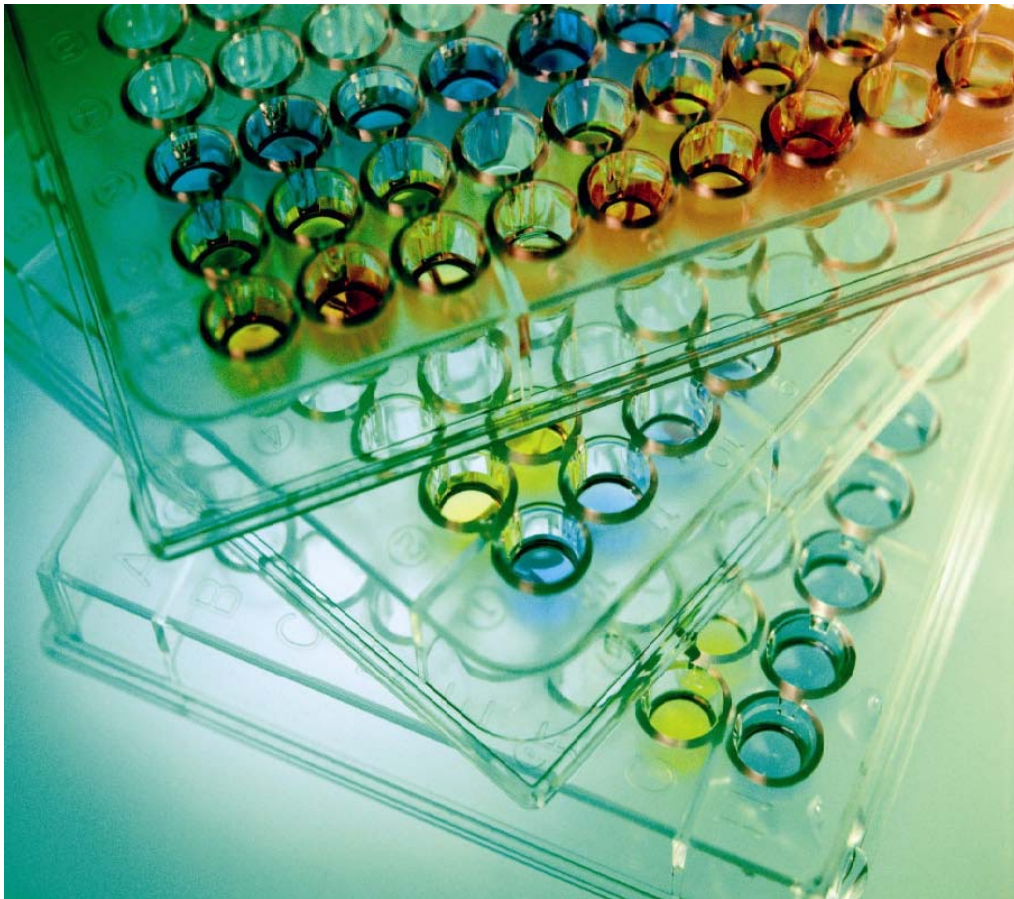


## **ELISA-metoden, til bestemmelse af den genetiske profil i høns.**

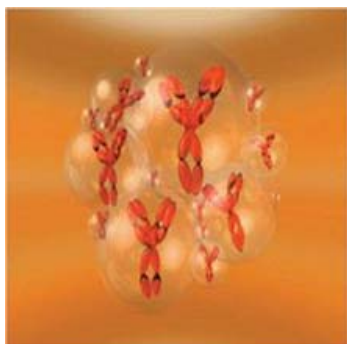


## Formål:

Formålet med denne øvelse er at demonstrere brugen af antistoffer i diagnostisk eller forskningsøjemed. Dvs. til at undersøge om personer, husdyr eller fødevarer, f.eks. er inficeret med en given smitsom sygdom, har en bestemt genetisk profil eller indeholder specifikke antigener. I den specifikke ELISA I skal køre på dagen, er formålet at bestemme hvilke høns der har en høj eller lav c-MBL genetisk profil.

## Introduktion

**Immunforsvaret** er kroppens forsvar mod bakterier, parasitter og virus. Immunforsvaret deles op i et innate (medfødt) og et adaptivt/achieved (erhvervet) immunforsvar. Det innate immunforsvar består af kemiske og fysiske barriere, samt en cellulær del og en ikke-cellulær del. Den cellulære del består af: Makrofager, der er til stede i det perifære væv og som genkender mikroorganismer med sine receptorer og indleder det akutte inflammatoriske respons. Naturlige dræberceller (NK-celler), som dræber celler der er inficeret med virus. Neutrofile granulocytter, som slår mikroorganismer ihjel ved fagocytose. Dendritceller som "spiser" mikroorganismer, nedbryder dem og migrerer til lymfeknuder og præsenterer antigenerne til T-cellerne som så aktiveres. Den ikke-



Figur 1: Immunoglobulin

cellulære del består af komplementsystemet, som er proteiner opløst i blodplasma som kan aktiveres til at angribe indtrængende mikroorganismer. Det adaptive immunforsvar består af T-celler, herunder T-hjælper celler (CD4+ celler) og T-cytotoksiske celler (CD8+ celler) og B-celler, herunder plasmaceller og hukommelsesceller. B-celler kan blive til plasmaceller ved aktivering og producerer antistoffer, der er proteiner med evne til at binde antigener, dvs. til at binde kropsfremmede stoffer. Antistoffer kaldes også immunoglobuliner (Ig). Der er udviklet mange forskellige laboratorieteknikker som er baseret på immunologiske principper, bl.a. udfældning, agglutinerings, ELISA, immundiffusion og flow cytometri.

(Det forventes, at de studerende har læst eget pensums materiale om immunforsvaret)

**Mannose bindende lektin (MBL)** er en del af det innate immunsystem. MBL er en receptor, som findes frit i plasma og dets biologiske funktion er at binde til kulhydrater (glukosamin, mannose, fukose og glukose) på cellevæggen af fremmede mikroorganismer (virus, bakterier, svampe mm.), som er trængt ind i kroppen. Denne binding kan aktivere komplementsystemet, som så bekæmper de skadelige mikroorganismer. MBL kan også sætte sig direkte på celleoverflader og derved

fremme, at hvide blodlegemer “æder” mikroorganismene. MBL produceres i leveren og sekreteres ud i blodet og dette stiger ved den akutte fase af f.eks. virusinfektioner.

**ELISA** (*Enzyme linked immunosorbent assay*) er en immunkemisk metode til at afsløre diverse antigener eller antistoffer i en given prøve og er en meget anvendt metode til bestemmelse af organisk stof. Metoden har den store fordel at den dels kan bestemme meget små stofmængder, samtidig med at den er meget specifik. *LÆS appendix A og B for gennemgang af selve ELISA metoden.* Anvendelsesmulighederne af ELISA er store; Det kan være meget relevant at måle på diverse immunologiske parametre ved diagnosticering af diverse sygdomme, f.eks. ved detektion af antistofproduktion ved HIV-diagnosticering. Men immunologien har også langt bredere anvendelsesmuligheder, idet påvisning af forskellige stoffer er mulige at udføre ved at bruge antistoffer f.eks. måling af hCG i urinen ved graviditetstests.

ELISA er derfor en metode der kan bruges til at teste for tilstedeværelsen af c(chicken)-MBL i plasmaprøver. Dette kan f.eks. være relevant, hvis man gerne vil diagnosticere for en infektion af dyrene eller infektionsniveauet. Det har desuden vist sig, at nogle af de kyllingestammer, som man bruger i forskningsøjemed af genetiske årsager udtrykker forskellige niveauer af MBL og dermed er forskellige i deres evne til at bekæmpe infektioner og sygdom. I avlsmæssige sammenhænge vil man altid være interesseret i kyllingestammer med høj sygdomsresistens, dvs. et højt niveau af c-MBL. I dette forsøg skal I bruge ELISA-metoden til at skelne Høj og Lav c-MBL stammer fra hinanden.



Besøg: <http://www.fwi.co.uk/Articles/17/05/2011/126826/Danish-birds-bring-genetic-resistance.htm> for at læse mere om hvor prøverne der bruges i dette forsøg kommer fra og hvad disse høns kan bruges til.

## **Materiale og metoder**

Maxisorp mikrotiterplader (Nunc 446612, Life Technologies)

Polypropylenrør til prøvefortynding

Plast”vugger” ved afpipettering af reagenser.

HYB 182 – 1 (anti-cMBL; 1,0 mg/ml)

PBS coatnings buffer

TBST vaskebuffer

TBS blokeringsbuffer

TBS prøvebuffer

Biotinyleret HYB 182-1

Streptavidin (horseradish peroxidase)  
TMB substrat (3,5,3',5'-tetramethylbenzidine)

Reagenser:

Kemikalieliste:

NaCl	Merck 6404
KCl	Merck 4936
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck 4873
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck 6580
Tris	Sigma T-1378
Tween 20	Sigma P-7949
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	Merck 2382
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1M	
HYB 182-01 cMBL antistof (ca. 1,0 mg/ml) (fra Claus Koch)	
Biotinyleret HYB 182-01 cMBL antistof som vi selv har ProteinG oprenset og selv har biotinyleret	
Streptavidin(Horseradish peroxidase)	DAKO P0397
TMB microwell peroxidase substrat	Millers Bio line Produkt nr.: TMBW-0100-01

<u>PBS coatningsbuffer: C-2:</u> (10 x konc.)	<u>500 ml</u>
1370 mM NaCl	40,0 g
27 mM KCl	1,0 g
15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
81 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,8 g
H <sub>2</sub> O ad	500 ml
pH 7,4 (evt. autoklivering – kontroller pH før brug)	

<u>Coatningsopløsning:</u>	<u>1 plade</u>	<u>2 plader</u>
C-2	1,0 ml	2,0 ml
MilliQ vand	9,0 ml	18,0 ml
HYB 182-1 Ab ( stamopl.: 1,0 mg/ml)	10 µl	20 µl

<u>Vaskebuffer: V-4:</u>	<u>10x</u>	<u>2000 ml</u>	<u>5000 ml</u>
10 mM Tris	24 g	2,4 g	6 g

100 mM NaCl	117 g	11,7 g	29,25 g
0,05% Tween 20		1 ml	2,5 ml
H <sub>2</sub> O ad	2000 ml	2000 ml	5000 ml
pH 7,6			

<b>D-1: TBS buffer (10 x konc.)</b>			1000 ml
100 mM Tris		12,1 g	
1400 mM NaCl			81,8 g
H <sub>2</sub> O ad			1000 ml
pH 7,6			

<b>D-2 TBST buffer (brugsopløsning):</b>		500 ml		1000 ml
D-1		50 ml		100 ml
Tween 20	250 µl		500 µl	
H <sub>2</sub> O ad		500 ml		1000 ml
Holdbar max 1 måned				

<b>B-2: blokerings opløsning</b>	2 plader		3 plader	
D-1		5 ml	20 ml	7 ml
Tween 20	250 µl	1 ml	350 µl	
H <sub>2</sub> O ad:		50 ml	200 ml	70 ml

<b>F-2 Prøvebuffer (brugsopløsning):</b>		200 ml	100 ml	500 ml
D-2		200 ml	100 ml	500 ml
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,294 g	0,147 g	0,735 g	
<b>Detektions antistof:</b>		1 plade		2 plader
D-2		12 ml		22 ml
Biotinyleret HYB 182-1 (lavet 28-08-09)		6 µl		11 µl
Blandes i Falconrør. (Fortyndingen er 1:2000)				

<b>Enzymkonjugat:</b>	1 plade	2 plader
D-2	12 ml	22,5 ml
Streptavidin NY,	160 µl stamopl.	300 µl stamopl

findes i fryseren i 1:1000

Blandes i Falconrør. (Fortyndingen er 1:75.000)

### Substrat:

TMB anvendes ufortyndet.

### Stop opløsning:

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M (55 ml konc H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ad 1000 ml H<sub>2</sub>O)

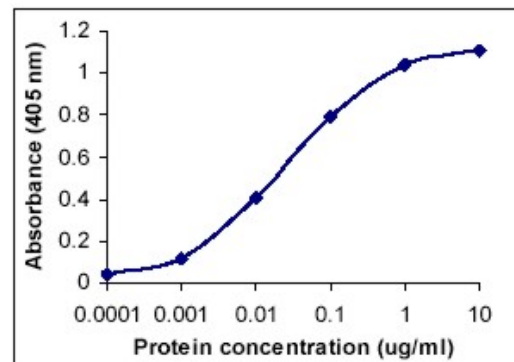
### Dagen før jeres besøg (følgende forbereder vi):

- 1) Coating med primært antistof: Tilsæt 100 µL coating buffer pr brønd (5µg mAb/mL PBS). Dæk micro-titer pladen til med plastic film og inkuber natten over ved 4°C (dvs. køleskab).
  - Næste morgen tages micro-titer pladen ud og bringes til stuetemperatur (15 min) og vask herefter micro-titer pladen 3 gange i balje med vaskebuffer. Bankes tør på papir.
  - 2) Blokering: Tilsæt 200 µL blokeringsbuffer/brønd. Tildæk micro-titer pladen med plastic film og sæt på pladeryster ved stue temp. i 20 min.
  - Klargør fortyndingerne af standarder, prøver og kontroller:
    - a. Standarder: 8 fortyndinger af kendt standard. Start med en fortynding (Std 1; 0,143 µg/mL) på 1:50 i F-2 og lav to-folds fortyndinger indtil 8 koncentrationer haves. Lav et batch af disse og gem ved -20°C, så den samme standard bruges hver gang.
    - b. Kontroller: Høj og lav kontroller fortyndes i 1:601 i F-2 (5 uL i 3 mL F-2). Lav et batch af disse og gem ved -20°C, så de samme kontroller bruges hver gang.
    - c. Prøve: Fortynd 1:601 i F-2 (5 uL i 3 mL F-2). Lav et batch af disse og gem ved 20°C, så de samme prøver bruges hver gang.
- 

### På dagen – dette er jeres opgave:

- Vask micro-titer pladen 3 gange i balje med vaskebuffer. Bankes tør på papir.

- 3) Inkubering med standardrække, prøve/serum og kontroller: Tilsæt 100  $\mu$ L pr brønd. (Følg pladeskema) Micro-titer pladen dækkes med plasticfilm og sættes på pladerysteren i 1 time ved stuetemp.
- Tag TMB ud af køleskabet for at opnå stuetemp.
- 4) Inkubering med detektionsantistof: Tilsæt 100  $\mu$ L fortyndet biotinyleret antistof pr brønd. Tildæk micro-titerpladen med plasticfilm og sæt den på pladerysteren og inkuber i 30 min ved stuetemp.
- Vask micro-titer pladen 3 gange i balje med vaskebuffer. Bankes tør på papir.
- 5) Inkubering med konjugat: Tilsæt 100  $\mu$ L fortyndet streptavidin/brønd. Tildæk micro-titer pladen med plasticfilm og sæt på pladeryster ved stue temp. i 30 min.
- Vask micro-titer pladen 3 gange i balje med vaskebuffer. Bankes tør på papir.
- 6) Inkubering med substrat: Tilsæt 100  $\mu$ L TMB pr brønd. Tildæk micro-titer pladen med sølvpapir og inkuber i 11-15 min ved stuetemp. (Husk handsker).
- Stop farvereaktionen med 100  $\mu$ L 1 M  $H_2SO_4$  pr brønd. Stop før hvis farveudviklingen er kraftig (Husk handsker).
- Mål absorbans ved 450-650 nm på ELISA-readeren.



## Resultater

Ved aflæsning af micro-titeter pladen på ELISA-readeren, fås der et normal data-sheet, indeholdende;

1. Data og tabel for standard-kurven.
2. Data på kontrollerne
3. Data på prøverne

En standard-kurve er et kvantitativt redskab, som benyttes til at bestemme koncentrationen af det stof man leder efter. Dvs. der laves en fortyndingsrække med kendte koncentrationer af det stof man gerne vil måle. Den kurve der dannes ud fra disse og absorbansen, kan bruges til at aflæse koncentrationen af det givne stof i prøverne. En standard-kurve har et S-formet forløb og man vil gerne aflæse sine resultater på den lineære del af kurven, hvor resultatet er mest sikkert.

For at være sikker på, at der ikke er store forskelle imellem forskellige kørsler af plader, så medbringer man nogle kontroller (Høj, Lav og Neg) på hver plade. Disse kender man koncentrationen af og denne skulle så gerne være det samme mellem pladerne. Til videre at

Figur 2: S-formet standard kurve.

bestemme om kørslen er fin, beregnes variationskoefficienten CV% mellem dobbeltbestemmelserne af prøverne på hver plade og mellem kontrollerne mellem pladerne.

På forsøgsdagen vil vi gennemgå de data I får og snakke videre om databehandling.

## **Diskussion**

Gennemgå den direkte/sandwich ELISA metode, ved brug af denne animations model:

<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/ELISA.html>

I c-MBL ELISA-opsætningen benyttes den direkte ELISA-metode. Sammenlign den med den indirekte ELISA-metode, som også gennemgås i animationen og diskuter forskellene.

Hvad kan problemerne være ved ELISA-metoden/fejlkilder? Skal diskuteres hjemmefra og så kan vi gennemgå nogle fejlkilder undervejs på forsøgsdagen.

Efter ELISA-kørslen vil vi diskutere jeres data, dvs. bestemme hvilke høns der har hvilken genetisk baggrund, og dermed diskutere deres anvendelse i avlen og i forskningen.

## **Konklusion**

Hvad har I lært om ELISA-metoden og dens brug i forskningen og hvad kan I forestille jer af forsøgsmuligheder og problemstillinger med denne metode?



ler er mest veleg-  
da de involverede  
mple, er der mu-  
alyserne. En stor  
der skal udvikles  
nent, man ønsker  
an alt efter om-  
i mdr. til flere år  
e. Hvis man der-  
sjældent, eller de  
kommercielt til-  
andre metoder,

antistoffer inde-  
srisiko. Der kan  
ner bruges sub-  
skal omgås med  
ne grund skal  
ggeligt. Ved ra-  
yet små mæng-  
kal behandles i  
ler, der findes  
of. Disse inde-  
er en film, der  
råling. Herved  
lingsdosis.

iske analysers  
ndes der ofte  
ressive stoffer  
ir der arbejdes

## ELISA

Immunoassay er en gruppe af immunkemiske metoder, der adskiller sig fra andre ved, at der ikke dannes præcipitat. Reaktionen detekteres her med enzymer, radioaktive stoffer eller fluoro-chromer. Anvendes enzymer og tilhørende substratreaktion som detektionssystem, kaldes metoden for enzyme immuno assay, EIA. I kapitlet side 26 er omtalt tilsvarende metoder, hvor der anvendes detektion med radioaktive stoffer, RIA og med fluorescerende stoffer, FIA.

ELISA er betegnelsen for en speciel form for EIA, hvor antigen-antistofreaktionen foregår knyttet til en fast fase. ELISA er en forkortelse af *enzyme linked immunosorbent assay*. Reaktionen, der foregår på overfladen af en fast fase, betegnes heterogene, mens reaktioner, der foregår i opløsning betegnes homogene. Homogene EIA vil ikke blive omtalt i denne bog.

Der findes således mange varianter af immunoassay med forskellig opsætning og forskellige detektionssystemer. Til levnedsmiddelanalyse er ELISA den mest anvendte metode, og det vil altid være antigener i prøven, der analyseres for. Metoden kan også anvendes til bestemmelse af antistof fx ved bestemmelse af titeren på et antiserum, man selv har fået fremstillet, eller ved kliniske undersøgelser af blod.

Kort fortalt er princippet i ELISA, at antigen i prøven indfanges af antistoffer, der sidder bundet til overfladen af plastbrønde. Til sættes derefter endnu et antistof, med et tilknyttet enzym, vil dette enzym give et farvesignal, der kan aflæses fotometrisk, og som er proportionalt med antigenmængden.

### ELISA til levnedsmiddelanalyse

ELISA har været anvendt i mange år på det kliniske område. Erfaringerne herfra er nu overført til levnedsmiddelområdet, og i dag

findes der opskrifter og færdige ELISA-kits til bestemmelse af en lang række stoffer.

ELISA metoden kan anvendes til påvisning og bestemmelse af alle ønskede og uønskede komponenter i levnedsmidler, hvortil der kan skaffes antistoffer, se figur 47. Det gælder således makromolekyler samt mindre molekyler, der kan gøres immunogene ved at binde dem til en carrier (se side 10). Metoden giver mulighed for kvalitativ, semikvantitativ og kvantitativ analyse afhængig af ens behov.

- 
- \* Kødproteiner
  - \* Ikke-kød proteiner (gluten, casein, soya-, ærte- og valleproteiner)
  - \* Bakterier
  - \* Svampe
  - \* Virus
  - \* Mikrobielle toxiner
  - \* Plantetoxiner
  - \* Pesticider
  - \* Hormoner
  - \* Antibiotika
  - \* Stabilisatorer
- 

Figur 47. Stoffer der kan bestemmes ved ELISA.

Som følge af den specifikke binding mellem antigen og antistof kan der opnås en meget høj grad af specificitet. Metoden kan fx anvendes til at skelne mellem nært beslægtede stoffer. Den kan fx artsbestemme kødproteiner, altså skelne mellem kød fra ko, svin, får, osv., eller man kan analysere for aflatoxin B<sub>1</sub> selv ved tilstedeværelse af aflatoxin B<sub>2</sub>. Fremstillingen af prøveekstrakt er sædvanligvis simpel, da andre stoffer i prøven sjældent interfererer. Høj specificitet er vigtig for at nedsætte antallet af falske positive svar ved de kvalitative analyser og for at undgå forhøjede resultater ved kvantitative analyser.

Der kan detekteres meget små koncentrationer (1 ng/ml), hvilket har stor betydning ved



fx toxinbestemmelse, men er mindre afgørende ved analyse af stoffer, der forekommer eller tilsættes i store koncentrationer som fx soyaprotein i kødvarer. En fordel ved de lave detektionsområder er, at den nødvendige fortynding af prøveekstrakten bevirker, at generende stoffer fra prøven fortyndes væk, og dermed gør ekstraktfremstillingen simplere. Lav detektionsgrænse betyder færre antal falske negative prøver. Detektionsgrænsen varierer stærkt med typen af ELISA-opsætningen.

Ved analyse af levnedsmidler er det vigtigste ikke nødvendigvis at kunne bestemme resultatet med stor nøjagtighed, men snarere at bestemme niveauet for indholdet. Metodens nøjagtighed varierer meget fra prøve til prøve. Fx angives en nøjagtighed på 0-15% for soya i forskellige kødvarer.

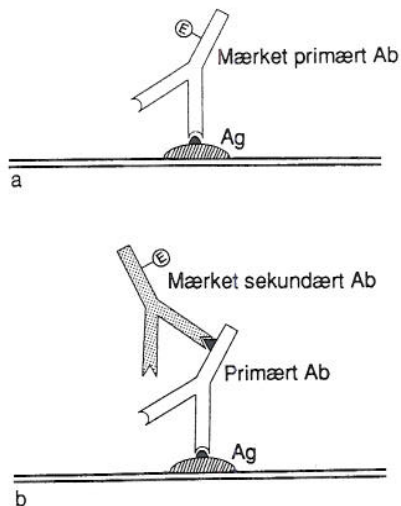
Prisen pr. analyse er lav sammenlignet med andre metoder, idet prøveforbehandlingen er enkel, der kan måles et stort antal prøver på meget kort tid, og udstyret er billigt. Sammenligninger har vist, at analyse af aflatoxin ved ELISA er seks gange hurtigere end ved HPLC og udstyret desuden billigere. Sammenligning af metoder til bestemmelse af vitaminet pantothen-syre ved ELISA og ved mikrobiologisk styrkebestemmelse viste, at ELISA var hurtigere, mindre arbejdskrævende og havde ti gange så lav detektionsgrænse.

ELISA egner sig til automatisering, hvilket gør det muligt at screene et stort antal prøver. Fx testes alle vore læggekartofler for virus ved hjælp af ELISA før salg.

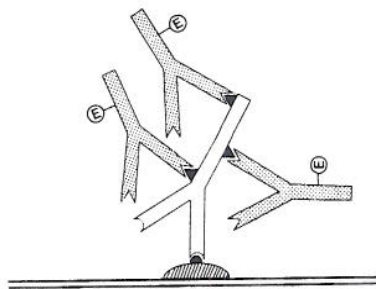
### Klassifikation af ELISA

ELISA kan opbygges i mange forskellige varianter, med forskellig antal lag af antigen og antistof og med enzym knyttet til antigen eller til antistof. I de viste eksempler, som ikke er dækkende for de mange muligheder, der findes, er antigenet altid det søgte stof. Der skelnes mellem *direkte metoder* og *indirekte metoder* afhængig af, hvorledes enzymet er placeret i forhold til det søgte stof. Ved den direkte metode sidder enzymet på det primære antistof, som er det antistof, der binder sig til antigenet, se figur 48 a. Ved den indirekte me-

tode er enzymet konjugeret til det sekundære antistof, der binder sig til det primære antistof, se figur 48 b. Denne tegning er forenklet for overskuelighedens skyld. På figur 49 er vist, at der er knyttet flere sekundære antistofmolekyler til ét primært antigenmolekyle, hvilket gør den indirekte metode mere følsom end den direkte. En anden fordel er, at samme enzymkonjugat kan benyttes til analyse af forskellige stoffer, såfremt alle de primære antistoffer er fra samme dyreart. En ulempe ved metoden er, at den er mere tidskrævende, da den indebærer et inkubationstrin mere end den direkte metode, og at der er større risiko for uspecifik binding til andre stoffer i prøven.



Figur 48. a) Direkte metode, hvor det enzymkonjugerede antistof er bundet til antigenet. b) Indirekte metode, hvor det enzymkonjugerede antistof er bundet til et primært antistof.



Figur 49. Forstærkende effekt ved den indirekte metode er her illustreret, idet der bindes flere sekundære antistofmolekyler til ét primært antistofmolekyle.

Figur 50. I antigenbes kun 2 af de



et til det sekundære  
 let primære antistof,  
 ing er forenklet for  
 På figur 49 er vist,  
 dære antistofmole-  
 nmolekyle, hvilket  
 ere følsom end den  
 , at samme enzym-  
 alyse af forskellige  
 nære antistoffer er  
 mpe ved metoden  
 ende, da den inde-  
 re end den direkte  
 isiko for uspecifik  
 øven.

erket primært Ab



ekundært Ab

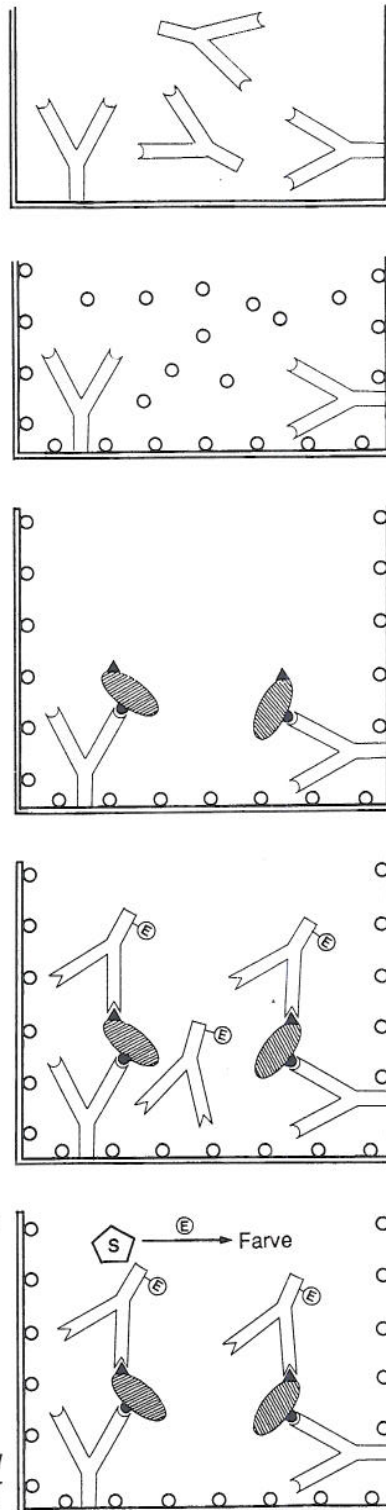
ært Ab



et enzymkonjuge-  
 t. b) Indirekte me-  
 antistof er bundet



en indirekte me-  
 s flere sekundæ-  
 istofmolekyle.



Coatning af brønd  
 med primært antistof

Vask

Blokering

Vask

Inkubering med prøve  
 eller standard-antigen

Vask

Inkubation med primært  
 antistofkonjugat

Vask

Enzym-substrat-reaktion

Tilsætning af stopreagens  
 og måling af absorbans

Figur 50. Direkte sandwich ELISA til  
 antigenbestemmelse. Figuren viser  
 kun 2 af de coatede antistofmolekyler.



## Non-kompetitiv ELISA

ELISA kan være sat op som en *non-kompetitiv* reaktion, hvor antigenet detekteres med et overskud af antistof, eller som en *kompetitiv* reaktion, hvor det søgte antigen i prøve eller standard konkurrerer med et tilsvarende tilsat antigen om en begrænset mængde antistof.

En typisk *non-kompetitiv* metode er *sandwichmetoden*, der kan udføres som en direkte eller indirekte metode. Figur 50 viser de enkelte trin i en direkte sandwichopsætning til antigenbestemmelse. (Analyseforskrift i appendix A).

1. Første lag er det antistof, der er rettet mod prøvens antigen. Dette antistof er coatet (immobiliseret) på plastoverfladen af brøndene i en titerplade. Overskud af antistof fjernes ved vask.
2. Ledige pladser på plastoverfladen blokeres med et inaktivt protein (se side 48), hvorefter overskud heraf fjernes ved vask.
3. Prøven sættes på og under inkubationen sker dannelsen af antigen-antistofkompleks. Øvrige stoffer fra prøven fjernes ved vask.
4. Tredie lag er et andet primært antistof end første lag, men antistoffet er nu konjugeret med et enzym. Når reaktionen mellem antigen og konjugeret antistof er sket, fjernes overskud af konjugeret antistof ved vask.
5. Ved tilsætning af substrat udvikler enzymet et farvestof, hvis intensitet er et mål for den bundne enzymmængde og dermed for mængden af antigen i prøven.
6. Enzymreaktionen stoppes ved tilsætning af et reagens, der forskyder pH eller på anden vis blokerer enzym-substratreaktionen.
7. Farven kan vurderes visuelt ved kvalitative analyser eller måles på ELISA-reader, som er et specielt fotometer, der direkte kan aflæse absorptionsen i brøndene.

Ved den *indirekte sandwich-metode* anvendes to primære antistoffer, som skal være produceret i to forskellige dyrearter. Herved opnås, at det sekundære antistof kun binder sig til det øverste primære antistof og ikke til det coatede antistof. En fordel ved sandwichteknikken er, at man kan coate mange titerplader på én gang og have dem liggende parat til senere brug.

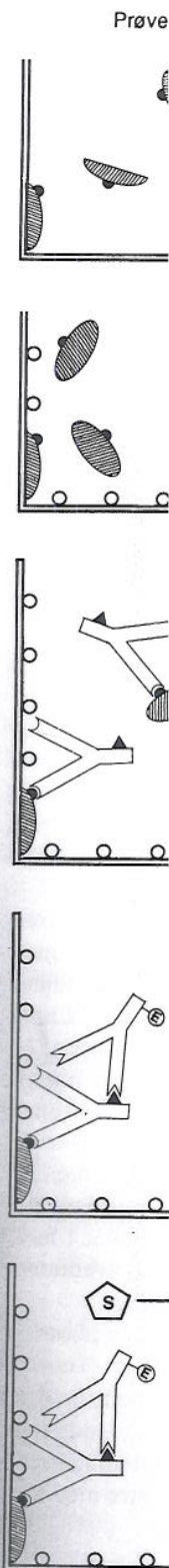
En anden *non-kompetitiv* opsætning kan være, at antigen fra prøve/standard coates på plastoverfladen, hvorefter først primært antistof og derefter enzymkonjugeret sekundært antistof tilsættes. En ulempe ved denne metode er, at andre stoffer end antigenet kan binde sig til plastoverfladen. Denne matrixeffekt kan give anledning til uspecifikke reaktioner med for høj baggrund og dermed for høj detektionsgrænse til følge. Metoden kan benyttes til prøver, hvor antigenet findes i så store mængder, at matrixeffekten forsvinder ved fortynding af prøven.

## Kompetitiv ELISA

Ved den *kompetitive* ELISA tilsættes antistof i underskud, hvorved der udspilles en konkurrence om dette antistof mellem antigenet i prøve/standard og et immobiliseret antigen af samme art. Figur 51 viser trinene i en kompetitiv ELISA til antigenbestemmelse.

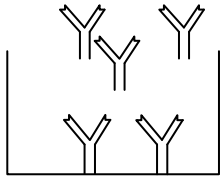
Brøndene er coatet med et antigen svarende til prøvens antigen. Efter coating tilsættes prøve/standard og antistof samtidig. Jo mere antigen der er i prøven/standard, des mindre antistof binder sig til det immobiliserede antigen, dvs. at responset falder med stigende antigenkoncentrationen. Efter inkubation fjernes komplekser mellem prøveantigen og antistof ved vask. Derefter inkuberes med enzymkonjugeret sekundært antistof. Overskud heraf fjernes ved vask, hvorefter der tilsættes substrat, som af enzymet omdannes til et farvestof, der måles på ELISA-reader. Jo mere antigen der er i prøven, des mindre antistof bindes til pladen, hvorved responset falder.

Sideløbende medtages en kontrol på, at metoden er i orden. Dette er en nul-prøve kaldet



Figur 51. Indirekte molekyler, der ind

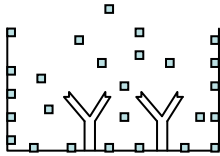
# Høuse MBL ELISA



1) Coatning med primært antistof



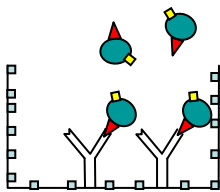
Vask



2) Blokering



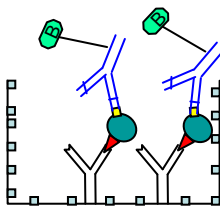
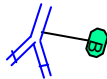
Vask



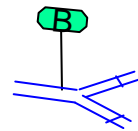
3) Inkubering med prøver/serum



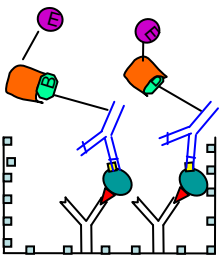
Vask



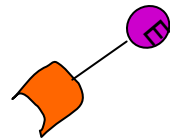
4) Inkubering med detektionsantistof



Vask

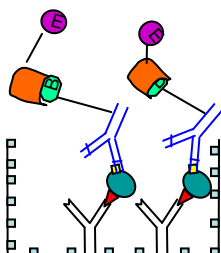


5) Inkubering med konjugat  
(streptavidin koblet med enzymet  
HRP)



Substrat  $\xrightarrow{E}$  Farve

Vask



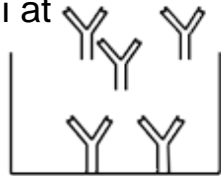
6) Inkubering med substrat  
(farvereagens TMB)

Tilsætning af stopreagens 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
og måling af absorbans 450 nm – 650 nm

## Høns MBL ELISA

ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) er en immunkemisk metode til at detektere diverse antigener eller antistoffer i en given prøve. Høns MBL ELISA som udføres i dette forsøg, er en sandwich ELISA. Princippet for dette er kort fortalt at et antistof i bunden af pladebrønde indfanger antigener i serum, som detekteres af et reporter antistof.

- 1) Coatning: Dagen før prøverne skal analyseres med ELISA, coates pladen med primært antistof. Det primære antistof er specielt udvalgt, da det kan genkende og binde det antigen man er interesseret i at måle, i ens prøve (serum). Dette skal coate i 24 timer.



Vask:

For at fjerne overskydende antistof, som ikke har bundet til pladen.

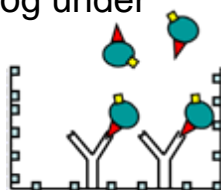
- 2) Blokering: Om morgenen blokeres pladen med et inaktivt protein, for at udrydde ledige bindings-pladser på pladen.



Vask:

Overskydende protein fjernes.

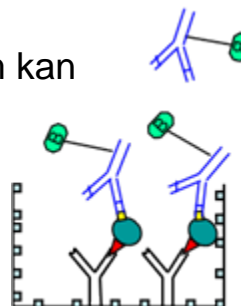
- 3) Inkubering med prøve: Serum (og standarder) sættes på pladen og under inkubationen dannes et antigen-antistof kompleks.



Vask:

Øvrige stoffer, end det der kan binde vaskes væk.

- 4) Inkubering med detektions antistof. Tredje lag er et antistof som kan binde et andet sted på det antigen man er interesseret i.



Vask:

Overskydende detektions antistof vaskes væk.

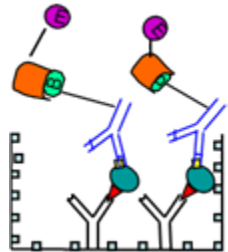


## Høns MBL ELISA

- 5) Inkubation med konjugat.: konjugatet kan binde til en side gruppe på detektions antistoffet. Konjugatet har en bundet enzymet HRP (horse radish peroxidase) som kan spalte substratet TMB som udgiver en farve.

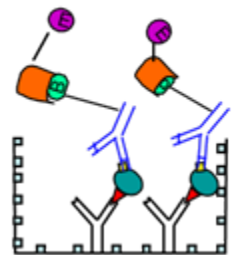
Vask:

Fjerner overskydende konjugat.



- 6) Inkubering med substrat.: Substratet TMB tilføres til brøndene og der udvikles et farvestof. Intensiteten af dette er et mål for den bundne enzymmængde og dermed for mængden af antigen i prøven.

Substrat → Farve



Tilsætning af stopreagens 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, for at stoppe farvereaktionen.

Måling af absorbans 450 nm – 650 nm (intensiteten af farvestoffet) på ELISA reader.

