



IMMUNOLÓGIAI ÉS
BIOTECHNOLÓGIAI
INTÉZET



Immunszerológia 2. ELISA, immunoblot technikák

Az immunológia alapjai

PTE-KK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Pécs

A szerológia fogalma (ismétlés)

- A **vérszérum** és más testnedvek laboratóriumi vizsgálata, a gyakorlatban elsősorban az azokban található **antitestek** kimutatását értik alatta.
- Emlékeztek?
 - **Vérplazma**: alvadásgátolt vér felülúszója
 - **Vérszérum**: alvadt vér felülúszója
- Ezek is **antigén-antitest reakción** alapulnak (mindkettő kimutatható).
- Milyen módszerek tartoznak ide?
 - **Precipitáción** alapulók (lásd múlt heti anyagot)
 - **Agglutináción** alapulók (lásd múlt heti anyagot)
 - **Immunoassay vizsgálatok** (ELISA, ELISPOT, radioimmunoassay)
 - **Immunoblot technikák** (Western blot, Dot blot)
 - **Indirekt immunfluoreszcens mikroszkópia**
- Főbb klinikai felhasználás:
 - **Fertőző betegségek** diagnosztikája (pl. a kórokozók ellen termelt antitestek kimutatása)
 - **Autoimmun betegségek** diagnosztikája (kóros autoantitestek kimutatása)
 - **Immunhiányos állapotok** diagnosztikája (antitestek szintjeinek mérése)
 - **Vércsoport meghatározás**

Indirekt ELISA gyakorlat

Szükséges anyagok és eszközök

- Előzetesen antigénnel bevont 96-lyukú mikrotiter lemez, zselatinos telítőoldattal (300 µl/lyuk)
- Mosópuffer
- Minták (zárójelben feltüntettük a hígítási faktort) és kontroll oldatok számozott csövekben (100 µl/cső):

1. (1x)	2. (5x)	3. (25x)	4. (50x)	5. (100x)	6. (200x)	neg. ctrl. (mosó)	poz. ctrl. (IgG 1:1000)
------------	------------	-------------	-------------	--------------	--------------	----------------------	-------------------------------

- Konjugátum: anti egér-IgG peroxidáz (PO) 1:10000
- Szubsztrát: TMB (3,3',5,5'-tetrametil-benzidin)
- STOP oldat

A gyakorlat menete

1. A lemezről távolítsa el a zselatinos telítőoldatot. Határozott mozdulattal öntse ki. Fordítsa fejjel lefelé a lemezt, és ütögesse tiszta papírtörülkhöz.
2. **Mosás (3x)**
 - Pipetázzon a lyukakra **300 µl** mosópuffert. Határozott mozdulattal öntse ki. Fordítsa fejjel lefelé a lemezt, és ütögesse tiszta papírtörülkhöz. Ismételje meg még kétszer. Minden további mosási lépés során ugyanígy járjon el a lemezzel.
 - Ne hagyja, hogy a lemez kiszáradjon a lépések között!
3. **Első inkubáció (Antitest kötődés)**
 - A harmadik mosást követően mérjen be a lyukakba **100 µl**-t a mintákból, illetve a pozitív és negatív kontrollokból.
 - A minták bemérési sorrendje az alábbi:

1.	1x
2.	5x
3.	25x
4.	50x
5.	100x
6.	200x
7.	neg. ctrl. (mosó)
8.	poz. ctrl. (IgG 1:1000)

4. **Mosás 3x**
 - Ismételjük meg a mosást 3x a fentiek (2. pont) alapján.

5. Inkubáció a másodlagos antitesttel

- Mérjen minden lyukba **100 µl** anti egér-IgG PO konjugátumot.
- **Inkubálás:** Szobahőmérsékleten **35 percig**.

6. Mosás 3x

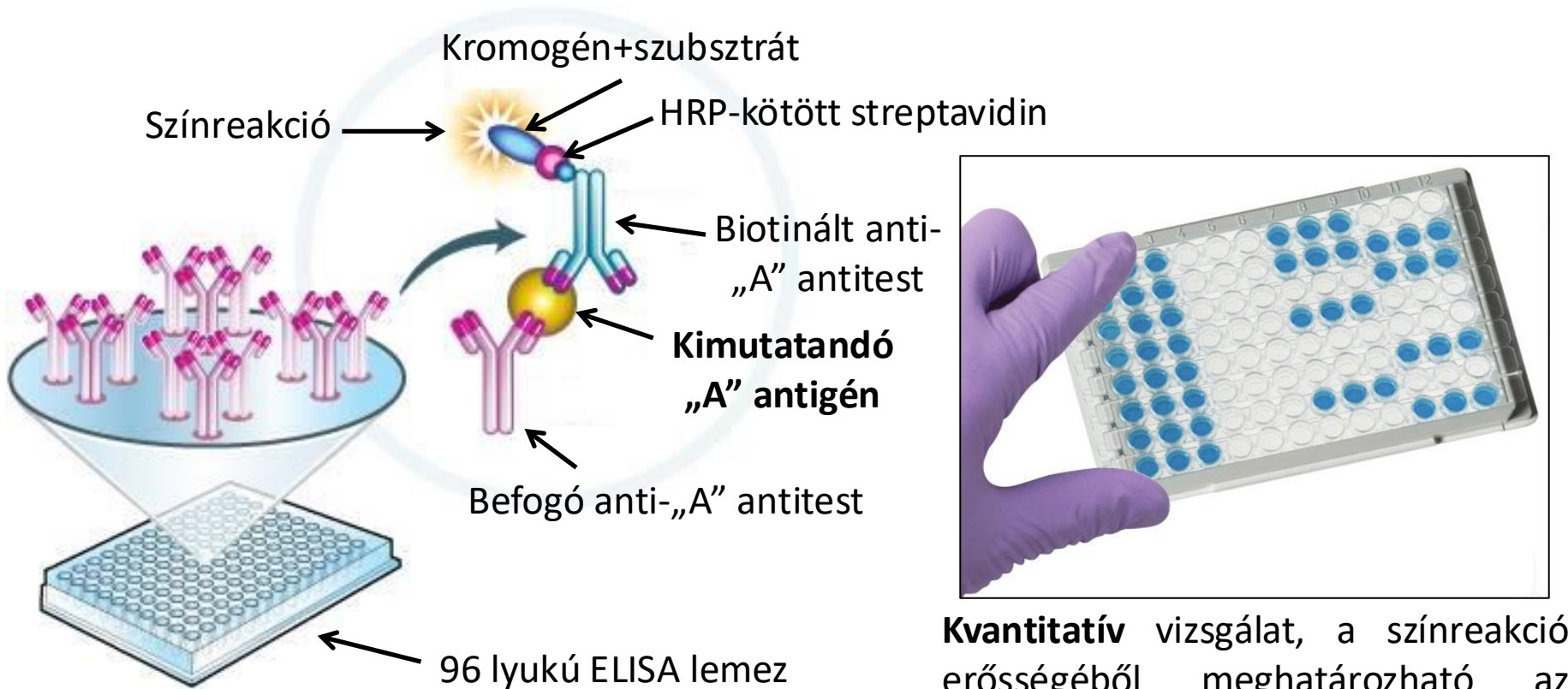
- Ismételjük meg a mosást 3x a fentiek (2. pont) alapján.

7. Színreakció és leállítás

- **Szubsztrát adagolás:** Mérjen be **100 µl TMB** oldatot minden lyukba. Várjuk meg a kék szín kialakulását.
- **Leállítás (STOP):** Adjon hozzá **50 µl STOP** oldatot. A kék szín ekkor sárgára változik.

ELISA alapok I.

- **ELISA** = **E**nzyme-**L**inked **I**mmuno**s**orbent **A**ssay^[1.] (enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálat)
- Példa az ELISA működési elvére (ún. sandwich ELISA, lásd következő diákon):

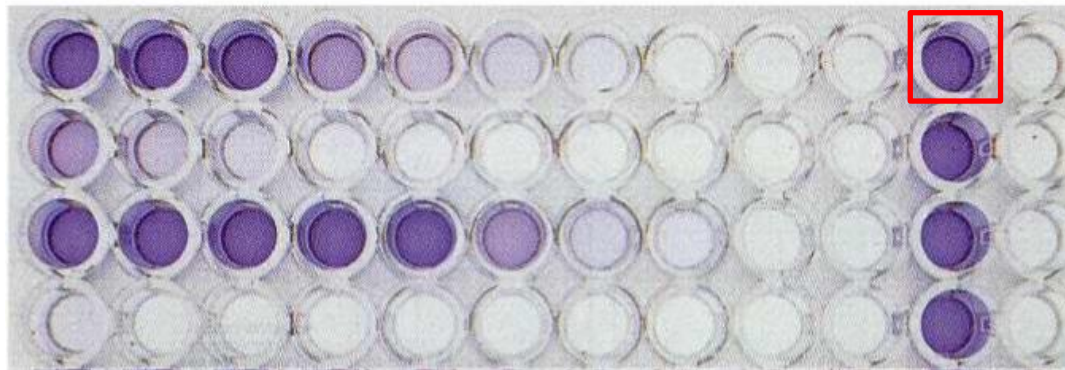
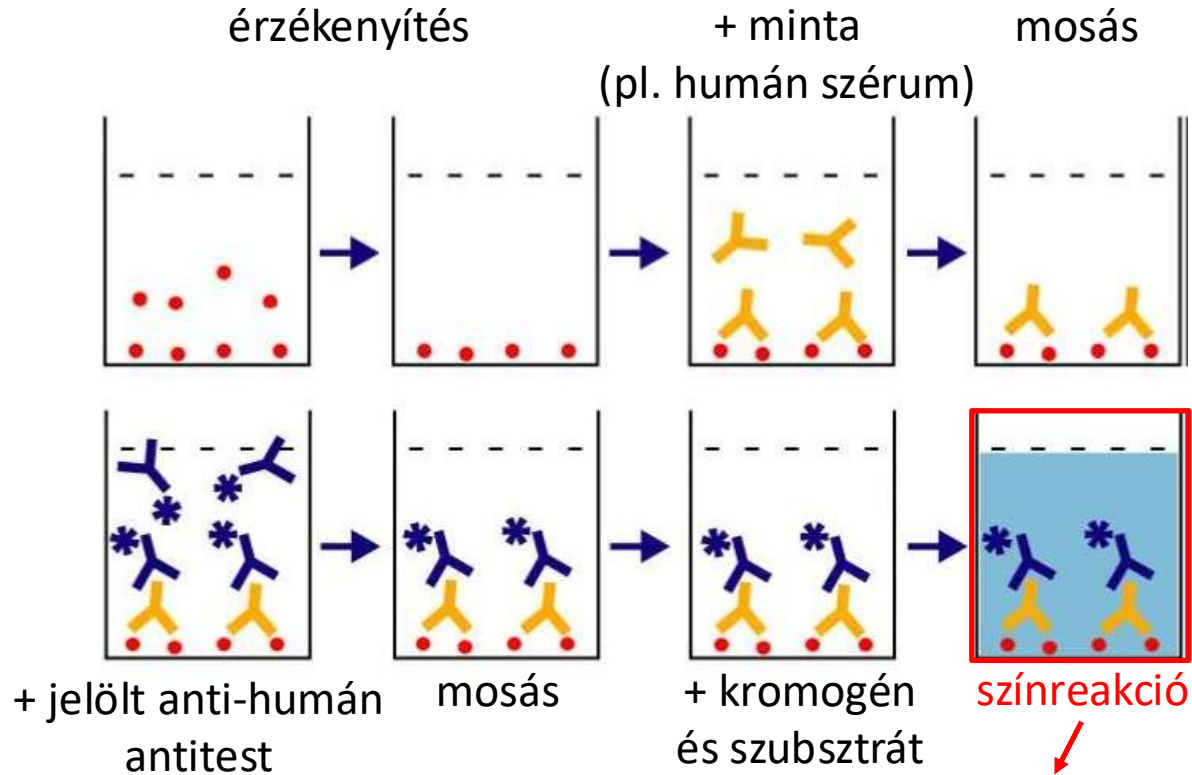


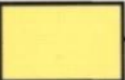


Kvantitatív vizsgálat, a színreakció erősségéből meghatározható az antigén **pontos koncentrációja!**

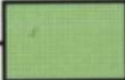
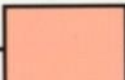
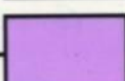
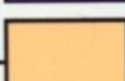
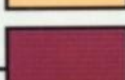
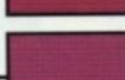
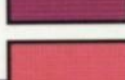

ELISA alapok II.

- **Antigén-antitest reakción** alapul, **mindkettő** kimutatható.^[2.]
- **Érzékenyítés:** Az egyiket szilárd fázishoz kötik.
- **Telítés:** Nem-specifikus kötőhelyek blokkolása.
- A kimutatni kívánt antitest/antigén **oldott formában** van. (pl. szérum)
- A befogó antitest/antigén megköti az oldatból a kimutatandó fehérjét, **kötött immunkomplex** képződik.
- A nem-kötődött fehérjéket mosással eltávolítják.
- A képződő immunkomplexet egy vagy több lépésben, **enzimatis reakcióval** teszik láthatóvá.
- A színreakciót adó kromogének **oldható végterméket** formálnak és egyenletesen eloszlának az oldatban.
- Ismert koncentrációjú **standardok** segítségével az oldat **fényelnyeléséből** kiszámítható a vizsgált anyag pontos **koncentrációja**. → **Kvantitatív vizsgálat!**

Az ELISA működési elve (indirekt ELISA)



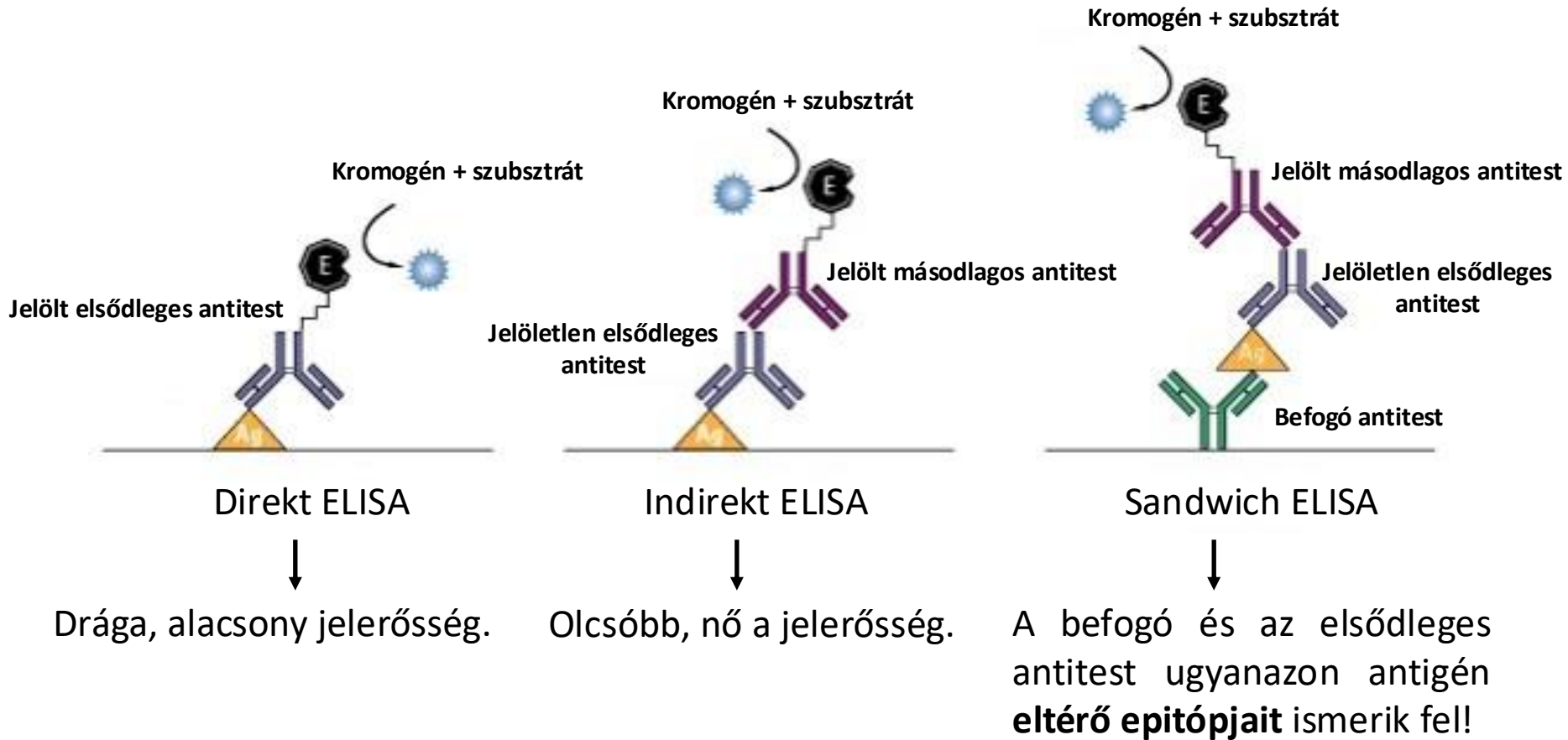
Alkalikus foszfátáz	p-nitrofenil-foszfát (pNPP)		oldható	ELISA
	Nitro blue tetrazolium (NBT)		oldhatatlan	hisztokémia, immunoblot
	Fast Red		oldhatatlan	hisztokémia, immunoblot

Peroxidáz	ABTS		oldható	ELISA
	o-feniléndiamin (OPD)		oldható	ELISA
	tetrametilbenzidin (TMB)		oldható	ELISA
	o-dianizidin		oldható	ELISA
	5-aminoszalicilsav (5-ASA)		oldható	ELISA
	diaminobenzidin (DAB)		oldhatatlan	hisztokémia, immunoblot
	3-amino-9-etilkarbazol (AEC)		oldhatatlan	hisztokémia, immunoblot
	4-kloro-1-naftol (4C1N)		oldhatatlan	hisztokémia, immunoblot

ELISA esetén a színreakciót adó kromogén **oldható végterméket** kell, hogy adjon. A színes végtermék **egyenletesen eloszlik** az oldatban, megváltoztatva annak fényelnyelését, melyet az ELISA olvasó lyukanként megmér.^[2.]

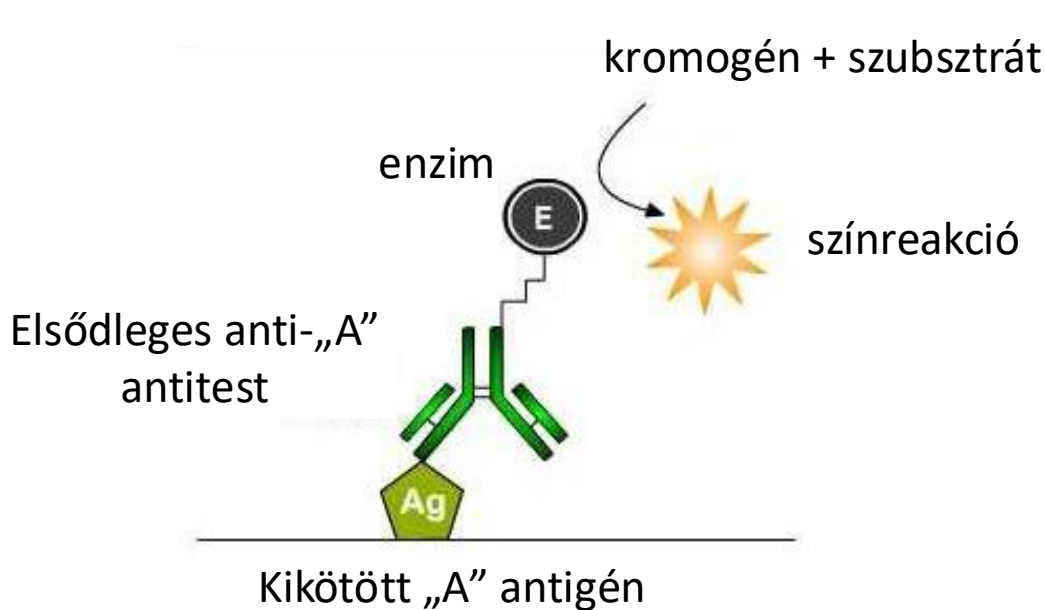
Immunhisztokémia, illetve blottolás esetén (pl. Western blot) fordítva, **oldhatatlan** végtermékre van szükség, hogy ne diffundáljon el a reakció helyétől és ott detektálják, ahol az antigén-antitest reakció létrejött.

Főbb ELISA típusok



Direkt ELISA

1. Kinyert „A” antigént kikötik a lemezre.
2. Enzim-jelölt anti-„A” antitesttel kimutatják az antigént.^[3.]



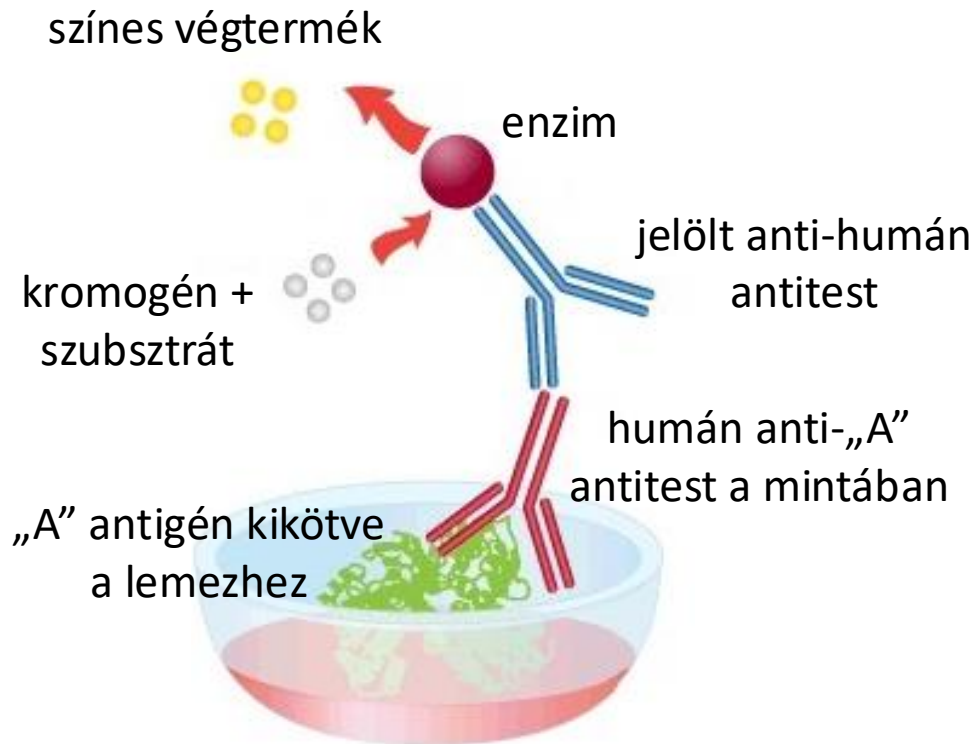
Előny:

- **Gyors**

Hátrány:

- **Drága** (jelölt elsődleges antitest szükséges hozzá)
- **Alacsony a jelerősség**, mert pl. a szérumban található fehérjék a kikötés során versenyeznek egymással, a vizsgált fehérjéből kis mennyiség kötődik ki. (Megoldás: Sandwich ELISA)

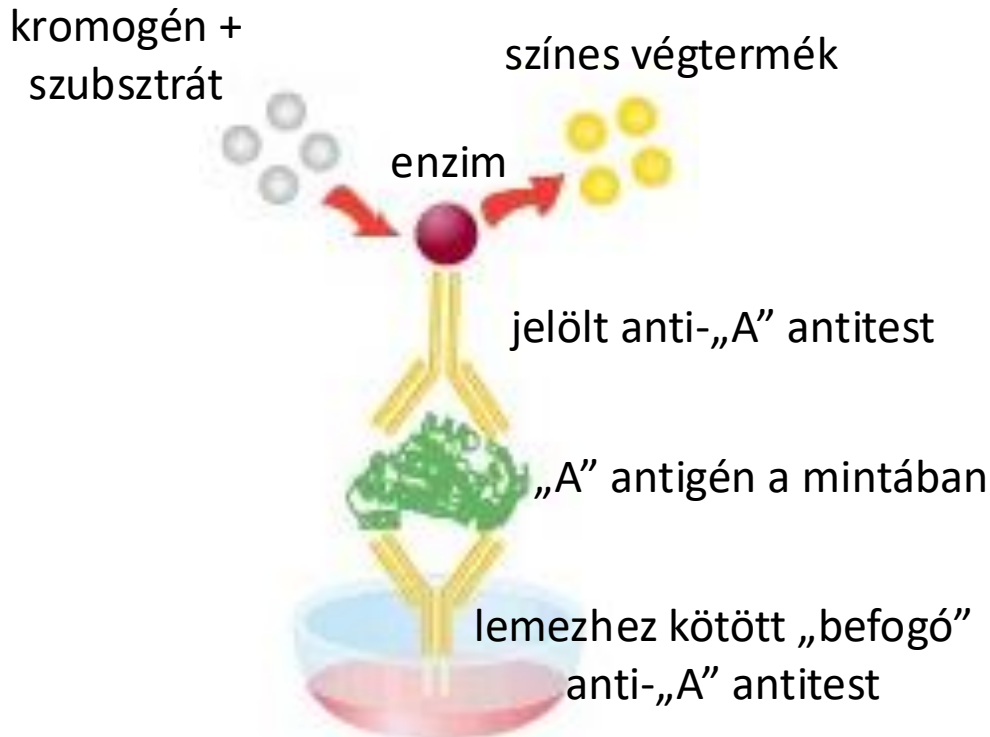
Indirekt ELISA



Felhasználás: **Antitestek kimutatása** a mintában, pl.:

- **Hibridóma felülúszó** tesztelése^[4.]
- Antigén-specifikus antitestek vizsgálata testfolyadékokból (pl. szérum autoantitestek mérése **autoimmun betegségekben**, részletesen lásd később)

Sandwich ELISA



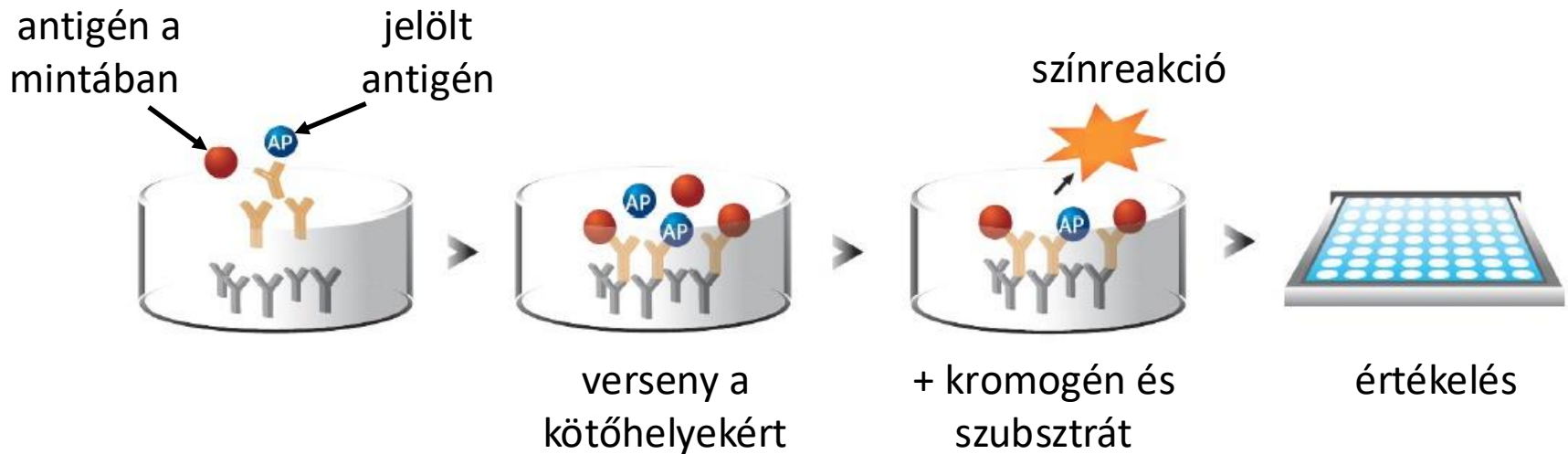
Felhasználás: **Antigén specifikus kimutatása** a mintában.

Pl.:

- Citokinek
- Tumormarkerek
- Hormonok
- Stb.

Feltétele: A befogó és a detektáló antitest **ugyanazon antigén eltérő epitópjait** ismerjék fel.

Kompetíciós ELISA



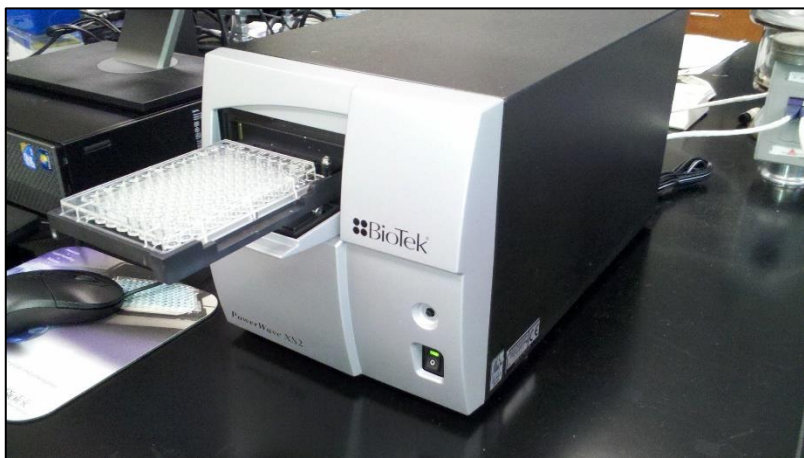
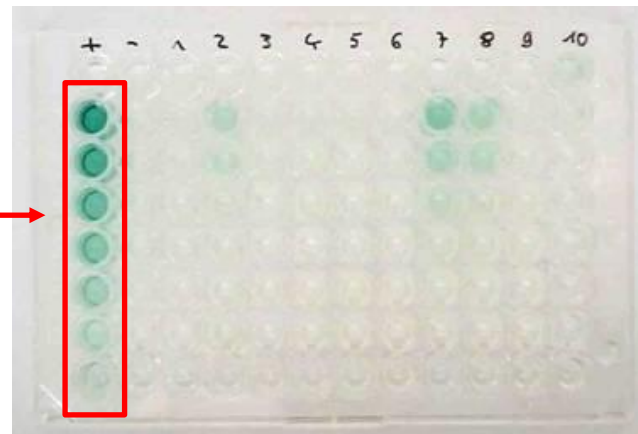
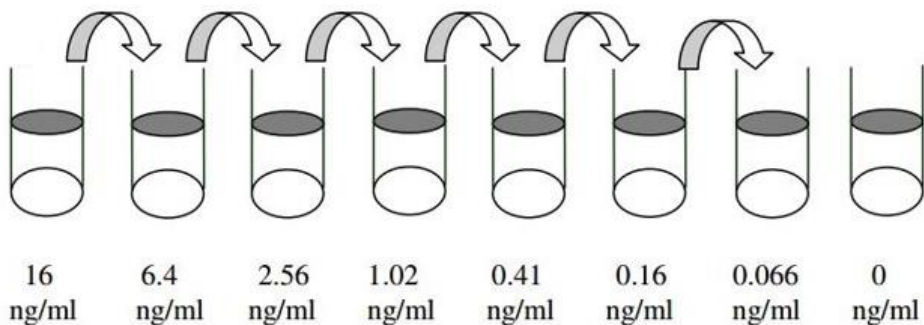
Felhasználás: **Antigén kimutatása** valamilyen mintában.

Elve:

1. Anti-„A” antitest kikötése a lemezhez.
2. A vizsgált mintához ismert mennyiségű enzim-jelölt „A” antigént adnak.
3. A mintában található jelöletlen „A” antigén **versenyez** a hozzáadott jelölt „A”-val a befogó antitest kötőhelyeiért.
4. A nem kötődött antigént kimossák.
5. A **színreakció** intenzitása **fordítottan arányos** a mintában található **antigén koncentrációjával**. (Minél kevesebb volt a mintában, annál több enzim-jelölt antigén tudott hozzákapcsolódni az antitestekhez.)

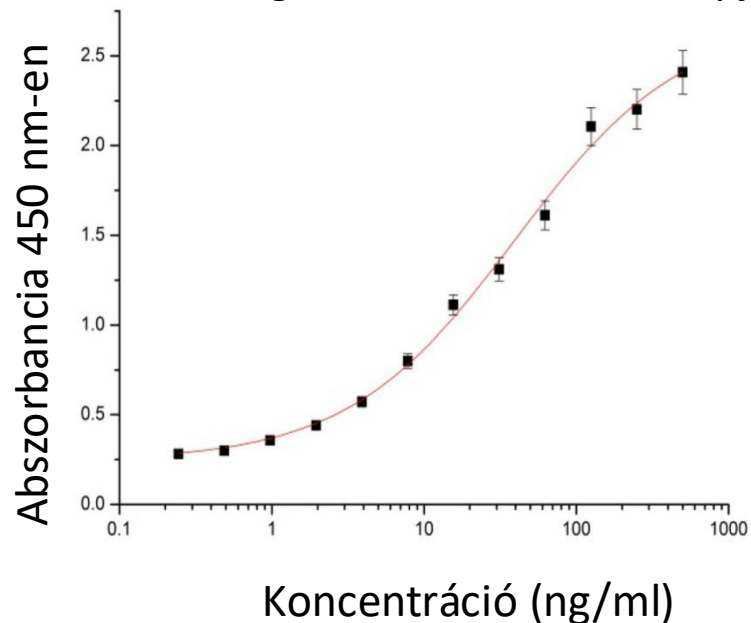
ELISA értékelése I.

Ismert koncentrációjú **standard sor** készítése:



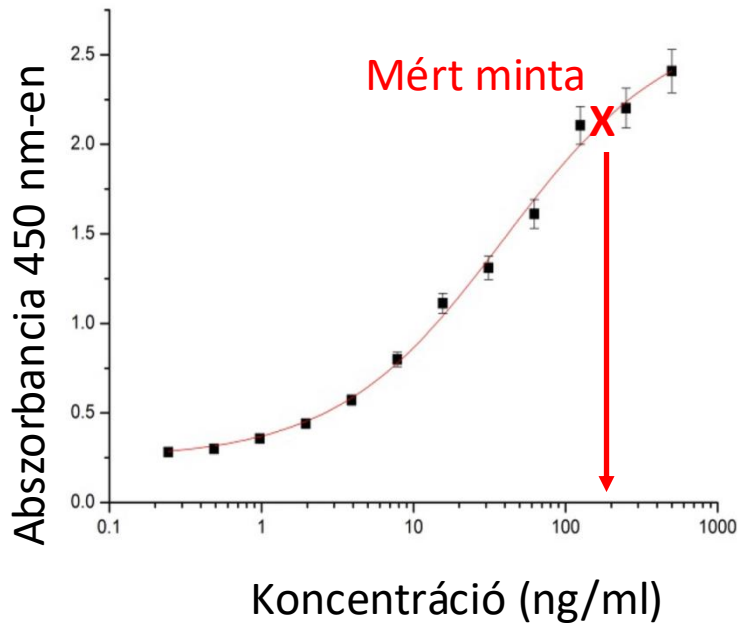
Egy ELISA olvasó, mely megméri az egyes lyukakban a **fényelnyelést** (abszorbancia).

Kalibrációs görbe a standardok alapján:

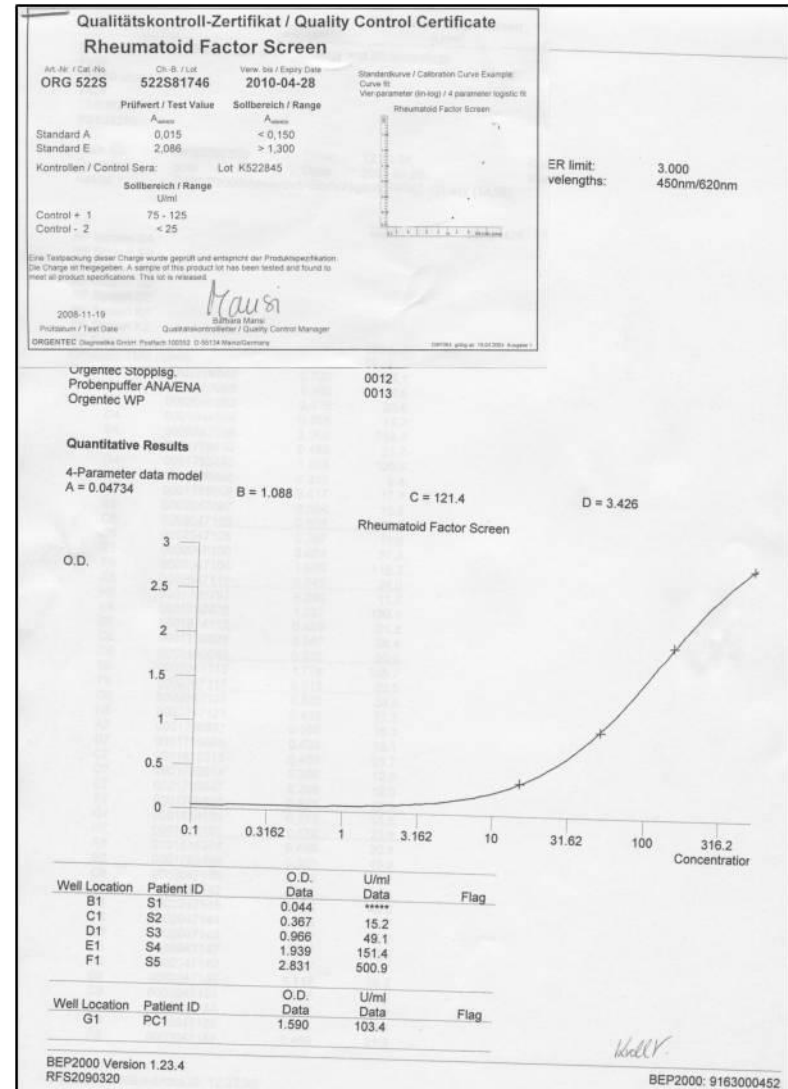


ELISA értékelése II.

Kalibrációs görbe:



A mintában mért fényelnyelési értéket ráillesztik a kalibrációs görbére és leolvassák a pontos koncentrációt.



Egy rutin ELISA lelet
(rheumatoid faktor meghatározás)

AZ ELISA jelentősége

- Orvosi diagnosztika:
 - **Autoimmun kórképek** diagnosztikája^[5.] (autoantitestek kimutatása testfolyadékokból, részletesen lásd később)
 - **Fertőző betegségek** diagnosztikája^[6, 7.] (kórokozó antigénjeinek vagy az ellenük termelt antitestek kimutatása, pl. HIV elleni antitestek kimutatása **HIV szűrésnél**)
 - **Specifikus szérumfehérjék** koncentrációinak meghatározása, pl. CRP, hormonok^[8.] (β -hCG, TSH, stb.) citokinek, tumormarkerek^[9, 10.] (pl. AFP, PSA, CEA, stb.)
- Ipari felhasználás:
 - **Táplálékallergének** kimutatása az élelmiszerekben^[11, 12.] (pl. glutén, mogyoró, tejfehérje, stb.)
 - Mérgezést okozó **toxinok** kimutatása élelmiszerekben^[13.]
 - **Hibridómák** antitest termelésének tesztelése^[4.]
 - Bizonyos ipari szennyezőanyagok kimutatása ipari hulladékokban, felszíni vizekben^[14.]
- Kutatás

ELISPOT

ELISPOT vizsgálat^[15.]

1. nap



1. Az antigént termelő sejtek inkubálása az antigénre specifikus befogó antitesttel.

2. nap

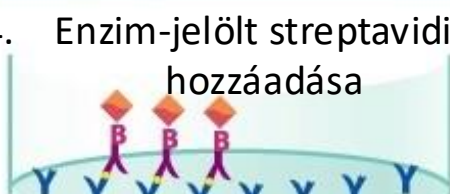


2. Sejtek kimosása



3. Biotinált antitest hozzáadása

3. nap



4. Enzim-jelölt streptavidin hozzáadása



5. Kromogén hozzáadása

- befogó antitest
- vizsgált antigén
- biotinált antitest
- enzim-jelölt streptavidin
- színes végtermék
- kromogén



6. Az antigén termelés helyén **kicsapódó** színes végtermék.

Sejtek antigén termelésének vizsgálatára alkalmas módszer.
Pl.:
Citokin termelés vizsgálata.

IFN γ termelés vizsgálata T-sejtekben

kezeletlen T-sejtek:



0 pötty („spot”)

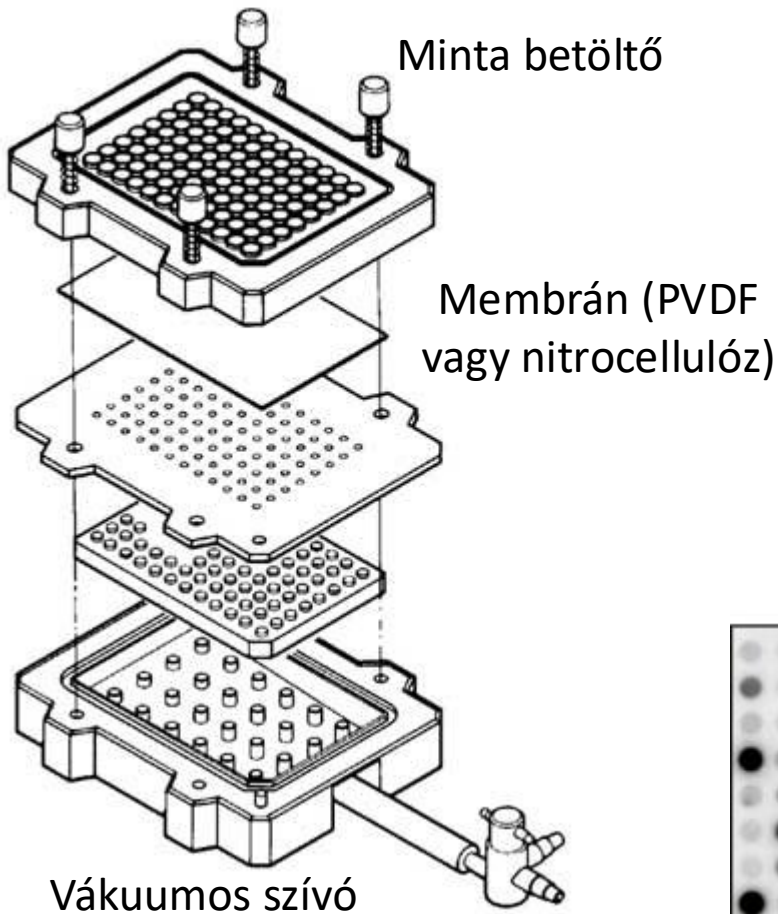
anti-CD3 kezelt T-sejtek:



760 pötty

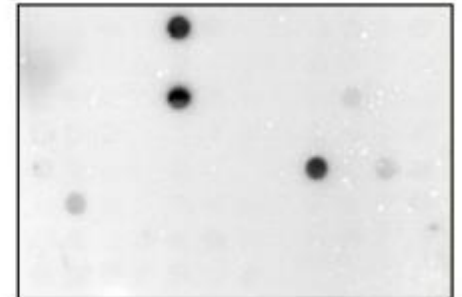
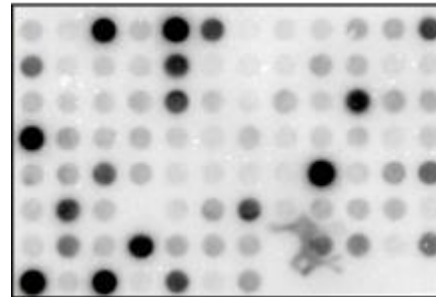
Interferon-gamma (IFN γ) termelés vizsgálata **ELISPOT módszerrel**. A sejtek ki lettek helyezve a lemezre, az általuk termelt IFN γ -át a lemezhez kötött befogó antitestek megkötötték, melyet enzimatikus reakcióval tettek láthatóvá. Az anti-CD3 antitesttel stimulált T-sejtek aktiválódtak és jelentős mennyiségben termeltek IFN γ -át.

Dot blot



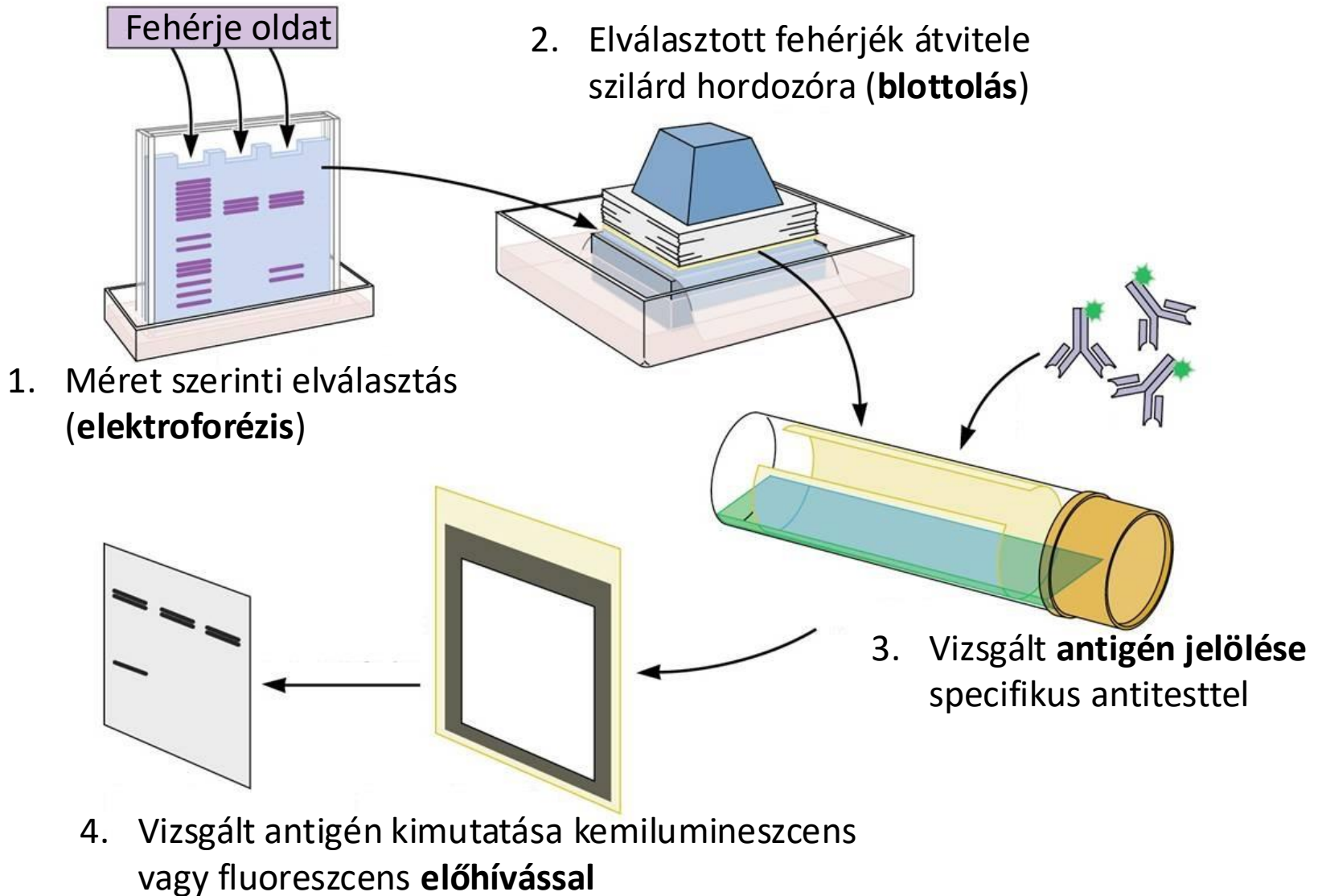
1. Antigént tartalmazó minta felcseppentése **szilárd hordozóra** (membrán).
2. A hordozón rögzült antigént jelölt antitesttel mutatják ki, vagy színes végterméket adó kromogénnel, vagy kemilumineszcens módon (lásd később).

Felhasználás: Meghatározott fehérje specifikus kimutatása kevert fehérjemintában.



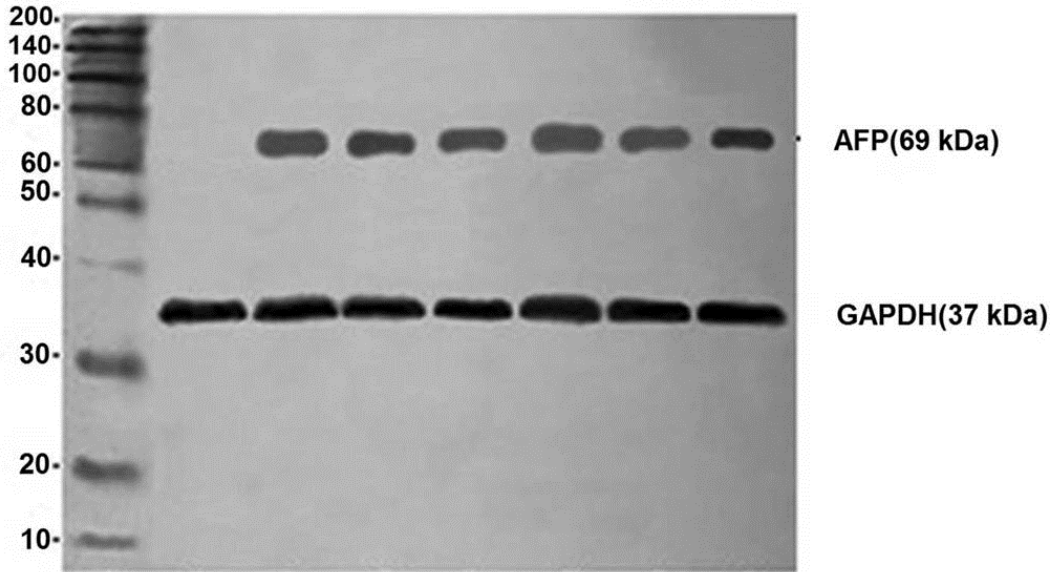
Két minta összehasonlítása különböző fehérjékre nézve dot bloton.

Western blot^[16.]

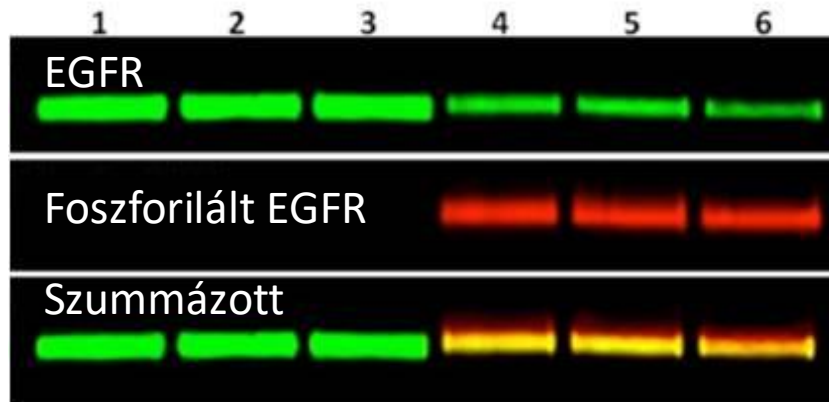


Példák

AFP és a GAPDH (mennyiségi kontroll) együttes előhívása **kemilumineszcens** technikával:



EGFR foszforiláció vizsgálata **fluoreszcens Western blottal**:

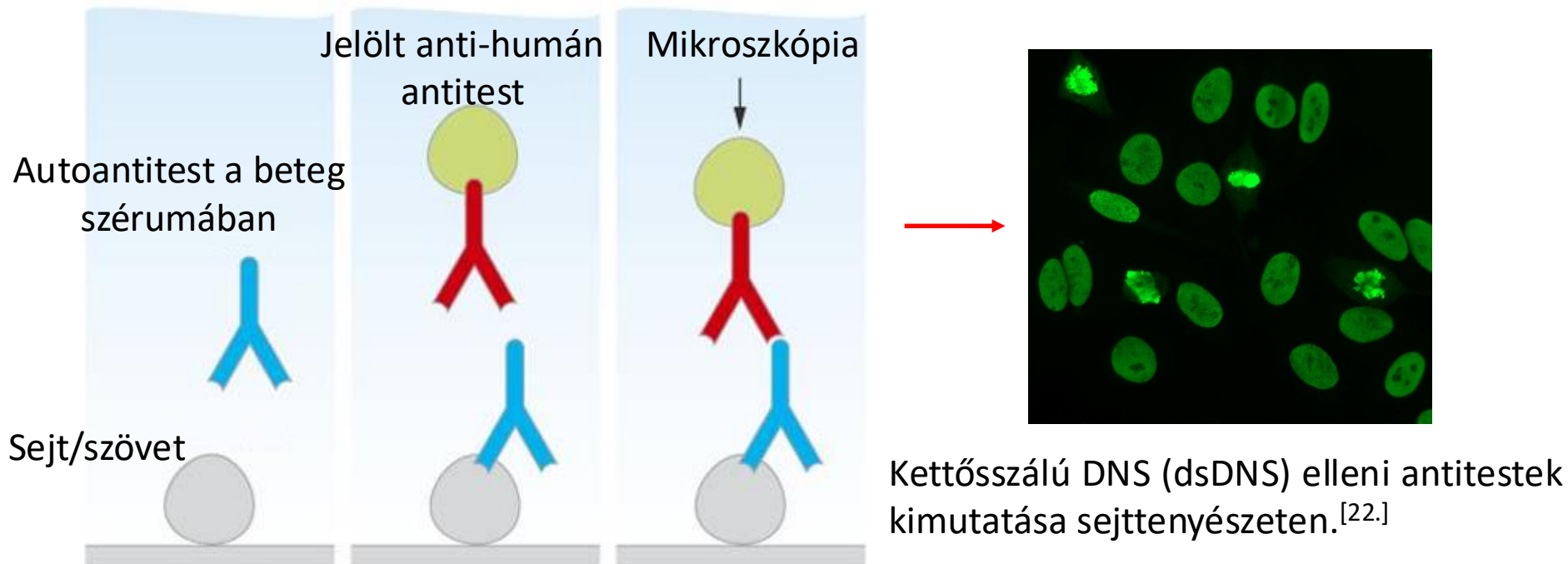


A Western blot jelentősége

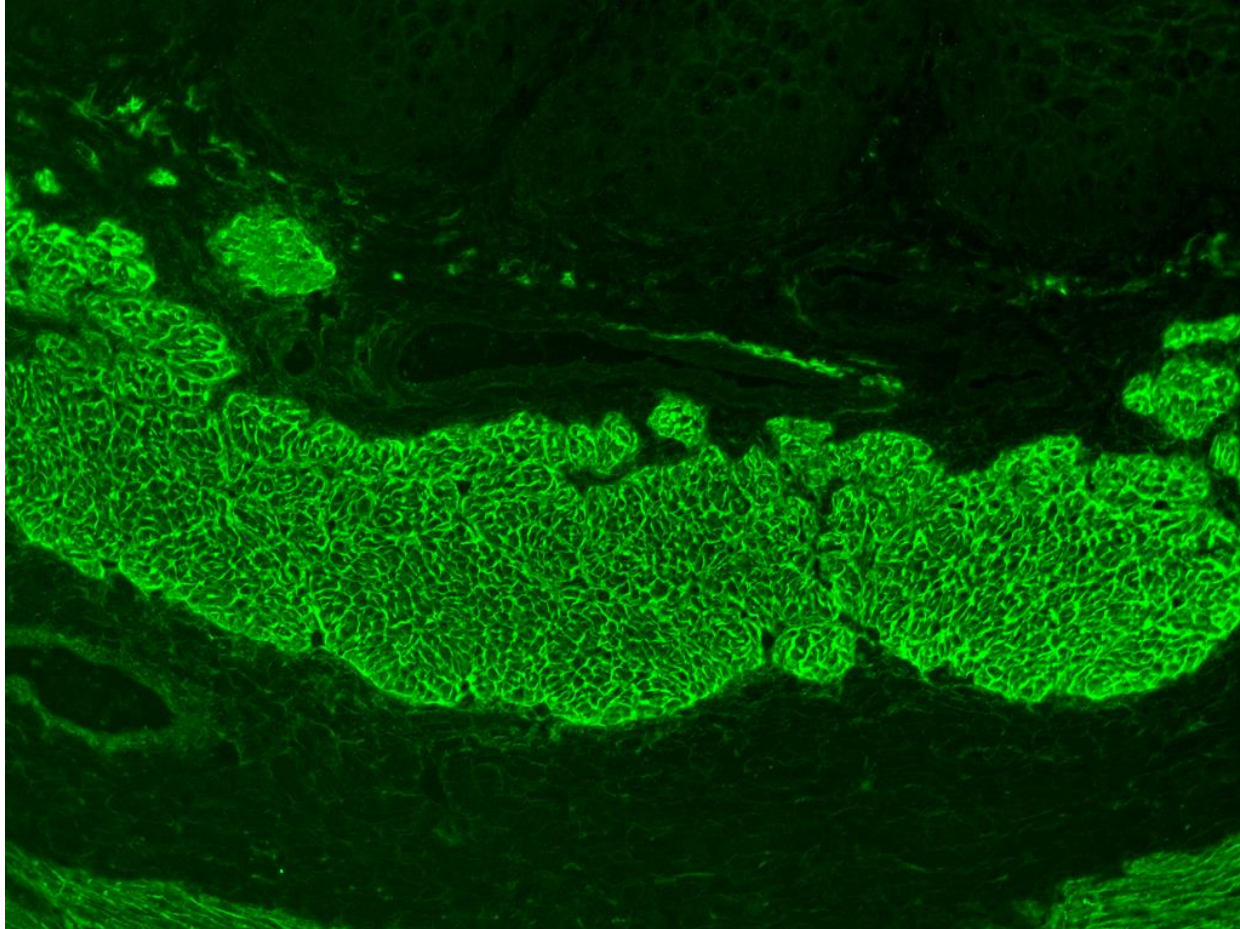
- Mire jó?
 - Egy kevert fehérjemintában **specifikusan mutat ki** meghatározott **fehérjéket**, melyek **méretét** is megadja, emellett **szemikvantitatív**.
 - Immunprecipitációval alkalmas **fehérje-fehérje kapcsolatok** kimutatására.
 - Alkalmas funkcionális vizsgálatokra, pl. fehérje **foszforiláció** detektálására.
- Kutatásban az egyik legelterjedtebb fehérjevizsgáló módszer.
- Klinikai gyakorlatban limitált a felhasználása, mert **nehezen standardizálható**.^[18.]
- Példák a diagnosztikus felhasználásra:
 - Egyes **fertőző betegségek** gyanújának megerősítése, pl.:
 - Lyme-kór^[19.]
 - BSE (Bovine spongiform encephalopathy, „kergemarha-kór”)^[20.]
 - HIV szűrés során a pozitív ELISA lelet megerősítése.^[21.]

Indirekt immunfluoreszcens mikroszkópia, mint szerológiai vizsgálómódszer

- Fluoreszcens mikroszkópia leírása → lásd 4. gyakorlat
- Felhasználás: **Autoimmun kórképek diagnosztikája** (részletesen lásd később)
- Lényeg: A beteg szérumát valamilyen sejtenyészethez vagy szövethez adják hozzá, mellyel egyes kóros autoantitestek reagálnak. A kikötődött humán autoantitesteket fluoreszcensen jelölt anti-humán ellenanyagokkal teszik láthatóvá.



Indirekt immunfluoreszcencia példa



Endomysium-ellenes autoantitest (EMA) kimutatása lisztérzékeny beteg szérumából majom nyelőcsövön. A nyelőcső metszetet először a beteg szérumával inkubálták, majd fluoreszcensen jelölt (**FITC**) anti-humán ellenanyaggal kezelték.^[23.]

A szerológiai módszerek érzékenysége

Módszer	Becsült érzékenység (μg fehérje/ml minta)
Precipitáció folyadékokban	20-200
Ouchterlony-féle kettős immundiffúzió	20-200
Immunelektroforézis	20-200
Mancini-féle radiális immundiffúzió	10-50
Rakéta immunelektrofézis	2
Immunfluoreszcencia	1
Direkt agglutináció	0,3
Passzív agglutináció	0,006-0,06
ELISA	0,0001-0,01

Hivatkozások 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.

Hivatkozások 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.