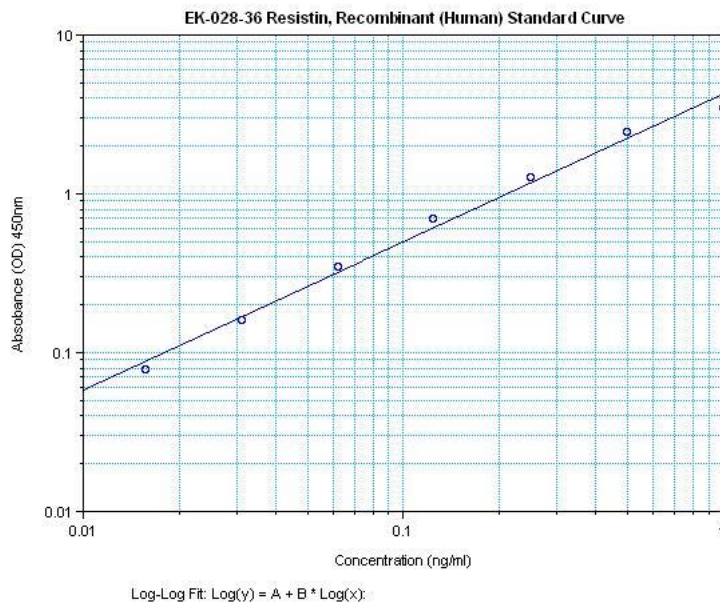
Opis procedury ćwiczeń:

Na zajęciach studenci wykonają analizę stężenia hormonu w medium hodowlanym wykorzystując komercyjnie zakupiony test ELISA wg instrukcji producenta.

1. Przygotować próby do analizy i protokół oznaczeń.
2. Przygotowanie krzywej kalibracyjnej.



3. Przygotować pozostałe odczynniki do analizy; roztwór buforowy (Wash buffer) do przemywania poprzez wymieszanie 30 ml w 720 ml wody destylowanej.
4. Dodać na płytkę 96 dołkową po 100 µl standardu, blanku, pozytywnej kontroli oraz analizowanych prób.
5. Inkubować 45 min w temperaturze 37°C, na wytrząsarce (300-400 rpm).
6. Usunąć zawartość płytki i każdy dołek płukać 300-350 µl Wash buffer 4x.
7. Następnie do każdego dołka płytki dodać po 100 µl *Biotinylated anti- (badany hormon) Detection Antibody*.
8. Inkubować 45 min w temperaturze pokojowej, na wytrząsarce (300-400 rpm).
9. Usunąć zawartość płytki i każdy dołek płukać 300-350 µl Wash buffer 4x.
10. Następnie do każdego dołka płytki dodać po 100 µl *Streptavidin-Horseradish Peroxidase (SA-HRP)*.
11. Inkubować 15 min w temperaturze pokojowej, na wytrząsarce (300-400 rpm).
12. Usunąć zawartość płytki i każdy dołek płukać 300-350 µl Wash buffer 4x.
13. Następnie do każdego dołka płytki dodać po 100 µl *Substrate Solution (TMB)*.
14. Inkubować 15 min w temperaturze pokojowej, na wytrząsarce (300-400 rpm).
15. Następnie do każdego dołka płytki dodać po 100 µl *Stop Solution*, w celu zastopowania reakcji. Obserwujemy zmianę koloru z niebieskiego na żółty.
16. Czytać absorbancję w czytniku spektrofotometrycznym, O.D. 450 nm.
17. Analiza wyników: porównanie analizowanych prób do krzywej kalibracyjnej.



Rysunek 3. Standardowa krzywa kalibracyjna.

Efekty kształcenia :

Student powinien znać zasadę testu immunoenzymatycznego i odróżnić warianty ELISA, wyjaśnić pojęcia: antygen, przeciwciało, enzym.

Student powinien wiedzieć jak zaplanować analizę testem immunoenzymatycznym.

Student powinien potrafić wykonać analizę dowolnego, dostępne komercyjnego zestawu testu immunoenzymatycznego oraz poprawnie zanalizować wyniki.

Literatura

<http://library.umac.mo/ebooks/b2805037x.pdf>

- Rudolf M. Lequin "Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)"; Clinical Chemistry. 2005;51:2415-2418;
- Stewart L. Fossceco, Knoll Pharmaceutical Company, Whippany, NJ.and Nathan A. Curtis, SAS Institute Inc., Cary, NC "Exploring Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Data with the SAS® Analyst Application"

Protokół oznaczenia:

Data.....

ELISA nr katalogowy.....

Próby.....

Zakres krzywej.....

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												