

# IMUNOENZYMOVÉ METODY

## EIA

## **RIA**

- ✓ **zdravotní riziko**
- ✓ **krátký poločas rozpadů izotopů**
- ✓ **nákladné zařízení na měření radioaktivity**

## **EIA**

- ✓ **místo radioaktivity se měří enzymová aktivita**
- ✓ **není zdravotní riziko**
- ✓ **není nutné nákladné přístrojové vybavení**
- ✓ **reagencie jsou obvykle stálé**
- ✓ **metoda je levnější**
- ✓ **menší časová náročnost**
- ✓ **stejná citlivost jako RIA**  
antigen s  $M_r$  10 000 lze stanovit již při koncentraci  
10 pg/ml
- ✓ **je možná automatizace**

# TYPY EIA

- ❑ který reaktant se má stanovit (Ab nebo Ag)
- ❑ který reaktant je značený
- ❑ podle charakteru reakce (kompetice nebo nekompetice)
- ❑ podle toho jestli je třeba oddělit volný označený reaktant od vázaného v imunokomplexu

## **Rozdělení EIA**

podle toho, zda **aktivita enzymu**  
**v konjugátu zůstane nezměněná nebo se mění:**

- ❖ **Homogenní EIA**

**katalytická aktivita se mění**

- ❖ **Heterogenní EIA**

**katalytická aktivita**

**enzymu v konjugátu se nemění**

# HOMOGENNÍ EIA

aktivita enzymu, který byl konjugován haptenem nebo antigenem, se po vazbě na protilátku **mění**

## Provedení:

Nechá se reagovat známé množství označeného hapténu (antigenu) s limitovaným množstvím Ab. Aktivita enzymu je přímo úměrná množství konjugátu navázaného na protilátku.

**Výhoda:** není třeba separace

anglicky: EMIT (*enzyme multiplied immunoassay technique*)

Enzymová aktivita konjugátu se po vazbě na protilátku může **snížovat nebo zvyšovat**.

❖ **snížení enzymové aktivity**

inhibice aktivity enzymu v konjugátu po navázání Ab  
enzym-hapten má aktivitu a rozkládá substrát  
za vzniku produktu:



Když přidáme protilátku vznikne komplex, který nemá enzymovou aktivitu:



množství přidaného haptenu je přímo úměrné obnovené enzymové aktivitě

Pro volný haptén má protilátka vyšší afinitu, a proto H vytěsňuje z vazebných míst konjugát EH (kompetice).

**EH-Ab + H → EH + H-Ab (aktivita se obnoví)**  
množství přidaného hapténu je přímo úměrné obnovené enzymové aktivitě.

## **ENZYMY PRO ZNAČENÍ HAPTENU**

**lysozym (EC 3.2.1.17)**

**malátdehydrogenasa (EC 1.1.1.37)**

**glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (EC 1.1.1.49)**

□ **Inhibice enzymové aktivity** je způsobena **konformačními změnami**, které způsobuje protilátka v okolí aktivního místa enzymu (lysozymu)

lysozym má na 97 pozici jeden ze 6 zbytků  $\epsilon$ -aminoskupiny, na kterou se kovalentně váže haptén. Haptén se naváže v blízkosti katalytického místa, Ab ovlivňuje prostorové uspořádání

□ **Inhibice enzymové aktivity** je způsobena **znemožněním konformačním změn** nevyhnutelných pro vazbu substrátu (malátdehydrogenasa a glukoso-6-fosfátdehydrogenasa)

haptény se neváží do blízkosti katalytického místa, vazba Ab znemožňuje vznik konformačních změn, které indukují substrát těsně před navázáním se na enzym.

ojedinelý způsob, např. pro stanovení tyroxinu



## **Použití homogenní EIA**

- ✓ **kvantitativní stanovení nízkomolekulárních látek –haptény**
- ✓ **byly však popsány i stanovení vysokomolekulárních látek**
- ✓ **koncentrace léků (antibiotika, omamné látky, hypnotika, sedativa, cytostatika, kardiotonika)**
- ✓ **koncentrace hormonů (tyroxin, trijodtyroxin, kortizol, estriol)**
- ✓ **kontrola hladin léků a hormonů – monitorování**  
digoxin při léčení srdeční nedostatečnosti úzký rozsah hladin  
překročení hladiny – toxické účinky  
hledání správné dávky pro pacienta

## Výhody homogenní EIA:

- ✓ jednoduchost
- ✓ rychlost (několik minut)
- ✓ automatizace – jednoduchá

## Nevýhody homogenní EIA

- ✓ nižší citlivost než heterogenní EIA
- ✓ složitá příprava reagensů

# HETEROGENNÍ EIA

- ❖ oddělení volného značeného reaktantu od značeného reaktantu vázaného v komplexu s protilátkou.
- ❖ aktivita značeného enzymu se nemění

## Způsoby oddělení

- ✓ klasickou precipitací imunokomplexu v polyethylenglykolu
- ✓ pomocí druhé sekundární protilátky (jako RIA).
- ✓ jeden z reaktantů navázán na tuhý nosič (stěna zkumavky nebo jamky mikrotitr. dest.)  
oddělení promytím nebo centrifugací

Jde o princip imunoadsorbentu = enzymová imunoadsorbní analýza (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ELISA

## Požadavky kladené na enzym (značku):

- malá relativní molekulová hmotnost
- vysoká stabilita
- vysoká enzymová aktivita
- schopnost vázat se na protilátky a různé funkční skupiny antigenů
- produkt enzymové reakce musí být barevný nebo detekovatelný
- enzym musí být snadno dostupný a levný

## Nejčastěji používané enzymy:

- ❖ **křenová peroxidasa (EC 1.11.1.7)**
- ❖ **alkalická fosfatasa (EC 3.1.3.1)**
- ❖  **$\beta$ -D-galaktosidasa (EC 3.2.1.23)**
- ❖ **glukosaoxidasa (EC 1.1.3.4)**

## Typy ELISA:

- **kompetitivní ELISA pro antigeny a hapteny**
- **sendvičová ELISA pro antigeny (nekompetitivní nebo kompetitivní)**
- **nepřímá ELISA pro antigeny**
- **sendvičová ELISA pro protilátky**
- **ELISA na zachycení IgM**

## **substráty pro peroxidasu**

**3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidin**

**2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonát) - ABTS**

**o-fenylendiamin**

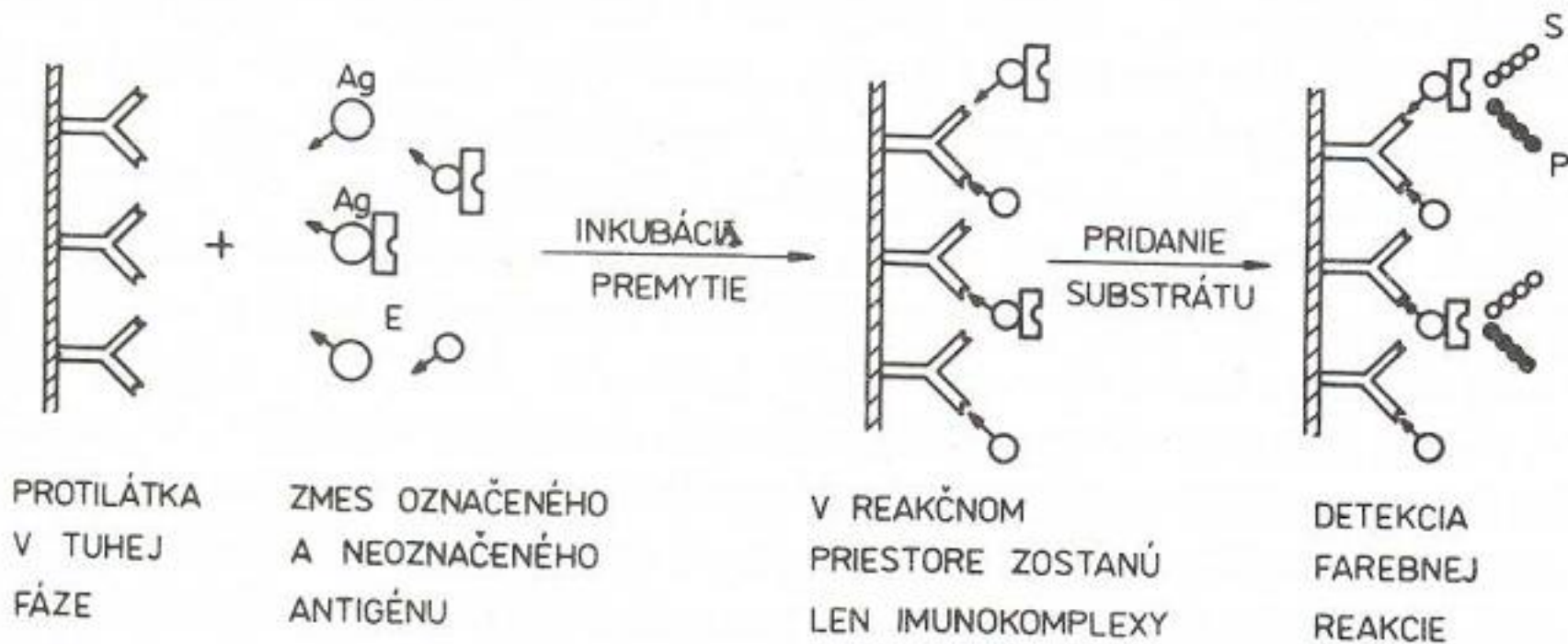
**o-dianisidin**

**o-toluidin**

## **substráty pro alkalickou fosfatasu**

**4-nitrofenylfosfát**

## Kompetitivní ELISA pro antigeny a hapteny



## **Princip:**

- ✓ na tuhou fázi se naváže protilátka specifická pro antigen
- ✓ přidá se známé množství enzymem označeného antigenu
- ✓ a známé množství (standard) neznačeného antigenu nebo neznámé množství neznačeného antigenu (vzorek).
- ✓ značený antigen soutěží se standardním nebo neznámým neznačeným antigenem.
- ✓ po skončení inkubace se jamka promyje tlumivým roztokem, (odstraní se volné reaktanty)
- ✓ zůstanou jen značené a neznačené antigeny navázané na imobilizované protilátky.
- ✓ přidá se roztok substrátu



## Vyhodnocení:

- ✓ čím víc bylo v reakční směsi neznačeného antigenu, tím méně je označeného antigenu v komplexu s protilátkou.
- ✓ intenzita zbarveného produktu se měří spektrofotometry pro ELISA techniky (reader),

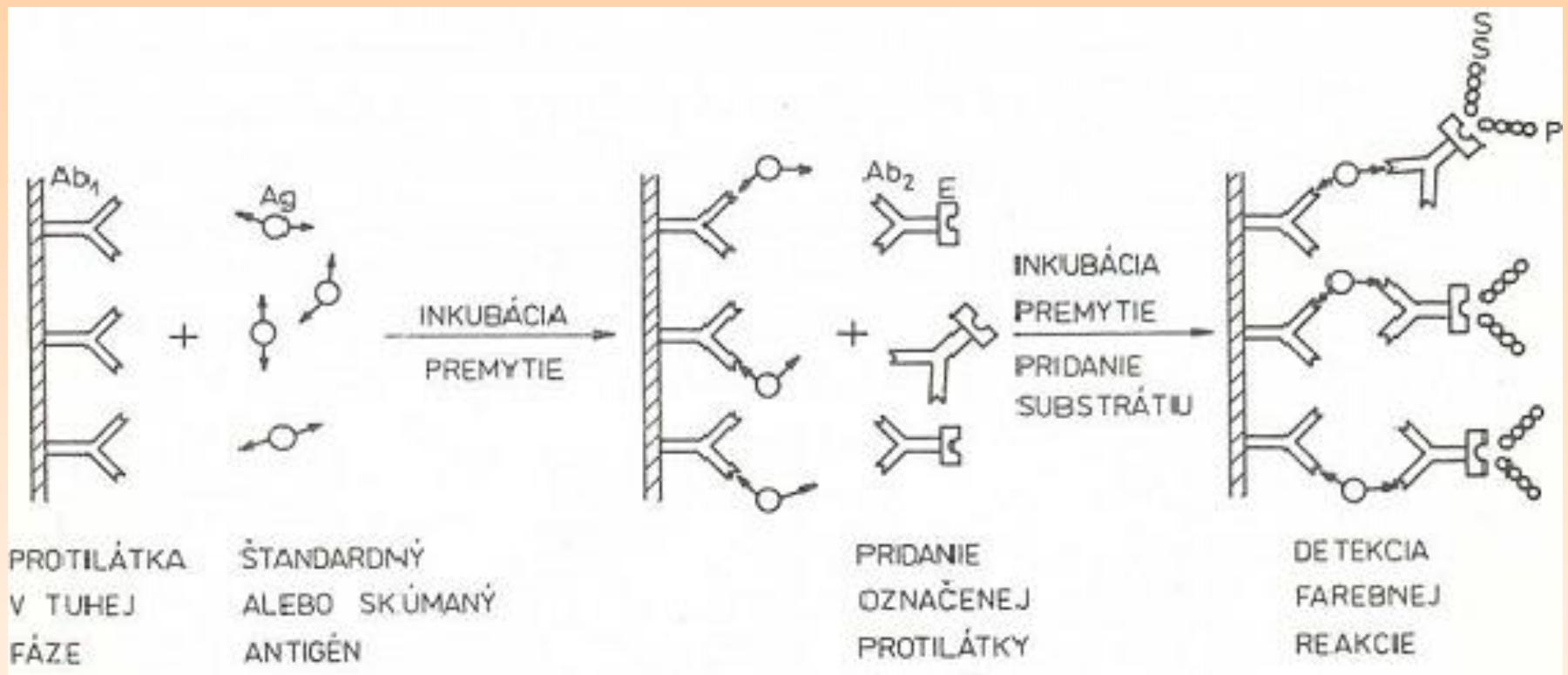
## Použití:

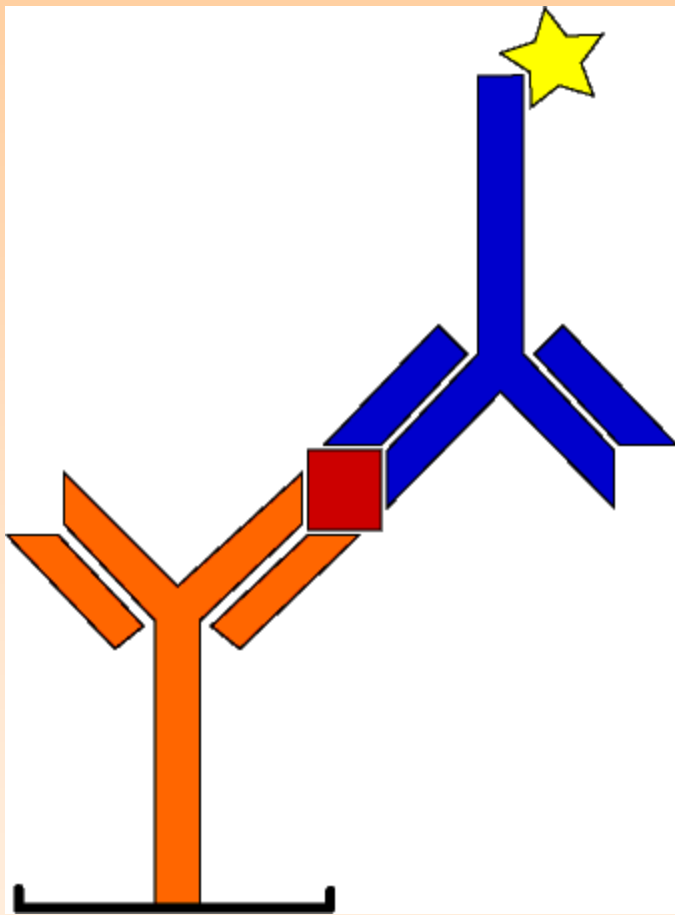
kvantitativní stanovení nízkomolekulárních látek,

**Stanovení:** **hormonů** (tyroxin, trijodtyroxin, prolaktin, inzulin, kortizol aj.)  
**léků** (theofilin, digitoxin, digoxin)  
**proteinů** (IgE, CEA)

CEA – karcinoembryonální antigen

# Sendvičová ELISA pro antigeny





## Sendvičová ELISA pro antigeny

## **Princip:**

- ✓ **na tuhou fázi se opět naváže protilátka**
- ✓ **na ni se navazují známé (standardy) nebo neznámé (vzorky) množství antigenu**
- ✓ **po promytí se přidá volná enzymem značená protilátka, (reaguje z druhé strany s volnými determinantami antigenu navázaného v komplexu)**
- ✓ **reakční prostor se opět promyje**
- ✓ **přidá se substrát na detekci enzymové aktivity.**

## **Antigeny:**

- ✓ nemusí být k dispozici značený čistý antigen, ale musí být známý obsah antigenu.

## **Protilátky:**

- ✓ použité sérum musí mít vysoký titr přísně monospecifických protilátek.
- ✓ doporučuje se imobilizovat na tuhou fázi protilátku jiného izotypu než je volná označená protilátka.
- ✓ obě protilátky musí mít stejnou specifičnost
- ✓ antigeny musí mít nejméně dvě determinanty

**Nejvhodnější: makromolekulové antigeny  
(HBsAg, IgE, CEA, feritin)  
jejichž příprava v čisté formě je složitá**

HBsAg – povrchový antigen viru hepatitidy B

CEA – karcinoembryonální antigen

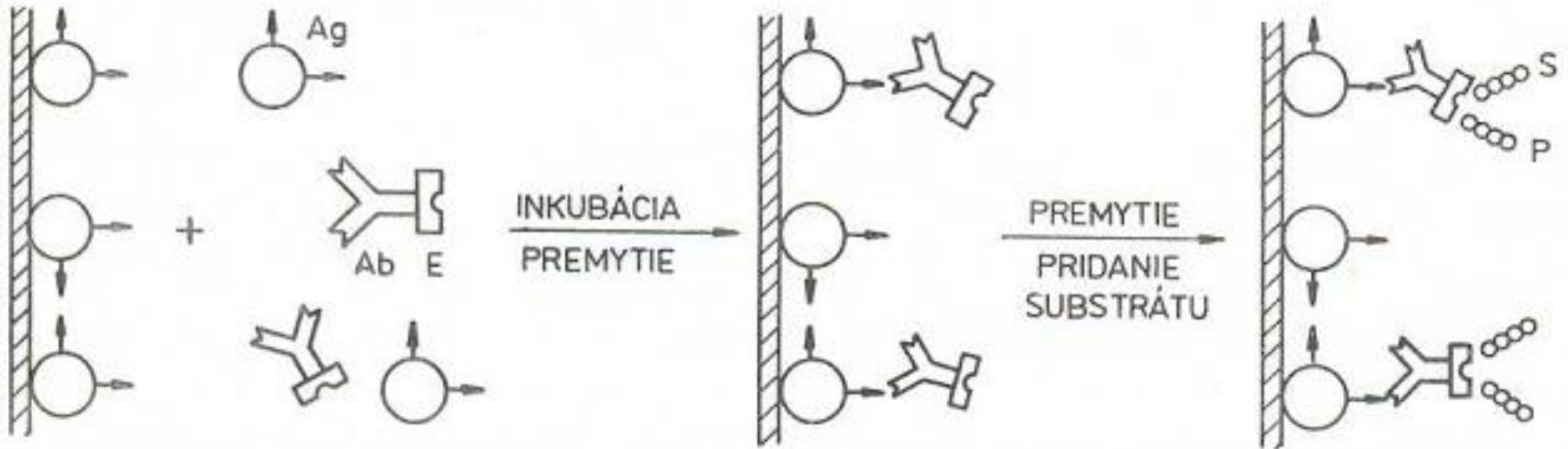
# OBMĚNA: Dvojitá senvičová ELISA

Místo druhé označené protilátky se použije neoznačená protilátka a vzniklý komplex ( $Ab_1$ -Ag- $Ab_2$ ) se detekuje **značeným antimonoglobulinem** (antiizotypová protilátka  $Ab_2$ )

Výhodou je možnost použít jednu komerčně dostupnou protilátku, která umožňuje kvantitativní stanovení různých antigenů.

**Nevýhoda:** prodloužení času analýzy  
větší možnost nespecifických reakcí

# Nepřímá ELISA pro antigeny



ANTIGÉN  
V TUHEJ  
FÁZE

ZMES VOL'NÉHO  
ANTIGÉNU A  
OZNAČENEJ  
PROTILÁTKY

DETEKCIA  
FAREBNEJ  
REAKCIE

## Princip:

- ✓ antigen se naváže na tuhou fázi (pokud se jedná o malý antigen, musí se předem navázat větší nosič BSA)
- ✓ zkoumaný roztok antigenu se smíchá se specifickou značenou protilátkou a směs se inkubuje s imobilizovaným antigenem.
- ✓ v kontrolní jamce se inkubuje směs, která neobsahuje antigen.
- ✓ po skončení inkubace se reakční jamky promyjí
- ✓ přidá se substrát

**Vyhodnocení:** rozdíl naměřené absorbance ve vzorku s volným antigenem a v kontrolní jamce určuje množství antigenu ve vzorku.

Je to **kompetitivní metoda**, v které o vazebné místo protilátky soutěží antigen imobilizovaný a antigen ve vzorku



## Platí:

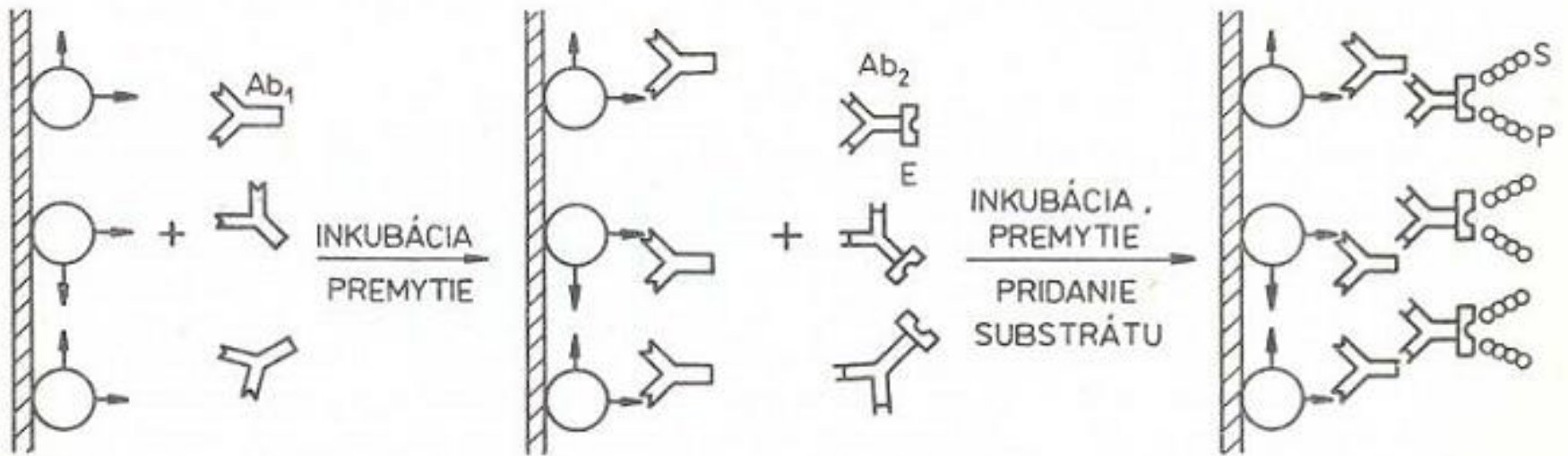
- ❖ Čím víc antigenu bude ve vzorku, tím méně protilátky se může navázat na imobilizovaný antigen a tím menší je intenzita zbarvení v reakčním vzorku.
- ❖ nejvíce zbarvený bude roztok v kontrolní jamce.

## Modifikace:

Místo označené protilátky se použije **neoznačená protilátka** (např. ve formě králičího IgG) a imobilizované imunokomplexy se detekují pomocí značeného antiimunoglobulinu ve formě sekundární protilátky (např. prasečí IgG proti králičímu IgG)

Výhodou této modifikace je možnost použít komerčně dostupné značené protilátky.

# Senvičová ELISA pro protilátky



ANTIGÉN  
V TUHEJ  
FÁZE

PROTILÁTKA  
V SKÚMANEJ  
VZORKE

PRIDANIE  
OZNAČENÉHO  
ANTIIMUNOGLOBULÍNU

DETEKCIA  
FAREBNEJ  
REAKCIE

# Sendvičová ELISA pro protilátky (nepřímá ELISA na detekci protilátek)

## Princip:

- ✓ antigen se naváže na tuhou fázi
- ✓ přidá se zředěné sérum (v kterém se má určit přítomnost protilátek)
- ✓ po inkubaci se jamky promyjí
- ✓ přidá se enzymem značená sekundární protilátka
- ✓ opět se promyje
- ✓ přidá se enzymový substrát

**Využití:** důkaz protilátek proti HIV-1, jednomu z virů vyvolávající syndrom získané imunitní nedostatečnosti AIDS. Lze stanovit v čase kratším jak 3 hodiny.

Metoda se využívá v diagnostických soupravách na důkaz přítomnosti protilátek proti různým původcům infekčního onemocnění.

**Diagnostické soupravy** tohoto typu obsahují:

- ✓ virový, bakteriový nebo parazitní antigen (většinou imobilizovaný na tuhé fázi)
- ✓ kontrolní pozitivní a negativní sérum
- ✓ při vlastním stanovení se porovnává testované sérum s oběma kontrolními séry.

**Modifikace:** dvojitá sendvičová ELISA

(stejný princip jako při dvojité sendvičové ELISA pro antigeny).

Je citlivější jako jednoduchá sendvičová ELISA ,ale na druhé straně je méně specifická.

# SENDVIČOVÁ ELISA PRO PROTILÁTKY

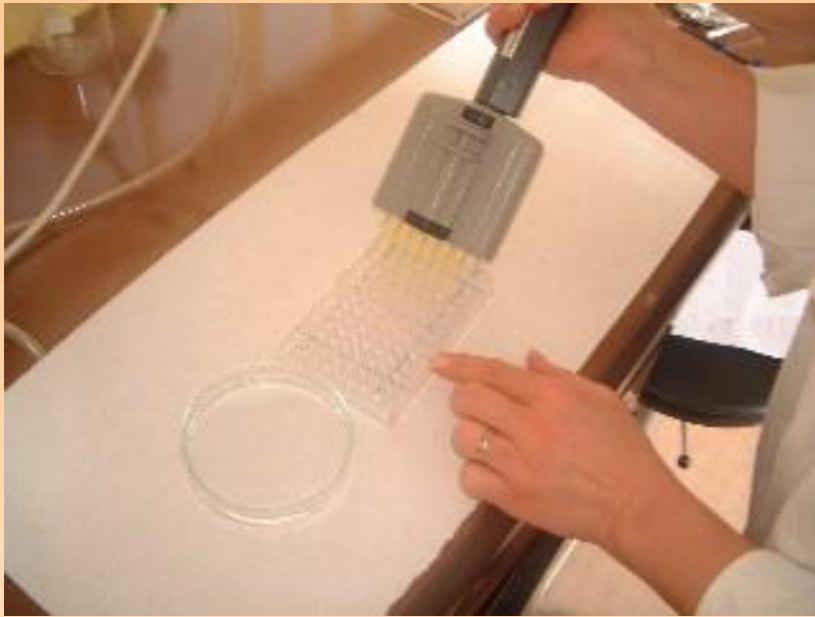
**PRAKTICKY**

**Pipetování antigenu a protilátky  
do destičky s imobilizovaným  
antigenem**

**1. inkubace**

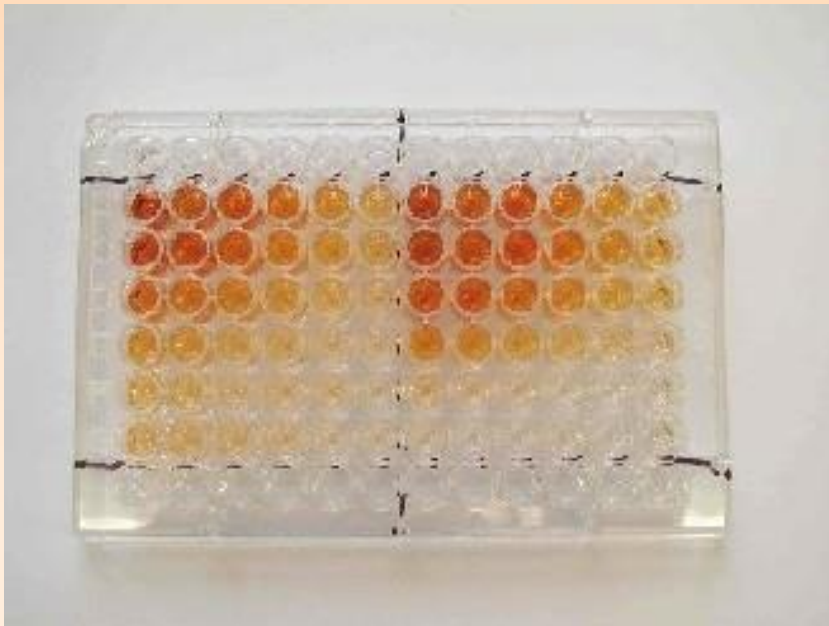
**Odstranění nenavázaných složek  
pomocí promývačky**





**Pipetování sekundární protilátky značené enzymem a následná druhá inkubace.**

**Po odstranění nenavázaných složek pipetování substrátu pro enzym.**



**Enzymová reakce a její zastavení kyselinou sírovou.**



**Měření absorbance pomocí fotometru (ELISA-reader pro automatické měření absorbance v mikrotitračních destičkách)**

# Sendvičová ELISA důkaz protilátek proti HIV-1 (Roche)

1.

1. 0,01 mL SKÚMANEJ VZORKY ŠÉRA (SV)  
 2. 0,01 mL NEGATÍVNEHO KONTROLNEHO ŠÉRA (NK)  
 3. 0,01 mL POZITÍVNEHO KONTROLNEHO ŠÉRA (PK - 3x)  
 2. 1 mL TLMIVÉHO ROZTOKU  
 3. 1 ČASTICA (GULÖČKA) OBALENÁ VÍRUSOVÝM ANTIGÉNOM

2.

PRVÁ  
1h INKUBÁCIA  
PRI 37°C

3.

PREMYTIE

4.

PRIDAŤ PO 0,25 mL  
ANTI - ĽUDSKÉHO  
IMUNOGLOBULÍNU  
OZNAČENÉHO  
PEROXIDÁZOU

5.

DRUHÁ  
1h INKUBÁCIA  
PRI 37°C

6.

PREMYTIE

7.

PRIDAŤ PO  
0,25 ml.  
PRACOVNÉHO  
ROZTOKU  
SUBSTRÁTU  
(O-FENYLÉN-  
DIAMÍN)

8.

INKUBÁCIA  
30 min PRI  
LABORATÓRNEJ  
TEPLOTE  
V TME

9.

PRIDAŤ PO  
1 mL KYSELINY  
SÍROVEJ

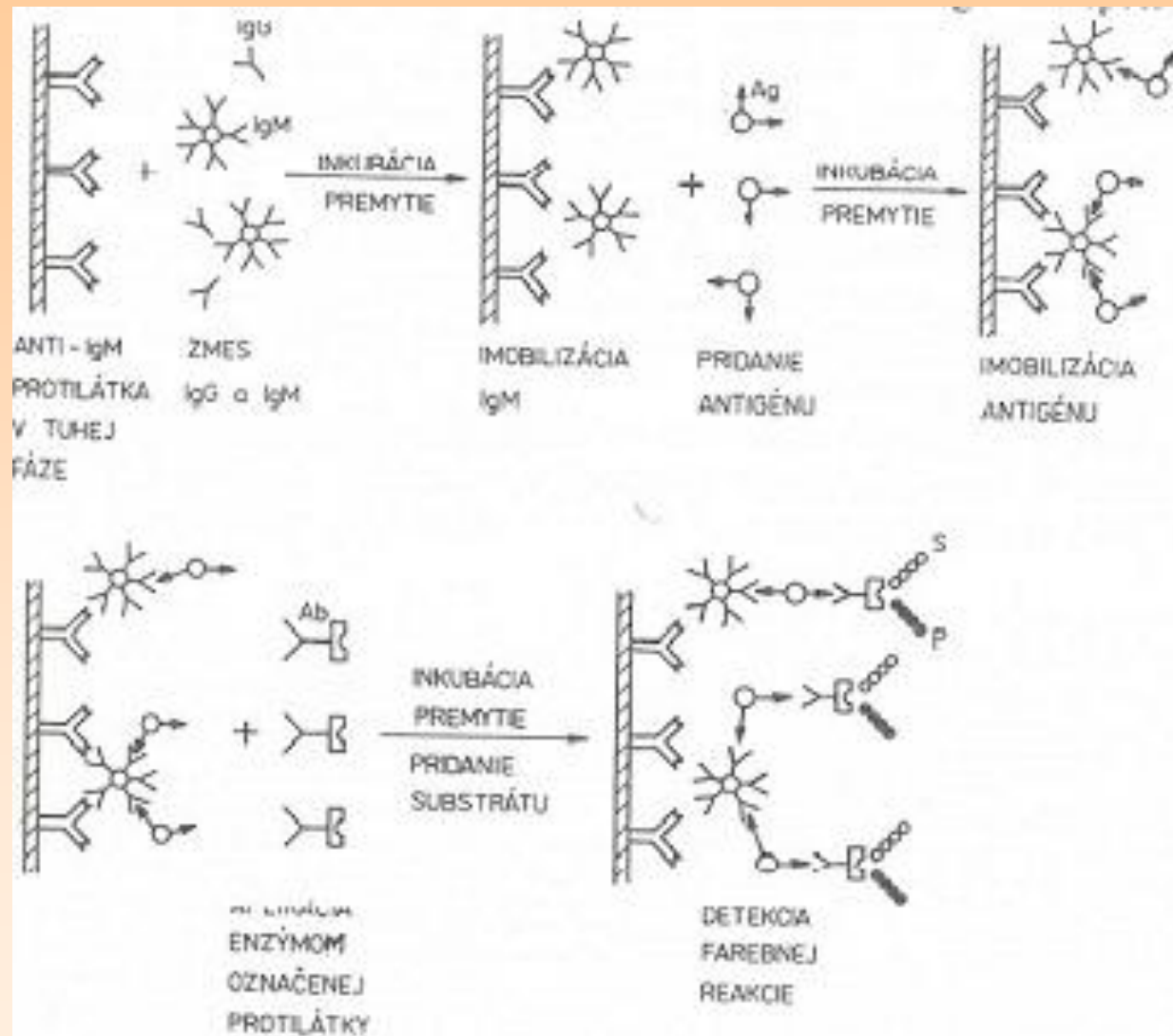
10.

ZMERAŤ  
ABSORBANCIU  
FAREBNÉHO  
ROZTOKU

492 nm



# ELISA na zachycení protilátek IgM (IgM-capture)



## **Princip:**

- ✓ na tuhou fázi se nejprve naváže anti-IgM protilátka, která z vyšetřovaného séra vychytá všechny IgM.
- ✓ po promytí se přidá antigen (naváže na IgM, které pro něj mají specifické místo)
- ✓ po promytí se přidá specificky označená protilátka proti antigenu.
- ✓ po inkubaci a promytí se přidá substrát

**Využití:** na důkaz protilátek proti některým virovým antigenům, např. proti viru hepatitidy A