

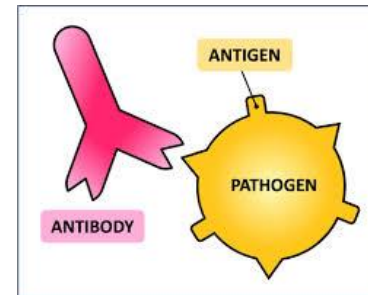
ΜΑΘΗΜΑ :
ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ
(immunoassays)

Αθηνά Μάρκου
Εμμανουήλ Σεμιδαλάς

ΧΡΗΣΙΜΟΙ ΟΡΙΣΜΟΙ (1/3)

ΑΝΤΙΓΟΝΟ

- ❑ Κάθε ουσία που ερχόμενη σε επαφή με τα αντισώματα, ή με μια ειδική στερεοδομή, τον υποδοχέα του T-λεμφοκυττάρου, αντιδρά στερεοχημικά με αυτά και συνδέεται μαζί τους σχετικά ισχυρώς.



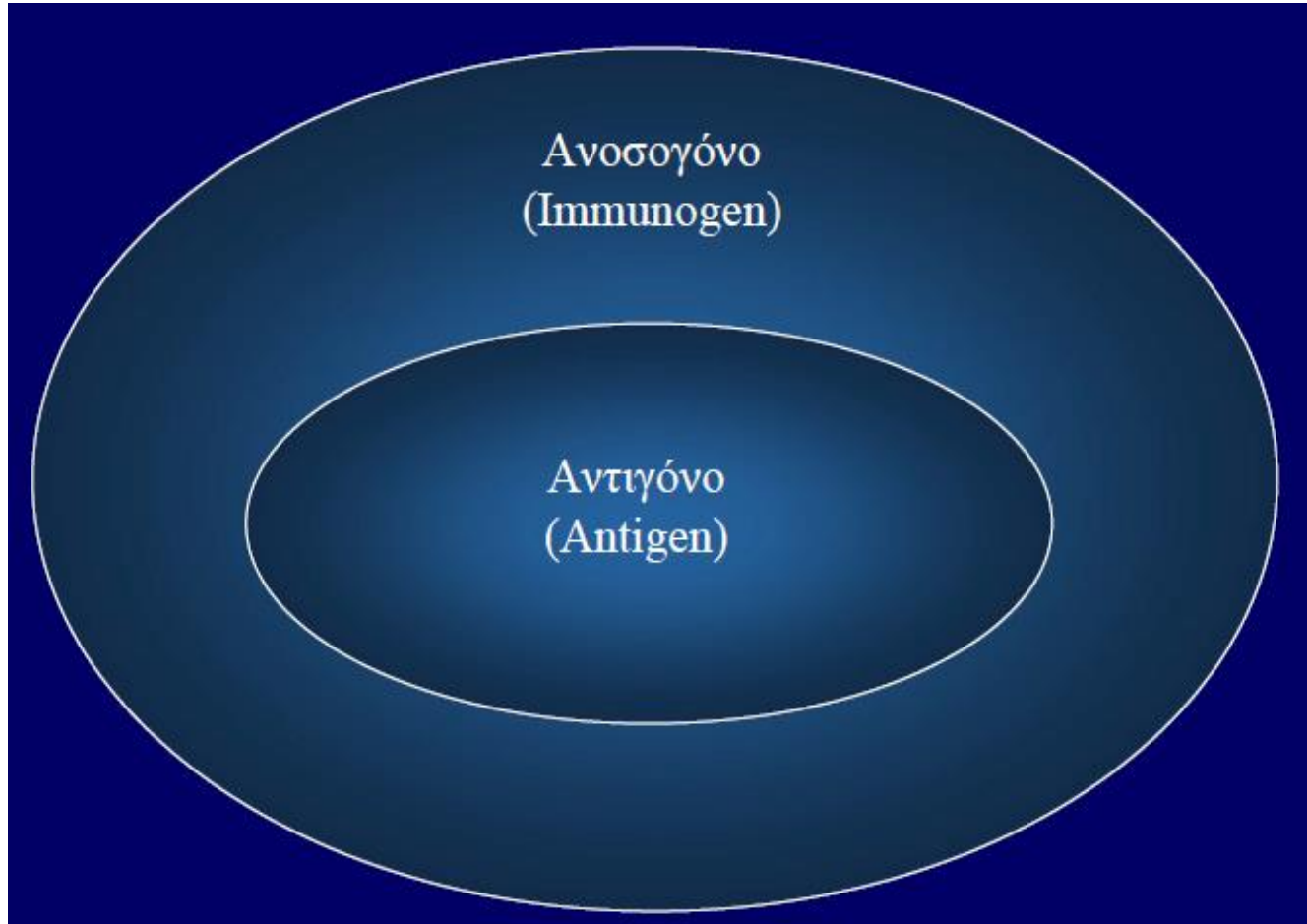
ΑΝΤΙΣΩΜΑ:

- ❑ Ονομάζεται και ανοσοσφαιρίνη
- ❑ Μεγάλου σχήματος Y πρωτεϊνικό μόριο που παράγεται από τα B λεμφοκύτταρα και χρησιμοποιείται από το ανοσοποιητικό σύστημα για να αναγνωρίσει και να ακινητοποιήσει ξένα αντικείμενα όπως είναι τα βακτήρια και τους ιούς
- ❑ Συνδέεται εξειδικευμένα με πλήθος φυσικών και συνθετικών αντιγόνων

ΑΝΟΣΟΓΟΝΟ

- ❑ Κάθε χημική ουσία, η οποία είναι ικανή να προκαλέσει παραγωγή ειδικών κατ' αυτής αντισωμάτων και επάγει την ανοσολογική απόκριση

ΧΡΗΣΙΜΟΙ ΟΡΙΣΜΟΙ (2/3)

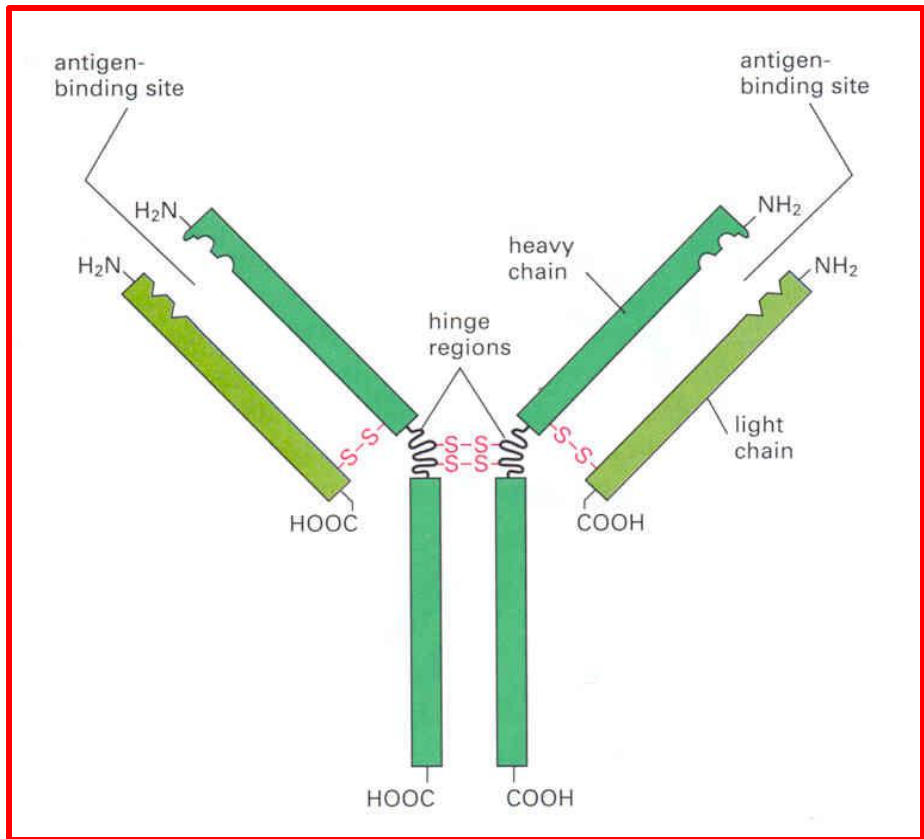


ΑΠΤΙΝΗ

□ είναι ουσία η οποία σε φυσιολογικές συνθήκες δεν δρα σαν αντιγόνο, δεν προκαλεί ή διεγείρει ανοσολογική απάντηση αλλά υπο κατάλληλες συνθήκες συνδυάζεται με το αντιγόνο, προκαλώντας ειδική αντισωματική απάντηση.

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

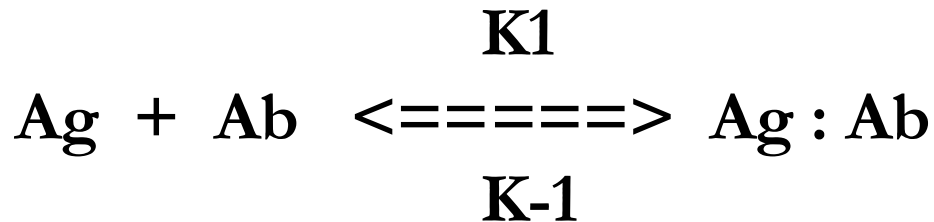
- ❑ Τα αντισώματα διακρίνονται σε πέντε διάφορες τάξεις (ισότυποι) και υποτάξεις με βάση τον τύπο της βαριάς αλυσίδας:
- ❑ **IgG, IgA, IgM, IgD, IgE**
- ❑ Το μόριο του αντισώματος αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, δύο μεγάλες και δύο μικρές. Οι μεγάλες πολυπεπτιδικές αλυσίδες ονομάζονται **βαριές** και οι μικρές **ελαφριές**.
- ❑ Η περιοχή του μορίου του αντισώματος που συνδέεται με το αντιγόνο ονομάζεται **μεταβλητή περιοχή**.
- ❑ Αντίθετα, το υπόλοιπο τμήμα του είναι ίδιο σε όλα τα αντισώματα και αποτελεί τη **σταθερή περιοχή** του αντισώματος.



ΣΥΓΓΕΝΕΙΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ (Antibody Affinity)

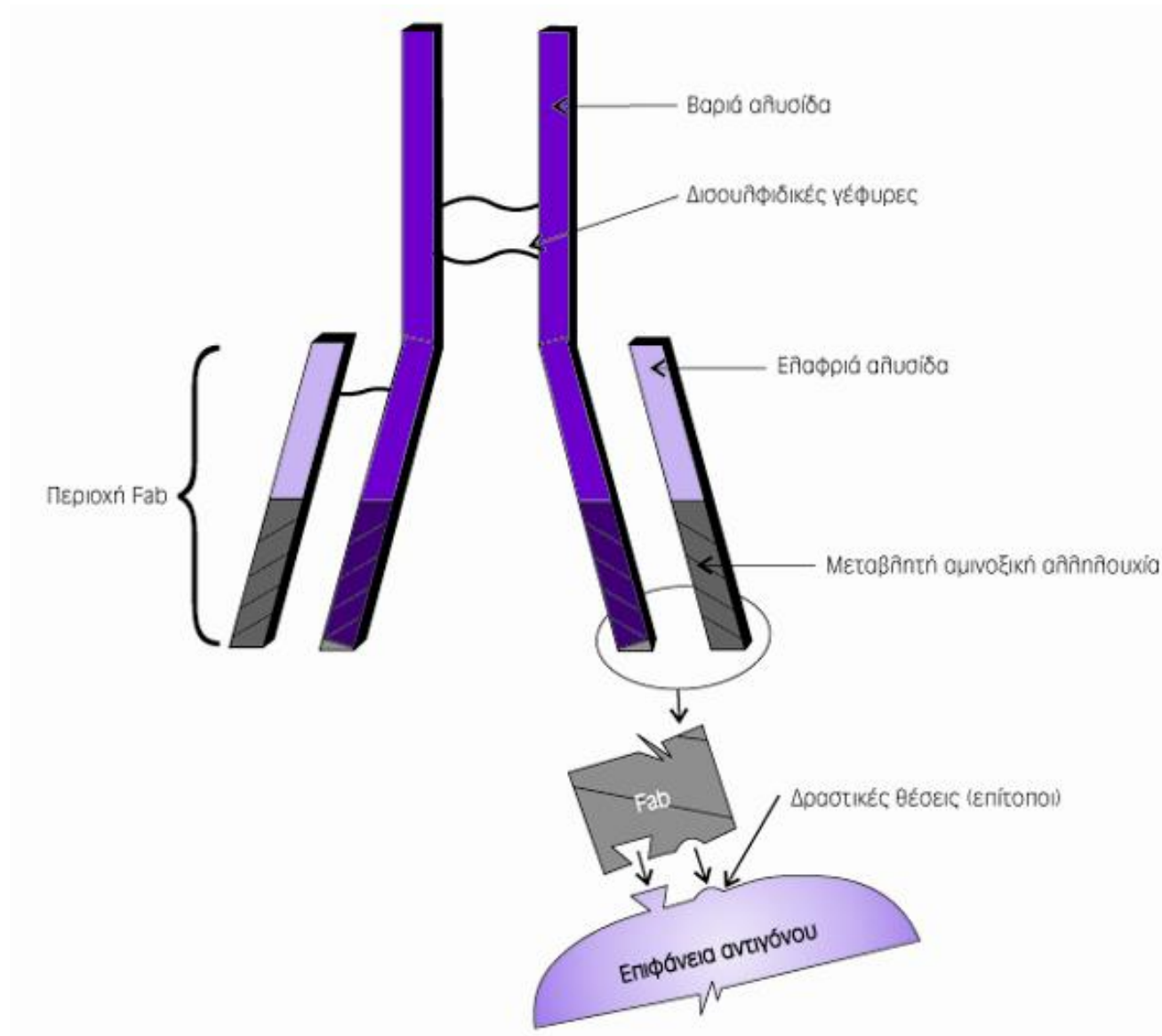
AFFINITY

Εκφράζει την σταθερά σχηματισμού (K_a) του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος σύμφωνα με την αντίδραση:

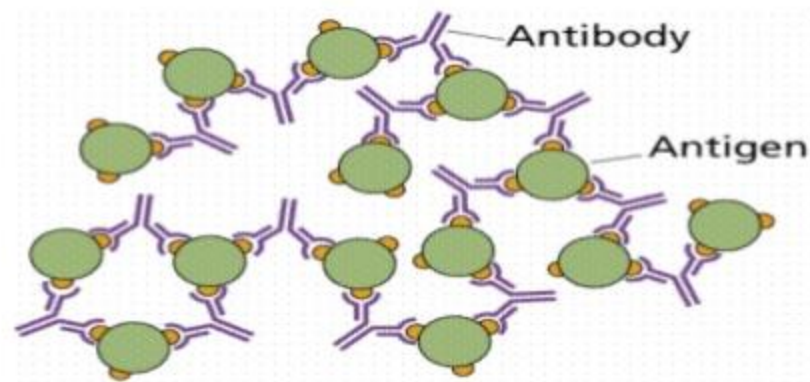
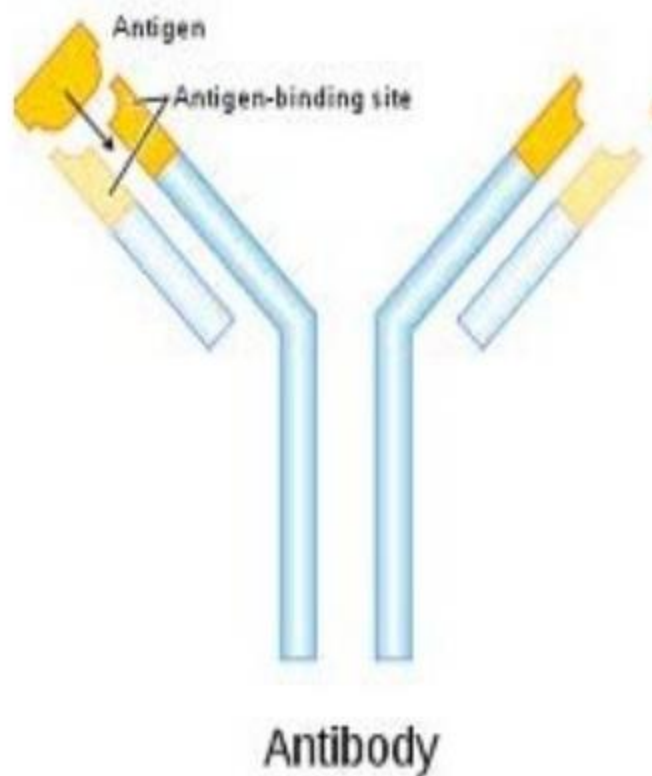


$$K_a = \frac{[\text{Ag} \cdot \text{Ab}]}{[\text{Ag}] \cdot [\text{Ab}]}$$

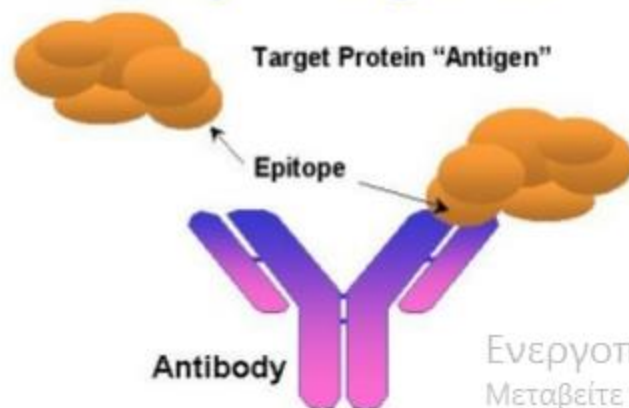
Αλληλεπίδραση μεταξύ αντιγόνου – αντισώματος



Antigens

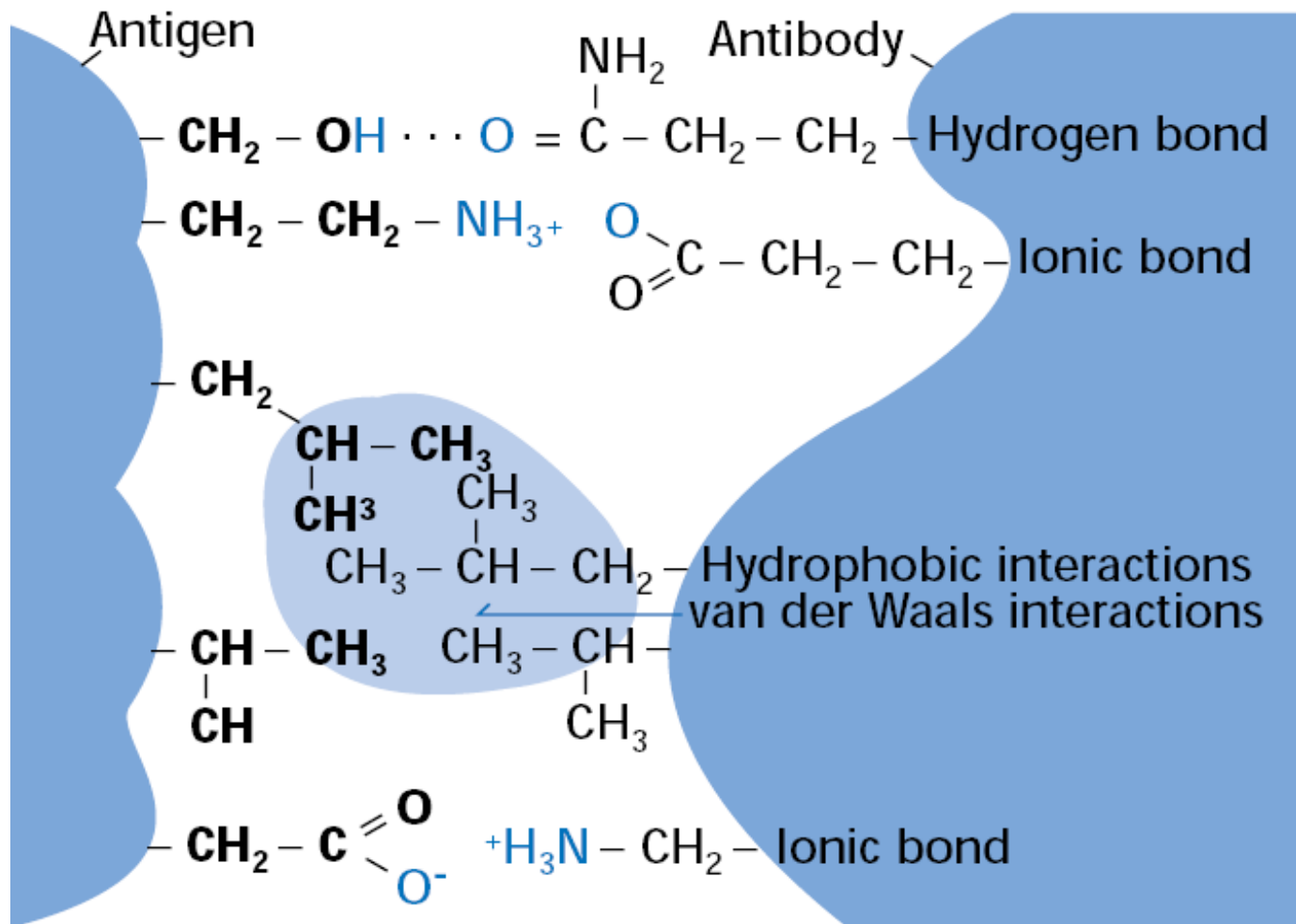


Antibody-Antigen Binding



Ενεργοποίηση των
Μεταβείτε στις ρυθμίσεις
ενεργοποιήσετε τα Windows

Διάφοροι τύποι μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ
αντιγόνου – αντισώματος.



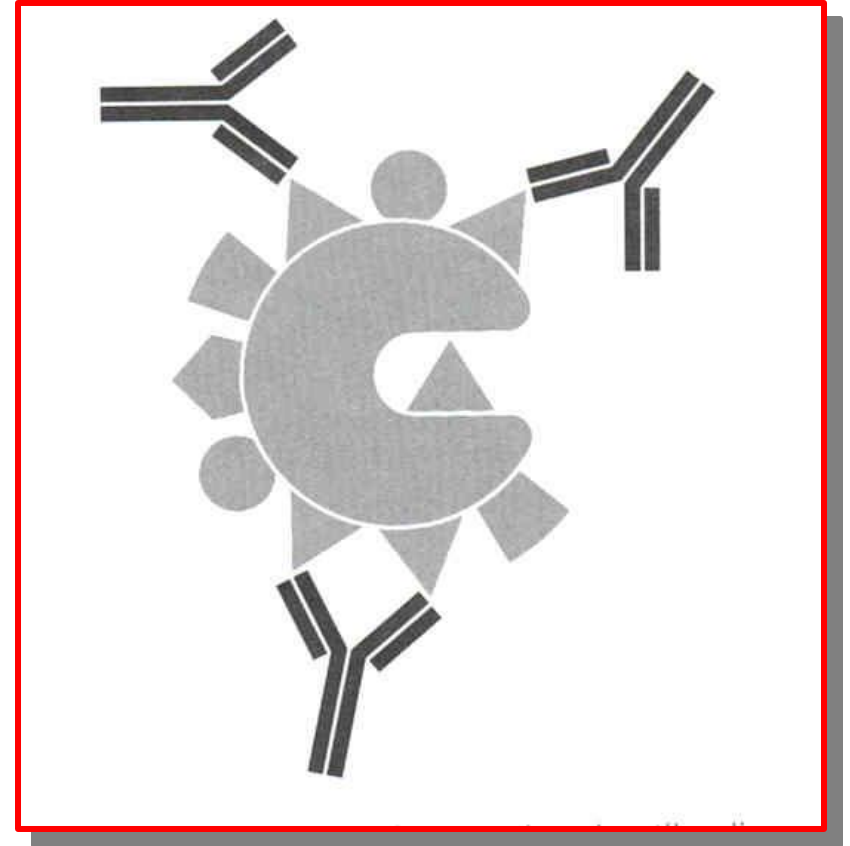
Είδη αντισωμάτων

- ❑ Μονομερές αντίσωμα: Με ένα Υ (2 θέσεις)
- ❑ Διμερές αντίσωμα (IgA): Με δύο Υ 
- ❑ Πενταμερές αντίσωμα: (IgM): Με 5 Υ 

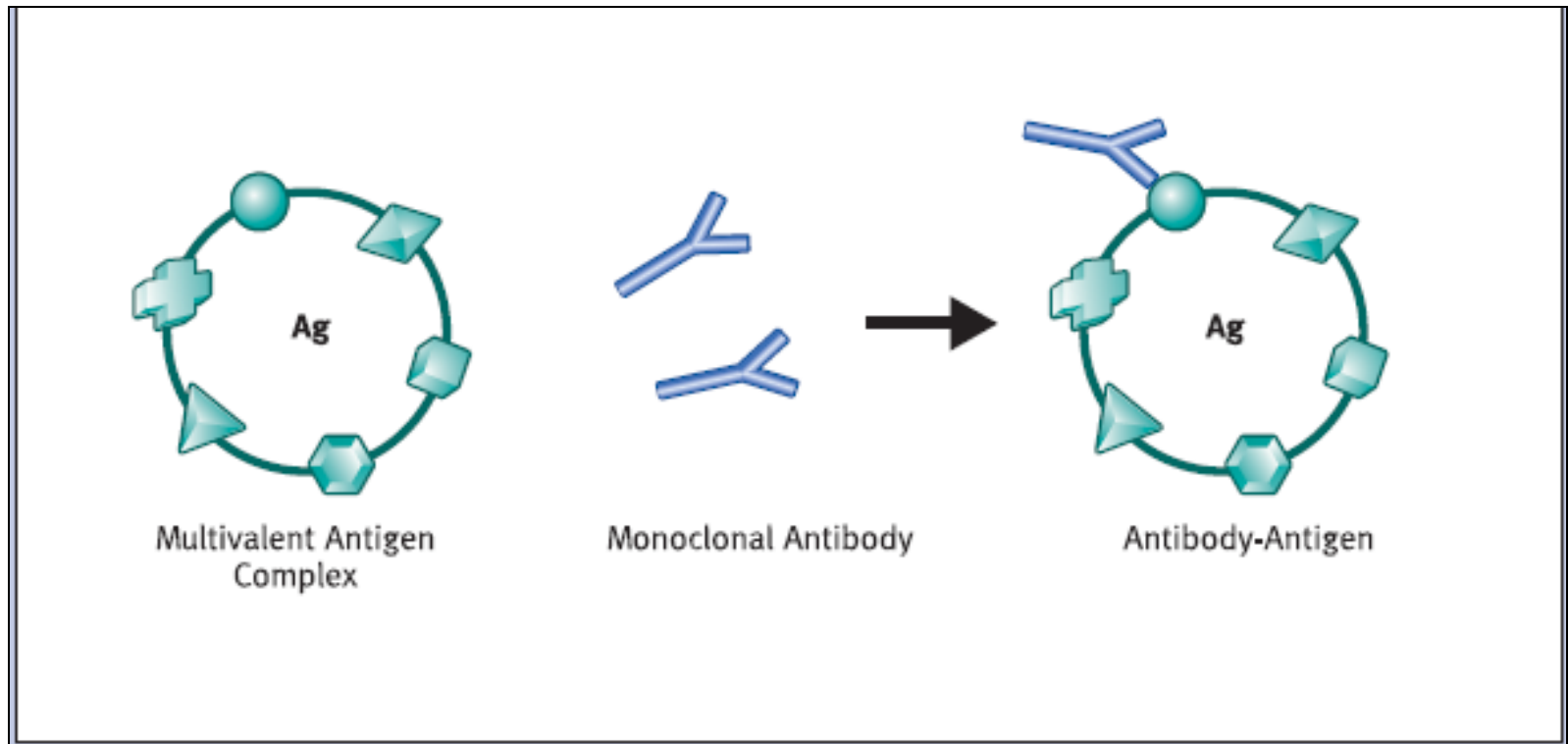
Ένωση	Κυκλοφορούσα συγκέντρωση	Μέθοδοι μέτρησης
	mmol/L (10 ⁻³ mol/L)	π.χ. φασματοφωτομετρία, χρωματομετρία, ποτενσιμετρία
Νάτριο Χλώριο Διττανθρακικά Γλυκόζη Ουρία Χοληστερόλη Ασβέστιο Τριγλυκερίδια (νηστείας)	140 105 30 5 4 4 2.5 1	
	μmol/L (10 ⁻⁶ mol/L)	Ανοσοχημικές μέθοδοι
Αλβουμίνη Ουρικό οξύ Φαινυλαλανίνη Ανοσοσφαιρίνη G Θεοφυλλίνη Αμμωνία Σίδηρος Χολερυθρίνη (ολική) Ανοσοσφαιρίνη M	600 250 125 90 80 30 20 10 1	
	nmol/L (10 ⁻⁹ mol/L)	Ομοιογενείς ανοσολογικές μέθοδοι, π.χ. EMIT, FPIA
Οιστρίδι (τέλος κύησης) Δεσμευτική της θυροξίνης σφαιρίνη Κορτιζόλη Πλακουντιακό γαλακτογόνο Θυροξίνη (ολική) Κορτικοστερόνη Διγοξίνη Τριωδοθυρονίνη Προλακτίνη Οιστραδιόλη 17β (γυναίκες) Προγεστερόνη	600 500 400 300 125 20 2 2 1 1 1	
	pmol/L (10 ⁻¹² mol/L)	Ετερογενείς ανοσολογικές μέθοδοι, π.χ. ELISA με ανίχνευση με φθορισμό
Αλδοστερόνη Ινσουλίνη Παραθορμόνη Αυξητική ορμόνη Ωχρινοποιητική ορμόνη Τριωδοθυρονίνη Φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη Θυρεοειδοτρόπος ορμόνη Αγγειοτασίνη II Ωκυτοκίνη Αργινίνη βασοπρεσίνη	180 120 100 50 10 10 10 5 4 1 1	
		RIA
		ELISA με ανίχνευση με χημειοφωταύγεια

ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

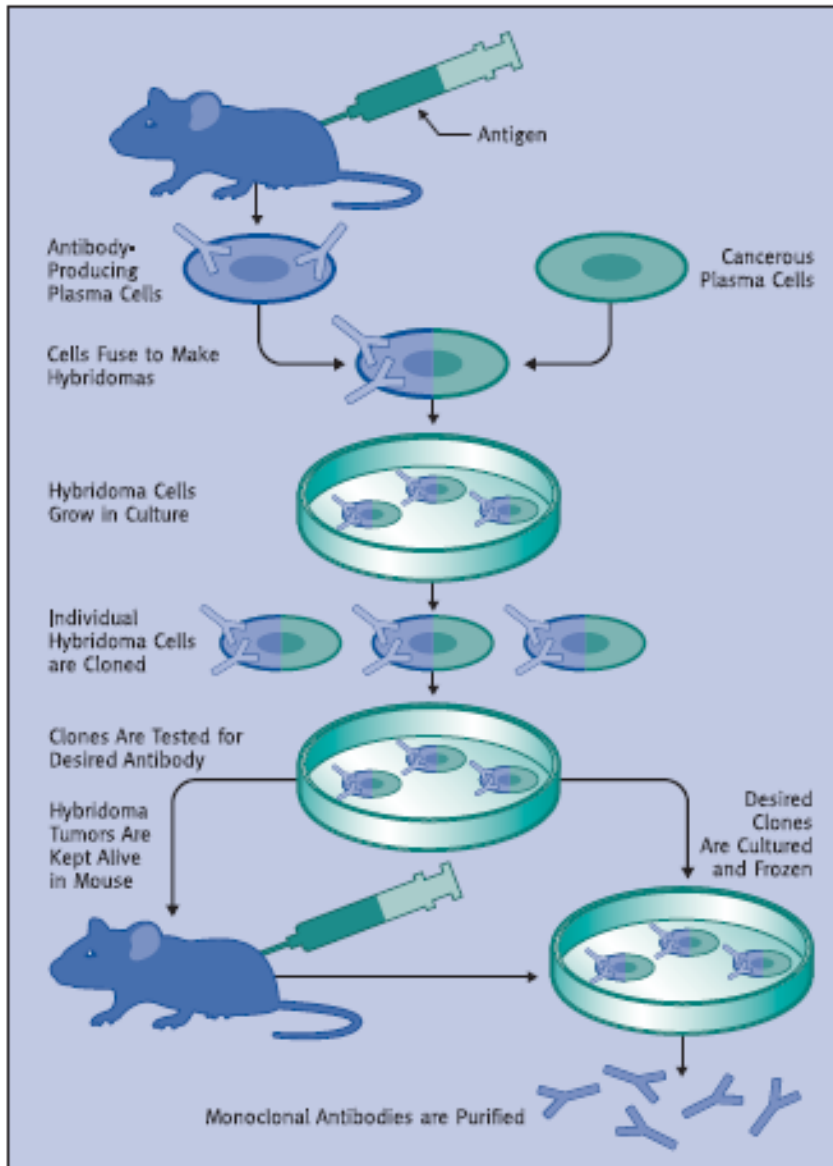
- παράγονται από κλώνους πλασματοκυττάρων και κατά συνέπεια είναι ανοσοχημικά πανόμοια.
- Αντιδρούν με τον ίδιο ειδικό επίτοπο του αντιγόνου.
- Τα πιο πολλά mouse monoclonals



ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ



ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ



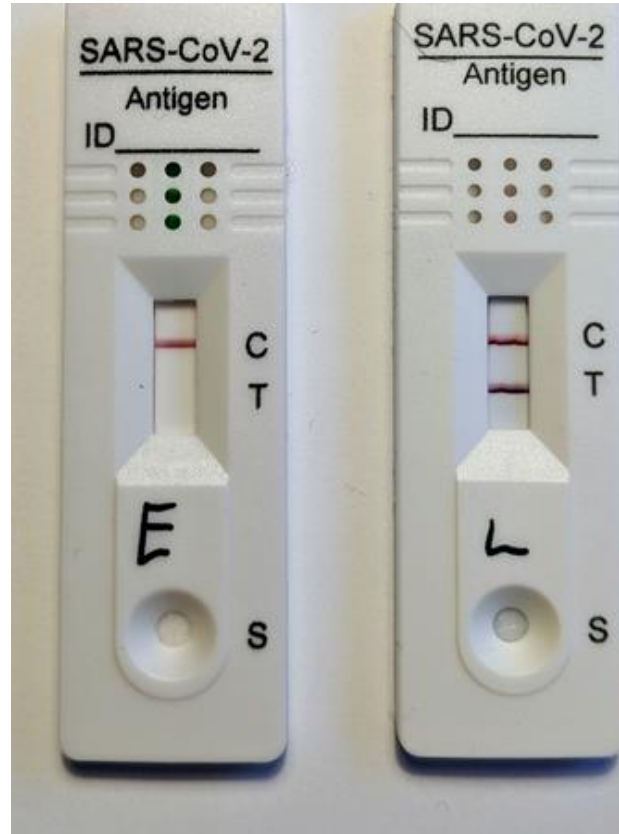
□ Η εργασία των Köhler και Milstein βραβεύτηκε με Νόμπελ το 1984, στηρίχθηκε στην τεχνική της κυτταρικής σύντηξης.

□ Τα παραγόμενα από ποντίκια υβριδώματα αποτελούν την πρώτη αξιόπιστη πηγή για την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

- Απόδοση απεριόριστης ποσότητας αντισώματος με σταθερά χαρακτηριστικά
- Χημική συγγένεια και ειδικότητα πλήρως καθορισμένες με δυνατότητα επιλογής ως προς την εφαρμογή
- Παραγωγή εξαιρετικά ειδικού αντισώματος από μη καθαρό ανοσογόνο
- Διαθεσιμότητα αντισωμάτων έναντι πολλών και διαφορετικών και απομεμακρυσμένων επιτόπων του ιδίου αντιγόνου
- Δυνατότητα εύκολου καθαρισμού σε μεγάλες ποσότητες με μεθόδους που δεν καταστρέφουν την ανοσοδραστικότητα
- Καθαρά αντιδραστήρια που δίνουν χαμηλό σήμα υποβάθρου (background) και μη-ειδικής σύνδεσης
- Συνήθως δεν παρεμποδίζουν τη βιολογική δραστηριότητα του αντιγόνου (πχ ενζύμου)

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ



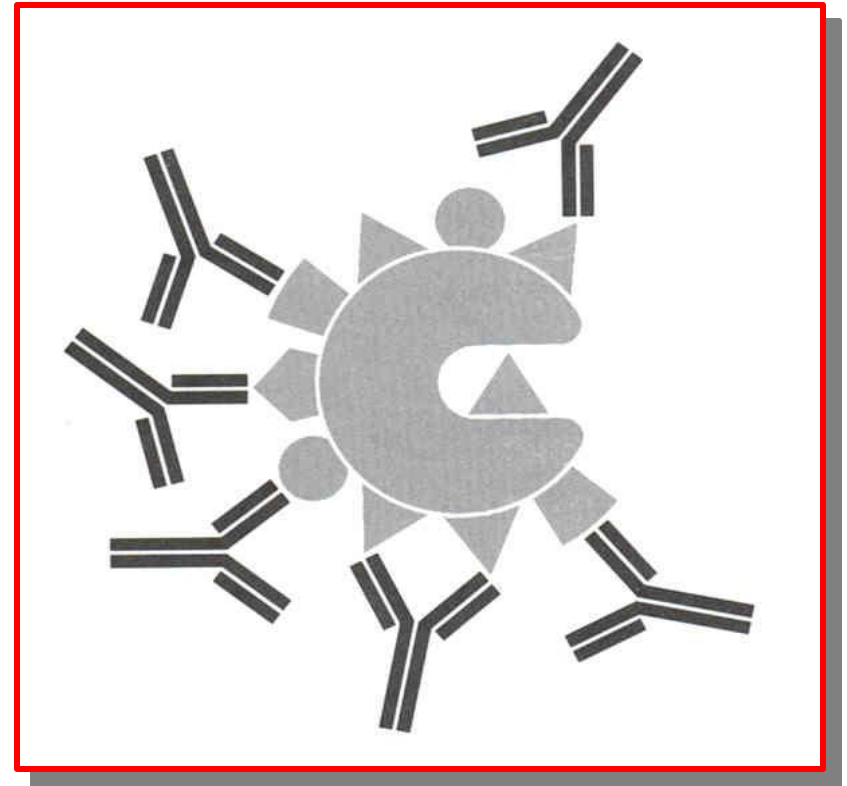
<https://www.youtube.com/watch?v=z07CK-4JoFo>

ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

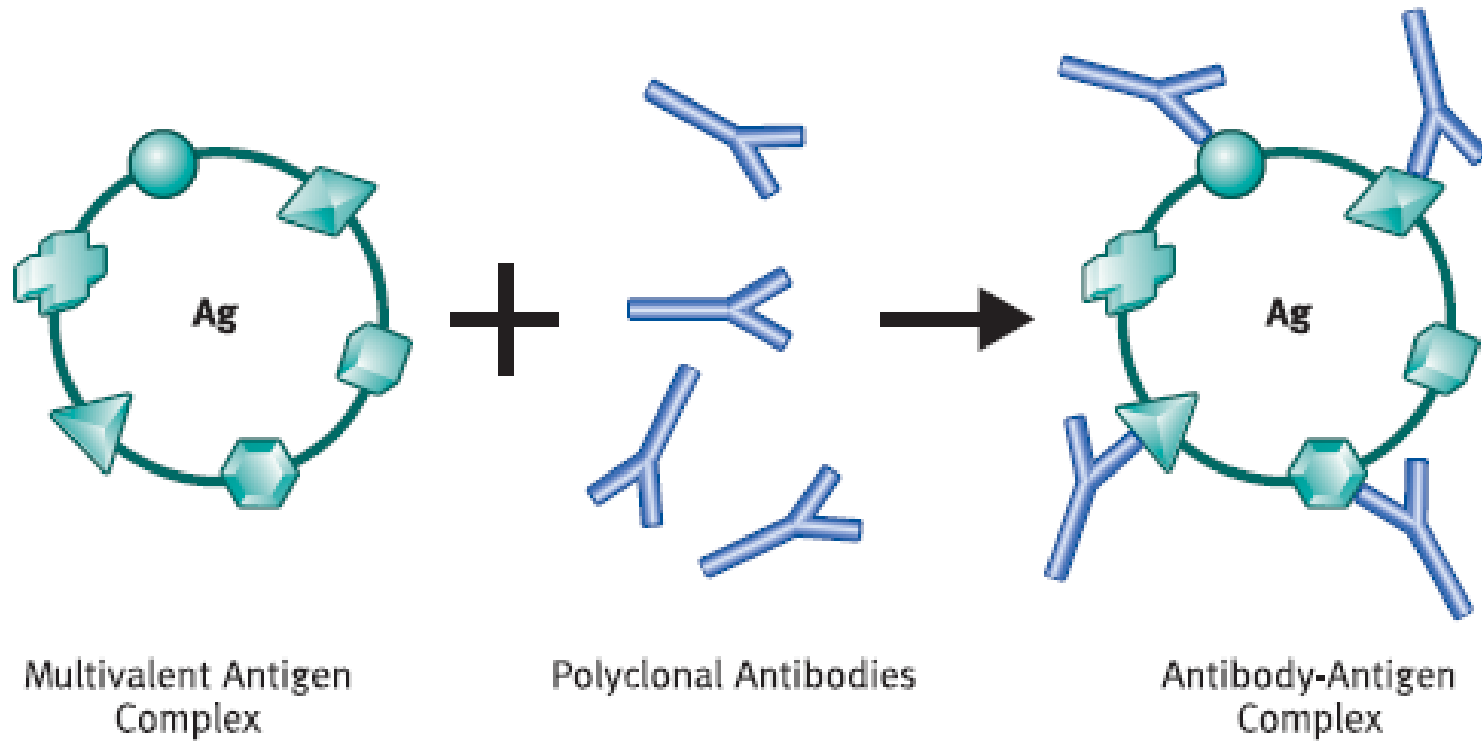
- Συνήθως χαμηλότερη χημική συγγένεια έναντι των πολυκλωνικών
- Εξάρτηση από ένα και μόνο επίτοπο, ο οποίος σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να μην είναι αντιπροσωπευτικός για το αντιγόνο ως σύνολο (σε περιπτώσεις πολυμορφικών επιτόπων)
- Πιθανότητα εμφάνισης ασυνήθιστων φυσικών ιδιοτήτων που εξαρτώνται από τον συγκεκριμένο ιδιότυπο
- Δεν εμφανίζουν ιδιότητες καθίζησης ή συγκόλλησης

ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

- Παράγονται από διαφορετικά κύτταρα και κατά συνέπεια είναι ανοσοχημικά ανόμοια.
- Αντιδρούν με πολλαπλούς επιτόπους του αντιγόνου.
- πιο συχνά: rabbit polyclonals



ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ



ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ- ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΩΝ Abs

Ιδιότητα	πολυκλωνικό Ab	μονοκλωνικό Ab
επίτοπος	πολλοί	ένας
ειδικότητα	μεταβλητή	σταθερή
συγγένεια	μεταβλητή	σταθερή
απόδοση	1mg/mL	100mg/mL(tissue)
παραγωγής		20mg/mL (ασκιτικό υγρό)
παρουσία άλλων IgGs	100%	Καθόλου σε κυτταροκαλλιέργειες 10% σε ασκιτικό υγρό
καθαρότητα αντιγόνου	καθαρό Ag	όχι πλήρως καθαρό Ag
κόστος	< 100\$	10.000\$
Παραγωγής		

ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΥΜΕΝΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ (cross-reaction)

- Εκφράζει το φαινόμενο, όπου παρατηρείται σύνδεση του ειδικού αντισώματος με αντιγόνο Ag2 διαφορετικό του ανοσογόνου Ag1 λόγω ύπαρξης παρόμοιου αντιγονικού επιτόπου.
- Στην περίπτωση αυτή αντισώματα εξειδικευμένα έναντι ενός επιτόπου του ομολόγου αντιγόνου (A) είναι δυνατό να αντιδρούν και με παρόμοιους αλλά διαφορετικούς επιτόπους άλλων ετερόλογων αντιγόνων.
- Στην περίπτωση αυτή έχουμε μικρότερη σταθερά σύνδεσης Ab-Ag.

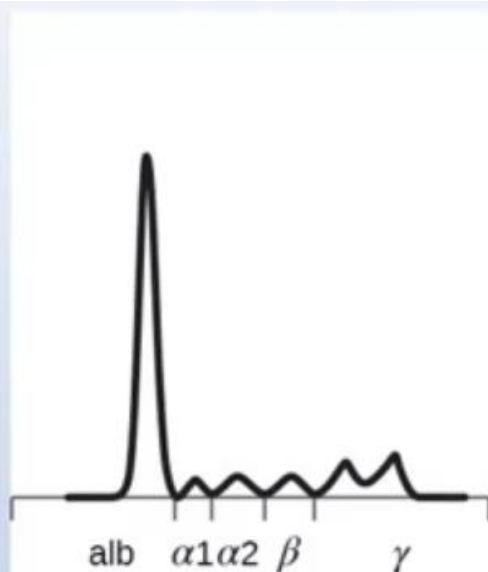
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

Α. ΠΟΙΟΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

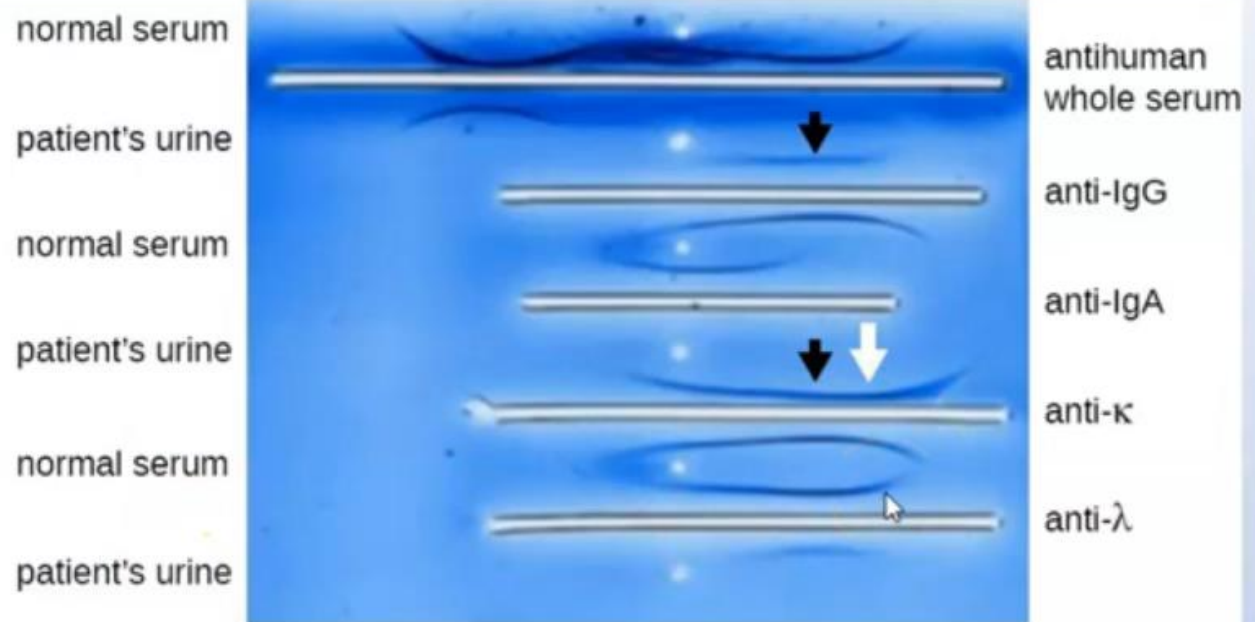
- α) διπλή ανοσοδιάχυση
- β) Ανοσοηλεκτροφόρηση (Immunoelectrophoresis)
- γ) Αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση
(Crossover immunoelectrophoresis, CIE)
- δ) Ανοσοκαθήλωση (Immunofixation)
- ε) Western blotting

ΑΝΟΣΟΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Χρήσιμη για να αναγνωρίσουμε ανώμαλες ταινίες που φαίνονται κατά την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, ιδίως στην γ περιοχή, ώστε να καθορίσουμε αν ένα αντίσωμα παράγεται μη ομαλώς



(a)



(b)

ΑΝΟΣΟΚΑΘΗΛΩΣΗ



Item	Results	Reference
Ig-G	19.8	7-16g/L
Ig-A	0.86	0.7-4.0g/L
Ig-M	0.18	0.5-2.2g/L
κ-light chain	5.91	1.7-3.7g/L
λ-light chain	1.15	0.9-2.1g/L

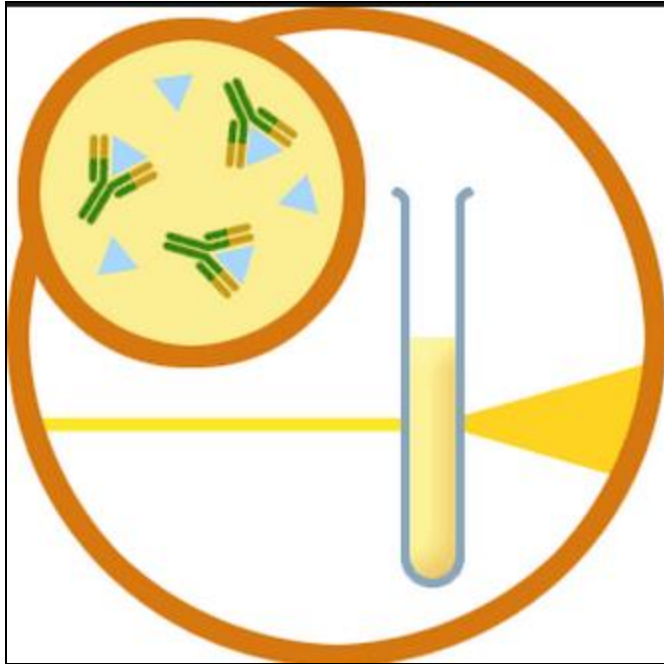
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

B. ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΜΗ-ΙΧΝΗΘΕΤΗΜΕΝΕΣ

- α) απλή ακτινωτή ανοσοδιάχυση (single radial immunodiffusion, SRID, Mancini)
- β) Ανοσοηλεκτροφόρηση Rocket
- γ) Διασταυρούμενη ανοσοηλεκτροφόρηση (Crossed immunoelectrophoresis)
- δ) **Νεφελομετρία (Nephelometry), Θολερομετρία (Turbidimetry)**
- στ) Μέθοδοι συγκόλλησης (Agglutination assays)

Θολωσιμετρία- Νεφελομετρία



Μη-ιχνηθετημένοι ανοσοπροσδιορισμοί

- ☐ Βασίζονται στο σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων και την επακόλουθη θολερότητα του δείγματος
- ☐ Η θολερότητα προκαλεί μείωση της έντασης της προσπίπτουσας δέσμης ακτινοβολίας καθώς αυτή περνά διαμέσου ενός διαλύματος σωματιδίων.
- ☐ Μέτρηση αυτής της μείωσης στην ένταση της προσπίπτουσας δέσμης ακτινοβολίας που προκαλείται από τη σκέδαση, ανάκλαση και απορρόφηση της ακτινοβολίας
- ☐ **Θολωσιμετρία:** Η θολερότητα μετράται υπό γωνία 180° ως προς την προσπίπτουσα δέσμη ακτινοβολίας.
- ☐ **Νεφελομετρία:** Η θολερότητα μετράται υπό γωνία 90° ως προς την προσπίπτουσα δέσμη ακτινοβολίας.

Θολωσίμετρο



17 14:06

Νεφελόμετρο



ΙΧΝΗΘΕΤΗΜΕΝΟΙ ΑΝΟΣΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ (labelled immunoassays)

Γενική κατάταξη ως προς :

1) τύπο της αντίδρασης

- α) ανταγωνιστικού τύπου (competitive type immunoassays)
- β) μη-ανταγωνιστικού τύπου (non-competitive type immunoassays)

2) διαχωρισμό ιχνηθέτη

- α) ομογενείς ανοσοχημικοί προσδιορισμοί (homogeneous immunoassays) στα συστήματα αυτά δεν απαιτείται διαχωρισμός του μη-αντιδρώντος ιχνηθετημένου Ab^* ή Ag^* από το μίγμα της αντίδρασης κατά τη μέτρηση του αναλυτικού σήματος.
- β) ετερογενείς ανοσοχημικοί προσδιορισμοί (heterogeneous immunoassays) στα συστήματα αυτά ο διαχωρισμός του μη-αντιδρώντος ιχνηθετημένου Ab^* ή Ag^* από το μίγμα της αντίδρασης είναι απαραίτητος κατά τη μέτρηση του αναλυτικού σήματος.



Υπάρχουν πολλών ειδών ιχνηθέτες που χρησιμοποιούνται στις ανοσοχημικές τεχνικές. Σε γενικές γραμμές διακρίνονται σε ένζυμα, ραδιοϊσότοπα και μόρια χημειοφωταύγειας.

Ραδιοανοσοπροσδιορισμοί (Radioimmunoassays, RIA)

- Οι ραδιοανοσολογικές μέθοδοι (RIA, IRMA) αποτελούν την παλαιότερη ανοσοχημική μέθοδο (Yellow & Berson, 1959). **ΒΡΑΒΕΙΟ NOBEL 1977**
- *"Immunoassay of endogenous plasma insulin in man"*. *J. Clin. Invest.* 39 (7): 1157–75



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1977
Roger Guillemin, Andrew V. Schally, Rosalyn Yalow

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1977

Nobel Prize Award Ceremony

Roger Guillemin

Andrew V. Schally

Rosalyn Yalow



Roger Guillemin



Andrew V. Schally



Rosalyn Yalow

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1977 was divided, one half jointly to Roger Guillemin and Andrew V. Schally "for their discoveries concerning the peptide hormone production of the brain" and the other half to Rosalyn Yalow "for the development of radioimmunoassays of peptide hormones".

Προσδιορισμός ινσουλίνης στο
πλάσμα με τη βοήθεια Ab και
ινσουλίνης επισημασμένης με ^{131}I

ΡΑΔΙΟΙΧΝΗΘΕΤΕΣ

Ισοτοπικοί ιχνηθέτες

Ισότοπο	Χρόνος <u>ημιζωής</u>	Ενέργεια
^{125}I	60,2 ημέρες	20 - 80 <u>keV</u> , γ-ακτινοβολία
^{90}S	87,9 ημέρες	167 <u>keV</u> , β-σωματίδια
^{14}C	5760 έτη	158 <u>keV</u> , β-σωματίδια
^3H	12,3 έτη	18 <u>keV</u> , β-σωματίδια

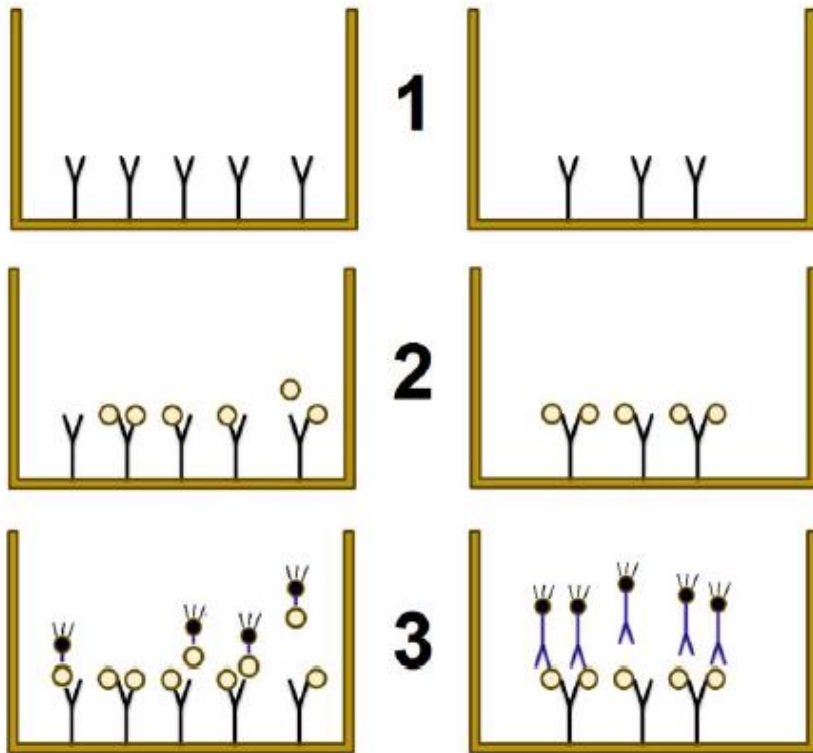
Για την εφαρμογή τους έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί διάφορα ραδιοισότοπα, αλλά σήμερα αυτό που χρησιμοποιείται ευρέως είναι το ^{125}I .

Το ^{125}I έχει χρόνο ημίσειας ζωής 60 ημέρες, δηλαδή μέσα σε 60 ημέρες η ραδιενέργεια που εκπέμπει μειώνεται στο 50%.

Αυτός ο χρόνος είναι ικανοποιητικός για διαγνωστική χρήση.

Ραδιοανοσολογικές μέθοδοι (RIA, IRMA)

- Υπάρχουν Ανταγωνιστικού και μη ανταγωνιστικού τύπου προσδιορισμοί

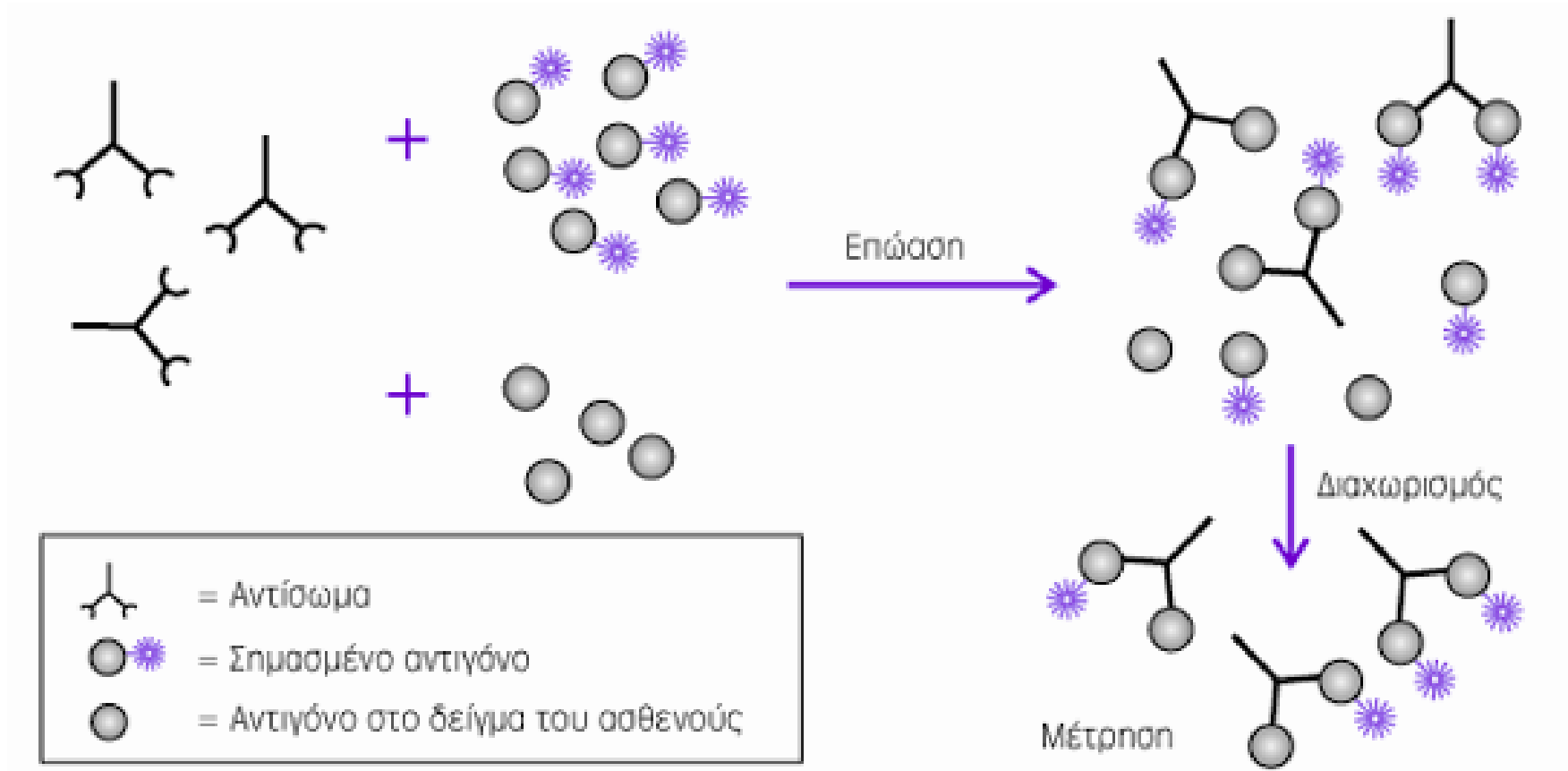


Τα τρία βασικά στάδια στις ραδιοανοσολογικές μεθόδους.

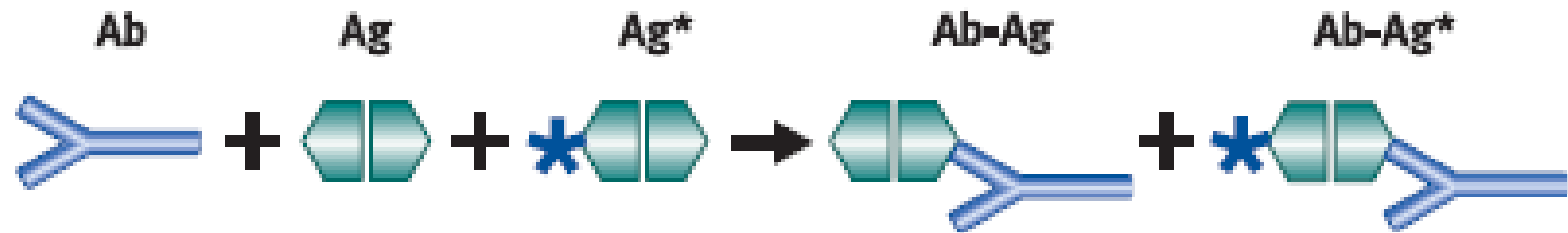
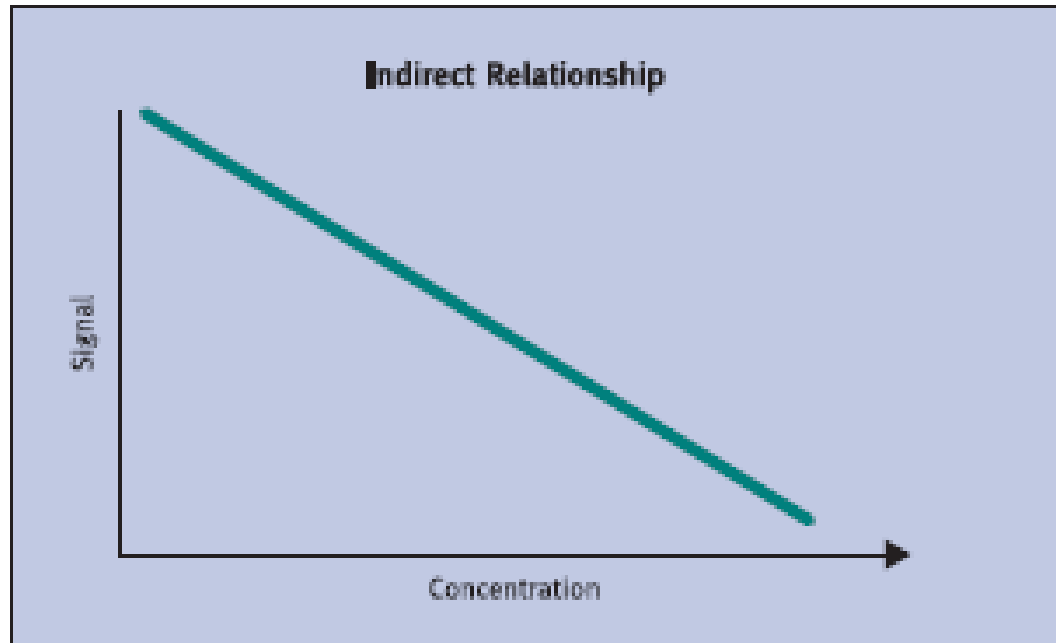
Αριστερά φαίνεται η ανταγωνιστική μέθοδος (RIA, Radioimmunoassays), όπου το θερμό αντιγόνο (αυτό που φέρει το ραδιοϊσότοπο ^{125}I) ανταγωνίζεται το αντιγόνο του ασθενούς.

Δεξιά φαίνεται η μη ανταγωνιστική μέθοδος (IRMA, Immunoradiometric assays), όπου το ραδιοϊσότοπο είναι ενωμένο με αντίσωμα το οποίο ενώνεται με το ακινητοποιημένο αντίγονο του ασθενούς από δεύτερο αντίσωμα.

ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ RIA ραδιοανοσολογική μέθοδος



Χαρακτηριστική καμπύλη αναφοράς



ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ (enzyme immunoassays, EIA)

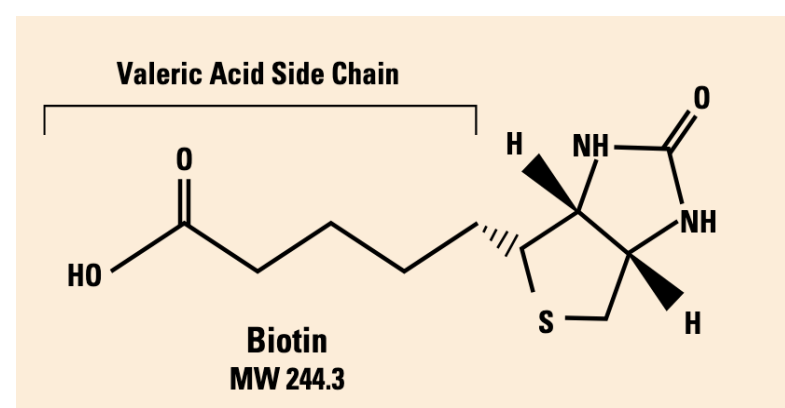
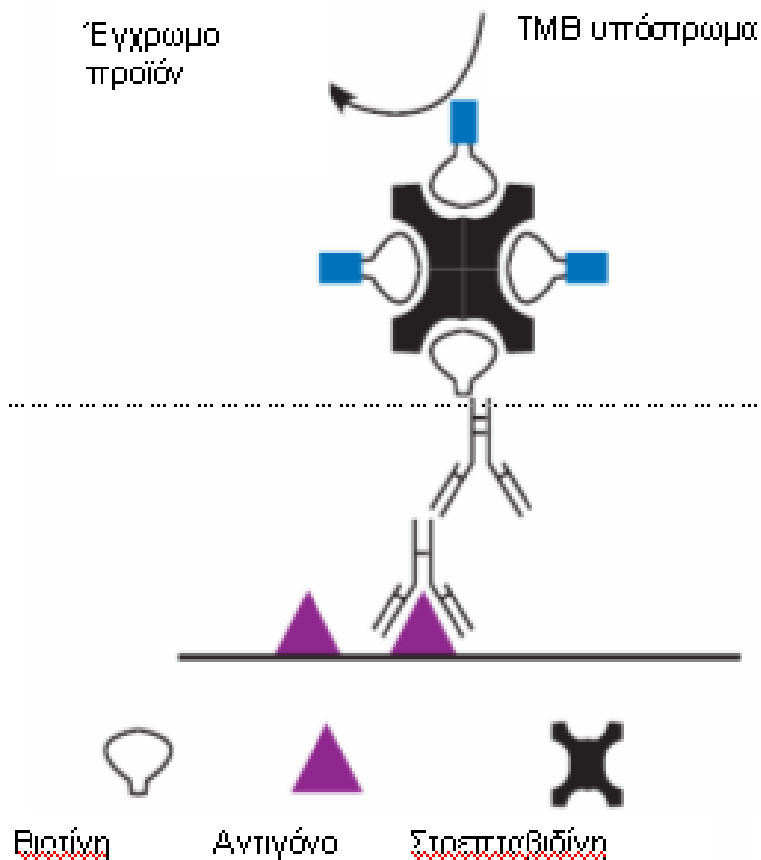
Ιστορική αναδρομή

- Avrameas & Uriel, 1966, Ινστιτούτο Pasteur Avrameas S, Guilbert B. A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. Eur J Immunol 1971;1:394-396
- Nakane & Pierce, 1966, USA : Σήμανση αντισωμάτων με υπεροξειδάση για ανίχνευση ανοσοσυμπλεγμάτων και κυτταρικών συστατικών
- Στις ανοσοενζυμικές μεθόδους ο ιχνηθέτης είναι ένζυμο. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι τα HRP, ALP και β -GAL και τα υποστρώματά τους μπορεί να είναι χρωμογόνα ή φθορισμογόνα.
- Οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι μπορεί να είναι ανταγωνιστικές και μη ανταγωνιστικές, ομογενείς ή ετερογενείς.

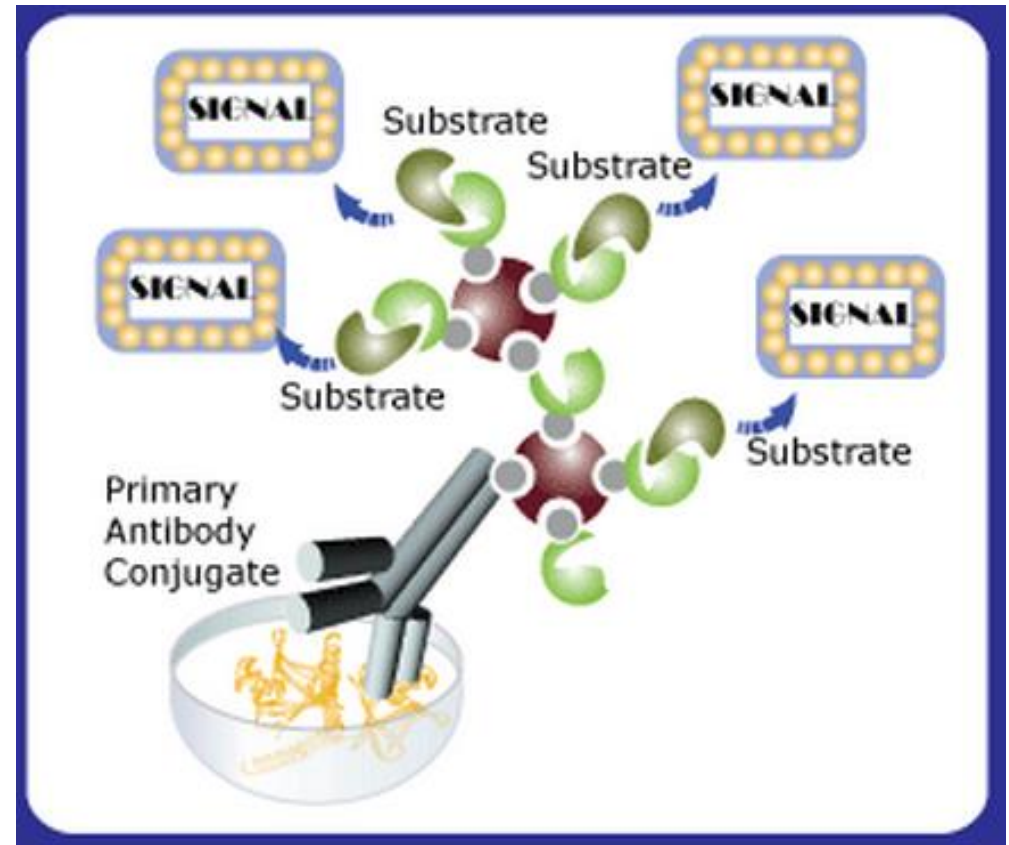
Ένζυμο	Είδος ενζύμου	Χρωμογόνα υποστρώματα	Συντόμευση	Μήκος κύματος (nm)
Υπεροξειδάση (HRP)	Οξειδάση	2,2-άζινο δις-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ	ABTS	415
		3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη	TMB	450
		Ορθο-φαινυλενοδιαμίνη	OPD	492
		Φθορίζοντα υποστρώματα		Συντόμευση
		π-υδροξυφαινυλοξικό οξύ		HPPA
		3-(π-υδροξυφαινυλο) προπιονικό οξύ		HPPA
Αλκαλική φωσφατάση (ALP)	Υδρολάση	Χρωμογόνα υποστρώματα	Συντόμευση	Μήκος κύματος
		π-φωσφορική νιτροφαινόλη	pNPP	405
		Φθορίζοντα υποστρώματα		Συντόμευση
		4-μεθυλο φωσφορική ουμπελιφερόνη		MUP
β-γαλακτοσιδάση (β-GAL)	Υδρολάση	Χρωμογόνα υποστρώματα	Συντόμευση	Μήκος κύματος
		ο-νιτροφαινυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσίδη	oNPG	420
		Ερυθρό χλωροφαινόλης-β-D-γαλακτοπυρανοσίδης	CPRG	571
		Φθορίζοντα υποστρώματα		Συντόμευση
		4-μεθυλουμπελιφερολ-β-D γαλακτοπυρανοσίδη		MUG

Σύστημα βιοτίνης – στρεπταβιδίνης

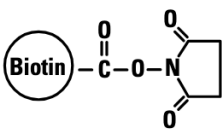
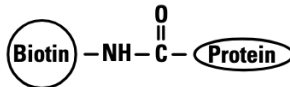
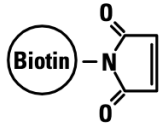
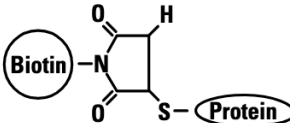
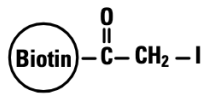
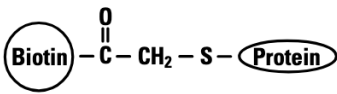
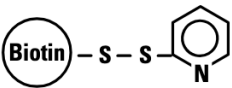
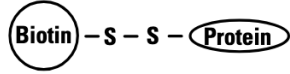
(α) ELISA



Ενίσχυση σήματος μέσω γέφυρας
στρεπταβιδίνης-βιοτίνης



Σύστημα βιοτίνης – στρεπταβιδίνης

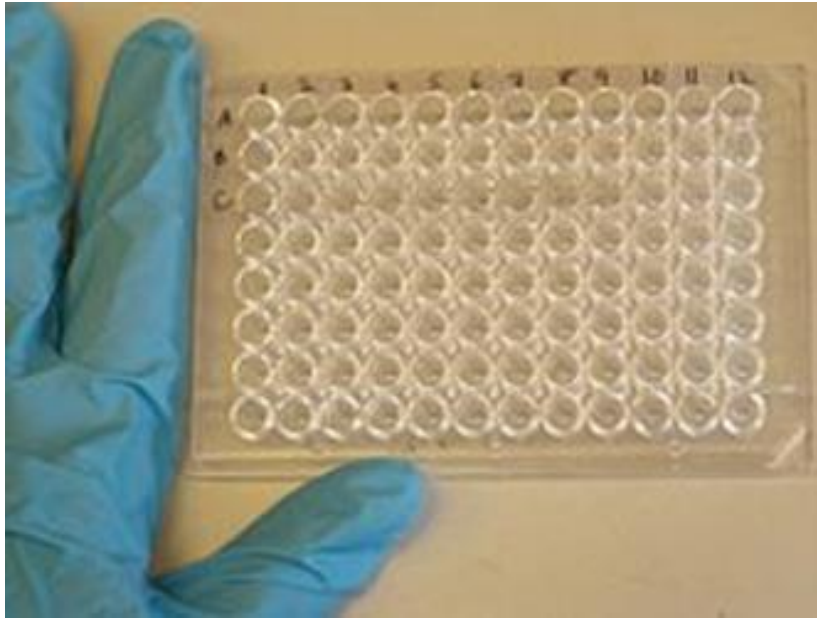
Reactive Group	Reacts With	Linkage Formed
NHS-Ester/Sulfo-NHS Ester 	Primary Amine (lysine residue) 	Amide Bond 
Maleimide 	Sulfhydryl (cysteine residue – not disulfide bonded) 	Thioether Bond 
Iodoacetyl 		Thioether Bond 
Pyridyl Disulfide 		Disulfide Bond 

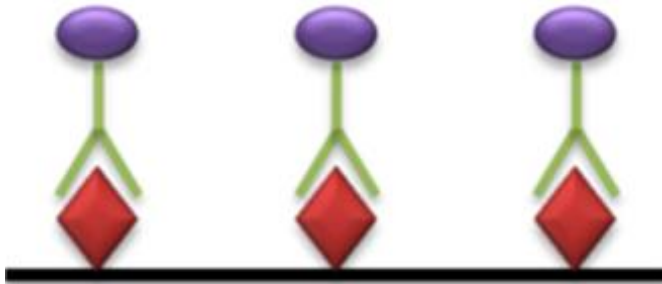
ΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΕΝΖΥΜΟΥ-ΙΧΝΗΘΕΤΗ

- Υψηλή ειδική ενεργότητα (specific activity)
- Μεγάλη σταθερότητα σε συνθήκες φύλαξης αλλά και ανάλυσης
- Διαθέσιμο καθαρό ένζυμο σε χαμηλό κόστος και αναπαραγώγιμη ποιότητα
- Φθηνά και σταθερά μη-τοξικά υποστρώματα ικανά να σχηματίζουν σταθερά και ανιχνεύσιμα προϊόντα
- απουσία ενδογενούς ενζύμου στο μίγμα της αντίδρασης
- Χαμηλή τιμή K_m για το υπόστρωμα

Μέθοδος ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης (ELISA)

ELISA (Enzyme-Linked immunoSorbent Assay)





Τελική
αντίδραση

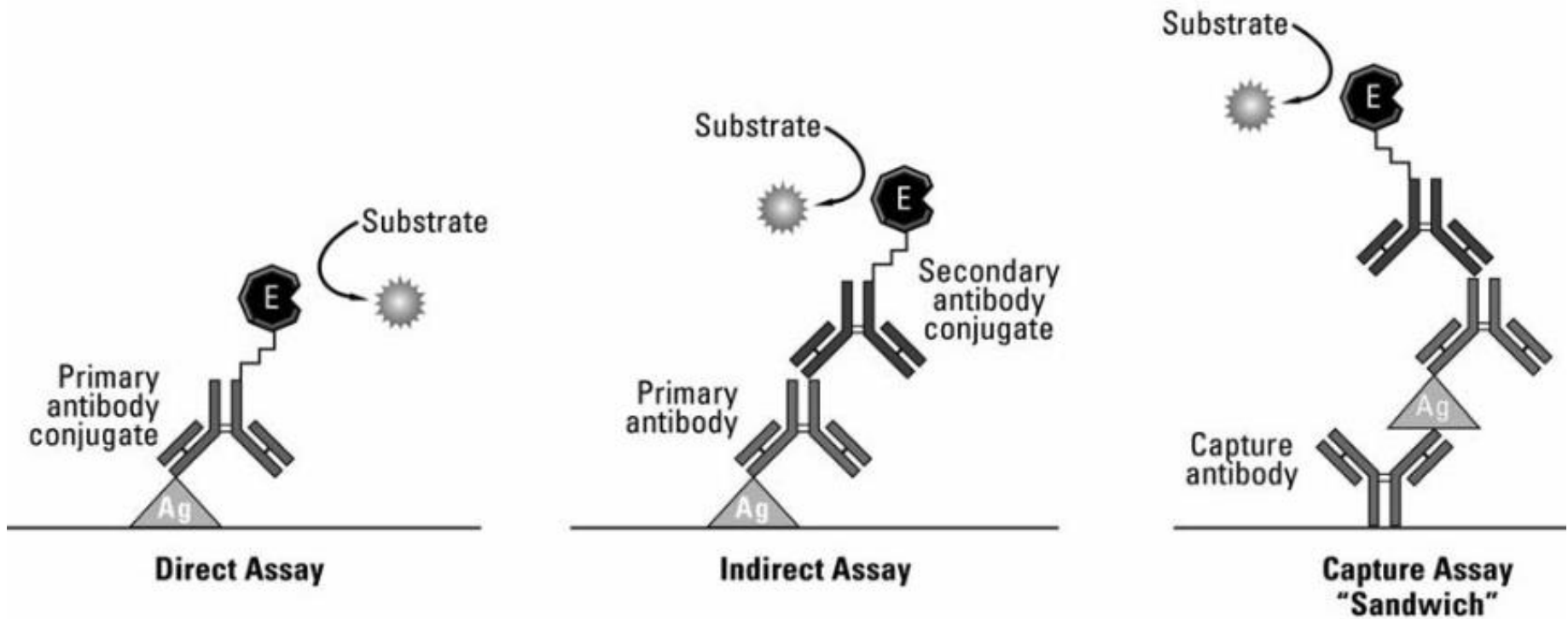
Αντιγόνο
ακινητοποιημένο σε
στερεά επιφάνεια

(ELISA)

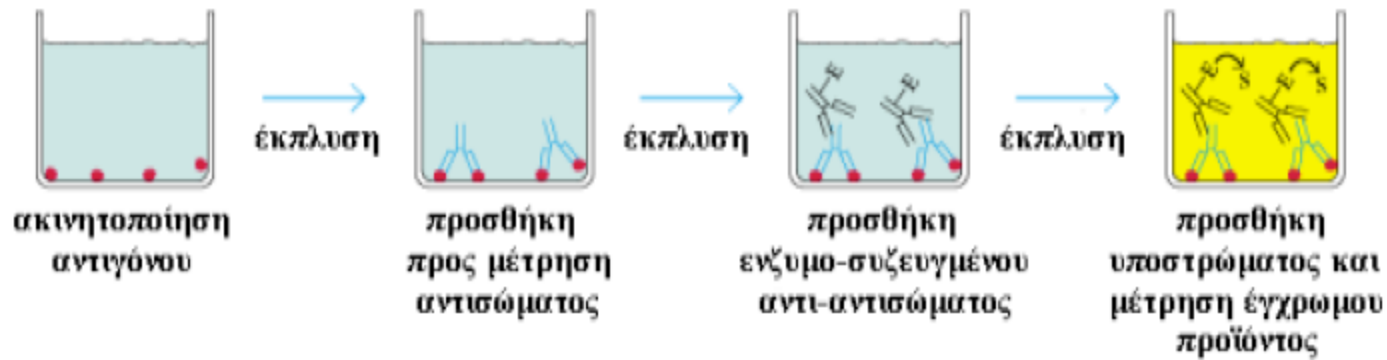
Σύνδεση
αντισώματος με
το αντιγόνο

Ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Οι ELISA ομαδοποιούνται σε:
άμεσες, έμμεσες, sandwich και ανταγωνιστικές



Έμμεση ELISA

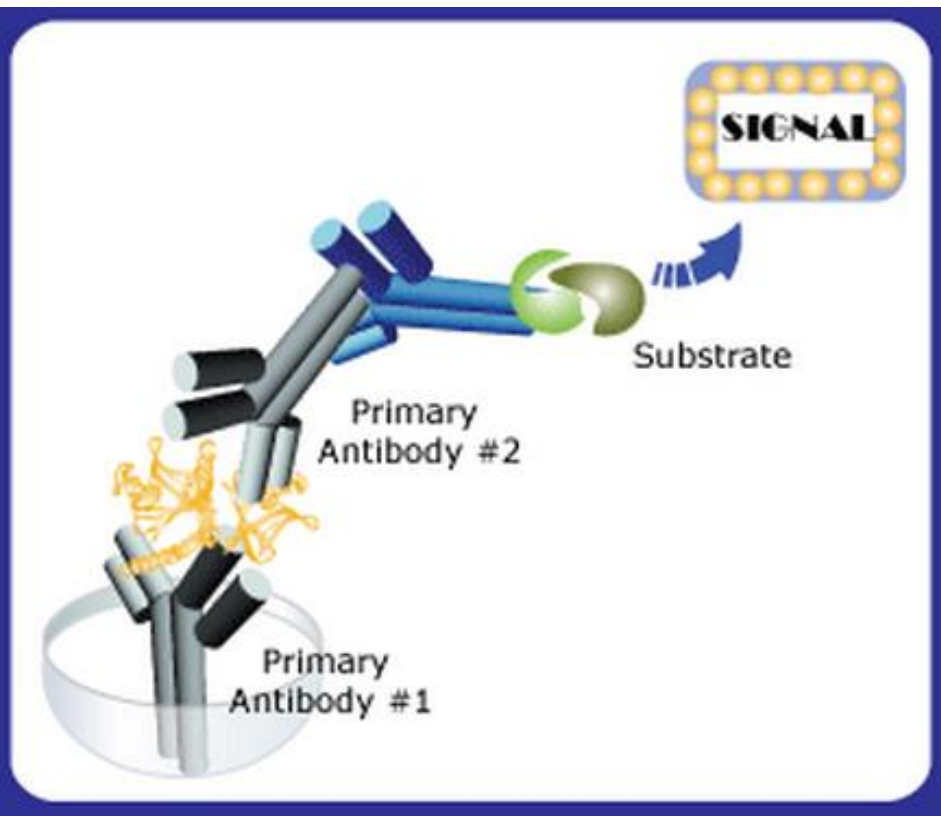


Για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένου αντιγόνου σε βιολογικά υγρά εφαρμόζεται η παραλλαγή της έμμεσης ELISA

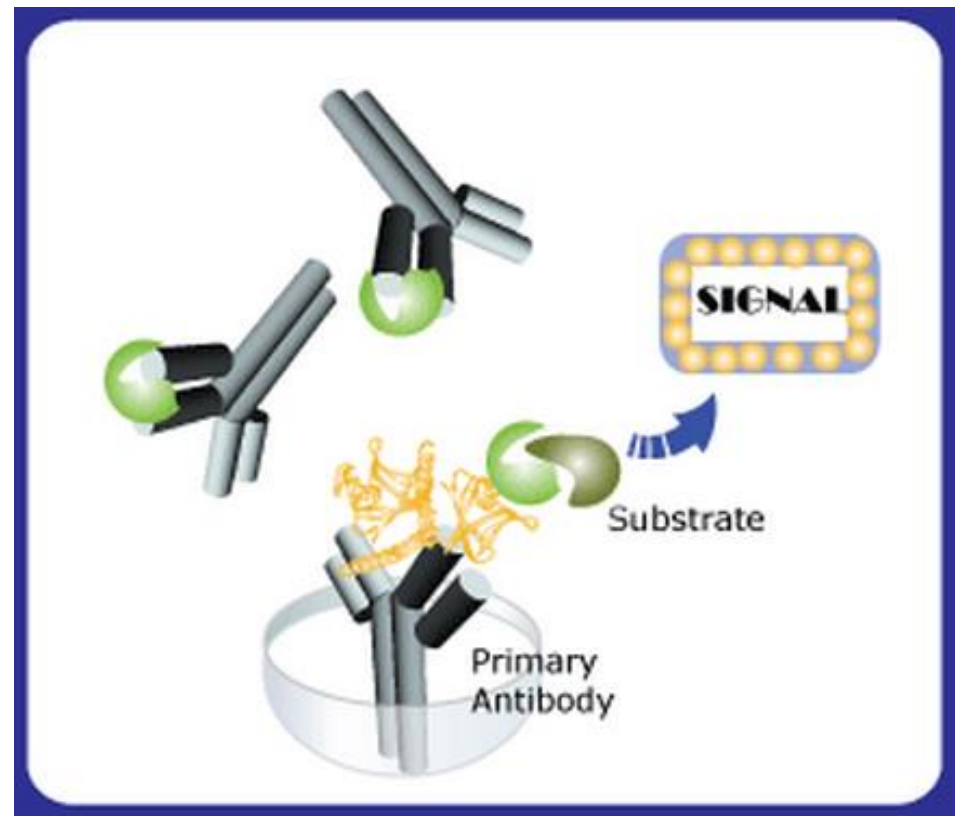
Η παραλλαγή αυτή εφαρμόζεται για:

- (α) ανίχνευση αντισωμάτων έναντι λοιμογόνων παραγόντων, όπως ο ιός HIV,
- (β) προσδιορισμό τίτλου αντισωμάτων μετά από εμβολιασμό ή ανοσοποίηση ζώων,
- (γ) ανίχνευση αυτοαντισωμάτων,
- (δ) ανίχνευση αντισωμάτων έναντι αλλεργιογόνων και
- (ε) ανίχνευση αντισωμάτων έναντι αντιγόνων, όπως στην περίπτωση της λεισμανίασης.

Τύποι ELISA



Μη-ανταγωνιστικού
τύπου (Sandwich)



ανταγωνιστικού τύπου

Μη Ανταγωνιστικές μέθοδοι ELISA

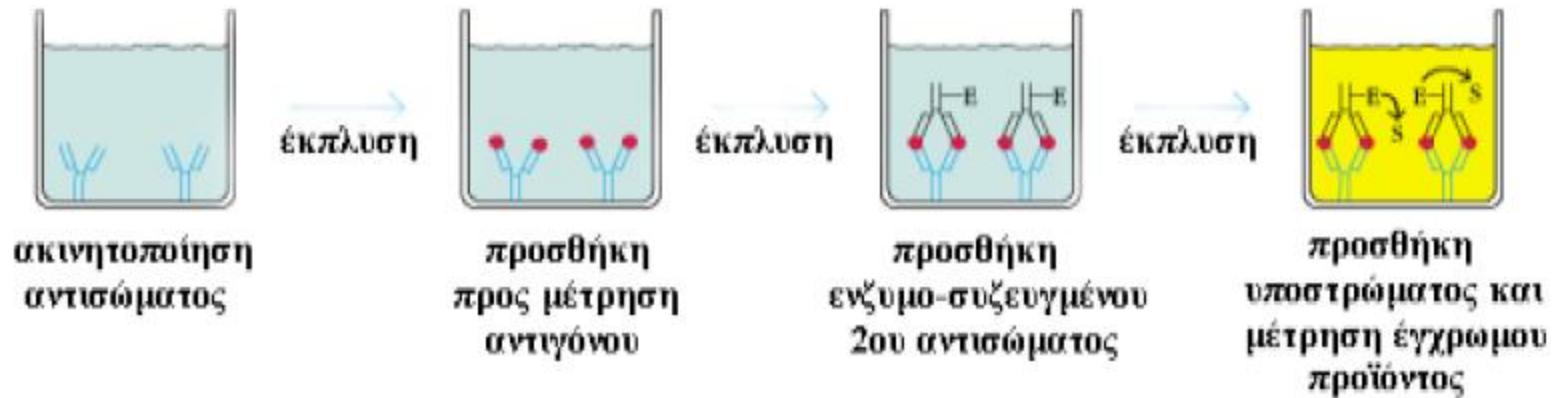
Όταν το αντιγόνο έχει δύο επιτόπους μπορεί να συνδεθεί με δύο αντισώματα η μέθοδος που εφαρμόζεται ονομάζεται **μη ανταγωνιστική ή αλλιώς Sandwich**.

Σε αυτή την περίπτωση το αντιγόνο ακινητοποιείται μεταξύ δύο αντισωμάτων. Το πρώτο αντίσωμα είναι σταθερά ενωμένο πάνω σε στερεή φάση και το δεύτερο φέρει τη σήμανση (**άμεση ELISA sandwich**).

Εάν το χρησιμοποιούμενο αντίσωμα ανίχνευσης δεν είναι επισημασμένο, απαιτείται ένα δευτερεύον αντίσωμα ανίχνευσης συζευγμένο με ένζυμο. Αυτό είναι γνωστό ως **έμμεση ELISA sandwich**.

Στη δοκιμασία sandwich το σήμα είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιγόνου και αυξάνεται, όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή του.

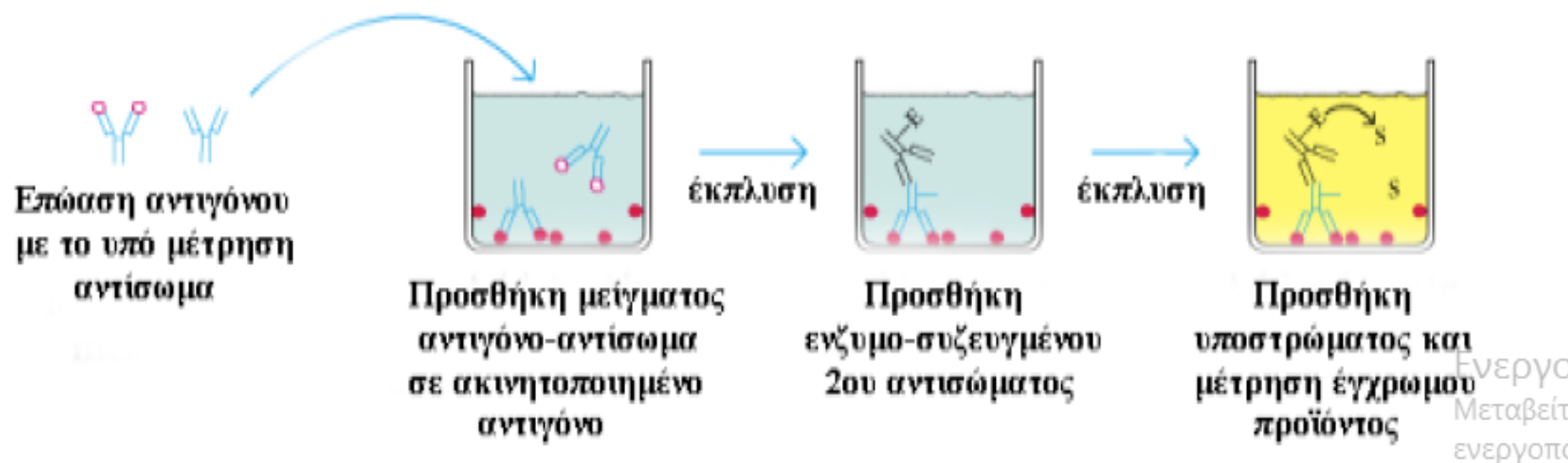
Για την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένου αντιγόνου σε βιολογικά υγρά εφαρμόζεται η παραλλαγή της ELISA τύπου Sandwich



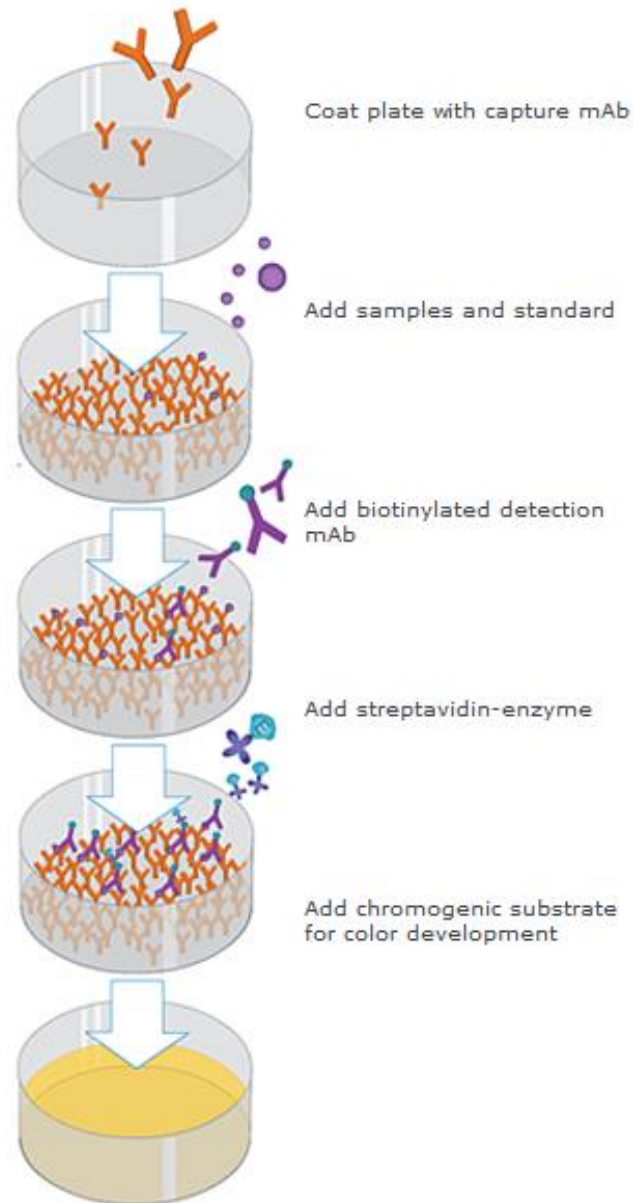
Η ELISA τύπου Sandwich εφαρμόζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό ορμονών, κυτταροκινών, ανοσοσφαιρινών και άλλων πρωτεϊνών σε βιολογικά υγρά και σε υπερκείμενα καλλιιεργιών.

ELISA ανταγωνιστικού τύπου

Αν είναι απαραίτητη η ποσοτική μέτρηση του αντιγόνου αλλά διαθέτουμε μόνο ένα αντίσωμα ή το αντιγόνο δεν διαθέτει περισσότερους από ένα επίτοπο τότε εφαρμόζουμε την ανταγωνιστική τύπου ELISA. Οι ανταγωνιστικές ELISA χαρακτηρίζονται από τον ανταγωνισμό μεταξύ διαλυτού και ακινητοποιημένου σε στερεά επιφάνεια αντιγόνου για την πρόσδεση στο αντίσωμα.



Σχηματική παράσταση των σταδίων μιας τυπικής ELISA



Οργανολογία κλασικής ELISA



ELISA reader

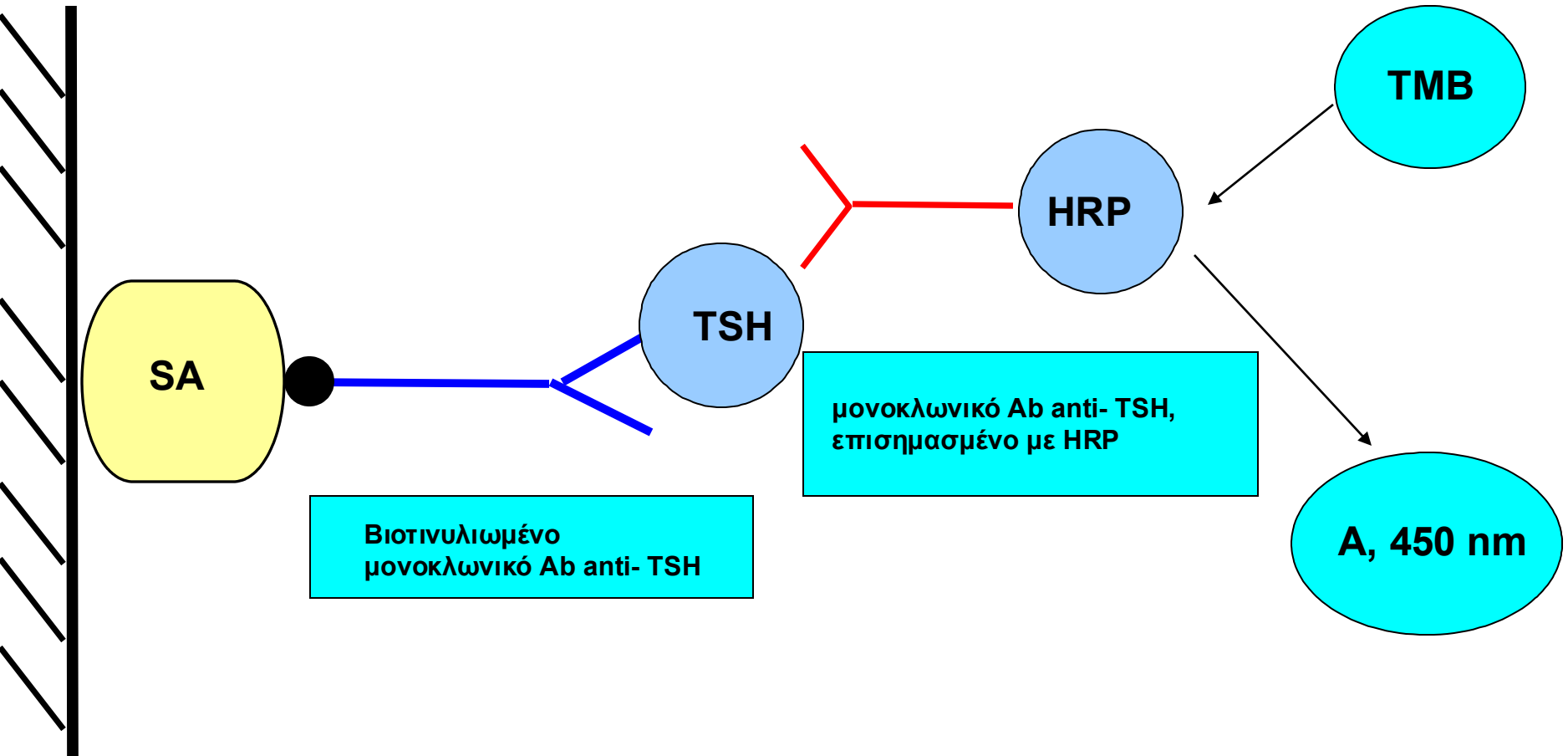


ELISA washer

Οργανολογία κλασικής ELISA

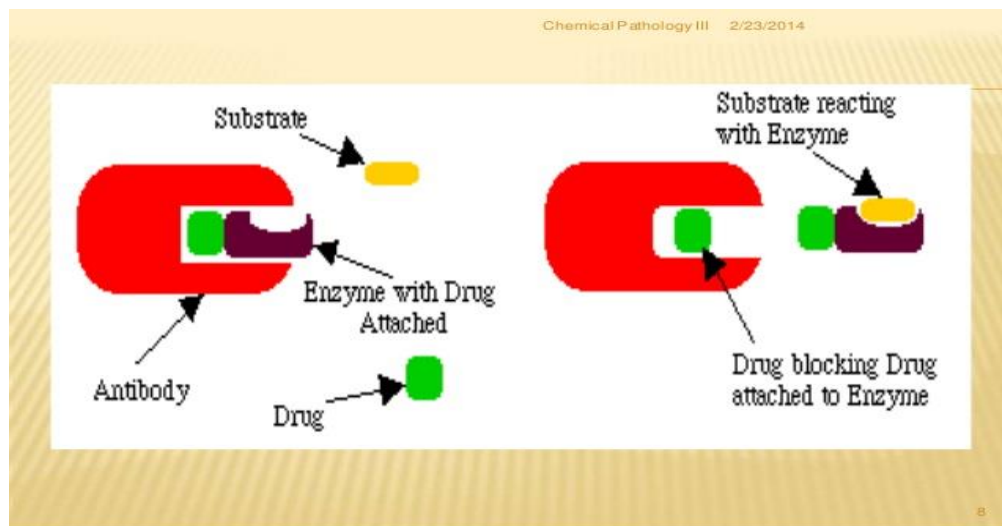
<https://www.youtube.com/watch?v=0c2FdQH33hk>

ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ IRMA ΤΥΠΟΥ Sandwich



Ανοσοενζυμική Ενισχυμένη μέθοδος (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique ή EMIT)

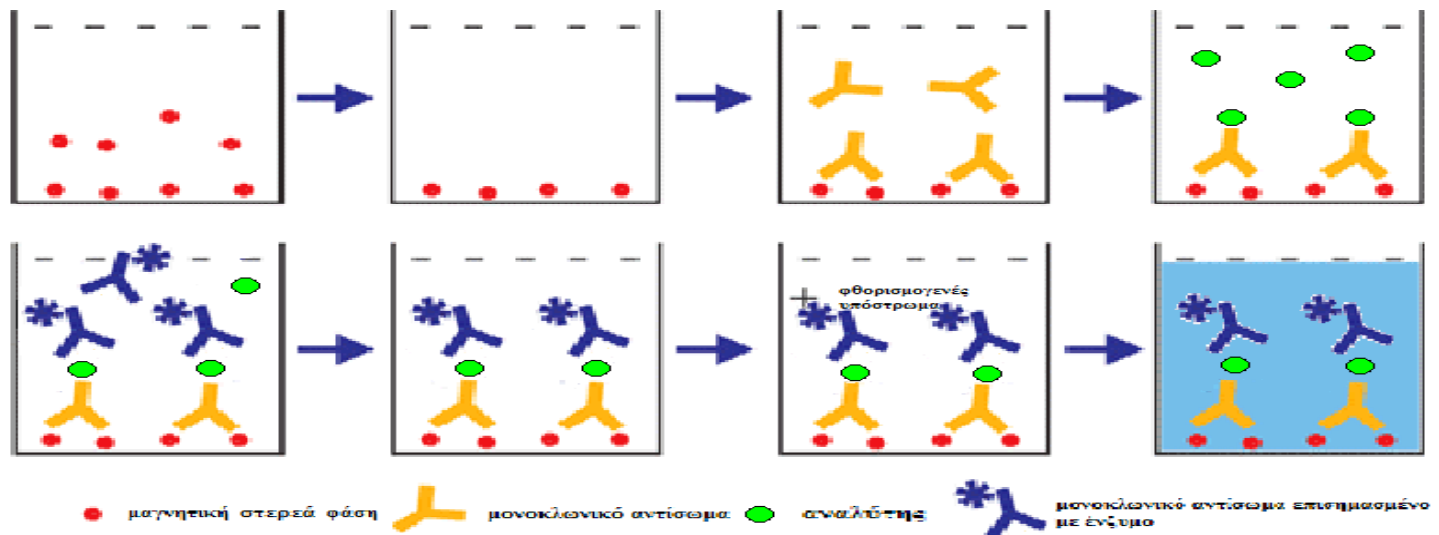
- **Ομογενής ανοσοενζυμικός προσδιορισμός**
- Η ανοσοενζυμική ενισχυμένη μέθοδος (**Enzyme Multiplied Immunoassay Technique** ή **EMIT**) χρησιμοποιείται ευρέως για τη μέτρηση ναρκωτικών και φαρμακευτικών ουσιών. Ο ιχνηθέτης της μεθόδου είναι το ένζυμο αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (**G6-PD**).



Η μέθοδος είναι ανταγωνιστικού τύπου. Όσο περισσότερο φάρμακο υπάρχει στον ορό του ασθενούς τόσο περισσότερο από αυτό θα συνδεθεί με τα αντισώματα και άρα τόσο περισσότερο αντιγόνο επισημασμένο με ένζυμο παραμένει ελεύθερο να αντιδράσει

Ανοσοφθορισμομετρικοί προσδιορισμοί

- Συνδυάζουν: υψηλή εξειδίκευση των ανοσοπροσδιορισμών και υψηλή ευαισθησία της φθορισμομετρικής ανίχνευσης
- Βασίζονται στην ενζυμική ιχνηθέτηση με παράλληλη φθορισμομετρική ανίχνευση του σήματος της ενζυμικής αντίδρασης
- Ένζυμα στους ανοσοφθορισμοπροσδιορισμούς: ιχνηθέτες δρώντας σε κατάλληλα φθορισμογόνα υποστρώματα



Αυτοματοποιημένη ELISA

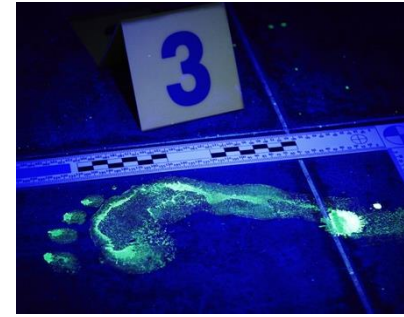


<https://www.youtube.com/watch?v=UHEdQVRn-PE>

Αυτόματος ανοσοαναλυτής ELECSYS 2010

- Για ετερογενείς ανοσοπροσδιορισμούς, ηλεκτροχημειοφωταύγεια (electrochemilluminescence – ECL)
- Μέθοδος «sandwich» με γέφυρα βιοτίνης – στρεπταβιδίνης
- Εξετάσεις: ορμόνες αναπαραγωγής, θυρεοειδικές ορμόνες, καρκινικοί δείκτες, καρδιακοί δείκτες, δείκτες αναιμίας κ.ά.





Αρχή μεθόδου - ηλεκτροχημειοφωταύγεια

- Αντίδραση χημειοφωταύγειας μορίων που παράγονται ηλεκτροχημικά πάνω στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου
- Παράγεται μέσω μιας αντίδρασης μεταφοράς ηλεκτρονίων ανάμεσα σε ένα οξειδωμένο και ένα ανηγμένο μόριο
- Υψηλής ευαισθησίας τεχνική, πλεονεκτήματα:
 - Όχι ραδιοϊσότοπα.
 - Όρια ανίχνευσης για ιχνηθέτες πολύ χαμηλά (200 fmol/L).
 - Δυναμικό εύρος διαγράμματος βαθμονόμησης >6 τάξεις μεγέθους.
 - Εξαιρετικά σταθεροί ιχνηθέτες
 - Εκλεκτικότητα → ικανότητα των επισημασμένων μορίων να πλησιάσουν την επιφάνεια του ηλεκτροδίου.
 - Ιχνηθέτες μικρά μόρια (~1000Da) → επισήμανση απτενίων ή μεγάλων μορίων ενώ πολλαπλοί ιχνηθέτες συνδέονται με πρωτεΐνες ή ολιγονουκλεοτίδια
 - Απλή και ταχύτατη μέθοδος

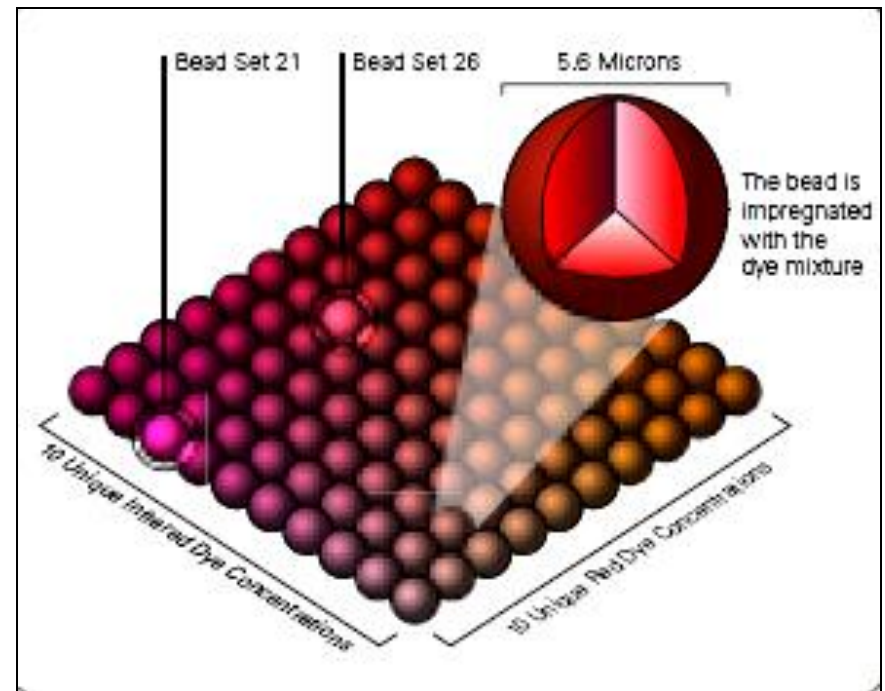
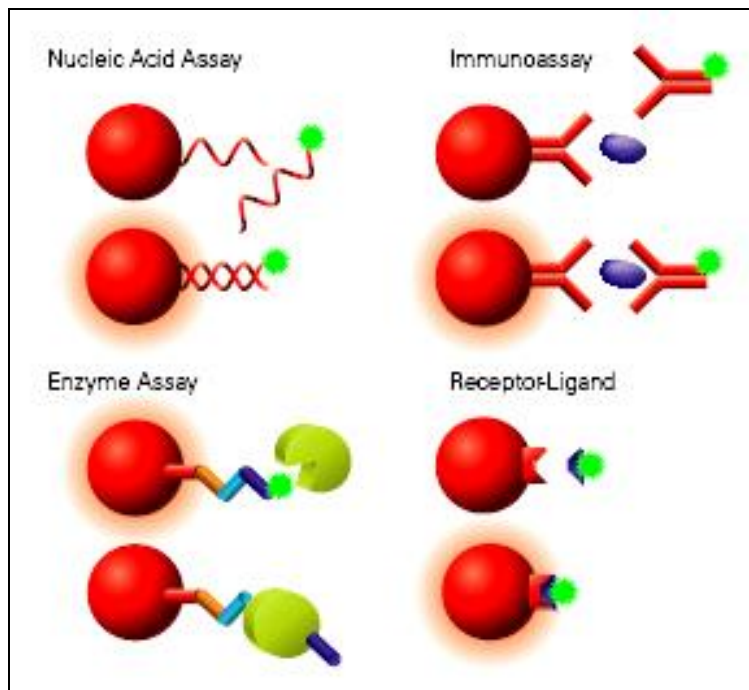
Αυτόματος ανοσοαναλυτής AIA 1800



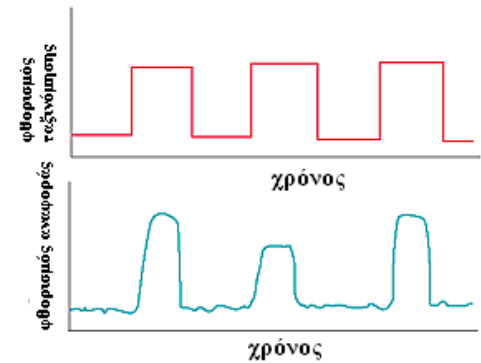
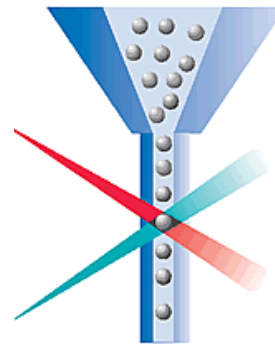
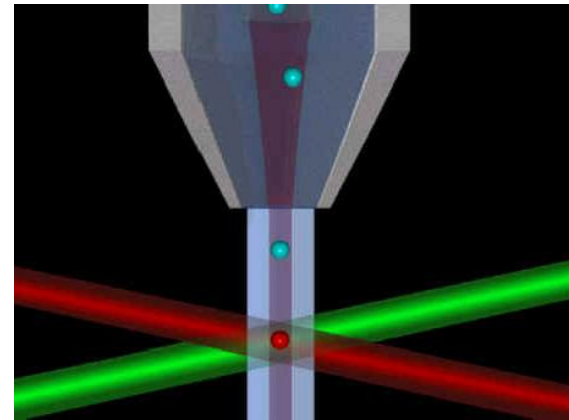
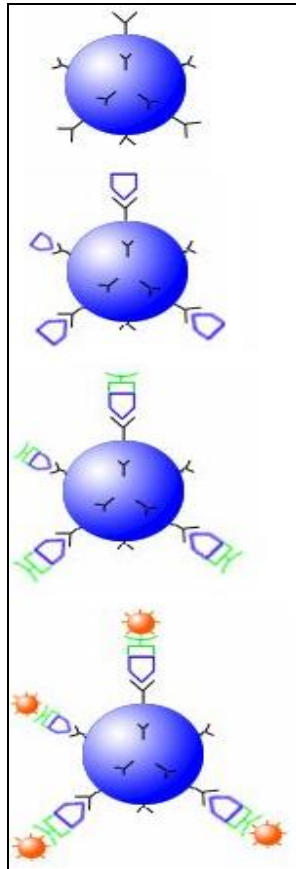
- Εκτελεί ενζυμικούς ανοσοπροσδιορισμούς με σύστημα φθορισμομετρικής ανίχνευσης (ELFIA) σε δείγματα ορού ή πλάσματος
- Αρχή μεθόδου - ενζυμοανοσοφθορισμομετρία
- Εξετάσεις: ορμόνες αναπαραγωγής, θυρεοειδικές ορμόνες, καρκινικοί δείκτες, καρδιακοί δείκτες, δείκτες αναιμίας κ.ά.

πολυπαραμετρική ELISA

Αρχή λειτουργίας συστήματος LumineX

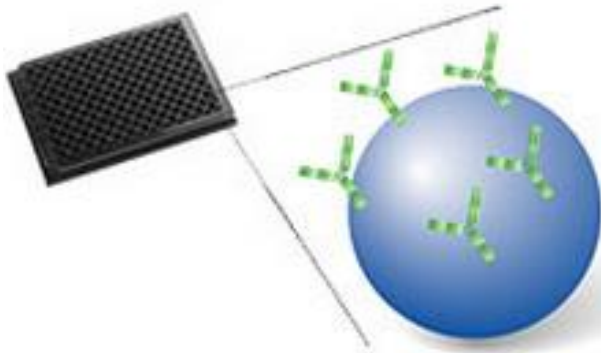


Αρχή λειτουργίας συστήματος LumineX

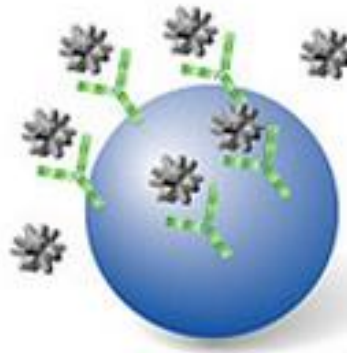


Αρχή λειτουργίας συστήματος LumineX

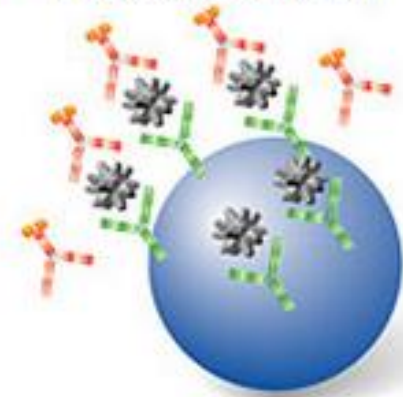
Step One
Dispense capture beads



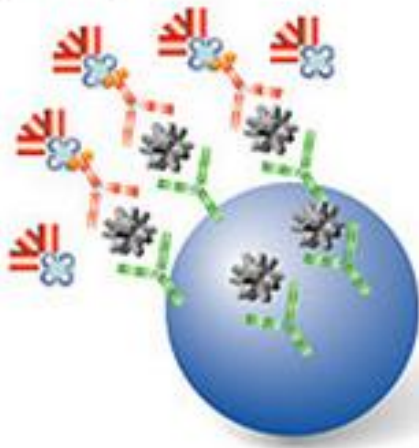
Step Two
Add samples



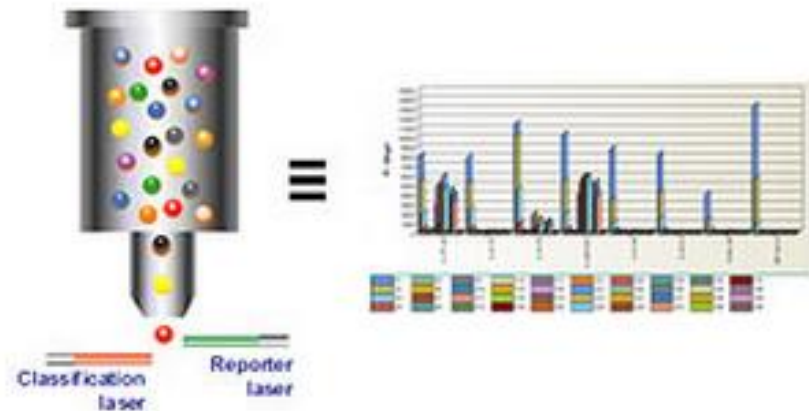
Step Three
Add detection antibody



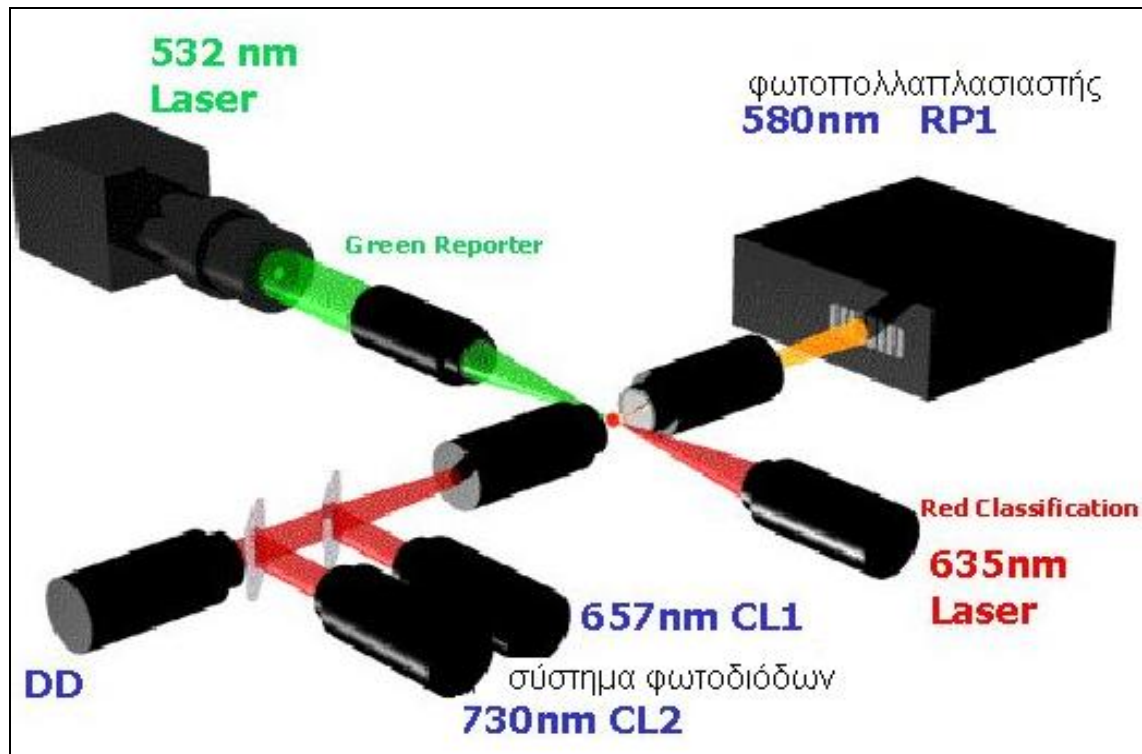
Step Four
Add reporter dye



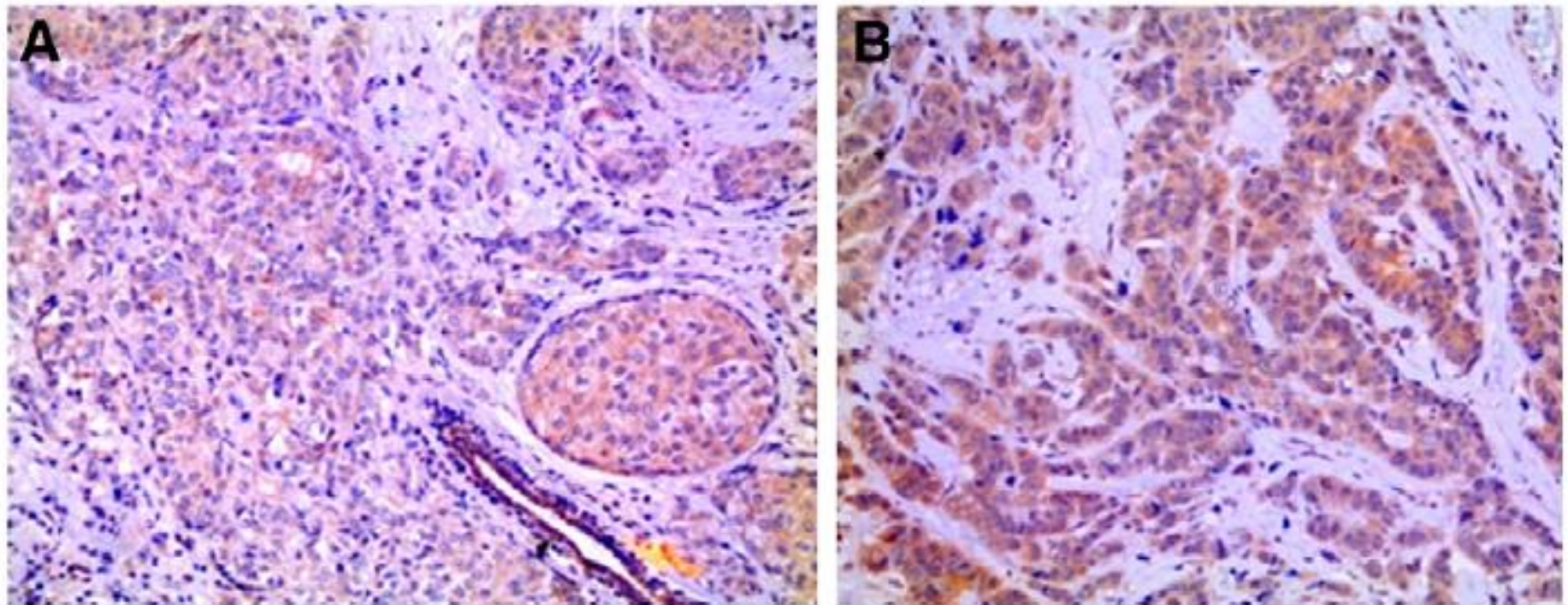
Step Five
Fluorescent sorting and data reduction



Αναπαράσταση των συστημάτων LASER, PMT και φωτοδιόδων στο Luminex-100.



ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ



M. Chimonidou et al. / Clinical Biochemistry 46 (2013) 235–240

Fig. 3. A: CST6 cytoplasmic immunohistochemical expression in benign luminal epithelium, carcinoma in situ (CIS) and infiltrating breast carcinoma in patients with methylated *CST6* promoter. Myoepithelial cells are negative, B: CST6 cytoplasmic immunohistochemical expression in infiltrating breast carcinoma in patients with methylated *CST6* promoter. (all magnifications: x200).

ΣΕ ΤΙ ΙΣΤΟΥΣ ΕΦΑΡΜΟΖΕΤΑΙ;

- Τομές παραφίνης
- Τομές κρυοστάτη
- Κύτταρα από συλλογές υγρών
- Κυτταρικές σειρές
- Τομές ηλεκτρονικού μικροσκοπίου

ΤΙ ΠΡΟΣΦΕΡΕΙ Η ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ;

- **Τυποποίηση των όγκων**
- **Ταυτοποίηση αγνώστου προελεύσεως όγκων**
- **Ανίχνευση ογκογονιδίων**
- **Ανάδειξη προγνωστικών, προβλεπτικών δεικτών**
- **Ανίχνευση ειδικών υποδοχέων**