



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Modulární výuka jako nástroj odezvy vzdělávacího systému na potřeby praxe CZ.1.07/2.2.00/28.0029

Návod do laboratorního cvičení z klinické analytické chemie

Stanovení karcinoembryonálního antigenu (CEA) pomocí techniky ELISA

Karcinoembryonální antigen (Carcinoembryonic Antigen, CEA) je monomerní glykoprotein o molekulové hmotnosti 180 kDa, s proměnou složkou uhlovodíků o výši cca 45 – 60 %, kde na polypeptidový řetězec, který je tvořen sedmi Ig doménami zakotvenými na povrchu buňky fosfatidylinositolovou vazbou, jsou navázány sacharidové řetězce vazbou N-acetylglukosaminu na asparagin. Spolu s alfa-fetoproteinem, patří do skupiny onkofetálních proteinů, které jsou vytvářeny během embryonálního a fetálního období. Gen je lokalizován na 19 chromozomu s pravděpodobnou rolí v procesu buněčné adheze. Prvně byl tento antigen popsán r. 1965 Goldem a Freemanem jako antigen jaterních metastáz karcinomu tlustého střeva. Patří k nejdéle stanovovaným nádorovým markerům (*von Kleist, S.: Introduction to the CEA family, Int. J. Biol. Marker, 7, 1992, 132-136*).

Fyziologická produkce CEA probíhá nejintenzivněji ve vyvíjejícím se plodu, následuje maximální produkce kolem 32. týdne gravidity a postupný pokles ve 3. trimestru. Transplacentární přechod je minimální a lze jej zjistit v tělesných tekutinách asi u 5 % těhotných žen. Metabolismus CEA ovšem není přesně znám, jeho degradace probíhá v játrech (*Cibula D., Petruželka L. a kol.: Onkogynekologie, Praha, 2009*).

Expres CEA je přítomna v některých fetálních tkáních a u dospělého člověka se vyskytuje v normální tkáni tlustého střeva, v epiteliálních buňkách prostaty a nízkou expresi lze detekovat i v leukocytech. Ačkoliv není ani orgánově ani nádorově specifický, lze jej použít u řady nádorů. Hlavním zdrojem patologicky zvýšené hladiny CEA jsou z 55 – 60 % pokročilejší karcinomy tlustého střeva a konečníku. Dále zvýšené hodnoty nacházíme u pacientů s karcinomem žaludku, pankreatu či žlučových cest. Kromě gastrointestinálního traktu, se zvýšené hladiny CEA nachází u 70 % pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic, močového měchýře a štítné žlázy. V poslední řadě i nádory ženských orgánů jsou charakteristické syntézou CEA, jedná se zejména o karcinomy vaječníku, adenokarciomy děložního hrdla a karcinomy endometria (*Kaušitz, J.: Rádioimunoanalýza v onkologii. LF UK Plzeň, 1995*).

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) představuje jednu z nejpoužívanějších bioanalytických metod v praxi a to především díky její specificitě, jednoduchosti a snadné automatizovatelnosti. Metoda ELISA je založena na specifické interakci antigenu (antigen, Ag) s příslušnou protilátkou (antibody, Ab).



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



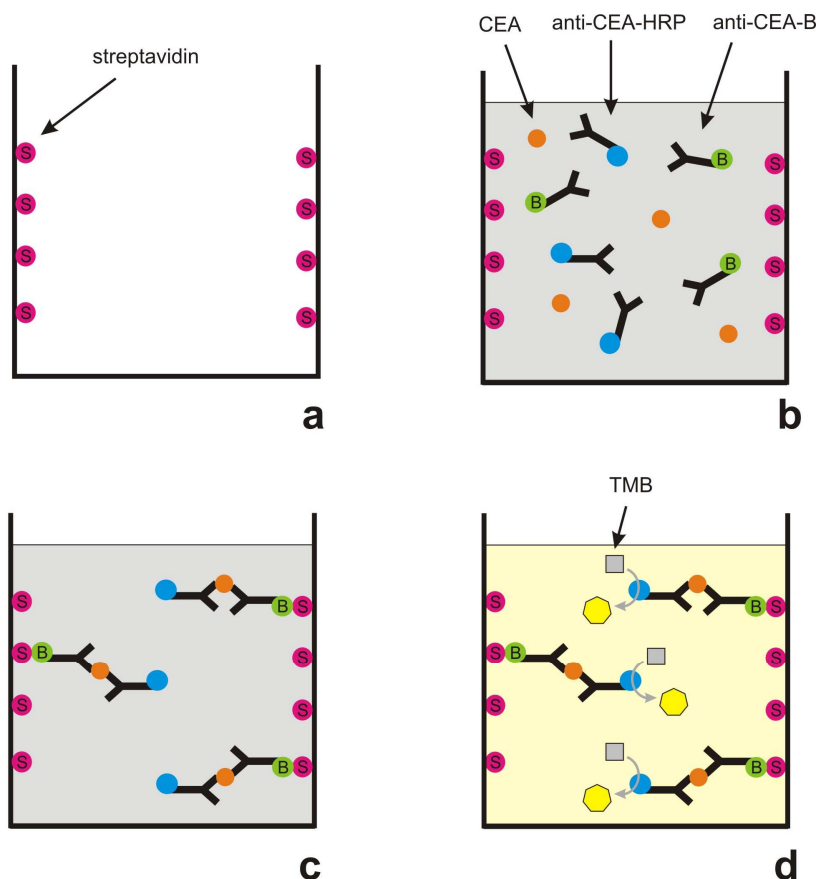
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Modulární výuka jako nástroj odezvy vzdělávacího systému na potřeby praxe CZ.1.07/2.2.00/28.0029

V případě prováděného testu na stanovení CEA (sendvičové ELISA technice) se navíc využívá vysoké afinity biotinu k streptavidinu. Streptavidinem (S) jsou potaženy stěny jamek na mikrotitrační destičce (Obr. 1a). V prvním inkubačním kroku je vzorek smíchán s tzv. enzymovým konjugátem, tj. roztokem obsahujícím monoklonální protilátky proti CEA značené peroxidáso (anti-CEA-HRP) a monoklonální protilátky proti CEA biotinylované (anti-CEA-B), viz obr. 1b. Během konjugace dochází k vytvoření sendvičového komplexu vázaného na stěně jamky (S/anti-CEA-B/CEA/anti-CEA-HRP), viz obr. 1c. Po inkubaci a vymytí zbytku konjugučního roztoku se aplikuje roztok obsahující substrát pro reakci s křenovou peroxidázou (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin s peroxidem močoviny a acetátovým pufrém), který reaguje s enzymem za vzniku modrého zbarvení (viz obr. 1d). Po inkubaci se reakce zastavuje roztokem kyseliny sírové, který převádí modré zbarvení na žluté, které se spektrofotometricky měří.



Obr. 1: Schéma stanovení CEA



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

**Modulární výuka jako nástroj odezvy vzdělávacího systému na potřeby praxe
CZ.1.07/2.2.00/28.0029**

ÚKOL

Proveďte stanovení karcinoembryonálního antigenu (CEA) ve vzorku séra technikou ELISA pomocí kitu IMTEC.

POSTUP

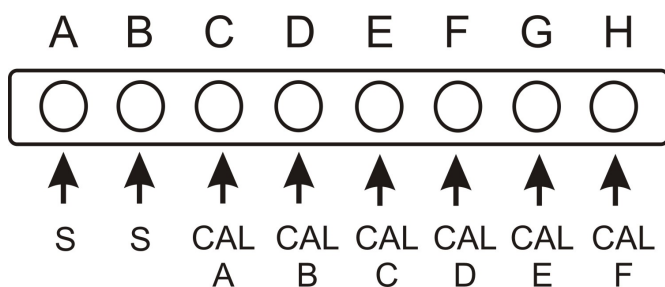
Se všemi vzorky i roztoky pracujte jako s potenciálně infekčním materiálem – v rukavicích!

Reagencie:

- sada kalibrátorů IgG (CAL) o koncentracích 0 ng/ml (A); 5,0 ng/ml (B); 10,0 ng/ml (C); 25 ng/ml (D); 50 ng/ml (E); 250 ng/ml (F)
- koncentrovaný promývací pufr (WS): MOPS-NaCl, 0,05 mol/l, pH 8,8
- konjugační roztok (CON): anti-CEA-HRP (kozí) a anti-CEA-B (myší), pH 7,45
- substrátová reagencie A (SA) 1 g/l 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB), 0,05 mol/l acetátový pufr, pH 3,5
- substrátová reagencie B (SB) 0,8 g/l peroxid močoviny, 0,05 mol/l acetátový pufr, pH 4,5
- zastavovací roztok (STOP) 0,5 mol/l H₂SO₄

Postup:

1. Všechny části ELISA kitu nechte vytemperovat na teplotu místnosti.
2. Připravte promývací pufr (WASH) naředěním koncentrovaného pufru (WS). Celý obsah lahvičky koncentrovaného pufru (WS) nalejte do 1000 ml deionizované vody. Lahvičku od koncentrátu (WS) několikrát propláchněte takto připraveným roztokem (WASH). Promývací pufr skladujte ve tmě v lednici, je stabilní 60 dnů.
3. Připravte roztok substrátu (SUB) smícháním substrátové reagencie A (SA) a substrátové reagencie B (SB) v poměru 1:1. Roztok substrátu (SUB) skladujte ve tmě v lednici, je stabilní 30 dnů.
4. Do jamek mikrotitrační destičky (MTP) potažených streptavidinem napipetujte postupně 25 µl vzorku (S), vzorek pipetujte do dvou jamek, a kalibrátorů (CAL A – F), viz obrázek.





evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

**Modulární výuka jako nástroj odezvy vzdělávacího systému na potřeby praxe
CZ.1.07/2.2.00/28.0029**

5. Napipetujte do každé jamky 100 μ l konjugačního roztoku (CON). Pipetou roztoky v každé jamce pečlivě promíchejte (několikrát naberte a vypusťte roztok, použijte pipetu nastavenou na objem cca 110 μ l). Nedotýkejte se vnitřní stěny jamky! Na každou jamku použijte novou špičku! Roztoky v mikrotitrační destičce jemně promíchejte.
6. Mikrotitrační destičku zavřete lepícím proužkem a ponechte inkubovat 60 minut při 25°C.
7. Odstraňte roztok z jamek mikrotitrační destičky a jamky promyjte 3x 300 μ l zředěného promývacího pufru (WASH). Odstraňte promývací pufr z jamek. Mikrotitrační destičku obraťte dnem vzhůru nad buničinou na odstranění zbytku pufru.
8. Napipetujte do každé jamky 100 μ l roztoku substrátu (SUB). Opět mikrotitrační destičku uzavřete lepícím proužkem a ponechte inkubovat 15 min při 25°C.
9. Přidejte do každé jamky 50 μ l zastavovacího roztoku (STOP). Pipetou roztok vždy krátce promíchejte.
10. Změřte absorbanci v každé jamce mikrotitrační destičky při 450 nm. Měření proveďte do 10 minut po ukončení reakce (přidání zastavovacího roztoku).

POZN.:

Očekávané hodnoty:

	hladina CEA
nekuřáci	< 5 ng/ml
kuřáci	< 10 ng/ml