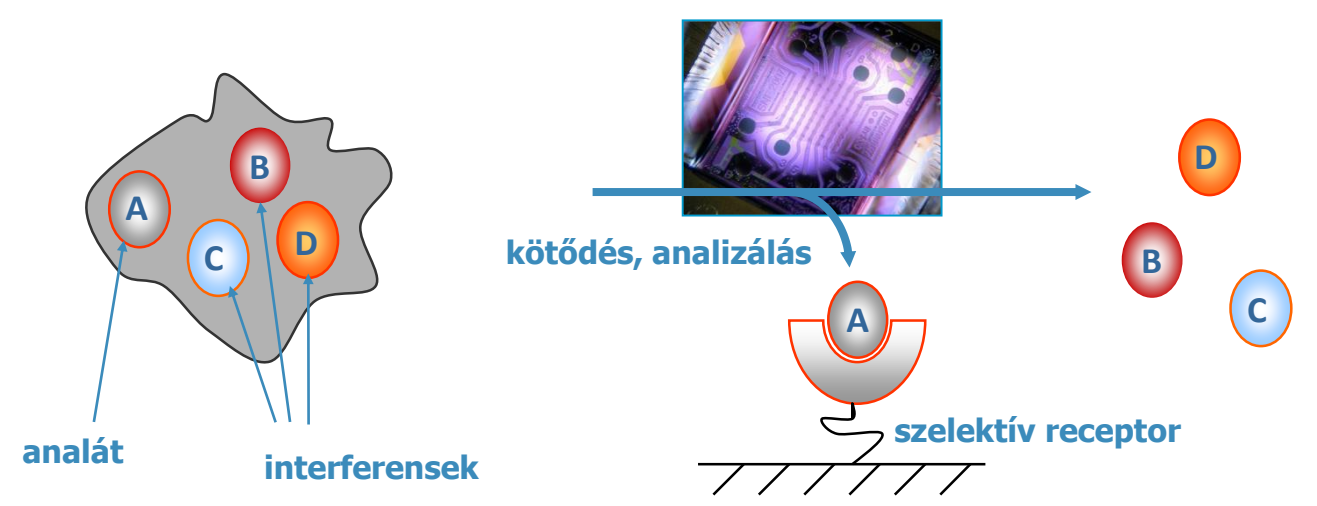
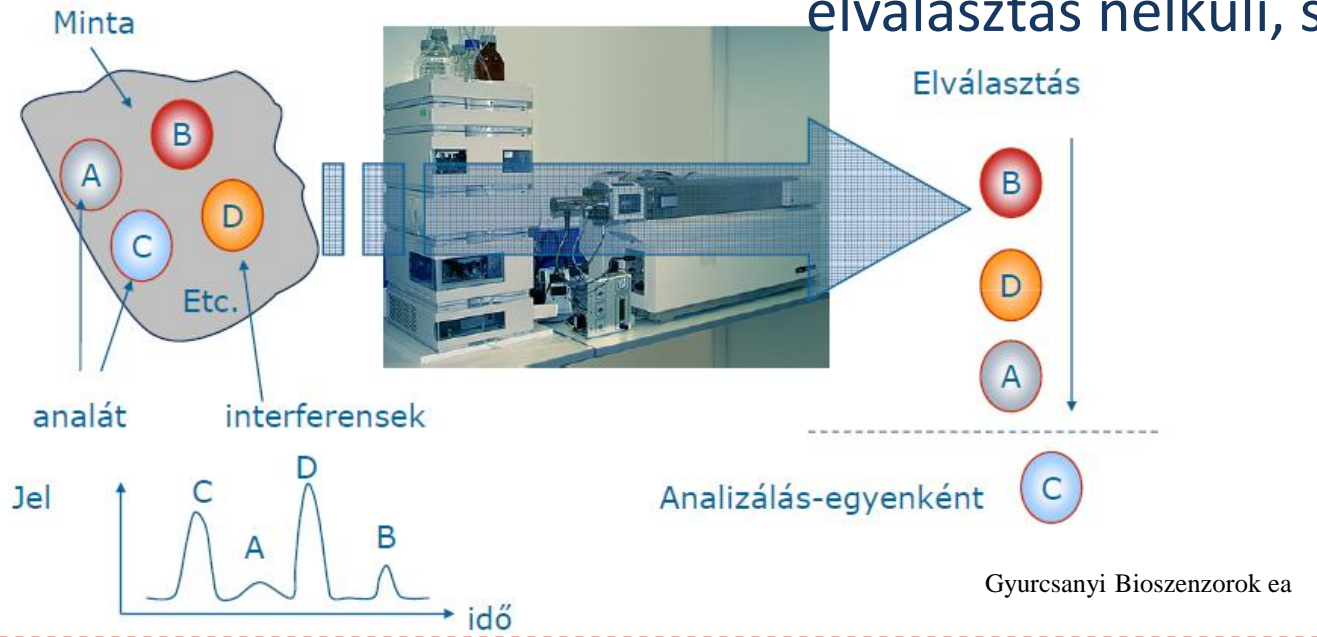

Immunanalitika

Nem-szelektív, elválasztáson alapuló mérési technikák vs. elválasztás nélküli, szelektív módszerek



Szelektív receptorok

Enzimek

Sejtek, szövetek

Receptorok

Ellenanyagok v. más néven Antitestek

Nukleinsavak

Aptamerek

Molekuláris lenyomatú polimerek

Immunanalitikai technikák

Fő alkalmazási területek

- ▶ orvosi diagnosztika (pl. hormon mérések, tumor markerek, szívmarkerek)
- ▶ gyógyszeranalitika (pl. gyógyszer szint meghatározások, gyógyszer kutatás)
- ▶ toxikológia (kábitószer-, doppinganalitika)
- ▶ környezetvédelmi analitika (növényvédőszer, növényi hormonok)
- ▶ élelmiszeranalitika (pl. mikotoxinok, prionok, biogén aminok, alkaloidok, gabona allergének)
- ▶ *élettudományi alap kutatások*

Az immunanalitikai módszerek jellemzői - az ellenanyagok egyedülálló tulajdonságai

Rendkívül specifikus a kötődés
(egy adott ellenanyag csak a neki
megfelelő antigénhez képes
erősen kötődni)

⇒ **Szelektív**

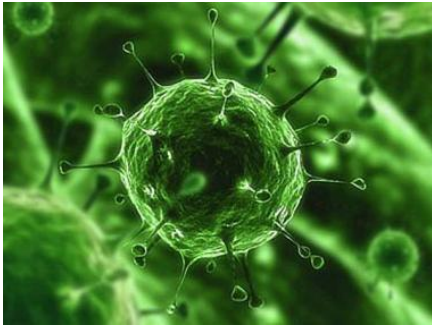
Rengeteg különböző anyaghoz
képesek kötődni (kb. 10^{11} féle
antigént
képesek felismerni)

⇒ **Rendkívül sokféle
anyag mérésére alkalmas**

Nagyon erős kötődés a megfelelő
anyaggal

⇒ **Érzékeny/alacsony
kimutatási határ**

Immunanalitikai módszerek: az antigén és ellenanyag (antitest) reakcióján alapulnak



antigén

A szervezetben ellenanyagtermelést kiváltó anyag (általában nagyméretű, pl.: vírus, baktérium, pollen az allergiások számára, idegen egyedből származó ellenanyag, sejt, szövet, fehérje)

ellenanyag

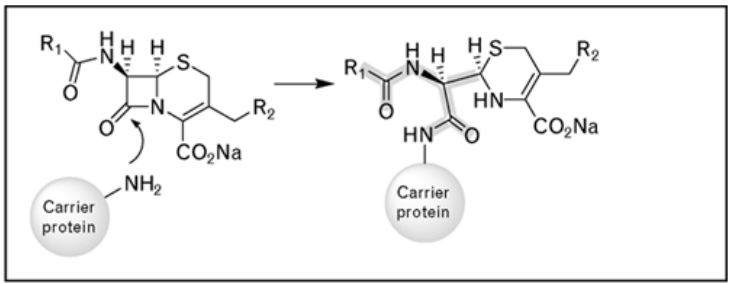
Az immunrendszer által termelt fehérje, mely az antigénhez kapcsolódva, elősegíti annak eliminálódását a szervezetből



Haptén és epitóp

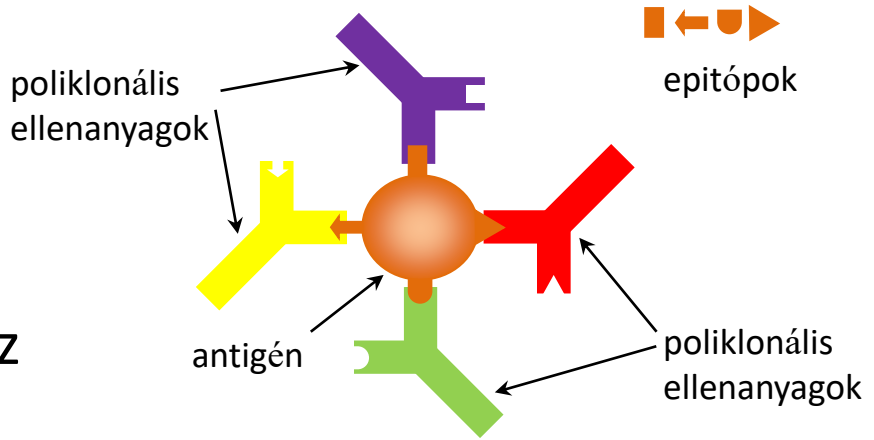
haptén

Kisméretű molekula, csak nagy molekulához, hordozóhoz (pl. fehérje) kötve vált ki ellenanyagtermelést (pl. egy gyógyszermolekula)



epitóp

Az antigén azon része (molekulacsoportja), amellyel az ellenanyaghoz kötődik

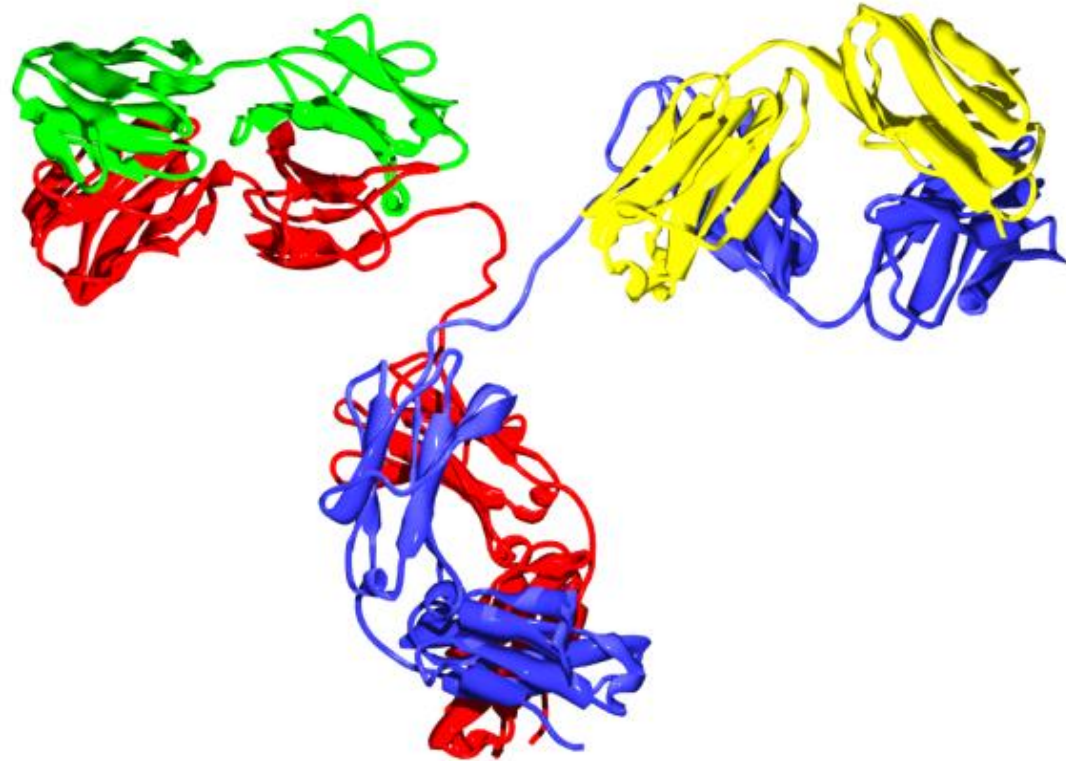


Az ellenanyag

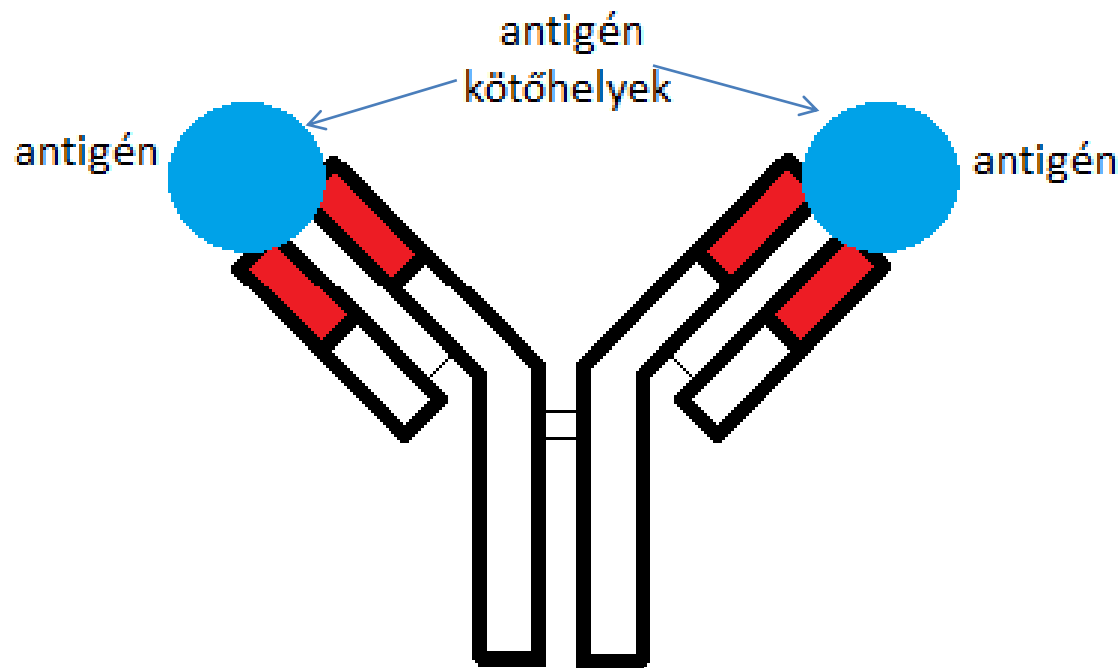
speciális fehérje
molekulák - ú.n.
immunglobulinok


Y alakúak


két nehéz és két könnyű
fehérjelánc



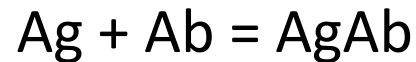
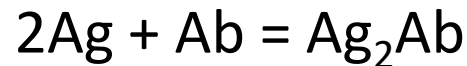
Az antigén-ellenanyag komplex



 variábilis régió
antigén specifikus

 konstans régió (csak
néhányféle létezik)
fajspecifikus

Az antigén antitest komplex képződése



$$K = \frac{[AgAb]}{[Ag][Ab]}$$

(K jellemzően 10^5 - 10^{12} 1/M között van)

Az antigén-ellenanyag komplex jellege: a szelektivitás eredete

az antigén az ellenanyaghoz másodlagos kötőerőkkel kapcsolódik:

- ▶ Coulomb erők/H-híd
- ▶ van der Waals
- ▶ hidrofób kölcsönhatás

csak rövid távon létrejövő gyenge kötőerők

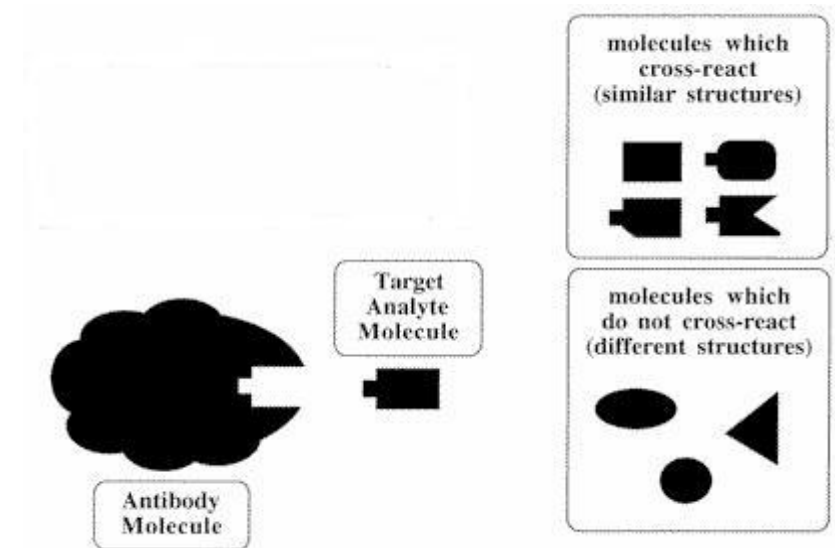
reverzibilis kötések

sok ponton való kapcsolódás

DE EHHEZ

pontos térbeli komplementaritás (kulcs-zár illeszkedés) szükséges

⇒ nagy affinitás, vagyis alacsony kimutatási határ



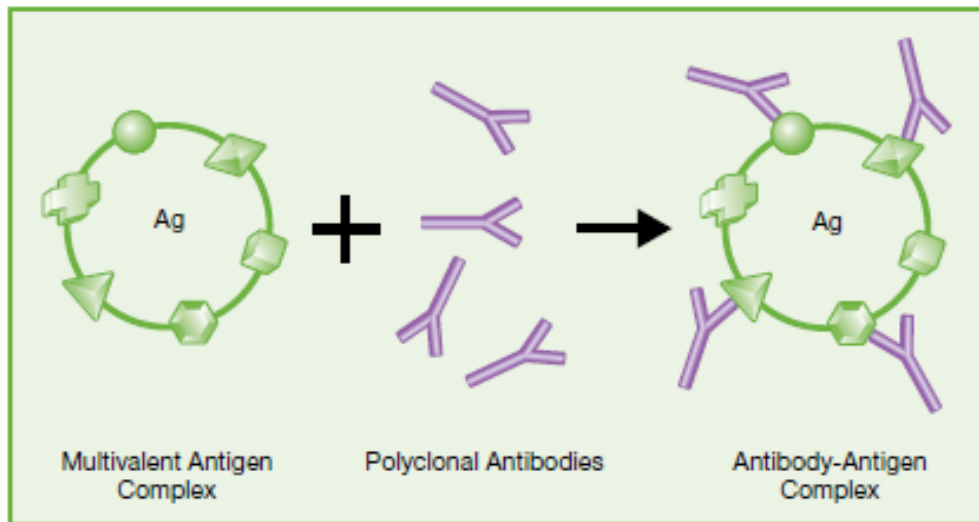
⇒ nagy szelektivitás

Ellenanyagok előállítása 1.

POLIKLONÁLIS ELLENANYAG

Állatok immunizációja

- ▶ Patkány, egér
- ▶ Tengerimalac, nyúl
- ▶ Kecske, birka, ló stb.



Jellemzők

- több klónból (sejtből) származnak
- egyetlen antigén több epitópjához kötődnek

EMIAATT

- gyakori a keresztreakció (nem annyira szelektív) ☹️

DE

- erős komplex (nagyon alacsony a kimutatási határ) 😊
- véges mennyiségben állítható elő ☹️

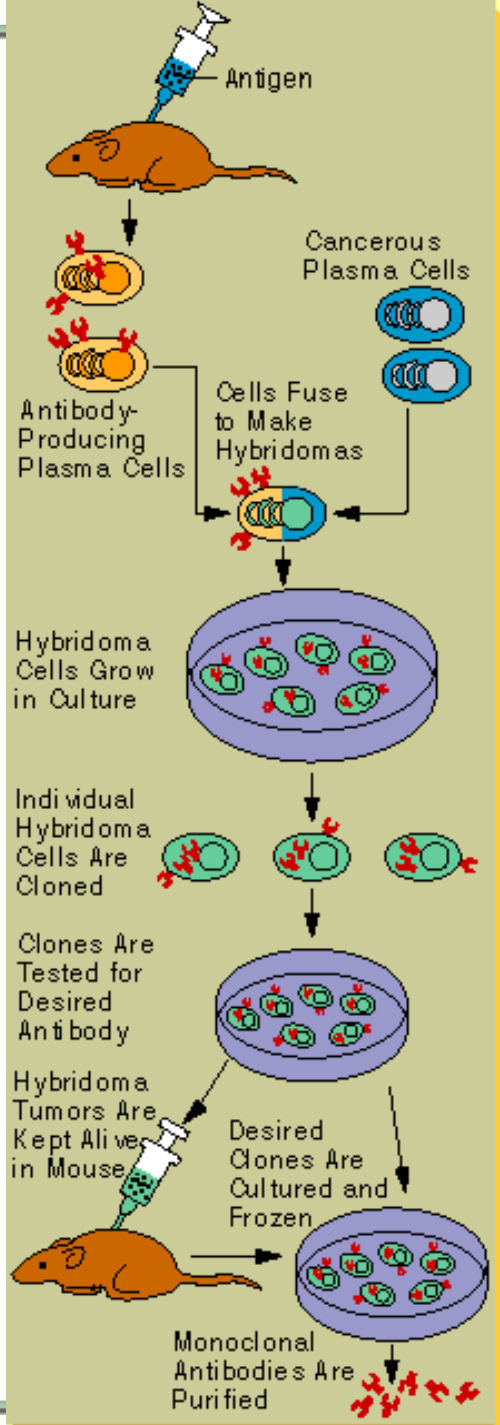
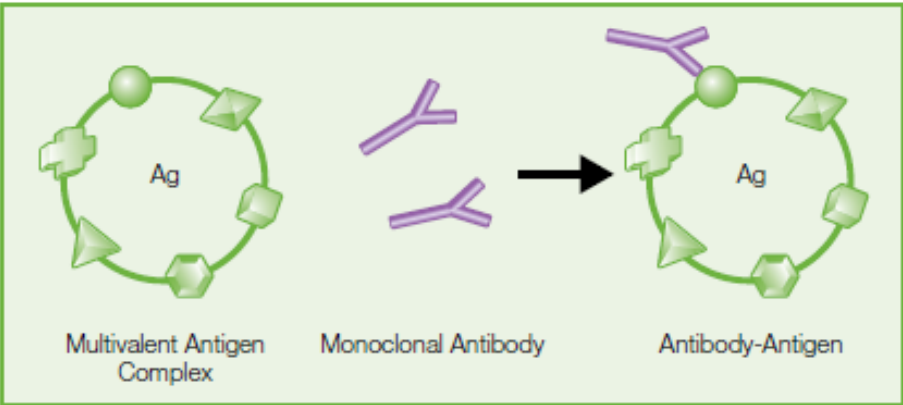
Ellenanyagok előállítása 2.

MONOKLONÁLIS ELLENANYAG

hibridóma technika (1975-Köhler és Milstein, 1984 Nobel díj)

Jellemzők

- ▶ egyetlen klónból származnak
 - ▶ egyetlen antigén egyetlen epitópjához kötődnek
- EMIATT
- ▶ ritka keresztreakció (nagyon szelektív) 😊
 - ▶ viszonylag gyenge komplex (magas kimutatási határ) 😞
 - ▶ gyakorlatilag végtelenségig termeltethető 😊



Ellenanyagok előállítása 3.

REKOMBINÁNS ELLENANYAG

Elve

Molekuláris biológiai technológia: antitesteket kódoló gén könyvtárakat mikroorganizmusokba juttatnak, amik ennek hatására elkezdnek antitesteket termelni. Ezekből a megfelelő szelektivitásúakat kiválasztják, majd a megfelelő gént is kiválasztják. Most már csak ezt az egy gént viszik be megfelelő mikroorganizmusokba, amik ettől kezdve a megfelelő szelektivitású antitestet állítják elő.

Jellemzők

- ▶ humán gyógyászati célra is alkalmasak
- ▶ állatok felhasználása nélkül
- ▶ nagyon szelektívek
- ▶ nagy affinitásúak ($K \geq 10^{11} \text{ M}^{-1}$)
- ▶ toxikus antigének esetén is működik
- ▶ antitest fragmentumok és származékok is előállíthatók

IMMUNANALITIKAI MÓDSZEREK

JELÖLT IMMUNREAGENST ALKALMAZÓ MÓDSZEREK

JELÖLÉS NÉLKÜLI MÓDSZEREK

Antitest feleslegben

Antitest korlátozott
mennyiségben

Antigén-antitest ekvivalens
mennyiségben

**IMMUNOMETRIKUS
MÓDSZEREK**
más néven *nem kompetitív,*
vagy
szendvics módszerek

**KOMPETITÍV
MÓDSZEREK**
más néven *versengő*
módszerek

**Precipitációs/ agglutinációs
módszerek**

jelzett antitest

jelzett antigén

nincs jelölés

pl.

- IRMA – immunoradiometrikus assay
- IEMA – immunoenzimatikus assay
- IFMA – immunofluorimetriás assay
- ILMA – immunoluminometrikus assay

pl.

- RIA – radioimmunoassay
- EIA – enzim immuno assay
- FIA – fluoreszcens immunoassay
- LIA – lumineszcens immunoassay

pl.

- radiális immundiffúzió
- turbidimetria
- nefelometria

IMMUNANALITIKAI MÓDSZEREK

JELÖLT IMMUNREAGENST ALKALMAZÓ MÓDSZEREK

JELÖLÉS NÉLKÜLI MÓDSZEREK

Antitest feleslegben

Antitest korlátozott
mennyiségben

Antigén-antitest ekvivalens
mennyiségben

**IMMUNOMETRIKUS
MÓDSZEREK**
más néven *nem kompetitív,*
vagy
szendvics módszerek

**KOMPETITÍV
MÓDSZEREK**
más néven *versengő*
módszerek

**Precipitációs
módszerek**

jelzett antitest

jelzett antigén

nincs jelölés

pl.

- IRMA – immunoradiometrikus assay
- IEMA – immunoenzimatikus assay
- IFMA – immunofluorimetriás assay
- ILMA – immunoluminometrikus assay

pl.

- RIA – radioimmunoassay
- EIA – enzim immunoassay
- FIA – fluoreszcens immunoassay
- LIA – lumineszcens immunoassay

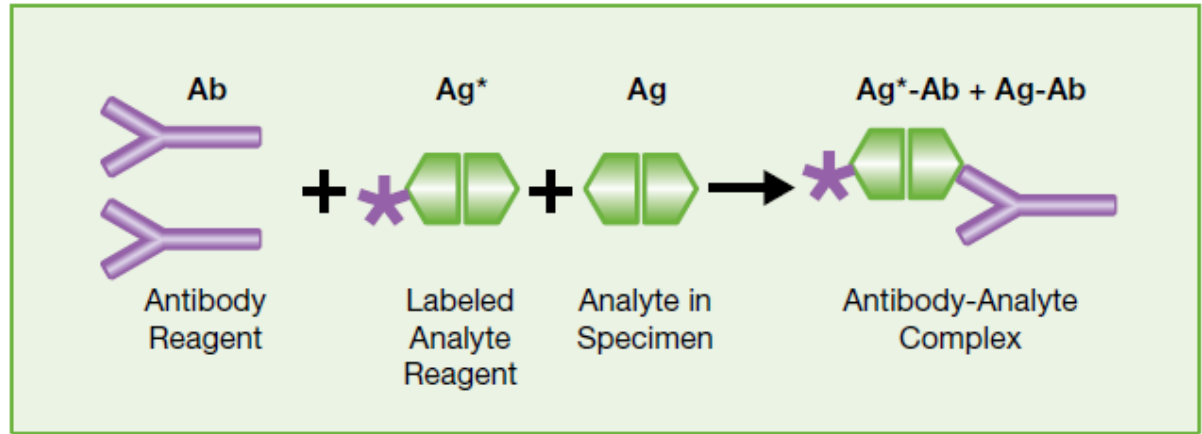
pl.

- radiális immundiffúzió
- turbidimetria
- nefelometria

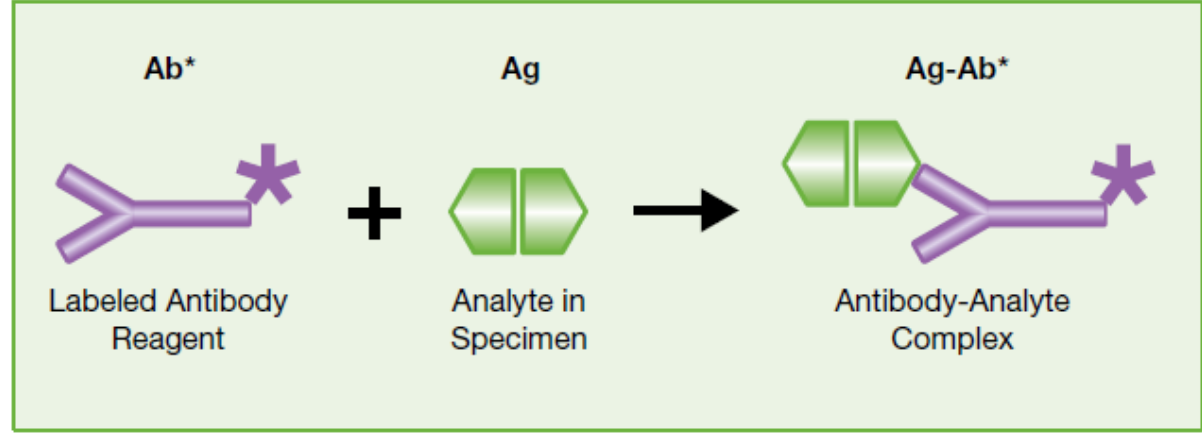
Immunoassay-ek

Jelölő anyag

- ▶ radioaktív izotóp
- ▶ enzim
- ▶ fluoreszcens molekula
- ▶ kemilumineszcens molekula
- ▶ mágneses nanorészecske



jelölt antigén



jelölt antitest

Radioaktív izotópos jelölés

1950-es évek végén fejlesztették ki (RIA, IRMA)

jelölő izotópok: ^{125}I , ^{131}I , (γ sugárzók), ^3H , ^{14}C (lágy β sugárzók)

hátrányai:

- ▶ hulladékok elhelyezése
- ▶ korlátozott felhasználási idő
- ▶ veszélyes anyagok
- ▶ költséges mérőberendezés
- ▶ állandó szervezett ellenőrzés

α sugárzás: He atommagok

β sugárzás: elektronok

γ sugárzás: elektromágneses sugárzás

Jelölésre használt radioaktív izotópok

γ sugárzó izotópos jelzés

- ▶ jól kidolgozott, gyors, olcsó jelölés
- ▶ érzékeny módszer (10^{-8} - 10^{-12} M)
- ▶ viszonylag rövid felezési idő (^{125}I -60 nap, ^{131}I -8 nap)
- ▶ “lebomlási katasztrófa” - a kémiai szerkezet is nagymértékben sérül
- ▶ kiváló minőségű számláló szükséges

β sugárzó izotópos jelzés

- ▶ jól kidolgozott jelöléstechnika
- ▶ érzékeny módszer (10^{-8} - 10^{-12} M)
- ▶ hosszú felezési idő (^3H -12,3 év, ^{14}C -5760 év)
- ▶ bonyolult és igen drága számlálóberendezés
- ▶ bonyolult és környezetszennyező vegyszeres előkészítés
- ▶ kereskedelmi forgalomban nemigen kapható

Enzim jelölés

1970-es években fejlesztették ki (EIA, IEMA)
kevésbé érzékeny, mint a radioizotópos módszerek
gyakran használt jelölő enzimek

- ▶ torma peroxidáz
 - ▶ alkalikus foszfatáz
 - ▶ β -galaktozidáz
- } +SZUBSZTRÁT → TERMÉK

Színes → abszorbancia

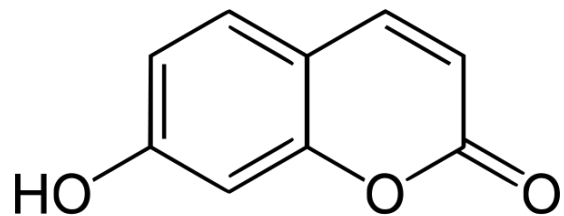
Fluoreszcens → fluoreszcencia (szélesebb koncentrációtartomány)

Kemilumineszcens → kemilumineszcencia (szélesebb koncentrációtartomány, kisebb kimutatási határ)

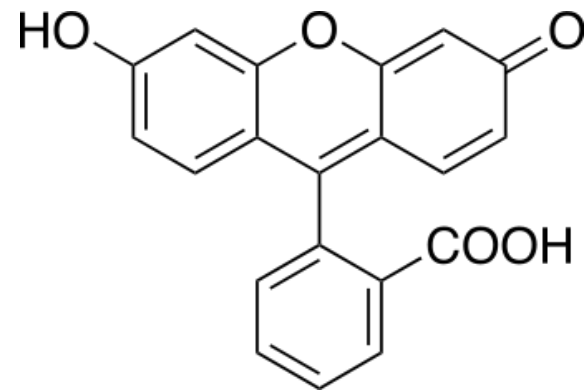
**ELISA - Enzyme Linked
Immunosorbent Assay**

Fluoreszcens jelölés

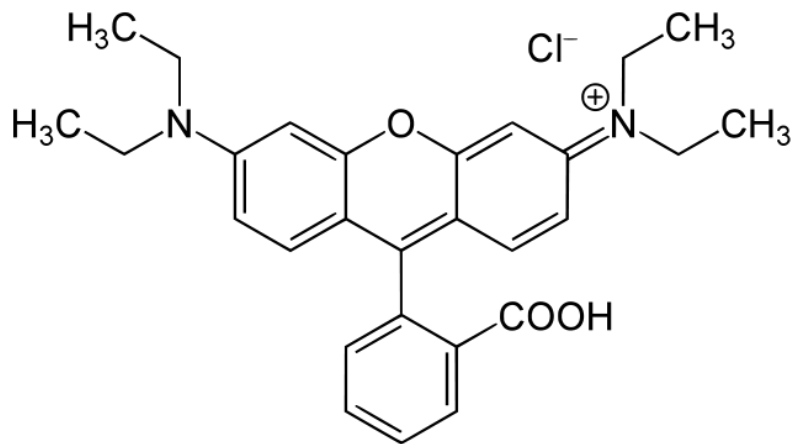
Jelölő anyagok



umbelliferon származékok



fluoreszcein

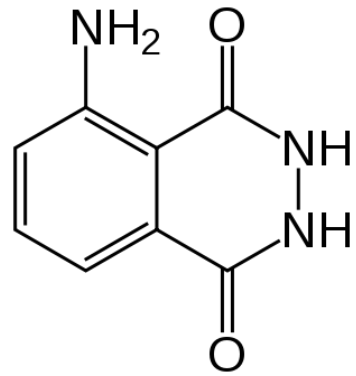


rhodamin B

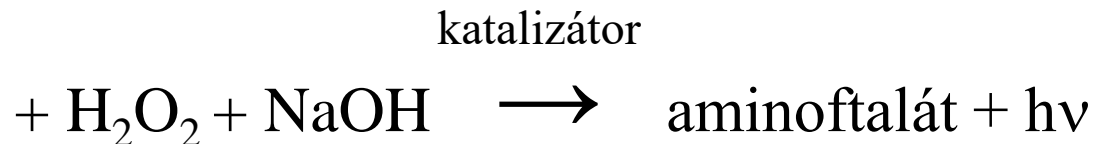
Kemilumineszcens jelölés

Jelölő anyagok luminol, izoluminol
akridínium észterek

Kemilumineszcencia

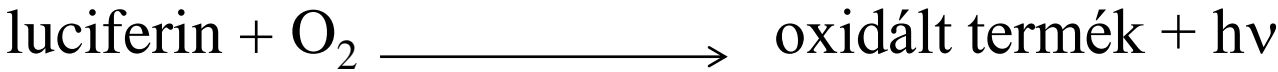


luminol



Biolumineszcencia

luciferáz enzim



Jelölési módszerek összehasonlítása

	Radioaktív Radioaktivitás	Enzim Abszorbancia	Fluoreszcens Fluoreszcencia	Kemilumineszcens Kemilumineszcencia
Kimutatási határ	10^{-8} - 10^{-12} M	10^{-5} M	10^{-8} M	10^{-8} - 10^{-12} M
Zaj	Nagyon kicsi	Mátrix zavar	Mátrix erősen zavar	Nagyon kicsi
Műszer	Bonyolult, drága	Közepes	Közepes	Egyszerű
Lineáris tartomány		10^2	10^3 - 10^4	10^6 - 10^7

IMMUNANALITIKAI MÓDSZEREK

JELÖLT IMMUNREAGENST ALKALMAZÓ MÓDSZEREK

JELÖLÉS NÉLKÜLI MÓDSZEREK

Antitest feleslegben

Antitest korlátozott
mennyiségben

Antigén-antitest ekvivalens
mennyiségben

**IMMUNOMETRIKUS
MÓDSZEREK**
más néven *nem kompetitív,*
vagy
szendvics módszerek

**KOMPETITÍV
MÓDSZEREK**
más néven *versengő*
módszerek

Precipitációs
módszerek

jelzett antitest

jelzett antigén

nincs jelölés

pl.

- IRMA – immunoradiometrikus assay
- IEMA – immunoenzimatikus assay
- IFMA – immunofluorimetriás assay
- ILMA – immunoluminometrikus assay

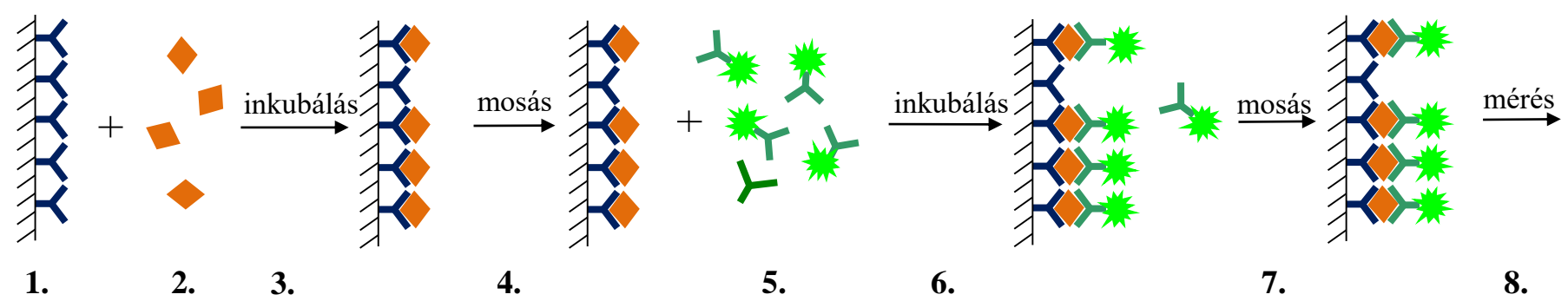
pl.

- RIA – radioimmunoassay
- EIA – enzim immuno assay
- FIA – fluoreszcens immunoassay
- LIA – lumineszcens immunoassay




pl.

- radiális immundiffúzió
- turbidimetria
- nefelometria

Nem-kompetitív immunoassay (szendvics módszer)



mérendő anyag az antigén

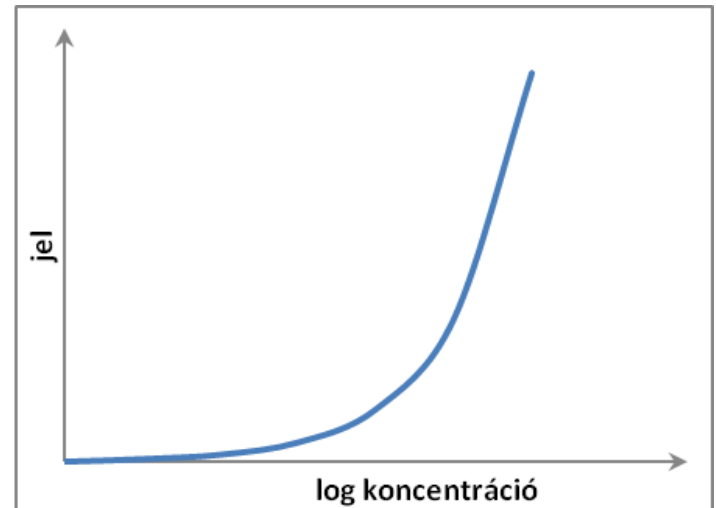
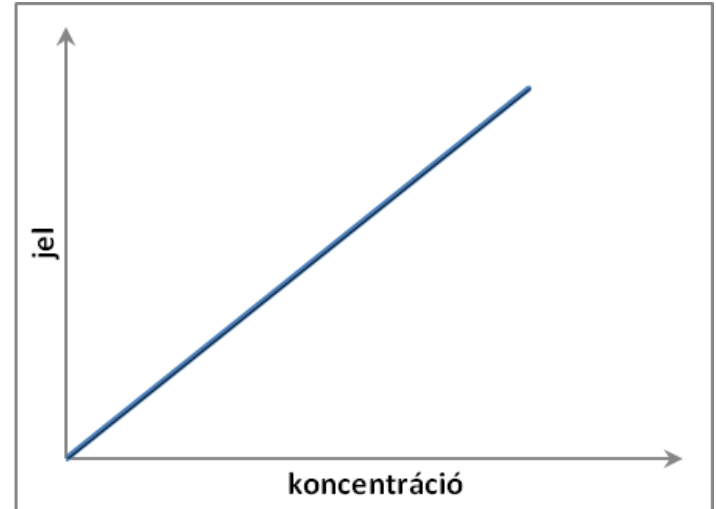
-  jelöletlen antitest
-  Mérendő, makromolekuláris antigén
-  második, jelzett antitest

Nem-kompetitív immunoassay

Jellemzői

- ▶ az ellenanyag kötőhelyek száma messze meghaladja a mérendő minta antigéneinek számát
 - ▶ az immunkomplex képződésének egyensúlya nagymértékben eltolódik a komplex felé, nagyon kevés antigén van szabadon
- ⇒ nagyon alacsony kimutatási határ

Jellegzetes kalibrációs görbéje



IMMUNANALITIKAI MÓDSZEREK

JELÖLT IMMUNREAGENST ALKALMAZÓ MÓDSZEREK

JELÖLÉS NÉLKÜLI MÓDSZEREK

Antitest feleslegben

Antitest korlátozott
mennyiségben

Antigén-antitest ekvivalens
mennyiségben

**IMMUNOMETRIKUS
MÓDSZEREK**
más néven *nem kompetitív,*
vagy
szendvics módszerek

**KOMPETITÍV
MÓDSZEREK**
más néven *versengő*
módszerek

**Precipitációs
módszerek**

jelzett antitest

jelzett antigén

nincs jelölés

pl.

- IRMA – immunoradiometrikus assay
- IEMA – immunoenzimatikus assay
- IFMA – immunofluorimetriás assay
- ILMA – immunoluminometrikus assay

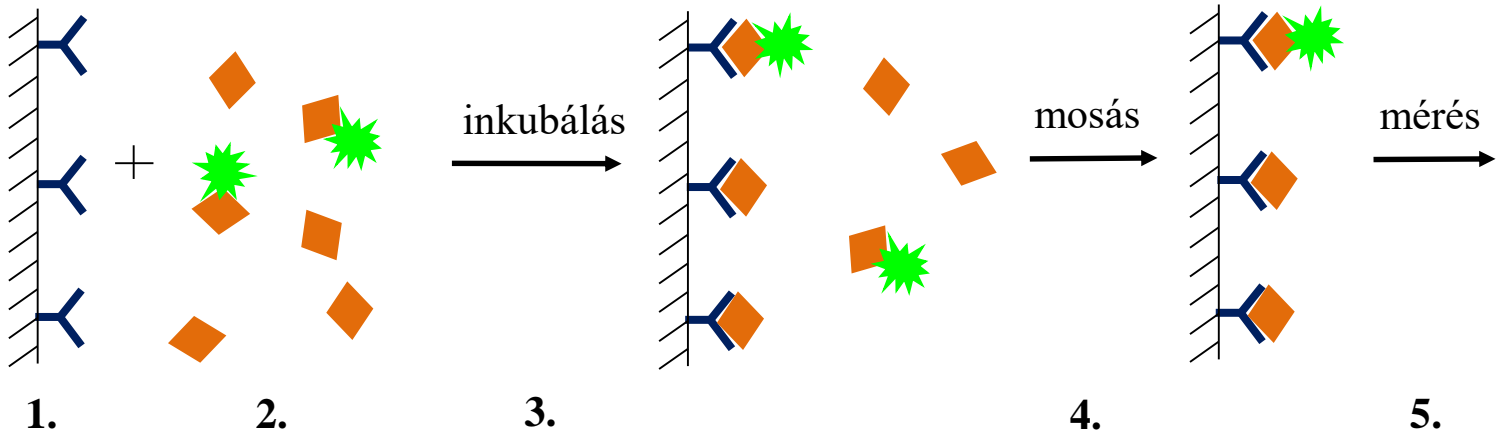
pl.




- RIA – radioimmunoassay
- EIA – enzim immuno assay
- FIA – fluoreszcens immunoassay
- LIA – lumineszcens immunoassay

pl.

- radiális immundiffúzió
- turbidimetria
- nefelometria

Kompetitív immunoassay



-  antitest
-  mérendő kisméretű antigén
-  jelzett antigén

Kompetitív immunoassay

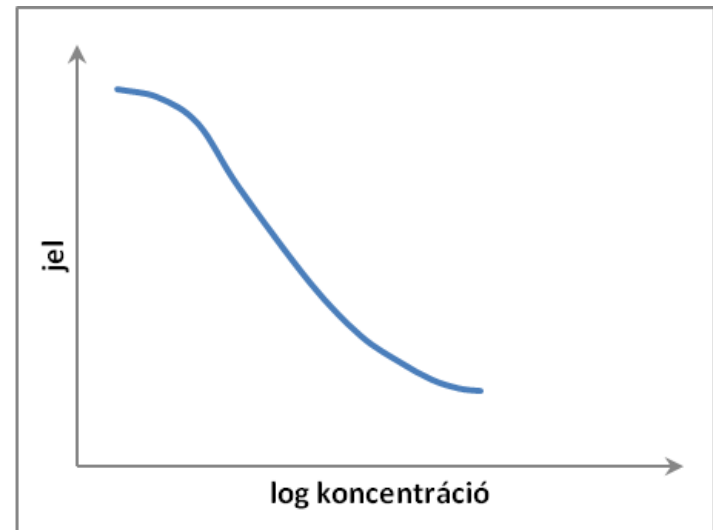
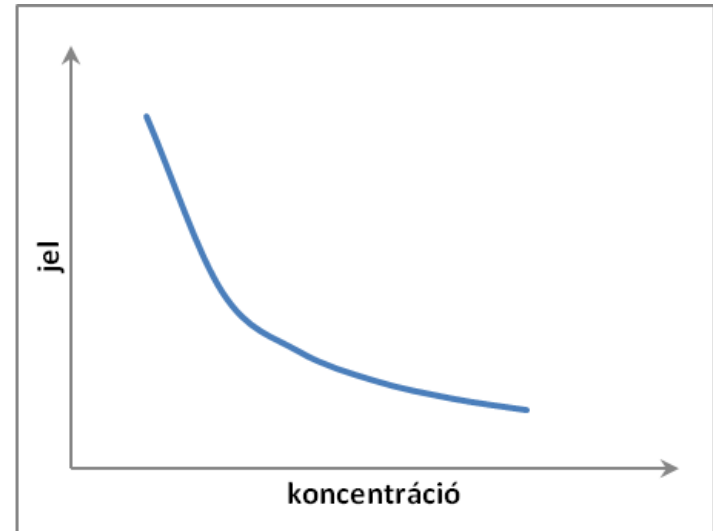
Jellemzői

▶ az ellenanyag kötőhelyek száma limitált, kevesebb kötőhely van, mint amennyi antigén és jelzett antigén összesen

▶ az egyensúly beálltakor marad kötetlen antigén

⇒ magasabb a kimutatási határ, mint a nem-kompetitív módszer esetén

Jellegzetes kalibrációs görbéje



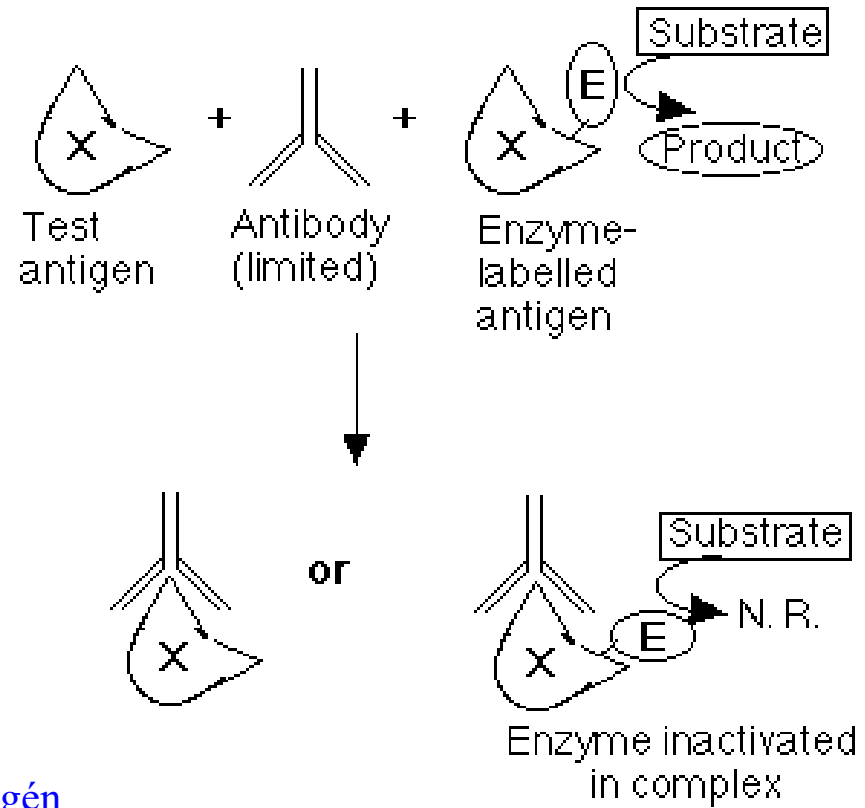
Heterogén és homogén immunoassay

heterogén immunoassay (kötött (immunkomplexben lévő) és szabad frakció fizikailag szeparálódik)

homogén immunoassay (kötött és szabad frakció fizikailag nem szeparálódik)

Homogén immunoassay

feltétele: a jelölő anyag jele megváltozzon, ha a jelölt anyag bekötődik az immunkomplexbe.



Heterogén immunoassay

- **Szilárd fázis**

műanyag kémcső
mikrotiter tálca
polimer szemcse
mágneses részecske

Immobilizáció

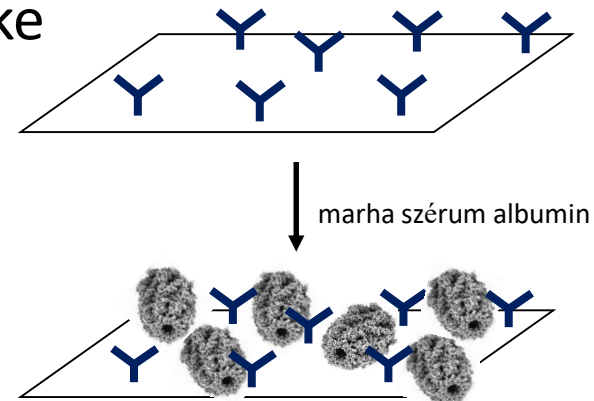
- ▶ fizikai adszorpció
- ▶ kovalens kötés
- ▶ speciális fehérjén keresztül (Protein A, vagy Protein G)

Elválasztás

- ▶ oldat kiöntése
- ▶ centrifugálás
- ▶ mágneses szeparáció

Blokkolás

- ▶ BSA
- ▶ eltérő móltömegű peptidok keveréke



Heterogén vs. homogén fázisú immunoassay

Heterogén immunoassay

- ▶ fizikailag elválasztják az antigén-ellenanyag komplexet a szabad antigéntől, (v. ellenanyagtól)
- ▶ az elválasztás munka- és időigényes, nehezebben automatizálható
- ▶ eltávolítják a mérés előtt a zavaró mátrix komponenseket
- ▶ nagyobb mintamennyiségek mérhetőek

Homogén immunoassay

- ▶ nincs fizikailag elválasztva az immunreakció után a kötött és szabad komponens
- ▶ egyszerű, könnyen automatizálható
- ▶ a méréshez szükséges, hogy az ellenanyaghoz való kötődés hatására a jelölő anyag valamilyen változást szenvedjen, pl.
 - az enzim inaktiválódjon
 - fluoreszcencia kioltódjon



ÉRZÉKENYSÉG, SPECIFICITÁS