

Optimalisatie ELISA analyse voor calprotectine meting

T. De Clippeleir, C. Verspecht, I. Reniers

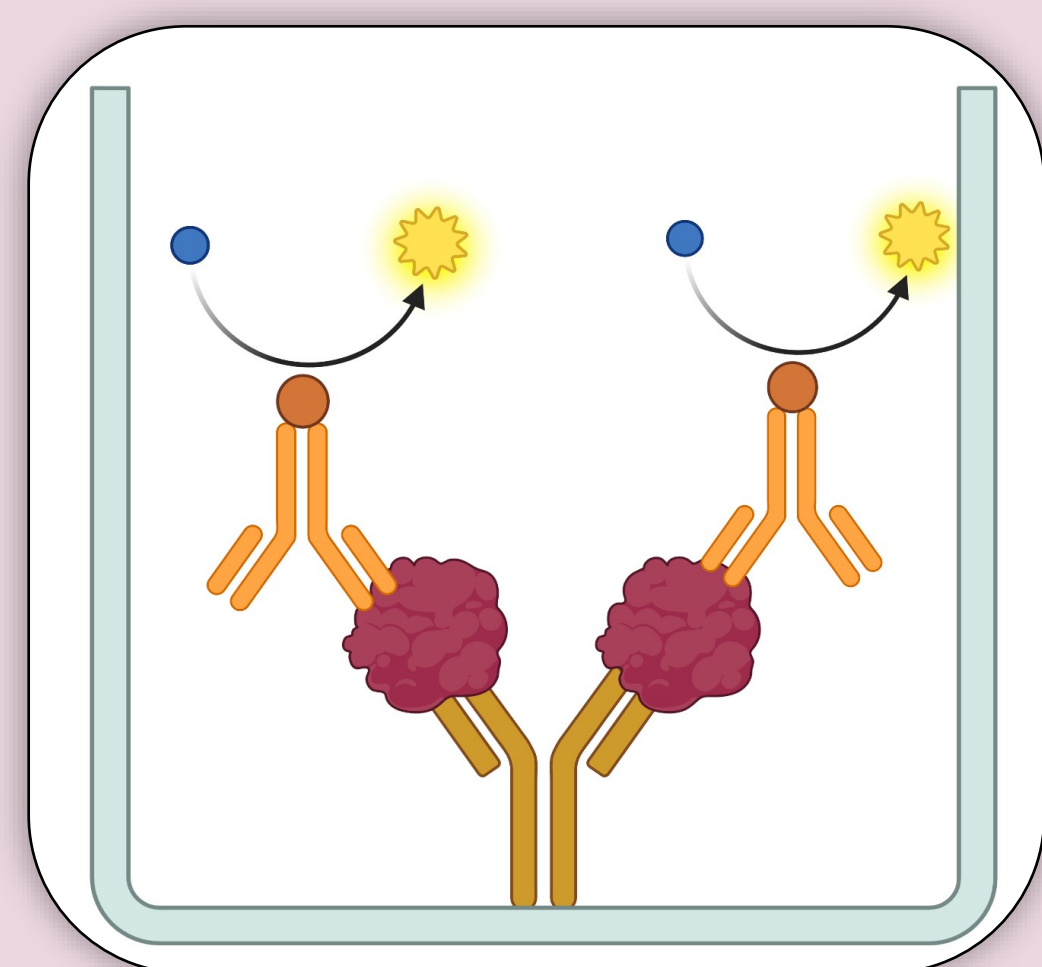
Rega-Instituut KU Leuven Laboratorium Moleculaire Bacteriologie

Inleiding

Calprotectine is een ontstekings eiwit en wordt gezien als merker voor intestinale inflammatie. Calprotectine wordt vrijgegeven door neutrofiële granulocyten, monocyt en macrofagen op de plaats van ontsteking bij bv. inflammatoire bowel disease (IBD) en irritable bowel syndrome (IBS). De opzet van de experimenten is om een veelgebruikte analyse, ELISA, te vergelijken met een vlottere techniek. Als met deze vlottere techniek dezelfde resultaten verkregen worden, zouden er sneller resultaten worden bekomen die het laboratorium efficiënter maken. Hiervoor werden 2 experimenten uitgevoerd met hetzelfde protocol waarbij de stalen in duplo worden gelopen: enerzijds a.d.h.v. de huidige methode en anderzijds met de deepwell-methode. Het eerste experiment bevatte 8 stalen, gemeten op 3 verschillende dagen en het tweede experiment bevatte 40 stalen, gemeten op 1 dag.

Graag wil ik mijn stagementoren, Chloë en Iris, bedanken voor al hun wijsheid, vriendelijkheid en behulpzaamheid.

Materialen en methoden



TMB → Geel

Monoclaal detectie antilichaam met mierikswortelperoxidase

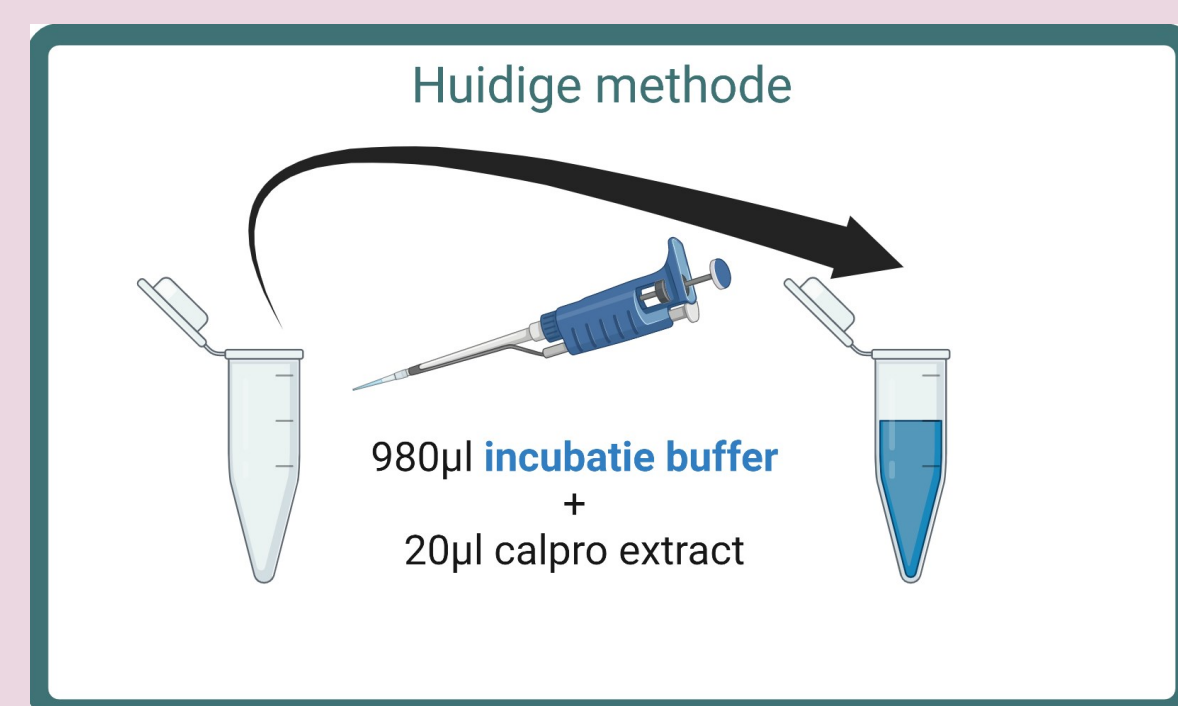
Calprotectine

Monoclaal capture antilichaam specifiek voor calprotectine

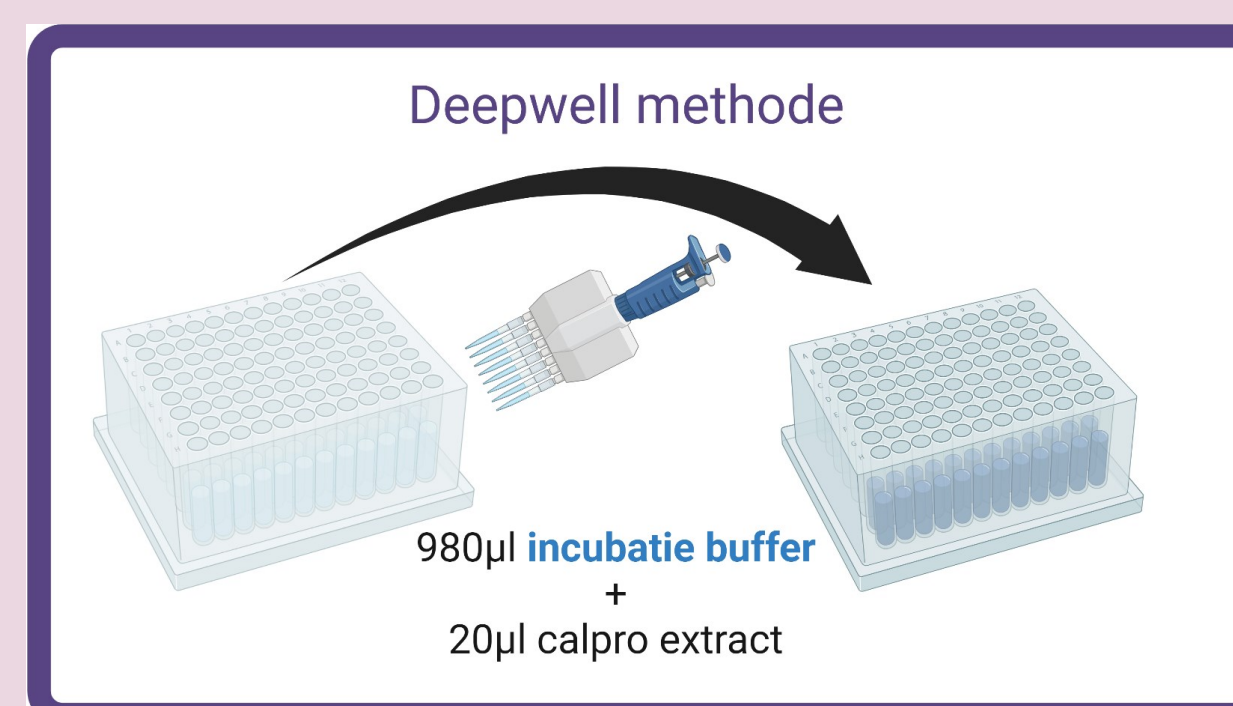
Figuur 1: Sandwich ELISA. Substraat: TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine omgezet naar geel product door het enzym mierikswortelperoxidase

Vorbereiding:

- Extractie met calprotubes en extractie buffer

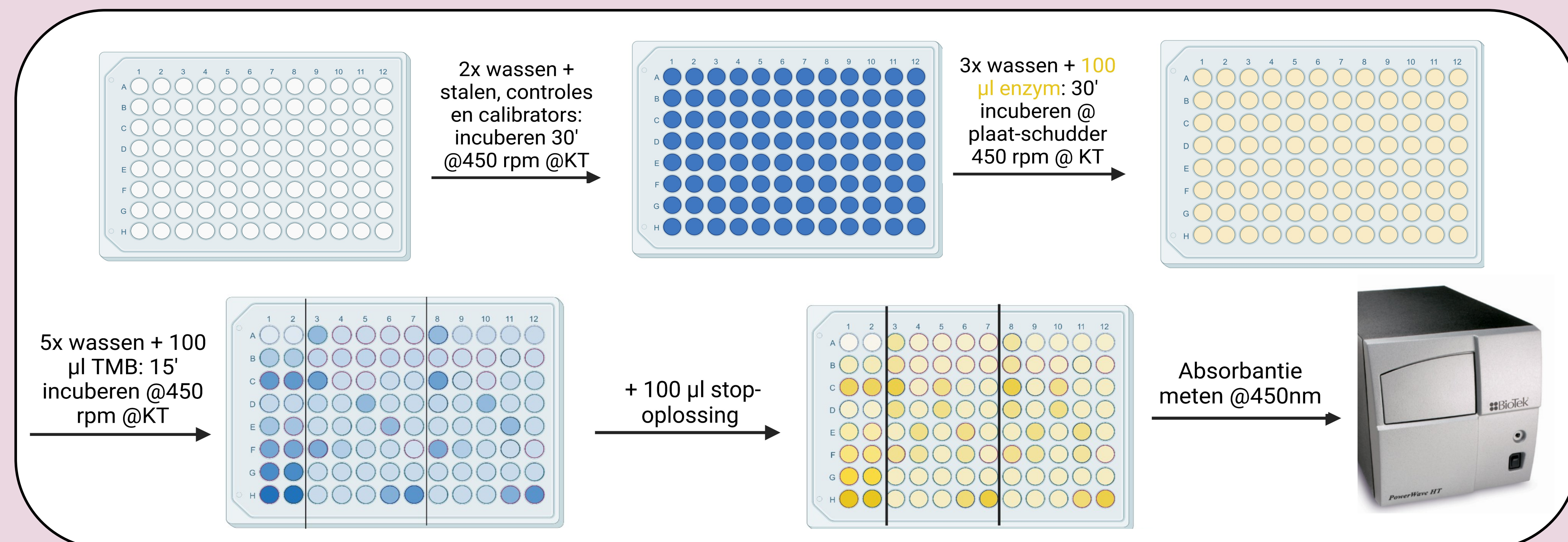


VS



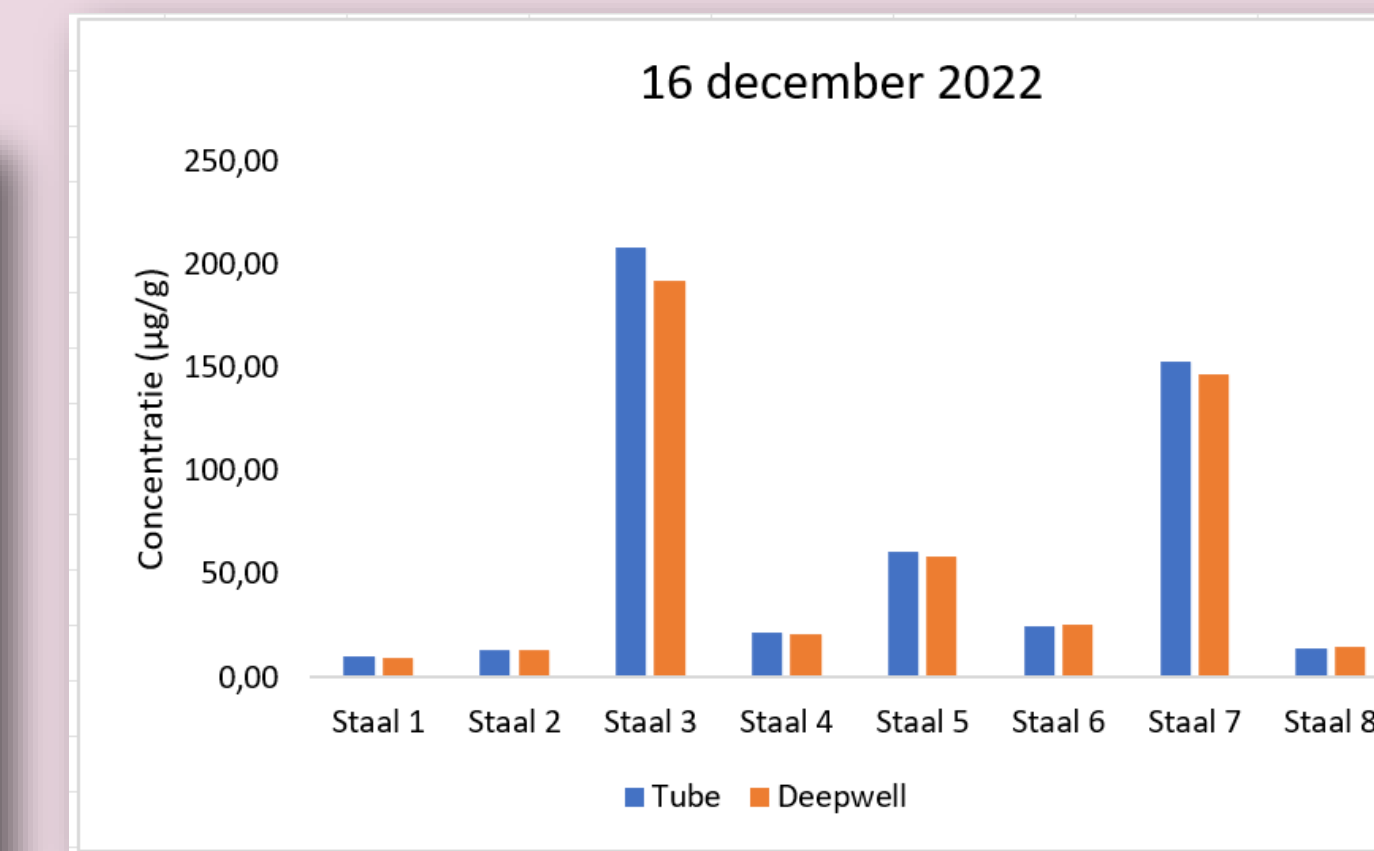
Mengen +
30' incuberen @KT

ELISA:



Figuur 3: protocol ELISA plaat: kolom 1 en 2 : blanco, lage controle serum afgeleide calprotectine, hoge controle serum afgeleide calprotectine, standaardreeks 10-30-100-300-600 µg/g. (opstelling experiment 2: kolom 3-7: huidige methode, kolom 8-12: deepwell-methode)

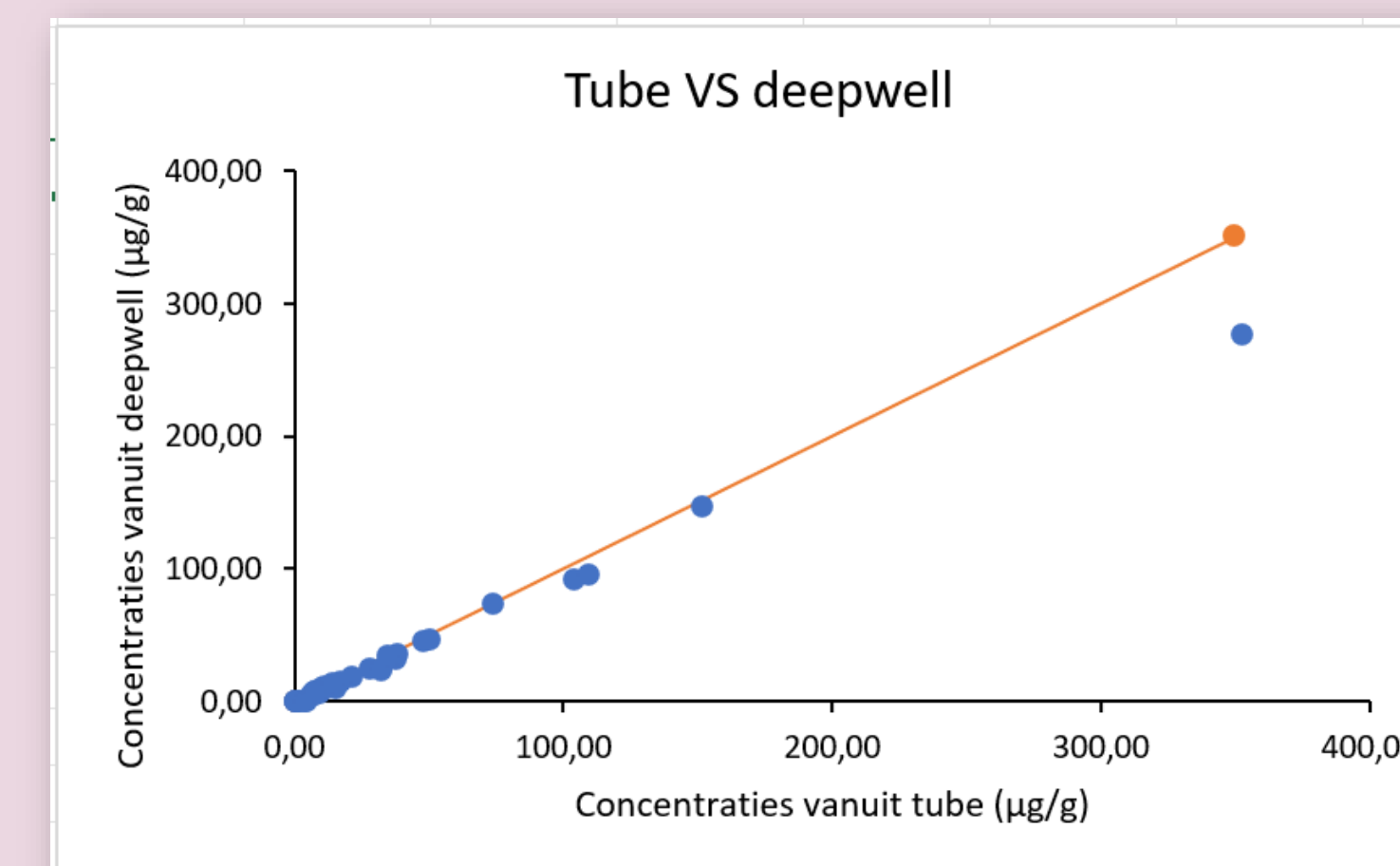
Resultaten



	9/12/2022			16/12/2022			22/12/2022		
	SD (µg/g)	Gem. (µg/g)	CV (%)	SD (µg/g)	Gem. (µg/g)	CV (%)	SD (µg/g)	Gem. (µg/g)	CV (%)
Staal 1	1,29	6,94	18,60	0,37	9,48	3,87	0,92	6,83	13,53
Staal 2	0,94	12,21	7,68	0,33	12,88	2,59	0,92	11,77	7,79
Staal 3	15,38	196,55	7,82	11,81	199,87	5,91	10,01	176,82	5,66
Staal 4	1,62	21,91	7,40	0,66	21,01	3,14	1,70	20,70	8,22
Staal 5	3,78	60,14	6,29	1,62	59,11	2,75	0,66	58,59	1,13
Staal 6	1,88	24,40	7,71	0,33	24,59	1,36	0,86	22,26	3,86
Staal 7	9,96	147,57	6,75	4,43	149,42	2,96	4,13	137,07	3,01
Staal 8	0,00	14,61	0,00	0,11	14,02	0,78	0,73	14,92	4,86

Tabel 1: SD: standaard deviatie; gem.: gemiddelde; CV: covariantie = SD/Gem.*100

Figuur 4: Histogrammen voor de 8 stalen per dag weergegeven : tube VS deepwell



Figuur 5: 40 stalen met huidige methode VS deepwell methode: spreidingsgrafiek met bissectrice

Experiment 2

Op figuur 5 liggen de punten, de 40 stalen, dicht bij de bissectrice, mits wat uitschieters. Dit wijst op een algemeen goede correlatie.

Conclusie/discussie

Experiment 1: De hoge covarianties zijn het eventuele gevolg van onvoldoende homogenisering en niet gecentrifugeerd te hebben. Hoe lager de concentratie hoe groter de fout. Op dagen 16 en 22 december werd hier rekening mee gehouden en zijn de covarianties lager. Hoe dan ook zijn alle drie de dagen goedgekeurd binnen het vastgestelde maximale covariantie van 15% en zelfs tot 20% indien het uitzonderlijk voorkomt zoals bij staal 1 op 9 december. Waarden onder 10 µg/g worden altijd opnieuw meegenomen in een volgende analyse om te verzekeren dat ze echt zo laag zijn.

Experiment 2: De 40 stalen zien er op figuur 5 heel goed uit, omdat ze bijna allemaal mooi op de bissectrice liggen. Bij de berekende covarianties van experiment 2 zijn er meer uitschieters omwille van lage waarden <10 µg/g. (weergegeven in een tabel in bijhorend artikel). Dit experiment van 40 stalen werd uitgevoerd om de invloeden te bekijken van meerdere stalen.

Beide experimenten waren een succes. De deepwell plaat zou de tubes kunnen vervangen, maar eerst zou er een experiment met 80 stalen uitgevoerd moeten worden om een hele plaat na te bootsen.

Referenties

1. Figuur 1, 2 en 3 zijn gecreëerd met BioRender
2. Figuur 4 en 5 zijn gecreëerd met Excel
3. Standard Operating Procedure: Calprotectin Extraction and Measurement using ELISA geschreven door Jiyeon Si afgeleid van de kit handleiding.