



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

## Gyakorlat menete:

Az asztalokon különböző gyári ELISA kitek vannak kihelyezve.

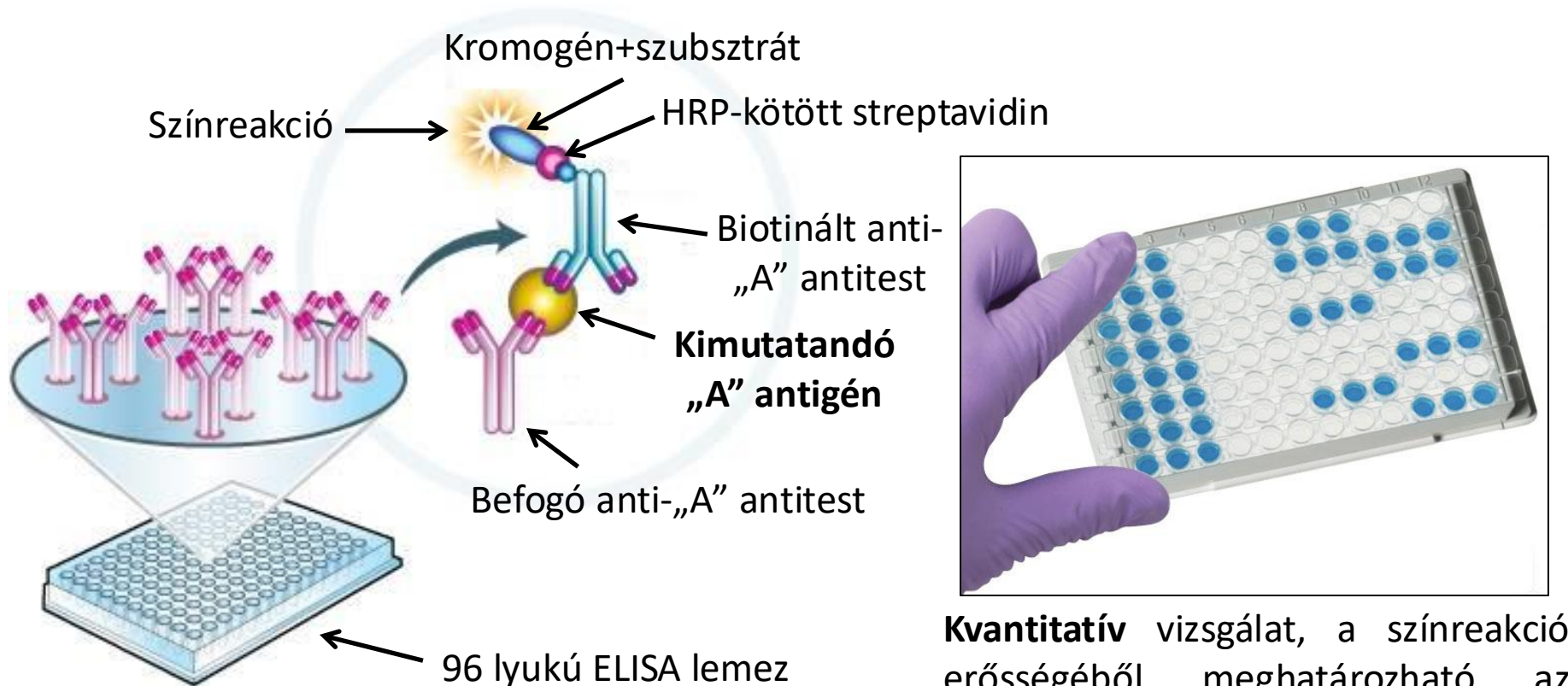
1. **Érzékenyítés:** az antigén kikötése az ELISA lemezhez.
  2. **Telítés:** nem specifikus kötőhelyek blokkolása zselatinnal.
- } Eddig a gyártó elvégezte.
3. A vizsgált **szérumminta** és a **standardok betöltése**. (100µl, 30 perc inkubáció)  
A gyakorlaton csak ez utóbbi áll rendelkezésre.
  4. **Mosás** háromszor.
  5. **100µl** anti-humán IgG-PO vagy IgM-PO **antitest** hozzáadása, **30 perc** inkubálás.
  6. **Mosás** háromszor.
  7. **Előhívás** 100µl tetrametil-benzidin (TMB) oldattal.
  8. Reakció **leállítás**a 50µl sav oldattal.
  9. (ELISA lemez leolvasása, értékelése.)



**HÚZZATOK KESZTYŰT!**

# ELISA alapok I.

- **ELISA** = **E**nzyme-**L**inked **I**mmunosorbent **A**ssay<sup>[1.]</sup> (enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálat)
- Példa az ELISA működési elvére (ún. sandwich ELISA, lásd következő diákon):

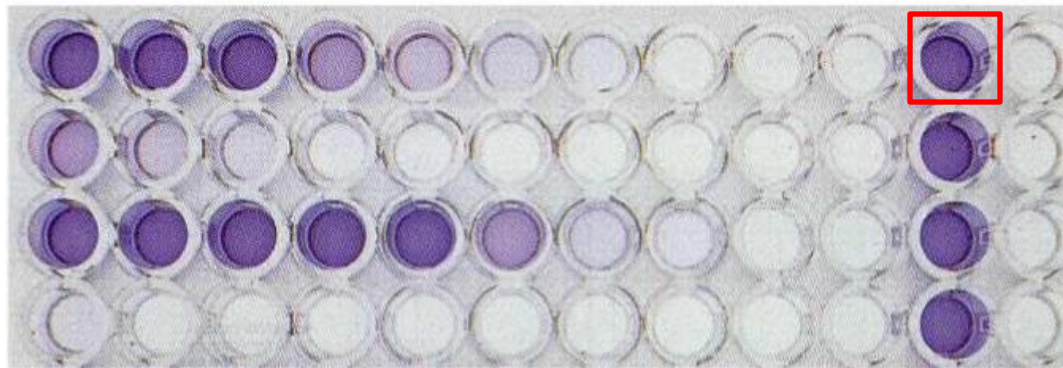
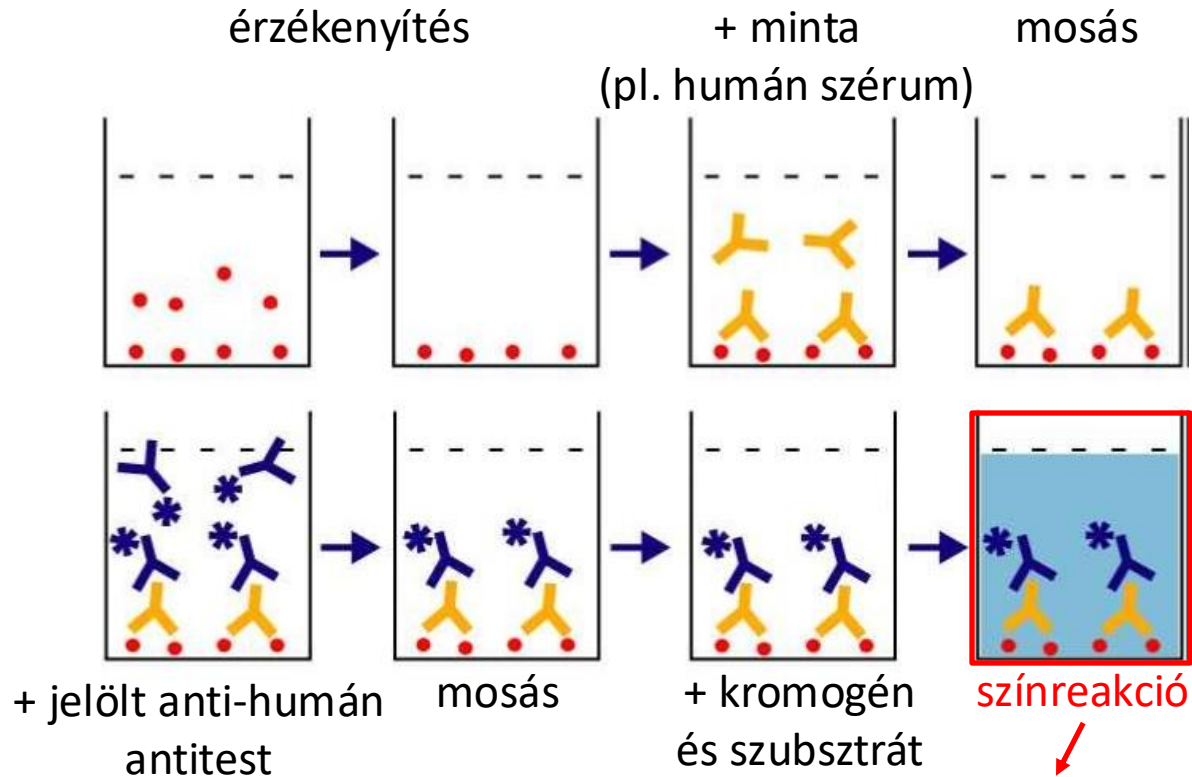


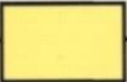


**Kvantitatív** vizsgálat, a színreakció erősségéből meghatározható az antigén **pontos koncentrációja!**


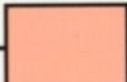
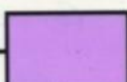

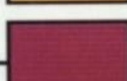
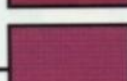
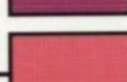

# ELISA alapok II.

- **Antigén-antitest reakción** alapul, **mindkettő** kimutatható.<sup>[2.]</sup>
- **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)



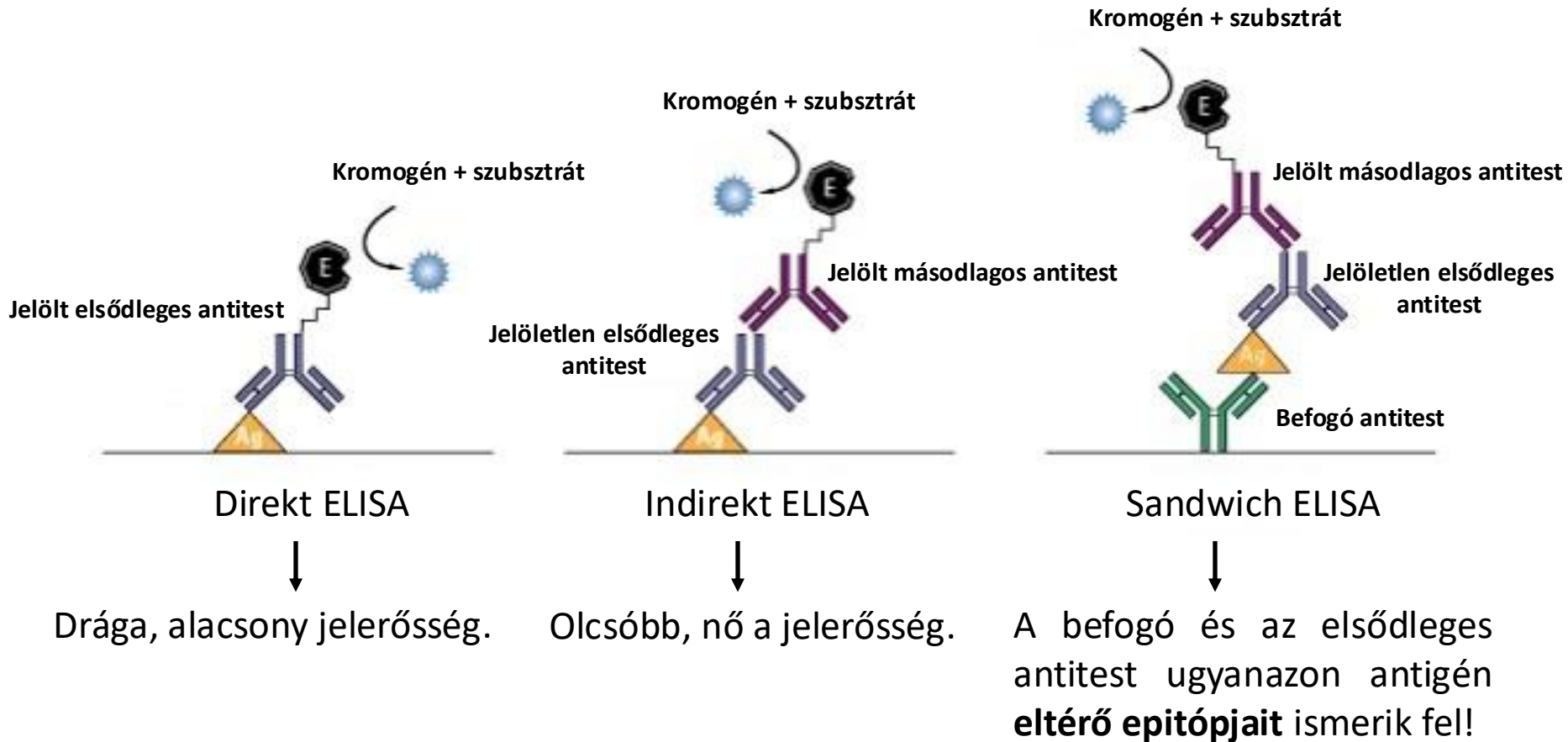
Alkalikus foszfátáz	p-nitrofenil-foszfát (pNPP)		oldható	ELISA
	Nitro blue tetrazolium (NBT)		oldhatatlan	hisztokémia, immunoblot
	Fast Red		oldhatatlan	hisztokémia, immunoblot

Peroxidáz	ABTS		oldható	ELISA
	o-feniléndiamin (OPD)		oldható	ELISA
	tetrametilbenzidin (TMB)		oldható	ELISA
	o-dianizidin		oldható	ELISA
	5-aminosalicilsav (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.

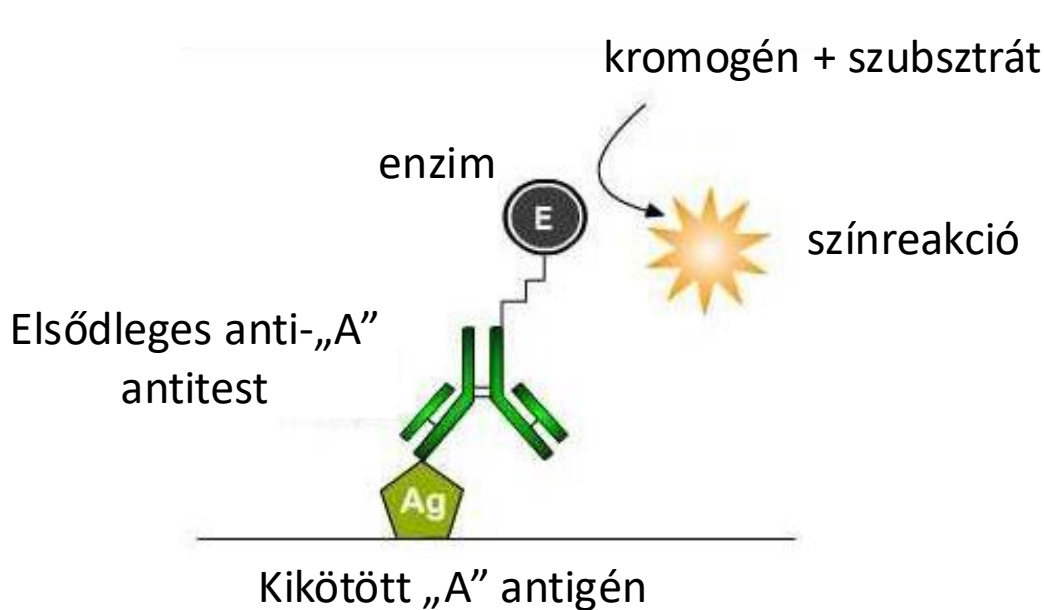
# Főbb ELISA típusok





# Direkt ELISA

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



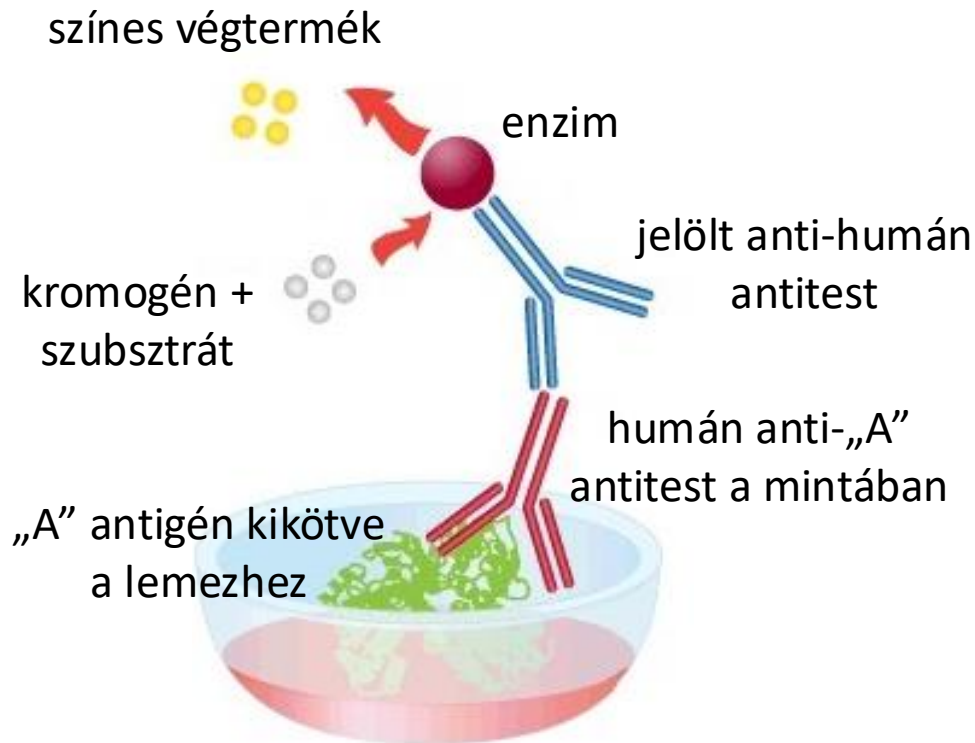
Előny:

- **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)

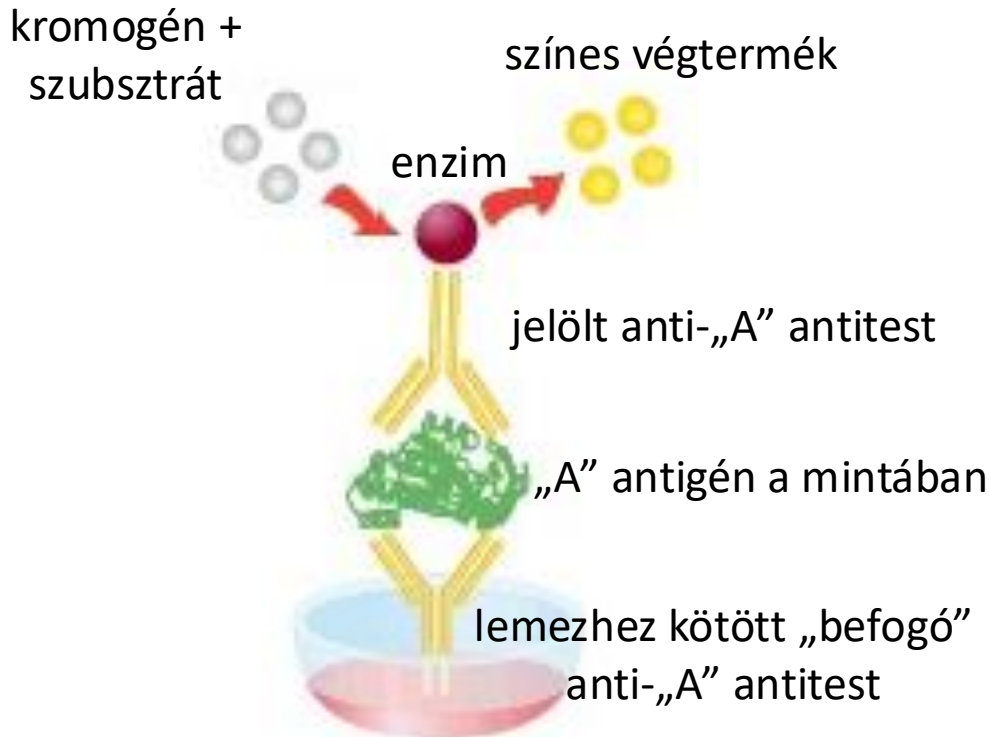
# Indirekt ELISA



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

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

# Sandwich ELISA



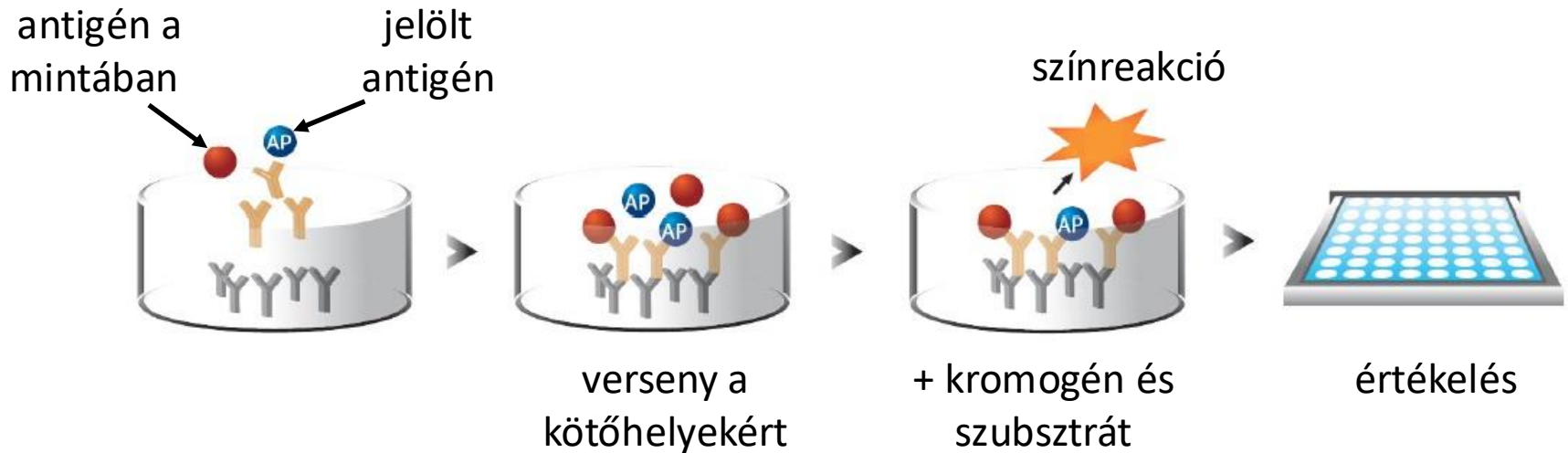
Felhasználás: **Antigén specifikus kimutatása** a mintában.

Pl.:

- Citokinek
- Tumormarkerek
- Hormonok
- Stb.

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

# Kompetíciós ELISA



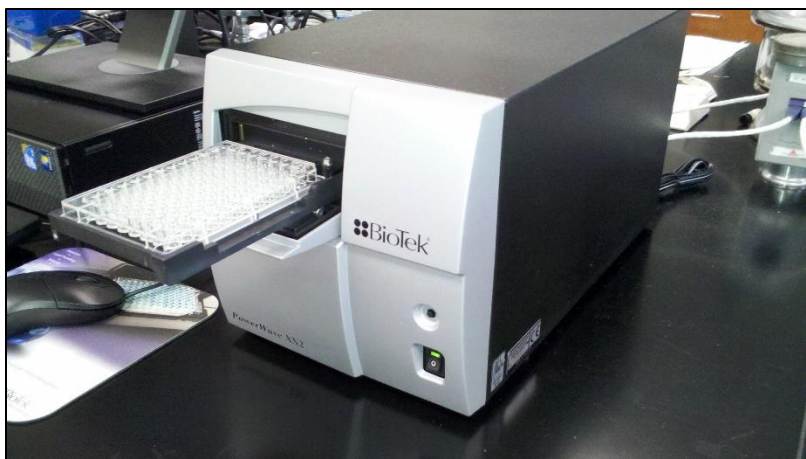
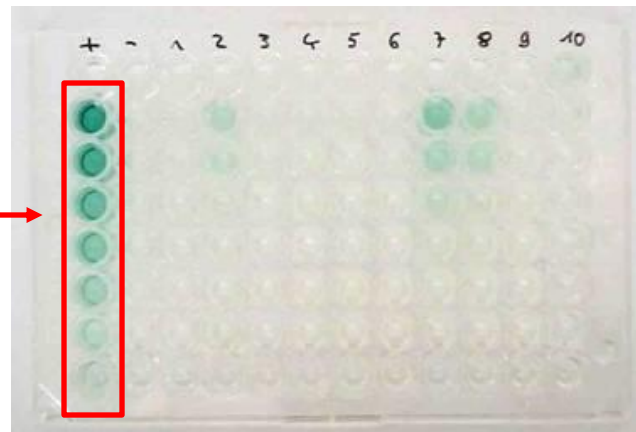
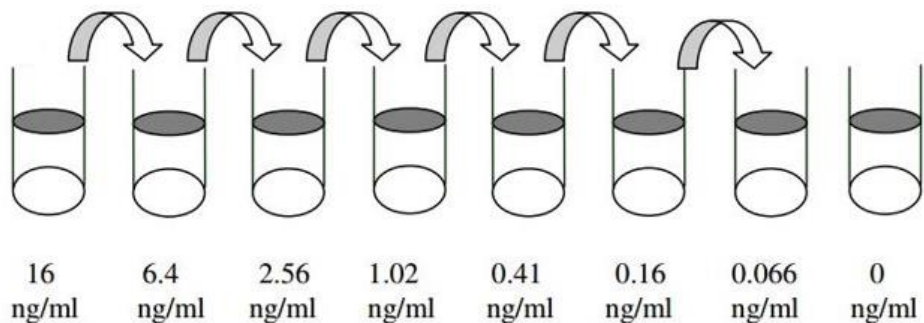
Felhasználás: **Antigén kimutatása** valamilyen mintában.

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.)

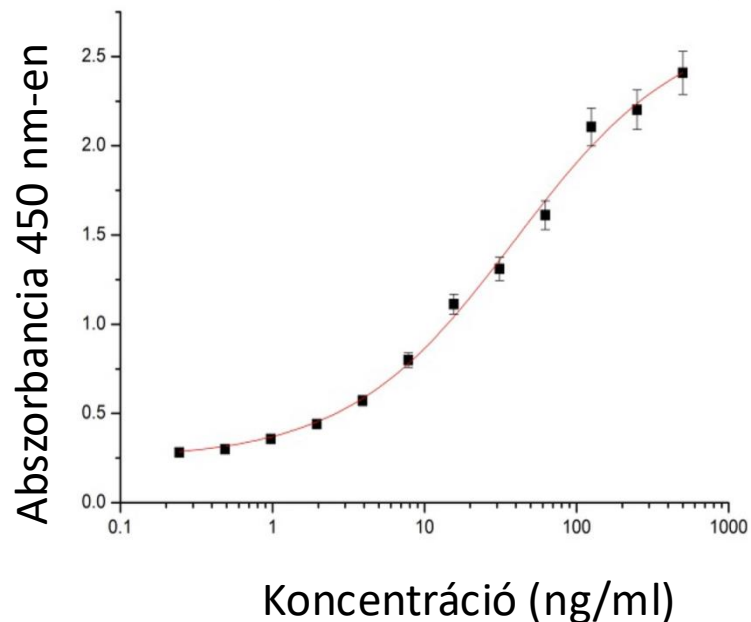
# ELISA értékelése I.

Ismert koncentrációjú **standard sor** készítése:



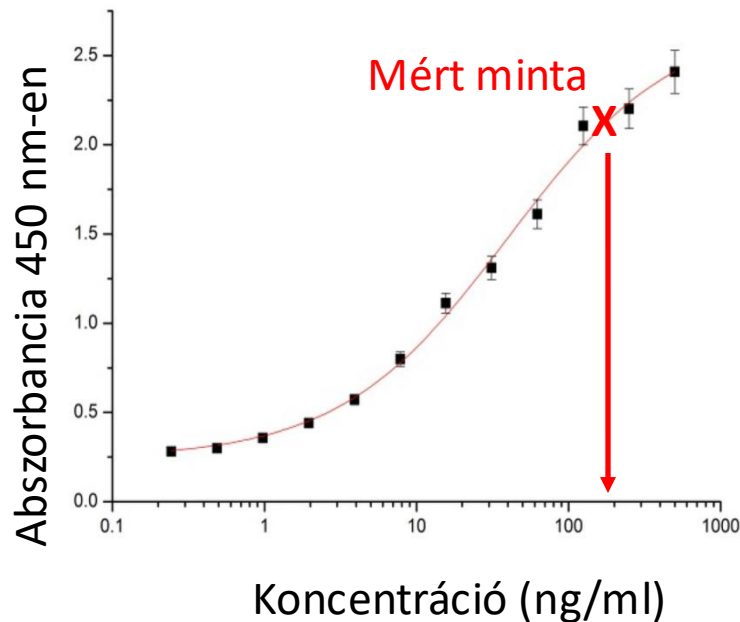
Egy ELISA olvasó, mely megméri az egyes lyukakban a **fényelnyelést** (abszorbancia).

Kalibrációs görbe a standardok alapján:

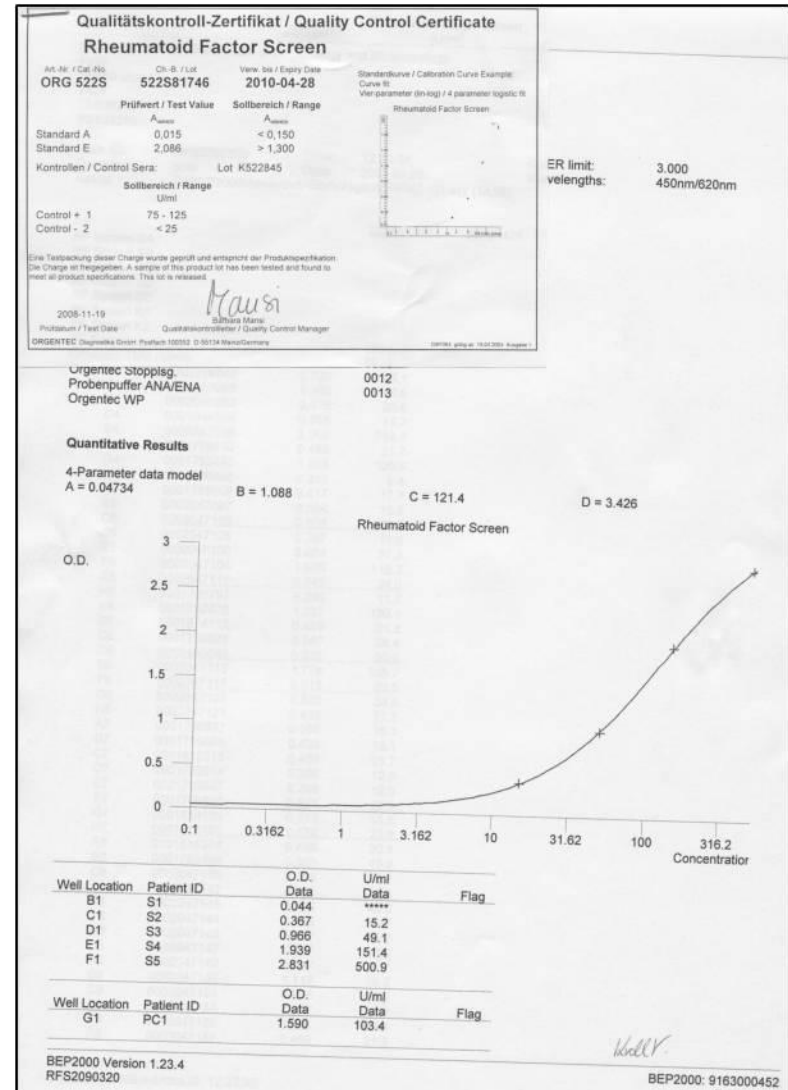


# ELISA értékelése II.

Kalibrációs görbe:



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



Egy rutin ELISA lelet  
(rheumatoid faktor meghatározás)

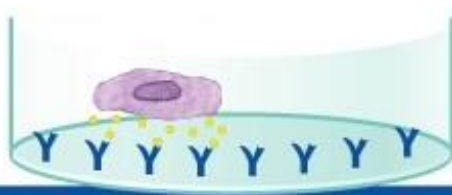
# AZ ELISA jelentősége

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

# ELISPOT

## ELISPOT vizsgálat<sup>[15.]</sup>

1. nap

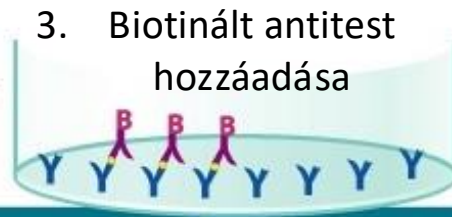


1. Az antigént termelő sejtek inkubálása az antigénre specifikus befogó antitesttel.

2. nap

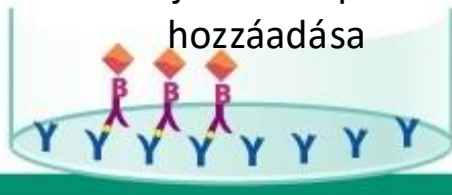


2. Sejtek kimosása



3. Biotinált antitest hozzáadása

3. nap



4. Enzim-jelölt streptavidin hozzáadása



5. Kromogén hozzáadása

- Y befogó antitest
- vizsgált antigén
- Y 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 $\gamma$ termelés vizsgálata T-sejtekben

kezeletlen T-sejtek:



0 pötty („spot”)

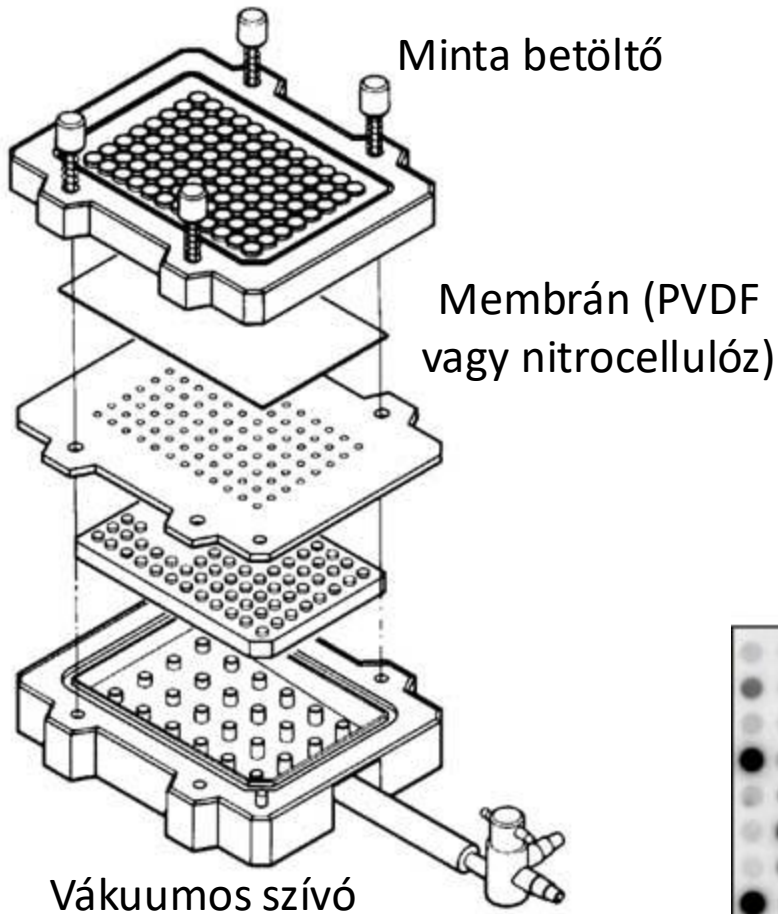
anti-CD3 kezelt T-sejtek:



760 pötty

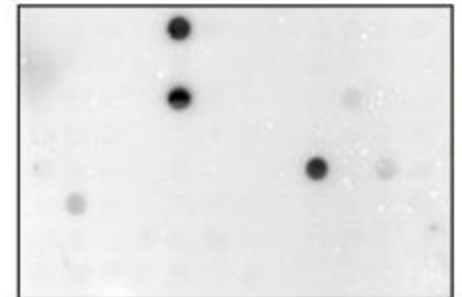
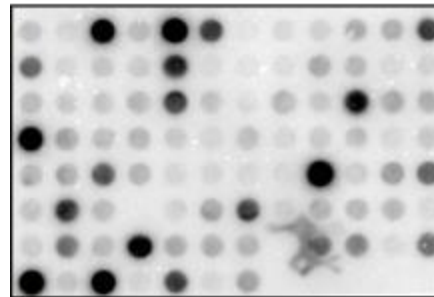
Interferon-gamma (IFN $\gamma$ ) termelés vizsgálata **ELISPOT módszerrel**. A sejtek ki lettek helyezve a lemezre, az általuk termelt IFN $\gamma$ -át a lemezhez kötött befogó antitestek megkötötték, melyet enzimatis reakcióval tettek láthatóvá. Az anti-CD3 antitesttel stimulált T-sejtek aktiválódtak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

# Dot blot



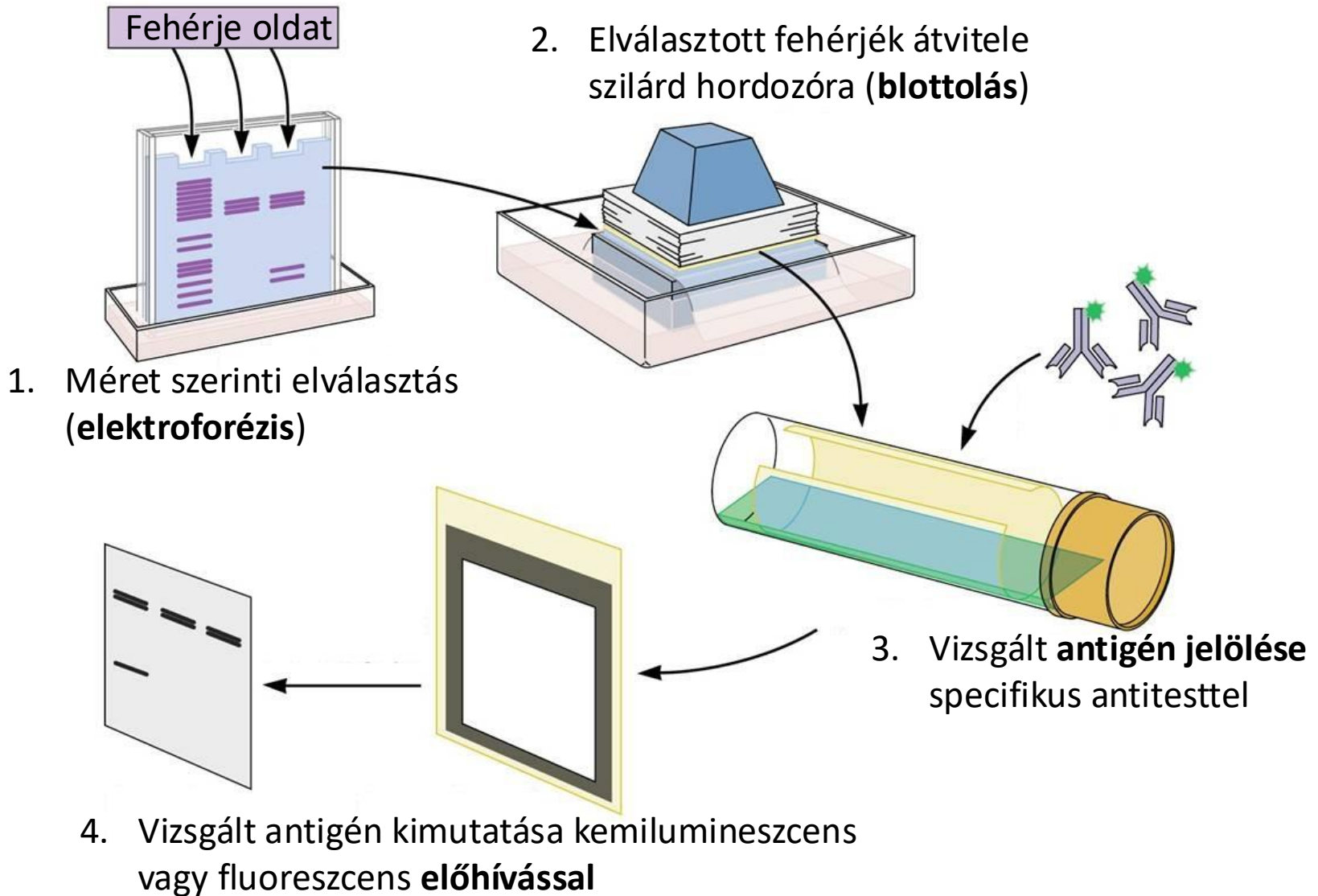
1. Antigént tartalmazó minta felcseppentése **szilárd hordozóra** (membrán).
2. A hordozón rögzült antigént jelölt antitesttel mutatják ki, vagy színes végterméket adó kromogénnel, vagy kemilumineszcens módon (lásd később).

**Felhasználás:** Meghatározott fehérje specifikus kimutatása kevert fehérjemintában.



Két minta összehasonlítása különböző fehérjékre nézve dot bloton.

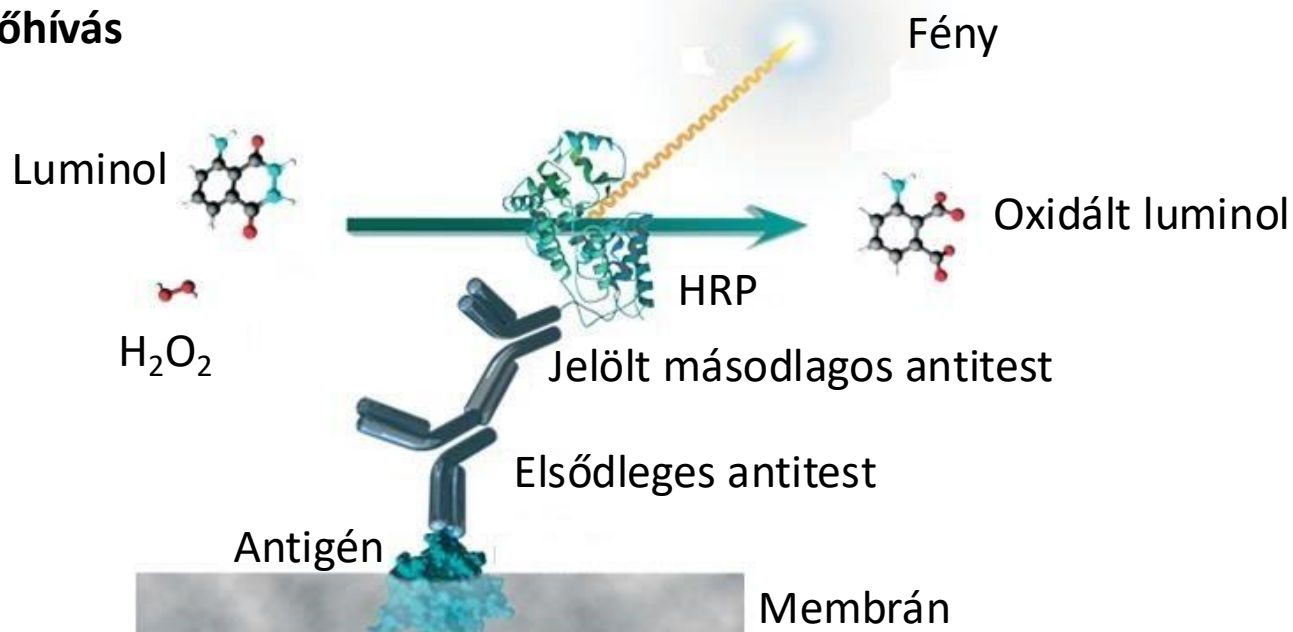
# Western blot<sup>[16.]</sup>



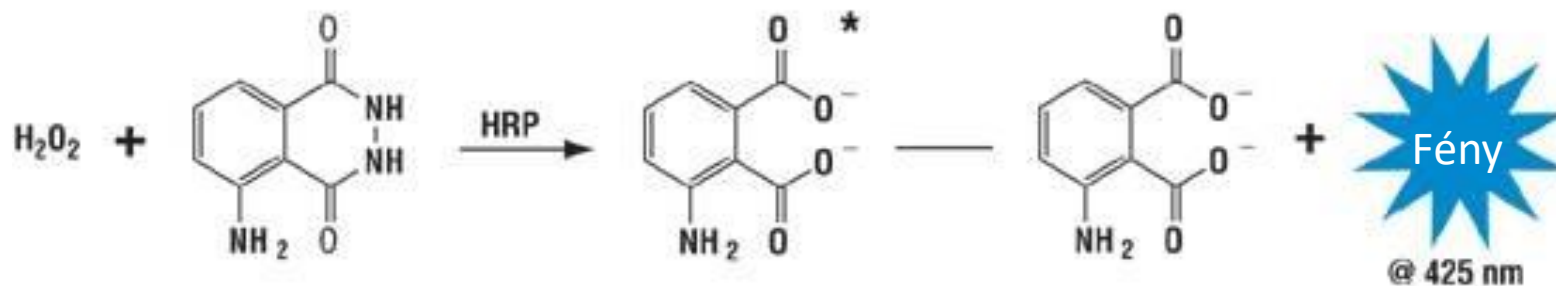
# Előhívás

A kötődött antitestek többféleképpen is láthatóvá tehetők, a leggyakoribb módszerek<sup>[17.]</sup>:

- Kemilumineszcens reakció
- Fluoreszcens előhívás

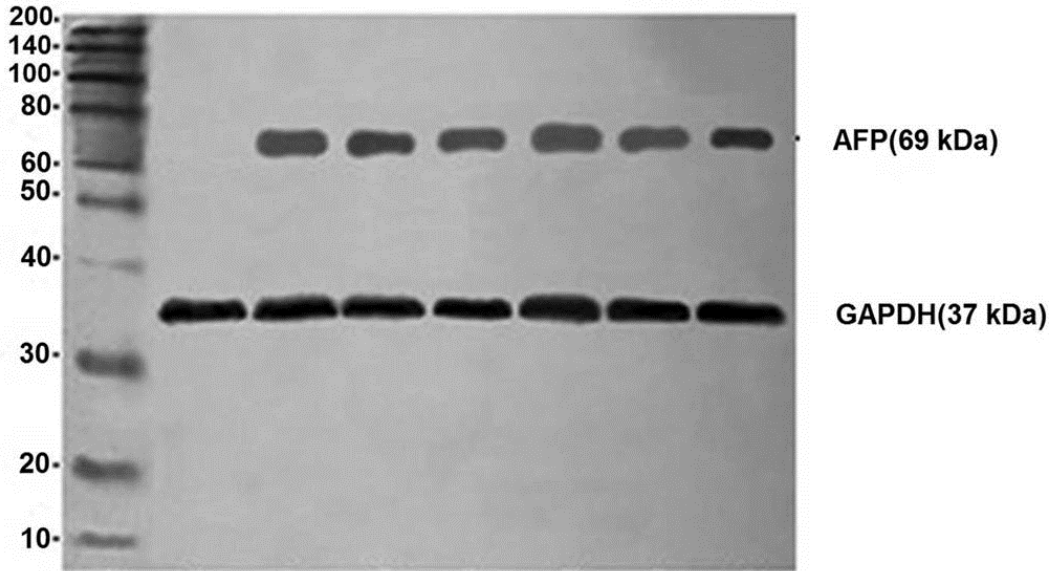


A luminol kemilumineszcens reakciója:



# Példák

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



EGFR foszforiláció vizsgálata **fluoreszcens Western blottal**:

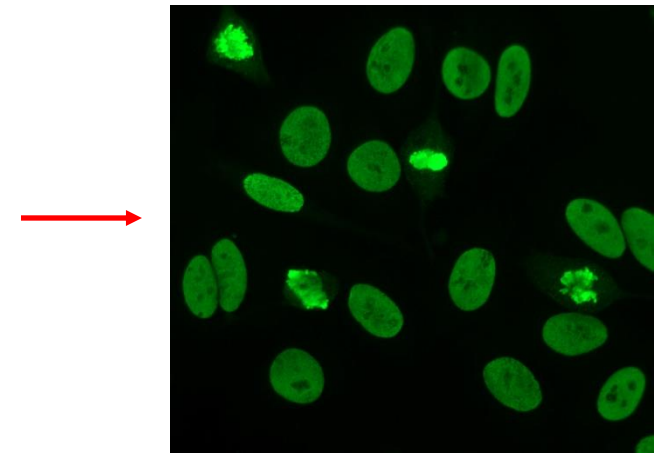
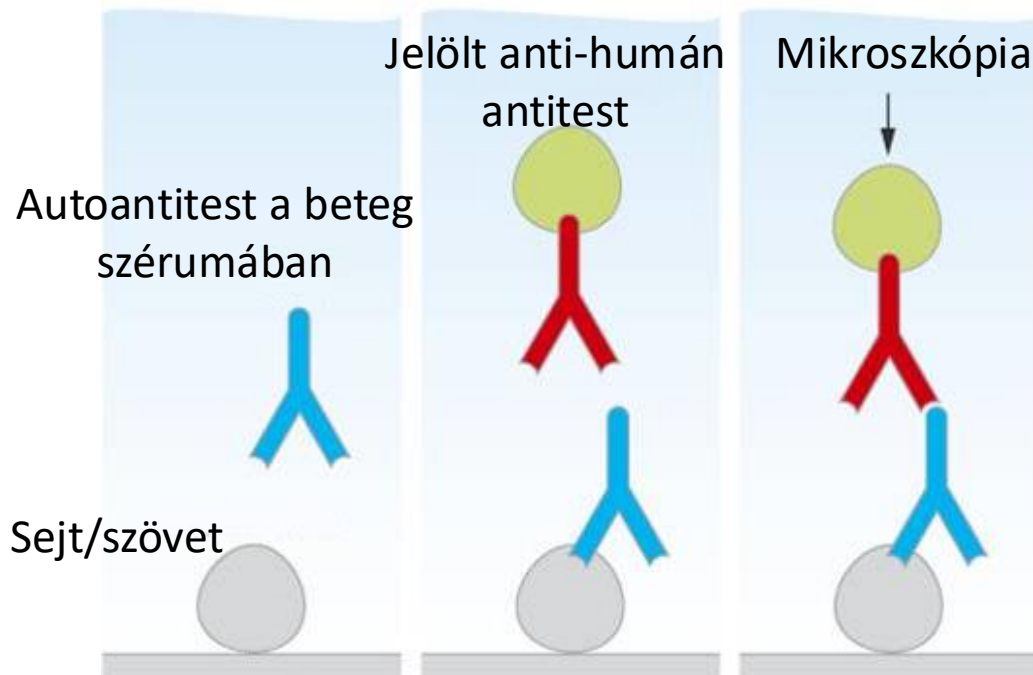


# A Western blot jelentősége

- 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**.<sup>[18.]</sup>
- Példák a diagnosztikus felhasználásra:
  - Egyes **fertőző betegségek** gyanújának megerősítése, pl.:
    - Lyme-kór<sup>[19.]</sup>
    - BSE (Bovine spongiform encephalopathy, „kergemarha-kór”)<sup>[20.]</sup>
    - HIV szűrés során a pozitív ELISA lelet megerősítése.<sup>[21.]</sup>

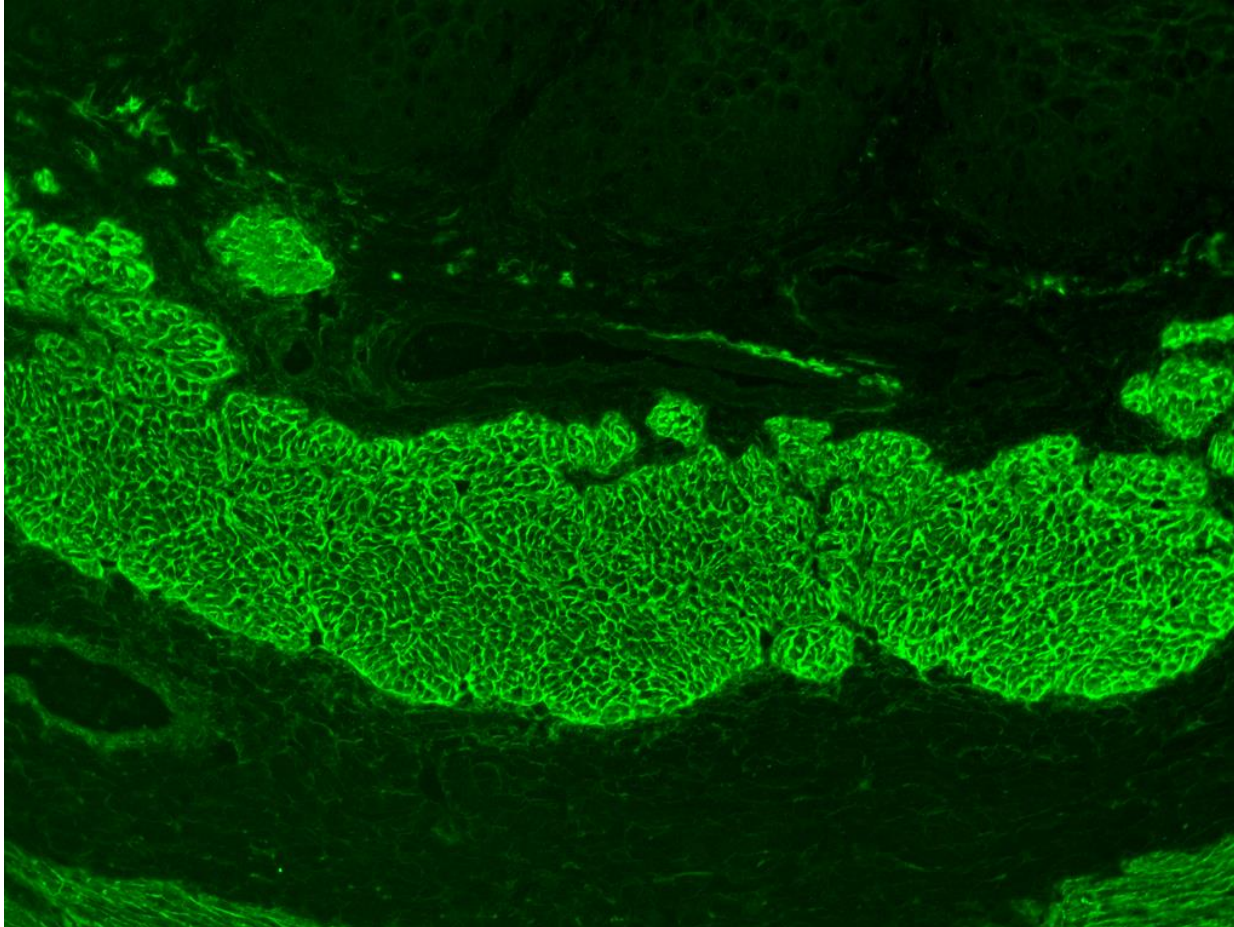
# Indirekt immunfluoreszcens mikroszkópia, mint szerológiai vizsgálómódszer

- 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.



Kettősszálú DNS (dsDNS) elleni antitestek kimutatása sejtenyészeten.<sup>[22.]</sup>

# 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.<sup>[23.]</sup>



# A szerológiai módszerek érzékenysége

Módszer	Becsült érzékenység ( $\mu\text{g}$ 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 RM<sup>1</sup>: **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 AV<sup>1</sup>: **Direct ELISA**. *Methods Mol Biol*. 2015;1318:61-7. doi: 10.1007/978-1-4939-2742-5\_6.
4. Delaunay T<sup>1</sup>, 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 A<sup>1</sup>: **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 M<sup>1</sup>, 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 GG<sup>1</sup>, 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 KN<sup>1</sup>, 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 J<sup>1</sup>, 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 V<sup>1</sup>, 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 I<sup>1</sup>, 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 S<sup>1</sup>, 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 M<sup>1</sup>, 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 M<sup>1</sup>, 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 AE<sup>1</sup>: **Chemistry and biology of the ELISPOT assay.** *Methods Mol Biol.* 2005;302:15-31.
16. Hnasko TS<sup>1</sup>, Hnasko RM: **The Western Blot.** *Methods Mol Biol.* 2015;1318:87-96. doi: 10.1007/978-1-4939-2742-5\_9.
17. Mathews ST<sup>1</sup>, 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 M<sup>1</sup>, 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 A<sup>1</sup>, 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 C<sup>1</sup>: **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 LV<sup>1</sup>, 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 C<sup>1</sup>, et al: **Anti-nuclear antibody screening using HEp-2 cells.** *J Vis Exp.* 2014 Jun 23;(88):e51211. doi: 10.3791/51211.
23. Amara W<sup>1</sup>, 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.