

Immunológiai módszerek a klinikai kutatásban

8. előadás

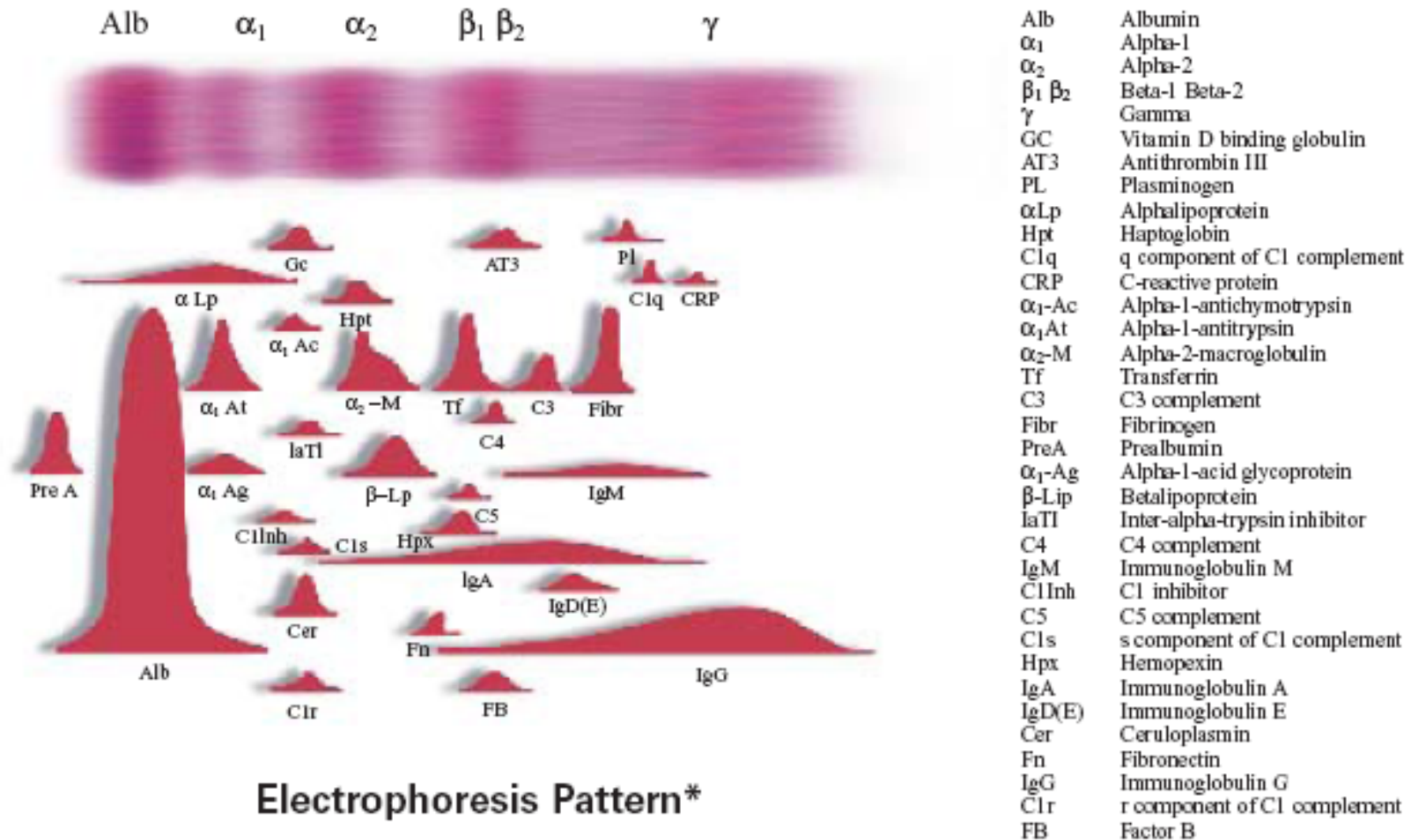
Immunszerológia, immunkémia

Az immunoassay-k érzékenysége

Különböző eljárásokkal kimutatható legkisebb ellenanyag koncentrációk

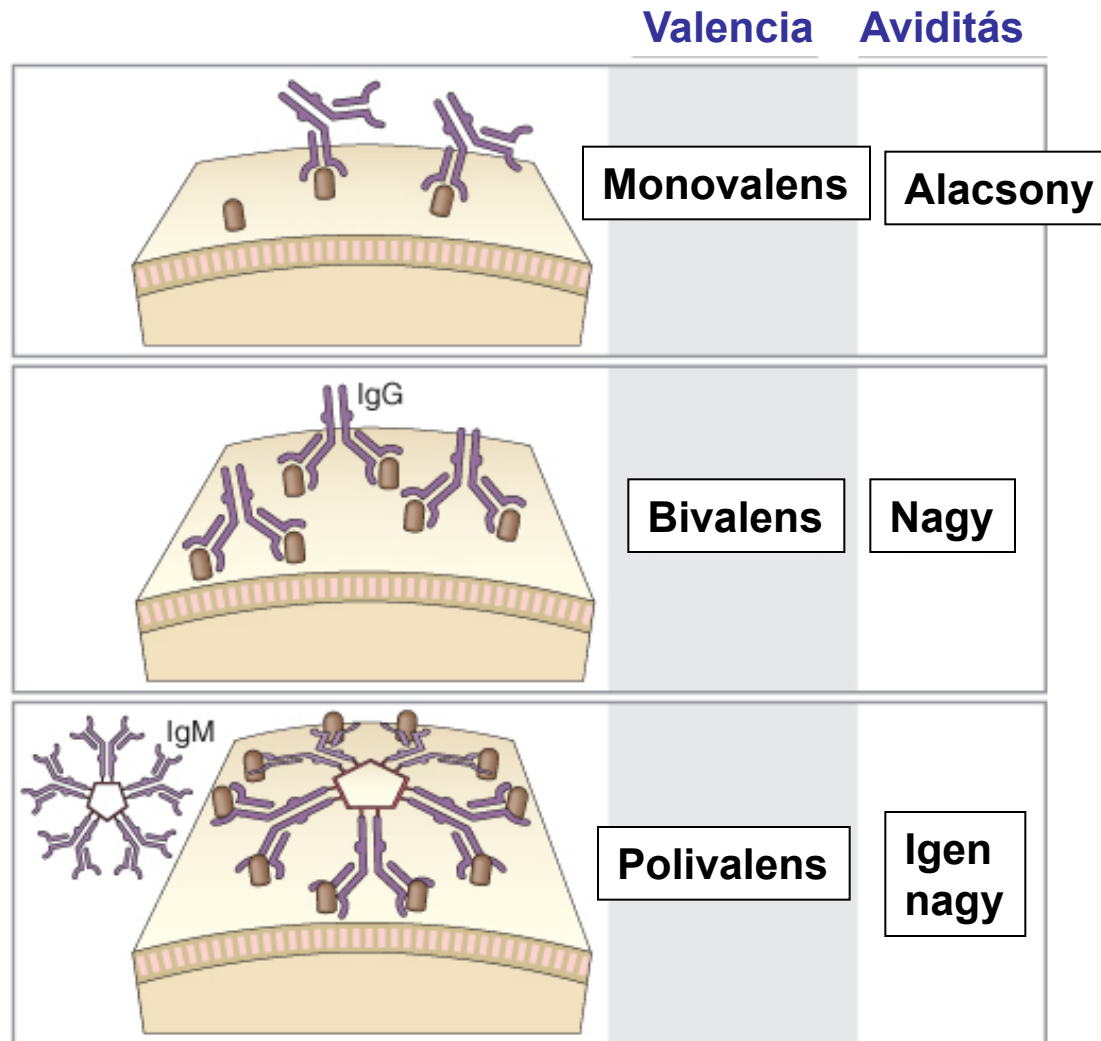
Immunfluoreszcencia	• 1 – 100 ng
Enzim immunoassay (ELISA)	• 0.2 – 100 pg
Lumineszcencia	• 0.1 – 100 pg
Radio-immunoassay (RIA, Farr)	• 0.1 – 100 pg
Immunoblot	• 0.2 – 100 pg

A fő szérumfehérje frakciók és az ahhoz tartozó fehérjék

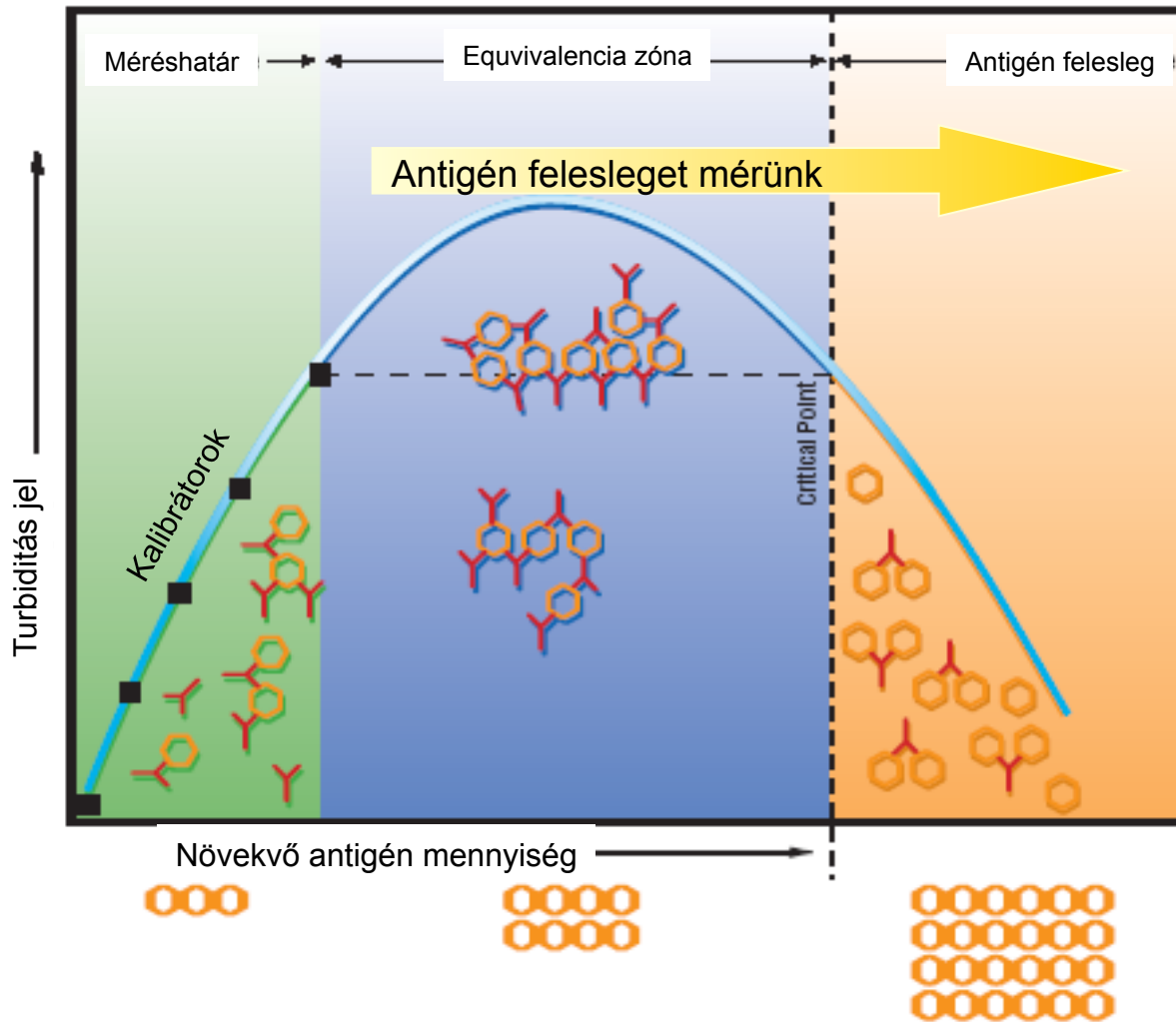


*Adapted from Laurell, C-B (11).

Az Ig valencia és aviditás viszonya

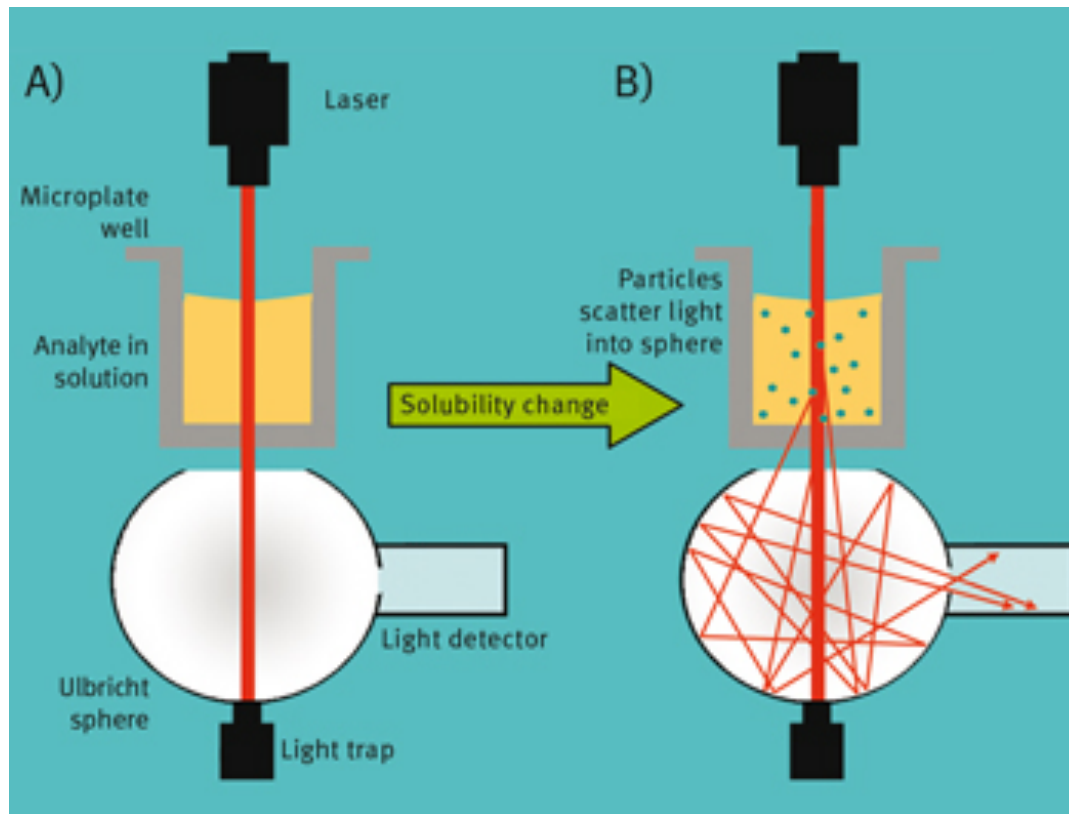


Heidelberg görbe



Az antigén-antitest reakcióban képződő immunkomplex keletkezésének jellemzői

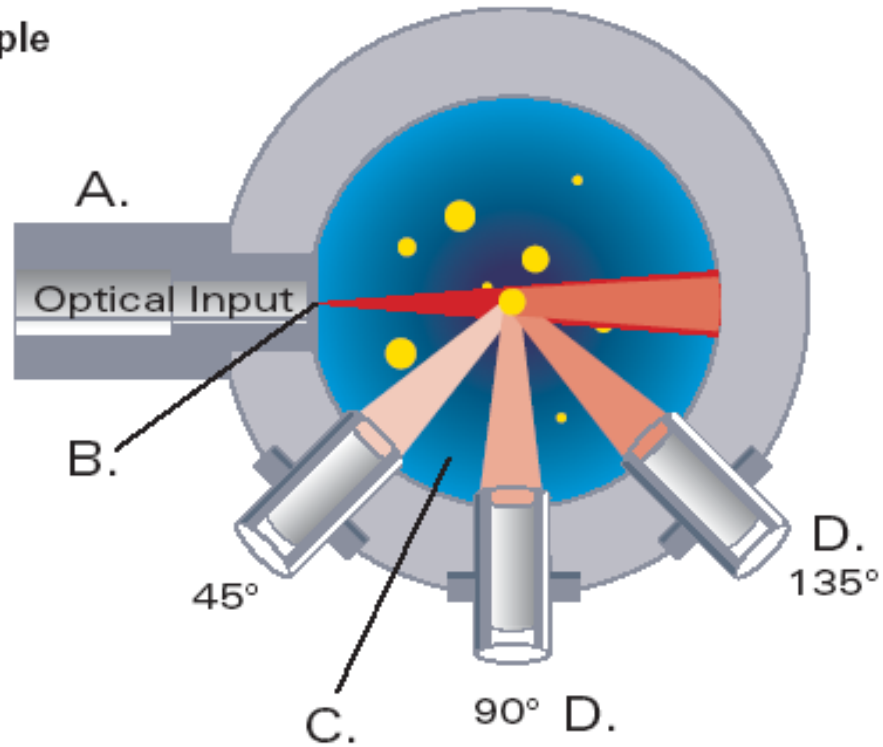
Nefelometria mérési elve



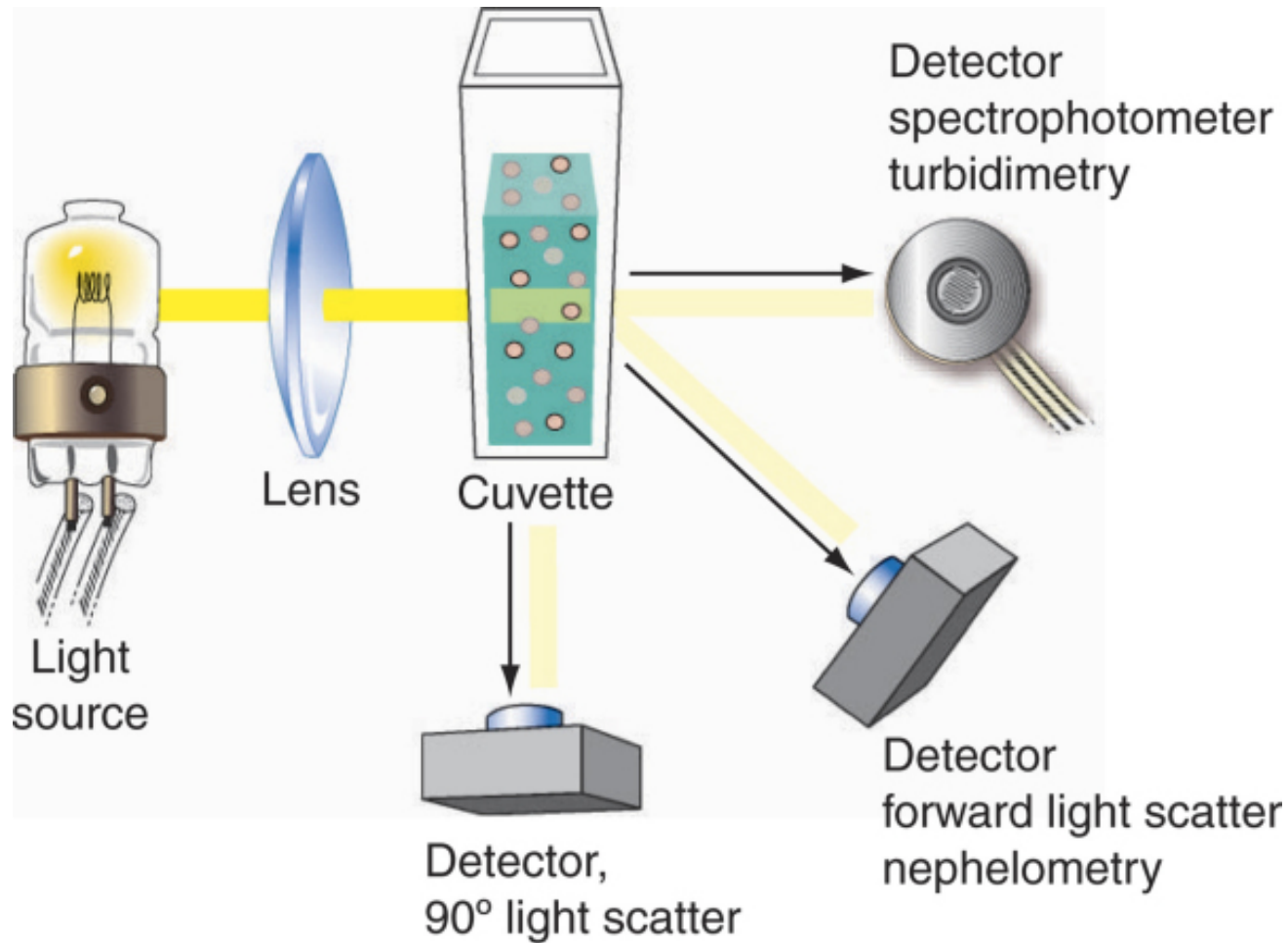
Nephelometria elve

Nephelometry Principle

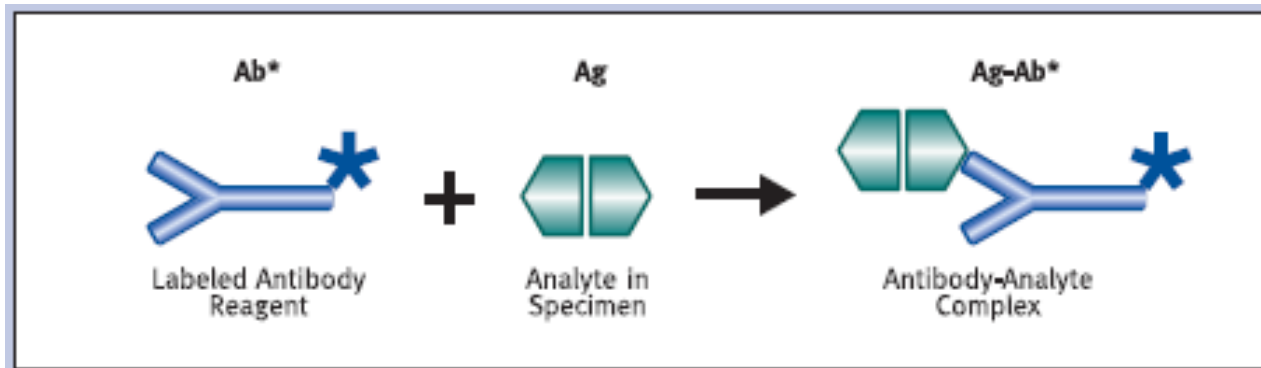
- A. Incoming Light
- B. Slit
- C. Reaction Cuvette
- D. Photo Detectors



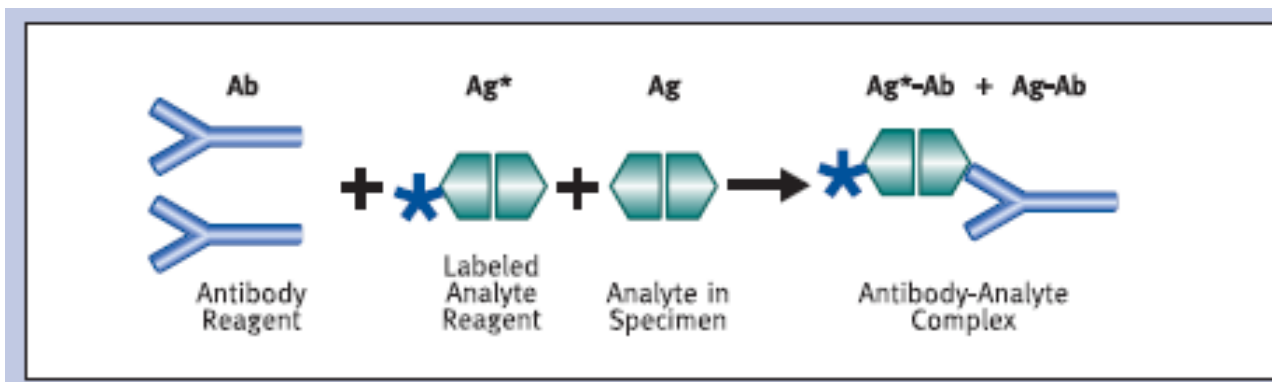
A nefelometria és turbidimetria optikai felépítése



Az immunoassay formátumok a jelölés helye szerint

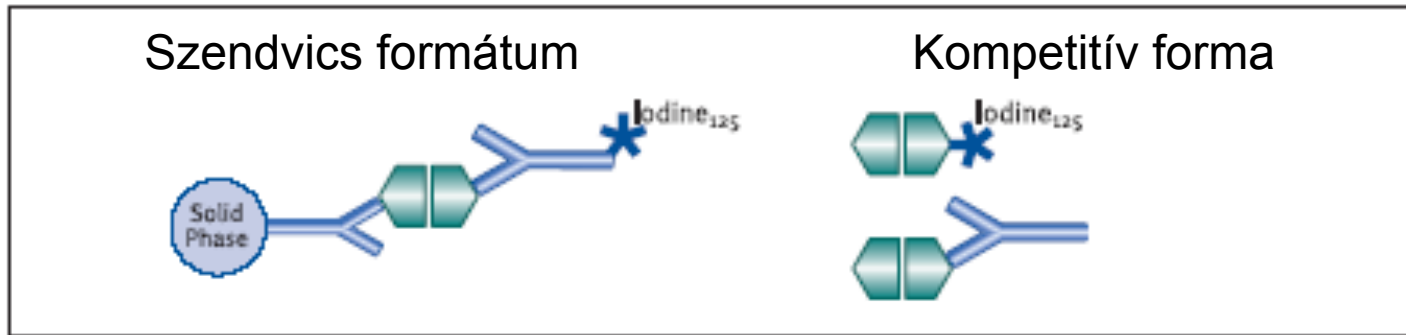


Jelölt antitestet alkalmazunk indirekt immunoassay-ben és a szendvics formátumban



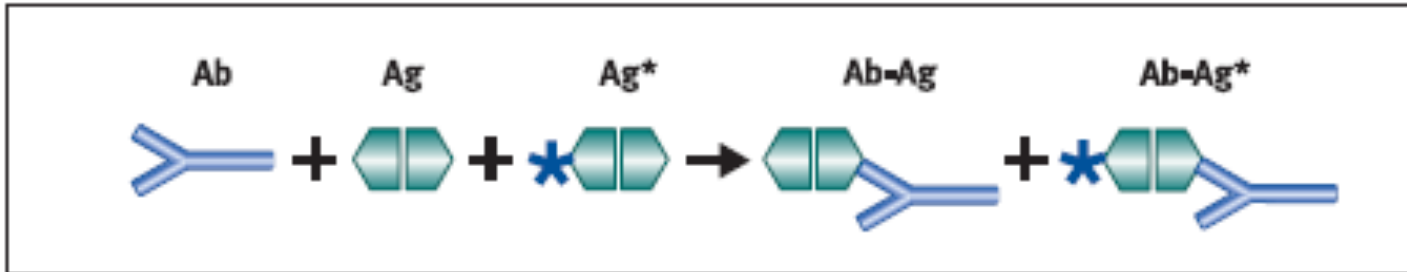
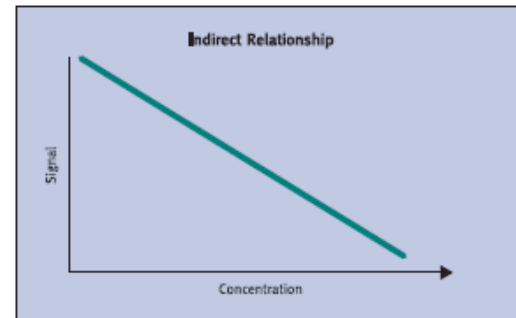
Jelölt antigént a kompetíciós formátumú immunoassay-ben alkalmazunk

A RIA radioaktív jelölést használ

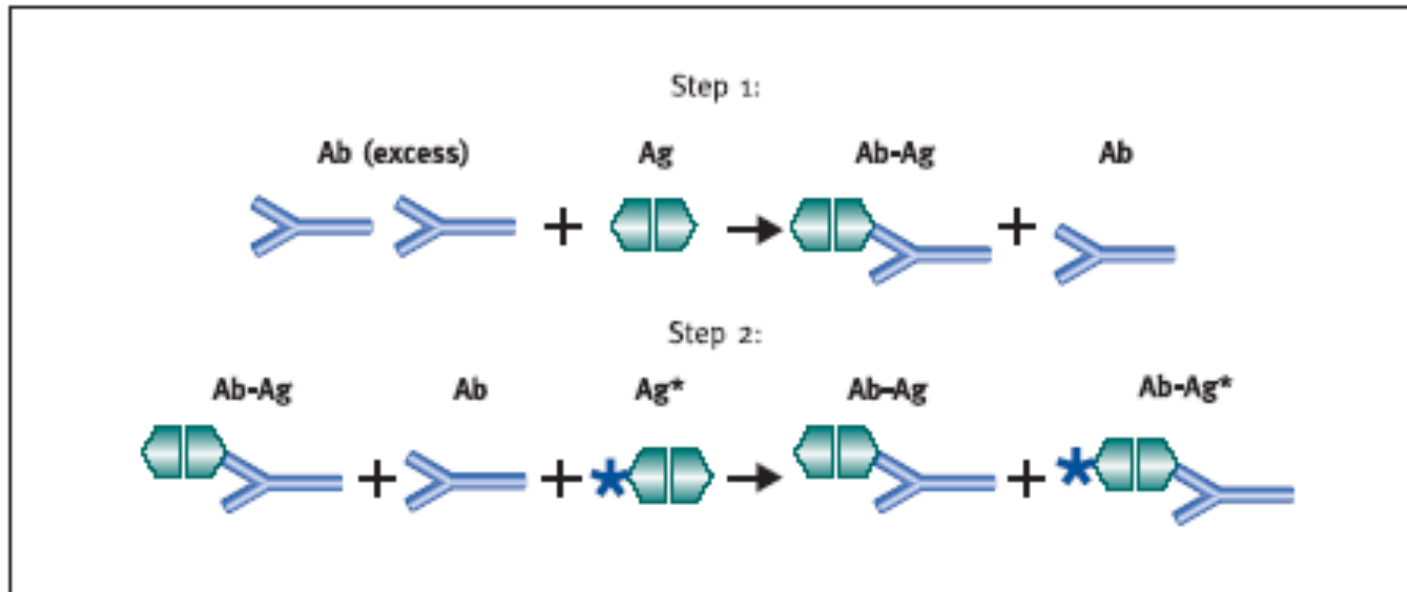


Kompetíciós assay:

fordított arány a jel és az analit koncentrációja között



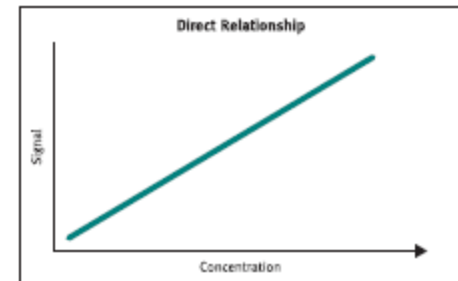
Egylépéses kompetitív immunoassay



Kétlépéses kompetitív immunoassay

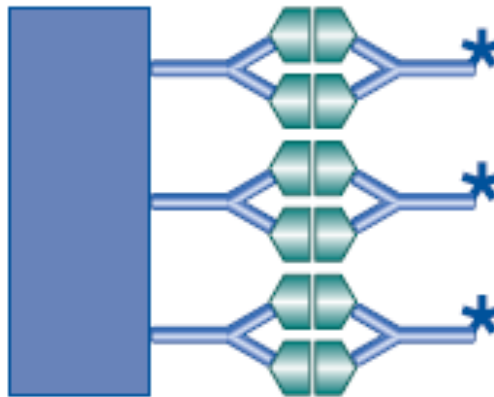
Nem-kompetitív, szendvics assay

egyenes arányosság a jel és antigén koncentráció között

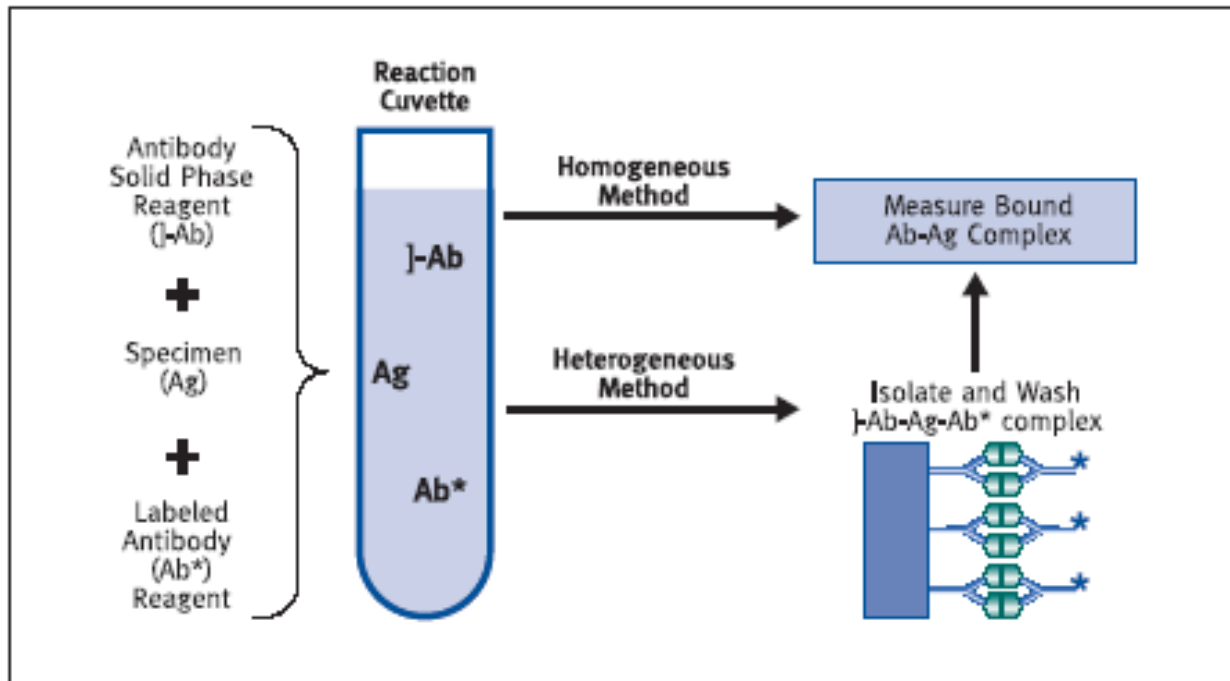


Szendvics assay: az antitestek az antigén két epitópját ismerik fel

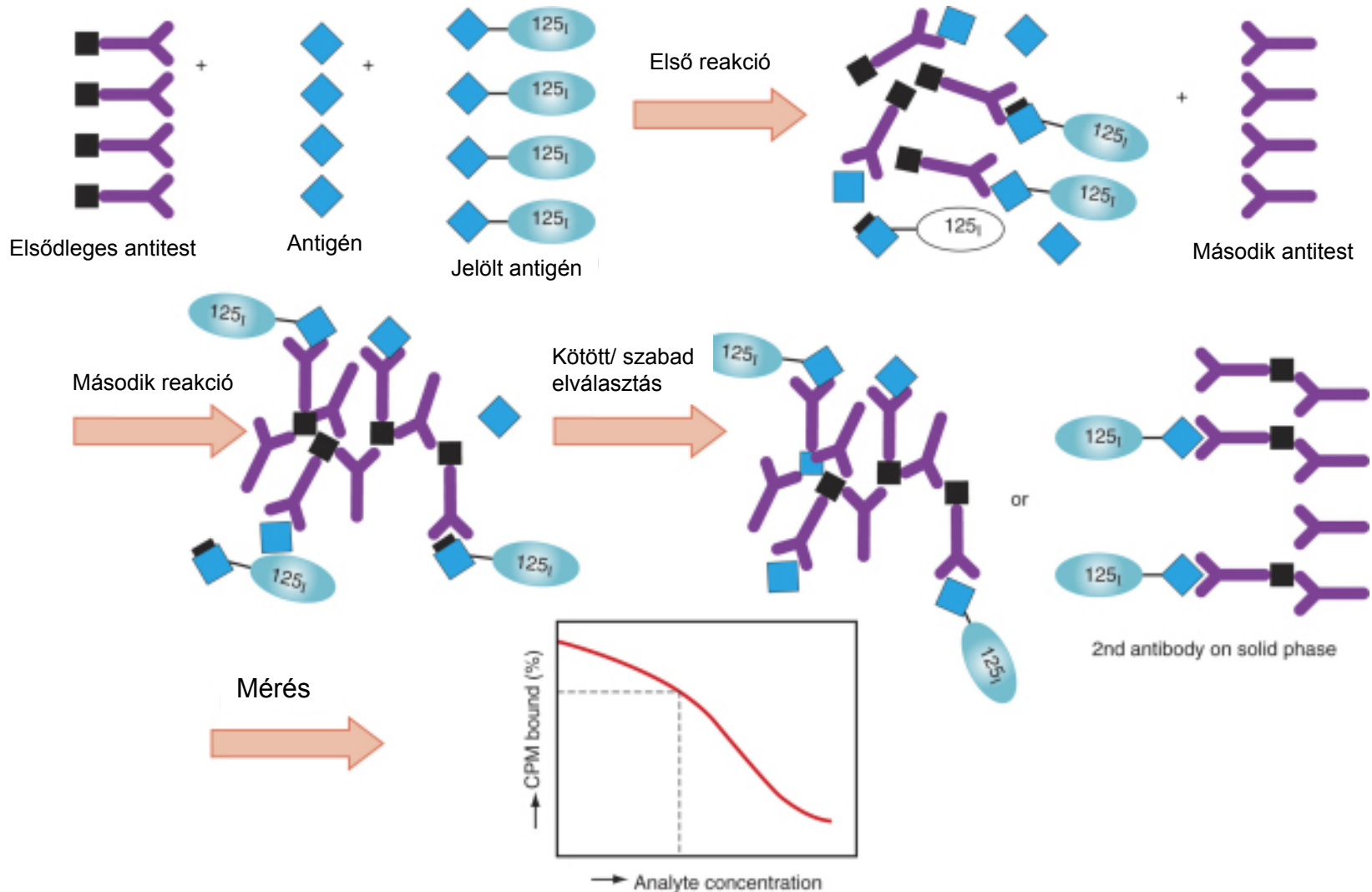
Szilárd hordozó:
Mikropartikulum
Beadek
Mikrotitráló lemez



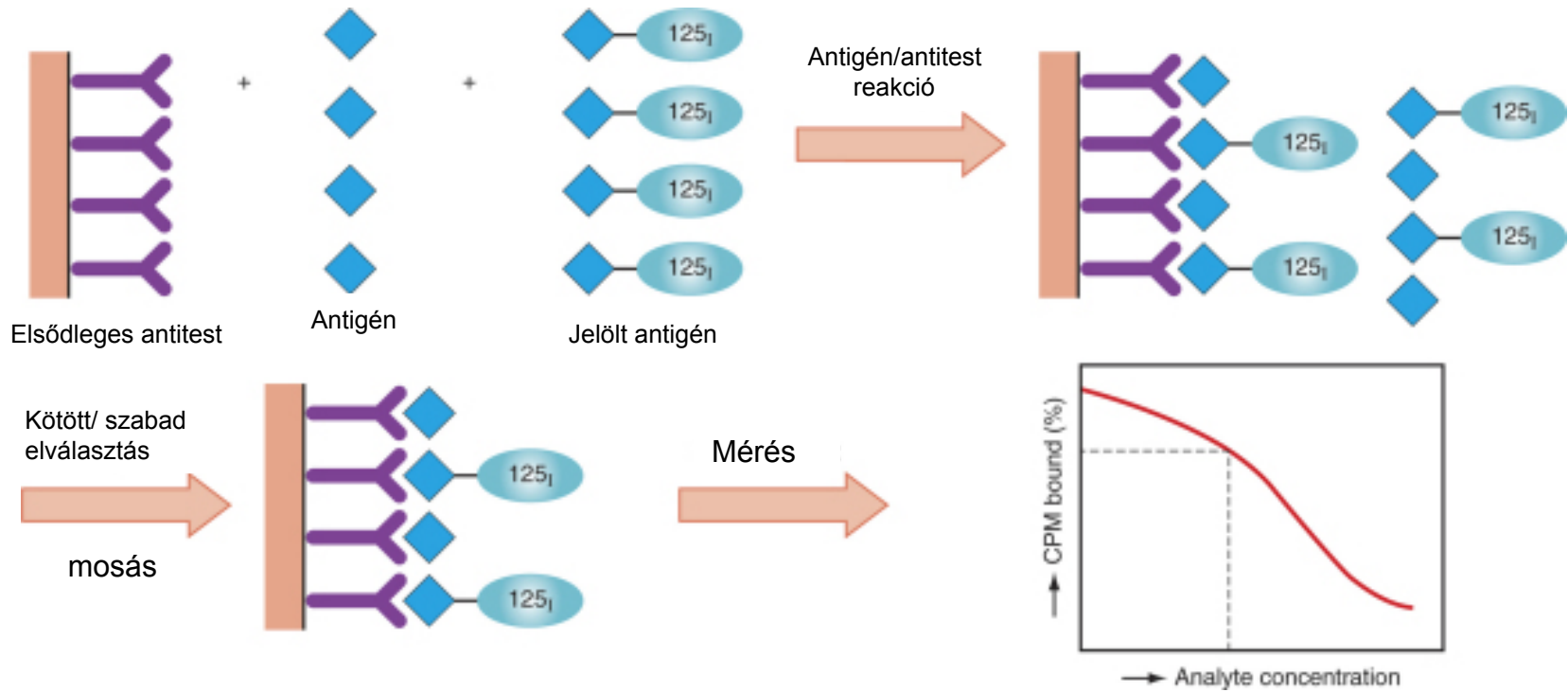
Homogén és heterogén immunoassay



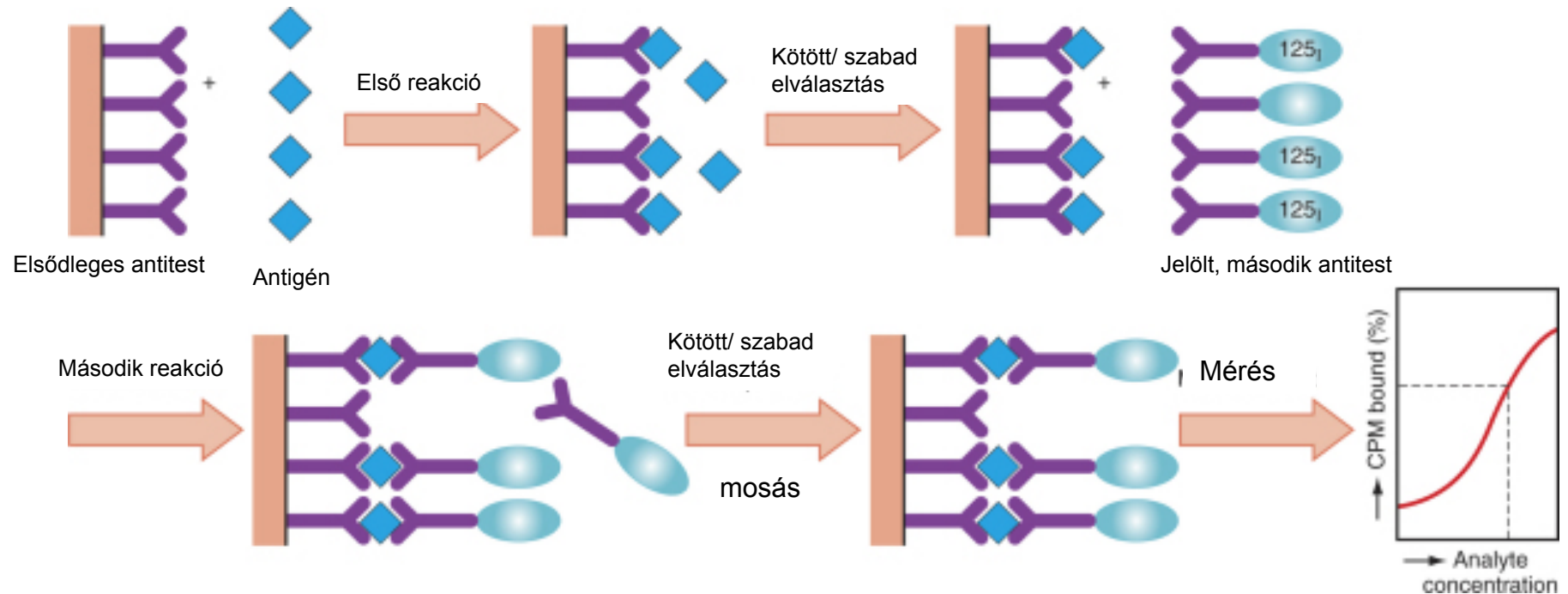
Kompetitív RIA: második antitestet használ a kötött és szabad frakció elválasztására



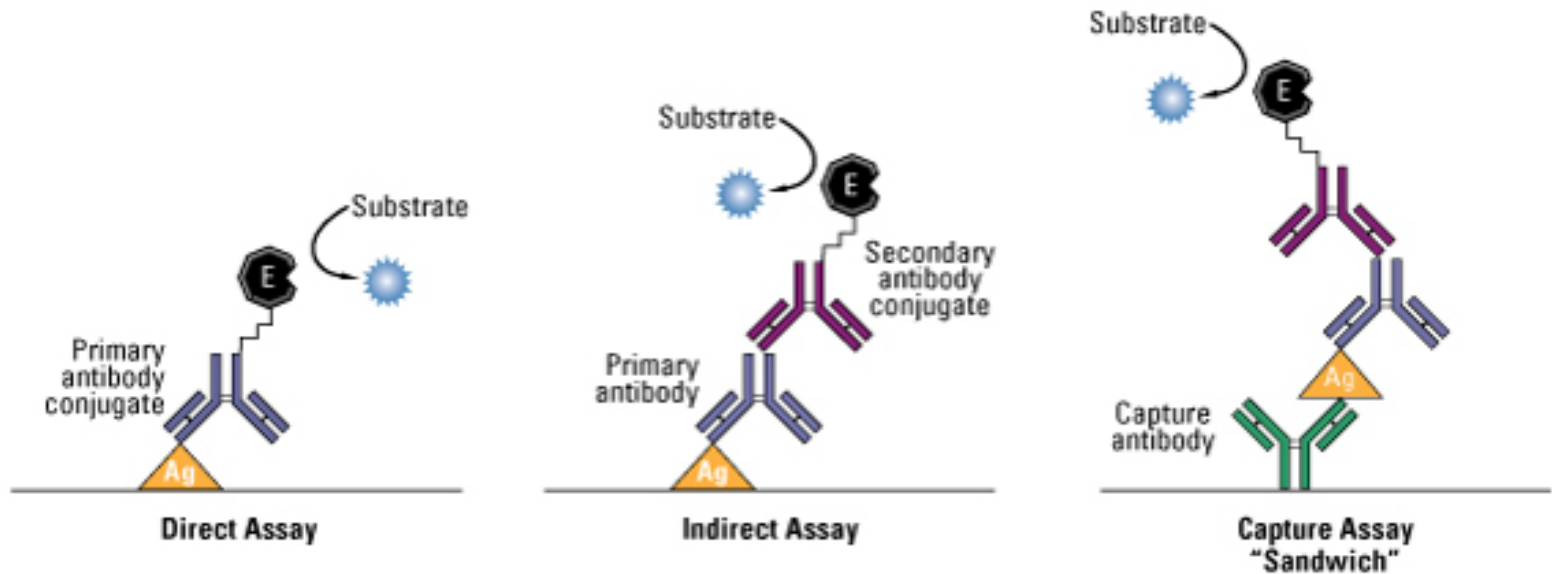
Kompetitív RIA: az elsődleges antitest szilárd fázishoz kötve



Szendvics RIA = immunoradiometrikus assay: a befogó antitest a szilárd fázishoz kötve

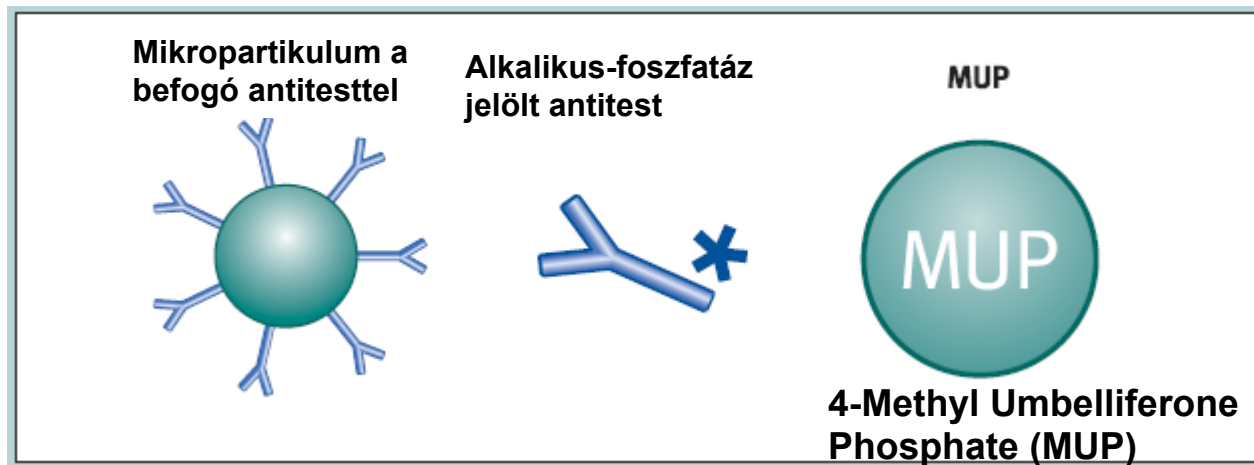


ELISA formátumok

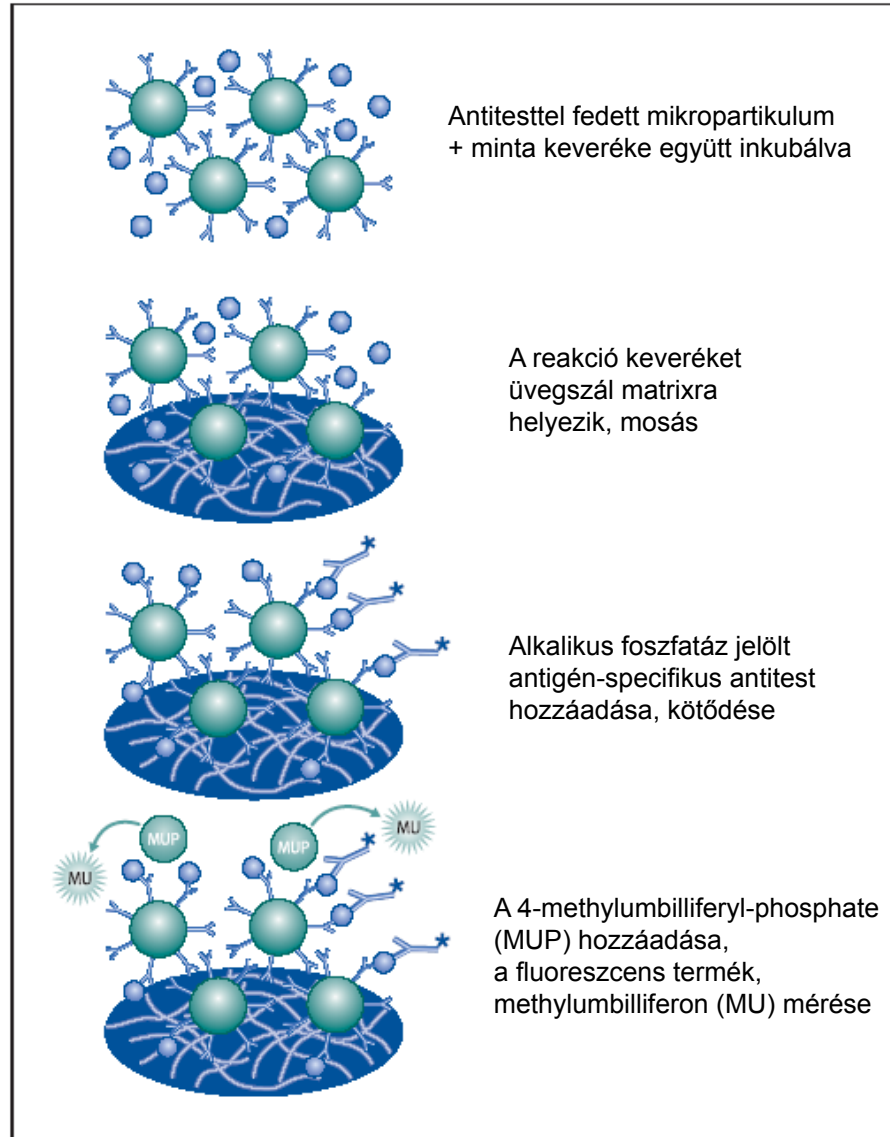


<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/ELISA.html>

Mikropartikulum enzim immunoassay (MEIA) egy olyan heterogén szendvics formátum, amelyben az immunkomplexek mikrobead-eken jönnek létre



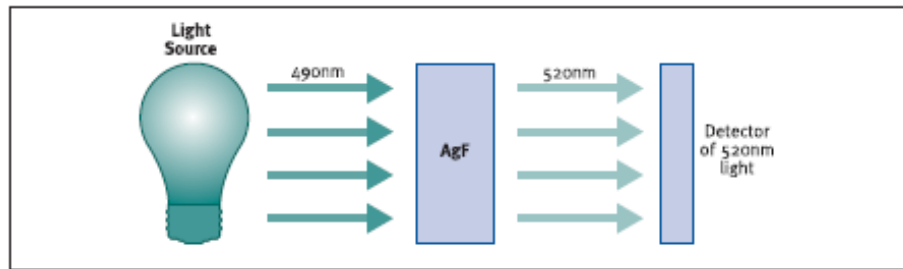
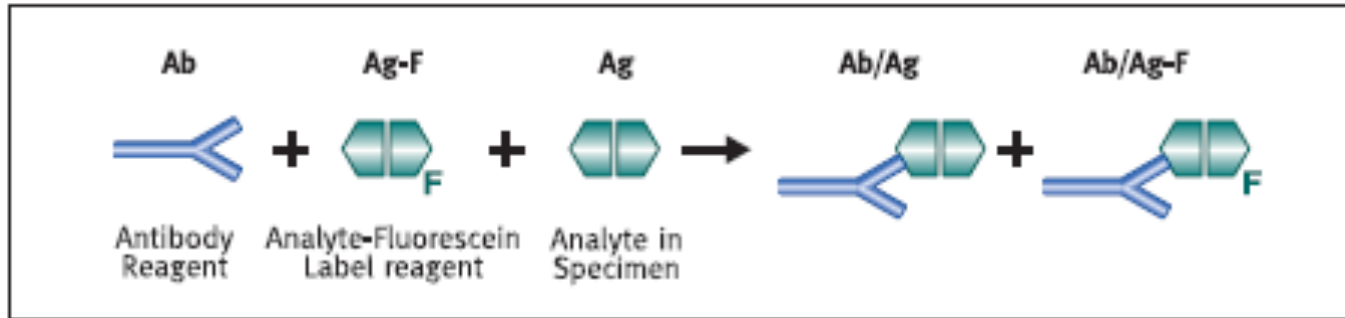
Mikropartikulum enzim immunoassay (MEIA)



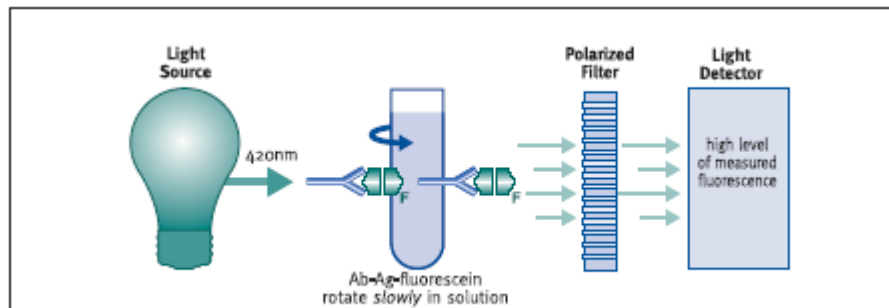
Néhány fontosabb fluoreszcens jelölő molekula

Fluorochrome	Fluorescence Emission Color	Em-Max (nm)
BD Horizon™ V450	Blue	448
Pacific Blue™	Blue	452
Alexa Fluor® 488	Green	519
FITC	Green	519
PE	Yellow	578
PE-Texas Red®	Orange	615
Texas Red®	Orange	615
APC	Red	660
Alexa Fluor® 647	Red	668
PE-Cy™5	Red	667
PerCP	Red	678
PerCP-Cy™5.5	Far Red	695
Alexa Fluor® 700	Far Red	719
PE-Cy™7	Infrared	785
APC-Cy7	Infrared	785
BD APC-H7	Infrared	785

Fluoreszcens polarizációs immunoassay - FPIA

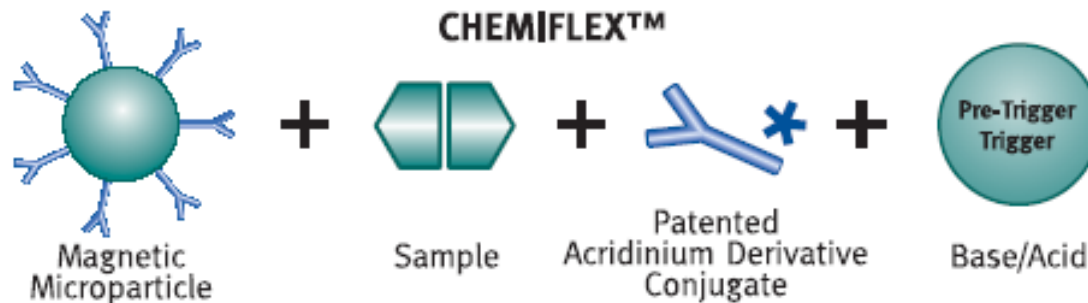


A fluoreszcens konjugátum fluoreszcenciája



A nagy antigán-jelölt antitest komplex lassabban mozog, nem rotál, a polarizált fényt előre felé átengedi

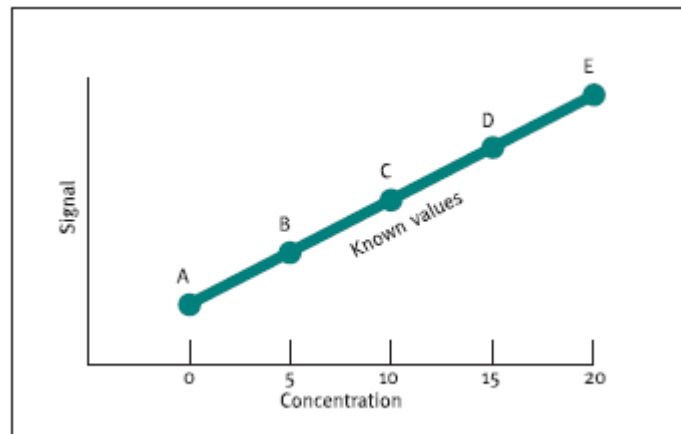
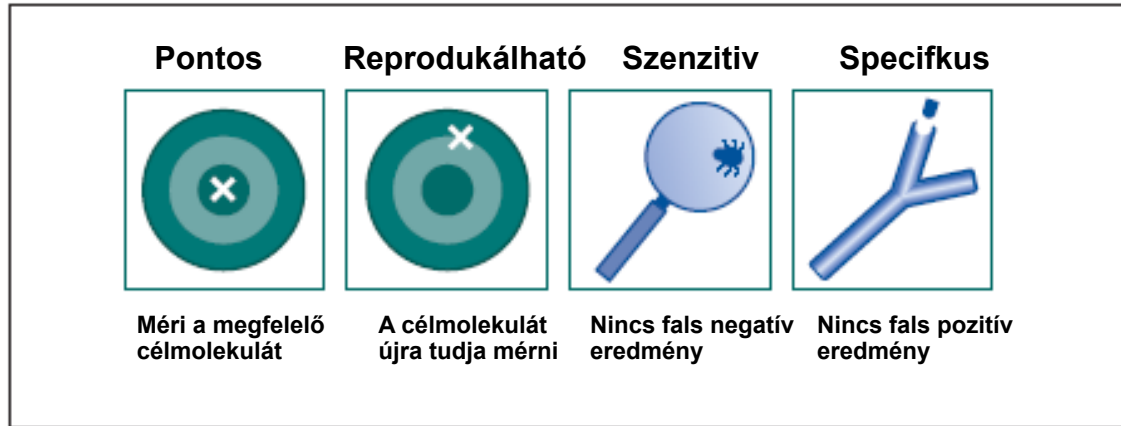
Kemilumineszcens Mágneses Immunoassay - CMIA



A két technológia különbségei és hasonlósága

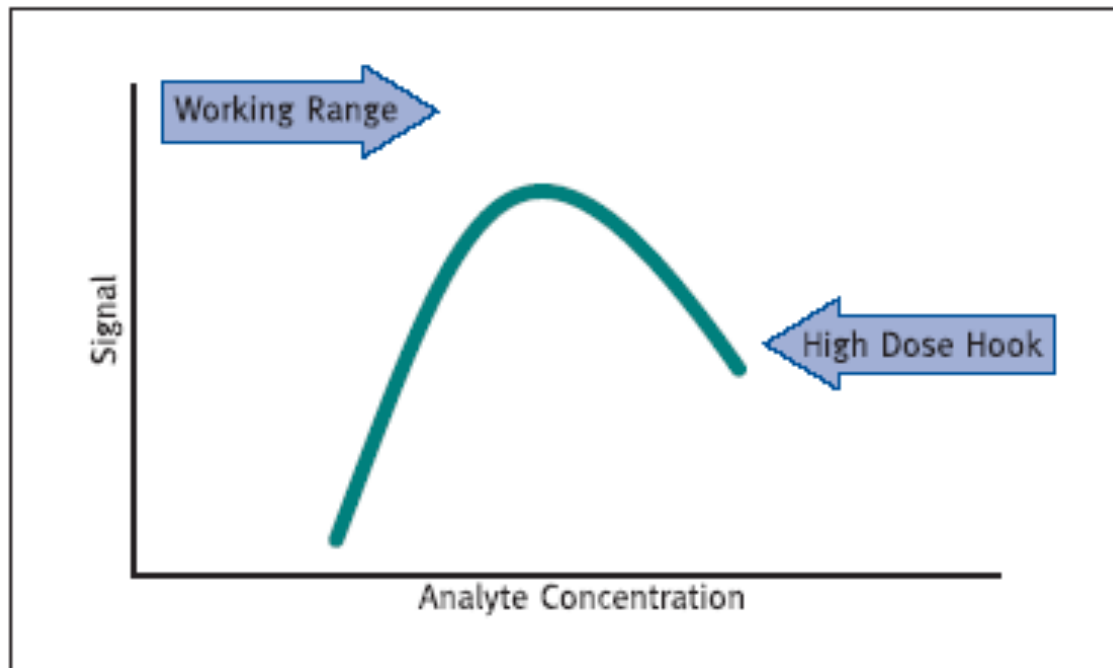
TECHNOLOGY	SOLID PHASE	SEPARATION STEP	LABEL	DETECTION TECHNOLOGY
MEIA	Latex Microparticle	Glass Fiber Matrix	Alkaline Phosphatase Enzyme	Fluorescence Detector
CMIA	Magnetic Microparticle	Magnet	Chemiluminescent Compound	Chemiluminescence Photomultiplier Tube

A jó immunoassay követelményei

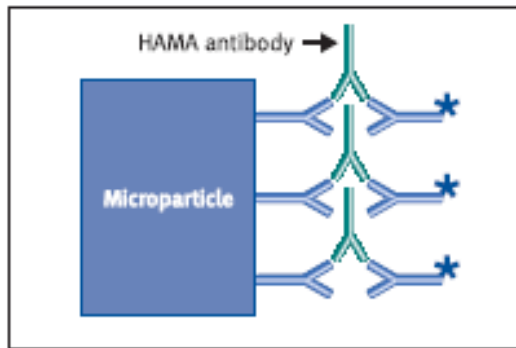


A jó kalibrációs görbe

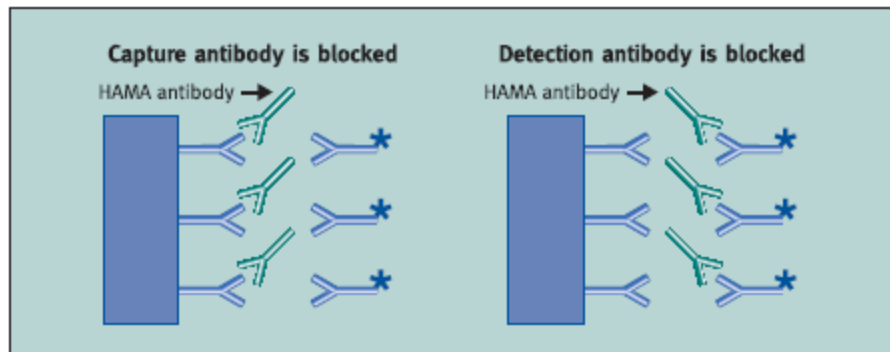
A szendvics assay-ben a mintában levő extrém nagy antigén koncentráció visszacsapási effektusa



Anti-egér antitest (HAMA) zavaró hatásai

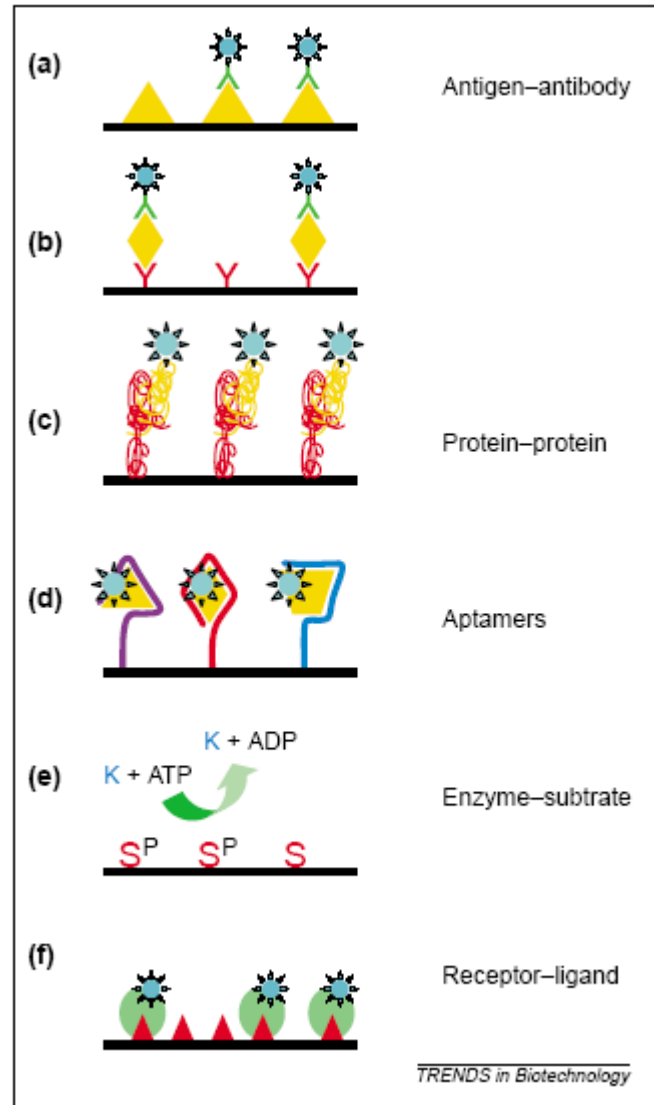


HAMA okozhat
fals pozitív eredményt

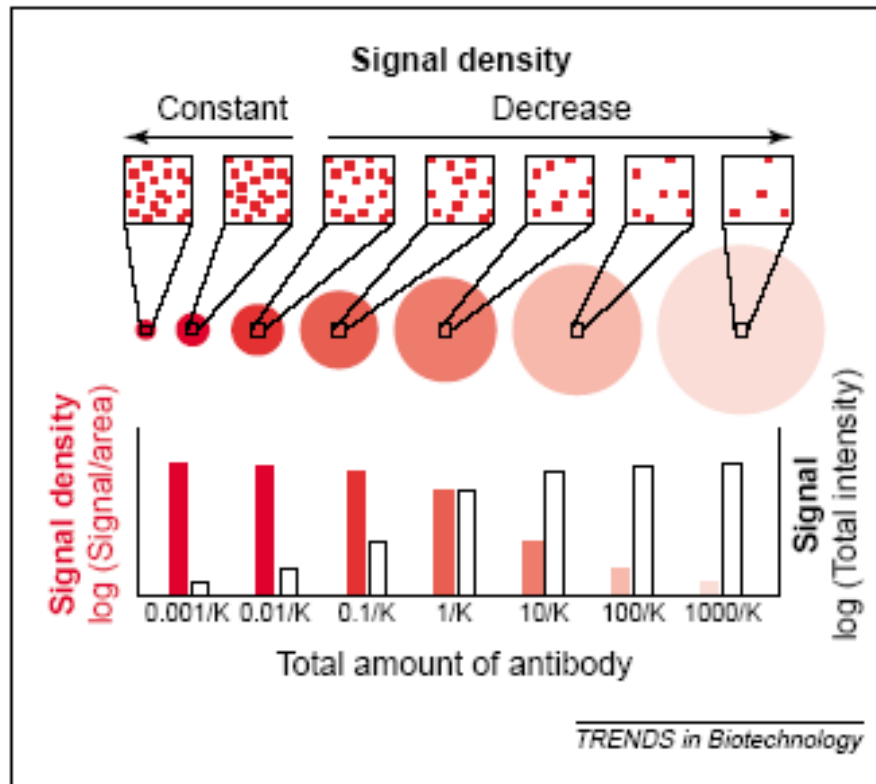


HAMA okozta
fals negatív eredmény

A protein mikroarray lehetséges befogó molekulái



A jel és a jel sűrűség aránya a mikrosponon: a multiplex „ambiens assay teóriájának” elve



Növekvő méretű spot-on a befogó molekulák ha ugyanolyan sűrűségben vannak nyomtatva, nő a teljes jel. Ezzel ellentétben a ha csökken a befogó molekulák száma és eléri a $<0.1/K$ értéket, a jel denzitás nő.