



IMMUNOLÓGIAI ÉS
BIOTECHNOLÓGIAI
INTÉZET



9. Praktikum: Immunserologie 2. ELISA, Immunblotting Techniken

Grundlagen der Immunologie

Universität Pécs, Klinisches Zentrum
Institut für Immunologie und Biotechnologie
Pécs, 2024.

Definition der Serologie (Erinnerung)

- Die wissenschaftliche Erforschung des **Blutserums** oder anderer Körperflüssigkeiten; In der Praxis handelt es sich um die Identifikation von **Antikörpern** im Serum.
- Erinnern Sie sich?
 - **Blutplasma**: Überstand des antikoagulierten Blutes
 - **Blutserum**: Überstand des koagulierten Blutes
- Basiert auch auf der **Antigen-Antikörper Reaktion**. (beide können detektiert werden)
- Welche Methoden umfasst die Serologie?
 - Methoden auf Basis der **Präzipitation**
 - Methoden auf Basis der **Agglutination**
 - **Immunassays** (ELISA, ELISPOT, Radioimmunassay, etc.)
 - **Immunblotting Technik** (Western blot, Dot blot)
 - **(Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie)**
- Wichtigste Klinische Anwendungen:
 - Diagnostik von **infektiösen Krankheiten** (z.B. Detektieren von Antikörpern die gegen Pathogene produziert werden)
 - Diagnostik **autoimmuner Störungen** (Detektieren von **Autoantikörpern**)
 - Diagnostik der **Immundefizienzen** (Bestimmen des Immunglobulin-Levels)
 - Bestimmen der Blutgruppe

Indirekt ELISA Praktikum

Schritte des Praktikums:

Sie werden verschiedene ELISA-kits auf ihren Tischen finden.

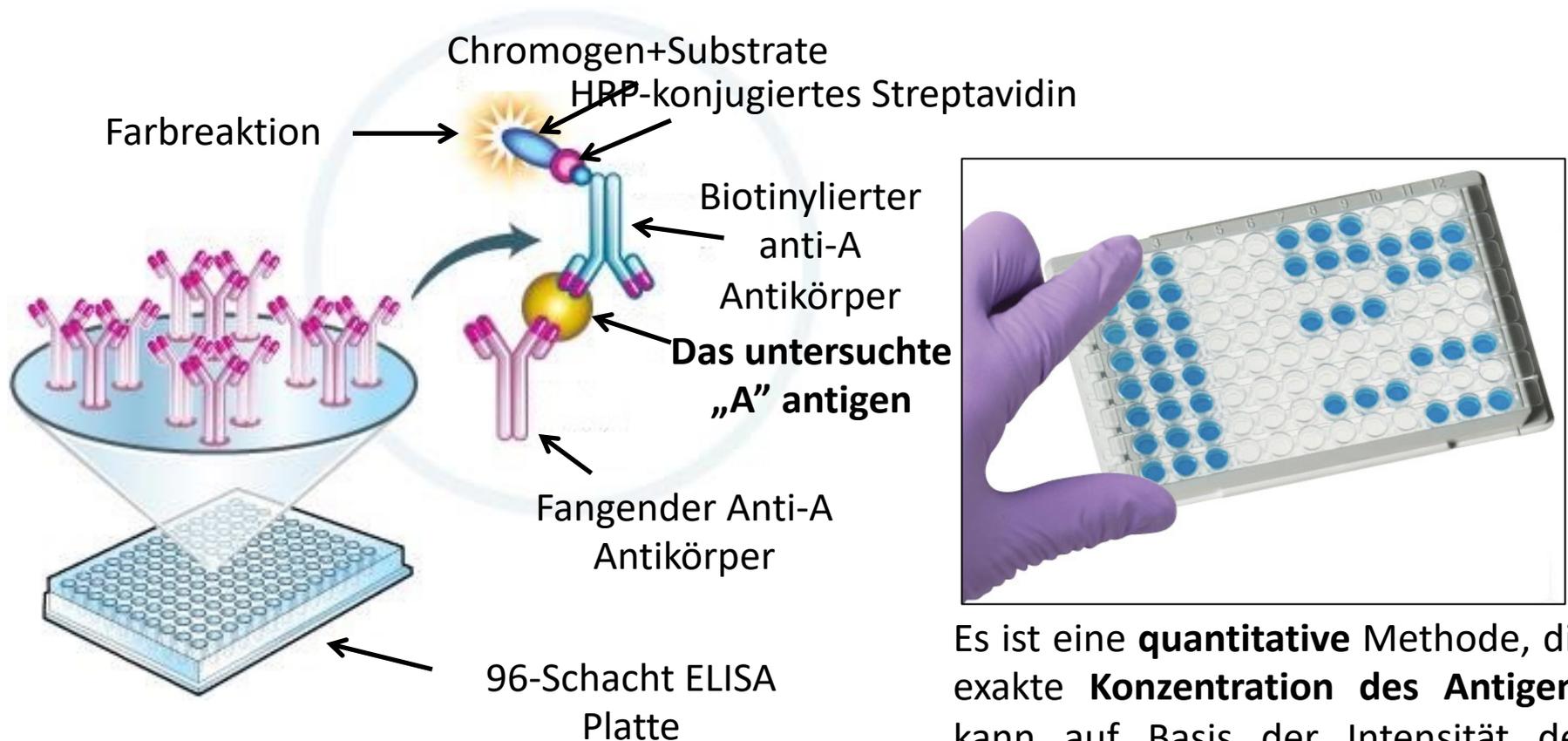
1. **Sensibilisierung:** Binden des Antigens zur Mikrotiterplatte.
 2. **Blocken:** Blocken der nicht-spezifischen Bindungsstellen mit Gelatine
- } Schon gemacht
3. "Loading" der untersuchten **Proben** und der **Standard-Kontrollen**. (**100µl, 30 Minuten** Inkubation) Sie nutzen nur die Standards für die Demonstration.
 4. **Waschen** Sie die Platten dreimal.
 5. **100µl** anti-human IgG-PO oder IgM-PO **Antikörper (30 Minuten Inkubation)**.
 6. **Washen** Sie die Platten dreimal.
 7. **Entwickeln der Farbreaktion** mit 100µl Tetramethylbenzidin (TMB) Lösung.
 8. Stoppen der Reaktion durch hinzufügen von 50µl Stop-Lösung.
 9. (Photometrische Detektion, Auswertung der Ergebnisse.)

**HANDSCHUHE
TRAGEN!**



ELISA Grundlagen I.

- **ELISA** = **E**nzyme-**L**inked **I**mmunosorbent **A**ssay^[1.]
- Ein Beispiel der Funktionsweise von ELISA: (so-genanntes Sandwich ELISA, siehe die folgenden Folien):

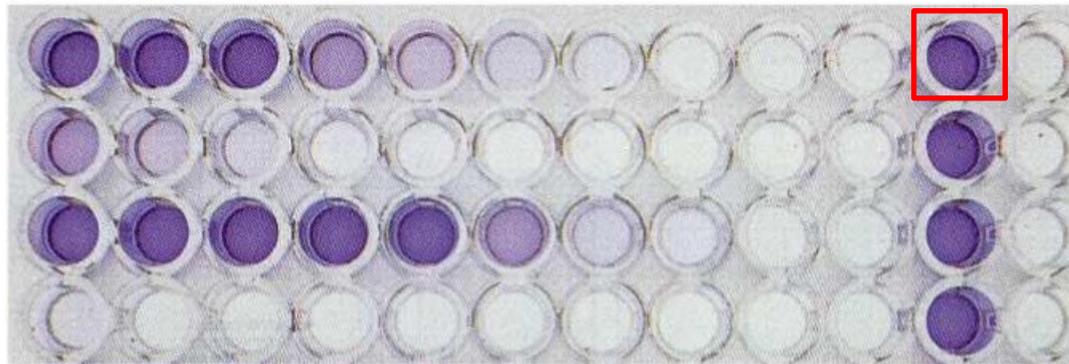
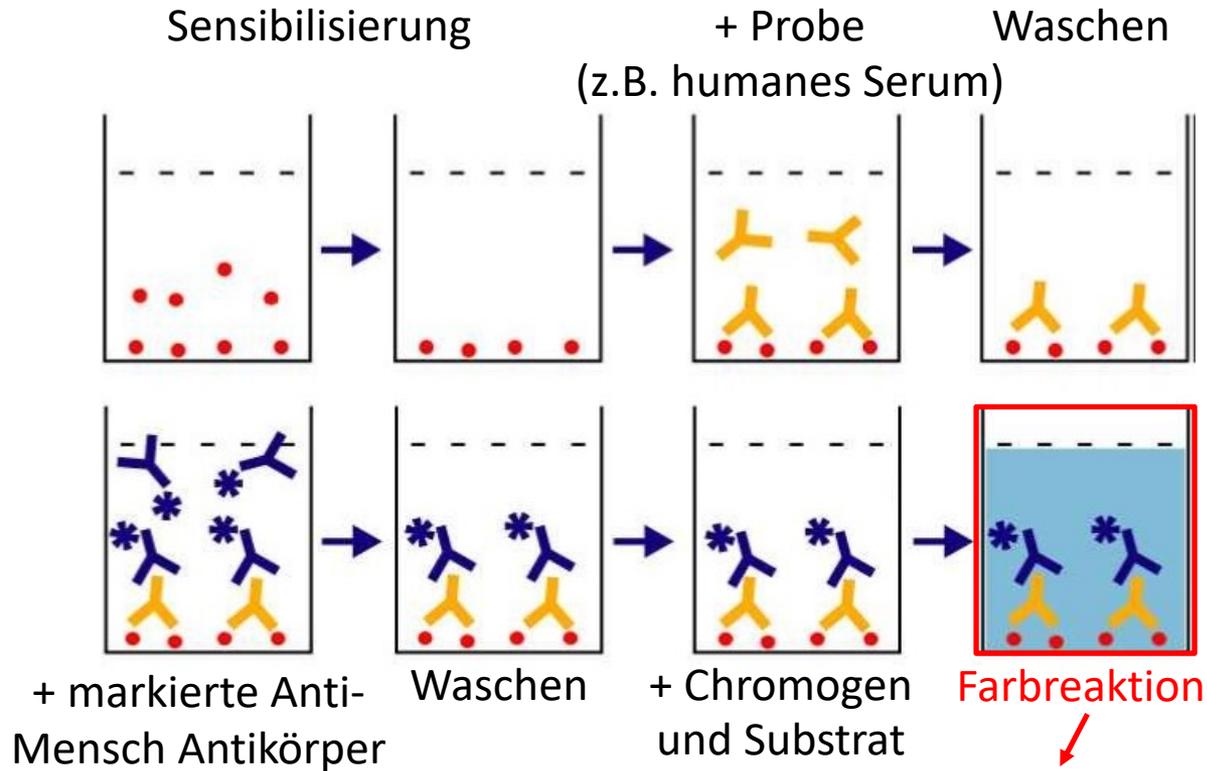


Es ist eine **quantitative** Methode, die exakte **Konzentration des Antigens** kann auf Basis der Intensität der Farbreaktion bestimmt werden.

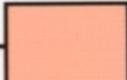
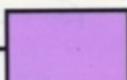
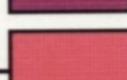
ELISA Grundlagen II.

- Es basiert auf der **Antikörper-Antigen Reaktion**, **beide** können **detektiert werden**.^[2.]
- **Sensibilisierung**: Einer der Teilnehmer wird an eine feste Oberfläche gebunden.
- **Blocken**: Blocken nicht-spezifischer Bindungsstellen.
- Der untersuchte Teilnehmer (entweder das Antigen oder der Antikörper) ist in einer **löslichen Form**. (z.B. Blutserum)
- Das Fang-Antigen/Antikörper wird seinen löslichen Liganden binden und **gebunden Immunkomplexe bilden sich**.
- Komponenten die nicht an die Oberfläche gebunden sind werden durch waschen entfernt.
- Die gebundenen Immunkomplexe können mit einer enzymatischen Farbreaktion entweder direkt oder indirekt detektiert werden.
- Das gefärbte Endprodukt des Chromogens ist löslich und diffundiert in die Lösung.
- Die **Konzentration** des untersuchten Teilnehmers **kann berechnet werden** indem man die **Lichtabsorption** der Lösung misst und **Standard-Proben** mit bekannten Konzentrationen nutzt. → **Es ist eine quantitative Methode!**

Prinzip des ELISA (indirektes ELISA)



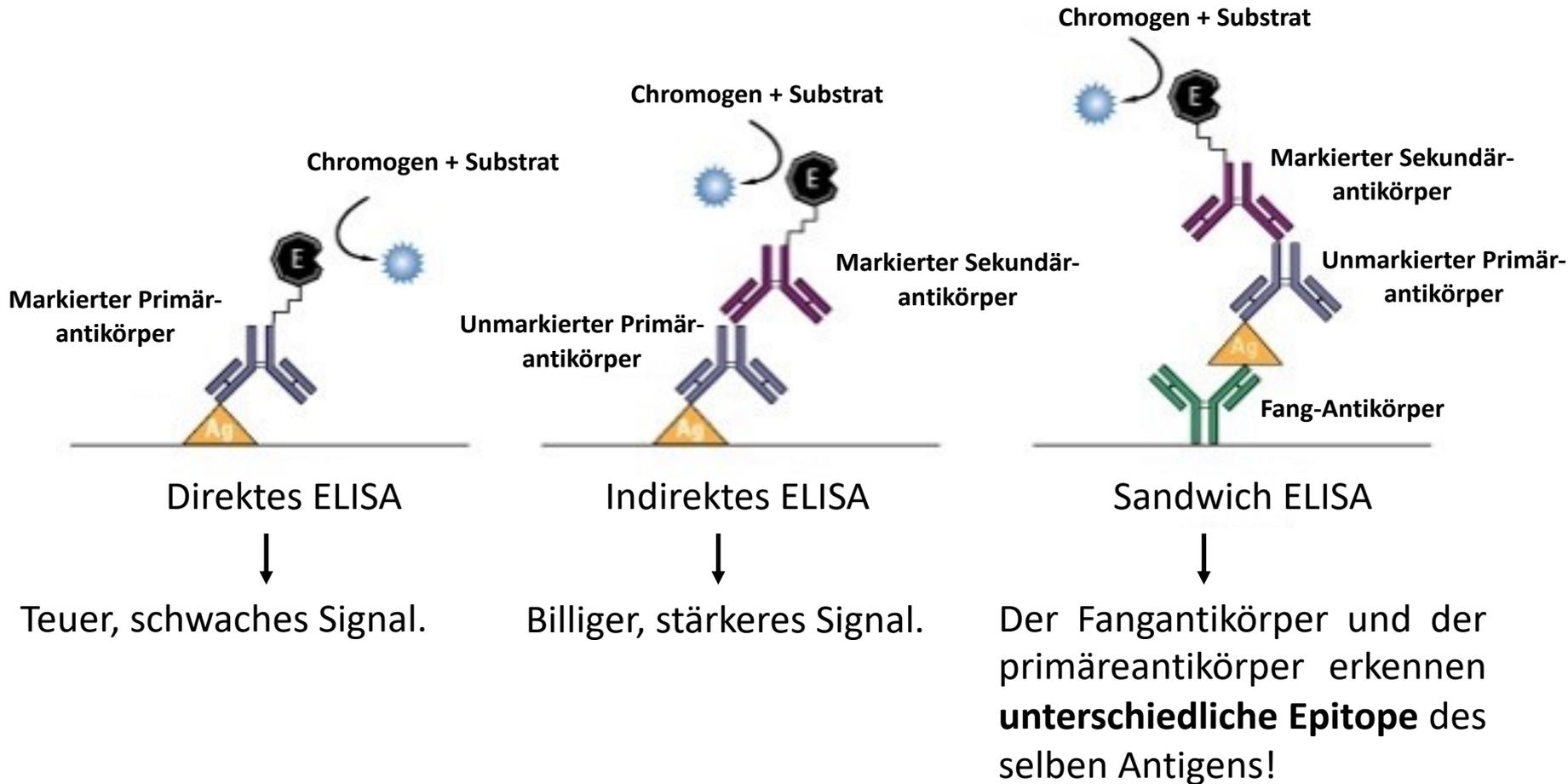
ALP	p-Nitrophenyl phosphat (pNPP)		soluble	ELISA
	Nitro blau Tetrazolium (NBT)		insoluble	histochemistry, immunoblotting
	Fast Red		insoluble	histochemistry, immunoblotting

Peroxidase	ABTS		soluble	ELISA
	o-phenylenediamine (OPD)		soluble	ELISA
	tetramethylbenzidine (TMB)		soluble	ELISA
	o-dianisidine		soluble	ELISA
	5-aminosalicylic acid (5-ASA)		soluble	ELISA
	diaminobenzidine (DAB)		insoluble	histochemistry, immunoblotting
	3-amino-9-ethylcarbazole (AEC)		insoluble	histochemistry, immunoblotting
	4-chloro-1-naphthol (4C1N)		insoluble	histochemistry, immunoblotting

Im Fall von **ELISA** muss das **gefärbte Endprodukt** des Chromogens **löslich** sein. Das Endprodukt wird zufällig in die Lösung **diffundieren** und die **lichtabsorbierenden** Eigenschaften ändern. Lichtabsorption wird dann Schicht für Schicht durch einen ELISA Leser gemessen. [2.]

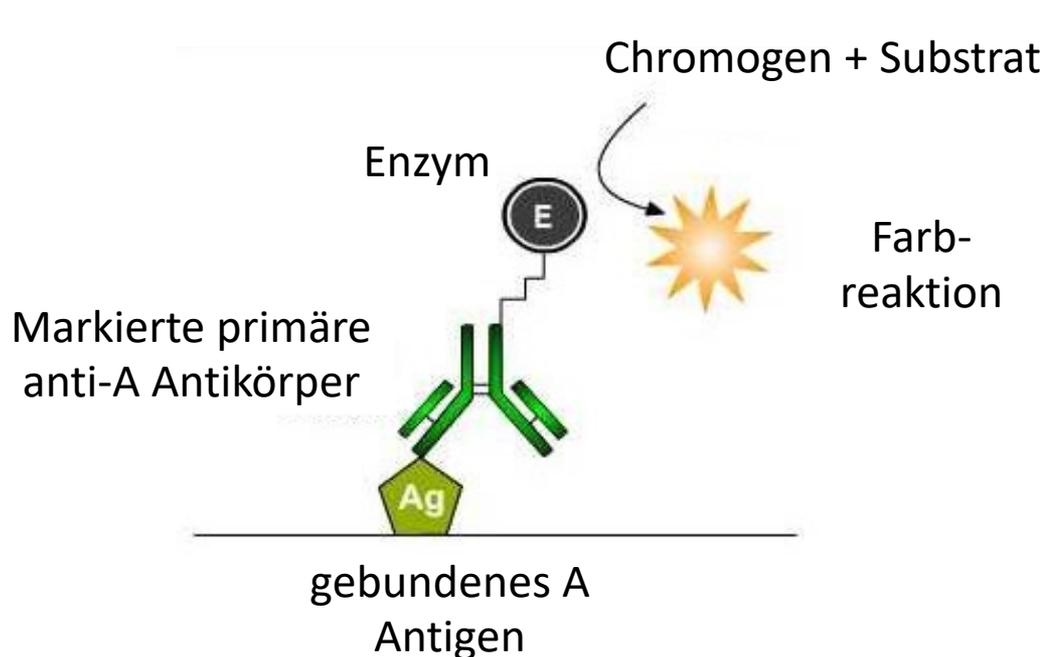
Im Fall von **Enzym IHC** und **Immunoblotting Techniken** (z.B. Westerb Blot) **muss** das Endprodukt **unlöslich** sein, andernfalls wird es wegdiffundieren. Ein unlösliches Endprodukt wird am Reaktionsort bleiben und erlaubt die Darstellung der Antigen-Antikörper Reaktion.

Wichtigste ELISA-Typen



Direktes ELISA

1. Antigen A der Probe wird an die Platte gebunden.
2. Das Antigen wird mit Enzym-markierten Anti-A Antikörpern detektiert. [3.]



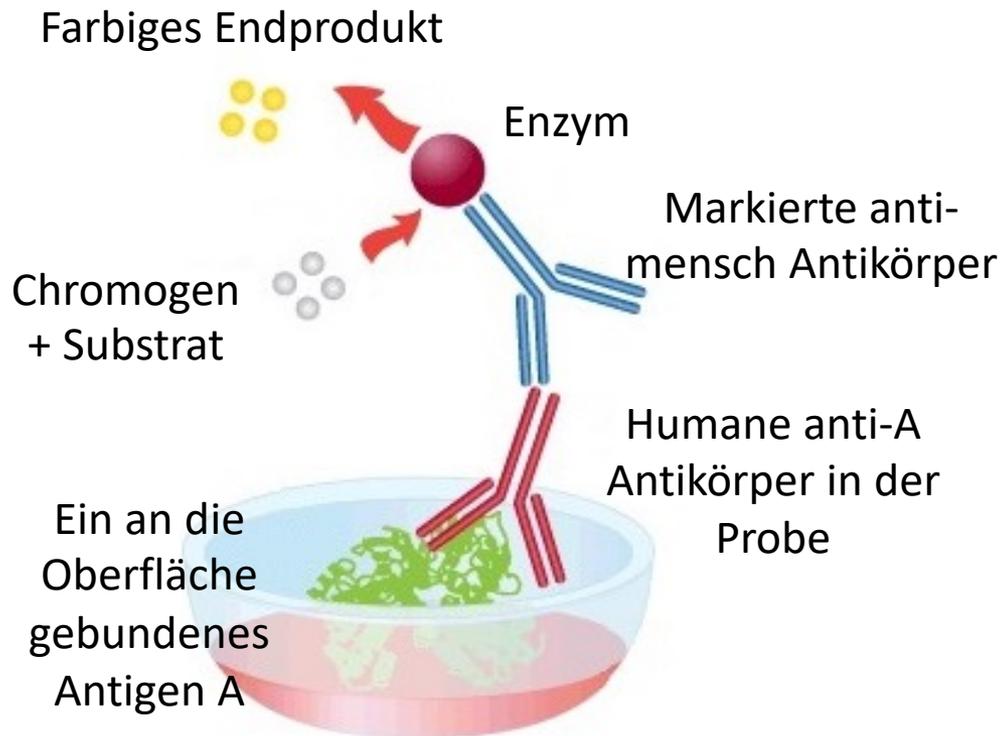
Vorteile:

- **Schnell**

Nachteile:

- **Teuer** (benötigt markierte Primärantikörper)
- **Das Signal ist schwach** weil die Proteine der Probe sich bei der Sensibilisierung kompetitiv hemmen. (Lösung: Sandwich ELISA)

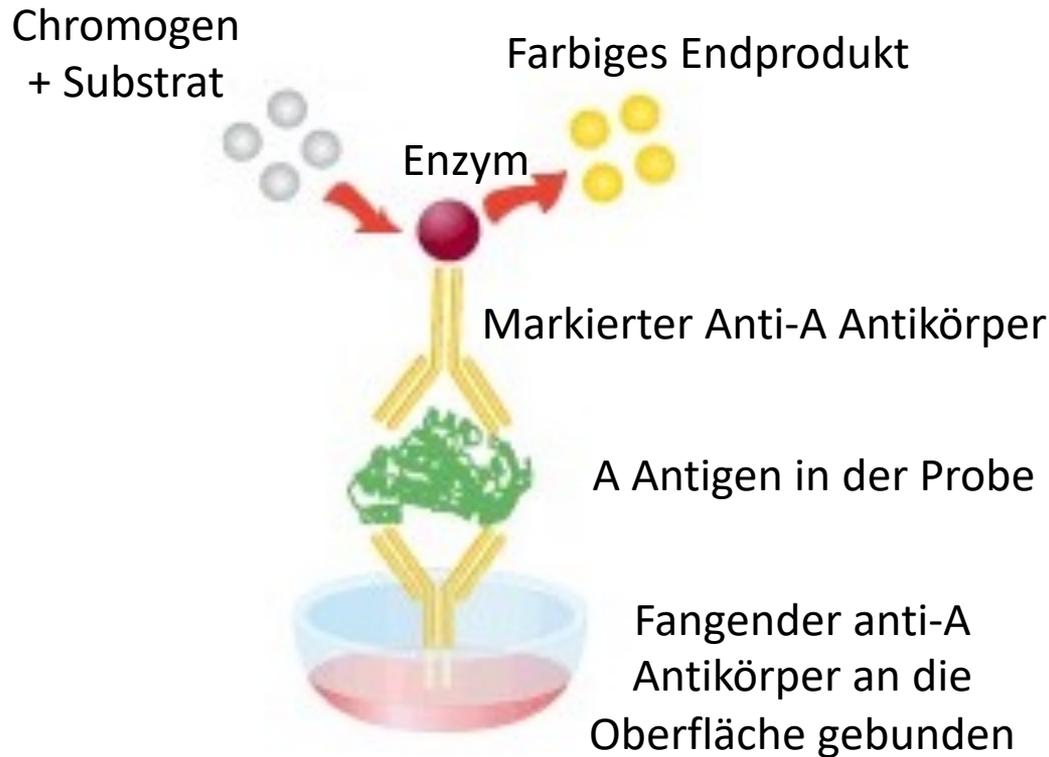
Indirektes ELISA



Anwendungen: Detektion von **Anti-körper** in der Probe, z.B.:

- Testen von **Hybridom Überständen**^[4.]
- Detektion von Antigen-spezifischen Antikörpern in Körperflüssigkeiten (z.B. Detektion von Autoantikörpern im Serum bei **autoimmunen Störungen**, siehe später)

Sandwich ELISA



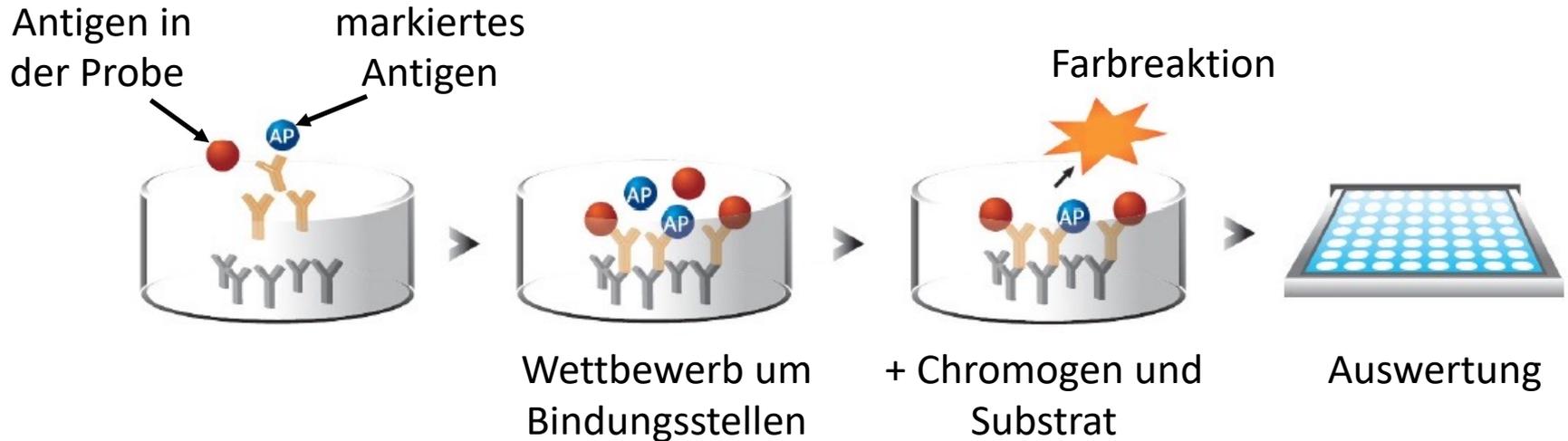
Anwendungen: Detektion spezifischer Antigene in der Probe.

z.B.:

- Zytokine
- Tumormarker
- Hormone
- Etc.

Voraussetzungen: der Fang- und der Primärantikörper müssen **verschieden Epitope** des gleichen Antigens erkennen.

Kompetitives ELISA



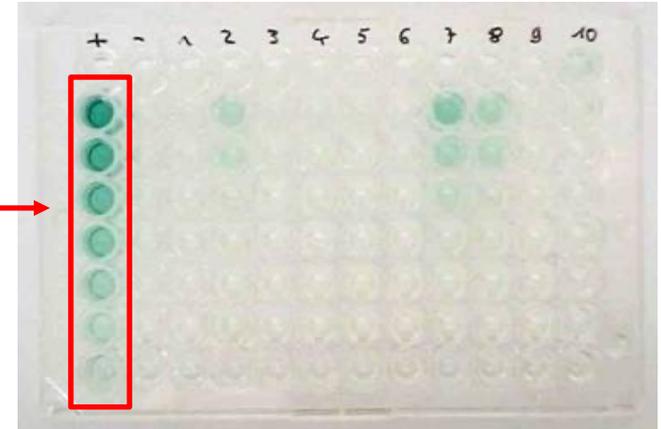
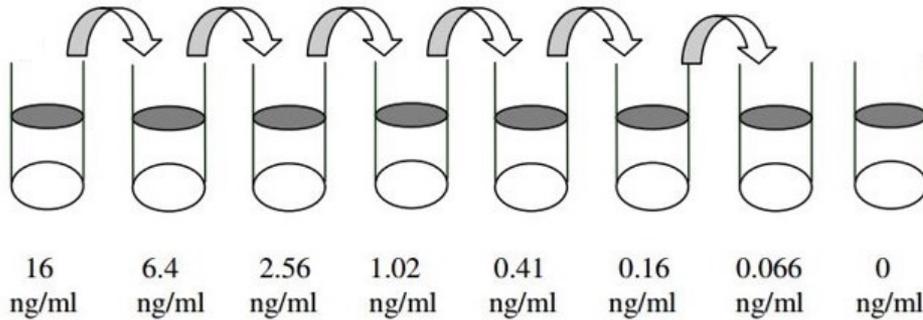
Anwendung: Detektion eines **spezifischen Antigens** in der Probe.

Prinzip:

1. Binden des anti-A Antikörpers zur Platte.
2. Eine bekannte menge des markierten Antigens wird zur Probe hinzugegeben.
3. Das unmarkierte Antigen der Probe wird mit dem **markierten** um die Bindungsstellen im Wettbewerb sein.
4. Die ungebundenen Komponenten werden durch Waschen entfernt.
5. Die Intensität der Farbreaktion ist Antiproportional zur Konzentration des Antigens in der Probe. (Je weniger Antigen in der Probe ist, desto mehr enzymmarkiertes Antigen kann die Antikörper binden.)

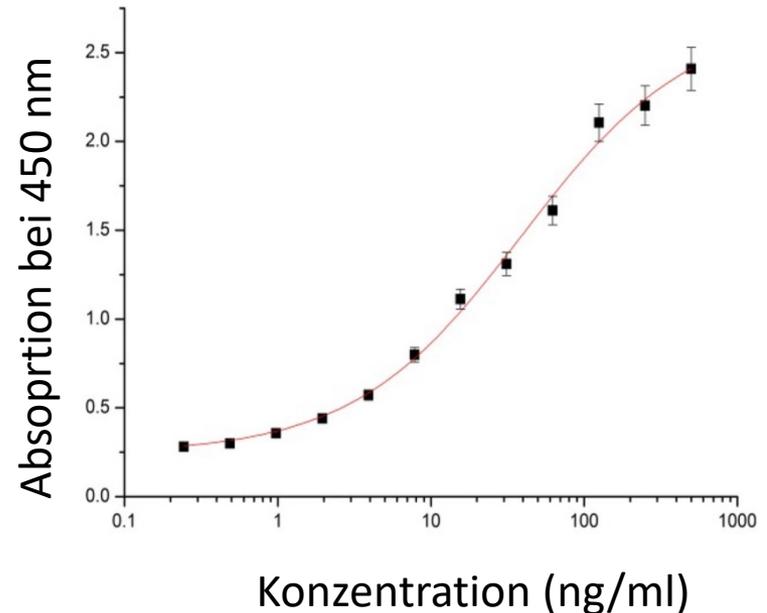
ELISA Auswertung I.

Standards mit bekannten Konzentrationen erstellen



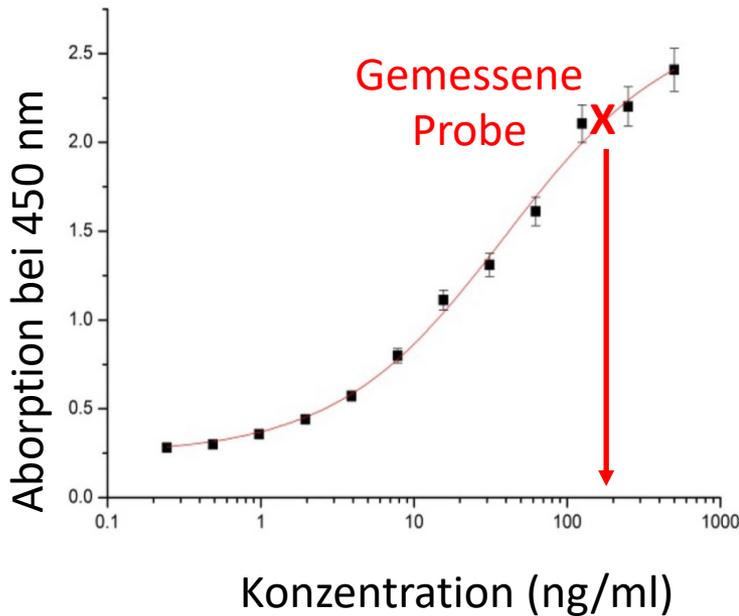
Ein ELISA Leser der die **Lichtabsorption** im Schacht der ELISA-Platte misst.

ELISA Standard Kurve:



ELISA Auswertung II.

Standard Kurve:



Die Konzentration des Antigens wird auf Basis der Lichtabsorption der Probe mithilfe der Standardkurve berechnet.

Qualitätskontroll-Zertifikat / Quality Control Certificate
Rheumatoid Factor Screen

Art-Nr. / Cat. No. ORG 522S Ch-B / Lot 522S81746 Verw. bis / Expiry Date 2010-04-28

Prüfwert / Test Value Sollbereich / Range

Standard A	0,015	< 0,150
Standard E	2,086	> 1,300

Kontrollen / Control Sera: Lot K522845

Sollbereich / Range U/ml

Control + 1	75 - 125
Control - 2	< 25

ER limit: 3.000
velengths: 450nm/620nm

2008-11-19
Protokoll / Test Date: 2008-11-19
Qualitätskontrollreferent / Quality Control Manager: M. Müller

Orgentec stoppig
Probenpuffer ANA/ENA 0012
Orgentec WP 0013

Quantitative Results
4-Parameter data model
A = 0.04734 B = 1.088 C = 121.4 D = 3.426

Rheumatoid Factor Screen

Well Location	Patient ID	O.D. Data	U/ml Data	Flag
B1	S1	0.044	*****	
C1	S2	0.367	15.2	
D1	S3	0.966	49.1	
E1	S4	1.939	151.4	
F1	S5	2.831	500.9	

Well Location	Patient ID	O.D. Data	U/ml Data	Flag
G1	PC1	1.590	103.4	

BEP2000 Version 1.23.4
RFS2090320

BEP2000: 9163000452

Ergebnis einer ELISA Routinediagnostik
(Rheuma Faktor Messung)

Die Bedeutung von ELISA

- Medizinische Diagnostik:
 - Diagnostik der **autoimmunen Störungen**^[5.] (Detektion von Autoantikörpern)
 - Diagnostik von **infektösen Krankheiten**^[6, 7.] (Detektion von entweder mikrobiellen Antigenen oder Antikörpern die dagegen produziert werden, z.B. Detektion von anti-HIV Antikörpern im **HIV Screening**)
 - Messen der Konzentrationen spezifischer **Serumproteine**, z.B. CRP, Hormone ^[8.] (β -hCG, TSH, usw.), Zytokine, Tumormarker^[9, 10.] (z.B. AFP, PSA, CEA, usw.)
- Industrieller Nutzen:
 - Detektion von **Lebensmittelallergenen**^[11, 12.] (z.B. Gluten, Erdnuss, Milchproteine, usw.)
 - Detektion von **Toxinen** in Lebensmitteln^[13.]
 - Testen der Antikörperproduktion von **Hybridomen**^[4.]
 - Detektion bestimmter industrieller Schadstoffe in Industrieabfällen ^[14.]
- Forschung

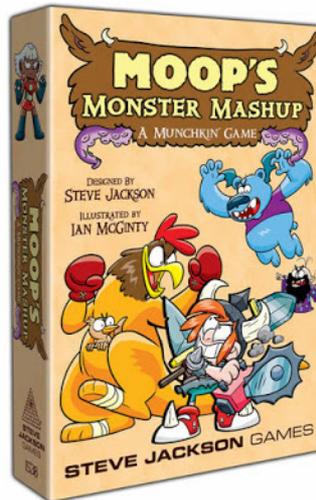
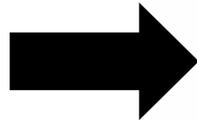
Hall of shame



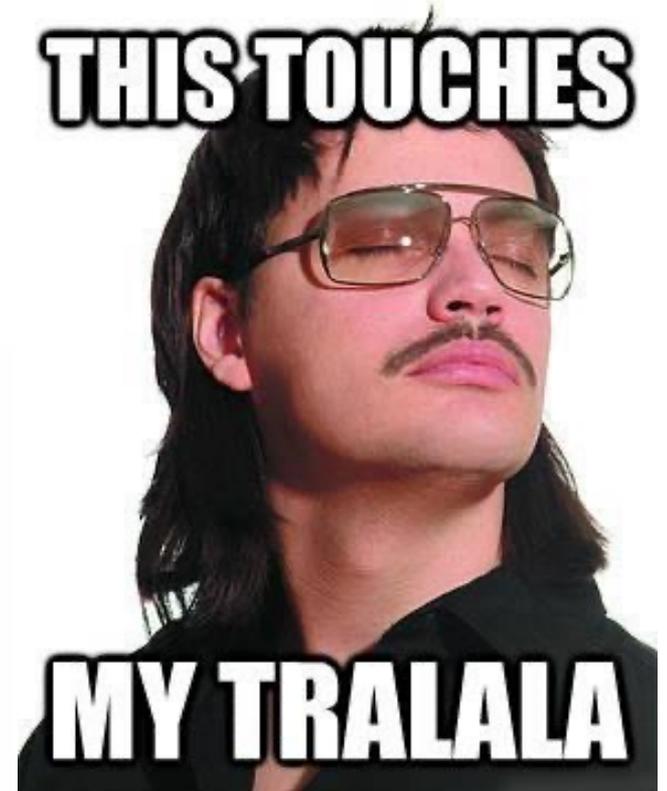
HIV Infektion wird mit dem Moops Test detektiert.



Moops test???



THIS TOUCHES

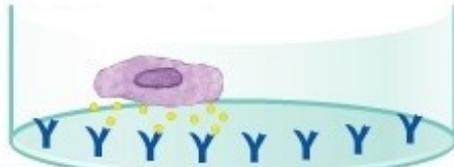


MY TRALALA

ELISPOT

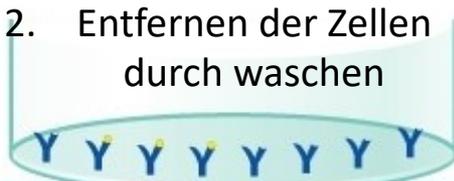
ELISPOT Test^[15.]

1. Tag



1. Inkubation der antigenproduzierenden Zellen auf einer Platte die mit spezifischen Fangantikörpern bedeckt ist.

2. Tag



2. Entfernen der Zellen durch waschen



3. Hinzufügen biotinylierter Antikörper



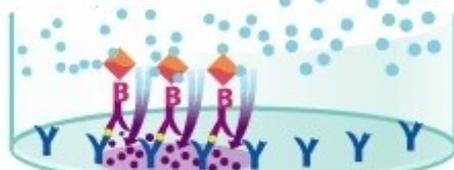
3. Tag



4. Hinzufügen von enzym-markiertem Streptavidin



5. Hinzufügen von Chromogen



- Y Fang-Antikörper
- Untersuchtes Antigen
- β biotinylierter Antikörper
- ◆ enzym-markiertes Streptavidin
- Farbiges Endprodukt
- Chromogen

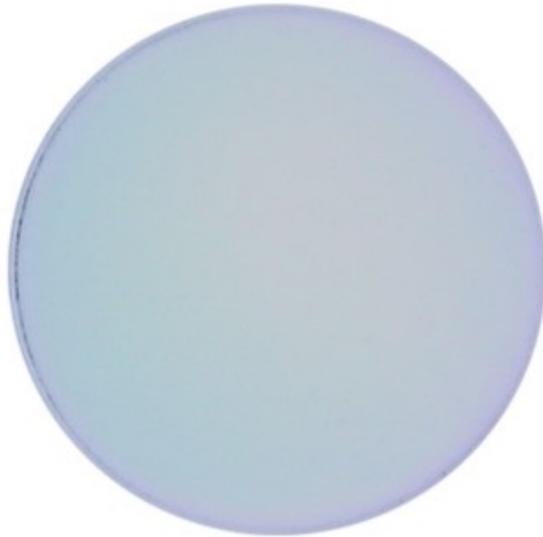


6. Bildung eines unlöslichen Endprodukts am Ort der Antigenproduktion.

Es wird zur Messung der **Antigensekretion** von Zellen genutzt.
z.B.:
Zytokinproduktion

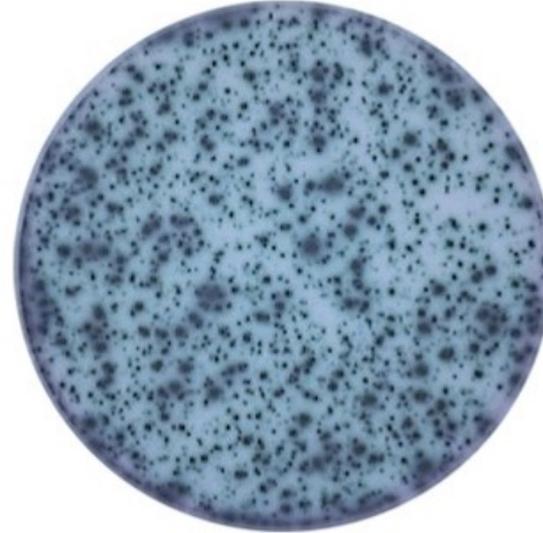
IFN γ Produktion in T Zellen

unbehandelte T Zellen:



0 Spots

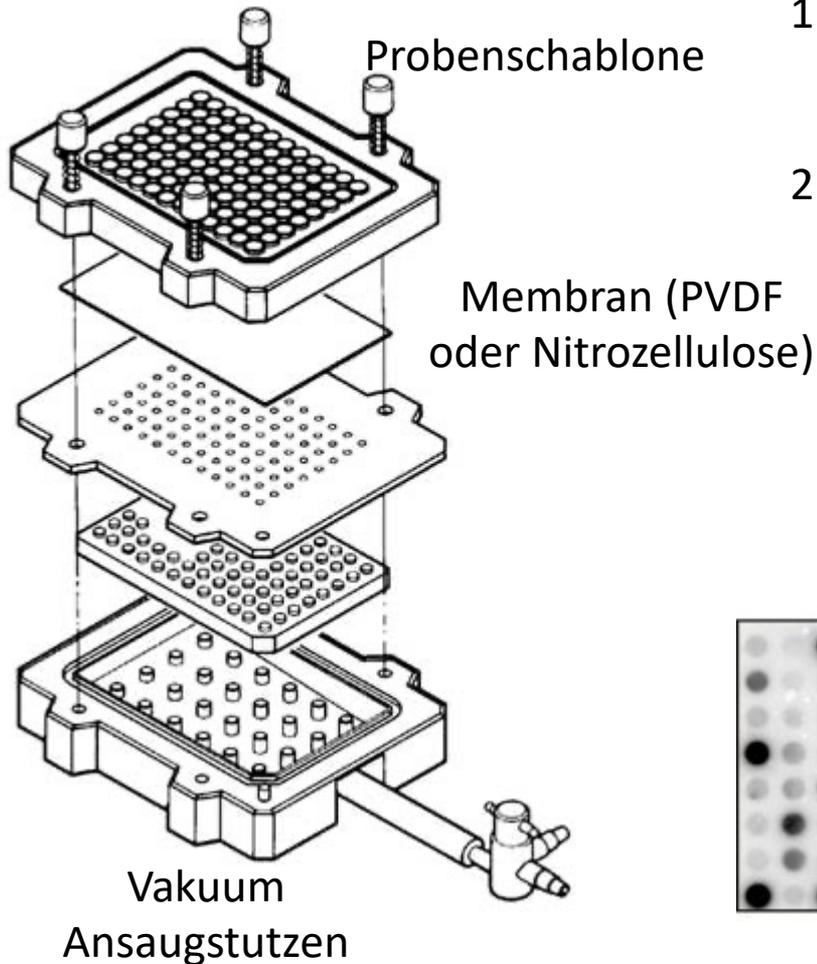
T Zellen stimuliert mit
anti-CD3 Antikörpern.



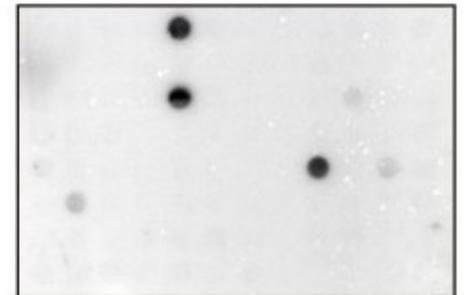
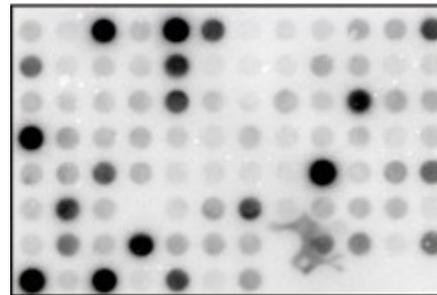
760 Spots

Erkennung des Interferon Gamma (IFN γ) mit **ELISPOT**. Die Zellen wurden in eine Platte gelegt. Das IFN γ das sie produzierten wurde sofort von Fang-Antikörpern gebunden. Das gebundene IFN γ wurde mithilfe einer enzymatischen Reaktion detektiert. Die stimulierten T Zellen wurden aktiviert und produzierten große Mengen IFN γ .

Dot blot

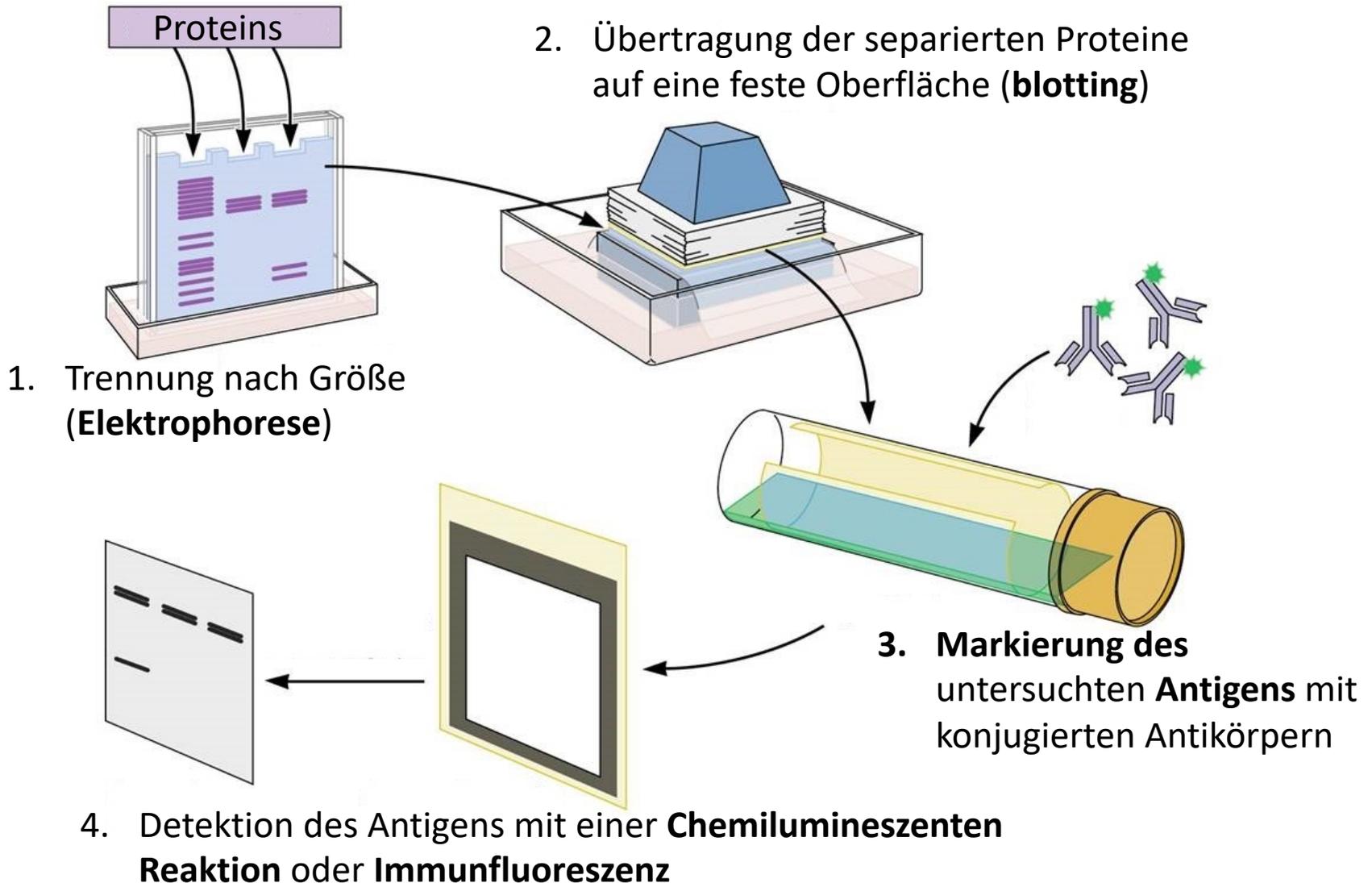


1. Man tut einen Tropfen der Antigen-enthaltenden Probe auf eine feste Fläche (Membran).
 2. Das Antigen das an die Fläche gebunden ist wird durch markierte Antikörper detektiert, entweder mit einem Chromogen oder einer Chemilumineszenten Reaktion (siehe später).
- Anwendung:** Detektion von spezifischen Proteinen in einer Probe gemischter Proteine.



Vergleich zweier unterschiedlicher Proben für die gleiche Proteine mit Dot blot.

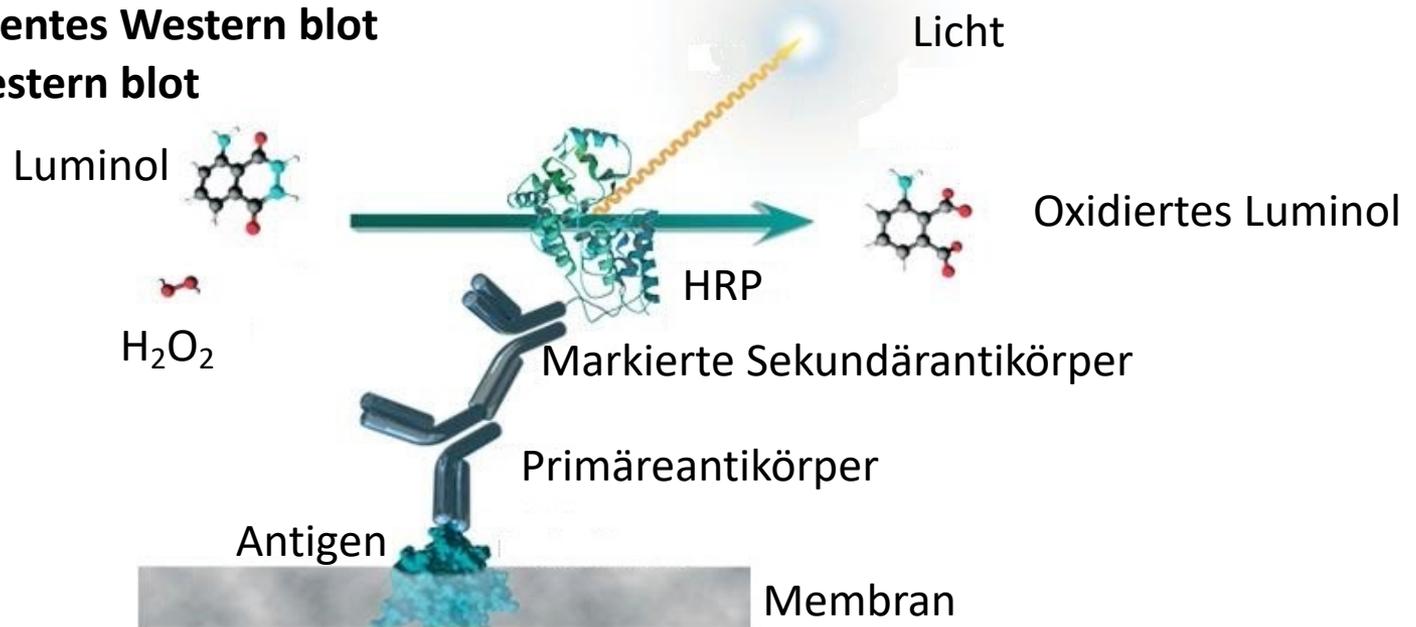
Western Blot^[16.]



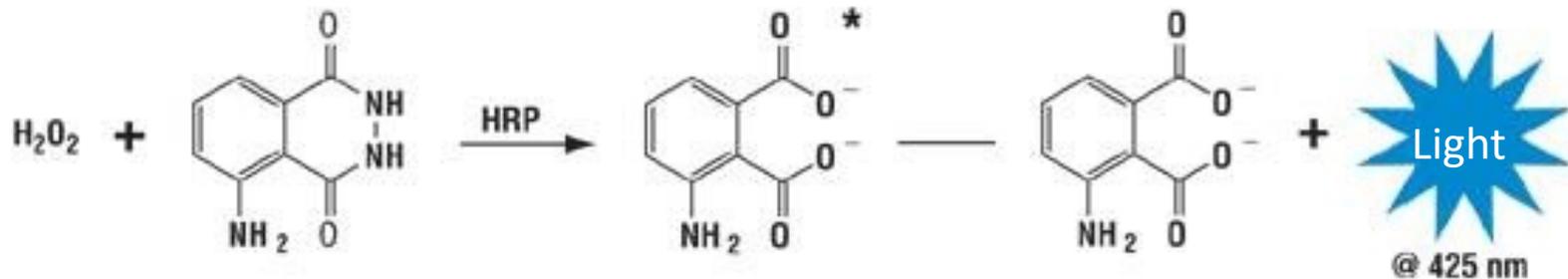
Detektion des Antigens

Es gibt mehrere Methoden zur Darstellung gebundener Antigene, am häufigsten genutzt sind [17.]:

- Chemilumineszentes Western blot
- Fluoreszenz Western blot

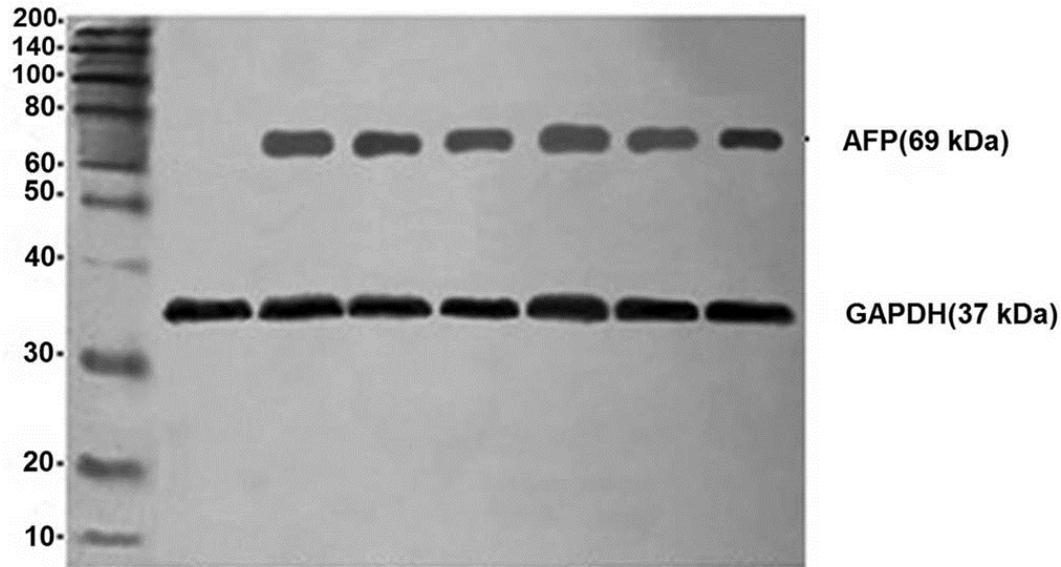


Die chemilumineszente Reaktion des Luminols:

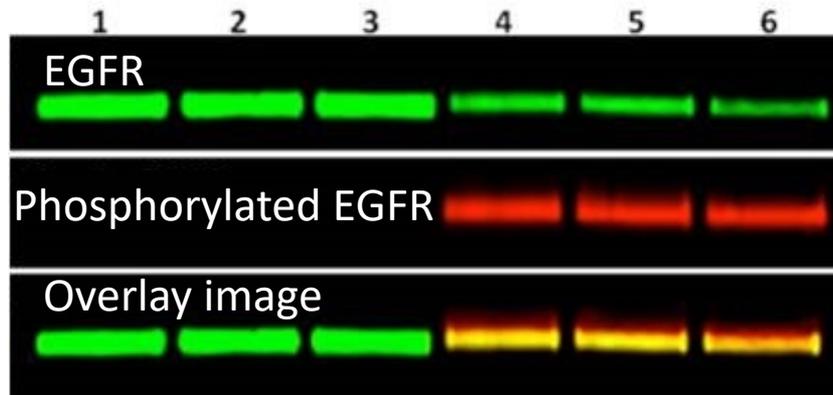


Beispiele

Simultane Detektion des AFP und GAPDH (Quantitätskontrolle) mit **chemilumineszenter Technik**:



Untersuchung der EGFR Phosphorylierung mit **Fluoreszenz Western blot**:



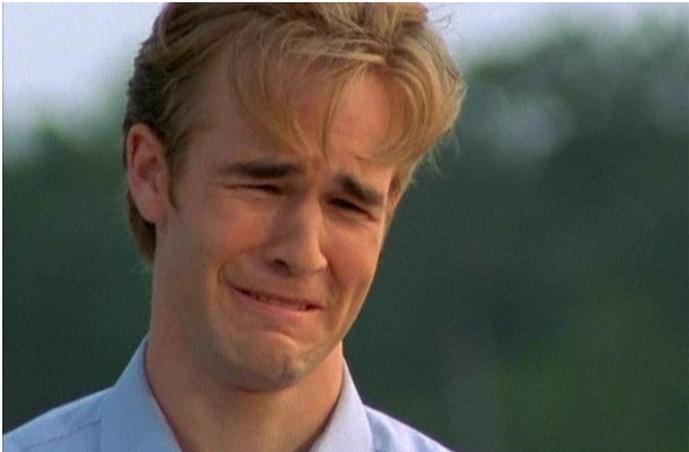
Bedeutung des Western Blot:

- Zu was ist es in der Lage?
 - Es **kann spezifisch Proteine** in einer **gemischten Proteinprobe detektieren** und gibt auch Information über **Größe** und **Menge** des untersuchten Proteins. (**Semiquantitative** Methode)
 - **Protein-Protein Interaktionen** können mit Immunpräzipitation detektiert werden.
 - Kann für **funktionelle Tests**, wie die untersuchung der Proteinphosphorylierung in Zellen, genutzt werden.
- Wird extensive in der Forschung verwendet.
- Der Nutzen für diagnostische Zwecke ist begrenzt da es **schwer zu standardisieren** ist.^[18.]
- Einige Beispiele diagnostischer Nutzung:
 - Bestätigung bestimmter **infektöser Krankheiten** z.B.:
 - Lyme-Borreliose^[19.]
 - BSE (Bovine Spongiform Enzephalopathie, „mad cow disease“)^[20.]
 - Bestätigung einer HIV Infektion im Fall eines positive ELISA screening Tests.^[21.]

Hall of shame

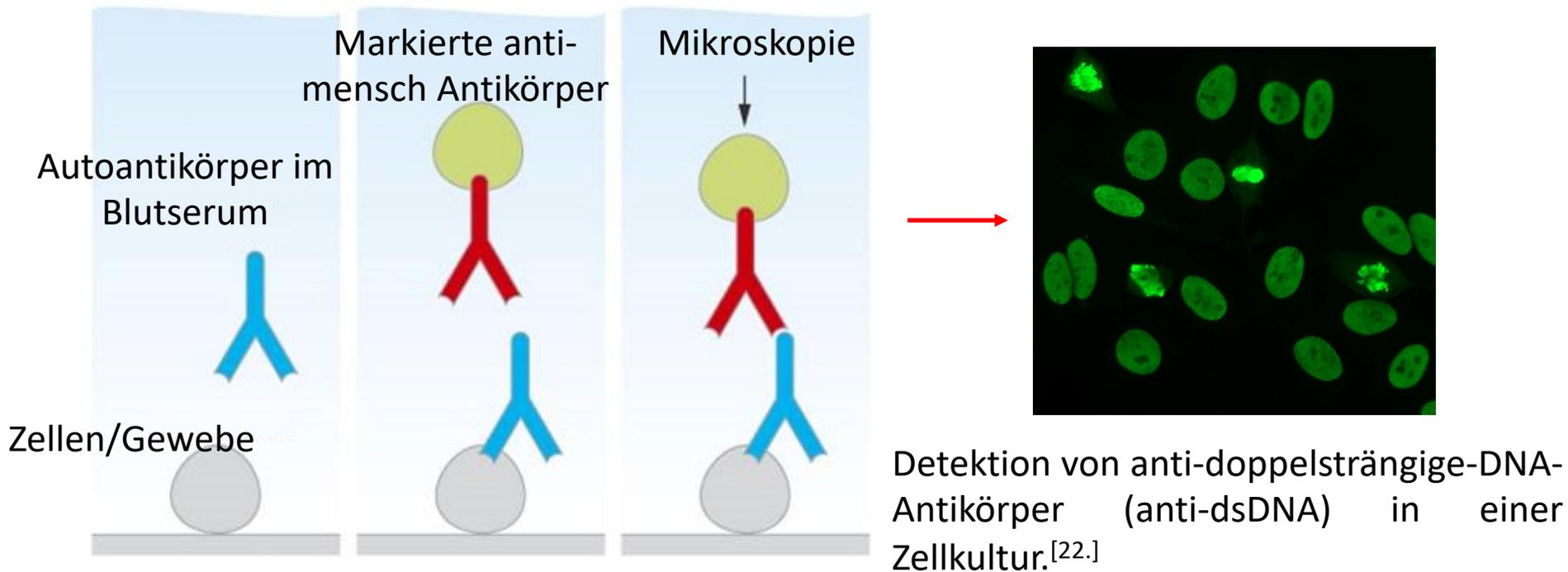


Der ELISA-blot ist eine immunserologische Methode.

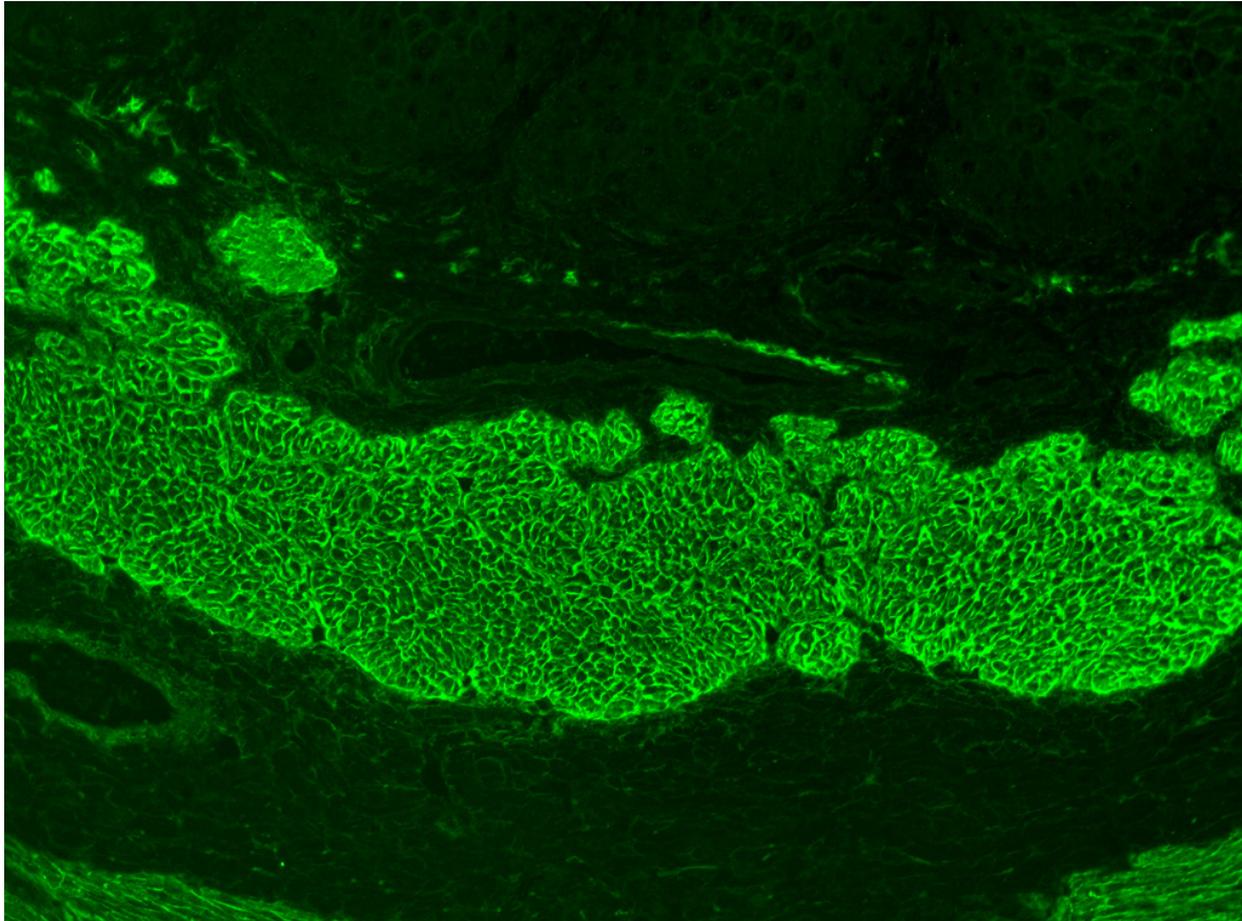


Indirekte immunofluoreszenz-Mikroskopie als serologischer Test

- Immunfluoreszenz-Mikroskopie → siehe 4. Praktikum
- Anwendung: **Diagnostik autoimmuner Störungen** (siehe später)
- Das Serum des Patienten wird zu einer Zellkultur oder einem Gewebe gegeben. Autoantikörper im Serum verursachen eine Kreuzreaktion mit dem Gewebe oder den Zellen die mit Fluorochrom-konjugierten anti-mensch Antikörpern detektiert werden kann.



Indirekte Immunfluoreszenz Bsp.



Detektion von anti-Endomysium Autoantikörpern (EMA) vom Serum eines Patienten mit Zöliakie in einem Affenösophagus. Der Ösophagusschnitt wurde erst mit Serum des Patienten inkubiert. Dann wurden Fluorochrom-konjugierte (**FITC**) Anti-mensch Antikörper hinzugefügt.^[23.]

Vergleich der Schwellenwerte verschiedener serologischer Methoden

Methode	Geschätzte Sensitivität ($\mu\text{g Protein/ml Probe}$)
Präzipitation in Flüssigkeiten	20-200
Ouchterlony Doppel- Immundiffusion	20-200
Immunelectrophorese	20-200
Mancini radiale Immundiffusion	10-50
Rocket Immunelectrophorese	2
Immunfluoreszenz	1
Direkte Agglutination	0,3
Passive Agglutination	0,006-0,06
ELISA	0,0001-0,01

Quellen 1.

1. Lequin RM¹: **Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**. *Clin Chem*. 2005 Dec;51(12):2415-8. Epub 2005 Sep 22.
2. John R. Crowther: **The ELISA Guidebook** © 2001 Humana Press Inc.
3. Lin AV¹: **Direct ELISA**. *Methods Mol Biol*. 2015;1318:61-7. doi: 10.1007/978-1-4939-2742-5_6.
4. Delaunay T¹, Louahed J, Bazin H: **Rat (and mouse) monoclonal antibodies. VIII. ELISA measurement of Ig production in mouse hybridoma culture supernatants**. *J Immunol Methods*. 1990 Jul 20;131(1):33-9.
5. Aggarwal A¹: **Role of autoantibody testing**. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2014 Dec;28(6):907-20. doi: 10.1016/j.berh.2015.04.010. Epub 2015 May 23.
6. Ghosh M¹, et al.: **Detection of hepatitis B virus infection: A systematic review**. *World J Hepatol*. 2015 Oct 18;7(23):2482-91. doi: 10.4254/wjh.v7.i23.2482.
7. Sun GG¹, et al.: **Early serodiagnosis of trichinellosis by ELISA using excretory-secretory antigens of *Trichinella spiralis* adult worms**. *Parasit Vectors*. 2015 Sep 23;8(1):484. doi: 10.1186/s13071-015-1094-9.
8. Islam KN¹, et al.: **Micro open-sandwich ELISA to rapidly evaluate thyroid hormone concentration from serum samples**. *Bioanalysis*. 2010 Oct;2(10):1683-7. doi: 10.4155/bio.10.125.
9. Schneider J¹, et al.: **Comparison of the tumor markers tumor M2-PK, CEA, CYFRA 21-1, NSE and SCC in the diagnosis of lung cancer**. *Anticancer Res*. 2000 Nov-Dec;20(6D):5053-8.
10. Barak V¹, et al.: **The Diagnostic and Prognostic Value of Tumor Markers (CEA, SCC, CYFRA 21-1, TPS) in Head and Neck Cancer Patients**. *Anticancer Res*. 2015 Oct;35(10):5519-24.
11. Valdés I¹, García E, Llorente M, Méndez E: **Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol**. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003 May;15(5):465-74.
12. Jayasena S¹, et al.: **Comparison of six commercial ELISA kits for their specificity and sensitivity in detecting different major peanut allergens**. *J Agric Food Chem*. 2015 Feb 18;63(6):1849-55. doi: 10.1021/jf504741t. Epub 2015 Feb 4.

Quellen 2.

13. Liang M¹, et al.: **Development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on the multiepitope peptide for the synchronous detection of staphylococcal enterotoxin A and G proteins in milk.** *J Food Prot.* 2015 Feb;78(2):362-9. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-323.
14. Hirobe M¹, et al.: **The use of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the determination of pollutants in environmental and industrial wastes.** *Water Sci Technol.* 2006;54(11-12):1-9.
15. Kalyuzhny AE¹: **Chemistry and biology of the ELISPOT assay.** *Methods Mol Biol.* 2005;302:15-31.
16. Hnasko TS¹, Hnasko RM: **The Western Blot.** *Methods Mol Biol.* 2015;1318:87-96. doi: 10.1007/978-1-4939-2742-5_9.
17. Mathews ST¹, Plaisance EP, Kim T: **Imaging systems for westerns: chemiluminescence vs. infrared detection.** *Methods Mol Biol.* 2009;536:499-513. doi: 10.1007/978-1-59745-542-8_51.
18. Gassmann M¹, Grenacher B, Rohde B, Vogel J: **Quantifying Western blots: pitfalls of densitometry.** *Electrophoresis.* 2009 Jun;30(11):1845-55. doi: 10.1002/elps.200800720.
19. Gerritzen A¹, Brandt S: **Serodiagnosis of Lyme borreliosis with bead based immunoassays using multiplex technology.** *Methods.* 2012 Apr;56(4):477-83. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.02.007. Epub 2012 Mar 3.
20. Porcario C¹: **Evaluation of two sets of immunohistochemical and Western blot confirmatory methods in the detection of typical and atypical BSE cases.** *BMC Res Notes.* 2011 Sep 29;4:376. doi: 10.1186/1756-0500-4-376.
21. Torian LV¹, et al.: **Comparison of Multispot EIA with Western blot for confirmatory serodiagnosis of HIV.** *J Clin Virol.* 2011 Dec;52 Suppl 1:S41-4. doi: 10.1016/j.jcv.2011.09.017. Epub 2011 Oct 12.
22. Buchner C¹, et al: **Anti-nuclear antibody screening using HEp-2 cells.** *J Vis Exp.* 2014 Jun 23;(88):e51211. doi: 10.3791/51211.
23. Amara W¹, Husebekk A: **Improved method for serological testing in celiac disease--IgA anti-endomysium antibody test: a comparison between monkey oesophagus and human umbilical cord as substrate in indirect immunofluorescence test.** *Scand J Clin Lab Invest.* 1998 Nov;58(7):547-54.