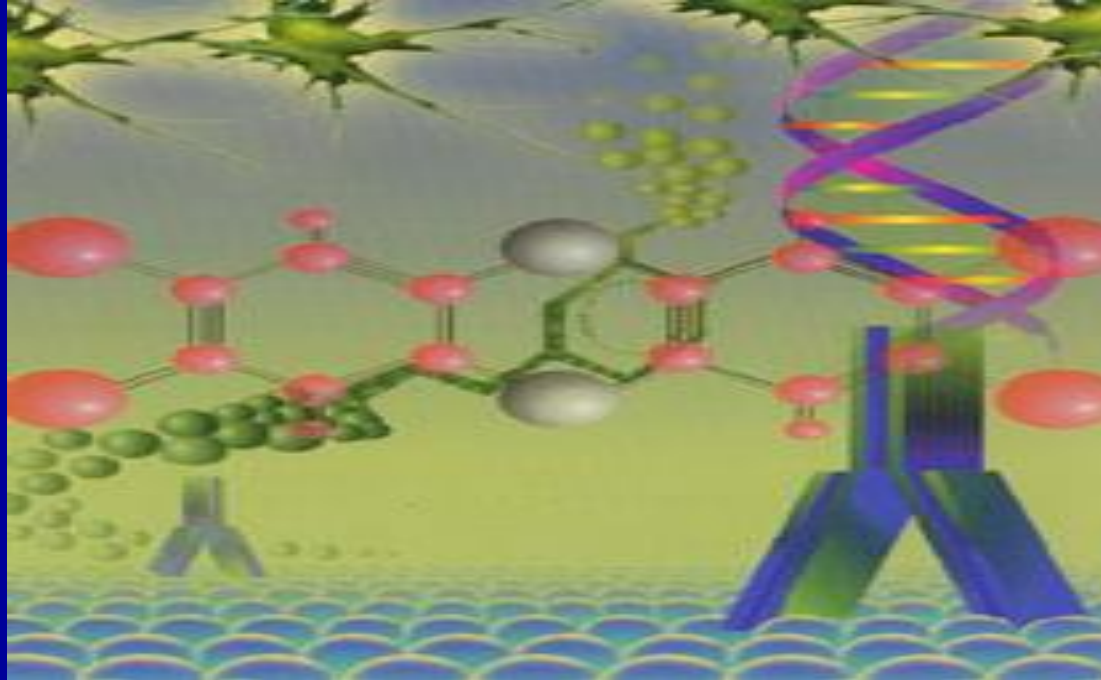


**ΜΑΘΗΜΑ : ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ**  
**(immunoassays)**



**Ε. Λιανίδου,**

**Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας – Κλινικής Χημείας**  
***lianidou@chem.uoa.gr***

| Ένωση                             | Κυκλοφορούσα συγκέντρωση |                           | Μέθοδοι μέτρησης   |
|-----------------------------------|--------------------------|---------------------------|--|
|                                   | mmol/L                   | (10 <sup>-3</sup> mol/L)  | <p>π.χ. φασματοφωτομετρία, χρωματομετρία, ποτενσιμετρία</p>  |
| Νάτριο                            | 140                      |                           |  |
| Χλώριο                            | 105                      |                           |  |
| Διττανθρακικά                     | 30                       |                           |  |
| Γλυκόζη                           | 5                        |                           |  |
| Ουρία                             | 4                        |                           |  |
| Χοληστερόλη                       | 4                        |                           |  |
| Ασβέστιο                          | 2.5                      |                           |  |
| Τριγλυκερίδια (νηστείας)          | 1                        |                           |  |
|                                   | umol/L                   | (10 <sup>-6</sup> mol/L)  |  |
| Αλβουμίνη                         | 600                      |                           |  |
| Ουρικό οξύ                        | 250                      |                           |  |
| Φαινυλαλάνη                       | 125                      |                           |  |
| Ανοσοσφαιρίνη G                   | 90                       |                           |  |
| Θεοφυλλίνη                        | 80                       |                           |  |
| Αμμωνία                           | 30                       |                           |  |
| Σίδηρος                           | 20                       |                           |  |
| Χολερυθρίνη (ολική)               | 10                       |                           |  |
| Ανοσοσφαιρίνη M                   | 1                        |                           |  |
|                                   | nmol/L                   | (10 <sup>-9</sup> mol/L)  | <p>Ομοιογενείς ανοσολογικές μέθοδοι, π.χ. EMIT, FRIA</p>   |
| Οιστρίδιλη (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 <sup>-12</sup> mol/L) | <p>Ετερογενείς ανοσολογικές μέθοδοι, π.χ. ELISA με ανίχνευση με φθορισμό</p> <p>RIA</p> <p>ELISA με ανίχνευση με χημειοφωταύγεια</p> |
| Αλδοστερόνη                       | 180                      |                           |  |
| Ινσουλίνη                         | 120                      |                           |  |
| Παραθορμόνη                       | 100                      |                           |  |
| Αυξητική ορμόνη                   | 50                       |                           |  |
| Ωχρινοποιητική ορμόνη             | 10                       |                           |  |
| Τριωδοθυρονίνη                    | 10                       |                           |  |
| Φλοισεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη     | 10                       |                           |  |
| Θυρεοειδοτρόπος ορμόνη            | 5                        |                           |  |
| Αγγειοτασίνη II                   | 4                        |                           |  |
| Ωκυτοκίνη                         | 1                        |                           |  |
| Αργινίνη βασοπρεσίνη              | 1                        |                           |  |

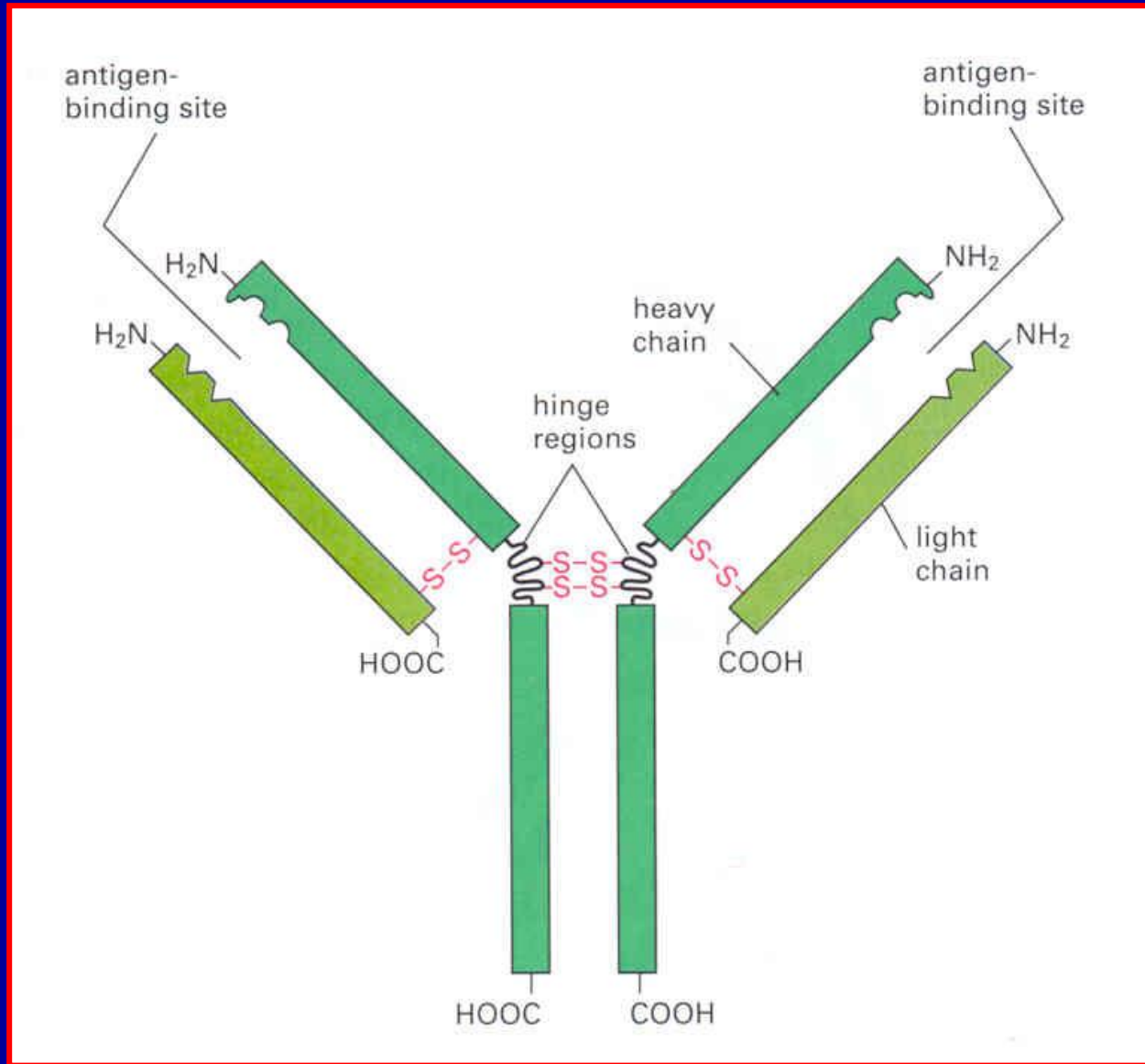
# ΧΡΗΣΙΜΟΙ ΟΡΙΣΜΟΙ

- **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

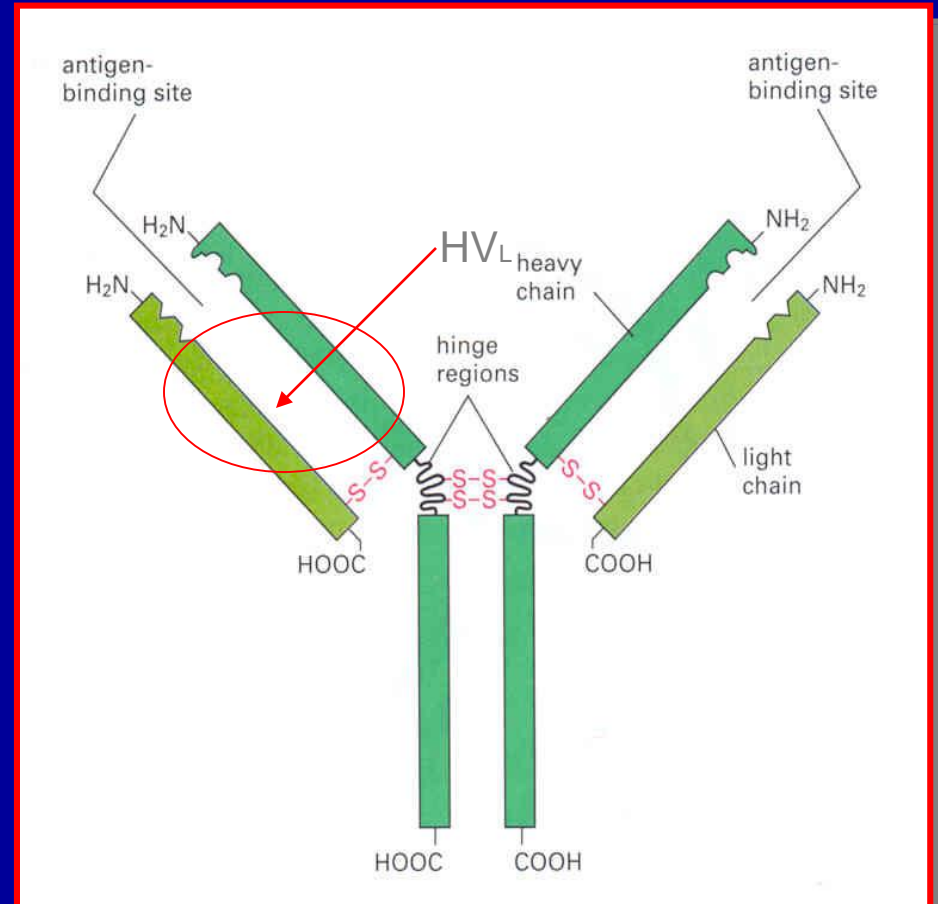
- **ΕΠΙΤΟΠΟΣ** :περιοχή στο αντιγόνο που συνδέεται με το αντίσωμα. (Πολύ μικρή περιοχή, 5-7 αμινοξέα).Στις πρωτεΐνες συναντάμε συνήθως 1 επίτοπο ανά 40-80 αμινοξέα
- **ΠΑΡΑΤΟΠΟΣ** : περιοχή στο αντίσωμα που συνδέεται με το αντιγόνο.

# Σχηματική παράσταση μορίου ανοσοσφαιρίνης G



# ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

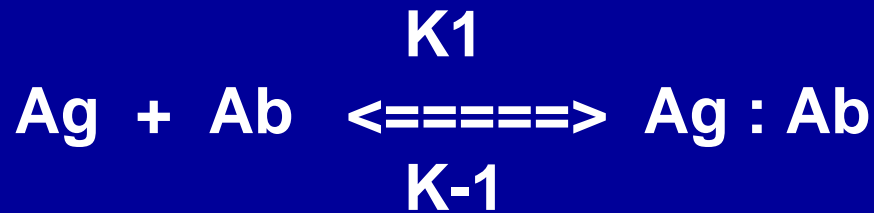
- IgG, IgA, IgM, IgD, IgE
- 2 όμοιες βαριές αλυσίδες (H), και δύο ελαφρείς- (L)
- Κ ή λ ελαφρείς αλυσίδες
- Η απόσταση μεταξύ HV<sub>L</sub> και αντιγόνου είναι περίπου 0.2nm
- Δομικές ειδικότητες του χώρου αυτού-Ιδιοτυπία (idiotypes)



Affinity constant  $K_a = \frac{[AgAb]}{[Ag].[Ab]}$

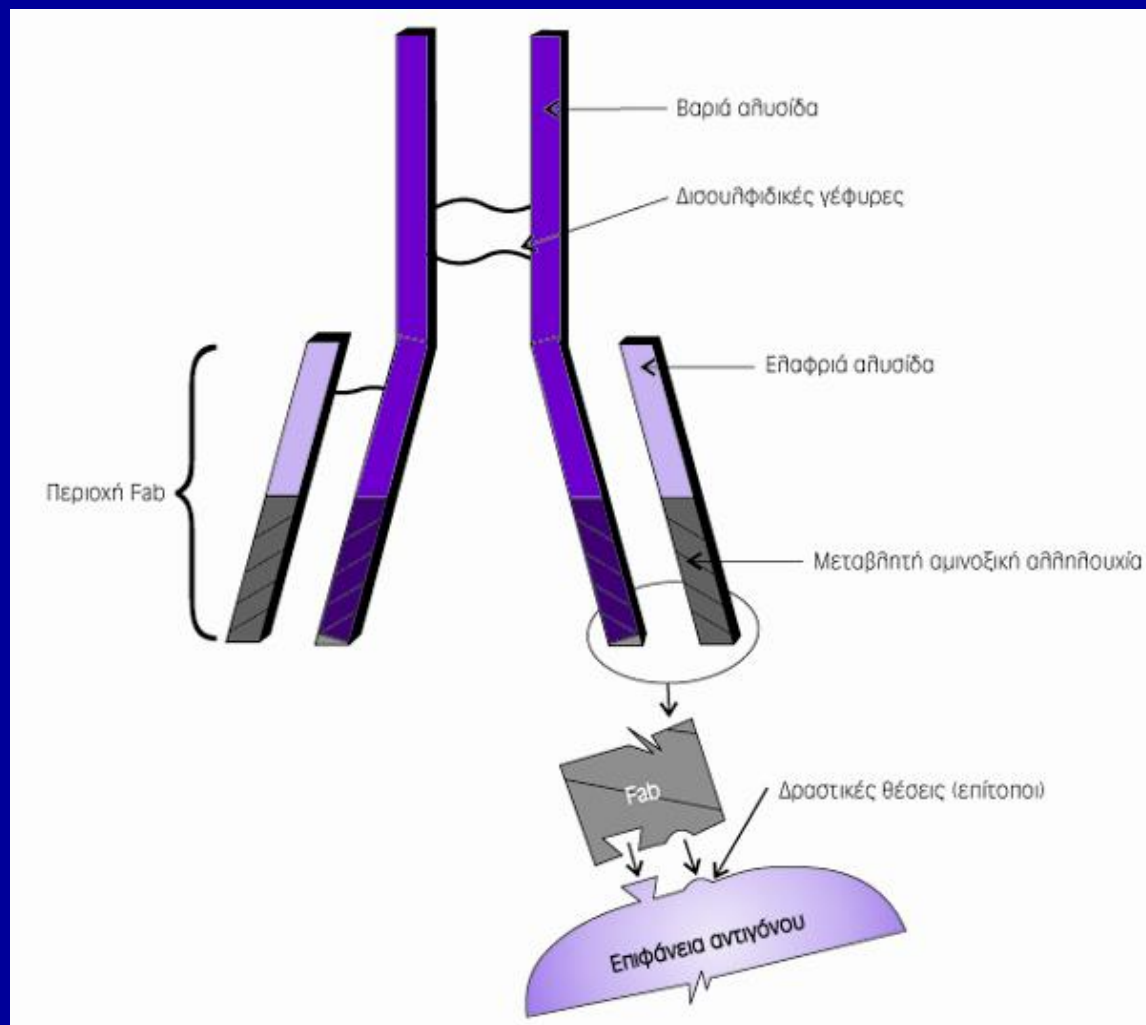
# ΣΥΓΓΕΝΕΙΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ (Antibody Affinity)

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



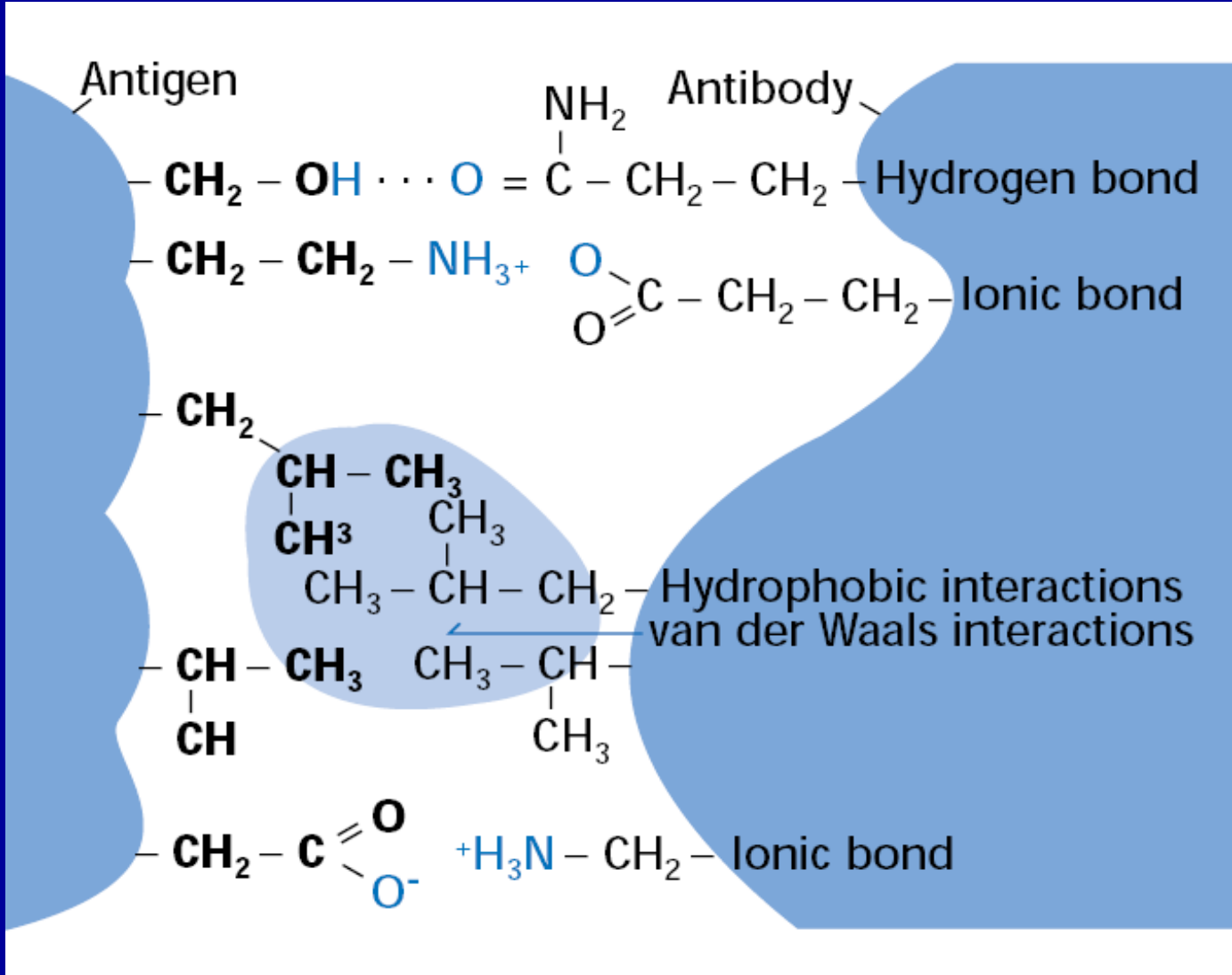
$$K_a = \frac{[\text{Ag} \cdot \text{Ab}]}{[\text{Ag}] \cdot [\text{Ab}]}$$

# Αλληλεπίδραση μεταξύ αντιγόνου – αντισώματος.





# Διάφοροι τύποι μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ αντιγόνου – αντισώματος.



# ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ (antibody specificity)

**ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ:** Εκφράζει τη συμπληρωματικότητα της στερεοδομής μεταξύ επιτόπου και παρατόπου

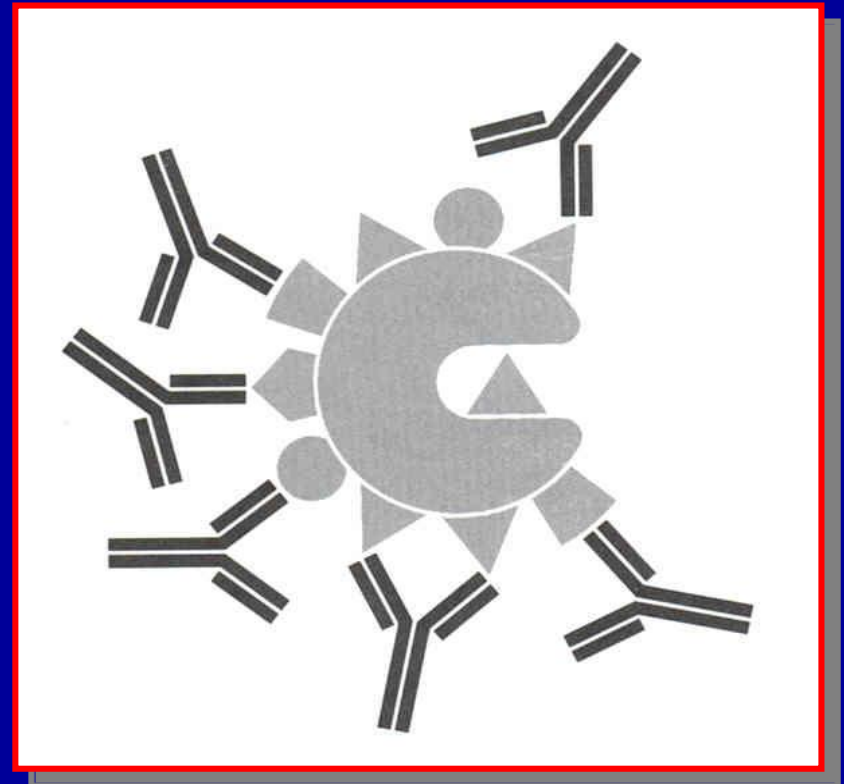
- Είναι δυνατόν δύο διαφορετικά αντιγόνα A και B να έχουν ένα ή περισσότερους κοινούς επιτόπους στο μόριό τους με αποτέλεσμα ένας υποπληθυσμός αντισωμάτων πολυκλωνικού αντιορού να αντιδρά και με τα δύο αντιγόνα. Στην περίπτωση αυτή εάν χρησιμοποιηθεί μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του κοινού επιτόπου δεν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

# ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΥΜΕΝΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ (cross-reaction)

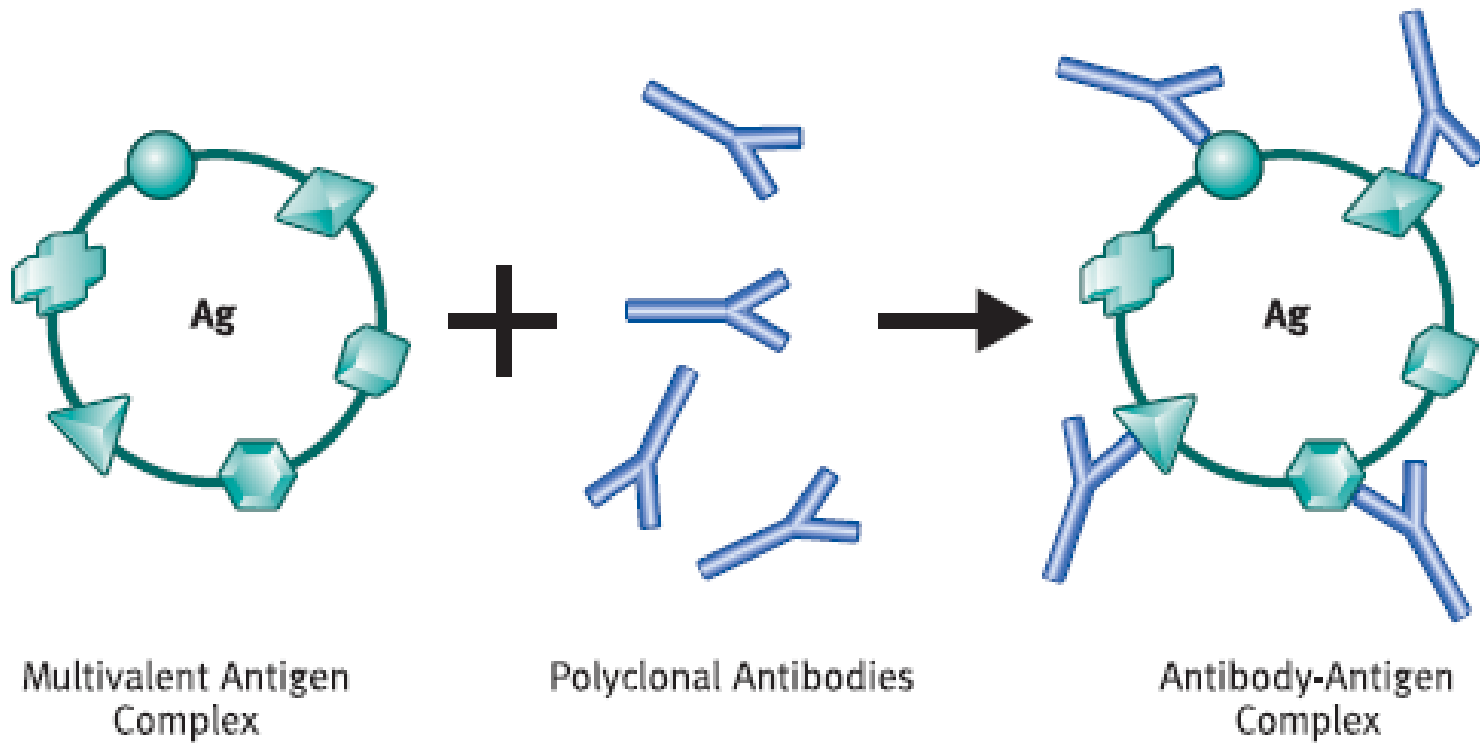
- Εκφράζει το φαινόμενο, όπου παρατηρείται σύνδεση του ειδικού αντισώματος με αντιγόνο Ag2 διαφορετικό του ανοσογόνου Ag1 λόγω ύπαρξης παρόμοιου αντιγονικού επιτόπου.
- Στην περίπτωση αυτή αντισώματα εξειδικευμένα έναντι ενός επιτόπου του ομολόγου αντιγόνου (A) είναι δυνατό να αντιδρούν και με παρόμοιους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

# ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

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

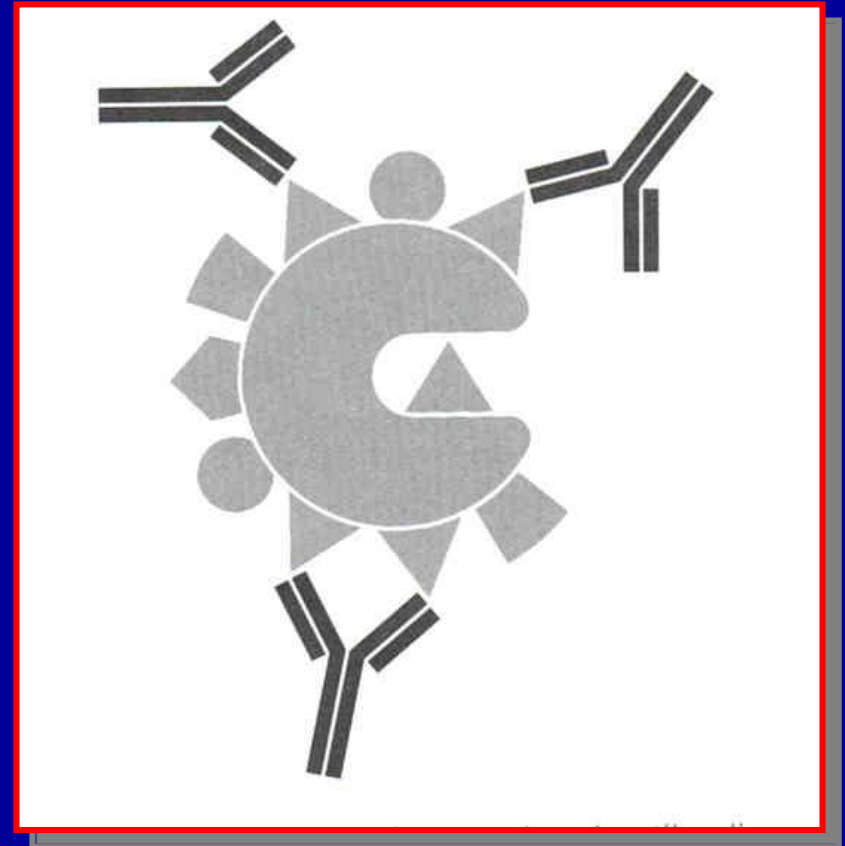


# ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

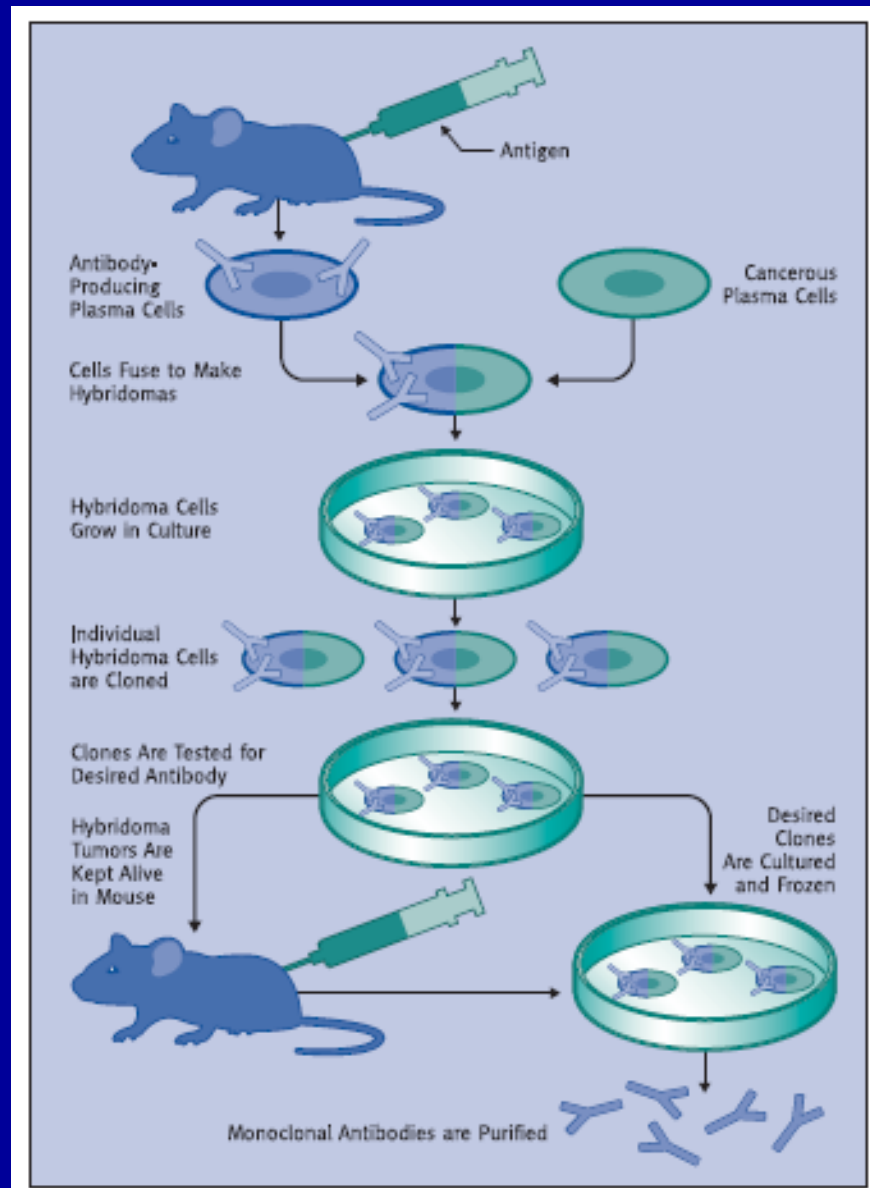


# ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

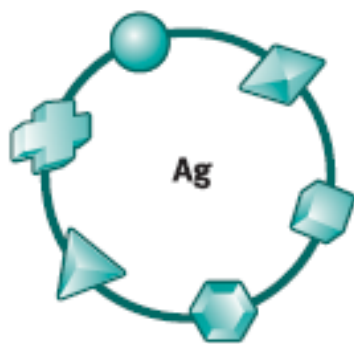
- παράγονται από κλώνους πλασματοκυττάρων και κατά συνέπεια είναι ανοσοχημικά πανόμοια.
- Αντιδρούν με τον ίδιο ειδικό επίτοπο του αντιγόνου.
- Τα πιο πολλά mouse monoclonals



# ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ



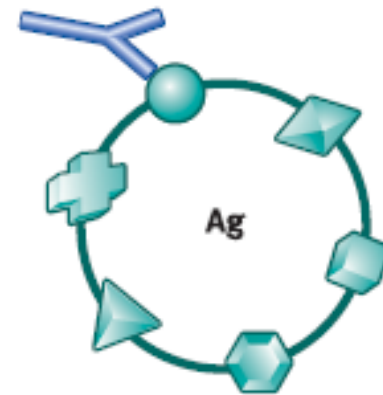
# ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ



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<br>(ασκιτικό υγρό)                                |
| παρουσία<br>άλλων IgGs  | 100%           | Καθόλου σε<br>κυτταροκαλλιέργειες<br>10% σε ασκιτικό υγρό |
| καθαρότητα<br>αντιγόνου | καθαρό Ag      | όχι πλήρως<br>καθαρό Ag                                   |
| κόστος<br>Παραγωγής     | < 100\$        | 10.000\$  |

# ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

## Α. ΠΟΙΟΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

α) διπλή ανοσοδιάχυση

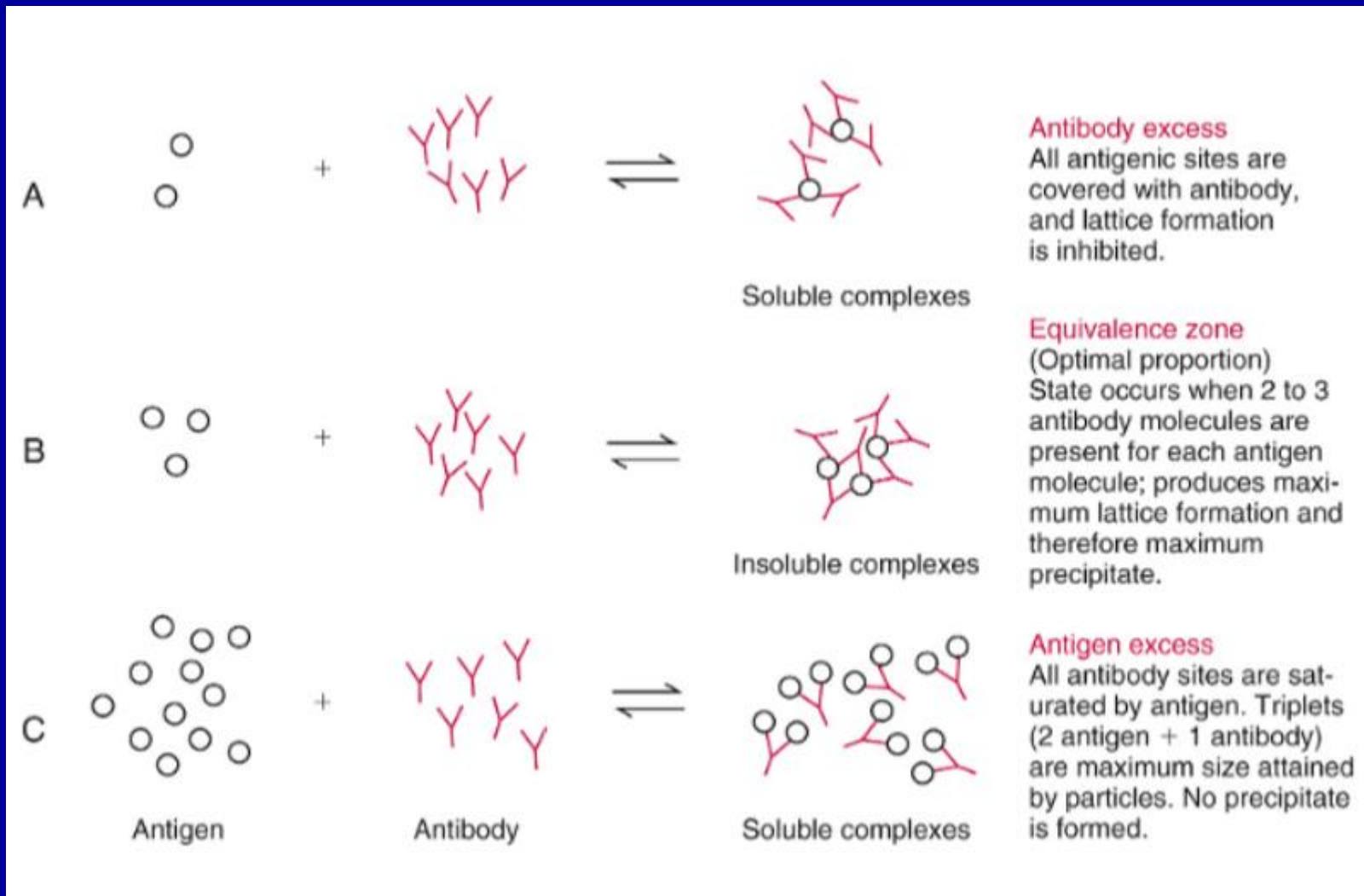
β) Ανοσοηλεκτροφόρηση (Immunoelectrophoresis)

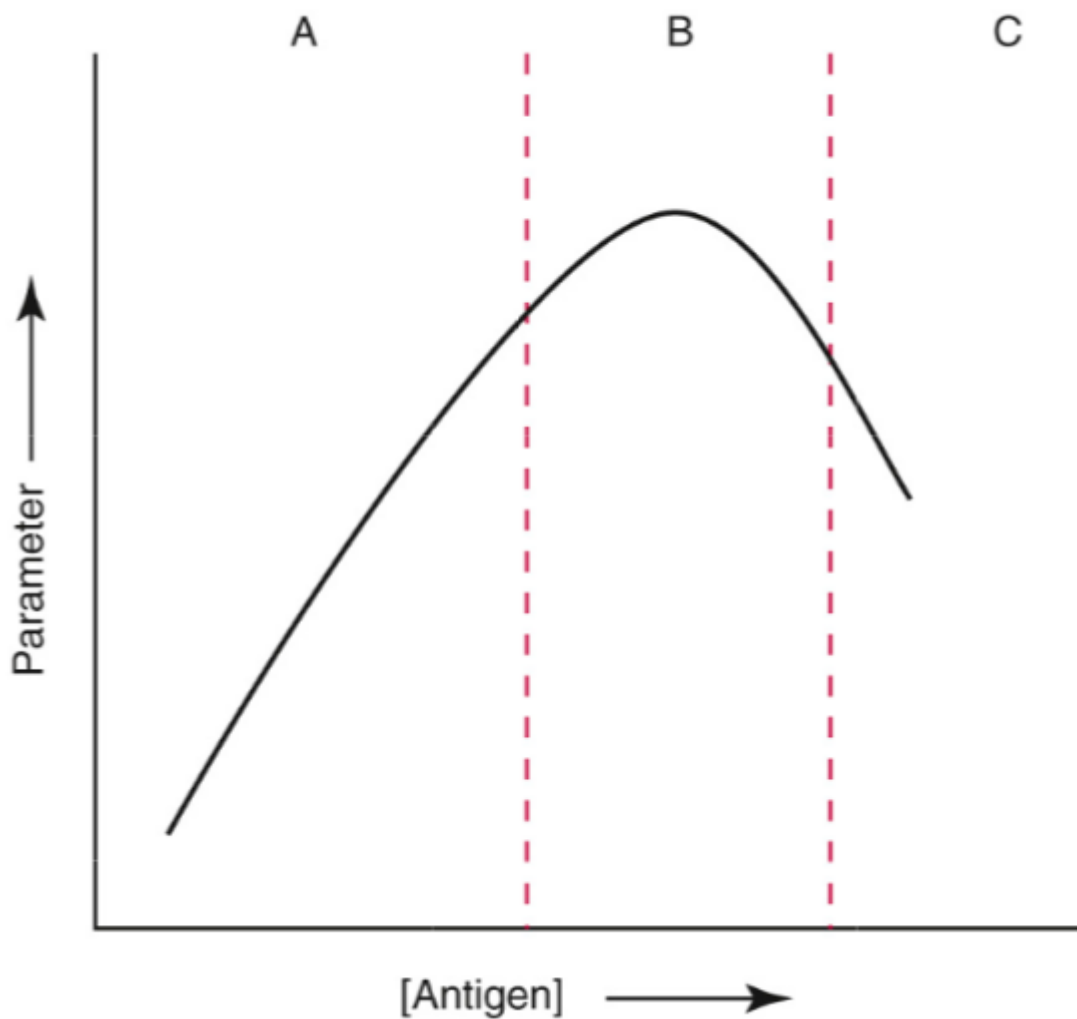
γ) Αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση (Crossover immunoelectrophoresis, CIE)

δ) Ανοσοκαθήλωση (Immunofixation)

ε) Western blotting

# Schematic diagram for precipitin reaction





**Schematic diagram of precipitin curve illustrating zones of :**

- **A: antibody excess**
- **B: equivalence**
- **C: antigen excess**

**The parameter measured may be the quantity of protein precipitated, light scattering, or another measurable parameter.**

**Antibody concentration is held constant in this example.**

# ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

## Β. ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. ΜΗ-ΙΧΝΗΘΕΤΗΜΕΝΕΣ

α) απλή ακτινωτή ανοσοδιάχυση (single radial immunodiffusion, SRID, Mancini)

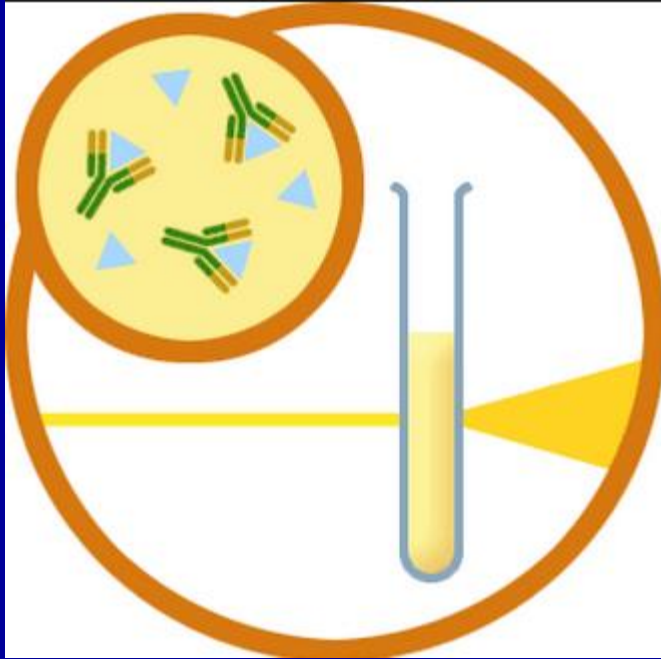
β) Ανοσοηλεκτροφόρηση Rocket

γ) Διασταυρούμενη ανοσοηλεκτροφόρηση (Crossed immunoelectrophoresis)

δ) Νεφελομετρία (Nephelometry), Θολερομετρία (Turbidimetry)

στ) Μέθοδοι συγκόλλησης (Agglutination assays)

# 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.

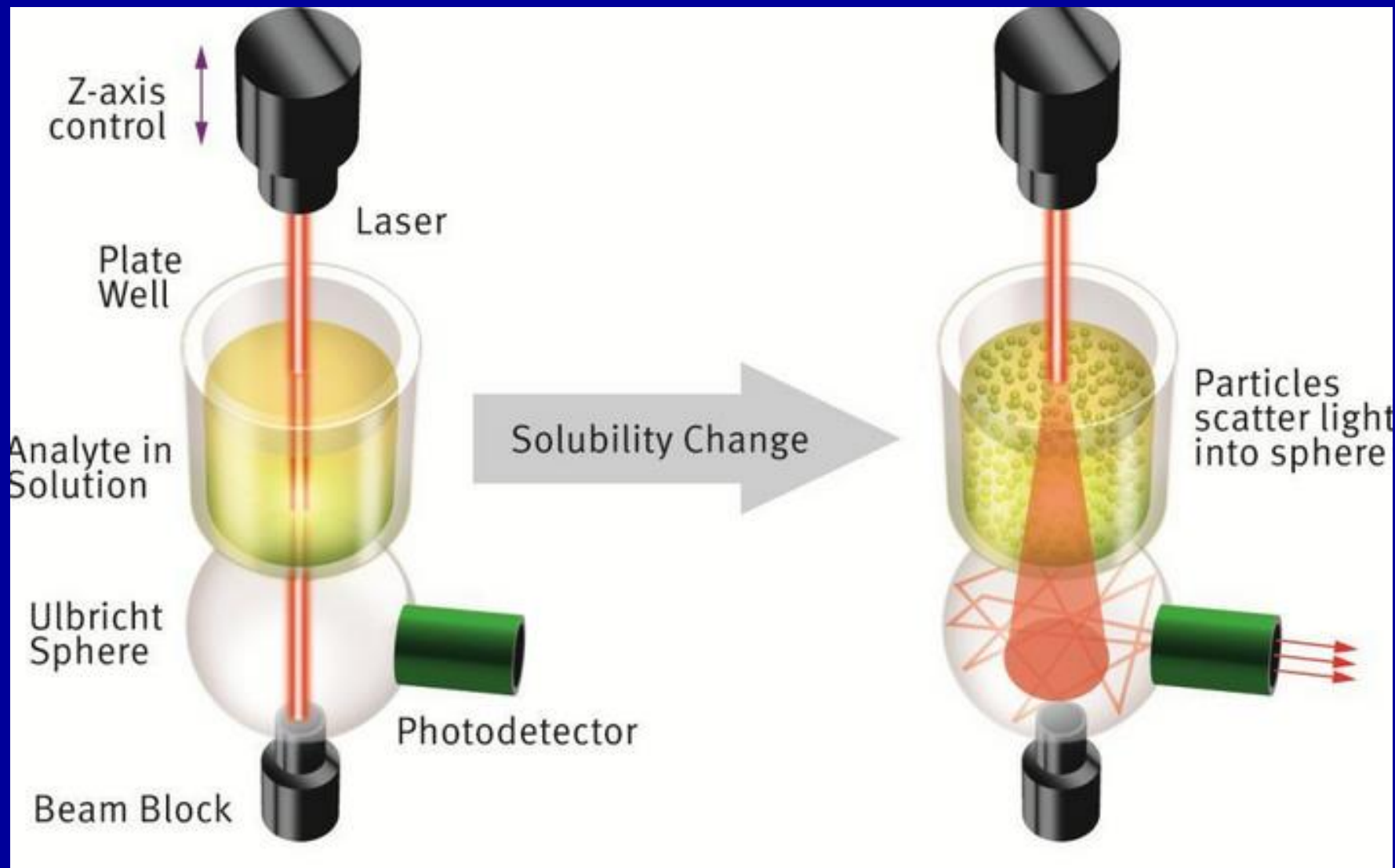
▪Μέτρηση αυτής της μείωσης στην ένταση  
της προσπίπτουσας δέσμης ακτινοβολίας  
που προκαλείται από τη σκέδαση, ανάκλαση  
και απορρόφηση της ακτινοβολίας

▪Θολωσιμετρία: Η θολερότητα μετράται υπό  
γωνία  $180^{\circ}$  ως προς την προσπίπτουσα  
δέσμη ακτινοβολίας.

▪Νεφελομετρία: Η θολερότητα μετράται υπό  
γωνία  $90^{\circ}$  ως προς την προσπίπτουσα  
δέσμη ακτινοβολίας.



# Θολωσιμετρία- Νεφελομετρία



## 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

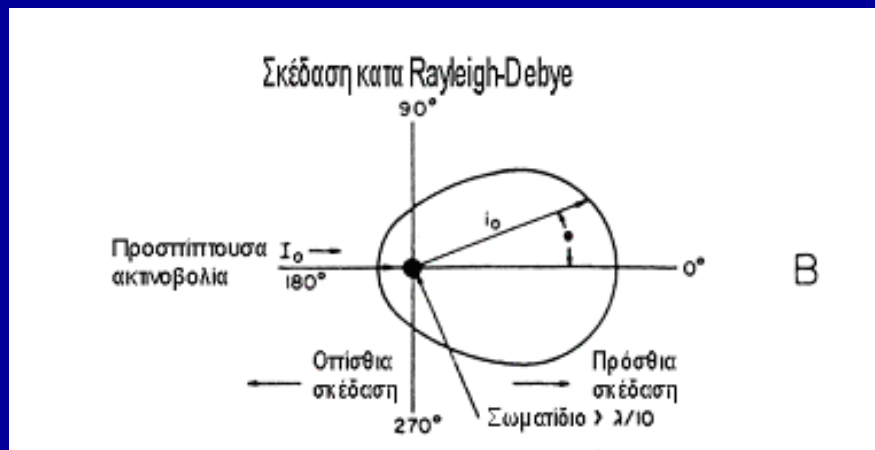
$t$  = θολερότητα

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

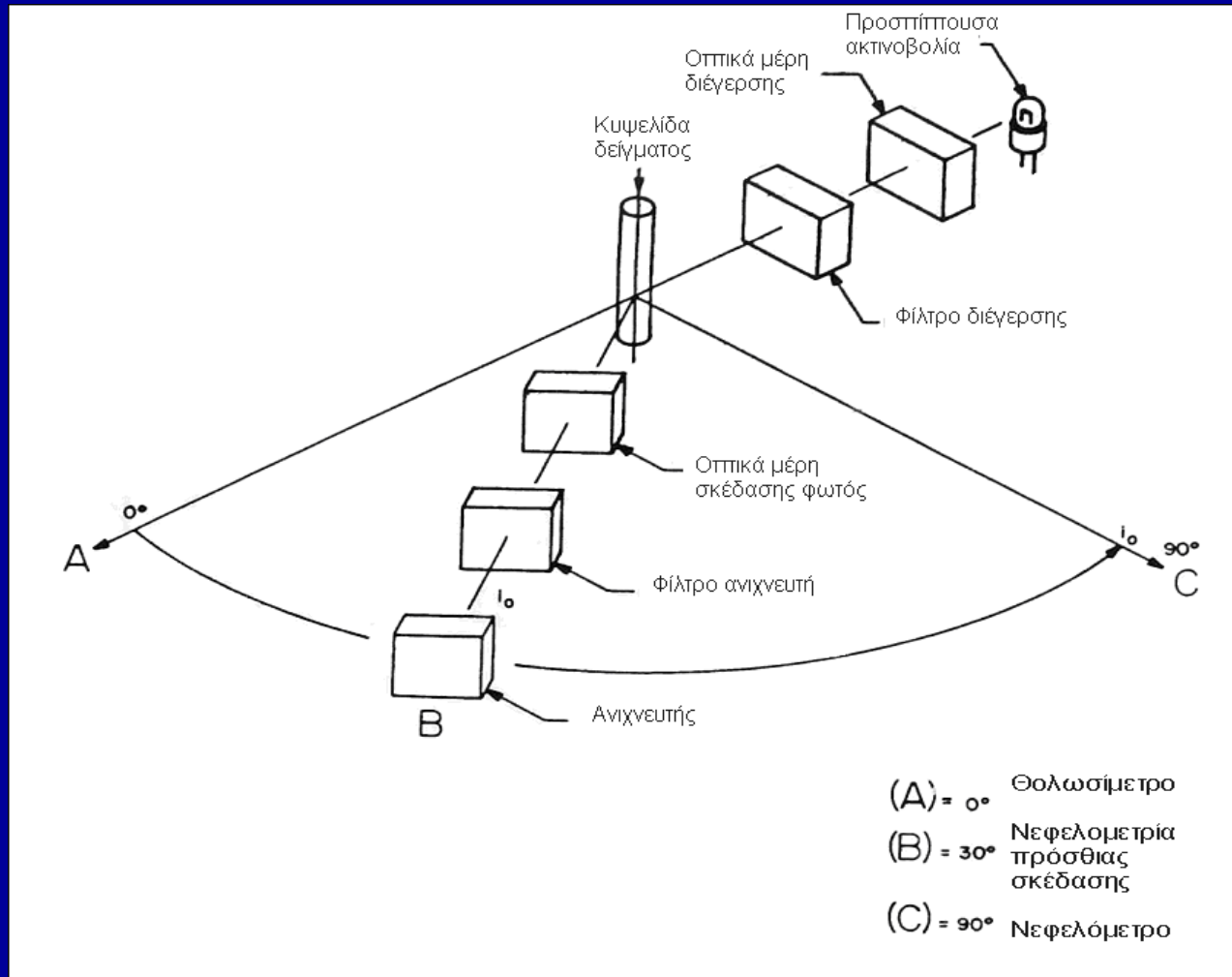
▪ Η θολερότητα μετράται υπό γωνία  $180^\circ$  ως προς την προσπίπτουσα δέσμη ακτινοβολίας.

## 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

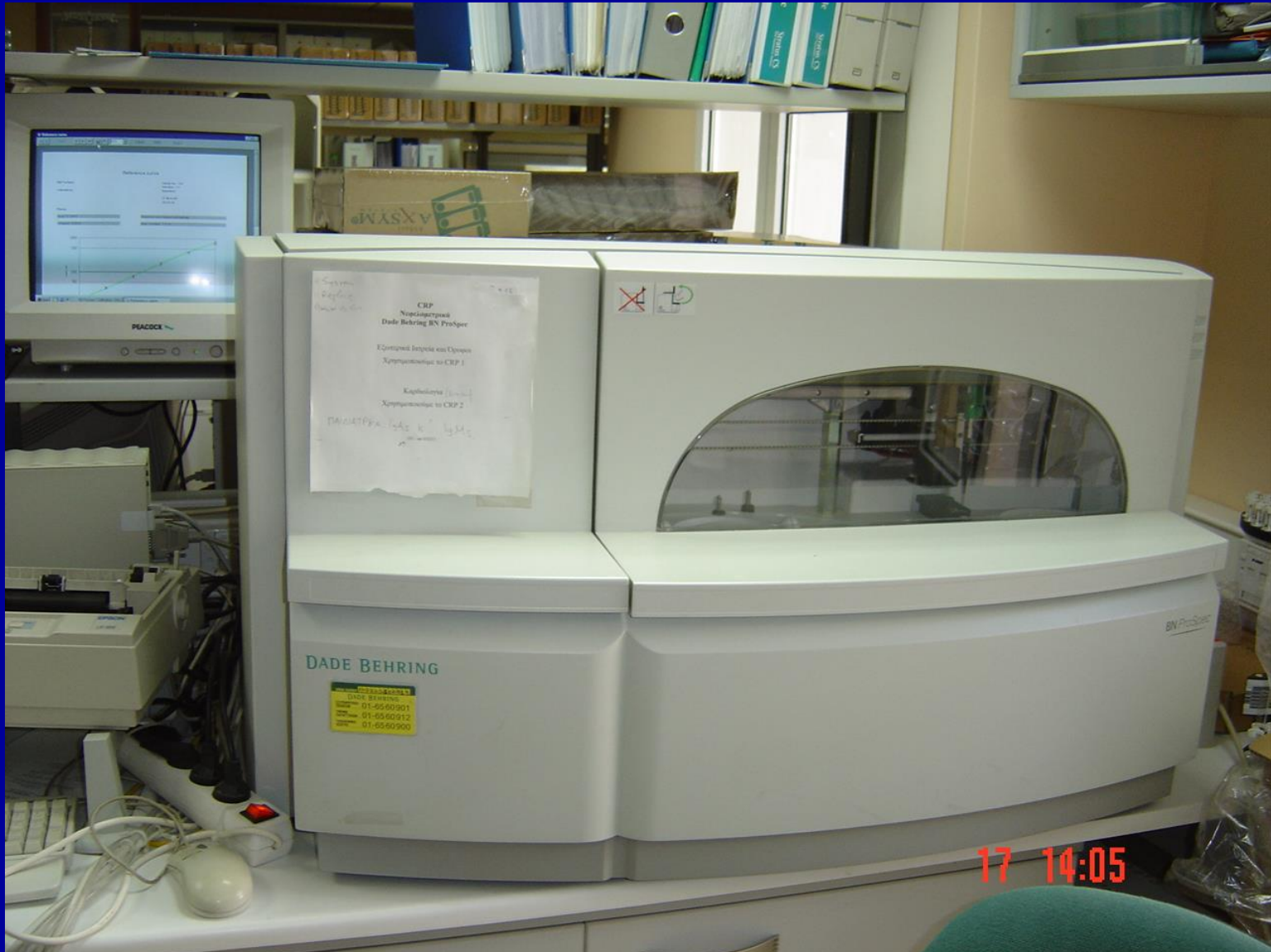


Σχηματικό διάγραμμα οργανολογίας για τη μέτρηση της σκέδασης ακτινοβολίας που δείχνει τη θέση των οπτικών οργάνων για θολωσίμετρο (A), για νεφελόμετρο πρόσθιας σκέδασης (B), νεφελόμετρο ορθής γωνίας (C)

# Θολωσίμετρο




# Νεφελόμετρο



# Ραδιοανοσοπροσδιορισμοί (Radioimmunoassays, RIA)

- Yallow & Berson (1959), ΒΡΑΒΕΙΟ NOBEL 1977
- ***YALOW R, BERSON S (1960). "Immunoassay of endogenous plasma insulin in man". J. Clin. Invest. 39 (7): 1157–75***

**Rosalyn Sussman Yalow**




Rosalyn Yalow (1977)

**Born** July 19, 1921  
New York City, New York, U.S.

**Died** May 30, 2011 (aged 89)<sup>[1]</sup>  
The Bronx, New York, U.S.

**Nationality** American

 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".

# Ραδιοανοσοπροσδιορισμοί (Radioimmunoassays, RIA)

- Yallow & Berson (1959), ΒΡΑΒΕΙΟ NOBEL 1977
- **YALOW R, BERSON S (1960). "Immunoassay of endogenous plasma insulin in man". *J. Clin. Invest.* 39 (7): 1157-75**
- ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑΘΜΟΣ για την ανάπτυξη των ιχνηθετημένων ανοσοχημικών προσδιορισμών.
- Προσδιορισμός ινσουλίνης στο πλάσμα με τη βοήθεια Ab και ινσουλίνης επισημασμένης με  $^{131}\text{J}$
- 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

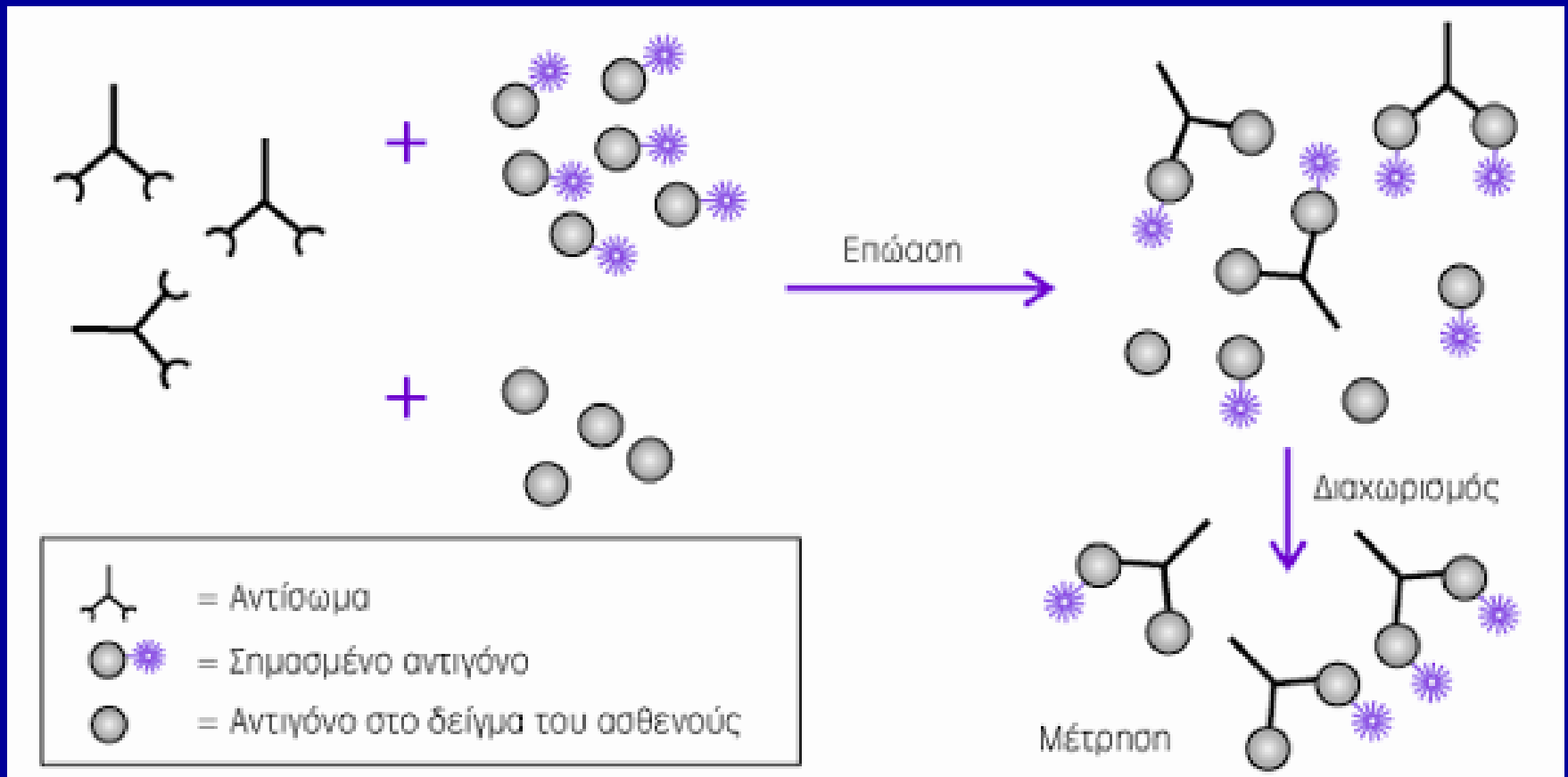
- Ραδιοϊσότοπο επιλογής---->  $^{125}\text{J}$
- εκπομπή  $\gamma$ -ακτινοβολίας (20-80 KeV)
- σχετικά μικρός χρόνος ημιζωής ,  $T_{1/2}=60$  μέρες
- ικανότητα σχηματισμού πλήθους ενώσεων λόγω ευρέως φάσματος καταστάσεων οξείδωσης του J
- εισαγωγή ατόμου J δεν επιφέρει δραματικές αλλαγές στη στερεοδιάταξη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

# ΡΑΔΙΟΙΧΝΗΘΕΤΕΣ

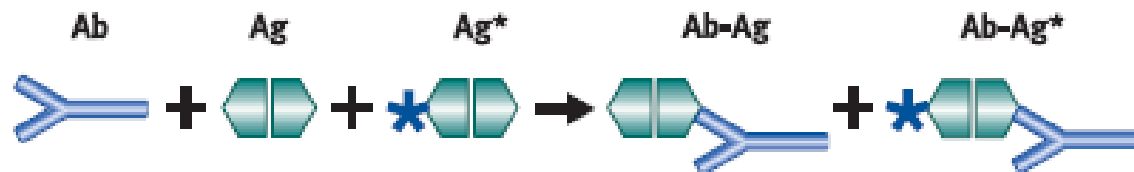
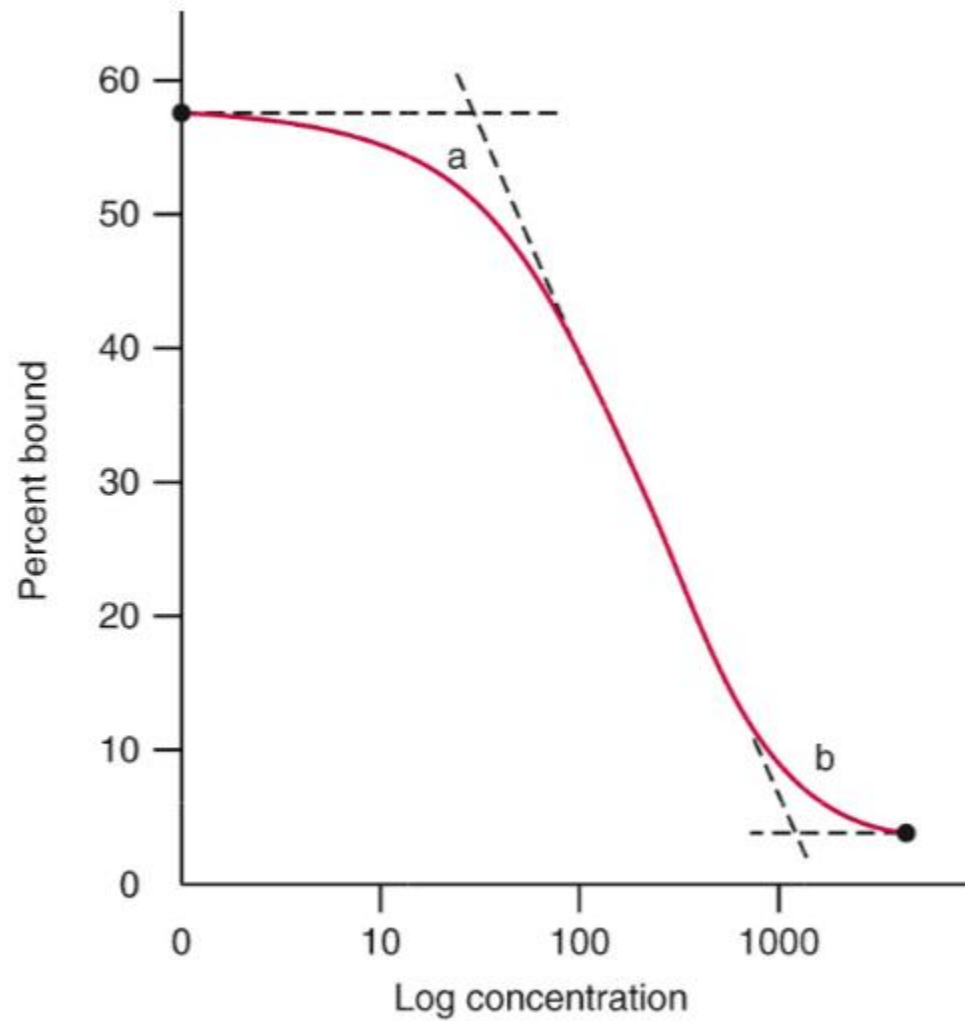
## Ισοτοπικοί Ιχνηθέτες

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

# ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ RIA ραδιοανοσολογική μέθοδος (ετερογενής)



# Competitive immunoassays



# 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

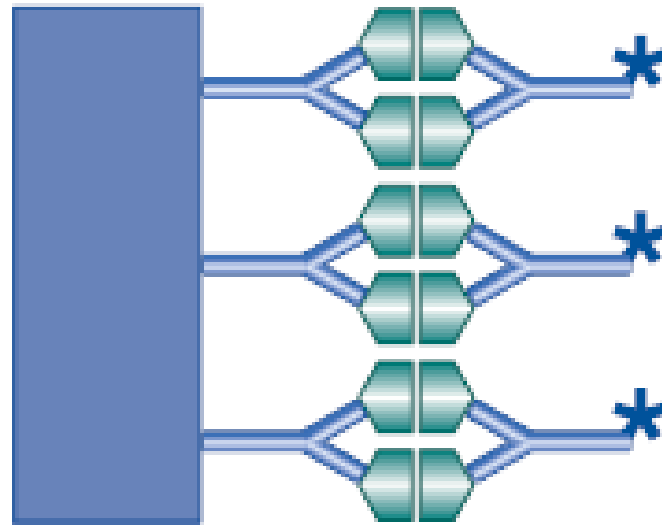
Κύρια πλεονεκτήματα έναντι των RIA:

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

# ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΙΡΜΑ ΤΥΠΟΥ Sandwich

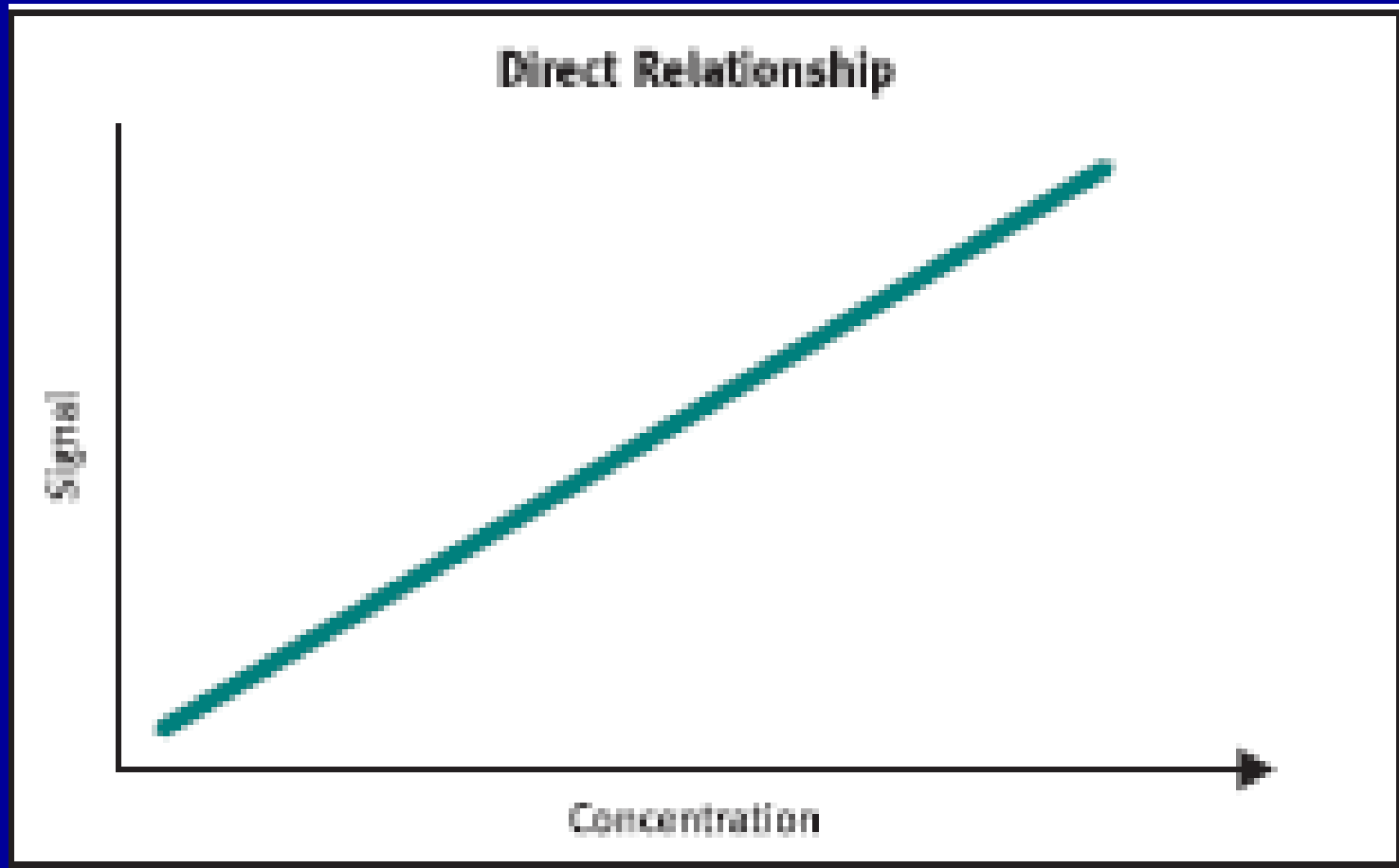
Sandwich Assays: Antibodies bind to two sites on analyte

Solid support:  
microparticles  
beads  
microtiter plates



απαραίτητη προϋπόθεση η ύπαρξη στο  
μόριο δύο απομακρυσμένων επιτόπων

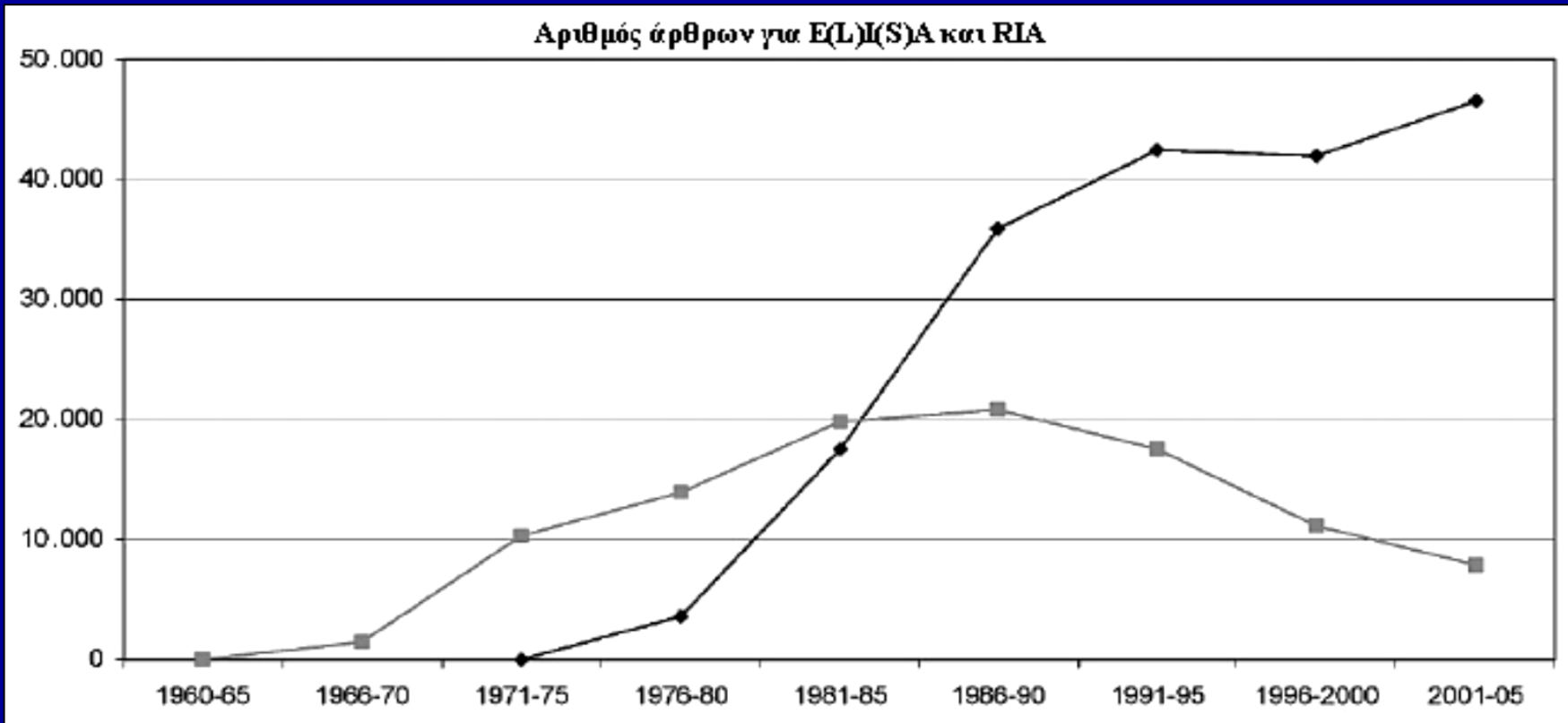
# Χαρακτηριστική καμπύλη αναφοράς





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

◆: EIA/ELISA, ■: RIA



# 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.

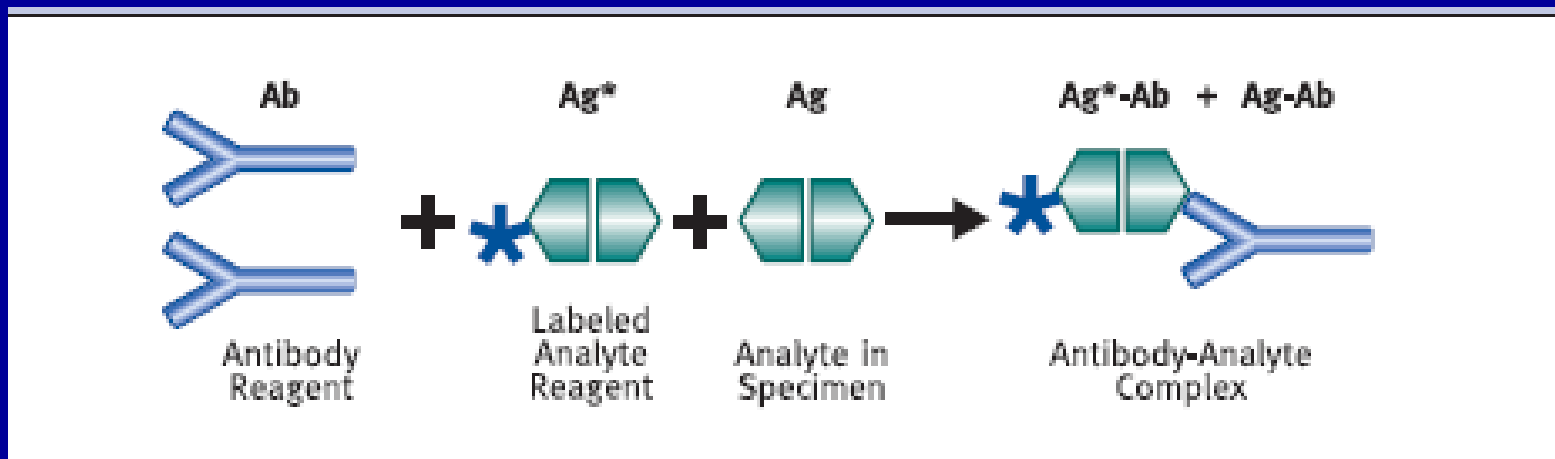
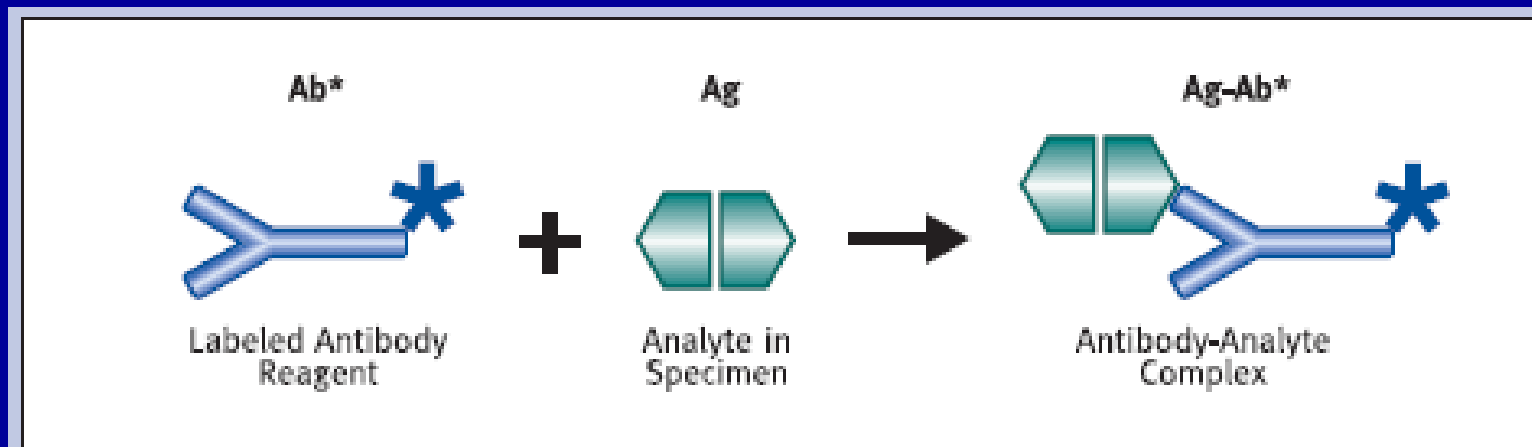
- β) ετερογενείς ανοσοχημικοί προσδιορισμοί (heterogeneous immunoassays)

\* 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.

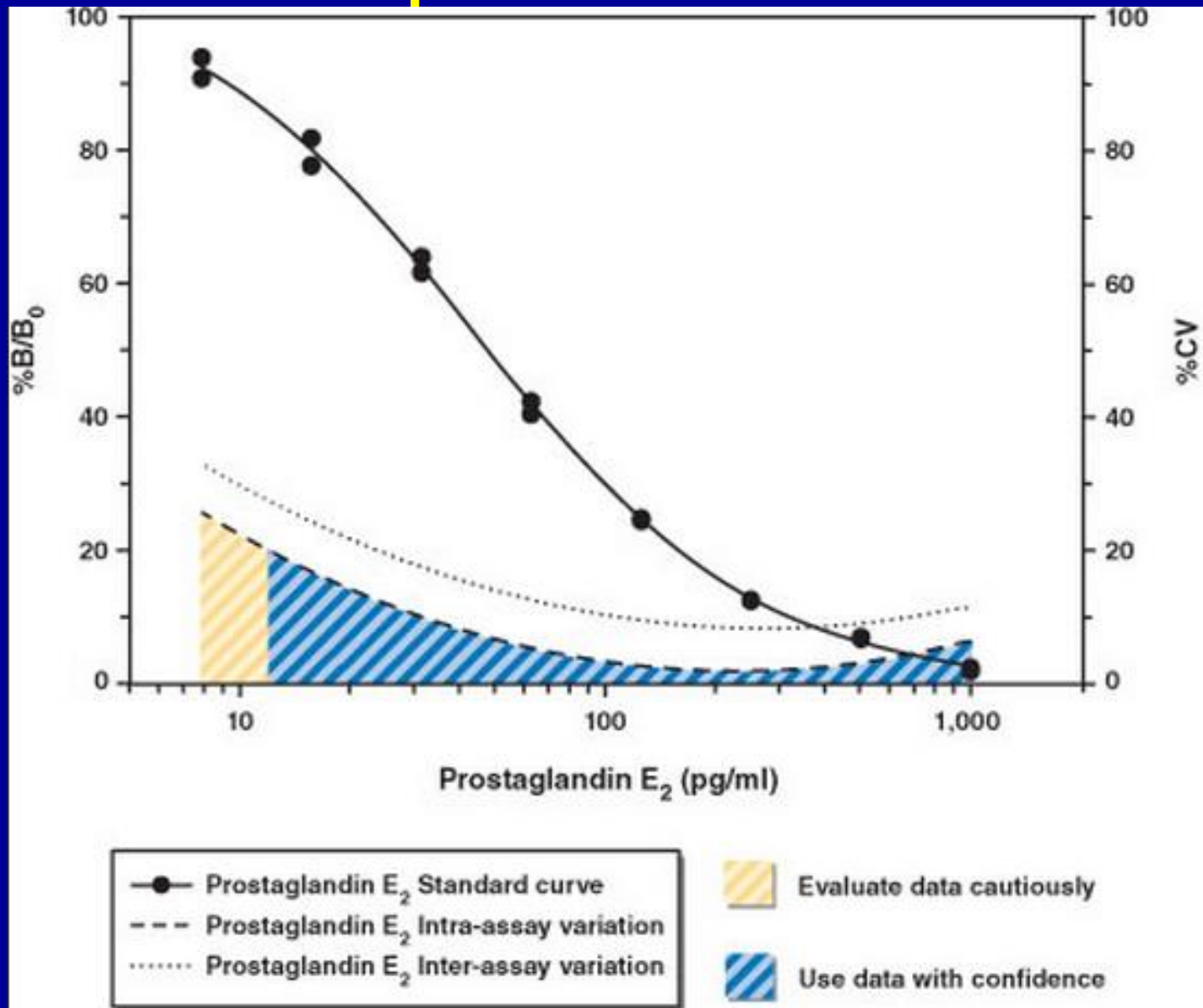
# ΧΡΗΣΙΜΟΙ ΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΟΥΣ ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΟΥΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥΣ

- **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

# ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΙΧΝΗΘΕΤΗΜΕΝΟΥ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ (COMPETITIVE)



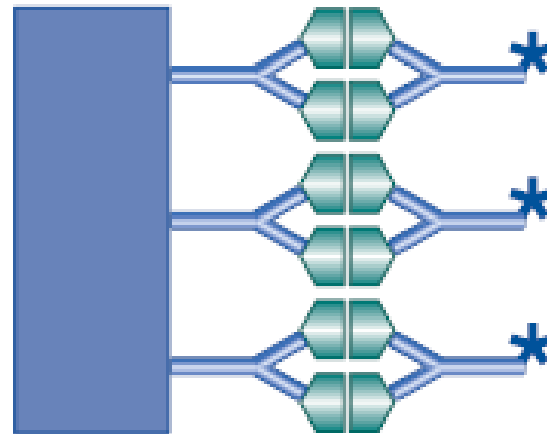
# Διάγραμμα βαθμονόμησης για ELISA ανταγωνιστικού τύπου



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

Sandwich Assays: Antibodies bind to two sites on analyte

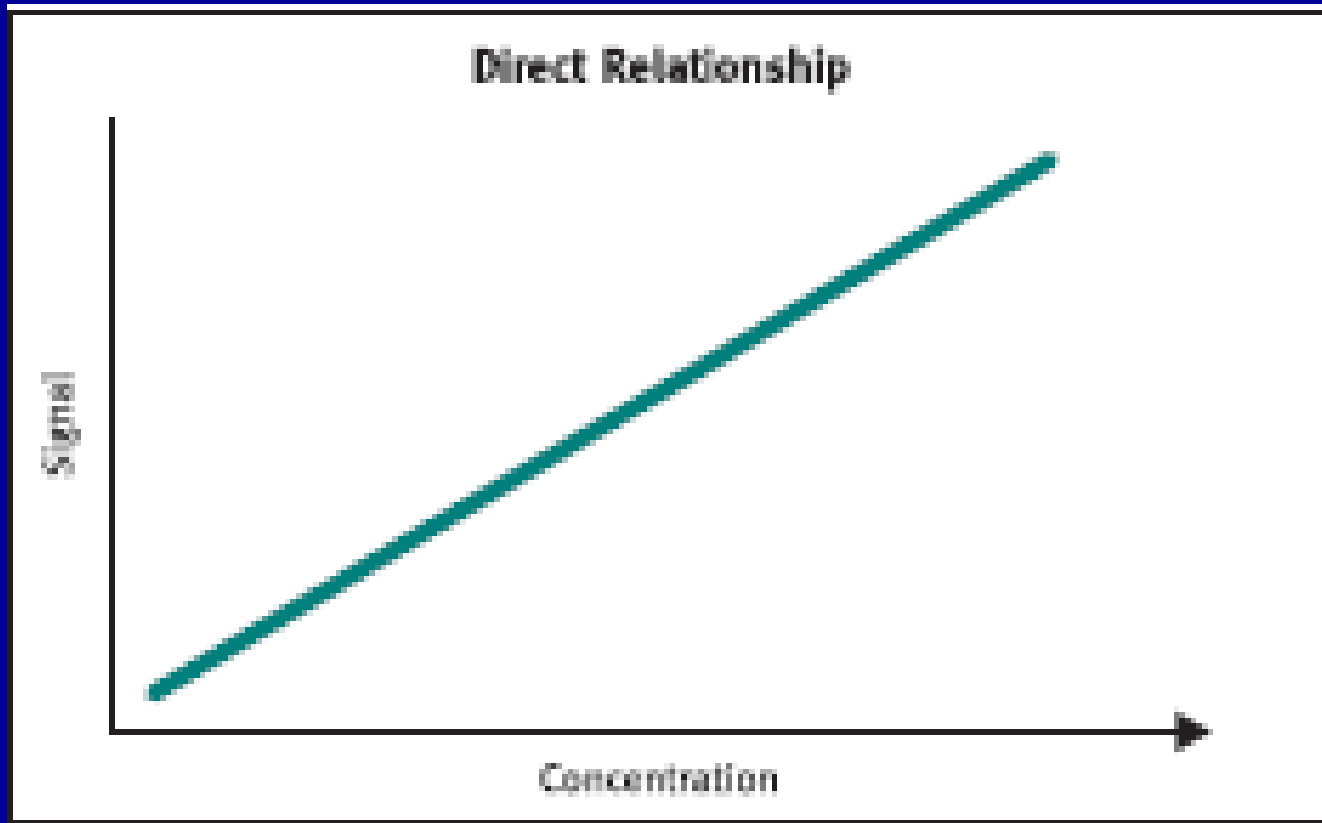
Solid support:  
microparticles  
beads  
microtiter plates



# ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΗ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ

(NON-COMPETITIVE, SANDWICH)

## Χαρακτηριστική καμπύλη αναφοράς



# ΙΧΝΗΘΕΤΗΜΕΝΟΙ ΑΝΟΣΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ (labelled immunoassays)

Ετερογενείς ανοσοχημικοί προσδιορισμοί  
(heterogeneous immunoassays)

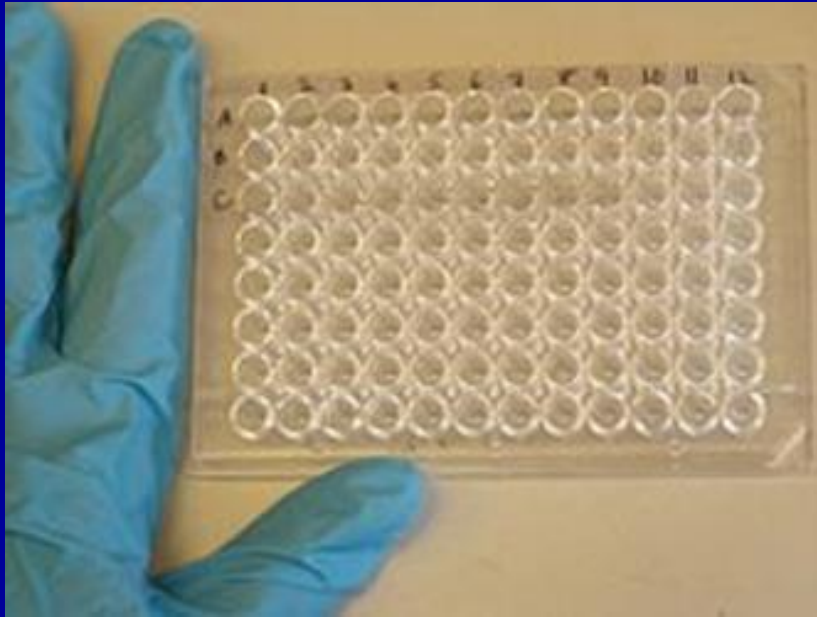
- \* στα συστήματα αυτά ο διαχωρισμός του μη-αντιδρώντος ιχνηθετημένου  $Ab^*$  ή  $Ag^*$  από το μίγμα της αντίδρασης είναι απαραίτητος κατά τη μέτρηση του αναλυτικού σήματος.

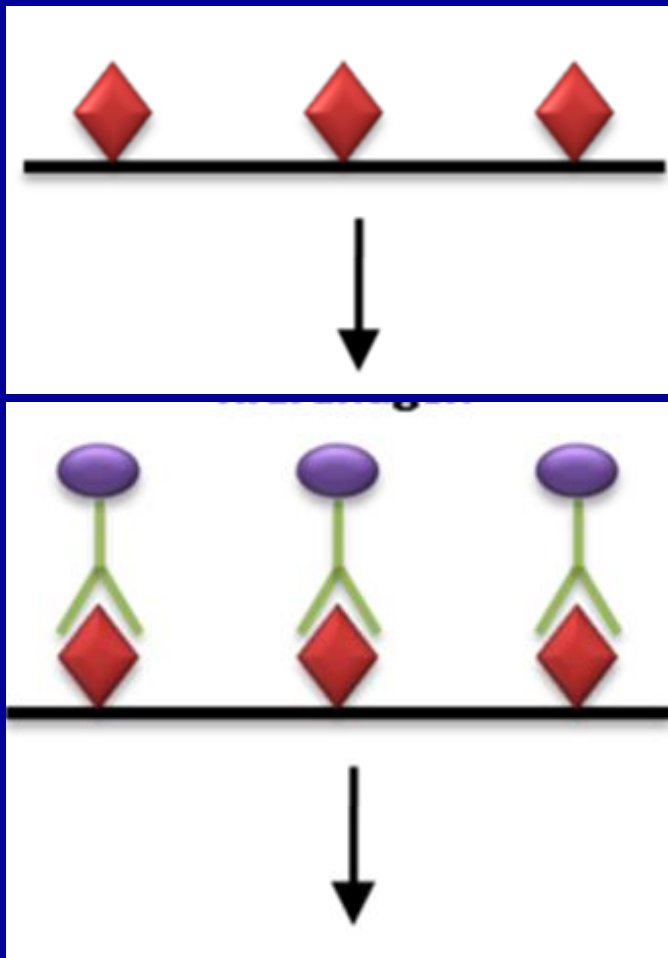


# ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ (enzyme immunoassays, EIA)

- *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

# Μέθοδος ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης (ELISA)





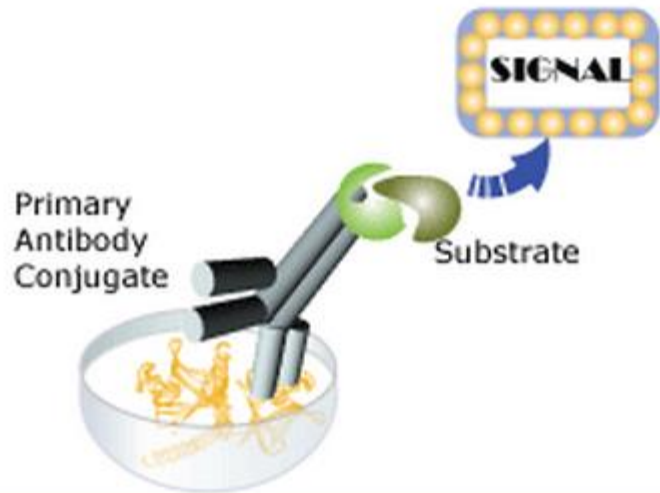
**Αντιγόνο  
ακίνητοποιημένο  
σε στερεά  
επιφάνεια**

**(ELISA)**

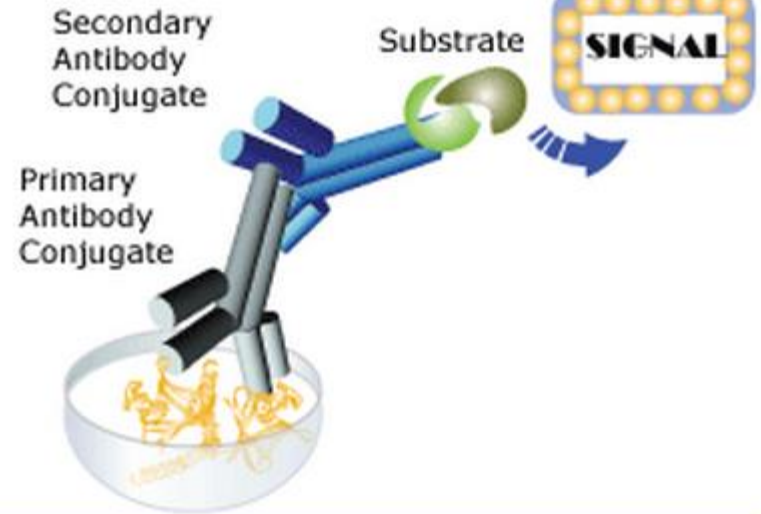
**Σύνδεση  
αντισώματος  
με το αντιγόνο**

**Τελική  
αντίδραση**

# Τύποι ELISA

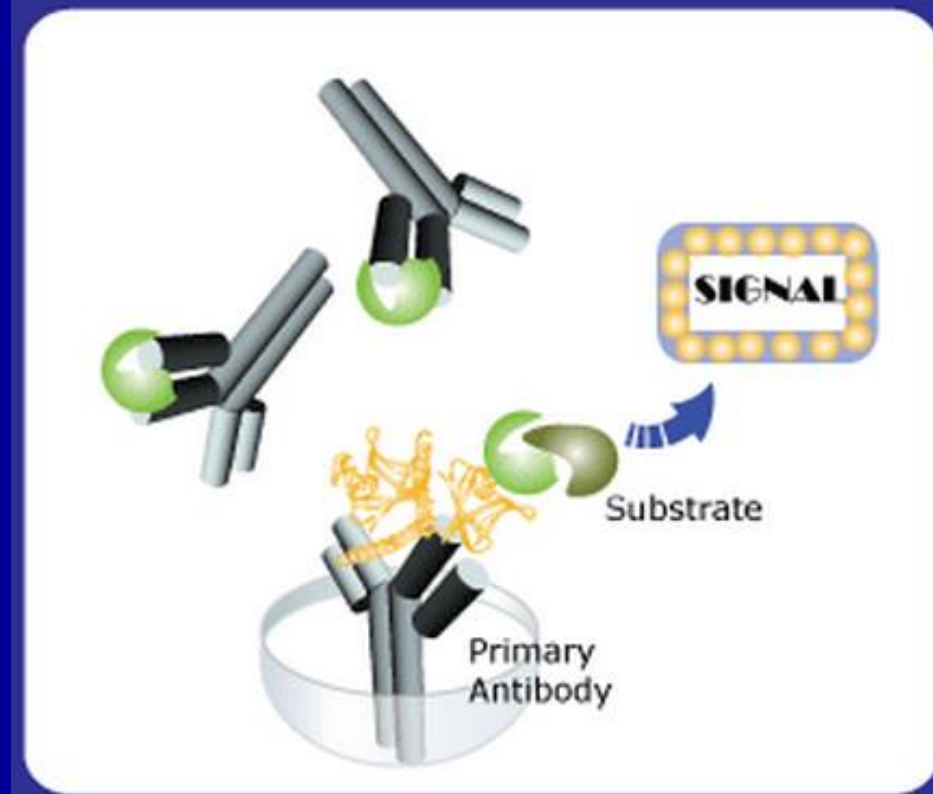
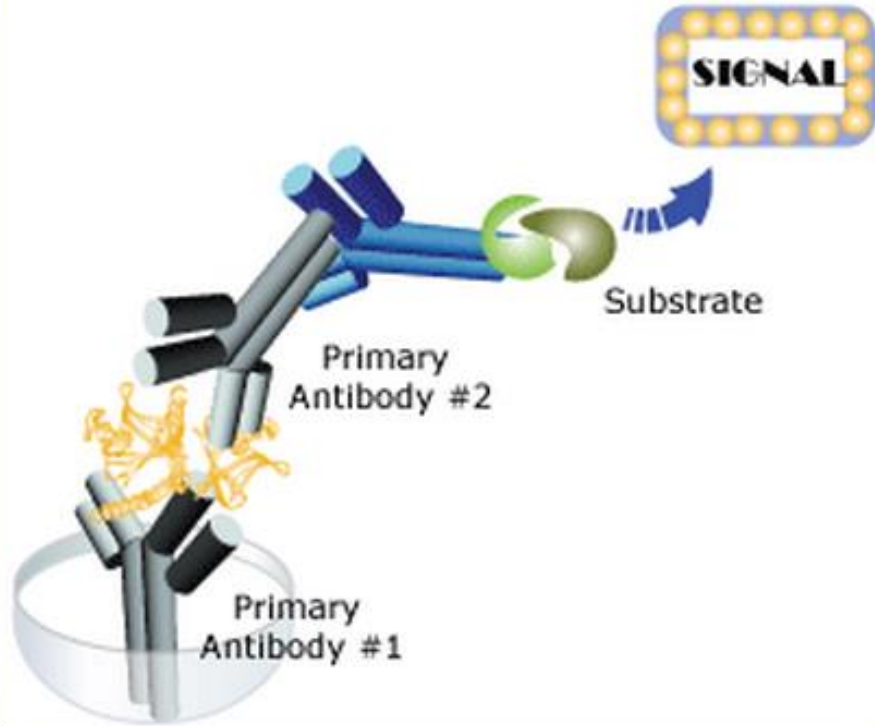


άμεση



έμμεση

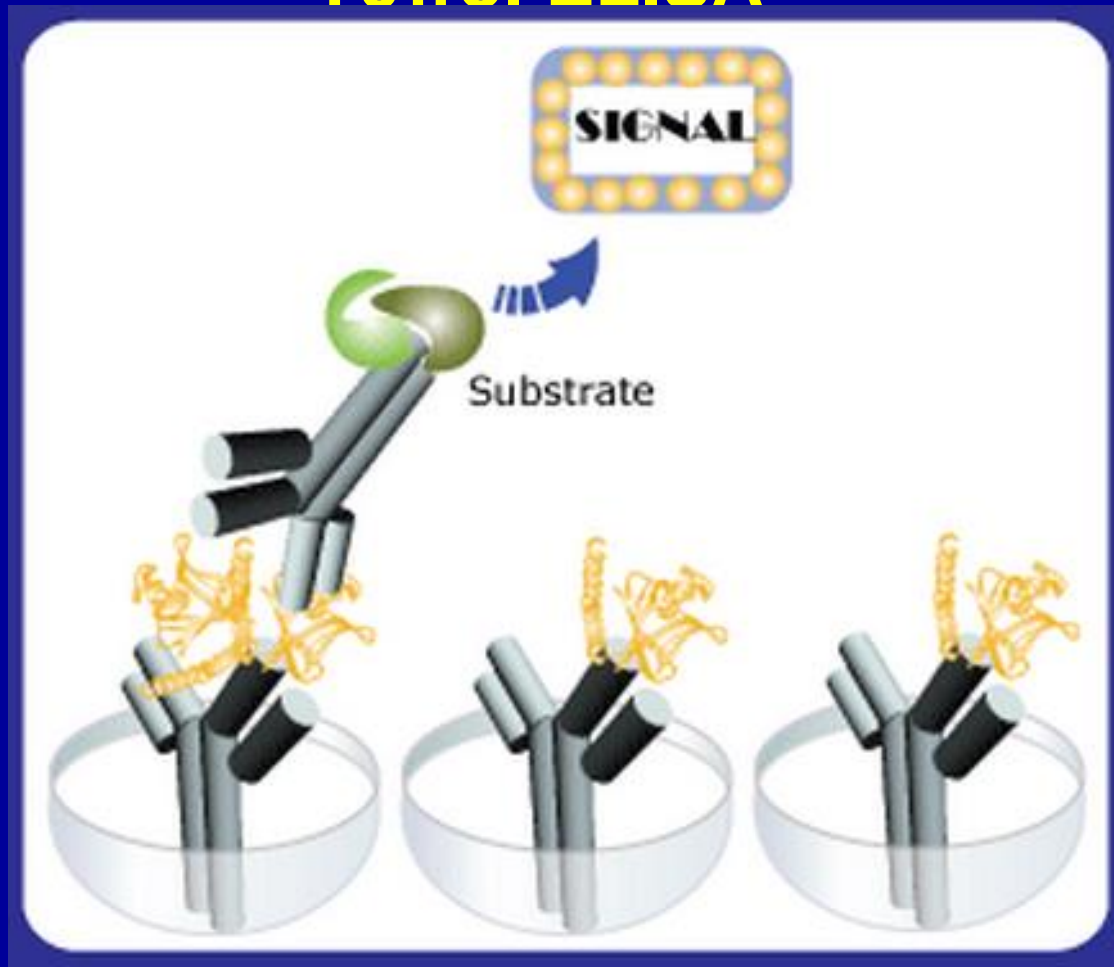
# Τύποι ELISA



**Μη-ανταγωνιστικού  
τύπου (Sandwich)**

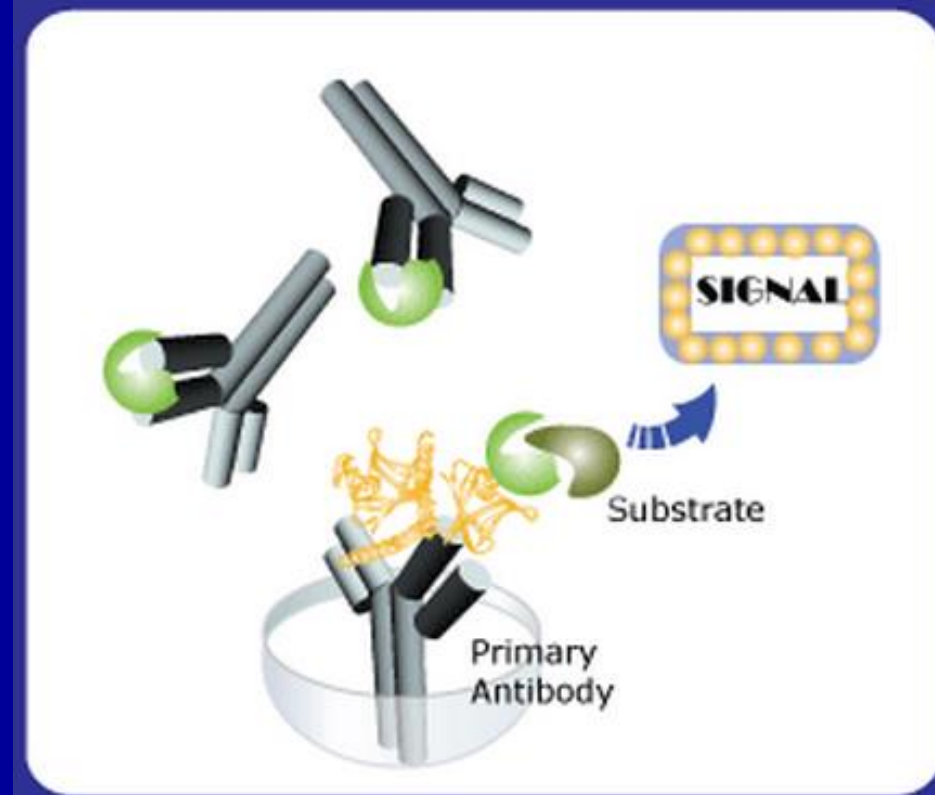
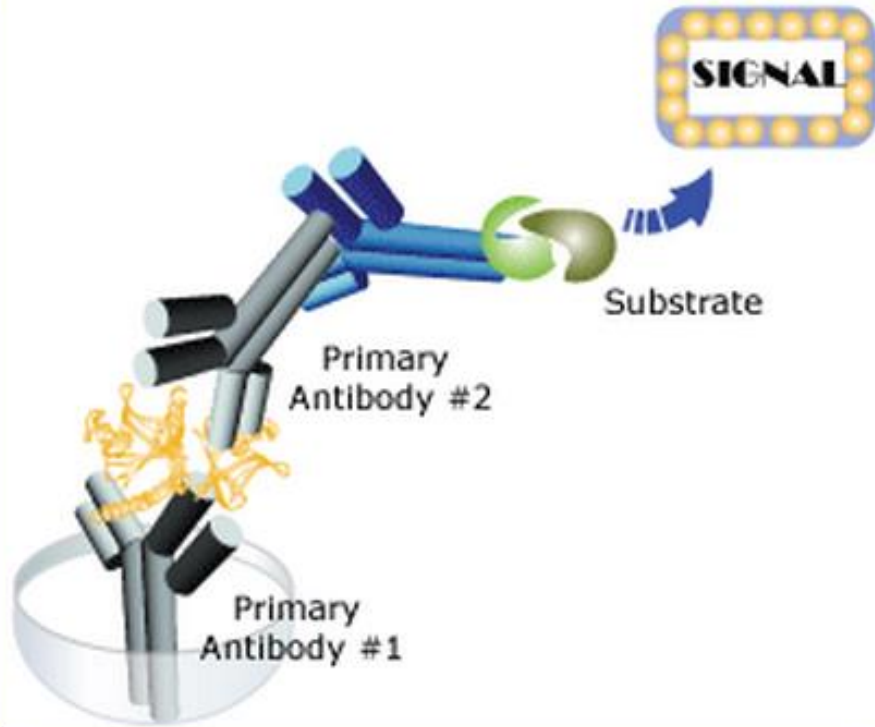
**ανταγωνιστικού  
τύπου**

# Τύποι ELISA



**Πολλαπλή  
πολλά αντισώματα έναντι διαφορετικών  
αντιγόνων  
Ταυτόχρονη ανίχνευση**

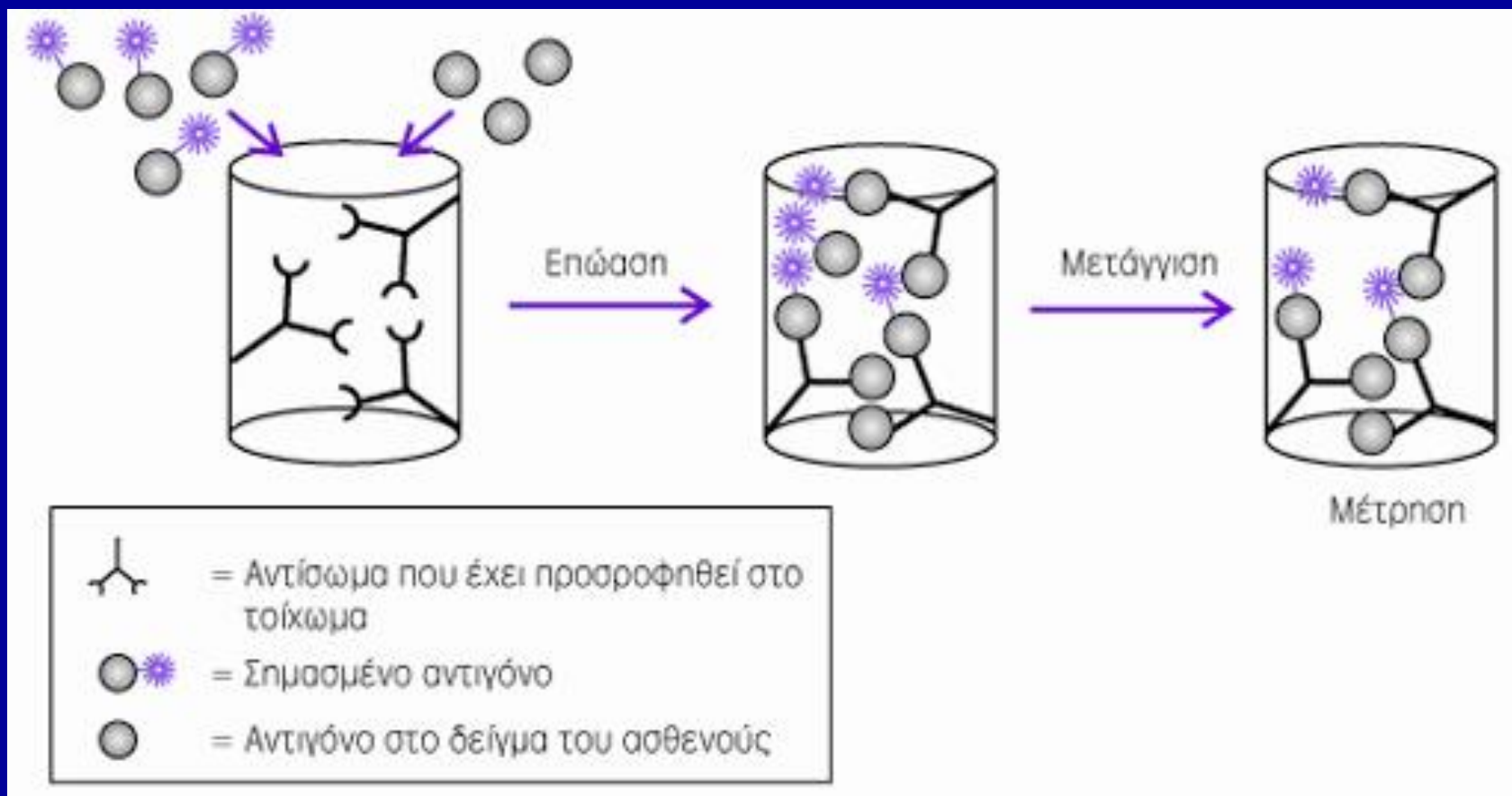
# Τύποι ELISA



Μη-ανταγωνιστικού  
τύπου (Sandwich)

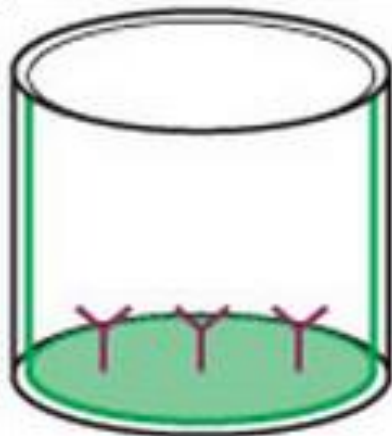
ανταγωνιστικού  
τύπου

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

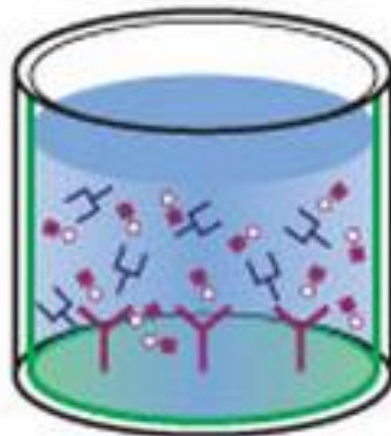




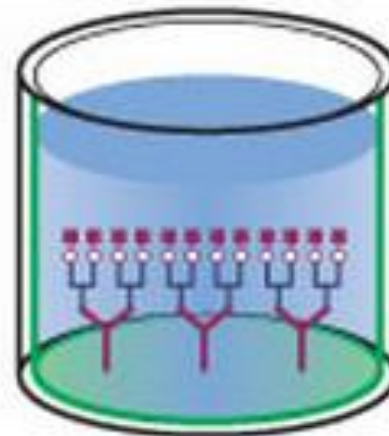
# ELISA ανταγωνιστικού τύπου



Wells are coated with blocking protein (green) and antibody-capturing IgG (Y).



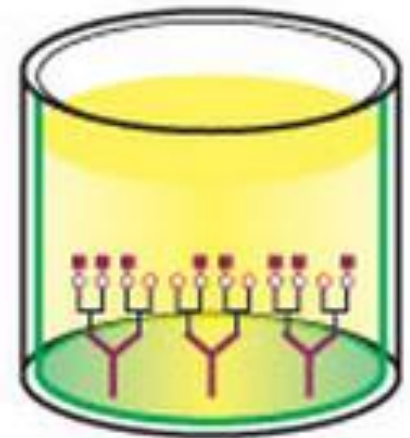
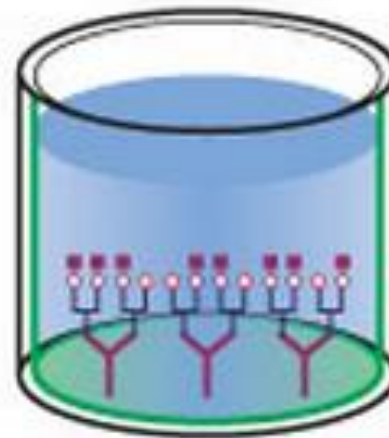
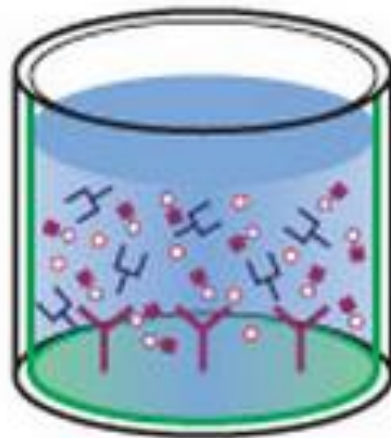
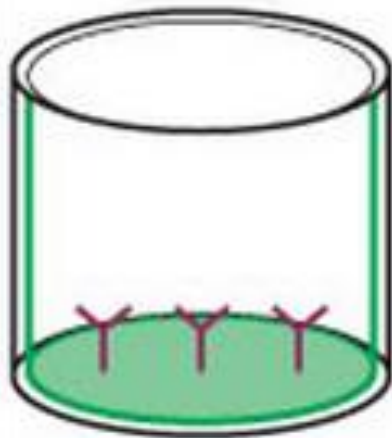
Experimenter adds specific antiserum (Ψ), analyte/tracer conjugate (⊗), and analyte (α), lower only.



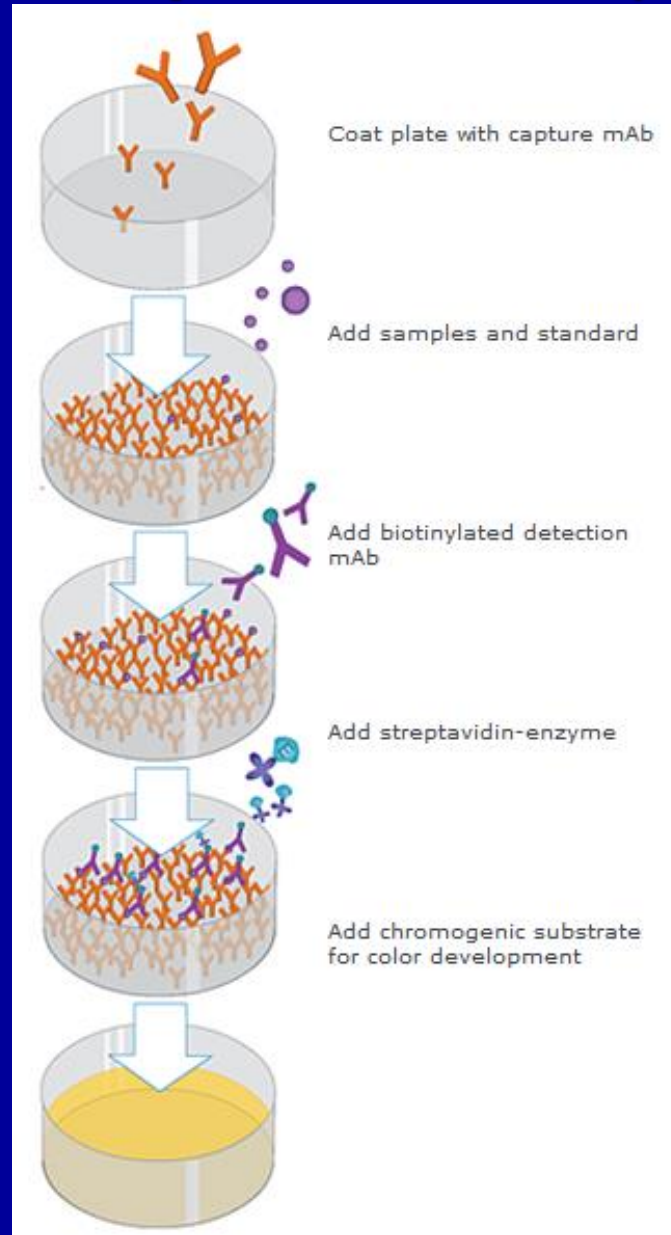
After incubation, wells are washed to remove all the unbound material



Color development is proportional to the amount of bound tracer.



# Σχηματική παράσταση των σταδίων μιας τυπικής ELISA





# Οργανολογία κλασικής ELISA

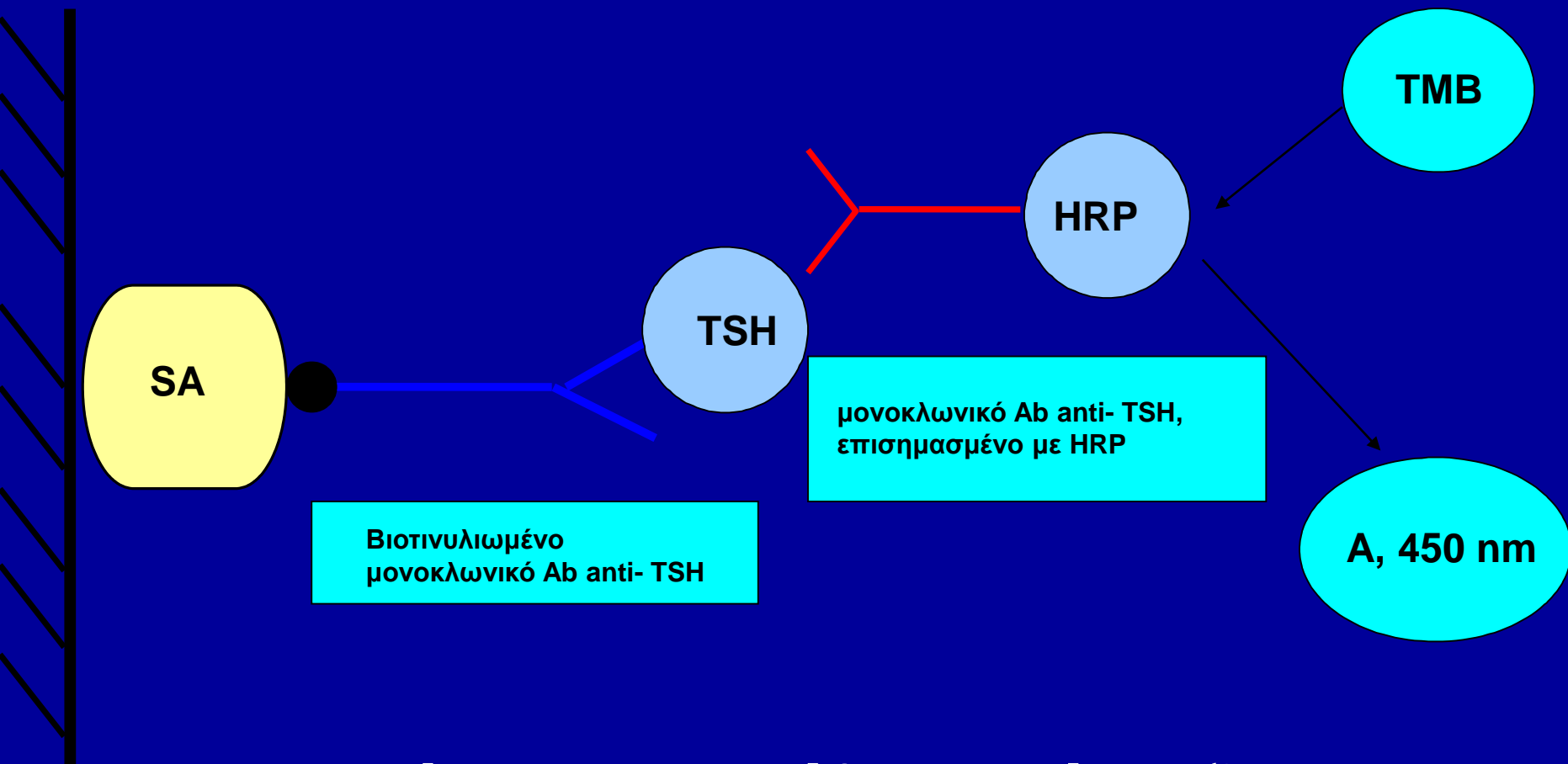


**ELISA reader**



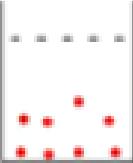
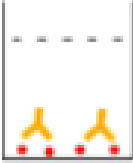

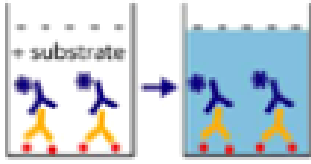
**ELISA washer**

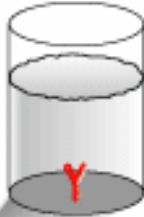
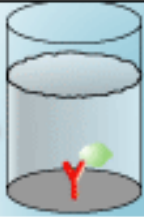


# ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΙΡΜΑ ΤΥΠΟΥ Sandwich



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 <sup>ο</sup> αντίσωμα   |
|    |    |
| 4. | Έκπλυση  |
| 5. | Επώαση με 2 <sup>ο</sup> αντίσωμα συνυδεδεμένο με ένζυμο (*)                         |
|    |   |
| 6. | Έκπλυση  |
| 7. | Επώαση με το υπόστρωμα του ενζύμου και ανάπτυξη του χρώματος                         |
| 8. |  |

|    |  |
|----|--|
| 1. | Δέσμευση του 1 <sup>ου</sup> (Α) αντισώματος στην μικροκυψελίδα  |
|    |   |
| 2. | Εκπλυση  |
| 3. | Επώαση με δείγμα που περιέχει το αντιγόνο  |
|    |   |
| 4. | Εκπλυση  |
| 5. | Επώαση με το 1 <sup>ο</sup> (Β) αντίσωμα   |
|    |   |
| 6. | Εκπλυση  |
| 7. | Επώαση με το 2 <sup>ο</sup> αντίσωμα σημειωμένο με ένζυμο  |
| 8. | <br>Επώαση με το υπόστρωμα του ενζύμου και ανάλυση του χρώματος |

## Σχηματική παράσταση των σταδίων ELISA τύπου sandwich

# 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



# 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><br>EC 1.11.1.7 | Ρεπάνια           | 5 – 7       | 4500                               |
| <u>Αλκαλική φωσφατάση</u>         | <u>Υδρολάση</u><br>EC 3.1.3.1  | Στομάχι μοσχαριού | 9 – 10      | 1000                               |
| <u>β-Γαλακτοσιδάση</u>            | <u>Υδρολάση</u><br>EC 3.2.1.23 | <u>E. coli</u>    | 6 – 8       | 600                                |

# Horse Radish Peroxidase, (HRP)

Οξειδάση, EC 1.11.1.7

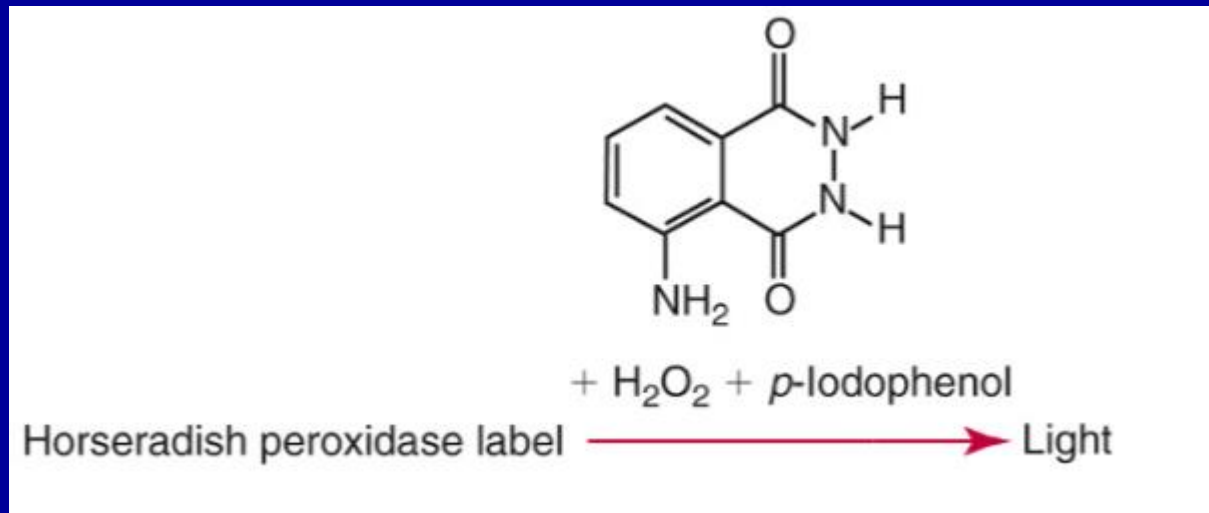
\* βέλτιστο pH 5-7

\* Μοριακό βάρος .... 44000 Da

\* Ειδική ενεργότητα ... 4500 U/mg

• Ειδική αντίδραση

**Chemiluminescent assay for horseradish peroxidase label using luminol**



κυριώτερα υποστρώματα

❖ *o*-methoxyphenol (guaiacol)

❖ *o*-phenylenediamine (*o*-PD) ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΟ!

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

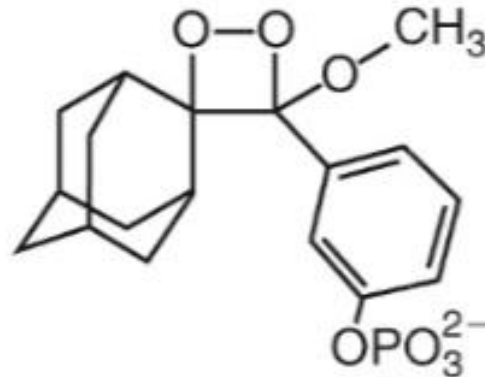
❖ 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline sulfonate-6) (ABTS)

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

❖ *n*-hydroxyphenylacetic acid (HPAA) κ.ά.

# 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.



(AMPPD)

Alkaline phosphatase label  $\longrightarrow$  Light

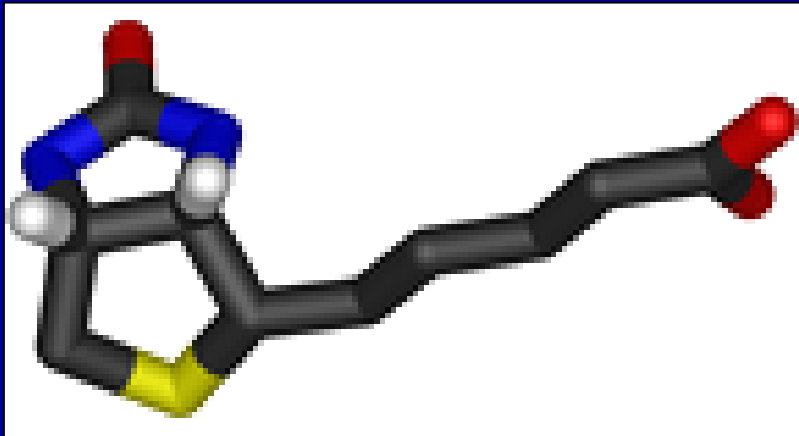
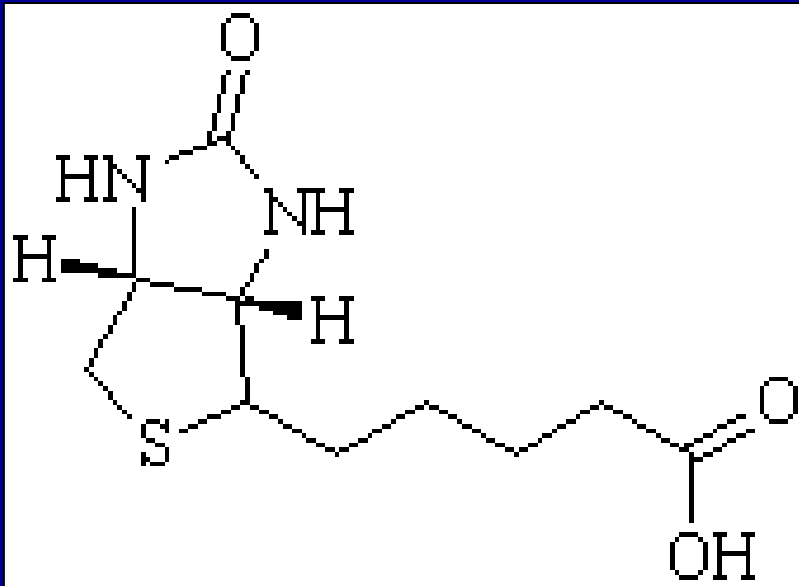
**Chemiluminescent assay for an alkaline phosphatase label using 3-(2'-spiroadamantyl)-4-methoxy-4-(3''-phosphoryloxy)-phenyl-1,2-dioxetane (AMPPD)**

- κυριώτερα υποστρώματα:
- p-nitrophenyl- phosphate (pNP)
- 4-methyl-umbelliferone phosphate (MUP)

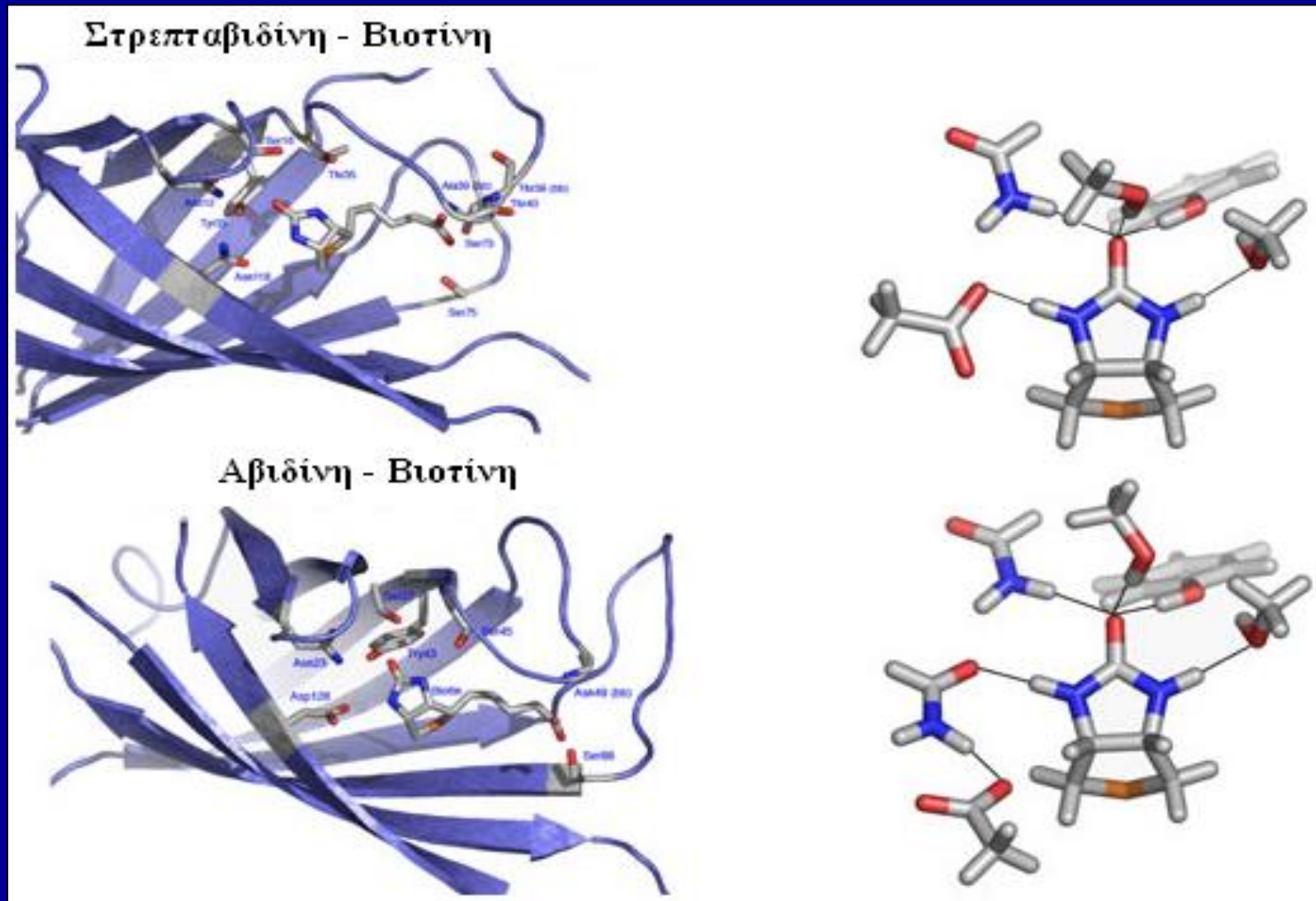
### 3) $\beta$ - Γαλακτοσιδάση ( $\beta$ -galactosidase)

- 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- $\beta$ -D-galactopyranoside (o-NPG)
  - chlorophenolic red-  $\beta$ -D-galactopyranoside (CRPG)
  - 4-methyl-umbelliferyl  $\beta$ -D-galactopyranoside (MUG)

# Σύστημα βιοτίνης – στρεπταβιδίνης



# Σύστημα βιοτίνης – στρεπταβιδίνης



αριστερά: Αναπαράσταση δομής συμπλόκων στρεπταβιδίνης-βιοτίνης και αβιδίνης βιοτίνης

δεξιά: Αντίστοιχα μοντέλα θέσεων σύνδεσης.

# γέφυρα βιοτίνης – στρεπταβιδίνης

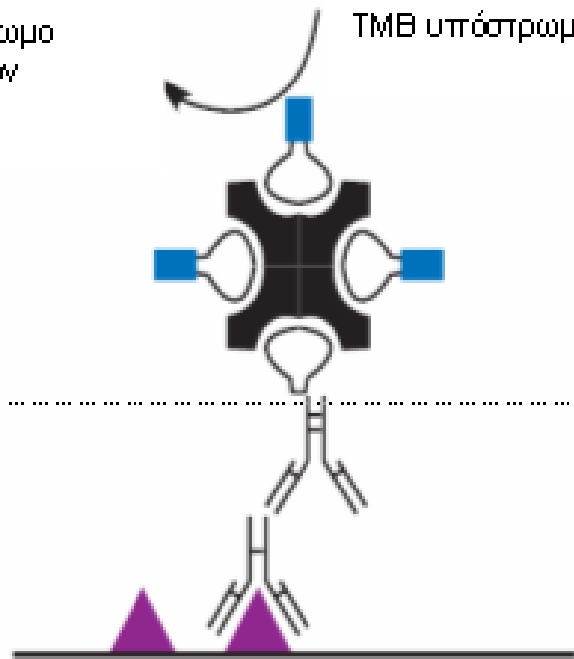
- Ιδιότητες του συστήματος:
  - Μη ομοιοπολική σύνδεση των δύο μορίων → τεράστια σταθερά σχηματισμού ( $K = 10^{15}$  L/mol), διατήρηση του συμπλόκου χωρίς συνέπειες από την επίδραση που ασκούν αλλαγές στο pH, χαοτροπικοί παράγοντες, πολλαπλές εκπλύσεις κ.λπ.
  - Ο δεσμός χαρακτηρίζεται από μεγάλη ειδικότητα.
  - Στρεπταβιδίνη 4 (αβιδίνη 2) θέσεις δέσμευσης βιοτίνης - > πολλαπλή βιοτινυλίωση.
  - Βιοτίνη: μικρό μόριο, εισαγωγή της σε βιολογικώς δραστικά μόρια συνήθως δεν επηρεάζει τις ιδιότητες των μορίων στα οποία συνδέεται
  - Στρεπταβιδίνη: ιδιαίτερα ανθεκτική στις δραστικές συνθήκες που απαιτούνται για τη σύνδεσή της με μόρια μικρού ή μεγάλου μοριακού βάρους ή στερεές επιφάνειες. Δε χάνει την ενεργότητα σύζευξής της με βιοτίνη.

# Σύστημα βιοτίνης – στρεπταβιδίνης

(α) ELISA

Έγχρωμο προϊόν

TMB υποστρώμα

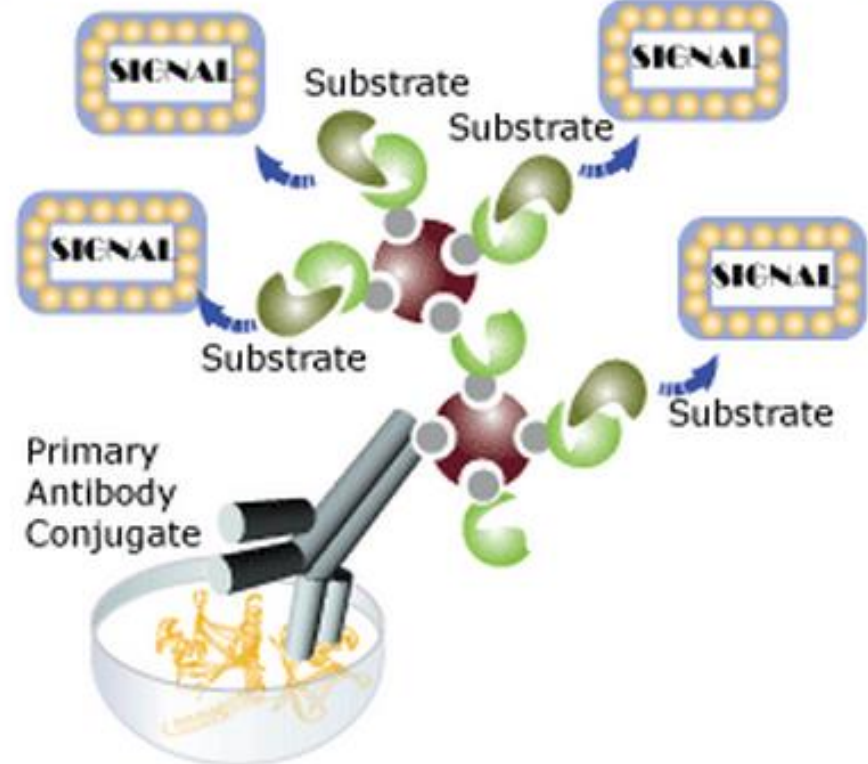


Βιοτίνη

Αντιγόνο

Στρεπταβιδίνη

## Ενίσχυση σήματος μέσω γέφυρας στρεπταβιδίνης-βιοτίνης

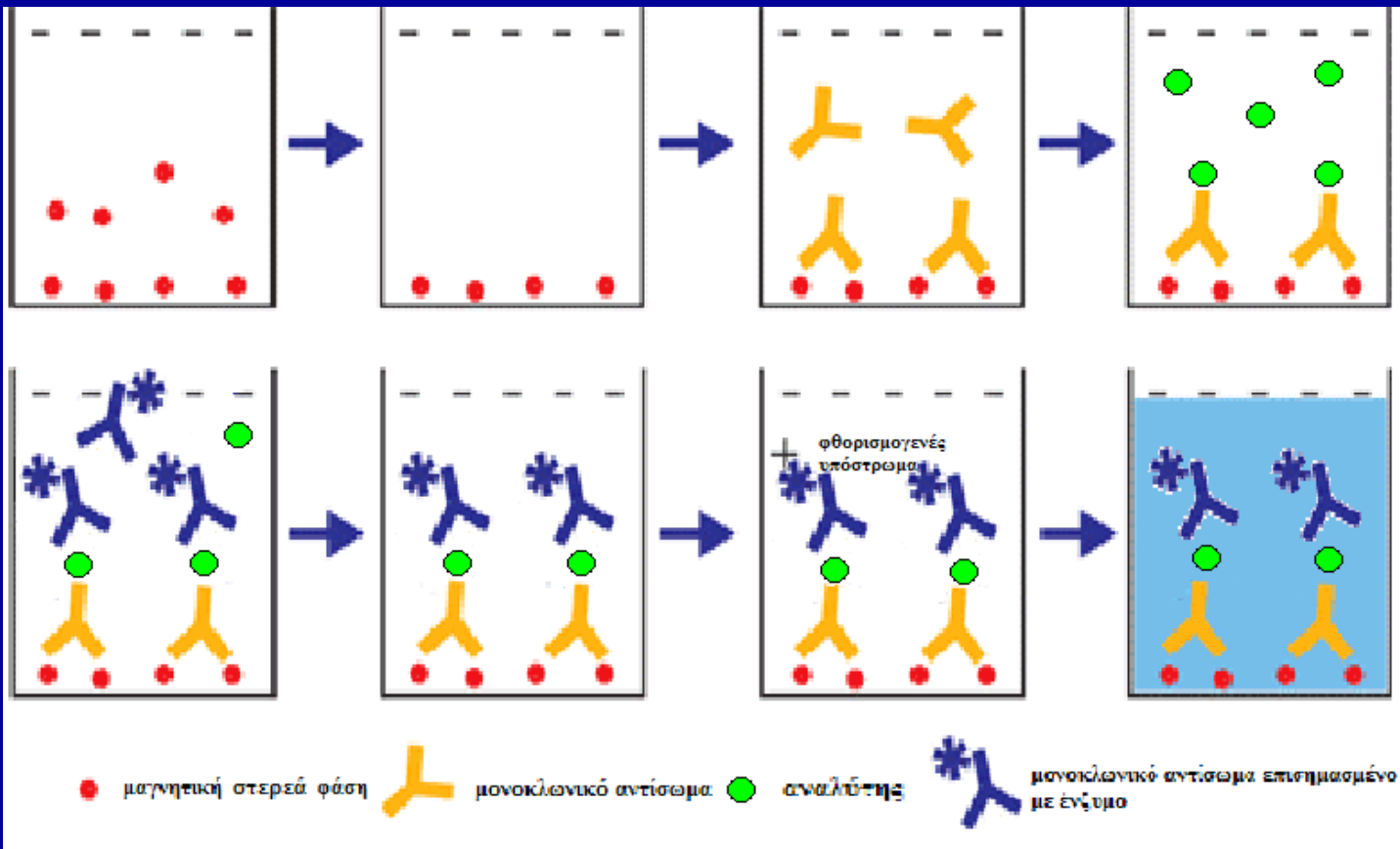




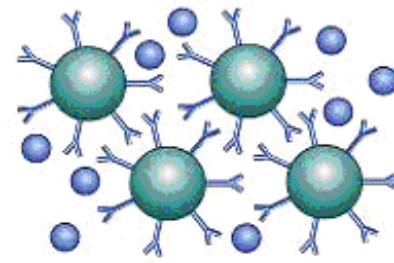
# Ανοσοφθορισμομετρικοί προσδιορισμοί

- 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

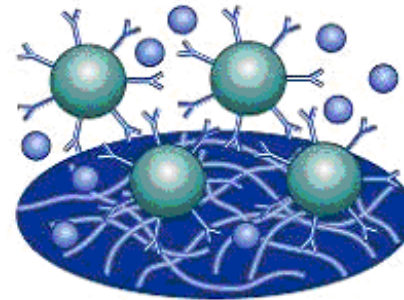
# Ανοσοφθορισμομετρικοί προσδιορισμοί



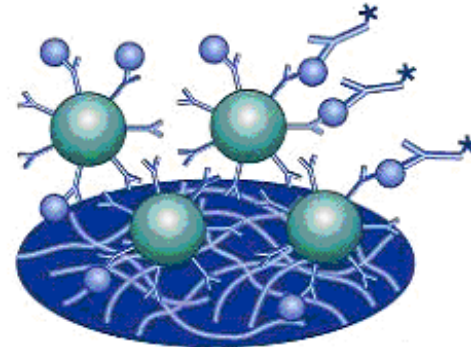
# Σύστημα Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA)



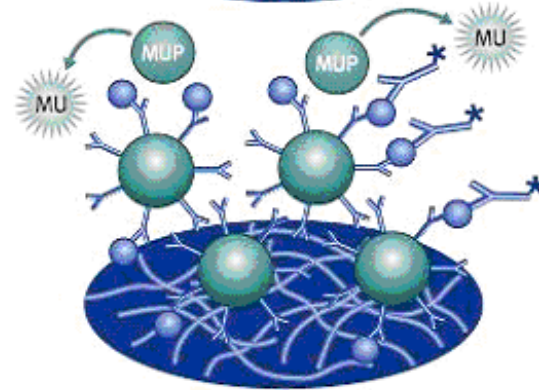
Μικροσωματίδια επικαλυμμένα με αντισώματα επωάζονται μαζί με το δείγμα για να σχηματίσουν το μίγμα αντίδρασης.



Ένα μέρος του μίγματος αντίδρασης μεταφέρεται σε στερεά επιφάνεια που αποτελείται από δίκτυο υαλονημάτων.



Αντισώματα ιχνηθετημένα με αλκαλική φωσφατάση προσδένονται στο μικροσωματιδιακό σύμπλεγμα.



Το υπόστρωμα του φωσφορικού εστέρα της 4-μέθυλο-ουμπελλιφερόνης (MUP) προστίθεται στην στερεά επιφάνεια. Το φθορίζον προϊόν, η μεθυλουμπελλιφερόνη (MU), μετρείται.

- Ετερογενής ανοσοενζυμικός προσδιορισμός μη ανταγωνιστικού τύπου
- Μικροσωματίδια επί των οποίων ακινητοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα εξειδικευμένα ως προς το προσδιορισμό αντιγόνου

# Αρχή μεθόδου – ΜΕΙΑ

- Πλεονεκτήματα χρήσης των μικροσωματιδίων:
  1. η αποτελεσματική επιφάνεια για πρόσδεση των αντισωμάτων είναι πολύ μεγαλύτερη στα μικροσωματίδια
  2. η απόσταση διάχυσης μεταξύ της ουσίας και της στερεάς επιφάνειας είναι σημαντικά μειωμένη
- Αύξηση της ταχύτητας του προσδιορισμού
- Μειώνουν κατά πολύ το συνολικό χρόνο επώασης επιτρέποντας την πλήρη ολοκλήρωση του προσδιορισμού σε χρόνο 30-40 min

# Ανοσοαναλυτής IMx, Abbot Microparticle Enzyme immunoassay (MEIA)



# ΙΧΝΗΘΕΤΗΜΕΝΟΙ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ (labelled immunoassays)

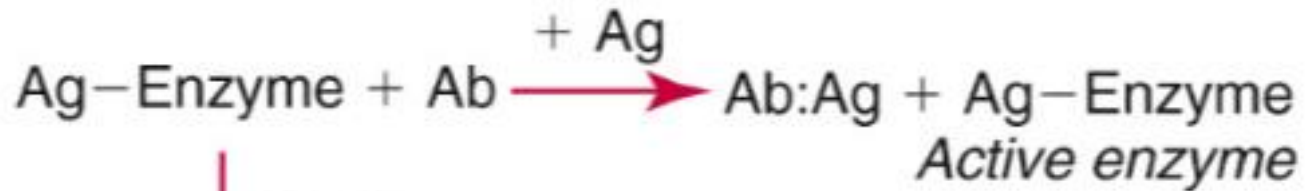
ομογενείς ανοσοχημικοί προσδιορισμοί (homogeneous immunoassays)

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

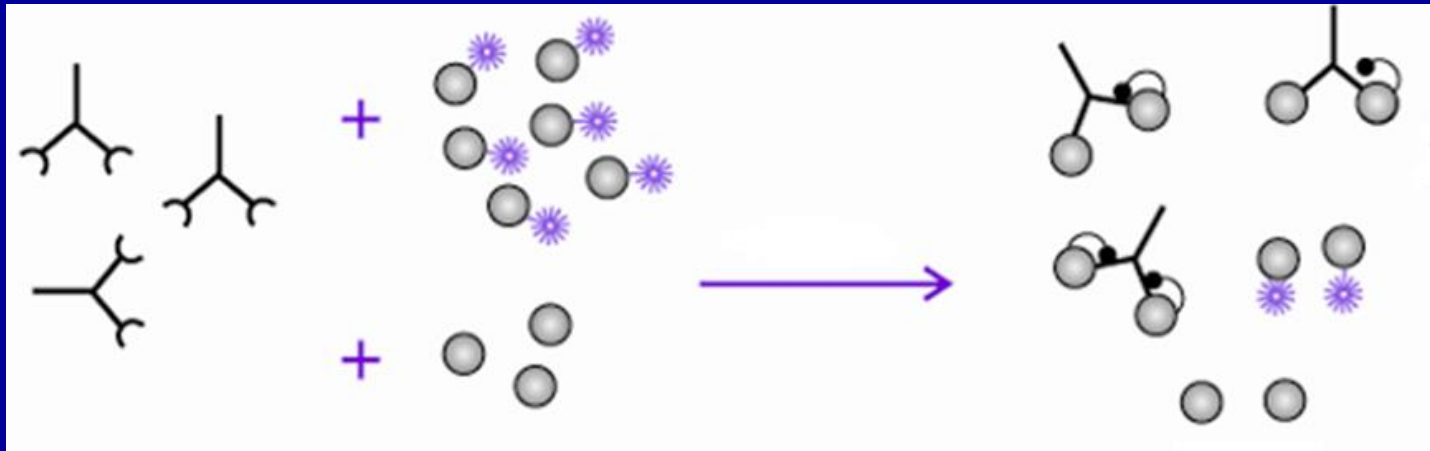
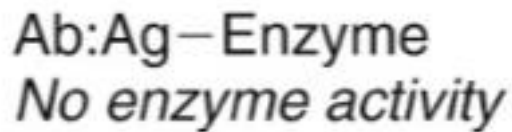
# Homogeneous immunoassays

## Enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT)

EMIT



No Ag



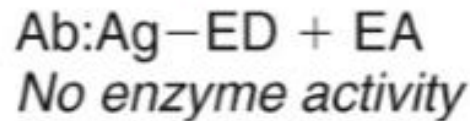
# Homogeneous immunoassays

## Cloned Enzyme Donor Immunoassay (CEDIA)

CEDIA



↓  
No Ag





# **Homogeneous immunoassays**

## **Cloned Enzyme Donor Immunoassay (CEDIA)**

**A cloned enzyme donor immunoassay (CEDIA) is a competitive homogenous enzyme immunoassay**

**This assay makes use of two component fragments of an enzyme which are each individually inactive.**

**Under the right conditions in solution these fragments can spontaneously reassemble to form the active enzyme.**

**For use in biochemical assays one of the enzyme fragments is attached to an analyte of interest.**

**The analyte-enzyme-fragment-conjugate is still able to reassemble with the other enzyme fragment to form an active enzyme.**

**However it is unable to do this if the analyte is bound to an antibody.**

# **Homogeneous immunoassays**

## **Cloned Enzyme Donor Immunoassay (CEDIA)**

**To determine the quantity of analyte in a sample:**

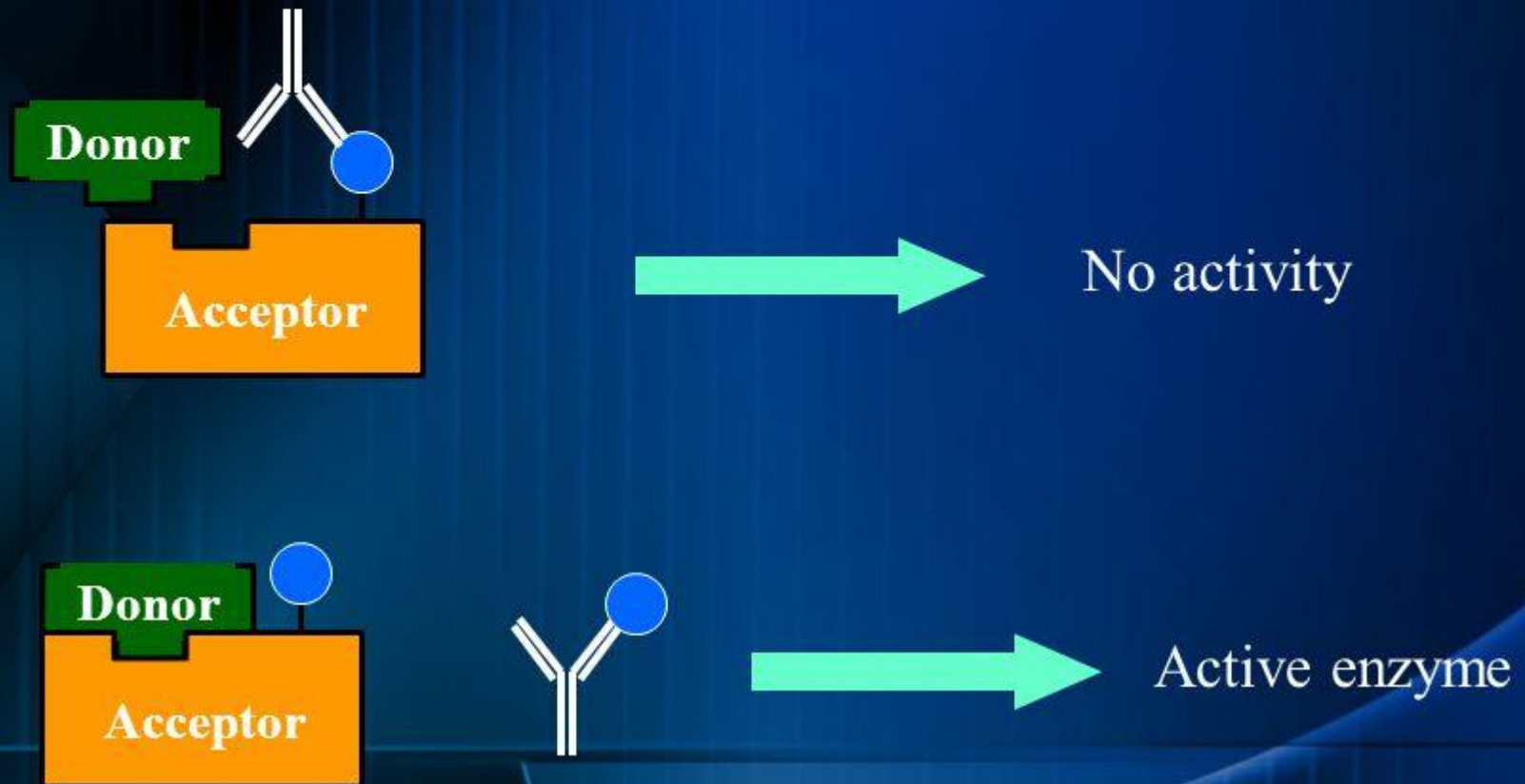
**an aliquot of sample must be added to a solution containing enzyme-fragment-analyte-conjugate, the other enzyme fragment, antibody directed against the analyte and substrate for the enzyme reaction.**

**Competition for the antibody occurs between the analyte in the sample and the enzyme-fragment-analyte-conjugate.**

**High concentrations of analyte in the sample lead to a relatively small amount of the enzyme-fragment-analyte-conjugate being prevented from forming active enzyme and therefore high enzyme activity.**

**Conversely, low concentrations of analyte in the sample lead to a relatively large amount of the enzyme-fragment-analyte-conjugate being prevented from forming active enzymes and therefore low enzyme activity.**

# Cloned enzyme donor immunoassay



# Fluorescence immunoassays (FIA)

Μέθοδος του πολωμένου ανοσοφθορισμού

(**FPIA**-Fluorescence Polarization Immunoassay)

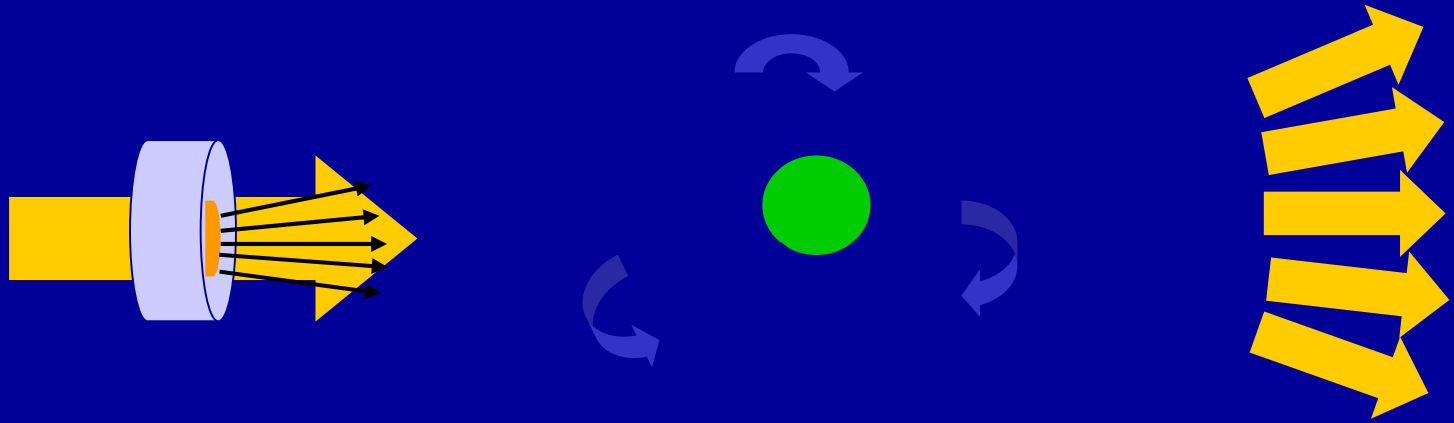
# Fluorescence Polarization Immunoassay (FPIA)

- ✓ Βασίζεται στην μέτρηση του βαθμού πόλωσης της εκπεμπομένης ακτινοβολίας φθορισμού
- ✓ Ο βαθμός πόλωσης του εκπεμπομένου φθορισμού μιας ουσίας η οποία διεγέρθηκε με πολωμένο φως εξαρτάται από την ταχύτητα περιστροφής του μορίου της ουσίας.
- ✓ Η ταχύτητα περιστροφής ενός μορίου σε διάλυμα εξαρτάται από το μέγεθός του.

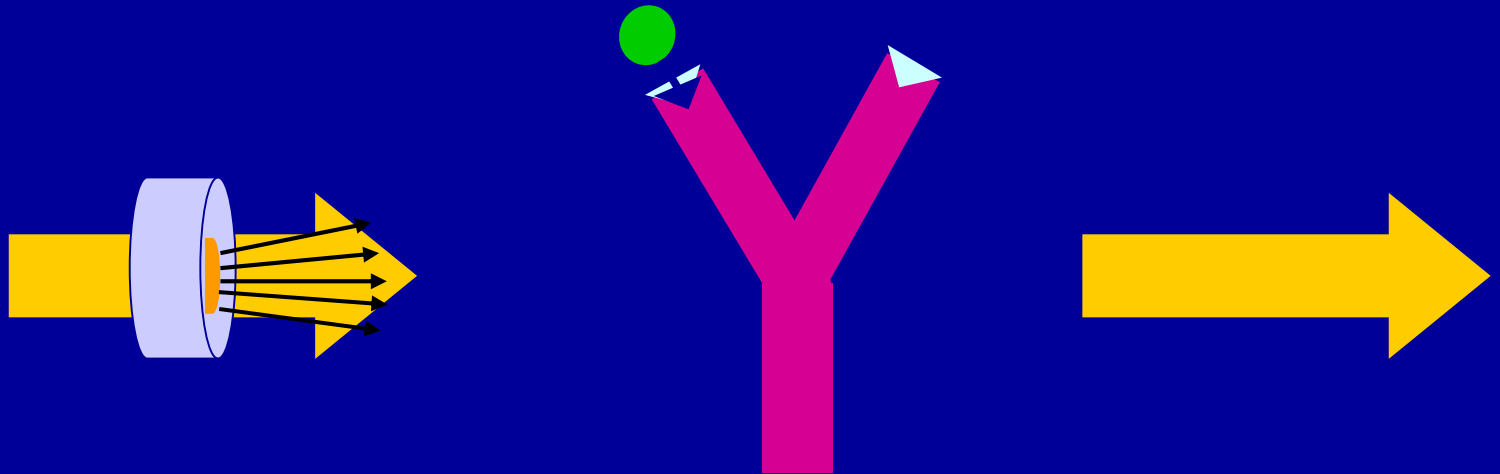


**D = φάρμακο**

**F = φλουορεσκεΐνη**

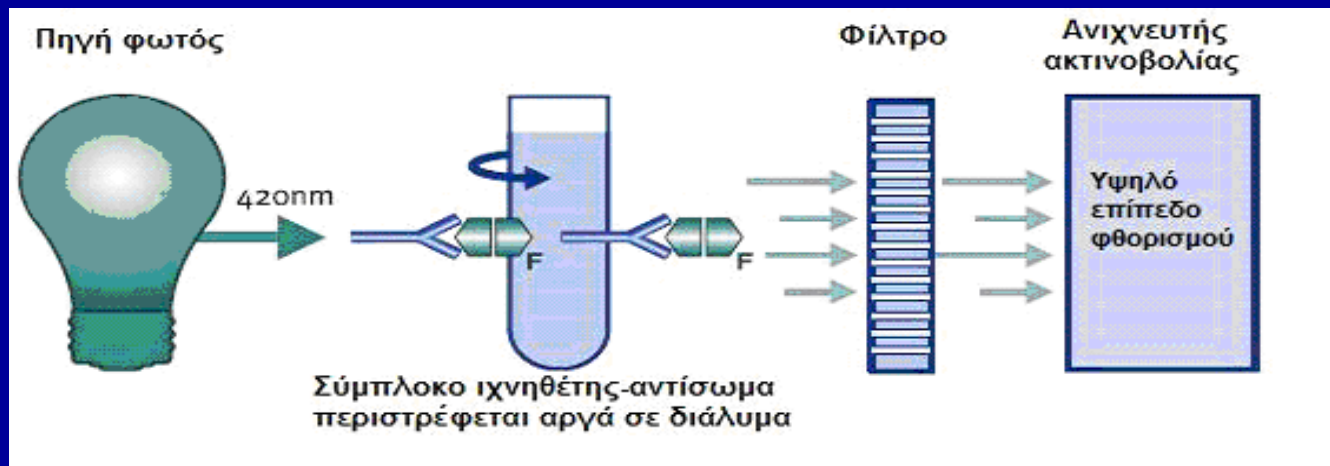
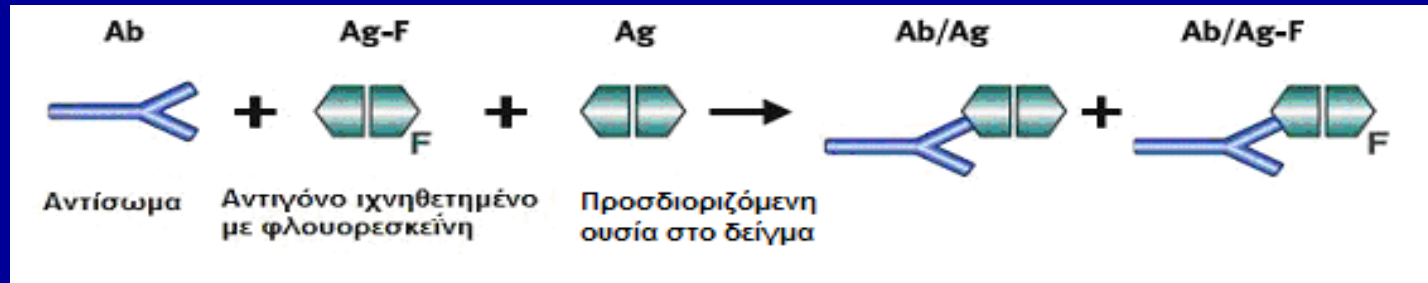


**Γρήγορη** περιστροφή του ελεύθερου επισημασμένου φαρμάκου προκαλεί **μείωση** της πόλωσης του εκπεμπομένου φθορισμού



**Αργή** περιστροφή του δεσμευμένου επισημασμένου φαρμάκου προκαλεί **αύξηση** της πόλωσης του εκπεμπομένου φθορισμού

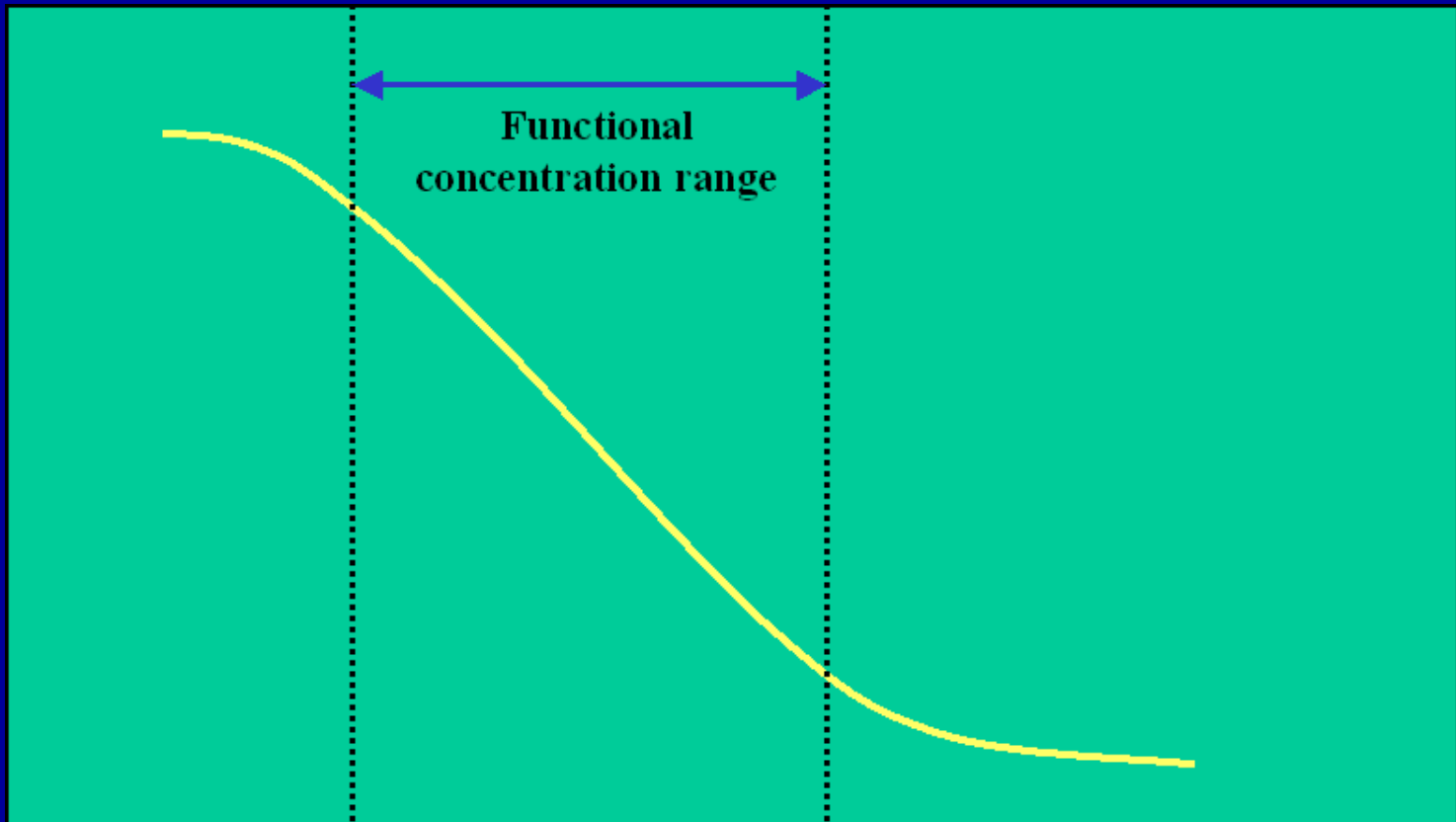
# FRIA: ομογενής ανοσοπροσδιορισμός ανταγωνιστικού τύπου



- Ιχνηθέτης: αντιγόνο επισημασμένο με φθορίζουσα ουσία
- Φθορίζων ιχνηθέτης και προσδιοριζόμενη ουσία ανταγωνίζονται για περιορισμένο αριθμό θέσεων δέσμησης σε ειδικό αντίσωμα

# FPIA

Καμπύλη σήματος πολωμένης ακτινοβολίας φθορισμού (P)/συγκέντρωση φαρμάκου (D)

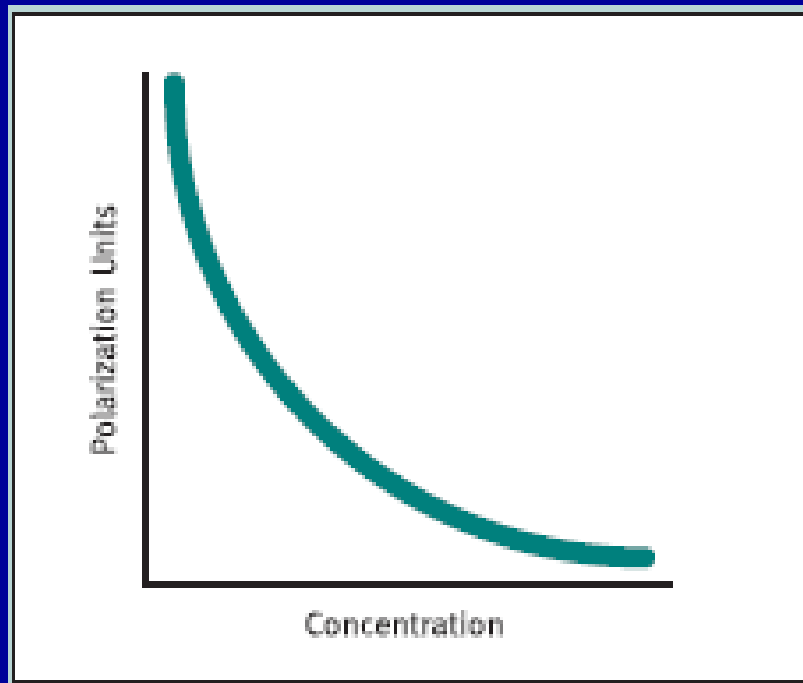


Σήμα P

Συγκέντρωση φαρμάκου D



# Σύστημα Fluorescence Polarization Immunoassay (FPIA) Ανοσοαναλυτής: TDx, (Abbott)



- **Luminescent labels**

**A, Chemiluminescent acridinium ester label**

**B, Electrochemiluminescent ruthenium (II) tris(bipyridyl) NHS ester label**

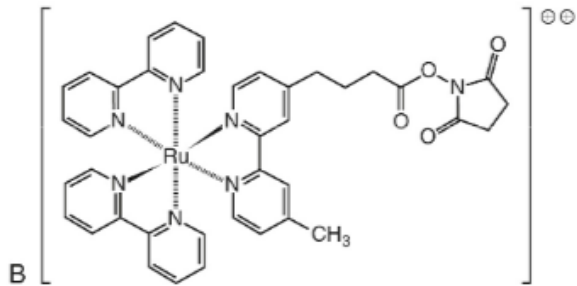
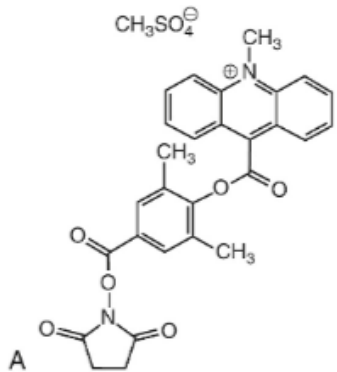


Figure 23.15

Luminescent labels. A, Chemiluminescent acridinium ester label. B, Electrochemiluminescent ruthenium (II) tris(bipyridyl) NHS ester label.

(From Law S-J, Miller T, Piran U, Klukas C, Chang S, Unger J. Novel poly-substituted aryl acridinium esters and their use in immunoassay. *J Biolumin Chemilumin* 1989;4:88-98. Reprinted by permission of John Wiley & Sons.)

# Luminescent labels

## Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay (LOCI)

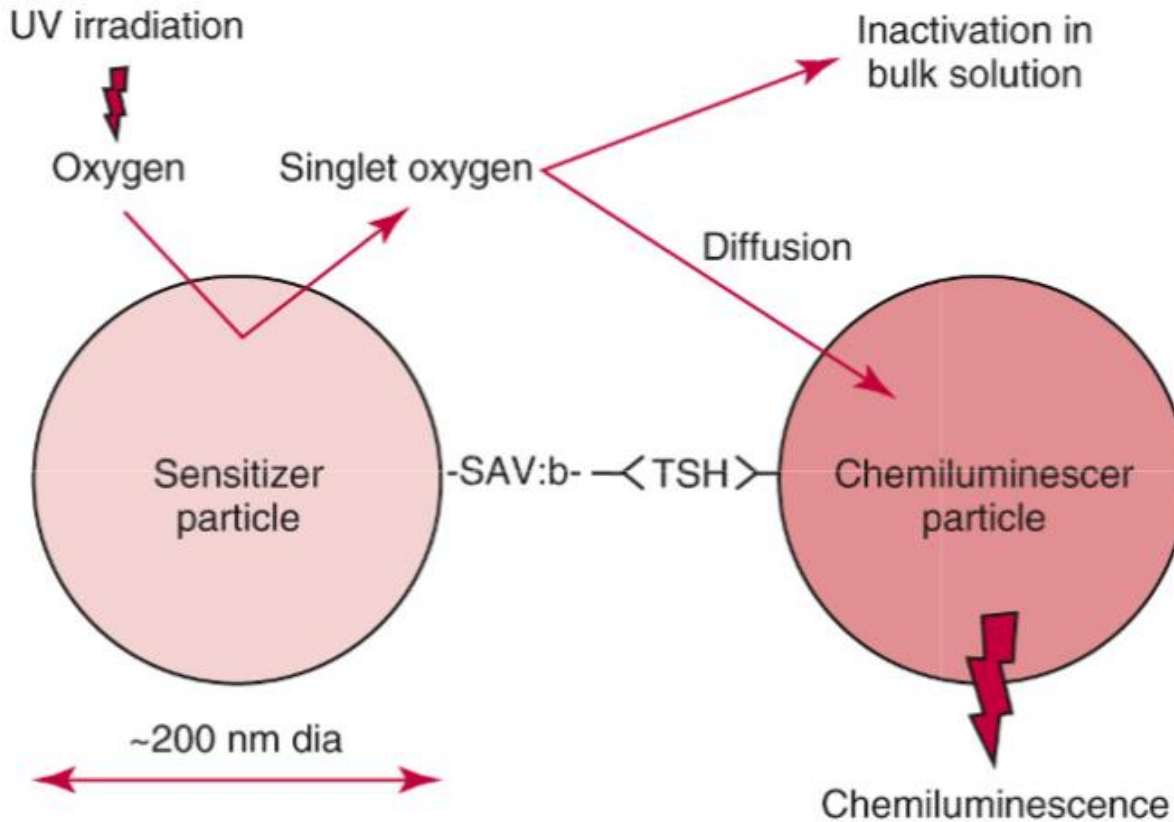
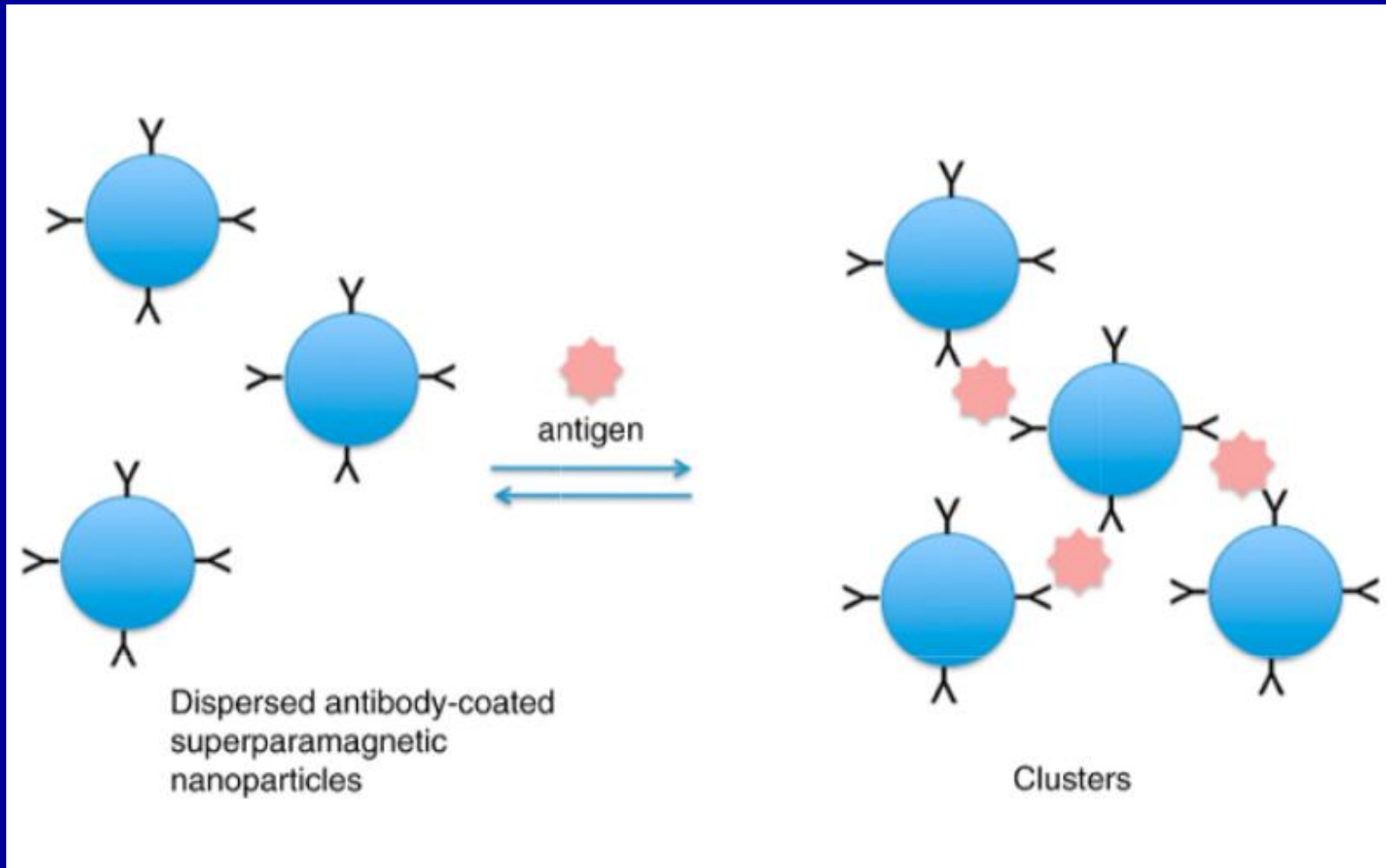


Figure 23.16

Example of luminescent oxygen channeling immunoassay (LOCI) for thyroid-stimulating hormone (TSH). In this assay, TSH links two latex microbeads—one containing a photosensitive reagent and the other a precursor of a chemiluminescent reagent. UV, Ultraviolet.

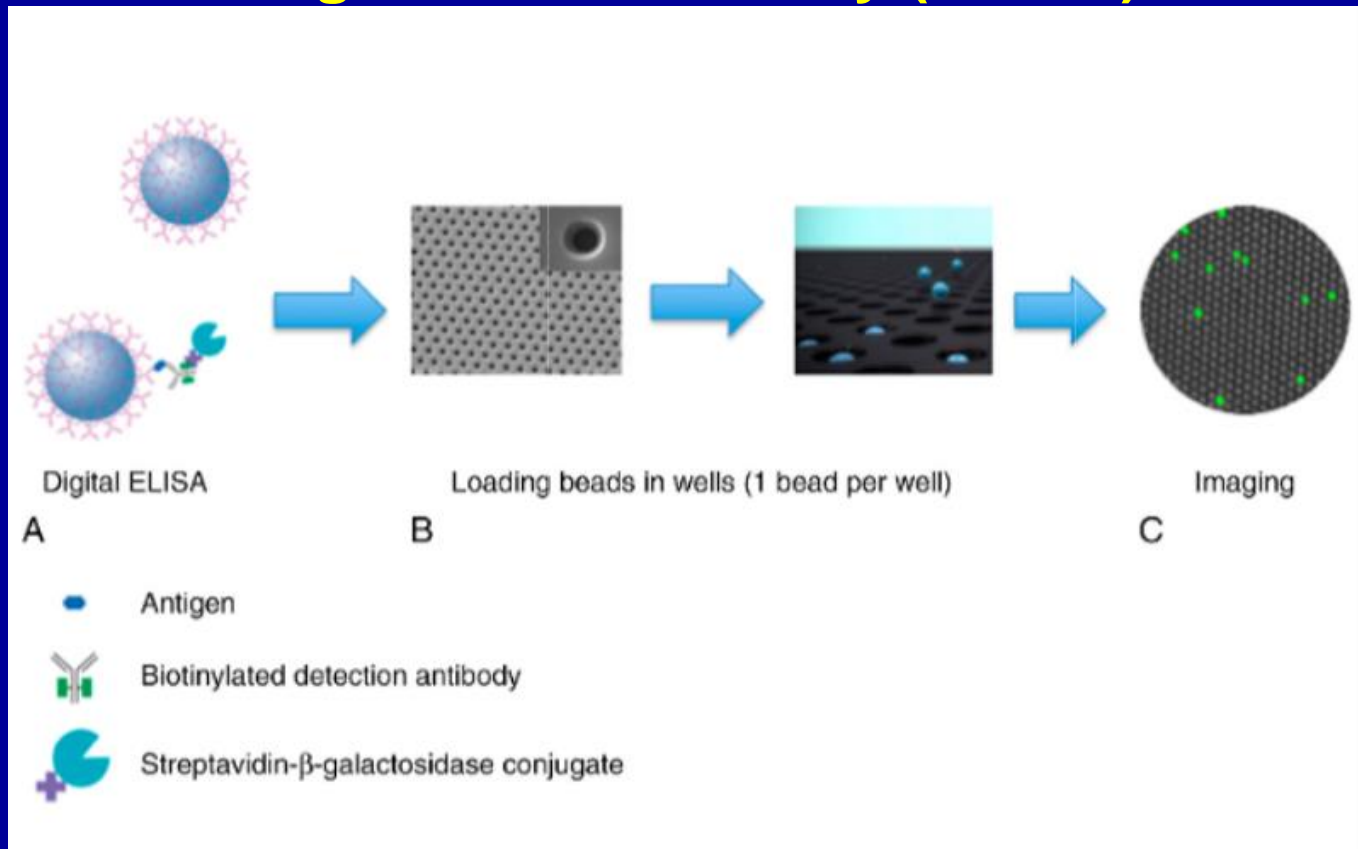
In this assay, TSH links two latex microbeads—one containing a photosensitive reagent and the other a precursor of a chemiluminescent reagent. UV, Ultraviolet.

# Magnetic particle immunoassay



Antigen binds to magnetic nanoparticles (~20 nm diameter) coated with antibody. The binding and resulting clustering of the particles alters the microscopic environment of water in the reaction mixture, and this can be detected by nuclear magnetic resonance (change in the T2 relaxation signal).

# Digital Immunoassay (Simoa)



A, Reaction of the antigen with capture antibody-coated magnetic beads and biotinylated detection antibody. This is then followed by reaction of the bound complex with streptavidin- $\beta$ -galactosidase conjugate to form single immunocomplexes of the magnetic beads. B, The beads are loaded into wells, one bead per well and then treated with a fluorometric substrate for  $\beta$ -galactosidase and fluorescence from the beads in the array of wells imaged. ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay.

# Αυτοματοποιημένη ELISA



# Αυτοματοποιημένη ELISA



# Αυτοματοποιημένη ELISA





# Αυτοματοποιημένη ELISA



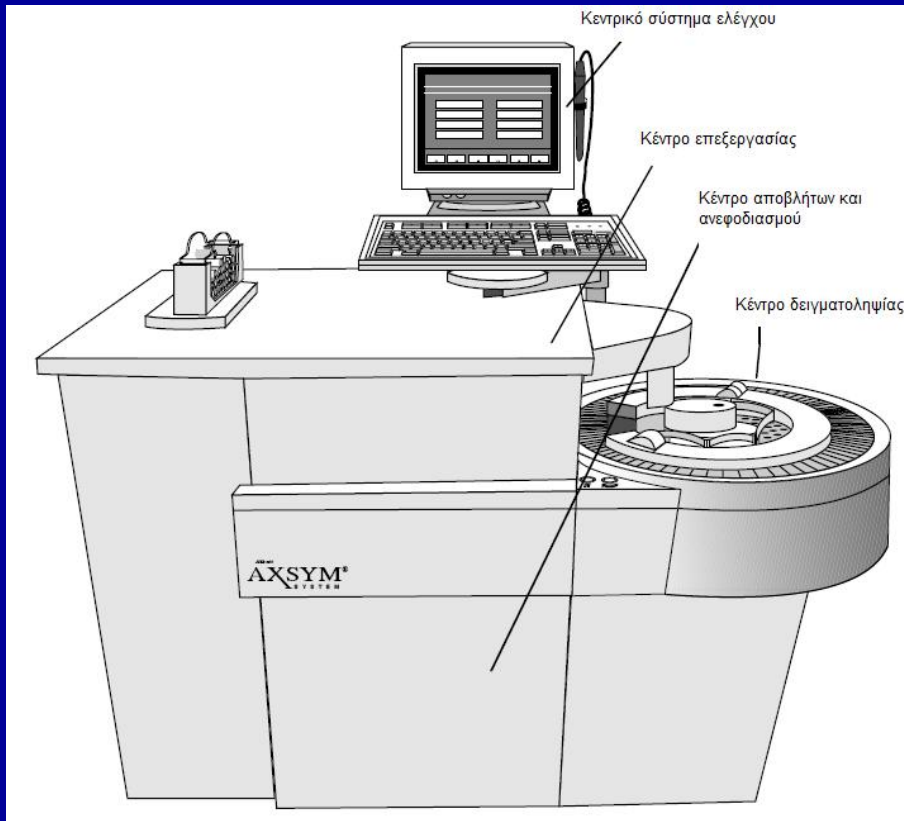


**Ανοσοαναλυτής AxSYM Abbot**  
**Microparticle Enzyme immunoassay (MEIA)**



# Ανοσοαναλυτής AxSYM Abbot

## Microparticle Enzyme immunoassay (MEIA)



- Εκτελεί ανοσοπροσδιορισμούς χρησιμοποιώντας τη μέθοδο μικροσωματιδιακού ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού (MEIA) και την FPIA σε δείγματα ορού ή πλάσματος
- Εξετάσεις: ορμόνες αναπαραγωγής, θυρεοειδικές ορμόνες, καρκινικοί δείκτες, καρδιακοί δείκτες, δείκτες αναιμίας, ναρκωτικές ουσίες κ.ά.

# 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.



# ELECSYS 2010

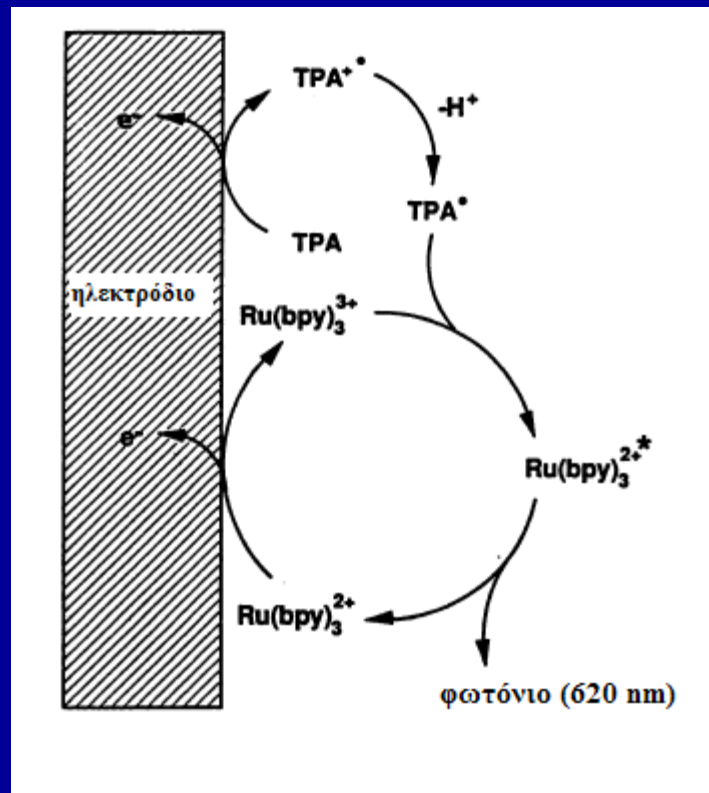
## Αρχή μεθόδου - ηλεκτροχημειοφωταύγεια

- 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

# ELECSYS 2010

## Αρχή μεθόδου - ηλεκτροχημειοφωταύγεια

- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+} + e^- \rightarrow \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  (αναγωγή)
- $\text{C}_9\text{H}_{21}\text{N} - e^- \rightarrow [\text{C}_9\text{H}_{21}\text{N}]^+ \rightarrow \text{C}_9\text{H}_{20}\text{N}\cdot + \text{H}^+$  (οξειδωση)
- $\text{C}_9\text{H}_{20}\text{N}\cdot + \text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+} \rightarrow \text{*Ru}(\text{bpy})_3^{2+} + \text{προϊόντα}$  (διεγερμένη κατάσταση)
- $\text{*Ru}(\text{bpy})_3^{2+} \rightarrow \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+} + h\nu$  ( $\sim 2.0 \text{ eV}$ , 610 nm) (εκπομπή φωτός)



# Αυτόματος ανοσοαναλυτής AIA 1800

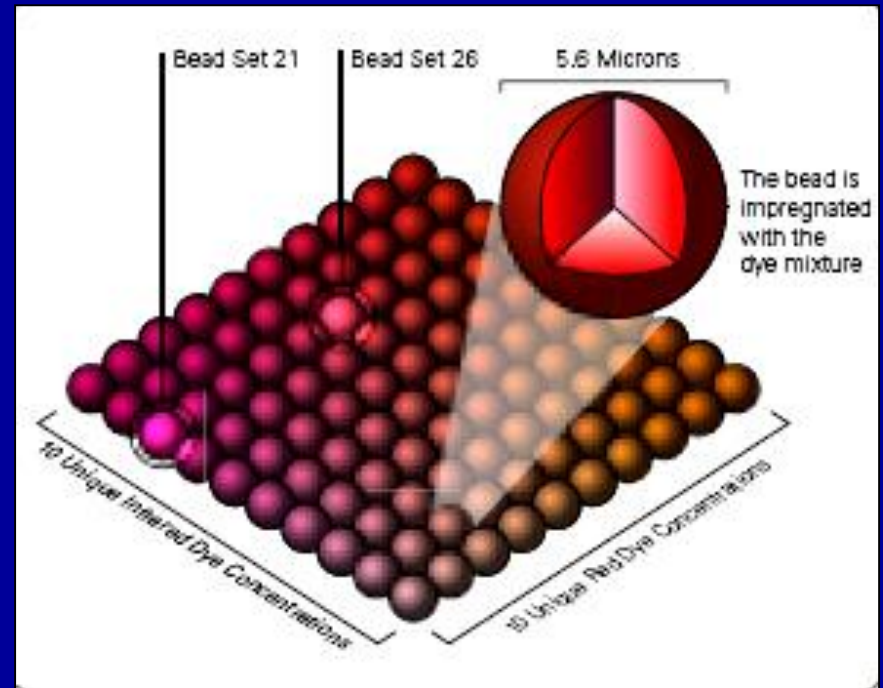
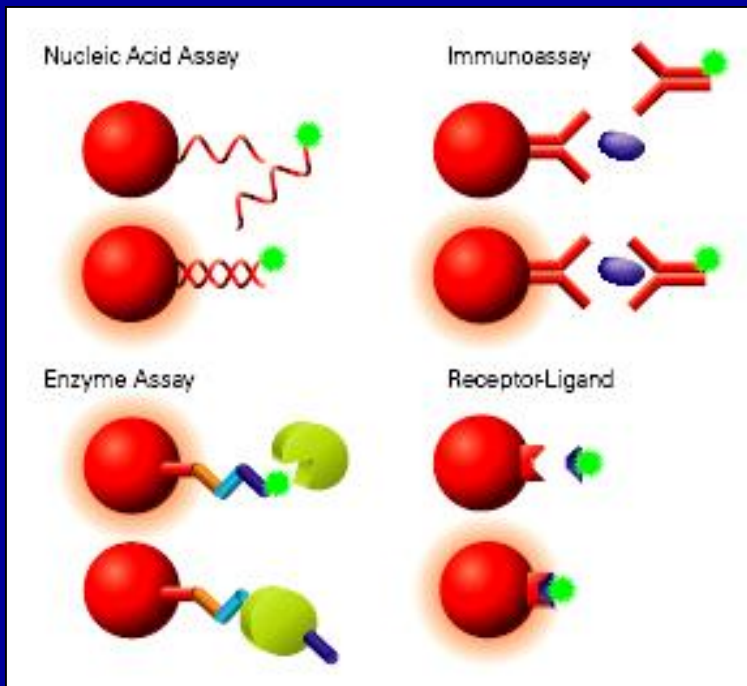


- Εκτελεί ενζυμικούς ανοσοπροσδιορισμούς με σύστημα φθορισμομετρικής ανίχνευσης (ELFIA) σε δείγματα ορού ή πλάσματος
- Αρχή μεθόδου - ενζυμοανοσοφθορισμομετρία
- Εξετάσεις: ορμόνες αναπαραγωγής, θυρεοειδικές ορμόνες, καρκινικοί δείκτες, καρδιακοί δείκτες, δείκτες αναιμίας κ.ά.

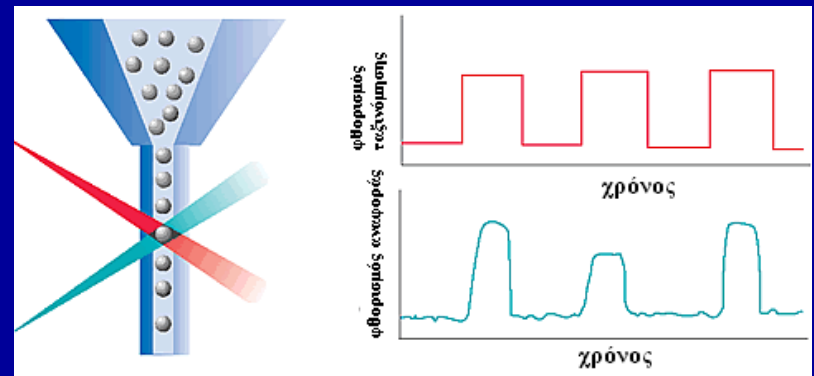
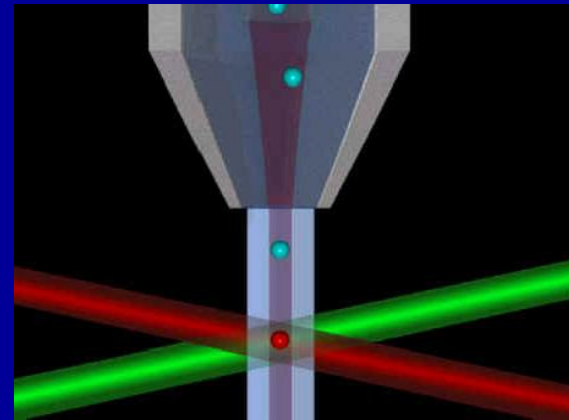
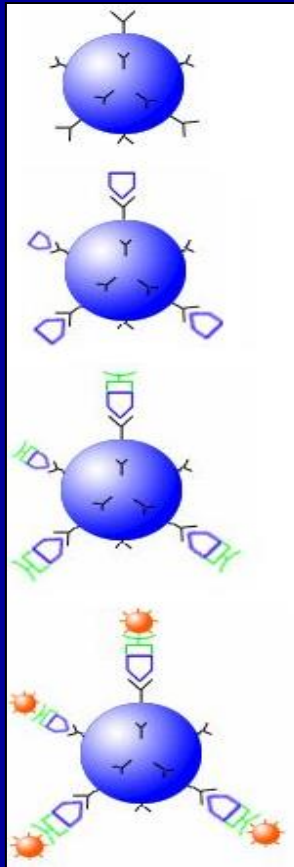


# πολυπαραμετρική ELISA

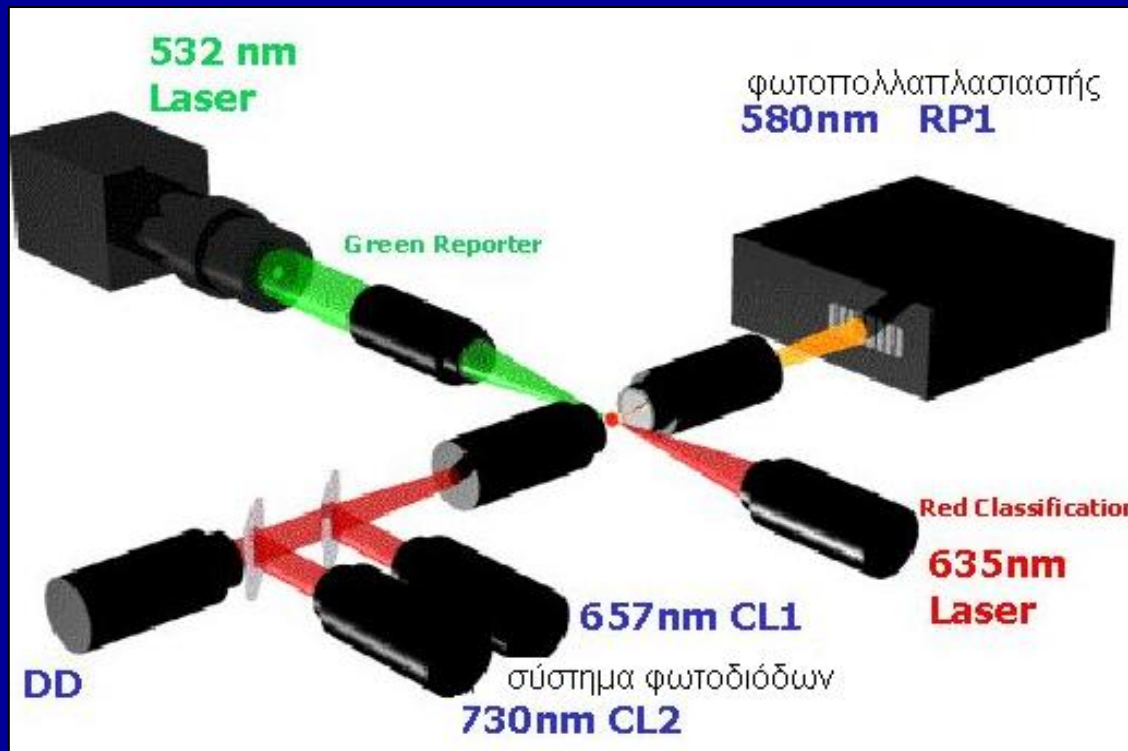
## Αρχή λειτουργίας συστήματος Luminesx



# Αρχή λειτουργίας συστήματος LumineX



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



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

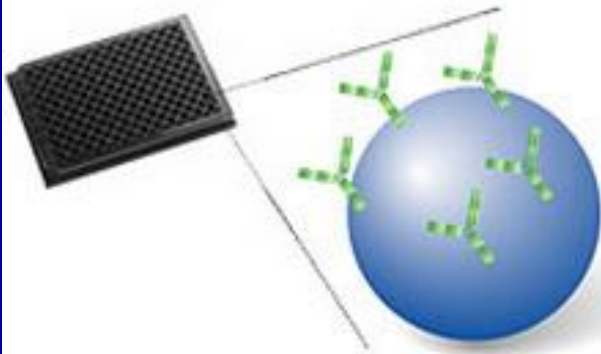
• Με διέγερση στα 635 nm του LASER ταξινόμησης, οι δυο φθορίζουσες ουσίες εκπέμπονται σε διαφορετικά μήκη κύματος: 657 nm και 730 nm.

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

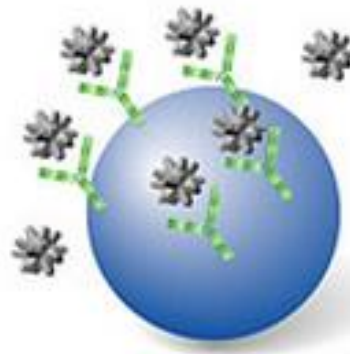
• Το όργανο καταγράφει τη μέση τιμή έντασης φθορισμού (MFI) των 50-80 σφαιριδίων κάθε.σετ και υπολογίζει την.συγκέντρωση κάθε ουσίας-στόχου στο δείγμα.

# Αρχή λειτουργίας συστήματος Luminesx

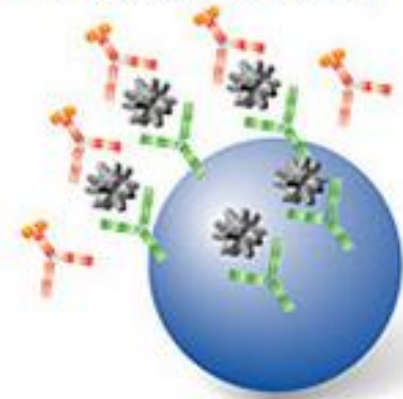
**Step One**  
Dispense capture beads



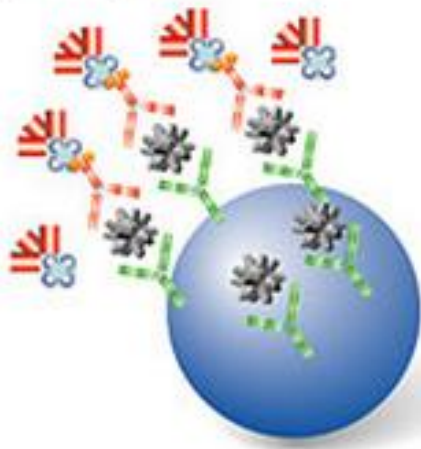
**Step Two**  
Add samples



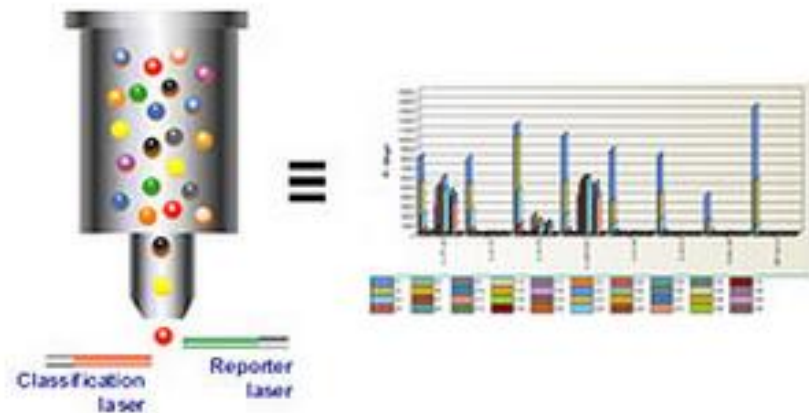
**Step Three**  
Add detection antibody



**Step Four**  
Add reporter dye

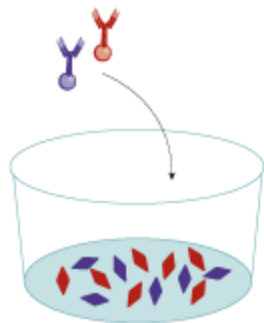


**Step Five**  
Fluorescent sorting and data reduction



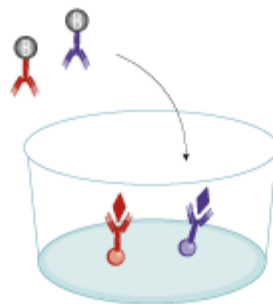
# Αρχή λειτουργίας συστήματος Luminex multiple immunoassays

STEP 1



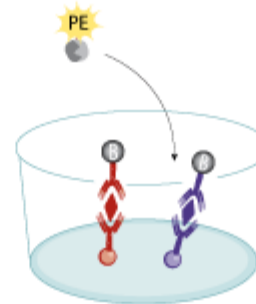
Color-coded beads, pre-coated with analyte-specific capture antibody for the molecule of interest, are added. Multiple analytes can be simultaneously detected in the same sample.

STEP 2



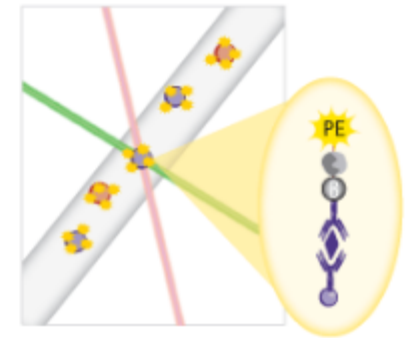
Analyte-specific antibodies capture the analyte of interest. Biotinylated detection antibodies specific to the analyte of interest are added and form an antibody-antigen sandwich.

STEP 3



Phycoerythrin (PE)-conjugated Streptavidin is added.

STEP 4



The beads are read on a dual-laser flow-based detection instrument, such as the Luminex 200™ or Bio-Rad® Bio-Plex® analyzer. One laser classifies the bead and determines the analyte that is being detected. The second laser determines the magnitude of the PE-derived signal, which is in direct proportion to the amount of bound analyte.

# Commercially available multiple immunoassays (<https://www.rndsystems.com/search?category=Luminex%20Assays>)

## Human TNF-alpha Luminex Performance Assay

 (51 Citations)

**Sensitivity:** 1.5 pg/mL

**Assay Range:** 5.3 - 3,900 pg/mL

compare (select up to 3 products to compare)

## Human IL-6 Luminex Performance Assay

 (47 Citations)

**Sensitivity:** 1.11 pg/mL

**Assay Range:** 3.0 - 2,400 pg/mL

compare (select up to 3 products to compare)

## Human IL-10 Luminex Performance Assay

 (33 Citations)

**Sensitivity:** 0.3 pg/mL

**Assay Range:** 3.0 - 2,320 pg/mL

compare (select up to 3 products to compare)

## Human Luminex Performance Assay Base Kit, MMP Panel

 (39 Citations)

compare (select up to 3 products to compare)

## Human IFN-gamma Luminex Performance Assay

 (33 Citations)

**Sensitivity:** 1.27 pg/mL

**Assay Range:** 3.0 - 1,900 pg/mL

compare (select up to 3 products to compare)

## Human Luminex Assay

 (4 Citations)

compare (select up to 3 products to compare)

## Human IL-1 beta/IL-1F2 Luminex Performance Assay

 (28 Citations)

**Sensitivity:** 0.57 pg/mL

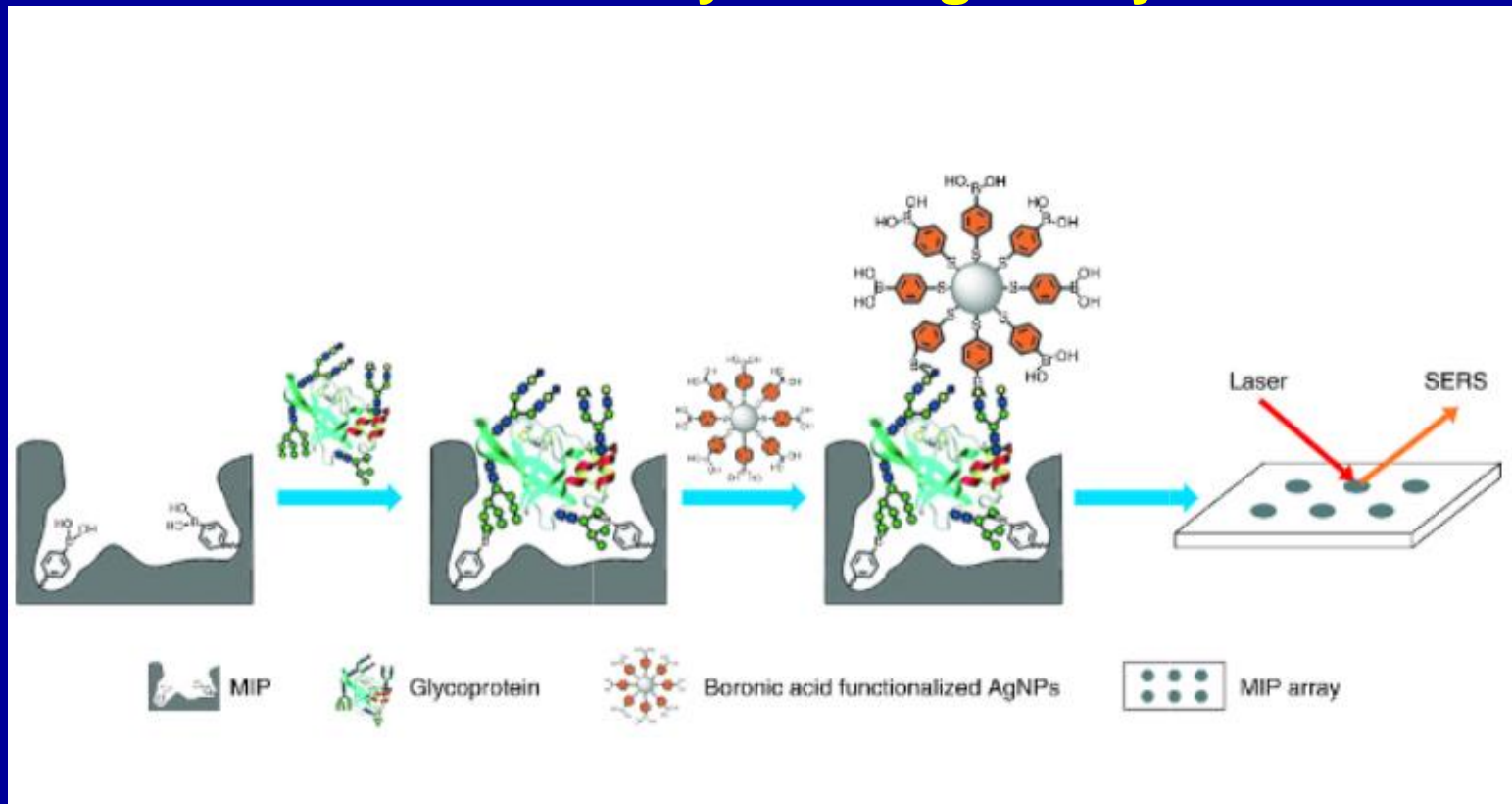
**Assay Range:** 3.0 - 1,920 pg/mL

compare (select up to 3 products to compare)

# Bead array videos

- <https://www.youtube.com/watch?v=qPAOBij4Op4>
- <https://www.youtube.com/watch?v=LrEbOsdnF5I>
- [https://www.youtube.com/watch?v=\\_2SWgZTbuok](https://www.youtube.com/watch?v=_2SWgZTbuok)
- [https://www.youtube.com/watch?v=JmWb\\_xHXrbC](https://www.youtube.com/watch?v=JmWb_xHXrbC)

# Non-antibody binding assays



A boronate affinity sandwich assay for glycoproteins. At the left of the figure is a molecularly imprinted polymer (MIP), which is a three-dimensional cavity synthesized from a 4-vinylboronic acid monomer; this cavity complements the structure of a specific glycoprotein. Next in the reaction, the glycoprotein of interest is bound by the MIP. A detection reagent based on a boronic acid and silver nanoparticles (AgNPs) is bound to the glycoprotein of interest. Finally, the binding of the AgNP detection reagent is detected by surface-enhanced Raman scattering (SERS).