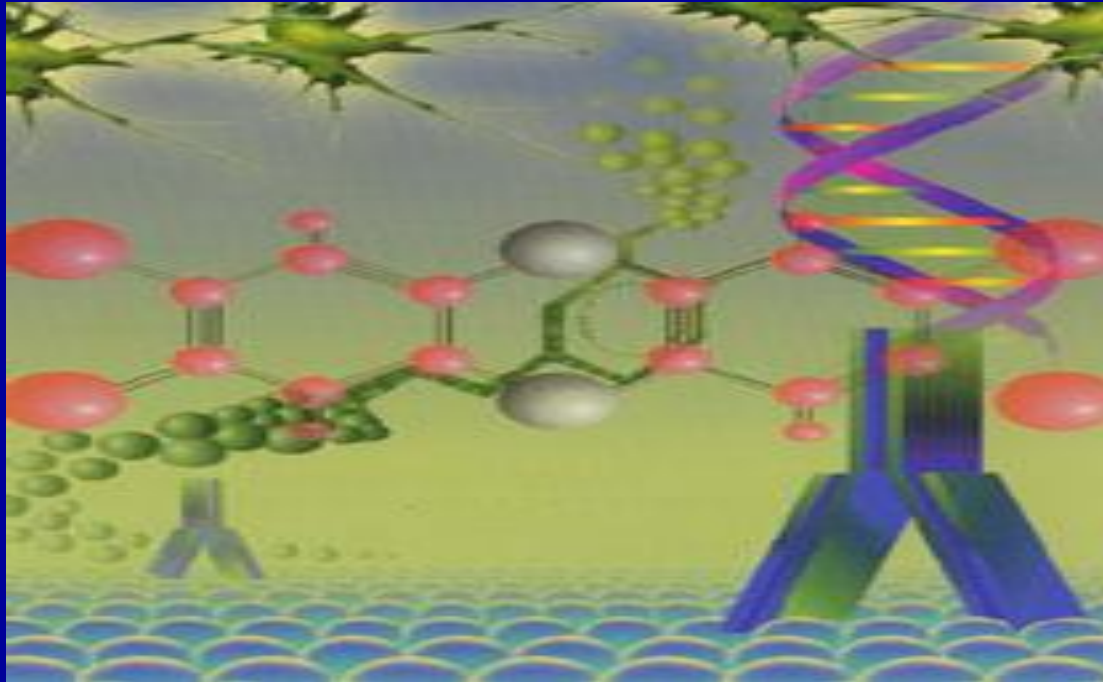


ΜΑΘΗΜΑ : ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ
(immunoassays)



Ένωση

Κυκλοφορούσα συγκέντρωση

Μέθοδοι μέτρησης

	mmol/L	(10 ⁻³ mol/L)
Νάτριο	140	
Χλώριο	105	
Διττανθρακικά	30	
Γλυκόζη	5	
Ουρία	4	
Χοληστερόλη	4	
Ασβέστιο	2.5	
Τριγλυκερίδια (νηστείας)	1	

	umol/L	(10 ⁻⁶ mol/L)
Αλβουμίνη	600	
Ουρικό οξύ	250	
Φαινυλαλανίνη	125	
Ανοσοσφαιρίνη G	90	
Θεοφυλλίνη	80	
Αμμωνία	30	
Σίδηρος	20	
Χολερυθρίνη (ολική)	10	
Ανοσοσφαιρίνη M	1	

	nmol/L	(10 ⁻⁹ mol/L)
Οιστρίδι (τέλος κύησης)	600	
Δεσμευτική της θυροξίνης σφαιρίνη	500	
Κορτιζόλη	400	
Πλακουντιακό γαλακτογόνο	300	
Θυροξίνη (ολική)	125	
Κορτικοστερόνη	20	
Διγοξίνη	2	
Τριωδοθυρονίνη	2	
Προλακτίνη	1	
Οιστραδιόλη 17β (γυναίκες)	1	
Προγεστερόνη	1	

	pmol/L	(10 ⁻¹² mol/L)
Αλδοστερόνη	180	
Ινσουλίνη	120	
Παραθορμόνη	100	
Αυξητική ορμόνη	50	
Ωχρινοπαιητική ορμόνη	10	
Τριωδοθυρονίνη	10	
Φλοισεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη	10	
Θυρεοειδοτρόπος ορμόνη	5	
Αγγειοτασίνη II	4	
Ωκυτοκίνη	1	
Αργινίνη βασοπρεσίνη	1	

π.χ. φασματοφωτομετρία, χρωματομετρία, ποτενσιμετρία

Ανοσοχημικές μέθοδοι

Ομοιογενείς ανοσολογικές μέθοδοι, π.χ. EMIT, FPIA

Ετερογενείς ανοσολογικές μέθοδοι, π.χ. ELISA με ανίχνευση με φθορισμό

RIA

ELISA με ανίχνευση με χημειοφωταύγεια

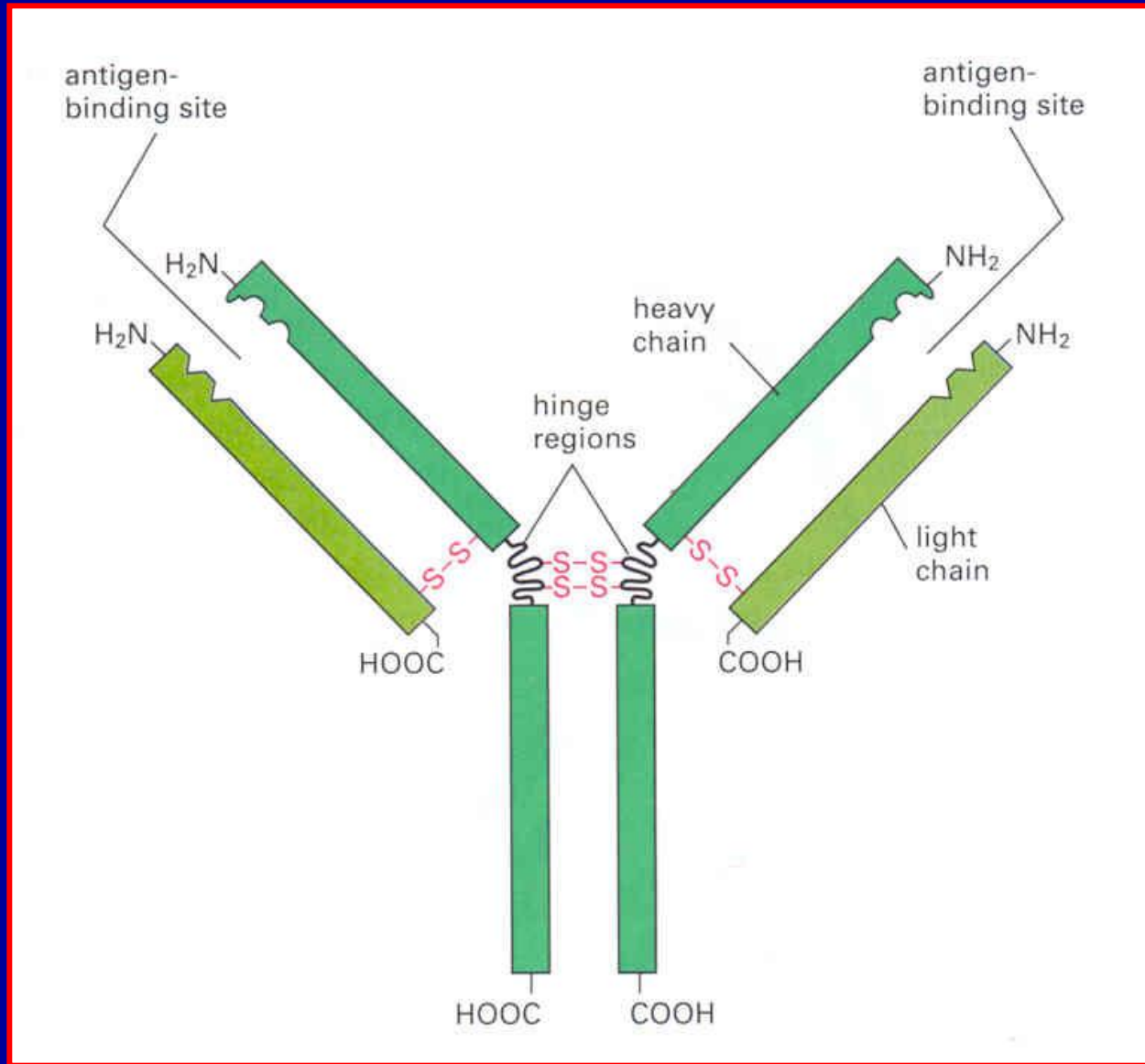
ΧΡΗΣΙΜΟΙ ΟΡΙΣΜΟΙ

- **ΑΝΤΙΣΩΜΑ** --> Ανοσοσφαιρίνη, η οποία συνδέεται εξειδικευμένα με μεγάλη ποικιλία φυσικών και συνθετικών αντιγόνων
- **ΑΝΟΣΟΓΟΝΟ** --> Κάθε χημική ουσία, η οποία είναι ικανή να προκαλέσει ανοσολογική απόκριση
- **ΑΠΤΙΝΗ**---> Μικρό μόριο, χημικά προσδιορισμένο, ικανό να προκαλέσει παραγωγή αντισωμάτων μόνο όταν συνδεθεί με ένα ανοσογόνο-φορέα.

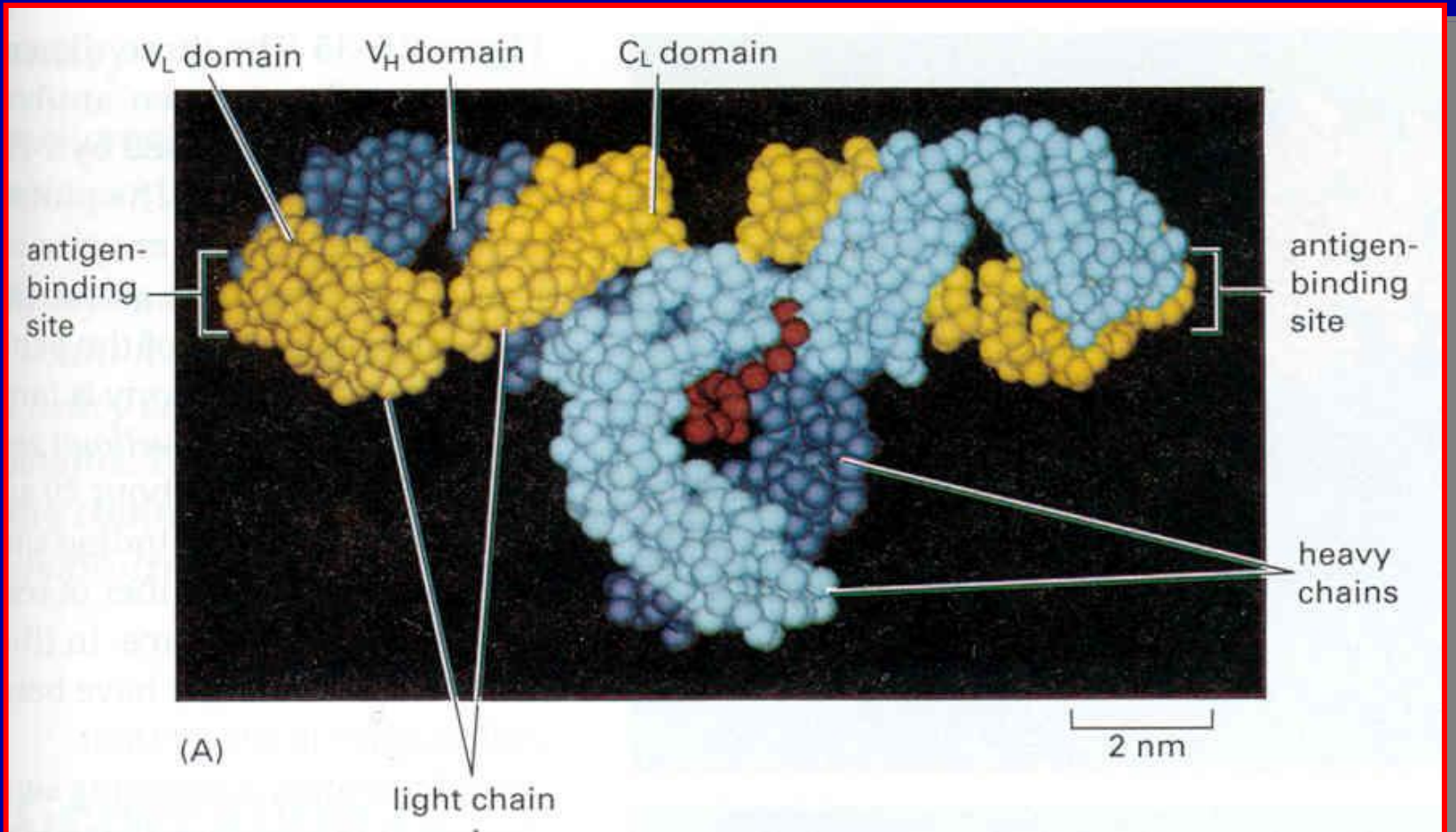
ΧΡΗΣΙΜΟΙ ΟΡΙΣΜΟΙ

- **ΕΠΙΤΟΠΟΣ** :περιοχή στο αντιγόνο που συνδέεται με το αντίσωμα. (Πολύ μικρή περιοχή, 5-7 αμινοξέα).Στις πρωτεΐνες συναντάμε συνήθως 1 επίτοπο ανά 40-80 αμινοξέα
- **ΠΑΡΑΤΟΠΟΣ** : περιοχή στο αντίσωμα που συνδέεται με το αντιγόνο.

Σχηματική παράσταση μορίου ανοσοσφαιρίνης G



Σχηματική παράσταση μορίου ανοσοσφαιρίνης G

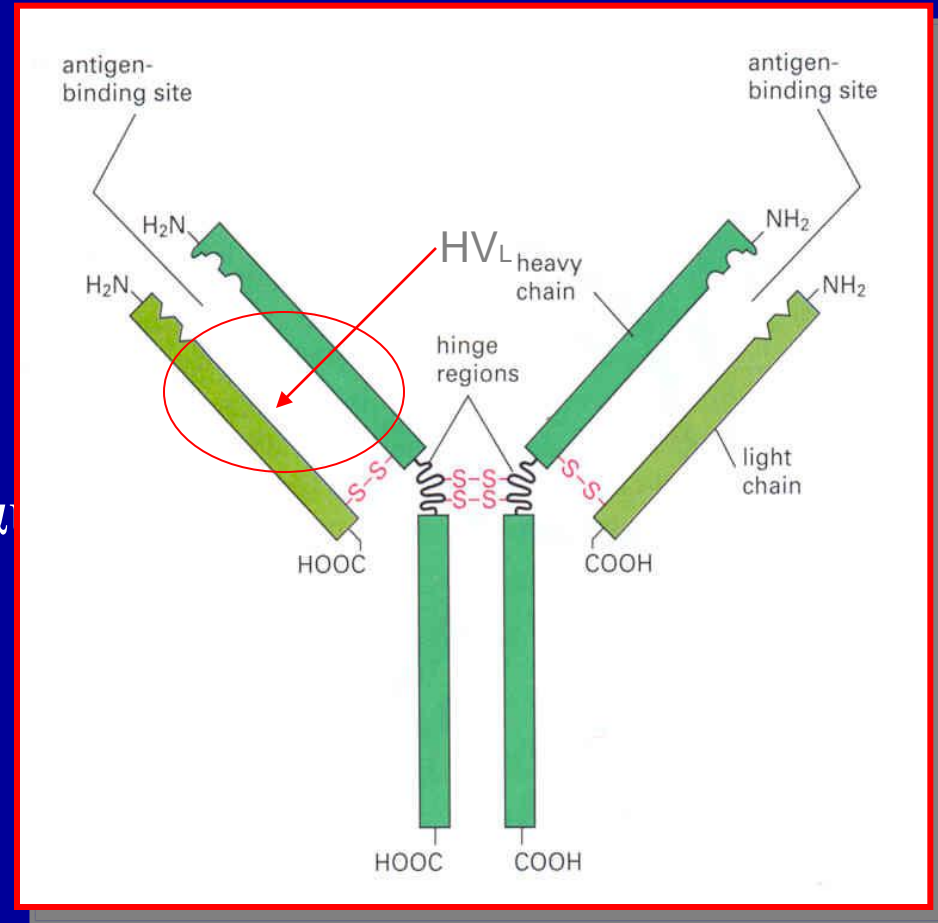


Χαρακτηριστικές ιδιότητες των τάξεων των ανοσοσφαιρινών

Τάξεις ανοσοσφαιρινών	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Μοριακό βάρος ($\times 10^4$ Da)	15,0	30,0	97,0	18,4	18,8
Τύπος βαριάς αλυσίδας	γ	α	μ	δ	ϵ
Σταθερές περιοχές Η αλυσίδων, C _H	3	3	4	3	4
Αλυσίδα J (Joint component)	-	+	\pm	-	-
Σύνθεση μορίου σε αλυσίδες	$\gamma_2\kappa_2$ ή $\gamma_2\lambda_2$	$(\alpha_2\kappa_2)_2$ ή $(\alpha_2\lambda_2)_2$	$(\mu_2\kappa_2)_5$ - J ή $(\mu_2\lambda_2)_5$	$\delta_2\kappa_2$ ή $\delta_2\lambda_2$	$\epsilon_2\kappa_2$ ή $\epsilon_2\lambda_2$
Διέλευση από τον πλακούντα	+	-	-	-	-
Σύνδεση συμπληρώματος	++	-	+++	-	-
Συγκέντρωση στον ορό, mg/dL	1200	5 - 300	150	3	0,005
% ποσοστό στο ολικό κλάσμα των Ig	80	13	6	1	0,002
Περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες %	2,5	7 - 11	12	9 - 14	12

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

- IgG, IgA, IgM, IgD, IgE
- 2 όμοιες βαριές αλυσίδες (H), και δύο ελαφρείς- (L)
- Κ ή λ ελαφρείς αλυσίδες
- Η απόσταση μεταξύ HV_L και αντιγόνου είναι περίπου 0.2nm
- Δομικές ειδικότητες του χώρου αυτού-Ιδιοτυπία (idiotypes)



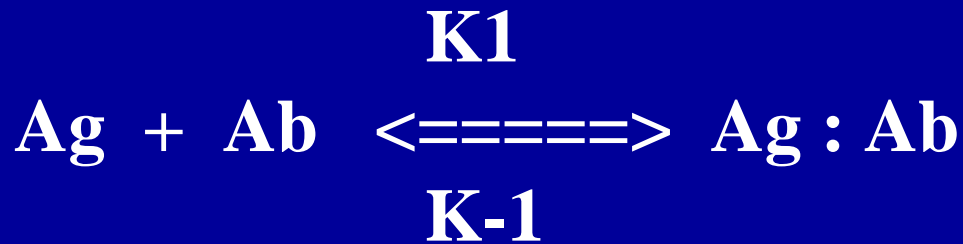
Affinity constant $K_a = [AgAb] / [Ag].[Ab]$

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

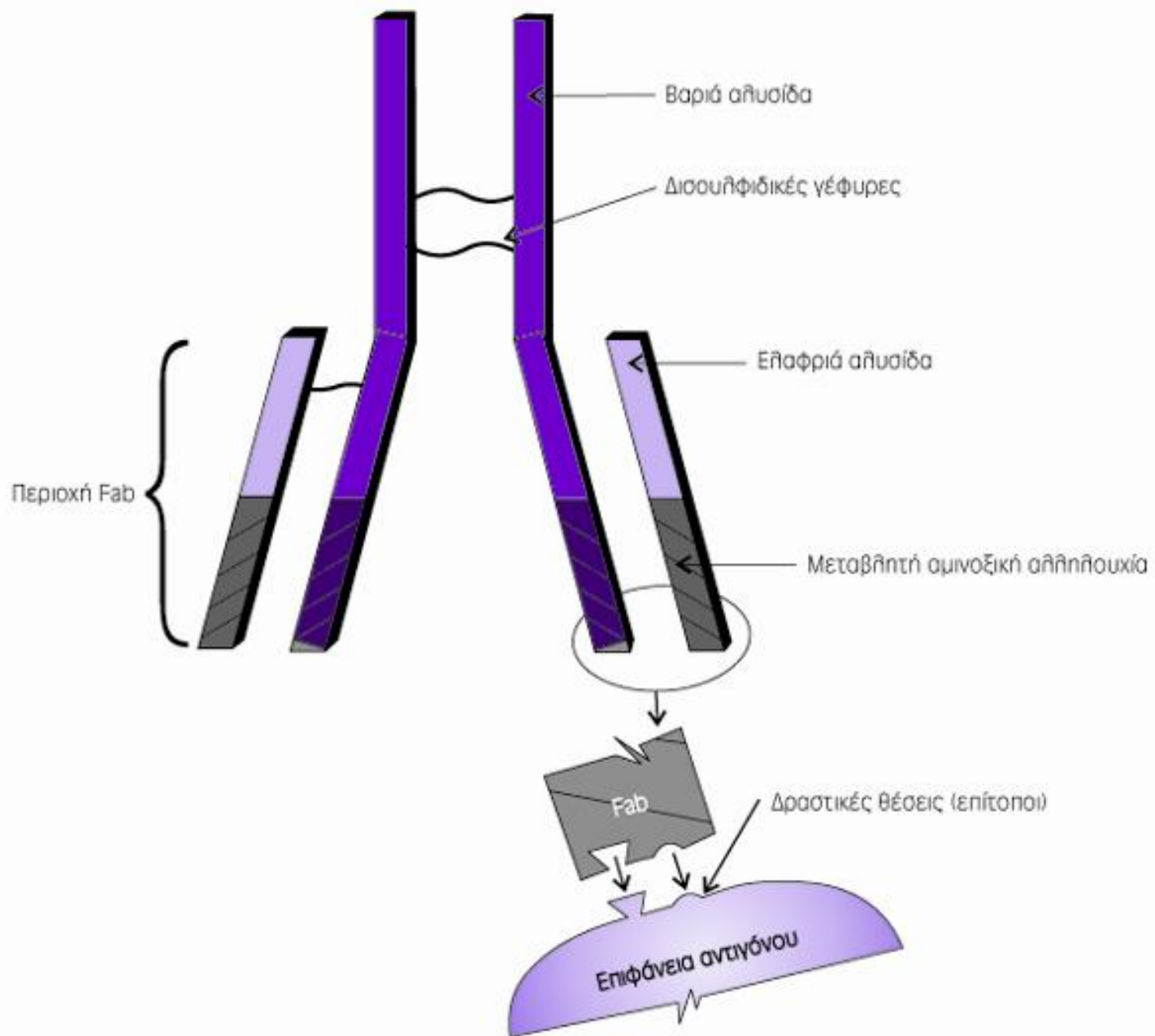
- **Antibody affinity**
- **Antibody cross-reactivity**
- **Antibody stability**
- **Antibody reaction rates**
- **Antibody titer**
- **Antibody dilution**
- **Antibody incubation**

ΣΥΓΓΕΝΕΙΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ (Antibody Affinity)

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



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



ΣΥΝΑΦΕΙΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ (antibody avidity)

**ΑVIDITY---> Εκφράζει την ολική σταθερότητα
του συμπλόκου Ab-Ag**

Εξαρτάται από:

- α) Συγγένεια του αντισώματος ως προς τον
αντιγονικό επίτοπο.**
- β) Σθένος του Ab και Ag.**
- γ) Γεωμετρικές διατάξεις του συνόλου των
δεσμών που σχηματίζονται μεταξύ Ab και Ag.**

ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

(antibody specificity)

ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ: Εκφράζει τη συμπληρωματικότητα της στερεοδομής μεταξύ επιτόπου και παρατόπου

- Είναι δυνατόν δύο διαφορετικά αντιγόνα Α και Β να έχουν ένα ή περισσότερους κοινούς επιτόπους στο μόριό τους με αποτέλεσμα ένας υποπληθυσμός αντισωμάτων πολυκλωνικού αντιορού να αντιδρά και με τα δύο αντιγόνα Στην περίπτωση αυτή εάν χρησιμοποιηθεί μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του κοινού επιτόπου δεν είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ των δύο αντιγόνων. (Shared reactivity).
- Παράδειγμα:
- α) CK-MB και CK-MM με ειδικό αντίσωμα έναντι της Μ υπομονάδας.
- β) LH και HCG με αντισώματα ειδικά έναντι της α υπομονάδας.

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.

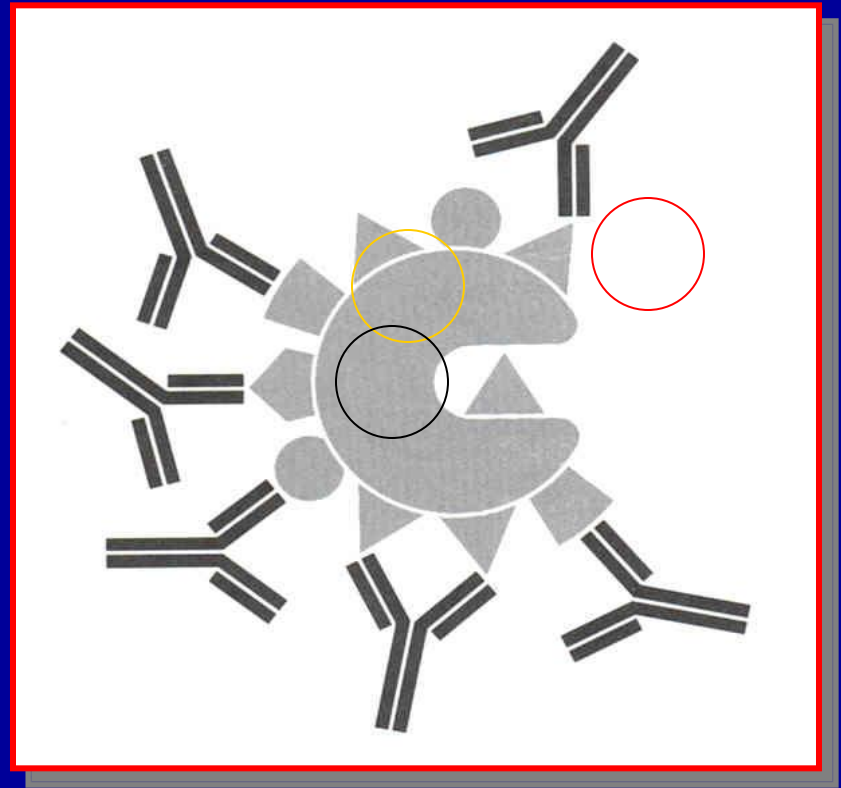
ΑΝΤΙ-ΙΔΙΟΤΥΠΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ (anti-idiotypic antibodies)

Αντισώματα έναντι ανοσοσφαιρινών τα οποία κατευθύνονται έναντι αντιγονικών επιτόπων που βρίσκονται στην μεταβλητή περιοχή του μορίου της ανοσοσφαιρίνης (περιοχή σύνδεσης)

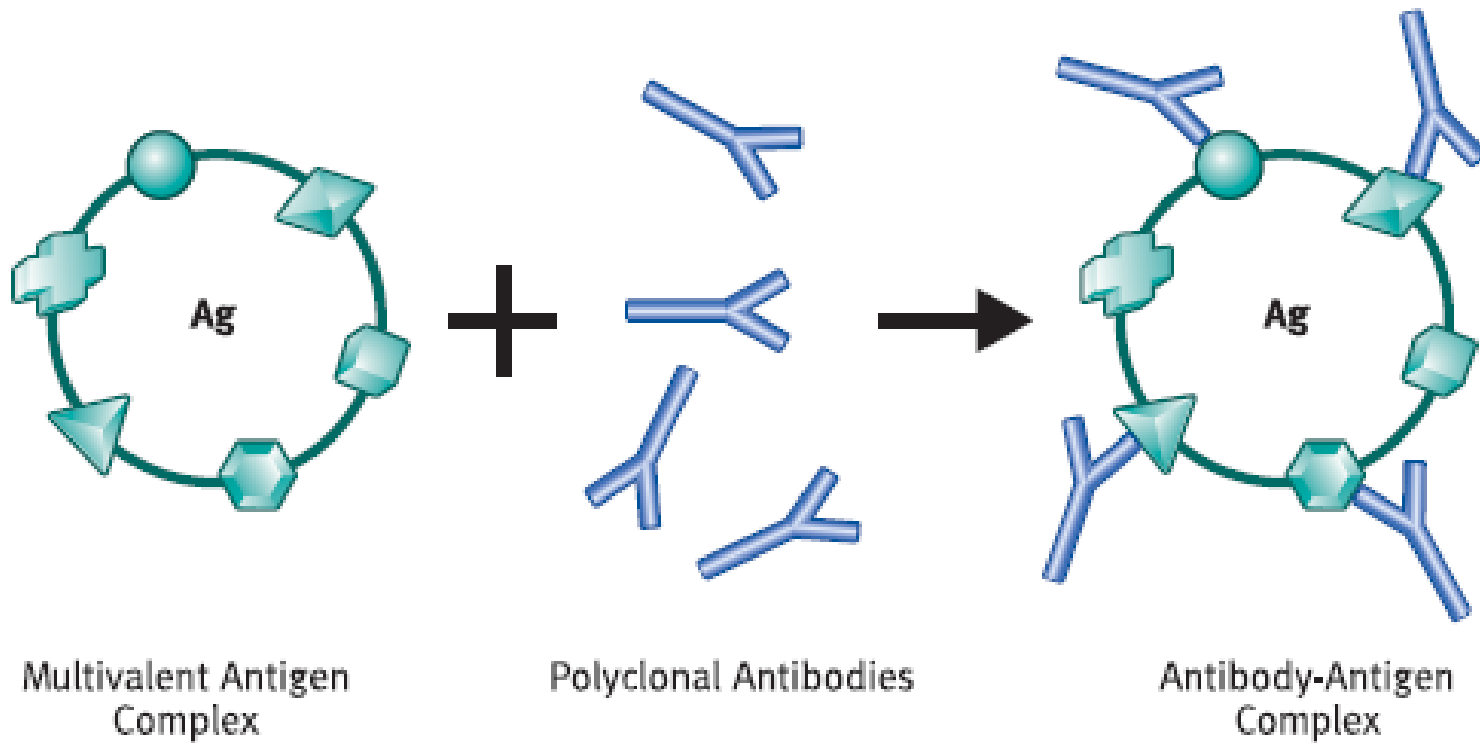
- * Σε μερικές περιπτώσεις η παρουσία των αντισωμάτων αυτών μπορεί να παρεμποδίσει τη σύνδεση μιας απτίνης με το ειδικό προς αυτήν αντίσωμα.
- * Τα αντι-ιδιοτυπικά αντισώματα είναι πολύ σημαντικά διότι σε ορισμένες περιπτώσεις ο παράτοπος τους έχει το ίδιο σχήμα με το αντιγόνο και μπορεί να συνδεθεί και με τον υποδοχέα του αντιγόνου στο κύτταρο με αποτέλεσμα βιολογική δραστικότητα παρόμοια του αντιγόνου.

ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

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

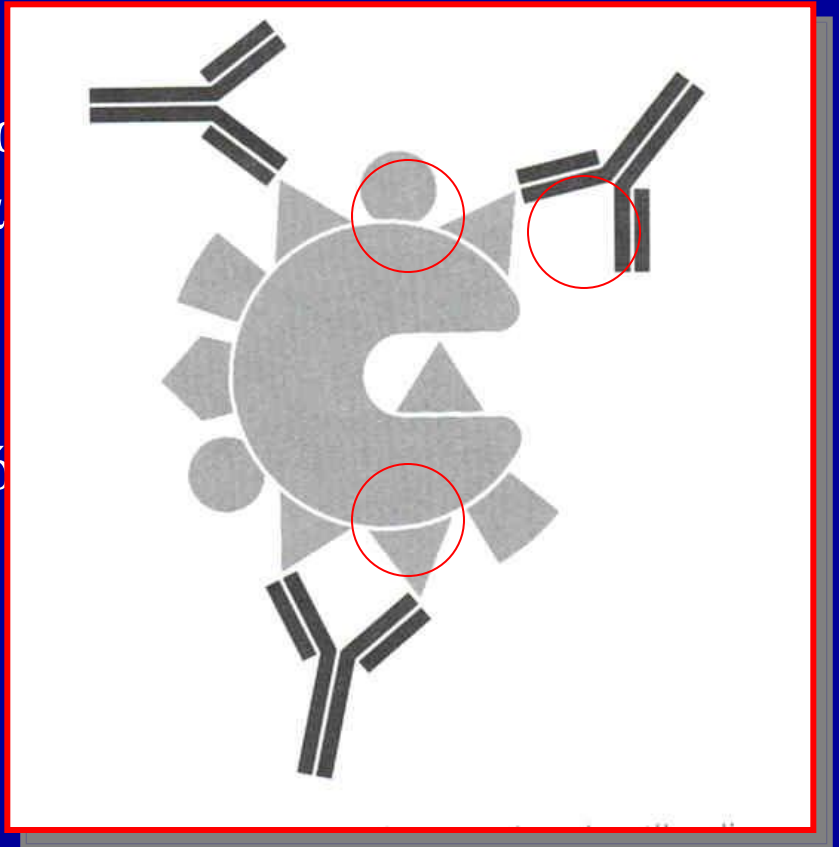


ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

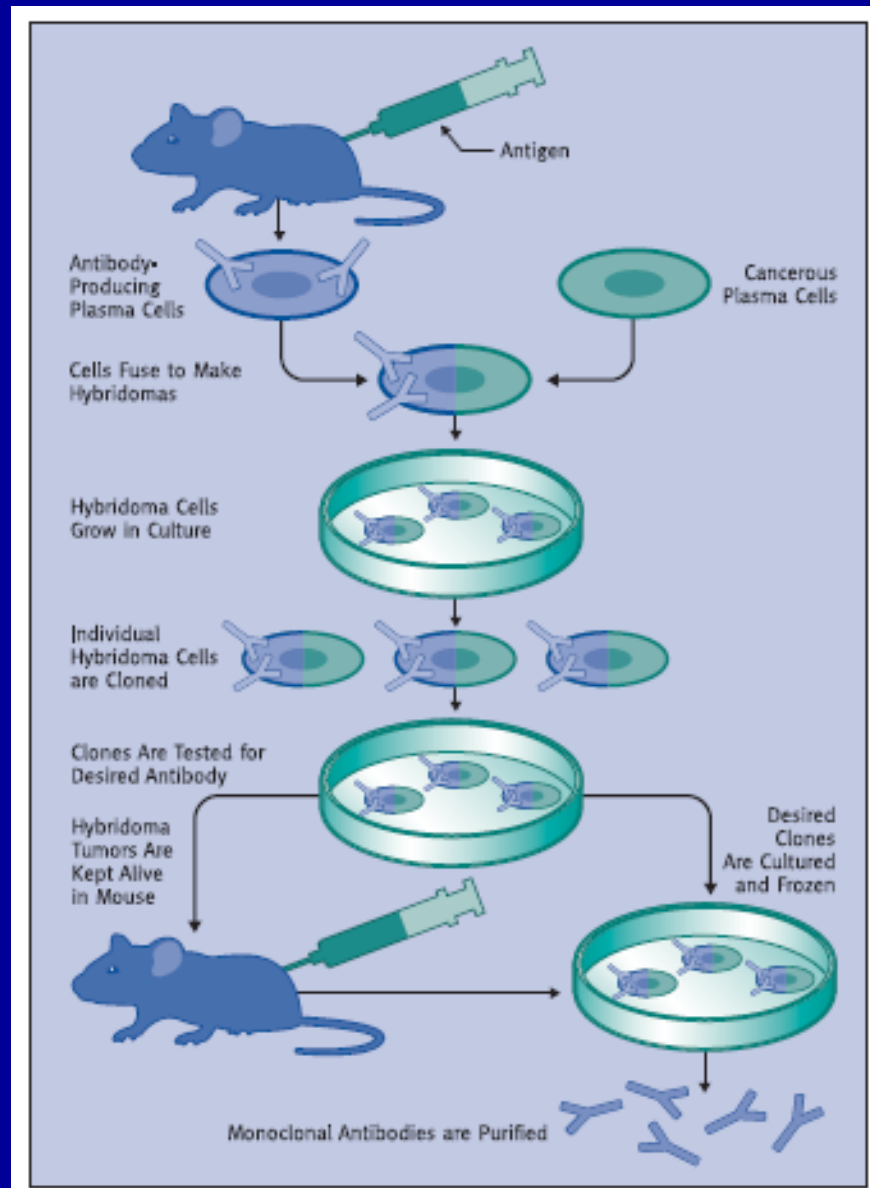


ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

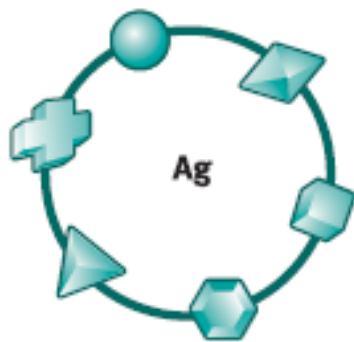
- παράγονται από κλώνους πλασματοκυττάρων και κατά συνέπεια είναι ανοσοχημικά πανόμοια.
- Αντιδρούν με τον ίδιο ειδικό επίτοπο του αντιγόνου.
- Τα πιο πολλά mouse monoclonals



ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ



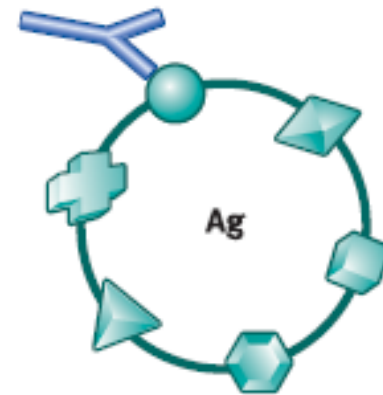
ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ



Multivalent Antigen
Complex



Monoclonal Antibody



Antibody-Antigen

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

- Απόδοση απεριόριστης ποσότητας αντισώματος με σταθερά χαρακτηριστικά
- Χημική συγγένεια και ειδικότητα πλήρως καθορισμένες με δυνατότητα επιλογής ως προς την εφαρμογή
- Δυνατότητα παραγωγής εξαιρετικά ειδικού αντισώματος από μη καθαρό ανοσογόνο
- Διαθεσιμότητα αντισωμάτων έναντι πολλών και διαφορετικών και απομακρυσμένων 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 (non specific binding, NSB)
- Συνήθως δεν παρεμποδίζουν τη βιολογική δραστηριότητα του αντιγόνου (πχ ενζύμου)

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

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 Παραγωγής	< 100\$	10.000\$

Καθαρισμός αντισωμάτων

- Ο καθαρισμός των αντισωμάτων πριν από τη χρήση τους ως αναλυτικών αντιδραστηρίων είναι απαραίτητος διότι:
- Μειώνεται το μη-ειδικό σήμα υποβάθρου (background).
- μπορεί να ακινητοποιηθούν μεγαλύτερες ποσότητες ειδικού αντισώματος στις στερεές επιφάνειες.
- Δεν γίνεται σπατάλη αντιδραστηρίων κατά τη συζευξη των αντισωμάτων με μακρομόρια.

Καθαρισμός αντισωμάτων

- Κυριώτερες μέθοδοι καθαρισμού αντισωμάτων από πολυκλωνικούς αντιορούς
- Μέθοδοι εξαλάτωσης - Na_2SO_4 ή $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Χρωματογραφία ιονανταλλαγής - DEAE-Sephadex
- Χρωματογραφία συγγενείας (Affinity chromatography) - Protein A

Καθαρισμός μονοκλωνικών αντισωμάτων

- 1) Εφαρμόζονται μέθοδοι καθαρισμού πολυκλωνικών (πχ DEAE-Sephadex)
- 2) Υδροξυαπατίτης. Διαχωρίζει τα μονοκλωνικά αντισώματα από την αλβουμίνη, τρανσφερίνη, πρωτεάσες και άλλα αντισώματα που δεν έχουν την ίδια σύσταση της ελαφριάς αλυσίδας.
- 3) Χρωματογραφία συγγενείας (Πρωτεΐνη Α, πρωτεΐνη G).

Χρωματογραφία συγγενείας (Πρωτεΐνη Α, πρωτεΐνη G).

Κύρια χαρακτηριστικά:

- Στήλες με ακινητοποιημένο το ligand.
- Στήλες με ανοσοπροσροφητικά μέσα (πολυ-ακρυλαμίδιο, αγαρόζη, δεξτράνη κ.ά.) για απομάκρυνση των μη επιθυμητών αντισωμάτων. Τα ειδικά αντισώματα περνούν δια μέσου της στήλης
- Εκλούση των ειδικών αντισωμάτων με αποδιατακτικούς παράγοντες (πχ ουρία) ή χαμηλό pH, ή χαιοτροπικούς παράγοντες (NH₄SCN)
- * Κίνδυνος: Περιορισμένη επιτυχία στην έκλουση αντισωμάτων υψηλής συγγενείας ως προς το Ag.

Πρωτεΐνη A (SpA)

- απομονώνεται από το κυτταρικό τοίχωμα του *Staphylococcus aureus*.
- Έχει μεγάλη σταθερά σύνδεσης με το τμήμα Fc των περισσότερων ανοσοσφαιρινών ($K_{SpA-IgG}=10^8 M^{-1}$).
- Διαθέσιμη εμπορικά η ανασυνδυασμένη Prot.A (δίνει ελαφρώς καλύτερα αποτελέσματα)
- Τουλάχιστον δισθενής σύνδεση
- Μπορεί να συνδέσει δύο μη-σχετικά αντισώματα
- Με κατάλληλη ιχνηθέτηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως γενικό αντιδραστήριο ανίχνευσης αντισωμάτων

Ημιποσοτικός φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός αντισωμάτων IgG

- Η απλούστερη μέθοδος για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων είναι η μέτρηση της απορρόφησης στα 278 nm
- Όταν $b=1\text{cm}$, τότε ένα διάλυμα IgG 1mg/mL δίνει απορρόφηση $A_{278\text{nm}}=1.35$
- Με απλή μέθοδο προσεγγίζουμε τη συγκέντρωση του αντισώματος στο δείγμα
- Η παρουσία άλλων πρωτεϊνών παρεμποδίζει

ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ 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

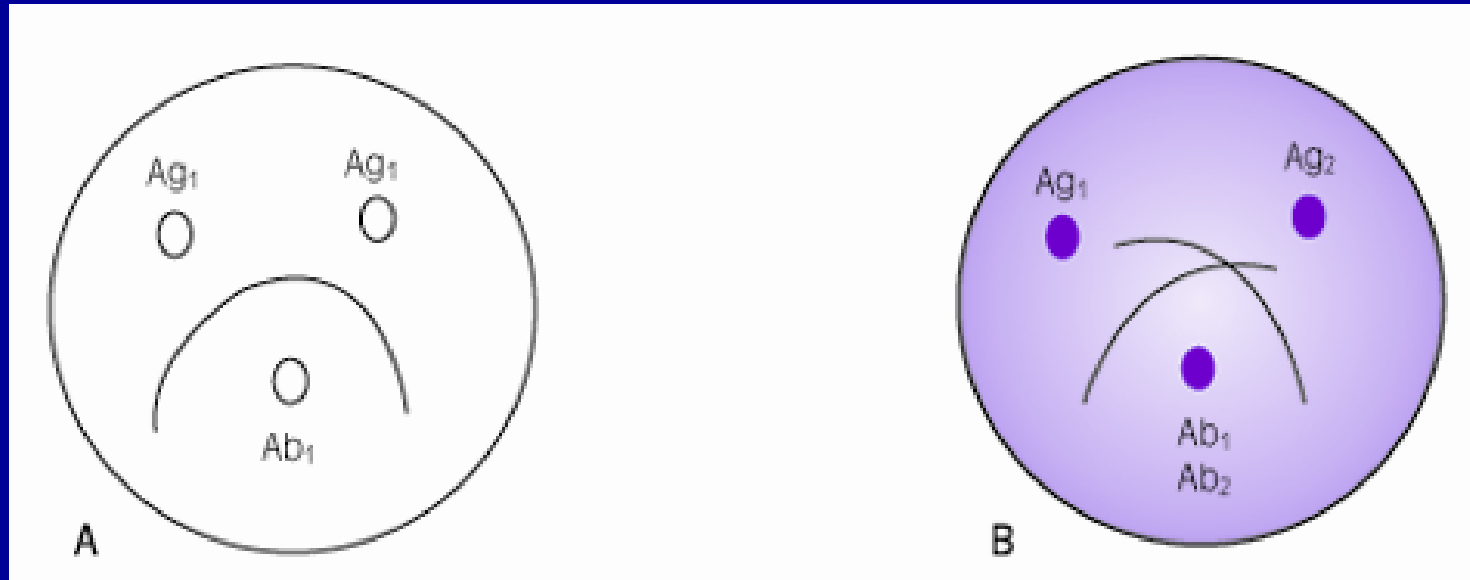
ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

Β. ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

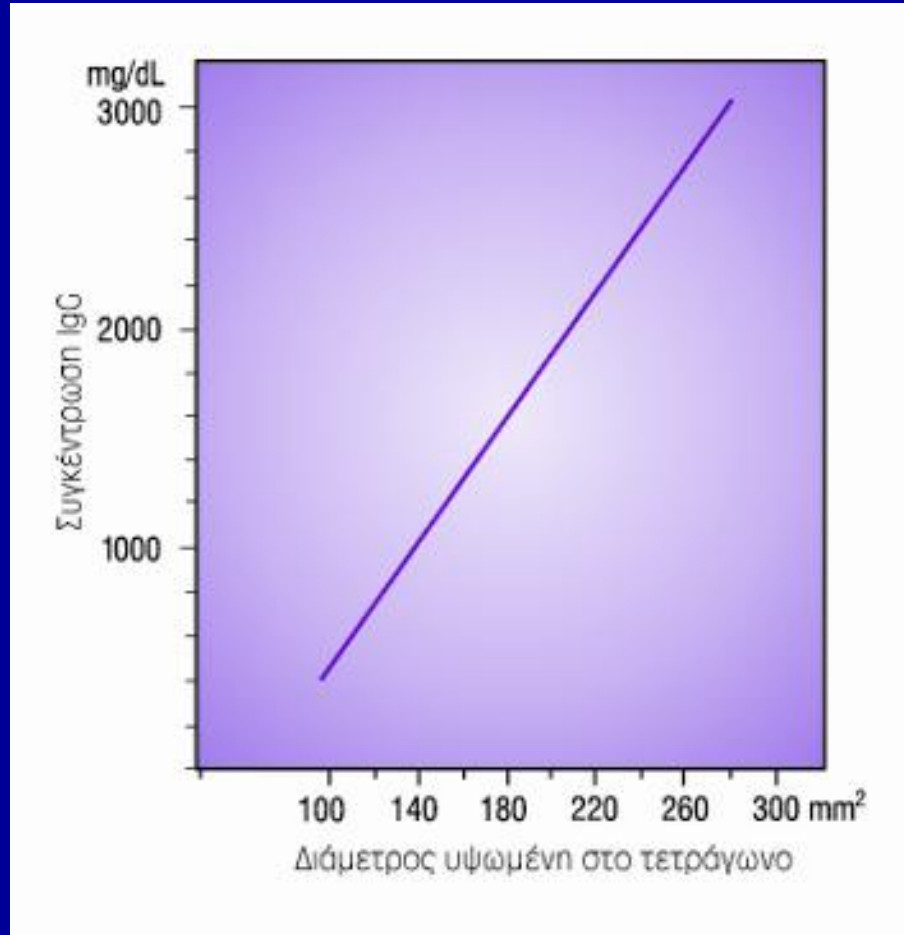
1. ΜΗ-ΙΧΝΗΘΕΤΗΜΕΝΕΣ

- 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)

Απεικόνιση της διπλής ανοσοδιάχυσης σε άγαρ

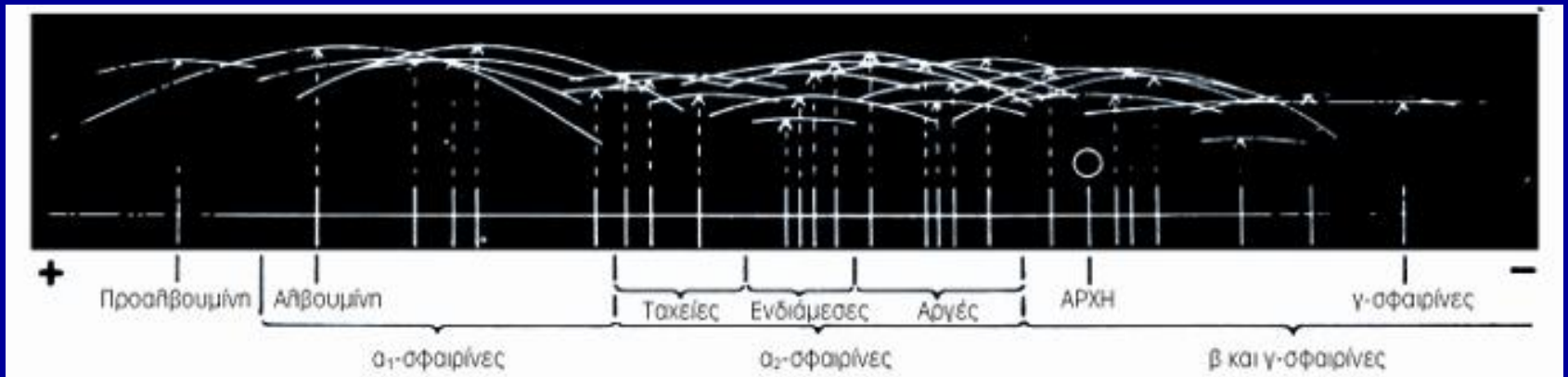


Καμπύλη βαθμονόμησης της IgG με τη μέθοδο της ακτινικής ανοσοδιάχυσης



η συγκέντρωση της IgG παριστάνεται γραφικά σε συνάρτηση με τη διάμετρο του δακτυλίου διάχυσης

Διαγραμματική αναπαράσταση του ανοσοηλεκτροφορητικού πρότυπου ΤΟΥ



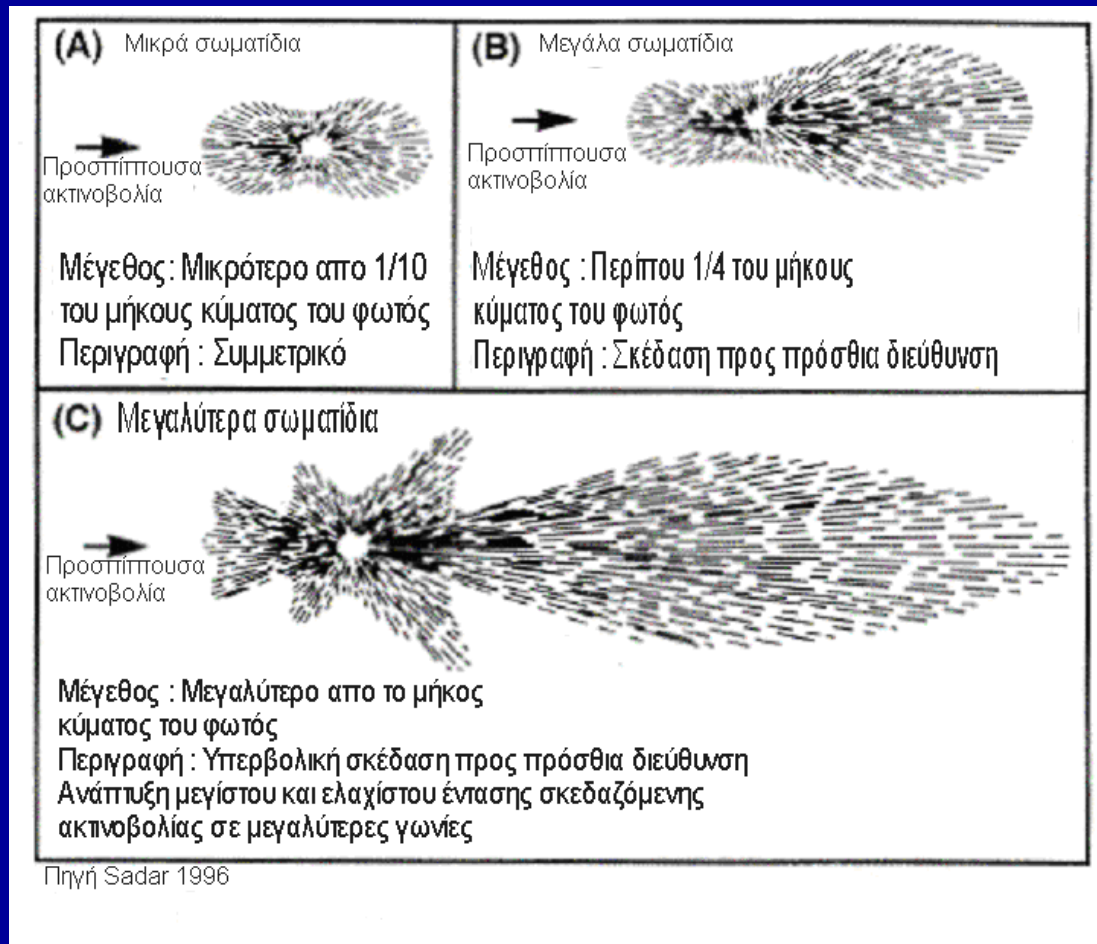
η συγκέντρωση της IgG παριστάνεται γραφικά σε συνάρτηση με τη διάμετρο του δακτυλίου διάχυσης

Νεφελομετρία – Θολωσιμετρία

Βασικές έννοιες και ορισμοί

- Όταν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, όπως το φως, προσπέσει σε ένα σωματίδιο προκύπτει ένα ταλαντούμενο δίπολο.
- Το ταλαντούμενο δίπολο γίνεται πηγή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, επανακτινοβολώντας φως ίδιου μήκους κύματος με το προσπίπτον φως προς όλες τις κατευθύνσεις. Η ακτινοβολία από το παλλόμενο δίπολο ονομάζεται σκεδαζόμενο φως.
- Υπάρχουν πολλοί παράγοντες τους οποίους πρέπει να θεωρήσουμε και να κατανοήσουμε γύρω από τη σκέδαση του φωτός, όπως:
 - τις επιδράσεις του μεγέθους του σωματιδίου
 - την εξάρτηση του μήκους κύματος
 - την απόσταση της παρατήρησης
 - την επίδραση της πόλωσης του προσπίπτοντος φωτός
 - την συγκέντρωση των σωματιδίων
 - το μοριακό τους βάρος.

α) Μέγεθος σωματιδίων



Γωνιακή εξάρτηση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας με το μέγεθος των σωματιδίων

β) Εξάρτηση της σκέδασης ακτινοβολίας από το μήκος κύματος ,

$$I_s/I_0 = 16\pi^2 a \sin^2\theta / \lambda^4 r^2$$

γ) Εξάρτηση της σκέδασης ακτινοβολίας από τη συγκέντρωση και το μοριακό βάρος

$$I_s/I_0 = 4\pi(dn/dc)^2 M c \sin^2\theta / N \lambda^4 r$$

όπου

I_s = ένταση σκεδαζόμενου φωτός

I_0 = ένταση του προσπίπτοντος φωτός

a = πολωσιμότητα του μικρού σωματιδίου

θ = γωνία παρατήρησης

λ = μήκος κύματος προσπίπτοντος φωτός

r = απόσταση του ανιχνευτή από το σημείο σκέδασης

dn/dc = αλλαγή στο δείκτη διάθλασης του διαλύτη με γνώση της αλλαγής της συγκέντρωσης.

Θολωσιμετρία

▪ Η θολερότητα προκαλεί μείωση της έντασης της προσπίπτουσας δέσμης ακτινοβολίας καθώς αυτή περνά διαμέσου ενός διαλύματος σωματιδίων.

▪ Η μέτρηση αυτής της μείωσης στην ένταση της προσπίπτουσας δέσμης ακτινοβολίας που προκαλείται από τη σκέδαση, ανάκλαση και απορρόφηση της ακτινοβολίας ονομάζεται θολωσιμετρία.

▪ Η θολερότητα μπορεί να ορισθεί ως :

$$I=I_0\exp(-bt) \quad \text{ή} \quad t=(1/b)\ln(I_0/I)$$

όπου I = ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας

I_0 = ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας

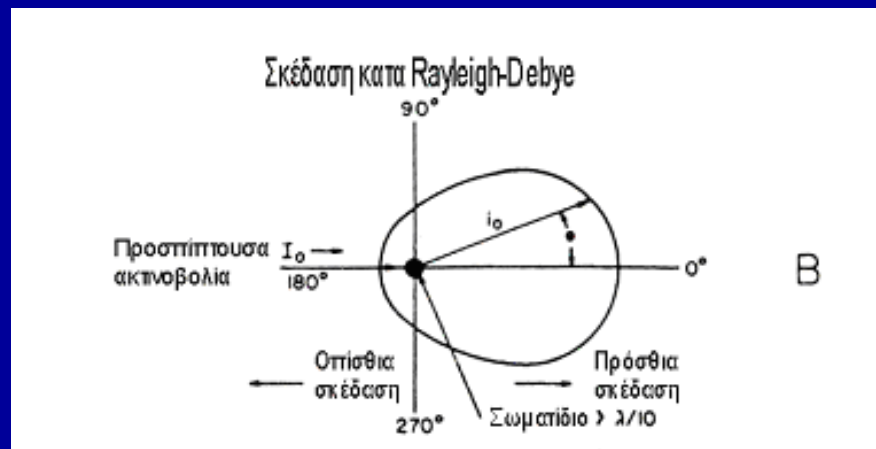
t = θολερότητα

b = διαδρομή της προσπίπτουσας ακτινοβολίας διαμέσου του διαλύματος των σωματιδίων που προκαλούν σκέδαση ακτινοβολίας.

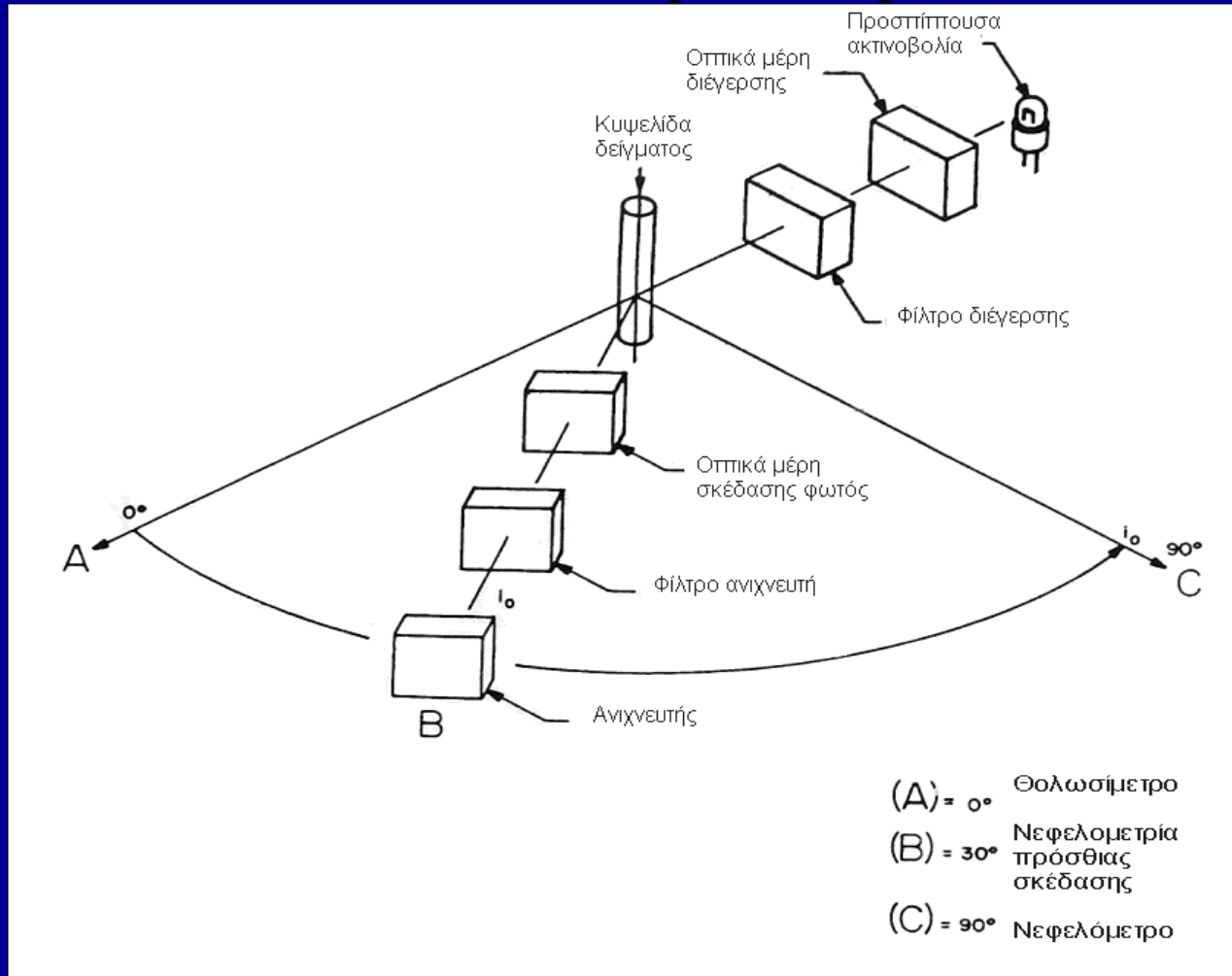
▪ Η θολερότητα μετράται υπό γωνία 180° ως προς την προσπίπτουσα δέσμη ακτινοβολίας.

Νεφελομετρία

- Η νεφελομετρία ορίζεται ως η ανίχνευση της ακτινοβολίας, η οποία σκεδάζεται ή ανακλάται προς τον ανιχνευτή, ο οποίος δεν είναι στην ίδια διεύθυνση με την προσπίπτουσα ακτινοβολία.
- Τα συνήθη νεφελόμετρα μετρούν τη σκεδαζόμενη ακτινοβολία σε δεξιές γωνίες της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.
- Κάποια νεφελόμετρα είναι σχεδιασμένα να μετρούν σκεδαζόμενη ακτινοβολία σε γωνία διαφορετική των 90 μοιρών, ώστε να εκμεταλλευτούν το πλεονέκτημα της αυξημένης έντασης της πρόσθιας σκέδασης, η οποία προκαλείται από μεγάλα σωματίδια (π.χ. ανοσοχημικά συστήματα). Αυτά τα όργανα χρησιμοποιούν την αρχή που παρουσιάζεται στο σχήμα

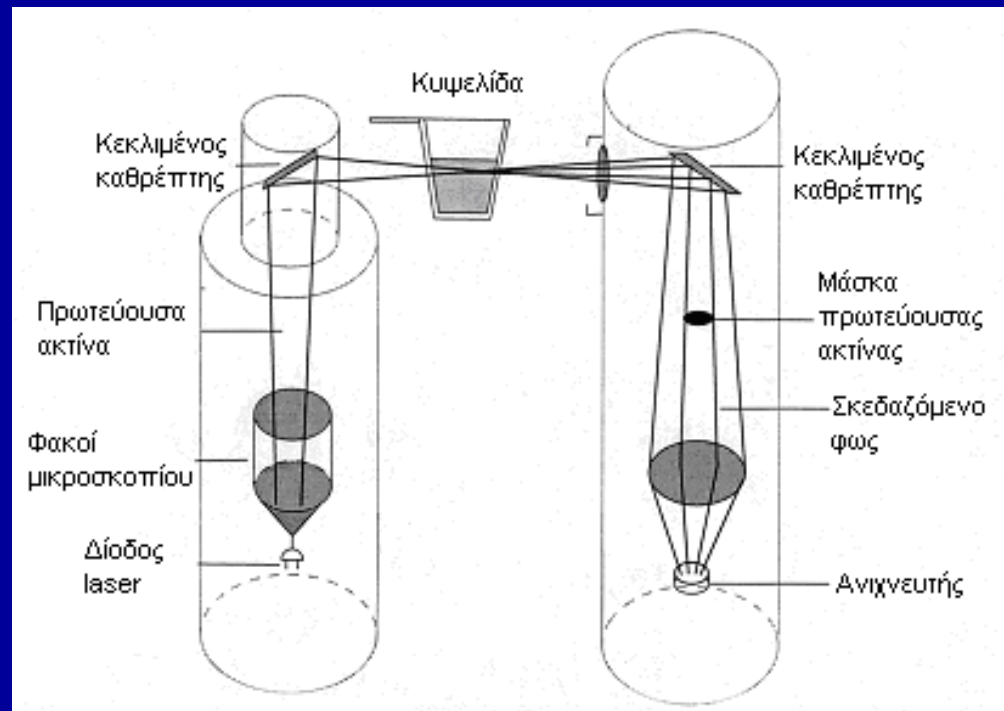


Οργανολογία μέτρησης σκέδασης ακτινοβολίας



Σχηματικό διάγραμμα οργανολογίας για τη μέτρησης της σκέδασης ακτινοβολίας που δείχνει τη θέση των οπτικών οργάνων για θολωσίμετρο (A), για νεφελόμετρο πρόσθιας σκέδασης (B), νεφελόμετρο ορθής γωνίας (C)

Οπτικό σύστημα νεφελομέτρου



Η δίοδος laser εκπέμπει ακτινοβολία μήκους κύματος 830 nm.

Το φως σκεδάζεται από τα σωματίδια στην κυψελίδα αντίδρασης και μετράται υπό γωνία 13° - 24° με ανιχνευτή υβριδικής διόδου.

Η κύρια ακτινοβολία φιλτράρεται, εκείνη η οποία δεν σκεδάστηκε από τα σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος.

Θολωσίμετρο Dimension AR της Dade Behring



Νεφελόμετρο BNProSpec της Dade Behring



ΙΧΝΗΘΕΤΗΜΕΝΟΙ ΑΝΟΣΟΧΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ (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

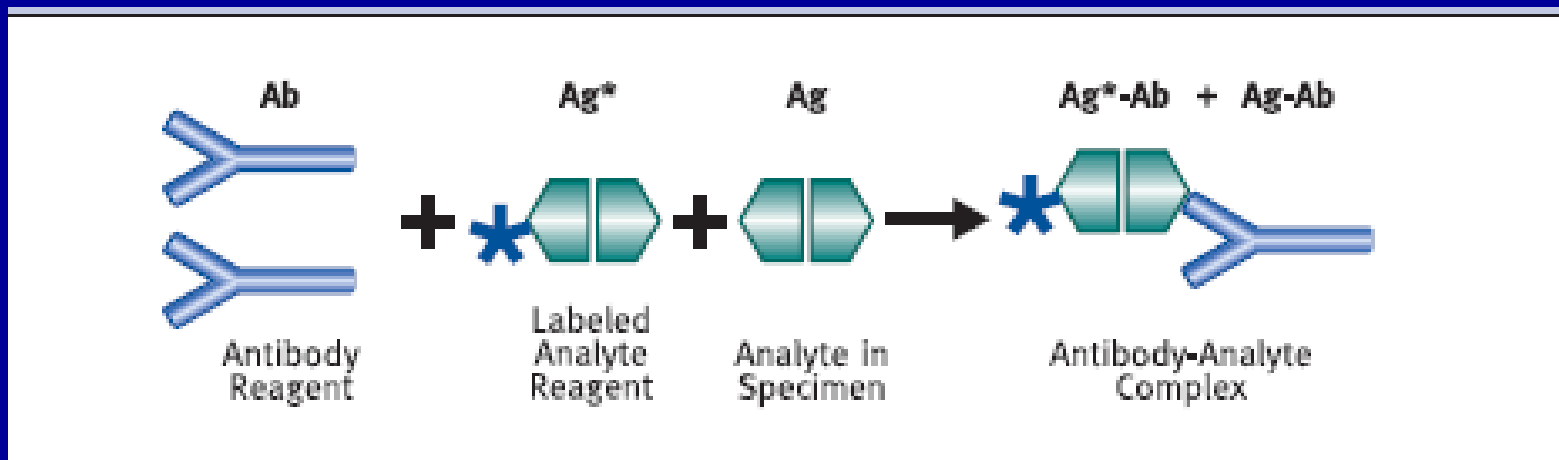
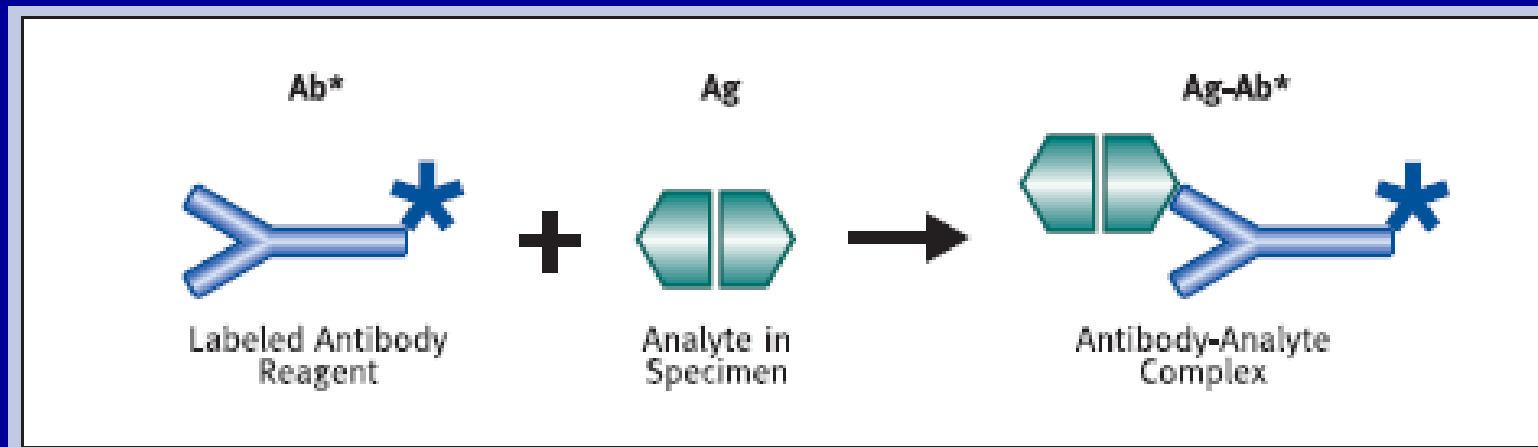
- α) ομογενείς ανοσοχημικοί προσδιορισμοί (homogeneous immunoassays)

* στα συστήματα αυτά δεν απαιτείται διαχωρισμός του μη-αντιδρώντος ιχνηθετημένου Ab* ή Ag* από το μίγμα της αντίδρασης κατά τη μέτρηση του αναλυτικού σήματος.

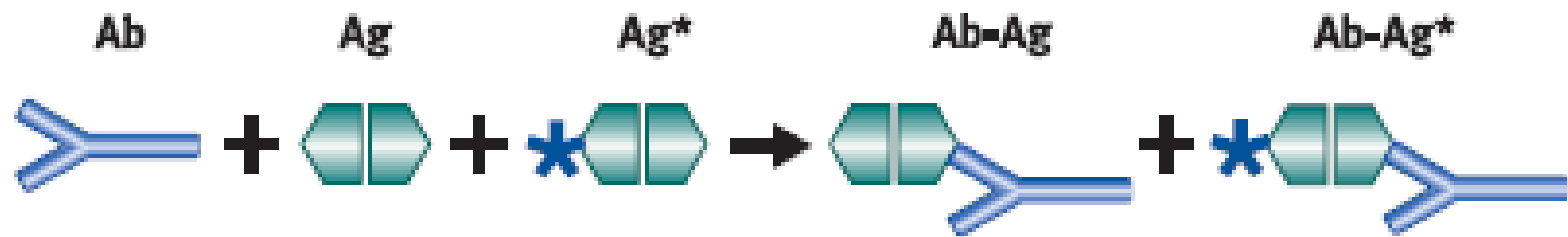
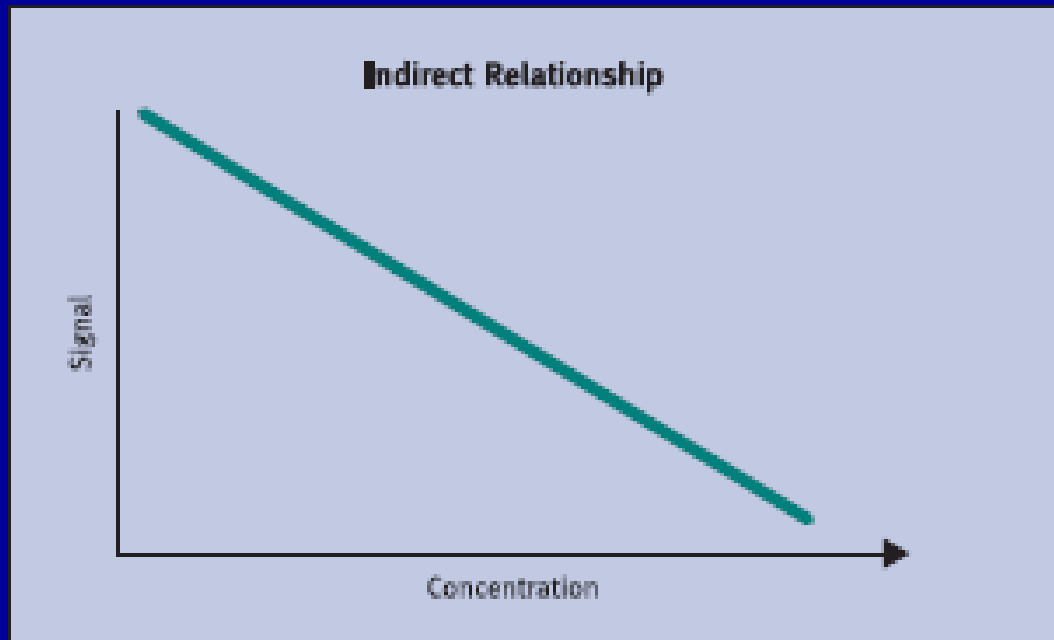
- β) ετερογενείς ανοσοχημικοί προσδιορισμοί (heterogeneous immunoassays)

* 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.

ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΙΧΝΗΘΕΤΗΜΕΝΟΥ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ (COMPETITIVE)



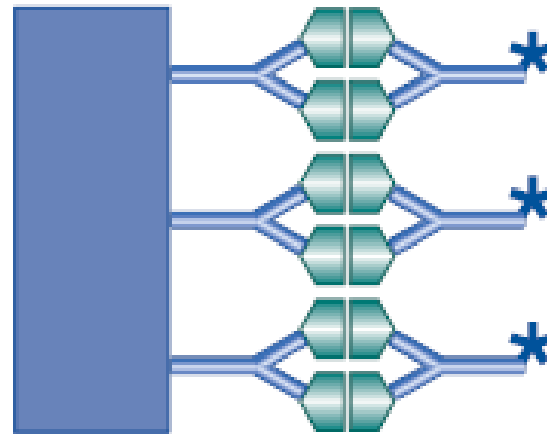
Χαρακτηριστική καμπύλη αναφοράς



ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΙΧΝΗΘΕΤΗΜΕΝΟΥ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΜΗ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ (NON-COMPETITIVE, SANDWICH)

Sandwich Assays: Antibodies bind to two sites on analyte

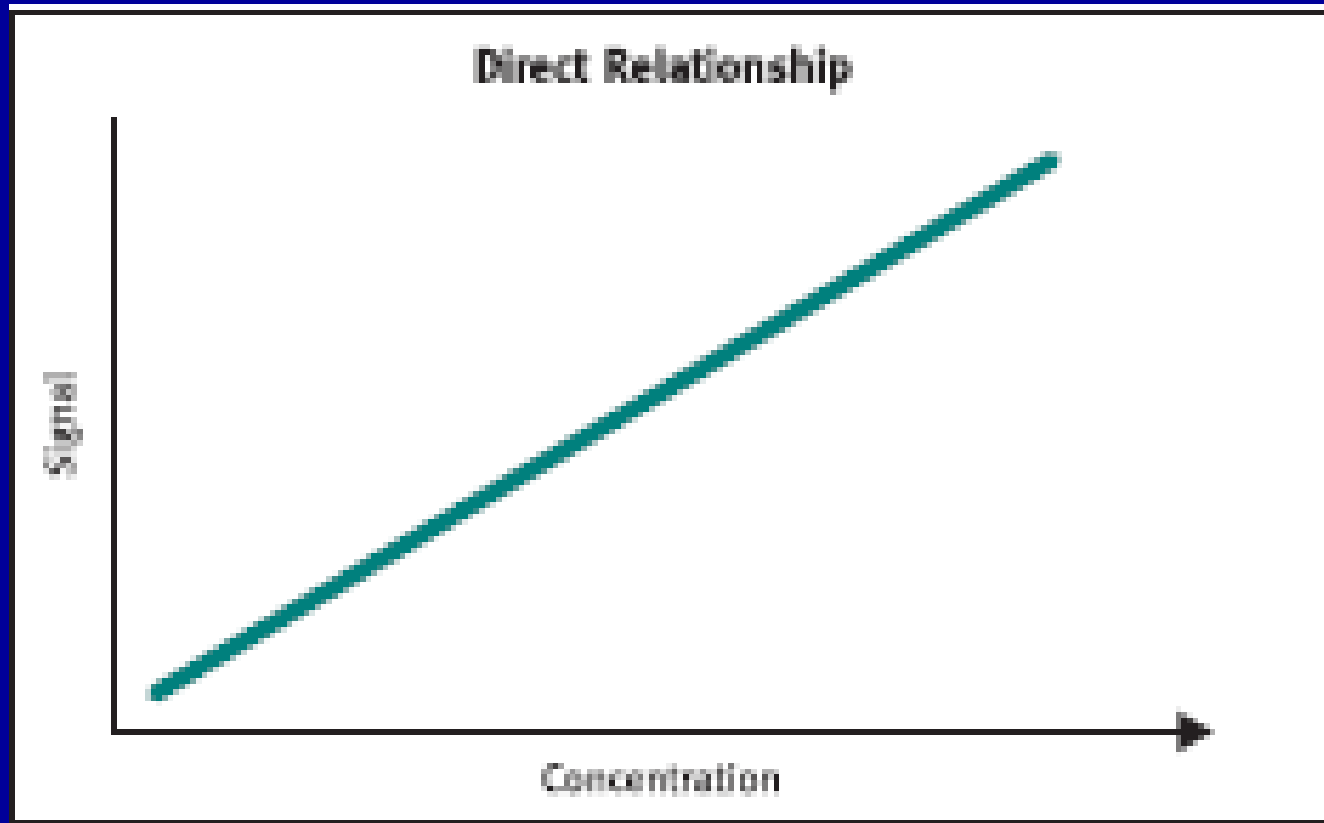
Solid support:
microparticles
beads
microtiter plates



ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΗ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ

(NON-COMPETITIVE, SANDWICH)

Χαρακτηριστική καμπύλη αναφοράς



Ραδιοανοσοπροσδιορισμοί (Radioimmunoassays, RIA)

- Yallow & Berson (1959), ΒΡΑΒΕΙΟ NOBEL 1977
- ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑΘΜΟΣ για την ανάπτυξη των ιχνηθετημένων ανοσοχημικών προσδιορισμών.
- Προσδιορισμός ινσουλίνης στο πλάσμα με τη βοήθεια Ab και ινσουλίνης επισημασμένης με ^{131}J
- Ανταγωνιστικού τύπου προσδιορισμός
- Η προς προσδιορισμό ουσία ανταγωνίζεται την αντίστοιχη επισημασμένη για κατάληψη περιορισμένου αριθμού θέσεων στο αντίσωμα
- Η ποσότητα της επισημασμένης ουσίας είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκεντρώσεως της προς προσδιορισμό ουσίας

Ραδιοανοσοπροσδιορισμοί (Radioimmunoassays, RIA)

- Η επιτυχία των RIA οφείλεται:
- Εξαιρετική ευαισθησία
- Εξαιρετική ειδικότητα
- Ευκολία στην εκτέλεση
- Δυνατότητα εφαρμογής προσδιορισμού σε τεράστια ποικιλία ουσιών όπως ορμονών, φαρμάκων, ενζύμων, κ.ά.

ΡΑΔΙΟΙΧΝΗΘΕΤΕΣ

- Ραδιοϊσότοπο επιλογής----> ^{125}J
- εκπομπή γ -ακτινοβολίας (20-80 KeV)
- σχετικά μικρός χρόνος ημιζωής , $T_{1/2}=60$ μέρες
- ικανότητα σχηματισμού πλήθους ενώσεων λόγω ευρέως φάσματος καταστάσεων οξείδωσης του J
- εισαγωγή ατόμου J δεν επιφέρει δραματικές αλλαγές στη στερεοδιάταξη της πρωτεϊνης
- ο δεσμός J-C έχει ανάλογη πολικότητα του δεσμού C-C

ΡΑΔΙΟΙΧΝΗΘΕΤΕΣ

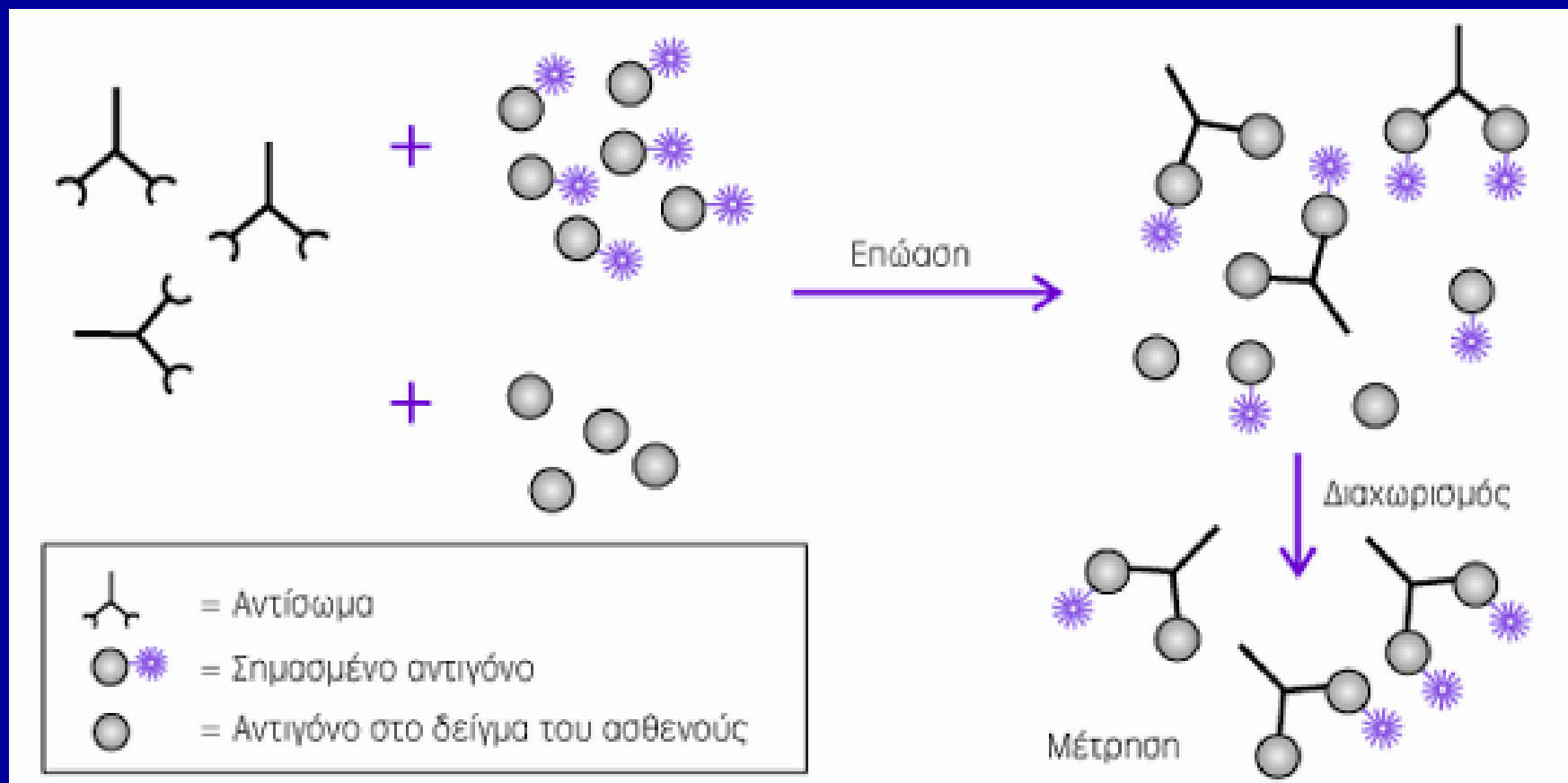
Ισοτοπικοί Ιχνηθέτες

Ισότοπο	Χρόνος ημιζωής	Ενέργεια
^{125}I	60,2 ημέρες	20 - 80 keV, γ-ακτινοβολία
^{32}S	87,9 ημέρες	167 keV, β-σωματίδια
^{14}C	5760 έτη	158 keV, β-σωματίδια
^3H	12,3 έτη	18 keV, β-σωματίδια

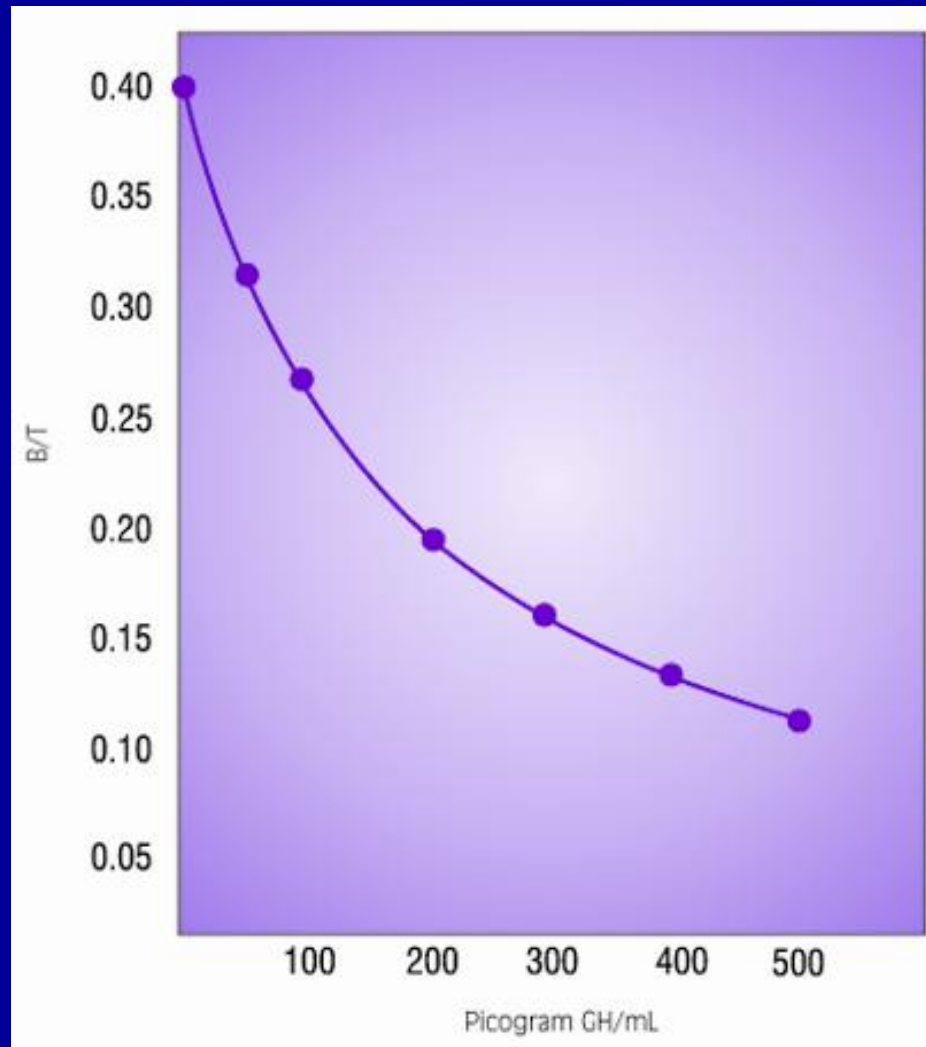
ΜΕΘΟΔΟΙ ΡΑΔΙΟΙΩΔΙΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

- Προσβολή των ιόντων φαινοξειδίου της τυροσίνης, ενσωμάτωση του ^{125}I σε ο-θέση, μέσω ηλεκτρονιόφιλης υποκατάστασης.
- α) μέθοδος χλωραμίνης T
- β) μέθοδος ιωδογόνου
- γ) ενζυμική μέθοδος
- δ) ραδιοιωδίωση με προσθετική ομάδα

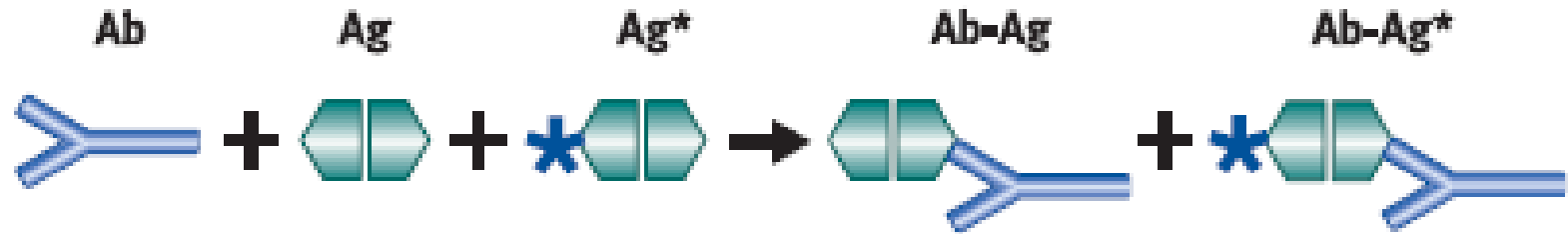
ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ RIA ραδιοανοσολογική μέθοδος (ετερογενής)



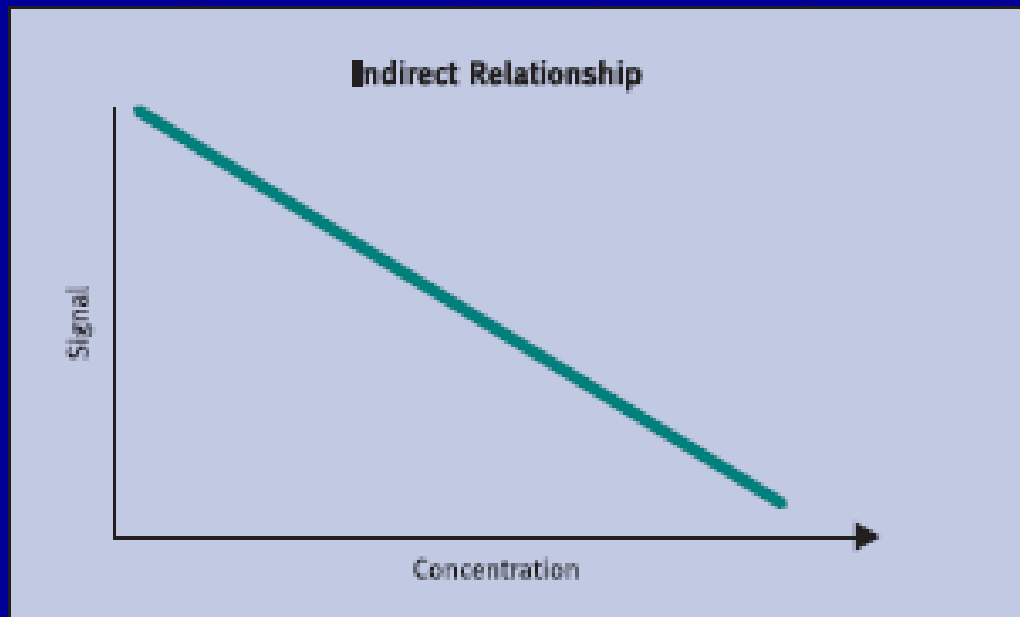
Πρότυπη καμπύλη για τον προσδιορισμό της αυξητικής ορμόνης με ραδιοανοσολογική μέθοδο



ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ RIA



Χαρακτηριστική καμπύλη αναφοράς



ΑΝΟΣΟΡΑΔΙΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ

(Immunoradiometric assays, IRMA)

- Miles & Hales (1968)
- Μη-ανταγωνιστικού τύπου
- Το αντίσωμα βρίσκεται σε περίσσεια και μεταφέρει τον ιχνηθέτη-ισότοπο
- Η ποσότητα του ιχνηθετημένου αντισώματος είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης της προς προσδιορισμό ουσίας

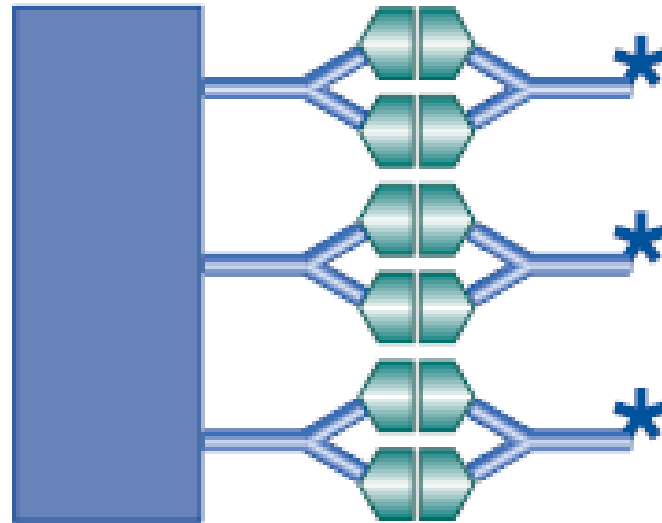
Κύρια πλεονεκτήματα έναντι των RIA:

- α) καλύτερη ευαισθησία
- β) Ταχύτερες αντιδράσεις (υψηλότερη συγκέντρωση αντισώματος)
- γ) καλύτερη αξιοποίηση των μονοκλωνικών αντισωμάτων

ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΙΡΜΑ ΤΥΠΟΥ Sandwich

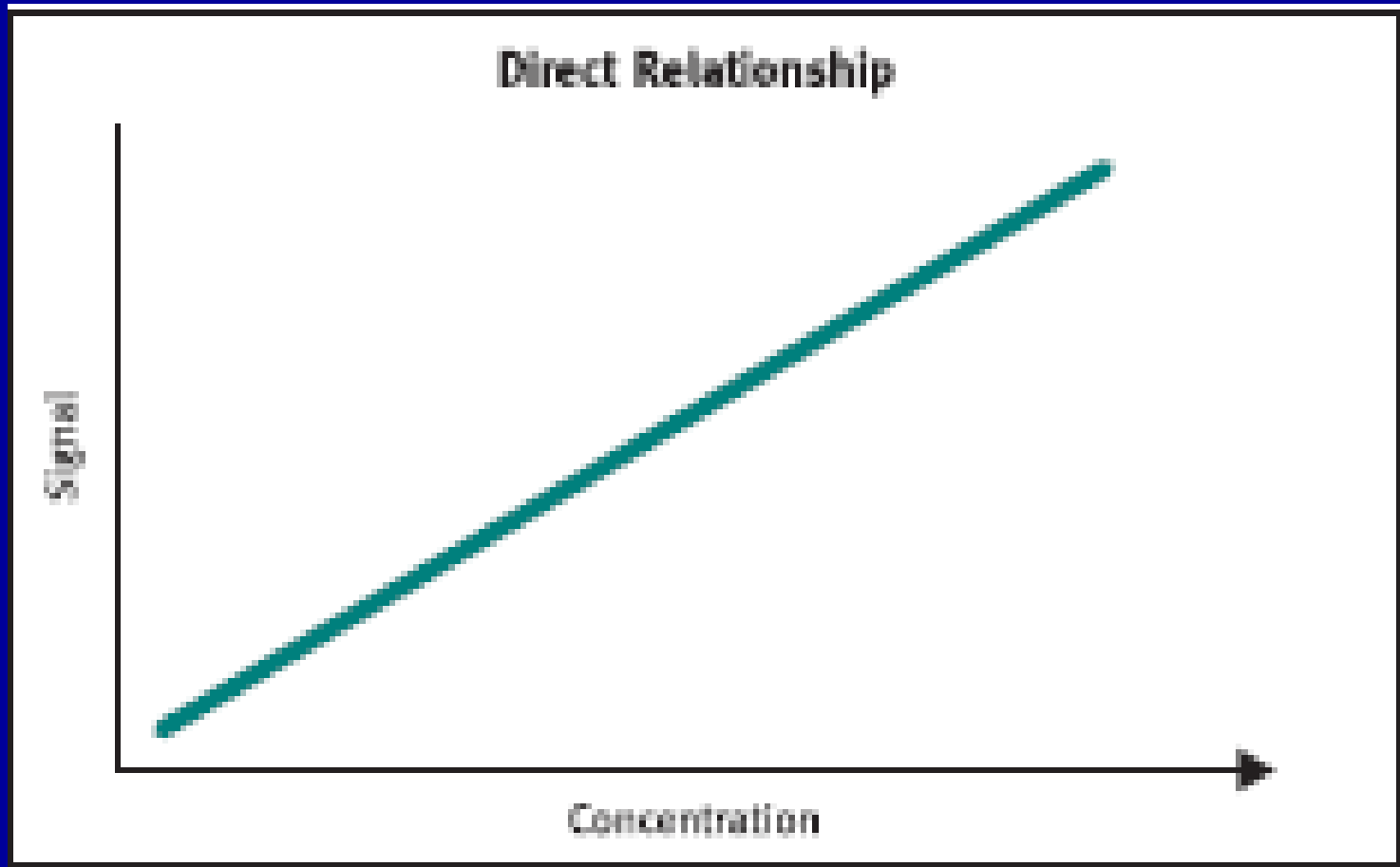
Sandwich Assays: Antibodies bind to two sites on analyte

Solid support:
microparticles
beads
microtiter plates



απαραίτητη προϋπόθεση η ύπαρξη στο
μόριο δύο απομακρυσμένων επιτόπων

Χαρακτηριστική καμπύλη αναφοράς

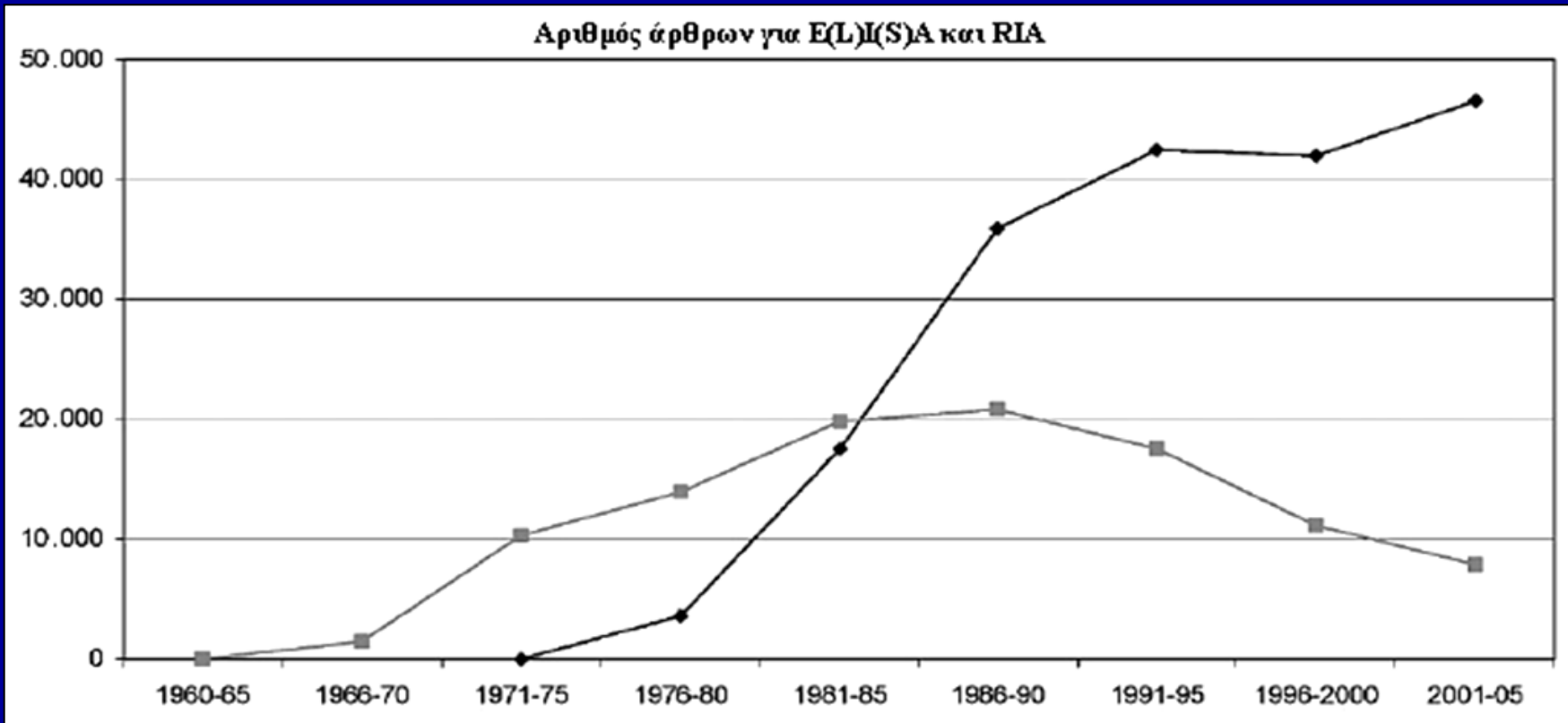


ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ (enzyme immunoassays, EIA)

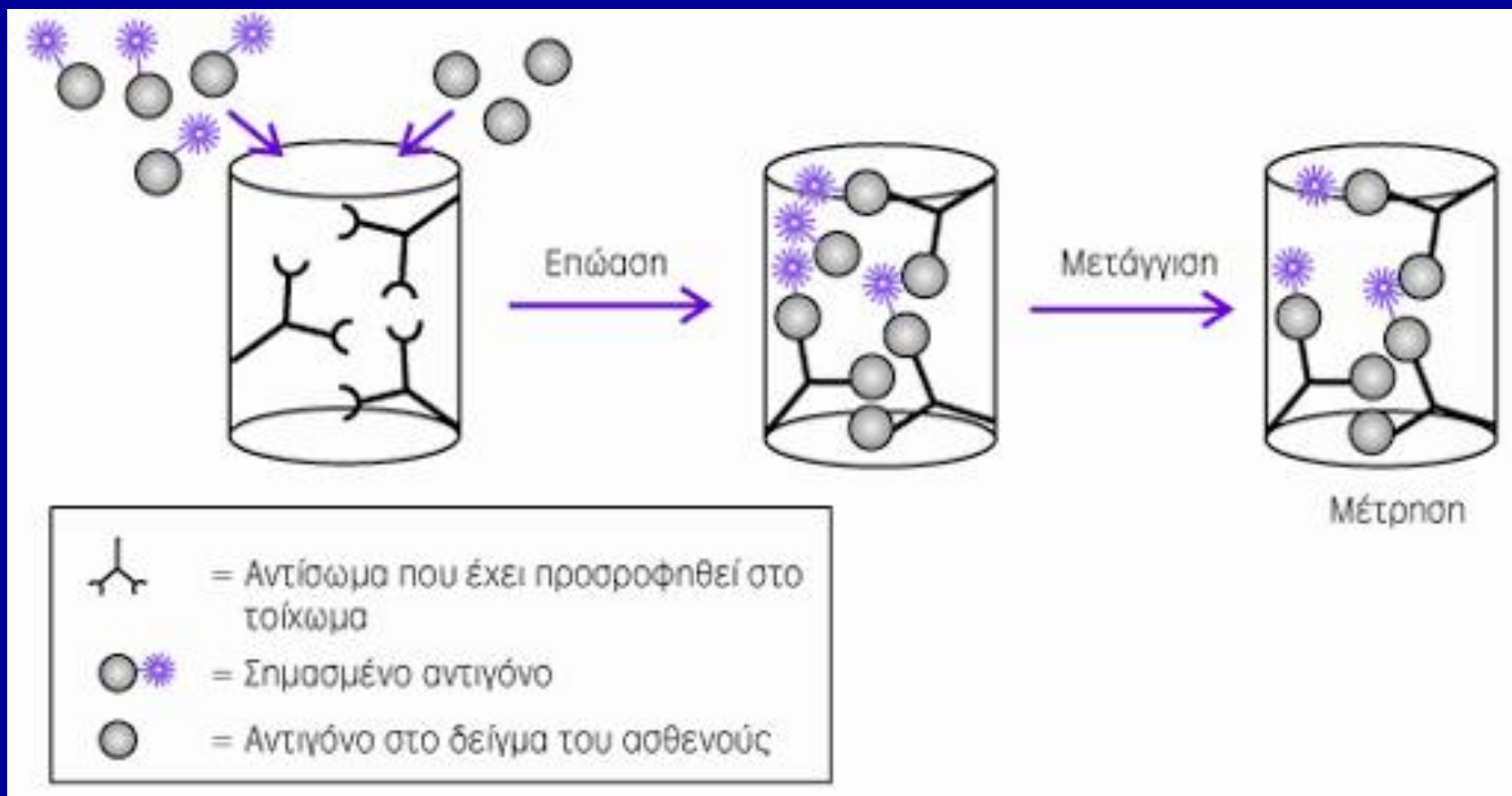
- *Ιστορική αναδρομή*
- Avrameas & Uriel, 1966, Ινστιτούτο Pasteur
- Nakane & Pierce, 1966, USA
- Σήμανση αντισωμάτων με υπεροξειδάση για ανίχνευση ανοσοσυμπλεγμάτων και κυτταρικών συστατικών

Αριθμός δημοσιευμένων άρθρων ανά πενταετή περίοδο για τις ELISA και RIA από το 1960 έως το 2005

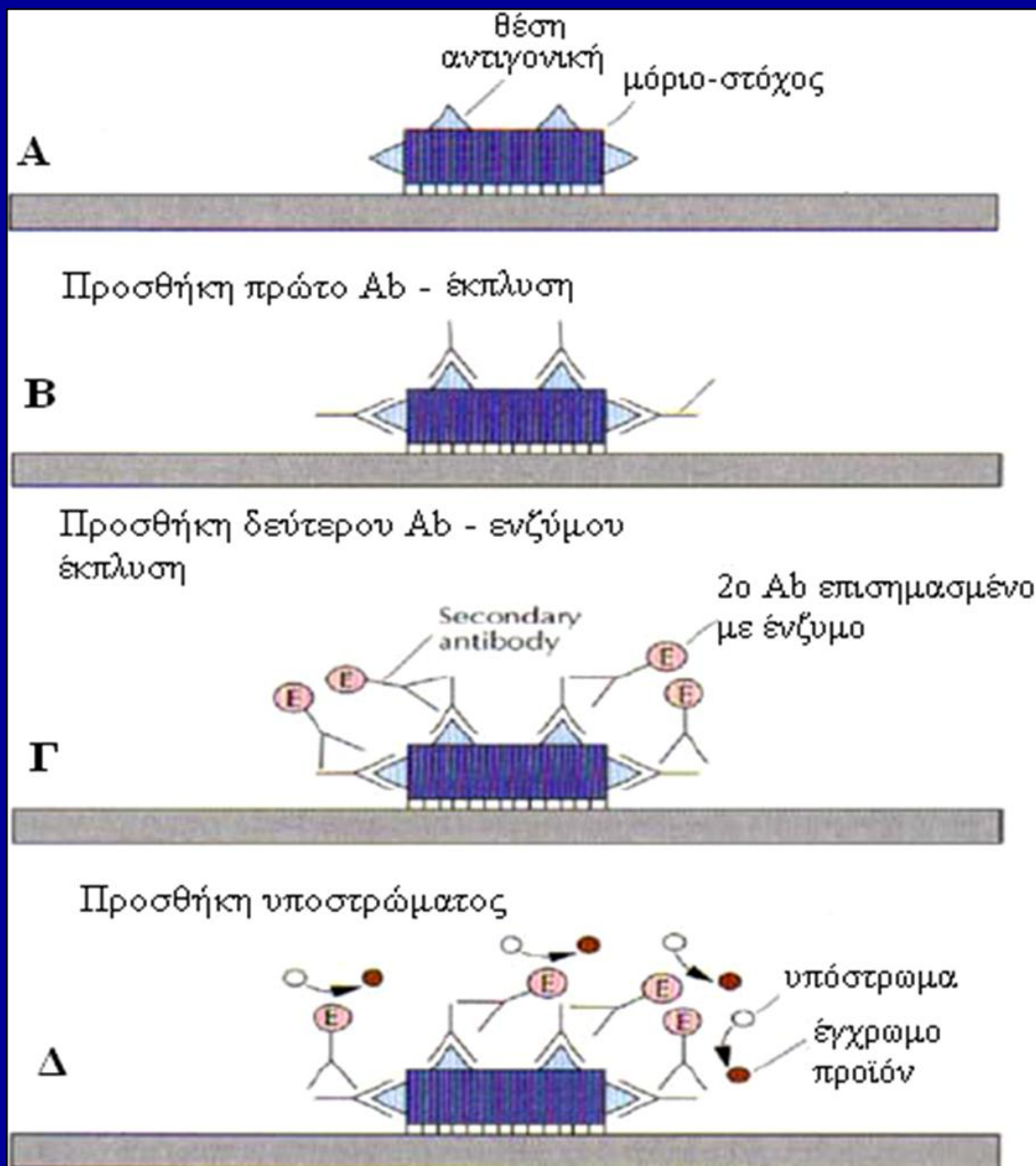
◆: EIA/ELISA, ■: RIA



Μέθοδος ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης (ELISA) με δοκιμαστικό σωληνάριο με εσωτερική επίστρωση αντισώματος

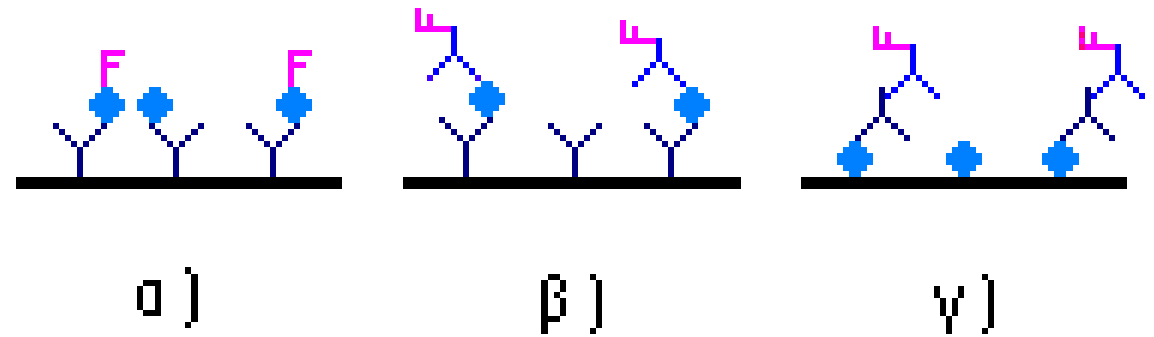


Σχηματική παράσταση των σταδίων μιας τυπικής ELISA



Τύποι ELISA

Υ : 1ο αντίσωμα
Υ : 2ο αντίσωμα
● : αντιγόνο
F : ένζυμο

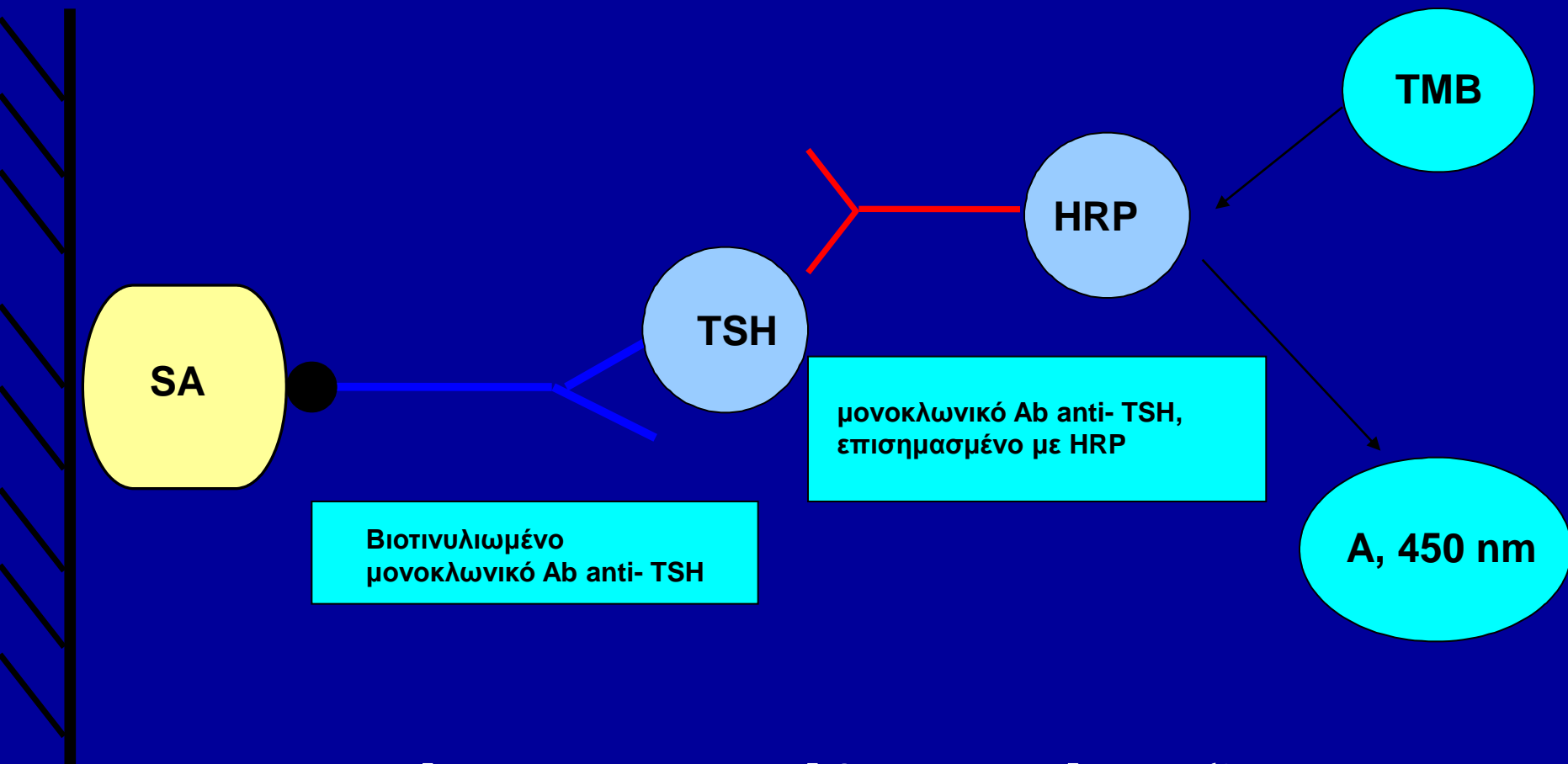


α) Συναγωνιστική ELISA με ένα αντίσωμα,

β) sandwich ELISA,

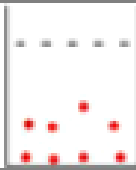
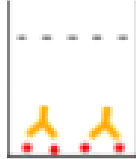
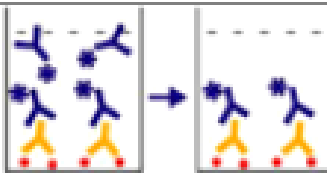
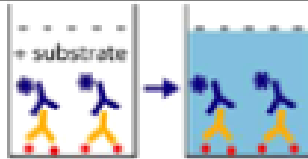
γ) έμμεση (indirect) ELISA.

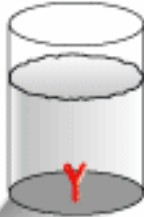
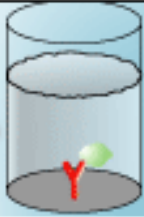


ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΙΡΜΑ ΤΥΠΟΥ Sandwich



απαραίτητη προϋπόθεση η ύπαρξη στο
μόριο δύο απομακρυσμένων επιτόπων

Σχηματική παράσταση των σταδίων της έμμεσης ELISA

1.	Πρόσδεση του αντιγόνου του δείγματος στην μικροκυψελίδα
	
2.	Έκπλυση
3.	Επώαση με το 1 ^ο αντίσωμα
	
4.	Έκπλυση
5.	Επώαση με 2 ^ο αντίσωμα συνυδεδεμένο με ένζυμο (*)
	
6.	Έκπλυση
7.	Επώαση με το υπόστρωμα του ενζύμου και ανάπτυξη του χρώματος
8.	

1.	Δέσμευση του 1 ^{ου} (A) αντισώματος στην μικροκυψελίδα
	
2.	Εκπλυση
3.	Επώαση με δείγμα που περιέχει το αντιγόνο
	
4.	Εκπλυση
5.	Επώαση με το 1 ^ο (B) αντίσωμα
	
6.	Εκπλυση
7.	Επώαση με το 2 ^ο αντίσωμα σημειωμένο με ένζυμο
	
8.	Επώαση με το υπόστρωμα του ενζύμου και ανάπτυξη του χρώματος

Σχηματική παράσταση των σταδίων ELISA τύπου sandwich

Μη ισοτοπικοί ιχνηθέτες

Ένζυμα	Φθορίζουσες ουσίες
Αλκαλική φωσφατάση	Ισοθειοκυανικός εστέρας της φλουορεσκείνης
Υπεροξειδάση της ραπαγίδας (HRP)	Ροδαμίνη
β-D-γαλακτοσιδάση (β-GAL)	Γαλακτοσυλ-ουμπελλιφερόνη
Οξειδάση της γλυκόζης (GOD)	Χημειοφωταυγείς ουσίες
Άκετυλοχολινεστεράση	Λουμινόλη
Λυσοζύμη	Εστέρες της ακριδίνης

ΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΕΝΖΥΜΟΥ-ΙΧΝΗΘΕΤΗ

- Υψηλή ειδική ενεργότητα (specific activity)
- Μεγάλη σταθερότητα σε συνθήκες φύλαξης αλλά και ανάλυσης
- Διαθέσιμο καθαρό ένζυμο σε χαμηλό κόστος και αναπαραγωγίμη 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

ΚΥΡΙΩΤΕΡΑ ΕΝΖΥΜΑ-ΙΧΝΗΘΕΤΕΣ ΣΤΟΥΣ ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΟΥΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥΣ

• ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ

-
- υπεροξειδάση
- β-γαλακτοσιδάση
- αλκαλική φωσφατάση
- ουρεάση
- οξειδάση της γλυκόζης
- γλυκοαμυλάση
- ακετυλοχολινεστεράση

ΟΜΟΓΕΝΕΙΣ

- β-γαλακτοσιδάση
- λυσοζύμη
- αφυδρογονάση της 6-
φωσφο-γλυκόζης
- ριβονουκλεάση

ΚΥΡΙΩΤΕΡΑ ΕΝΖΥΜΑ-ΙΧΝΗΘΕΤΕΣ ΣΤΟΥΣ ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΟΥΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥΣ

Ένζυμο	Είδος ενζύμου	Πηγή ενζύμου	Βέλτιστο pH	Ειδική δραστηριότητα (U/mg, 37° C)
<u>Υπεροξειδάση της ραπανίδας</u>	<u>Οξειδάση</u> EC 1.11.1.7	Ρεπάνια	5 – 7	4500
<u>Αλκαλική φωσφατάση</u>	<u>Υδρολάση</u> EC 3.1.3.1	Στομάχι μωσχαριού	9 – 10	1000
<u>β-Γαλακτοσιδάση</u>	<u>Υδρολάση</u> EC 3.2.1.23	<u>E. coli</u>	6 – 8	600

1) Υπεροξειδάση του ρεπανιού (horse radish peroxidase, HRP)

Οξειδάση, EC 1.11.1.7

* βέλτιστο pH 5-7

* Μοριακό βάρος ... 44000 Da

* Ειδική ενεργότητα ... 4500 U/mg

* Ειδική αντίδραση

HRP



όπου DH υπόστρωμα δότης υδρογόνων

κυριότερα υποστρώματα

❖ o-methoxyphenol (guaiacol)

❖ o-phenylenediamine (o-PD) ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΟ!

❖ 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine (TMB)

❖ 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline sulfonate-6) (ABTS)

❖ 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTS)

❖ p-hydroxyphenylacetic acid (HPAA), κ.ά.

2) Αλκαλική φωσφατάση (alkaline phosphatase, ALP)

- * Υδρολάση, EC 3.1.3.1
- * Βέλτιστο pH 9-10
- * Μοριακό βάρος ... 85000 Da
- * Ειδική ενεργότητα ... 1000-2000 U/mg
- * Ειδική αντίδραση: Υδρόλυση φωσφορικών εστέρων π.χ.
 - κυριότερα υποστρώματα:
 - p-nitrophenyl- phosphate (pNP)
 - 4-methyl-umbelliferone phosphate (MUP)

3) β - Γαλακτοσιδάση (β -galactosidase)

- Υδρολάση, EC 3.2.1.23
- βέλτιστο pH 6-8
- Ειδική ενεργότητα ...600 U/mg
- Μοριακό βάρος 465000 Da
- Ειδική αντίδραση: υδρόλυση γαλακτοσιδών
- κυριότερα υποστρώματα:
 - o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (o-NPG)
 - chlorophenolic red- β -D-galactopyranoside (CRPG)
 - 4-methyl-umbelliferyl β -D-galactopyranoside (MUG)

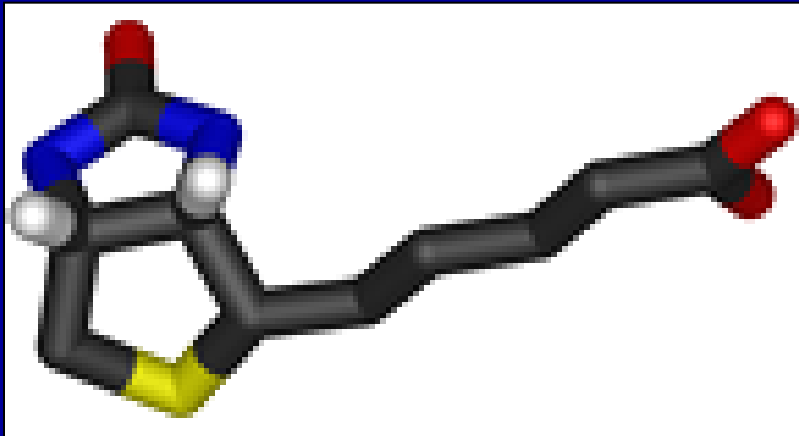
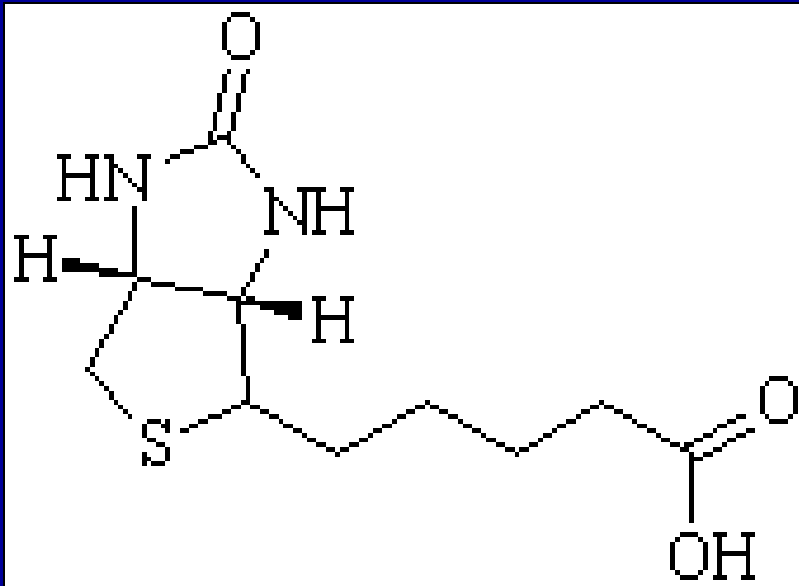
ΤΡΟΠΟΙ ΣΥΖΕΥΞΗΣ ΕΝΖΥΜΟΥ - ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

A) Με ομοιοπολικό δεσμό

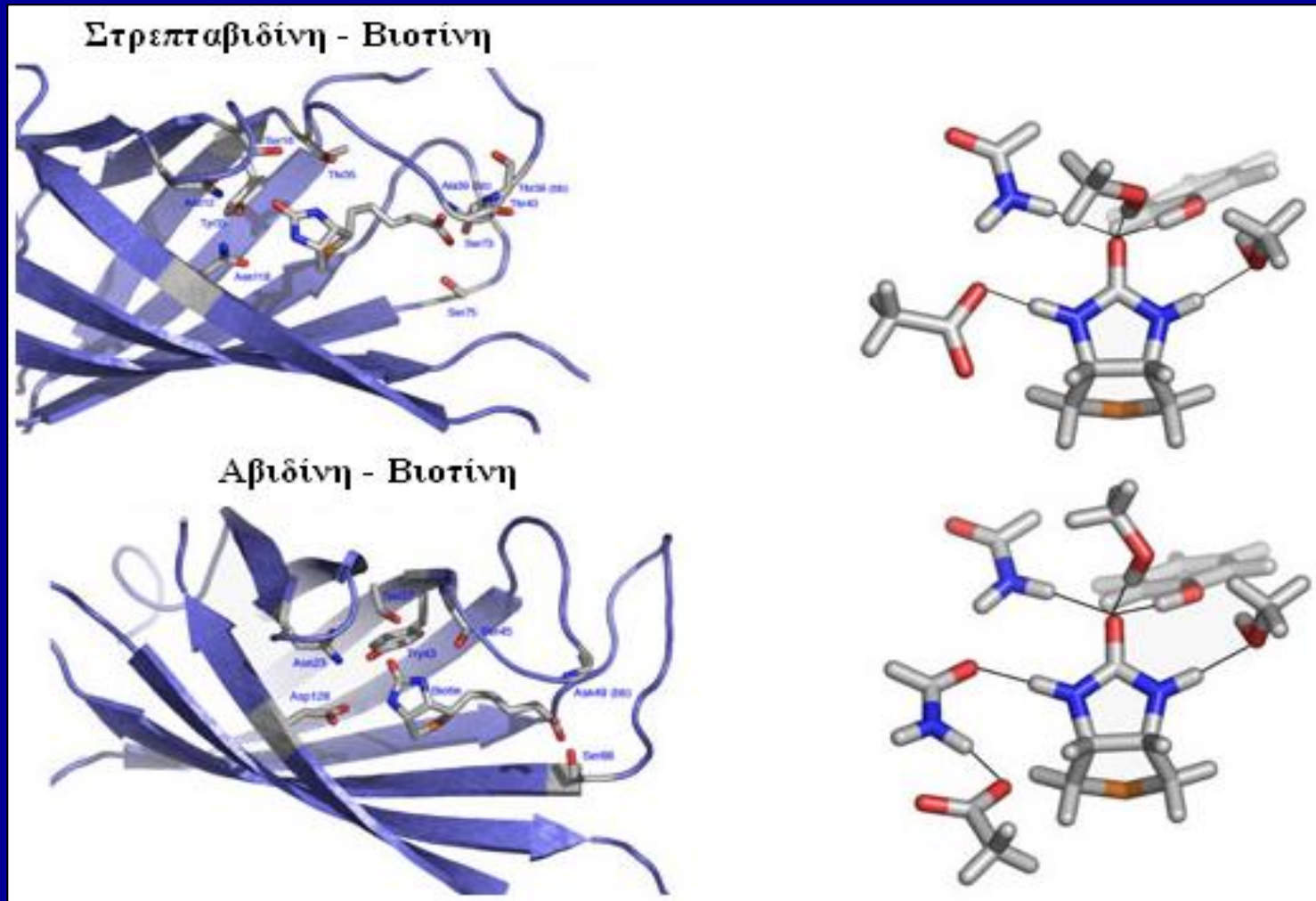
- Κυριότερα αντιδραστήρια σύζευξης
- Υπεριωδικό νάτριο
- Γλουταραλδεύδη
- π-βενζοκινόνη
- Μαλειμίδια (maleimides)
- N-υδροξυ-ηλεκτροιμιδικοί εστέρες
- (N-hydroxy-succinimide esters, NHS esters)

B) Μέσω γέφυρας βιοτίνης - στρεπταβιδίνης

Σύστημα βιοτίνης – στρεπταβιδίνης



Σύστημα βιοτίνης – στρεπταβιδίνης



αριστερά: Αναπαράσταση δομής συμπλόκων στρεπταβιδίνης-βιοτίνης και αβιδίνης βιοτίνης

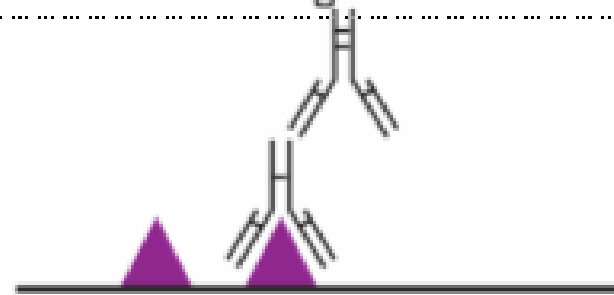
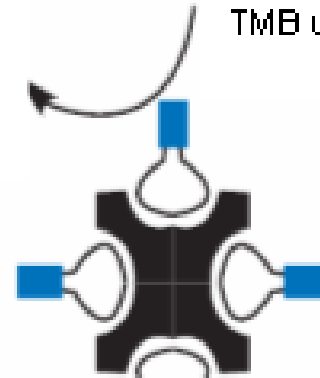
δεξιά: Αντίστοιχα μοντέλα θέσεων σύνδεσης.

Σύστημα βιοτίνης – στρεπταβιδίνης

(α) ELISA

Έγχρομο
προϊόν

TMB υπόσπρωμα



Βιοτίνη



Αντιγόνο



Στρεπταβιδίνη

ΧΡΗΣΙΜΟΙ ΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΟΥΣ ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΟΥΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥΣ

- **ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (sensitivity)----->** Εκφράζει την ελάχιστη ποσότητα ουσίας (αντιγόνου) που μπορεί να μετρηθεί με αξιοπιστία σε ένα δείγμα.
- Ορίζεται ως η συγκέντρωση της προς προσδιορισμό ουσίας που αντιστοιχεί στο μέσο όρο του σήματος του τυφλού δείγματος + 2.5 SD, όπως αυτή υπολογίζεται μέσω της καμπύλης αναφοράς
- Πρέπει να αναφέρεται πάντοτε στην αρχική συγκέντρωση της ουσίας στο βιολογικό δείγμα και όχι σε υδατικό διάλυμα.
-
- **Εξαρτάται κυρίως από :**
- α) πειραματικό σφάλμα (επαναληψιμότητα)
- β) χημική συγγένεια της προς προσδιορισμό ένωσης με το χρησιμοποιούμενο αντίσωμα
- γ) τρόπος διαχωρισμού δεσμευμένου από ελεύθερο αντίσωμα
- δ) ευαισθησία ανίχνευσης του ιχνηθέτη
- ε) σήμα μη ειδικής πρόσδεσης (non-specific binding signal, NSB)
- στ) χρόνος επώασης

Πρότυπες ουσίες στους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς

Επιθυμητά χαρακτηριστικά πρότυπης ουσίας

- * Πρέπει να είναι διαθέσιμη σε μεγάλες ποσότητες, αρκετές για να τροφοδοτεί πολλά εργαστήρια για πολλά χρόνια
- * Πρέπει να είναι σταθερή και να έχει ελεγχθεί προσεκτικά η επίδραση της αποθήκευσης για πολλούς μήνες σε διαφορετικές θερμοκρασίες
- * Δεν πρέπει να περιέχει ουσίες που να παρεμποδίζουν στους ανοσοπροσδιορισμούς
- * Στην ιδανική περίπτωση θα πρέπει να περιέχει υψηλής καθαρότητας ουσία (πχ ένα μόνο είδος μορίου)
- * Θα πρέπει να χορηγείται σε ένα σύνηθες πρωτεϊνικό περιβάλλον που να μιμείται τα βιολογικά δείγματα
- * Θα πρέπει να ορίζεται με βάση τη βιολογική δραστικότητα (Units), ή με βάση χημικές μονάδες (g/L ή mole/L)
- * Όταν δεν είναι γνωστή η ακριβής συγκέντρωση μιας πρότυπης ουσίας σε μονάδες μάζας ή σε μονάδες βιολογικής δραστικότητας χρησιμοποιούνται αυθαίρετες μονάδες (arbitrary units) όπως οι διεθνείς μονάδες (International Units)

Επίδραση παρουσίας Ρευματοειδών Παραγόντων στους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς

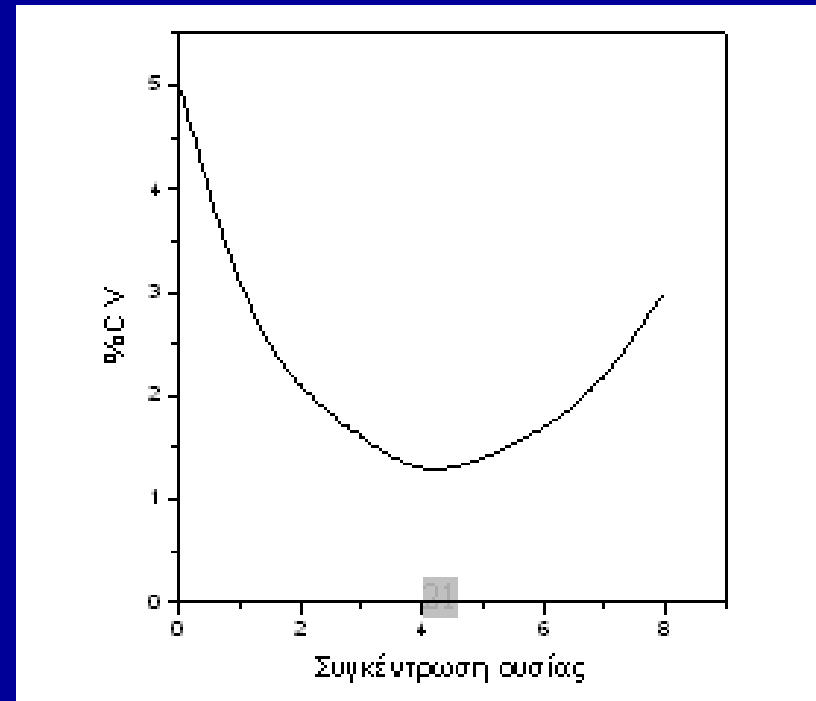
- Οι ρευματοειδείς παράγοντες είναι κυρίως μόρια IgM τα οποία κατευθύνονται έναντι ανθρώπινης IgG
- Αντιδρούν με την Fc περιοχή των IgG
- Συχνά παρατηρούνται και διασταρούμενες αντιδράσεις με αντισώματα άλλων ειδών, πχ ποντίκι, κουνέλι κ.ά.

Επίδραση παρουσίας ετεροφιλικών αντισωμάτων στους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς

- Το πρόβλημα μπορεί να αποφευχθεί και στις δύο περιπτώσεις με προσθήκη περισσειας μη ειδικών αντισωμάτων ποντικού στο μίγμα της αντίδρασης

ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

- Ορίζεται ως η περιοχή της καμπύλης αναφοράς όπου ο συντελεστής μεταβλητότητας της μεθόδου (CV) είναι μικρότερος του 10%
 - * RIA---> σχετικά μικρή δυναμική περιοχή, δύο έως τρεις τάξεις μεγέθους
 - * IRMA---> Μεγάλη δυναμική περιοχή, τρεις έως τέσσερις τάξεις μεγέθους.
-
- Precision profile, J. Imm. Methods, 45, 225-273, 1981



ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (ROBUSTNESS)

- Ο όρος αυτός εκφράζει την σταθερότητα ενός συστήματος έναντι μικρομεταβολών στο πρωτόκολλο και στο τοπικό περιβάλλον (διαφορετικά εργαστήρια, χειριστές, κλπ)

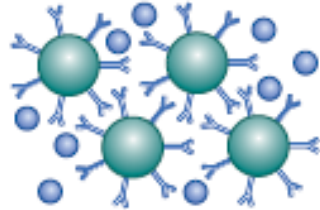
- Εξαρτάται κυρίως από:
 - α) θερμοκρασία
 - β) ιονική ισχύ και pH
 - γ) ακρίβεια χειρισμού πιπεττών
 - δ) ενδογενείς παράγοντες, οφειλόμενους στο ίδιο το βιολογικό δείγμα (matrix effects)
 -
- * Οι IRMA τύπου προσδιορισμοί χαρακτηρίζονται από πολύ υψηλό robustness έναντι των προσδιορισμών τύπου RIA

ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ HOOK

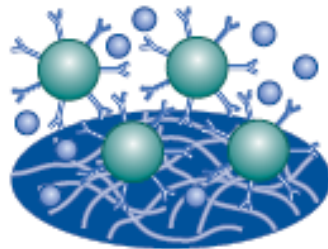
(high dose hook effect)

- Η τάση αναστροφής της καμπύλης αναφοράς σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις της προς προσδιορισμό ουσίας
- παρατηρείται μόνο σε προσδιορισμούς τύπου IRMA και όχι τύπου RIA
- Συμβαίνει διότι η ποσότητα του αντισώματος στερεάς φάσης (ακίνητοποιημένου) είναι περιορισμένη σε περιπτώσεις όπου η συγκέντρωση της προς προσδιορισμό ουσίας είναι πολύ υψηλή, με αποτέλεσμα να ανταγωνίζονται το Ag με το Ag:Ab* για την σύνδεση με την στερεά επιφάνεια

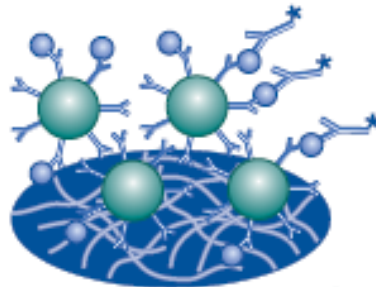
Σύστημα Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA)



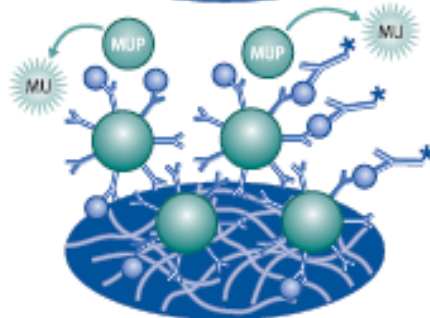
Microparticles coated with anti-analyte antibodies and sample are incubated together to form a reaction mixture.



An aliquot of the reaction mixture is transferred to the glass fiber matrix.



Alkaline phosphatase-labeled anti-analyte antibodies are allowed to bind to the microparticle complex.



The substrate 4-methylumbelliferyl phosphate (MUP) is added to the matrix. The fluorescent product, methylumbelliferone (MU) is measured.

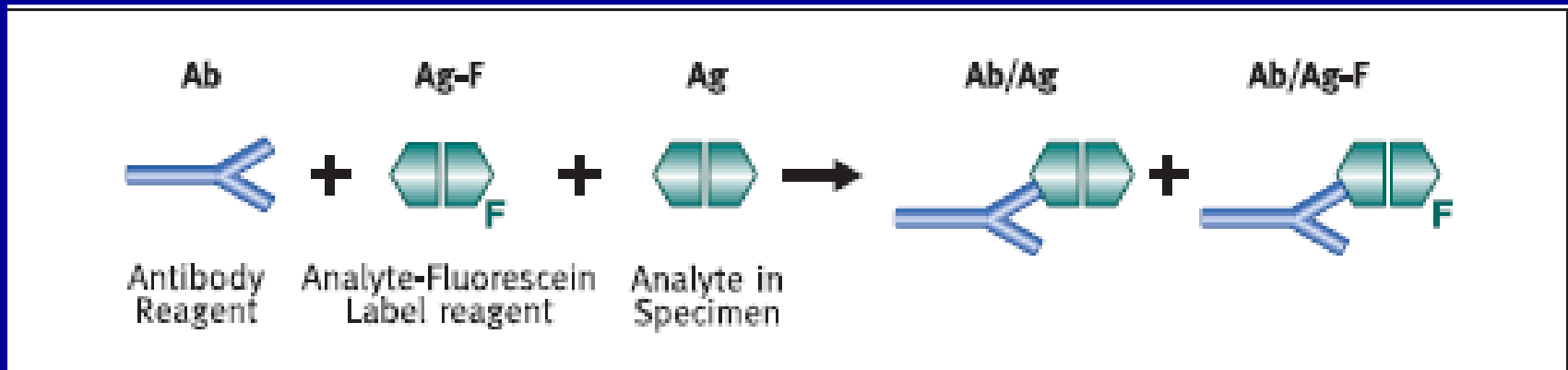
Ανοσοαναλυτής IMx, Abbot
Microparticle Enzyme immunoassay (MEIA)



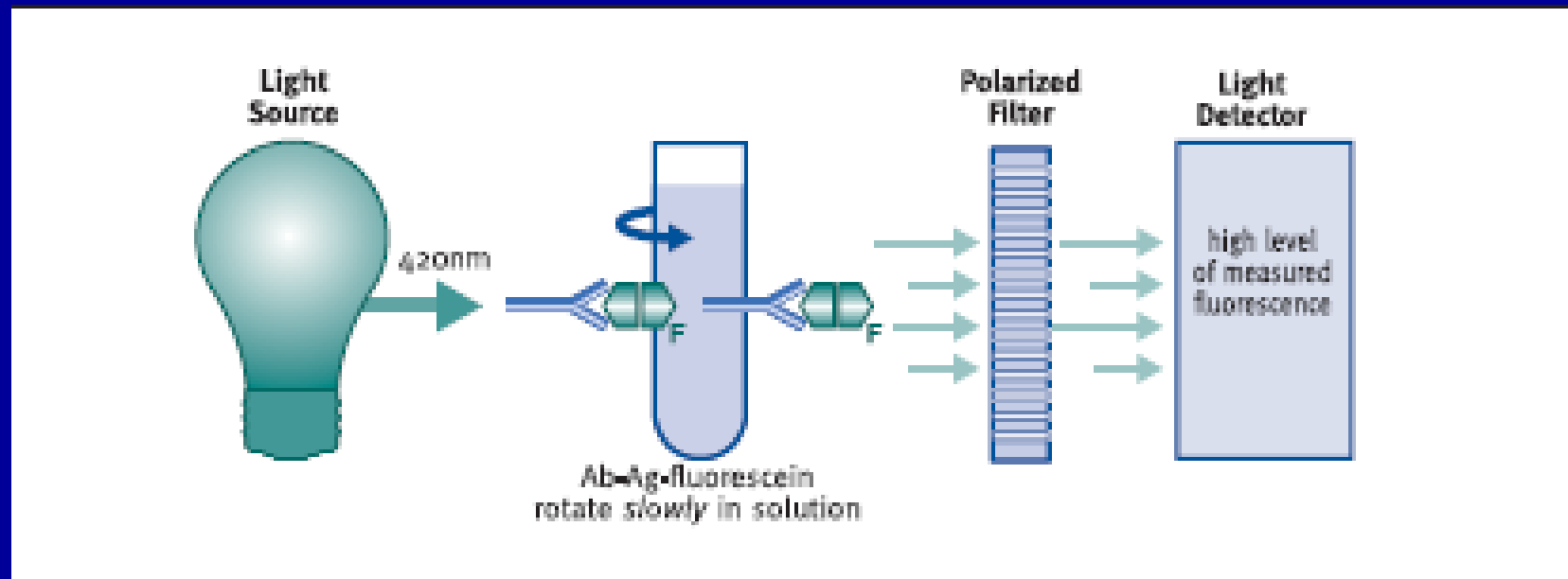
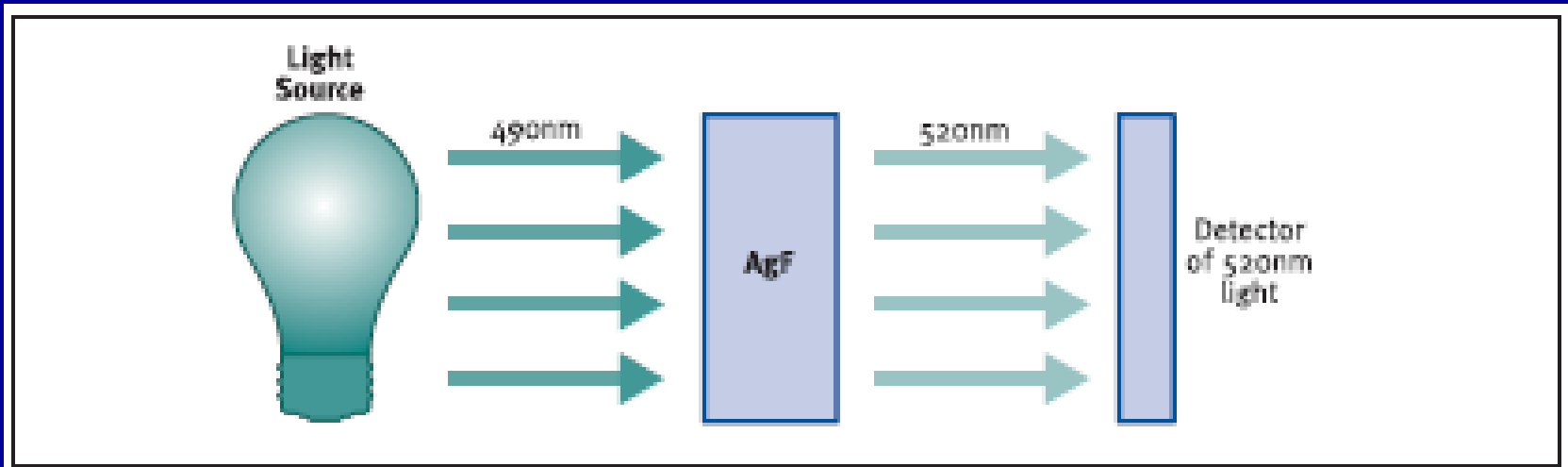
Ανοσοαναλυτής AxSYM Abbot
Microparticle Enzyme immunoassay (MEIA)



Σύστημα Fluorescence Polarization Immunoassay (FPIA)

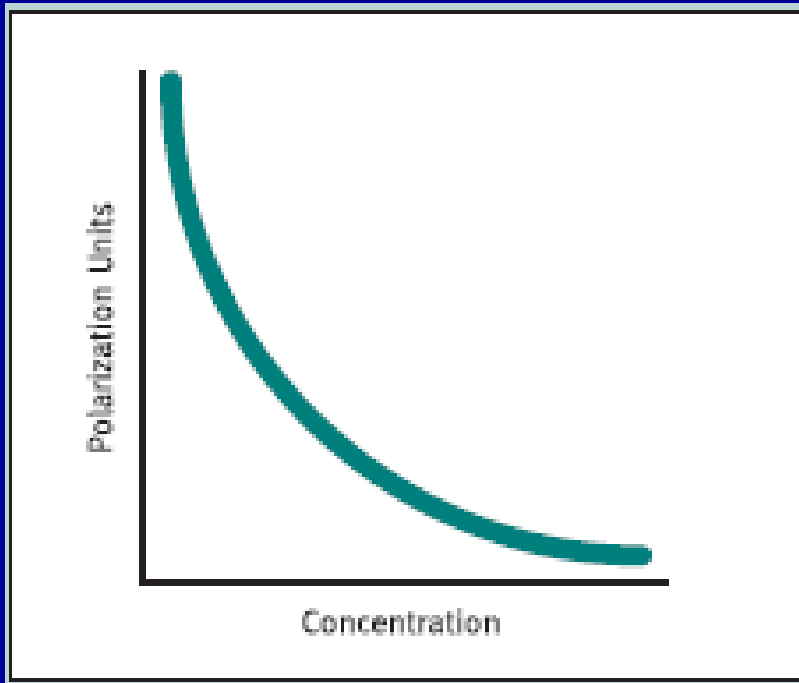


Σύστημα Fluorescence Polarization Immunoassay (FPIA)

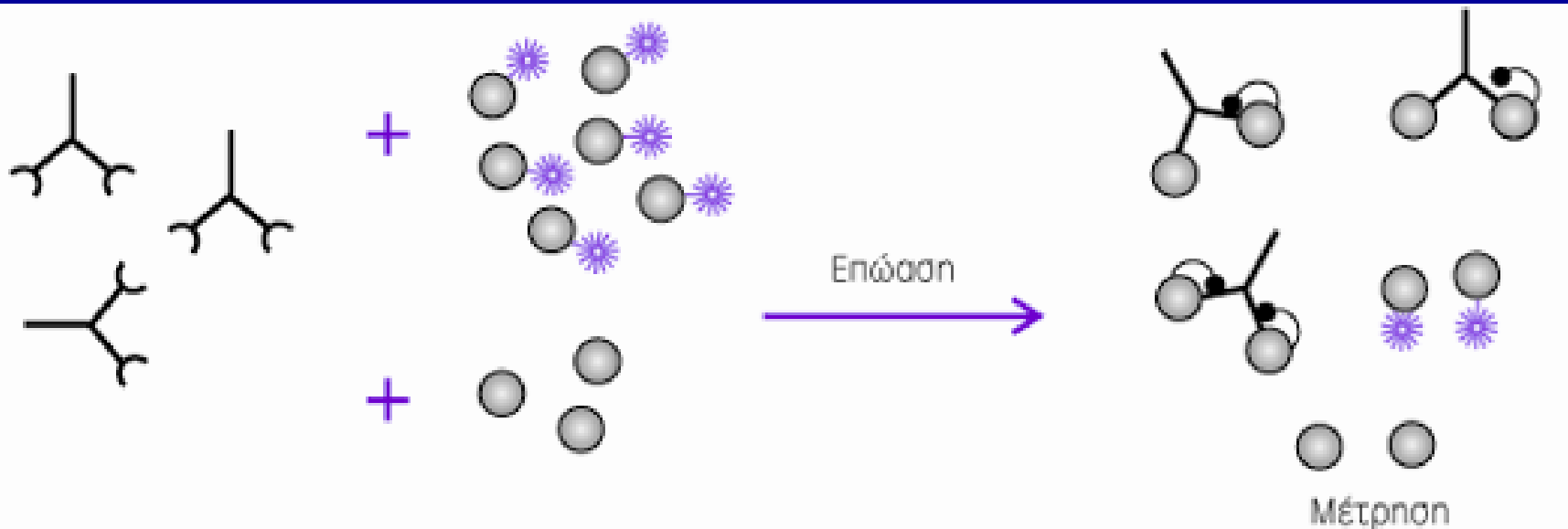


Σύστημα Fluorescence Polarization Immunoassay (FPIA)

Ανοσοαναλυτής: TDx, (Abbott)



Ενζυμική πολλαπλασιαστική ανοσολογική τεχνική (EMIT) (ομοιογενής ανοσολογική μέθοδος)



= Αντίσωμα



= Σημασμένο αντιγόνο με
δραστικό ένζυμο

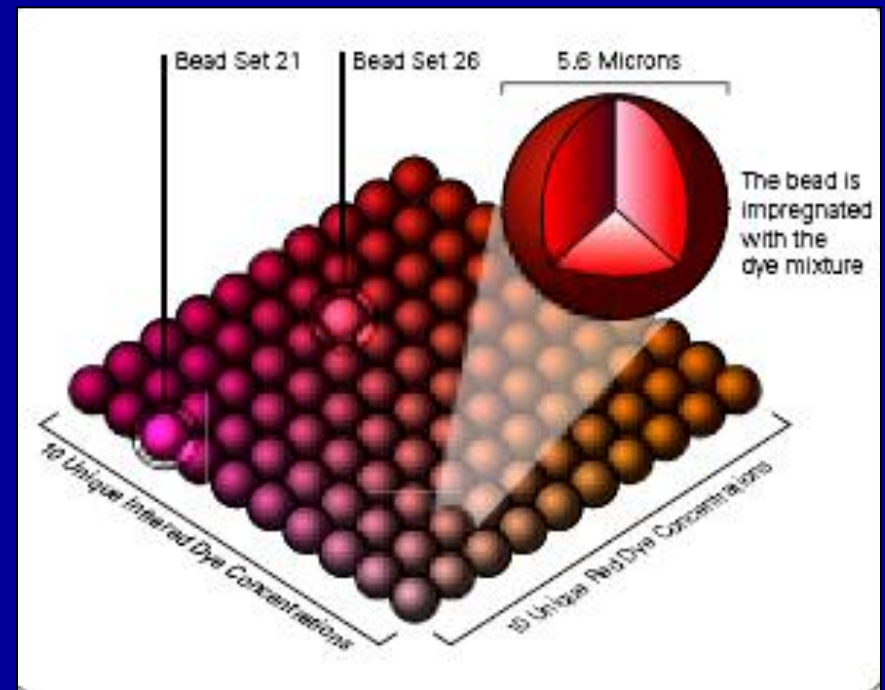
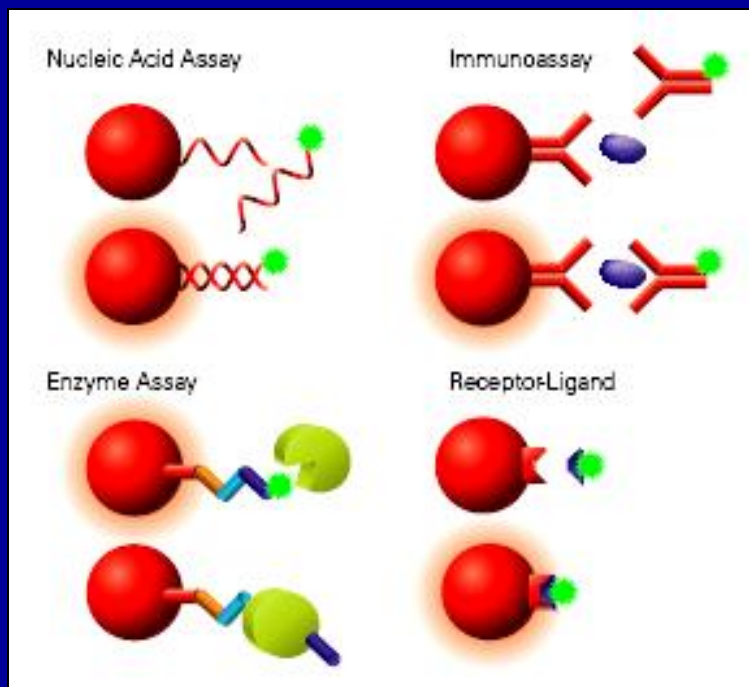


= Σημασμένο αντιγόνο (με αδρανές ένζυμο)

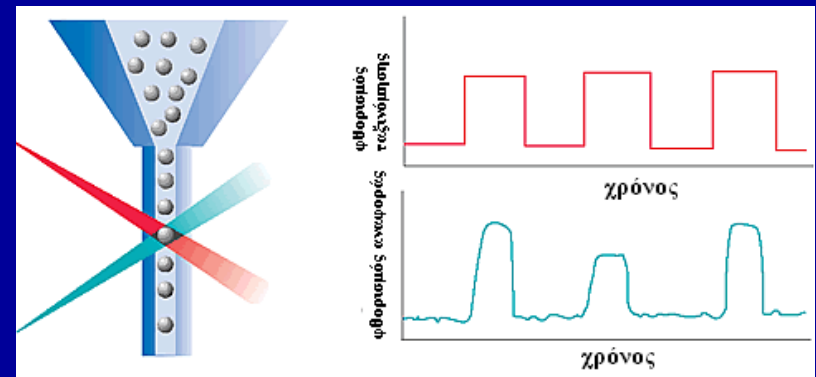
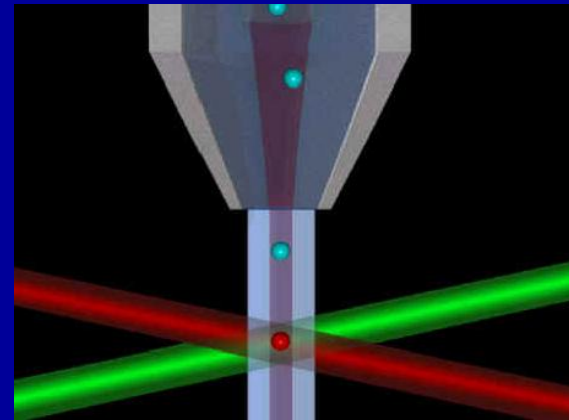
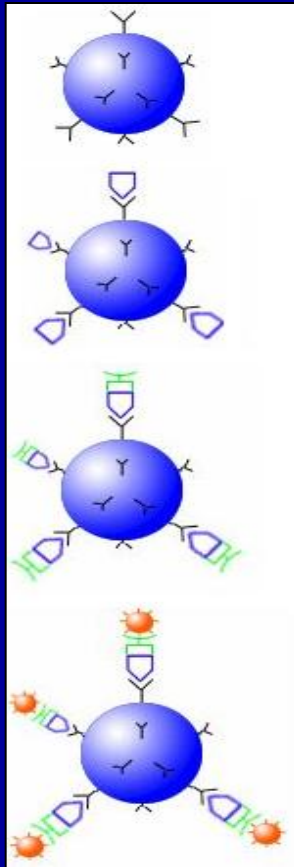


= Αντιγόνο στο δείγμα του ασθενούς

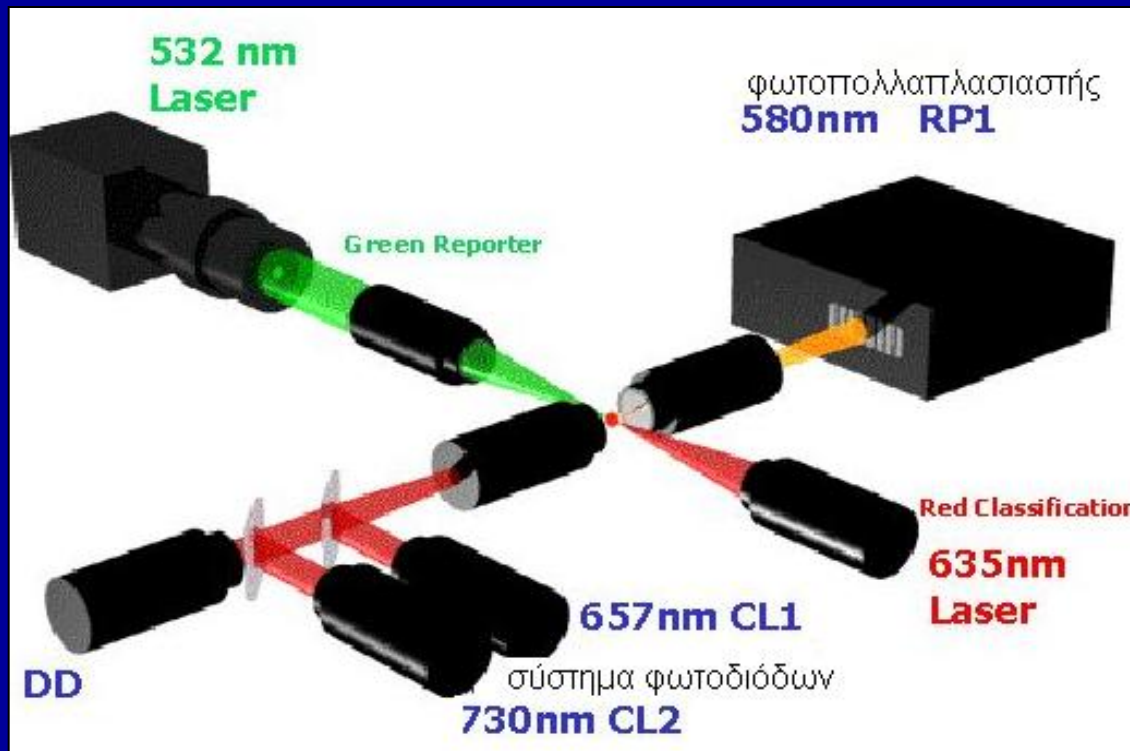
Αρχή λειτουργίας συστήματος Luminex-100



Αρχή λειτουργίας συστήματος Luminex-100



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



• Τα σφαιρίδια ρέουν μέσω του ρυθμιστικού διαλύματος στις ακτίνες των δυο LASER.

• Με διέγερση στα 635 nm του LASER ταξινόμησης, οι δυο φθορίζουσες ουσίες εκπέμπονται σε διαφορετικά μήκη κύματος: 657 nm και 730 nm.

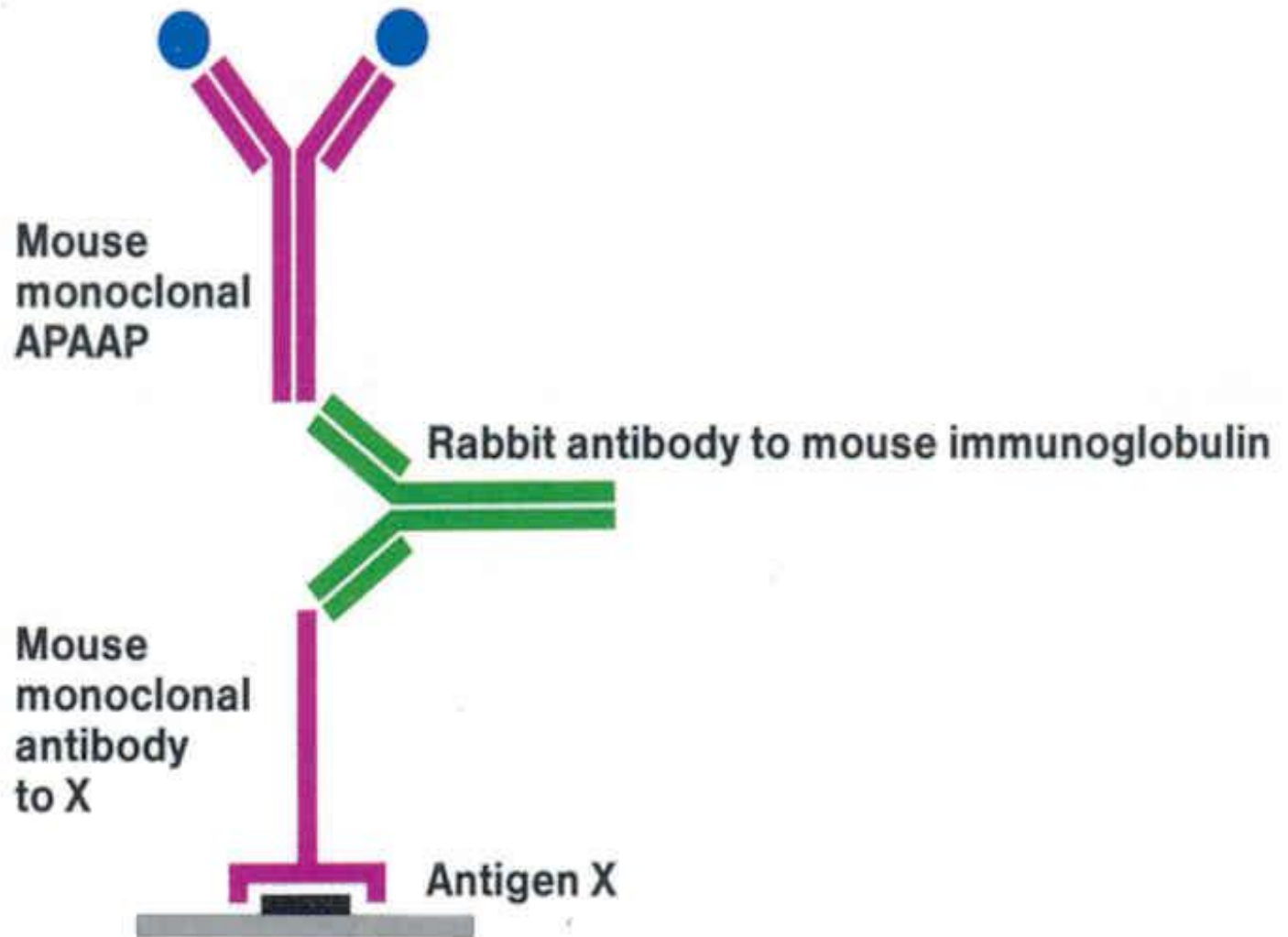
• Μια τρίτη φθορίζουσα ουσία, η φυκοερυθρίνη διεγείρεται στα 532 nm από το LASER αναφοράς (green reporter laser) που εκπέμπει στα 580 nm.

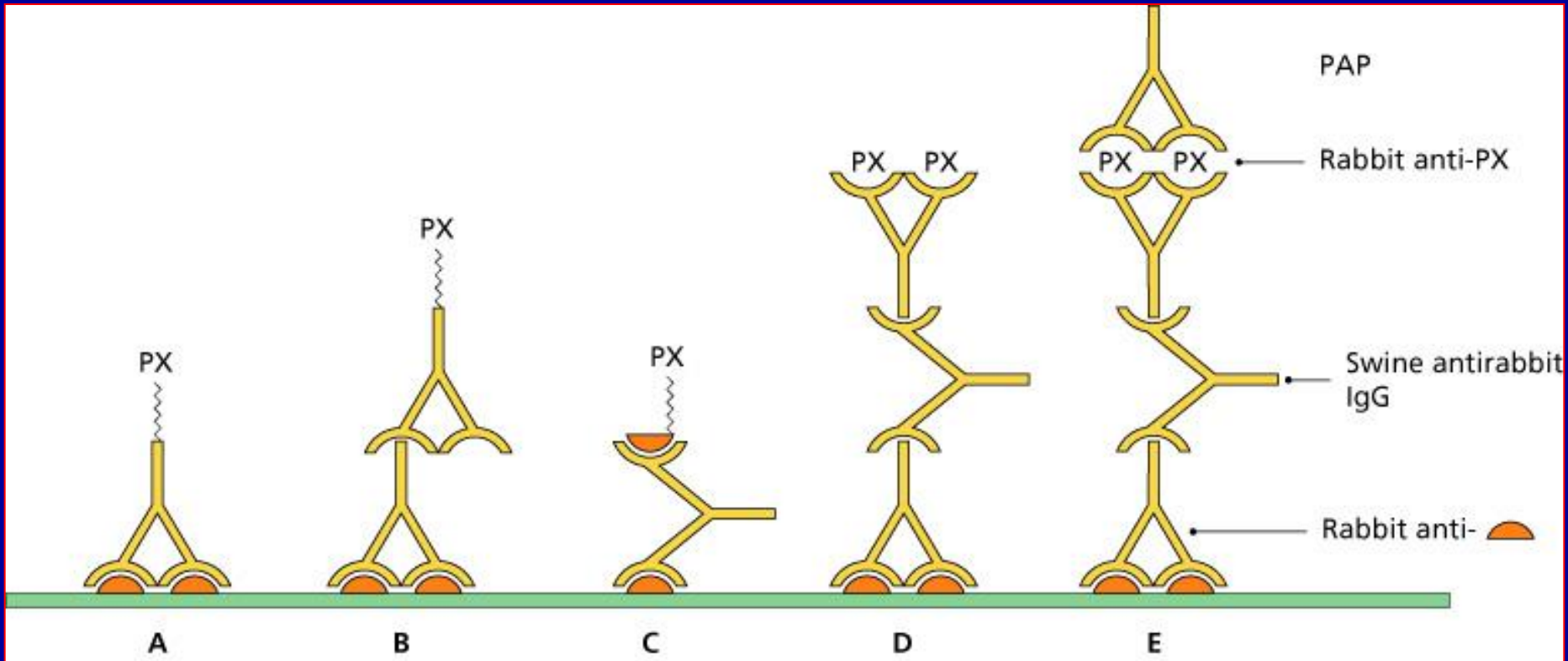
• Το όργανο καταγράφει τη μέση τιμή έντασης φθορισμού (MFI) των 50-80 σφαιριδίων κάθε.σετ και υπολογίζει την.συγκέντρωση κάθε ουσίας-στόχου στο δείγμα.

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

- Αντίσωμα-Αντιγονικός επίτοπος
- Παραγωγή αντισώματος
- Μεθοδολογία

ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ-ΑΝΤΙΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ





LSAB (Biotinylated link antibody followed by streptavidin)



STEP 1 Application of primary antibody. Incubate 10 min.



STEP 2 Application of biotinylated secondary antibody. Incubate 10 min.



STEP 3 Application of enzyme-conjugated streptavidin. Incubate 10 min.

ΣΕ ΤΙ ΙΣΤΟΥΣ ΕΦΑΡΜΟΖΕΤΑΙ;

- Τομές παραφίνης
- Τομές κρυστάτη
- 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

Diagnosis on disc

Frances S. Ligler and Jeffrey S. Erickson

Highly complex immunoassays that identify and quantify many different antigens simultaneously need high-resolution imaging capability. A simple, low-cost technique could be music to our ears.

Figure 1 | Molecular music. A conventional compact-disc pick-up reader works by focusing laser light onto the surface of the CD. As the CD rotates above the reader, information encoded as pits along a spiral track on its metal-coated surface can be read by means of light reflected back through a lens onto a photodiode. Lange and colleagues' immunoassay system¹ works in exactly the same way, but with a substrate covered with a regularly spaced array of capture antibodies taking the place of the CD. When an antigen binds to an antibody, its presence is signalled by a second, gold-containing detector antibody that catalyses the deposition of reflective silver particles onto the substrate.

