

3η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Επ. Καθ. Αικατερίνη Χλίχλια

ΑΝΟΣΟΔΟΚΙΜΑΣΙΑ:

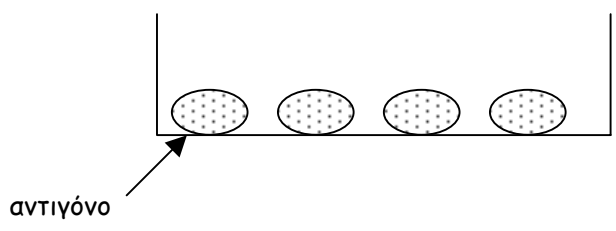
ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΕΩΣ ΜΕ ΣΥΝΔΕΣΗ ΕΝΖΥΜΟΥ (ELISA)

Στις τεχνικές των ανοσοδοκιμασιών χρησιμοποιούνται σημασμένα αντισώματα για την ανίχνευση αντιγόνων και αντισωμάτων. Είναι εξαιρετικά ευαίσθητες και πολύ οικονομικές στην κατανάλωση αντιδραστηρίων. Στις δοκιμασίες στερεάς φάσης για αντισώματα χρησιμοποιούνται προσδέματα σημασμένα με ραδιοϊσότοπα (ραδιοανοσοανάλυση, radio-immunoassay, RIA) ή ένζυμα (ανοσοπροσοροφητική ανάλυση στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου, enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Στη ραδιοανοσοανάλυση σημαίνεται το σταθερό συστατικό (αντίσωμα ή αντιγόνο) με ραδιοϊσότοπο, συνήθως με ραδιενεργό ^{125}I . Στην ELISA γίνεται χημική σύνδεση ενός ενζύμου με το αντίσωμα ή το αντιγόνο. Αυτές είναι οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες από όλες τις ανοσολογικές δοκιμασίες, επειδή μπορεί να πραγματοποιηθεί μεγάλος αριθμός δειγμάτων σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα. Πρόσφατα οι δείκτες φθορισμού (immunofluorescence) ή χημειοφωταύγειας (chemiluminescence) τείνουν να αντικαταστήσουν τα ραδιοϊσότοπα ως μέσα σήμανσης.

Ανοσοδοκιμασία για αντισώματα:

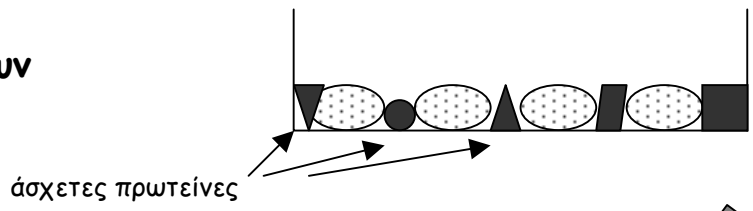
Αντιγόνα επωάζονται σε ισότονο διάλυμα αλάτων, μέσα σε πλαστικά πλακίδια ή σωληνάρια. Μικρές ποσότητες προσροφώνται επάνω στην πλαστική επιφάνεια. Το ελεύθερο αντιγόνο απομακρύνεται με πλύση. (Στο πλακίδιο μπορεί να προστεθεί περίσσεια άσχετης πρωτεΐνης για να παρεμποδισθεί οποιαδήποτε μη ειδική σύνδεση πρωτεϊνών). Προστίθεται το εξεταζόμενο αντίσωμα, το οποίο συνδέεται με το αντιγόνο. Οι μη προσδεμένες πρωτεΐνες απομακρύνονται με πλύση. Το αντίσωμα ανιχνεύεται από ένα σημασμένο πρόσδεμα/αντίσωμα. Το μη συνδεδεμένο πρόσδεμα απομακρύνεται με πλύση. Μετράται το σήμα που βρίσκεται προσδεδεμένο στα πλακίδια.

Προσρόφηση του αντιγόνου
στο πλακίδιο



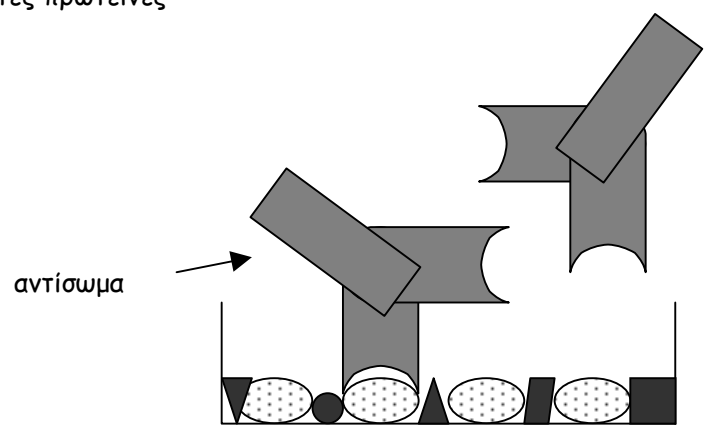
Πλύση

Μπλοκάρισμα των ακάλυπτων
θέσεων



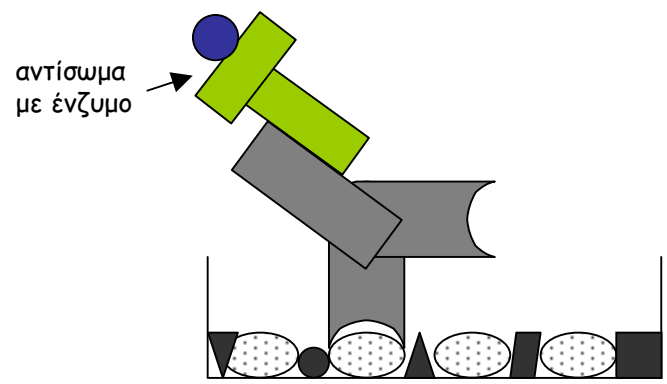
Πλύση

Προσθήκη εξεταζόμενου
αντισώματος



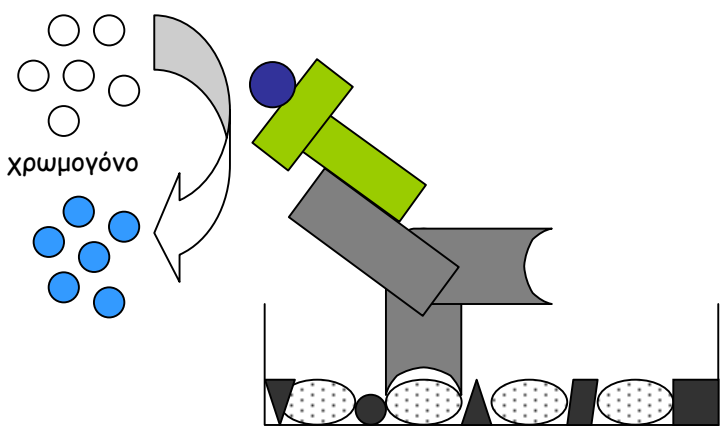
Πλύση

Προσθήκη αντι-αντισώματος
συνδεδεμένου με ένζυμο



Πλύση

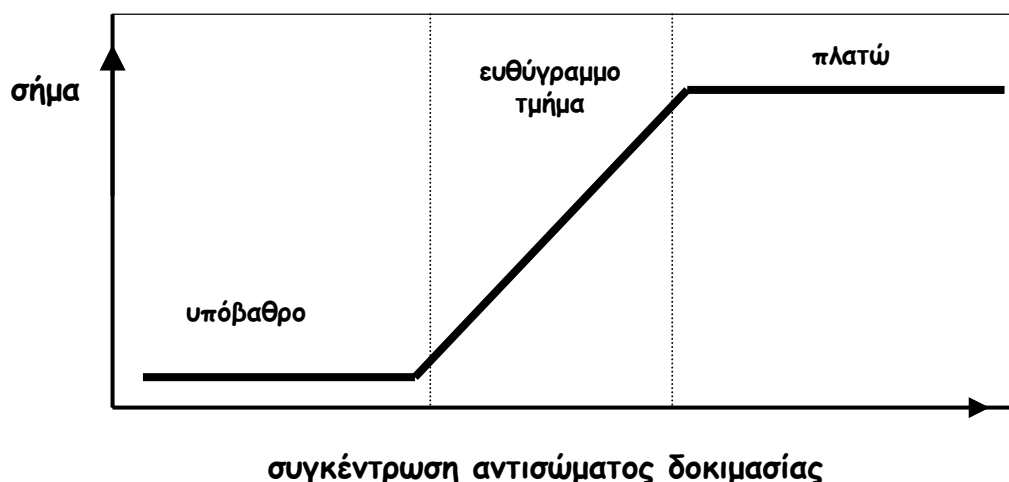
Προσθήκη χρωμογόνου



Εμφάνιση πλάκας

Το σημασμένο αντίσωμα καθίσταται ορατό με την προσθήκη χρωμογόνου, το οποίο είναι ένα άχρωμο υπόστρωμα επάνω στο οποίο δρα το ενζυμικό τμήμα του αντισώματος για να παραχθεί ένα έγχρωμο τελικό προϊόν. Η ποσότητα του εξεταζόμενου αντισώματος μετριέται εκτιμώντας την ποσότητα του έγχρωμου τελικού προϊόντος με σάρωση της οπτικής πυκνότητας του πλακιδίου. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάγνωση πολλών φρεατίων σε πλακίδια με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρων ELISA, πράγμα που κάνει τη μέθοδο ταχύτατη.

Τυπική καμπύλη τιτλοποίησης



Στην παραπάνω γραφική παράσταση φαίνεται μία τυπική καμπύλη τιτλοποίησης. Όταν αυξάνεται η ποσότητα του εξεταζόμενου αντισώματος, τότε το σήμα αυξάνεται από ένα βασικό επίπεδο, μέσω μιας γραμμικής περιοχής, έως ένα πλατώ. Οι τίτλοι του αντισώματος μπορούν να ανιχνευθούν σωστά μόνο μέσα στη γραμμική περιοχή. Τυπικά, η πρόσδεση στην περιοχή του πλατώ είναι 20-100 φορές μεγαλύτερη από ότι στο βασικό επίπεδο. Η ευαισθησία της τεχνικής είναι συνήθως περίπου 1-50 ng/ml ειδικού αντισώματος. Η εξειδίκευση της μεθόδου μπορεί να ελεγχθεί με πρόσθεση αυξανόμενων συγκεντρώσεων ελεύθερου αντιγόνου στο εξεταζόμενο αντίσωμα, στο στάδιο της προσθήκης του αντισώματος δοκιμασίας. Αυτό προσδένεται στο αντίσωμα και το παρεμποδίζει να συνδεθεί με το αντιγόνο επάνω στο πλακίδιο. Η προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων ελευθέρου αντιγόνου ελαττώνει την ισχύ του σήματος.

Υλικά

πλακίδια ELISA, διαλύματα ELISA, εξεταζόμενα αντισώματα/πολυκλωνικός ορός
σημασμένο αντίσωμα, ταμπλέτες OPD (ortho-phenyl-diamine; διαμίνη του φαινυλενίου)
πιπέττες και tips
επωαστήρας / κλίβανος 37°C

Μέθοδος

1. Τοποθετούμε στα πλακίδια ELISA πρωτεϊνικό ομογενοποίημα παρασιτικών σκωλήκων για προσρόφηση στην πλαστική επιφάνεια των φρεατίων, 100 μl σε κάθε φρεάτιο (με συγκέντρωση του πρωτεϊνικού ομογενοποιημένου: 10 μg/ml σε διάλυμα ανθρακικών-διανθρακικών αλάτων)
2. Επώαση όλη νύχτα ή για 4 ώρες στους 37°C.
3. Πλύσιμο των πλακιδίων ELISA με διάλυμα πλύσης (PBS-T 0.05%), 3 φορές. Αφαιρούμε το διάλυμα από τα φρεάτια, αναποδογυρνώντας τα πλακίδια και πετώντας το υγρό. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 150-200 μl διάλυμα πλύσης στα φρεάτια και μετά το αφαιρούμε. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία πλύσης για άλλες 2 φορές.
(Το ελεύθερο αντιγόνο απομακρύνεται με την πλύση)
4. Αφού αφαιρέσουμε το τελευταίο υγρό πλύσης, προσθέτουμε σε κάθε φρεάτιο 200 μl διαλύματος blocking (PBS-T 0.05%-FCS 5%).
(Πρόσθεση περίσσειας άσχετων πρωτεϊνών με σκοπό το μπλοκάρισμα πιθανών σημείων προσρόφησης).
5. Επώαση 1 h, 37°C.
6. Πλύσιμο των πλακιδίων, 3 φορές (βλ. 3).
7. Πρόσθεση του εξεταζόμενου αντισώματος / πολυκλωνικού ορού
(στην προκειμένη περίπτωση, ορός αίματος από μολυσμένα κουνέλια ή ποντίκια). Αραιώνουμε τον προς εξέταση ορό 1:100 σε διάλυμα blocking.
Χρησιμοποιούμε ορό από καθαρά, μη μολυσμένα πειραματόζωα ως αρνητικό control, αραιώση του ορού 1:100 σε διάλυμα blocking.
Προσθέτουμε 100 μl αραιωμένο ορό σε κάθε φρεάτιο.
8. Επώαση 2 h, 37°C.
9. Πλύσιμο των πλακιδίων, 3 φορές (βλ. 3).

10. Χρησιμοποιούμε σημασμένο αντίσωμα του εμπορίου ειδικό για κουνέλια (anti-rabbit) συνδεδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση (anti-rabbit IgG peroxidase labeled conjugate ή anti-mouse IgG peroxidase labeled conjugate).
Αραιώνουμε το σημασμένο αντίσωμα 1:2000 σε διάλυμα blocking και προσθέτουμε 100 μl αραιωμένο σημασμένο αντίσωμα σε κάθε φρεάτιο.
(Το σημασμένο αντίσωμα θα συνδεθεί με το εξεταζόμενο αντίσωμα/αντι-ορό που έχει προσδεθεί).
11. Επώαση 1 h, 37°C.
12. Πλύσιμο των πλακιδίων, 3 φορές (βλ. 3).
13. Χρησιμοποιούμε το διάλυμα OPD (ortho-phenyl-diamine; διαμίνη του φαινυλενίου).
Προσθέτουμε στο διάλυμα αυτό υπεροξειδίο του υδρογόνου πριν τη χρήση.
Προσθέτουμε 100 μl από το έτοιμο διάλυμα OPD σε κάθε φρεάτιο.
(Το OPD είναι ένα χρωμογόνο, ένα άχρωμο δευτερογενές υπόστρωμα. Με τη δράση της υπεροξειδάσης (το ενζυμικό τμήμα του αντισώματος) παράγεται ένα έγχρωμο τελικό προϊόν).
14. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, παρατηρούμε την εμφάνιση χρώματος (5-15 min).
15. Σταματούμε την αντίδραση προσθέτωντας το διάλυμα stop.
Προσθέτουμε 50 μl διαλύματος stop σε κάθε φρεάτιο.
16. Διαβάζουμε την οπτική πυκνότητα σε μήκος κύματος 490 nm σε φωτόμετρο ELISA.
Ως control αναφοράς χρησιμοποιούμε dH₂O, και ως μήκος κύματος αναφοράς, 650 nm.

	1	2	Pos		Neg		7	8	9	10	11	12
			3	4	5	6						
A			10*	10	10	10						
B			5	5								
C			2.5	2.5								
D			1.2	1.2								
E			0.6	0.6								
F			0.3	0.3								
G			0	0								
H												

* Οι αριθμοί που αναγράφονται στα τετράγωνα αντιπροσωπεύουν τη συγκέντρωση του αντιγόνου (σε $\mu\text{g}/\text{ml}$ διαλύματος προσρόφησης), η οποία χρησιμοποιήθηκε για την προσρόφηση στα φρεάτια των πλακιδίων ELISA. Εγιναν διαδοχικές αραιώσεις 1:2 της αρχικής συγκέντρωσης του αντιγόνου (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) σε διάλυμα προσρόφησης. Η προσρόφηση με αντιγόνο έλαβε χώρα κατά τη διάρκεια όλης της νύχτας σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα πλακίδια ELISA αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο (4°C).

Τα προς εξέταση δείγματα θα τοποθετηθούν κατά την άσκηση στα φρεάτια εις διπλούν. Στις στήλες 3 και 4 θα τοποθετηθούν τα προς εξέταση δείγματα (στην προκειμένη περίπτωση θετικά (pos) control δείγματα, από ορό μολυσμένων ζώων). Στα φρεάτια 5A και 6A θα τοποθετηθούν τα αρνητικά (neg) δείγματα (από ορό μη μολυσμένων ζώων).

Παρασκευή διαλυμάτων για ELISA:

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS) (10x)

3.36 g μονοβασικό φωσφορικό νάτριο (NaH_2PO_4), 10.23 g διβασικό φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4), 85.3 g χλωριούχο νάτριο (NaCl)

Ρύθμιση του pH στα 7.2-7.4 και πρόσθεση dH_2O μέχρι 1 λίτρο

Αραίωση με dH_2O (1:10) για παρασκευή 1 x PBS

PBS-T 0.05% (Διάλυμα πλύσης)

0.5 ml Tween 20 σε 1 λίτρο 1 x PBS

PBS-T 0.05% - FCS 5% (Διάλυμα blocking)

5 ml ορός αίματος από μοσχάρι (fetal calf serum, FCS) σε 95 ml PBS-T 0.05 %

Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών-διανθρακικών αλάτων pH 9.6 (Διάλυμα προσροφήσεως)

(A) 1 M διανθρακικό νάτριο (8.4 g NaHCO_3 σε 100 ml dH_2O)

(B) 1 M ανθρακικό νάτριο (10.6 g Na_2CO_3 σε 100 ml dH_2O)

Πρόσθεση 4.53 ml (A) + 1.82 ml (B), ρύθμιση του pH στα 9.6, και πρόσθεση dH_2O μέχρι 100 ml

Διάλυμα φωσφορικού άλατος και κιτρικού οξέος (0.05 M) (Διάλυμα υποστρώματος)

25.7 ml 0.2 M διβασικό φωσφορικό νάτριο (3.6 g Na_2HPO_4 σε 100 ml dH_2O)

24.3 ml 0.1 M κιτρικό οξύ (2.1 g κιτρικό οξύ σε 100 ml dH_2O)

50.0 ml dH_2O

Ρύθμιση του pH στα 5.0 και πρόσθεση dH_2O μέχρι 100 ml

Διάλυμα ενζύμου υπεροξειδάσης (Διάλυμα OPD)

Διαλύουμε μία ταμπλέτα OPD των 30 mg σε 3 ml διαλύματος υποστρώματος (10 mg/ml)

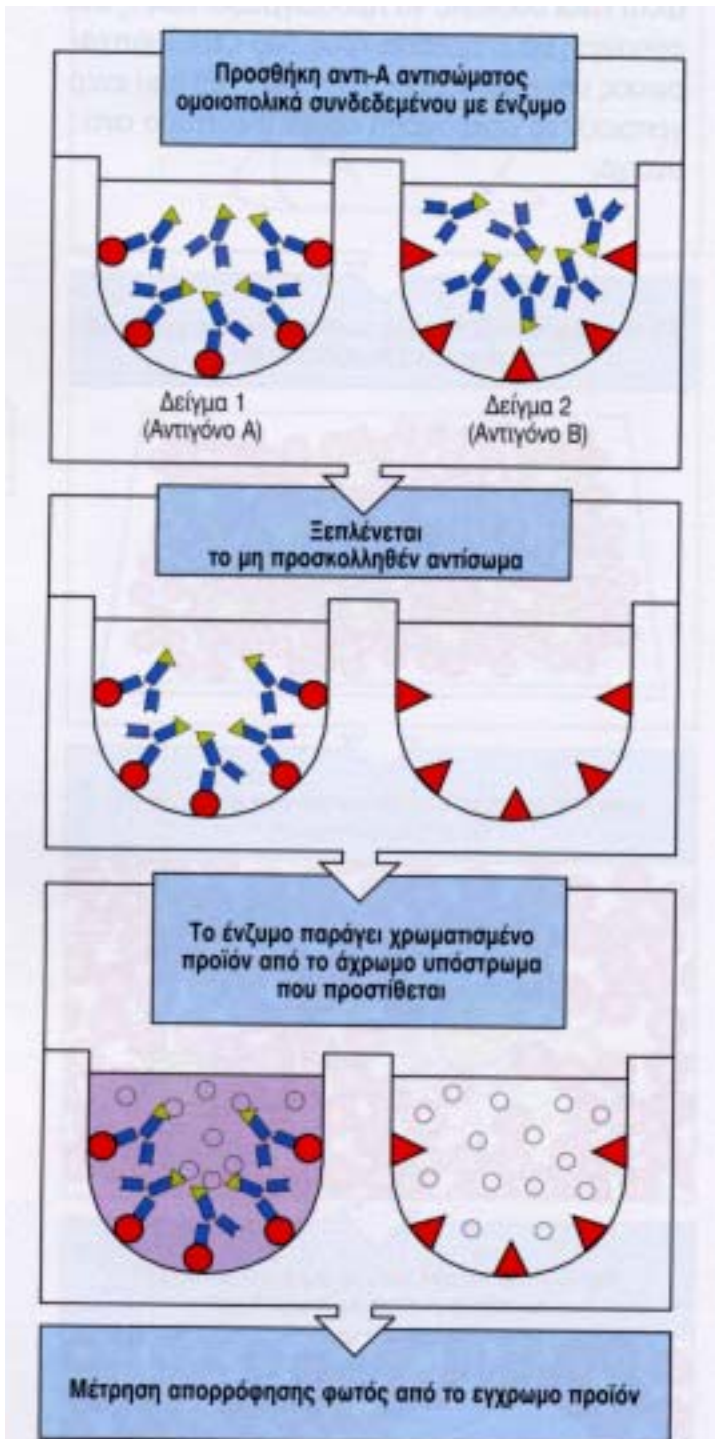
Αραιώνουμε 400 μl (συγκ. 10 mg/ml OPD) σε 10 ml διαλύματος υποστρώματος

Προ της χρήσεως, προσθέτουμε 4 μl υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) 30%

Διάλυμα stop

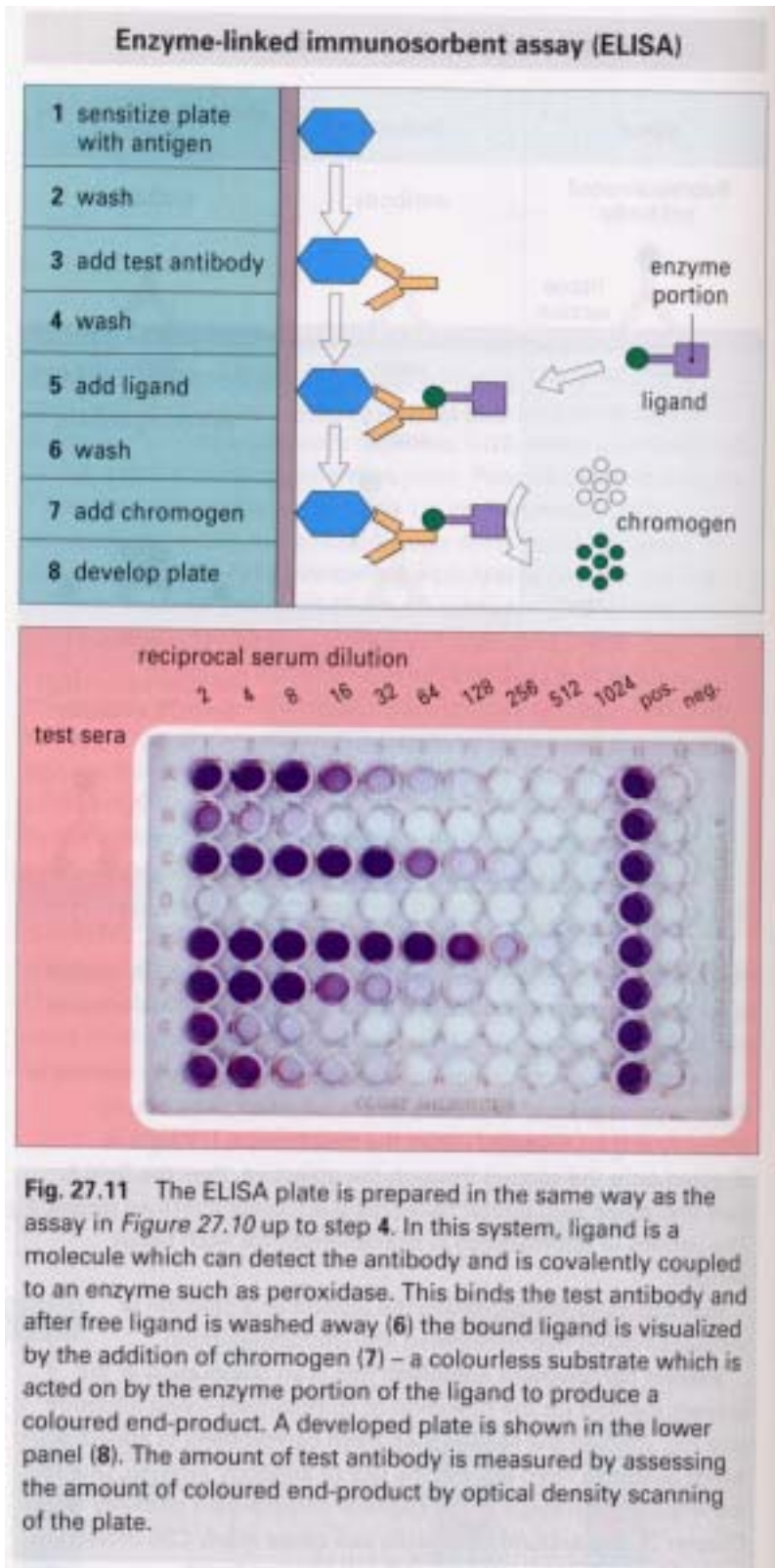
4 M θειϊκό οξύ (22 ml H_2SO_4 σε 100 ml dH_2O)

Ανοσοπροσοφητική ανάλυση στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου (ELISA)



Εικόνα 2.9. Η αρχή της ανοσοενζυμικής προσροφήσεως στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA).

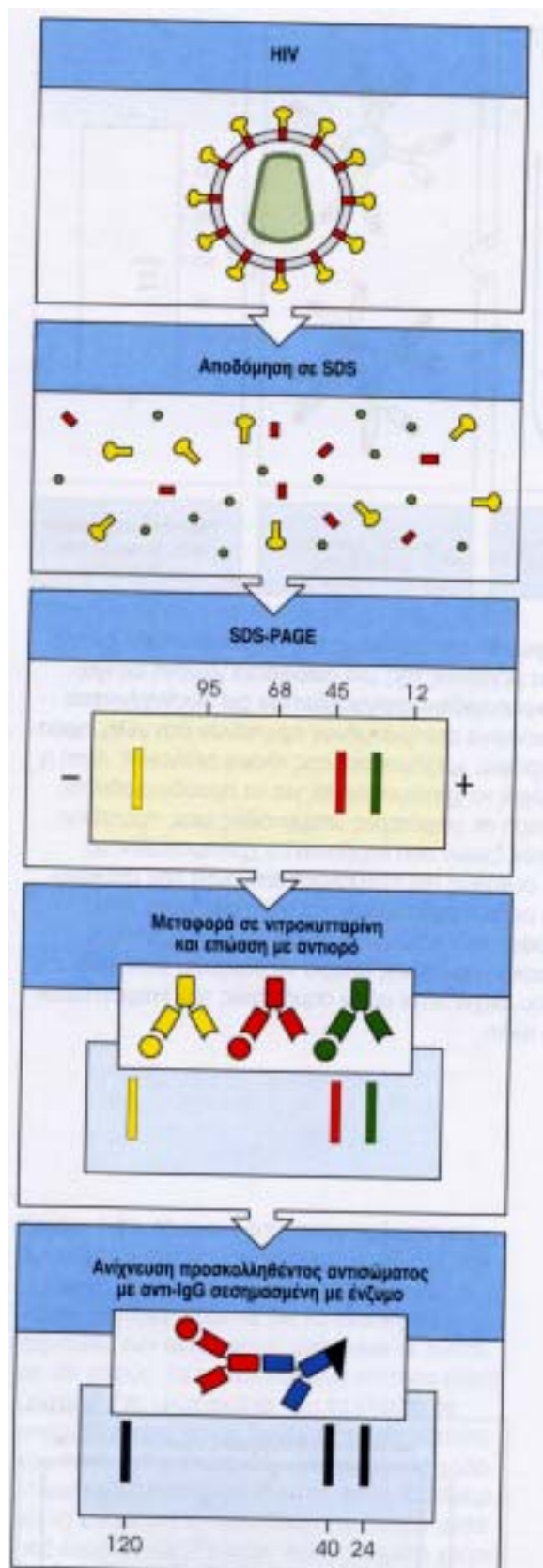
ELISA: ανοσοπροσροφητική ανάλυση στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου



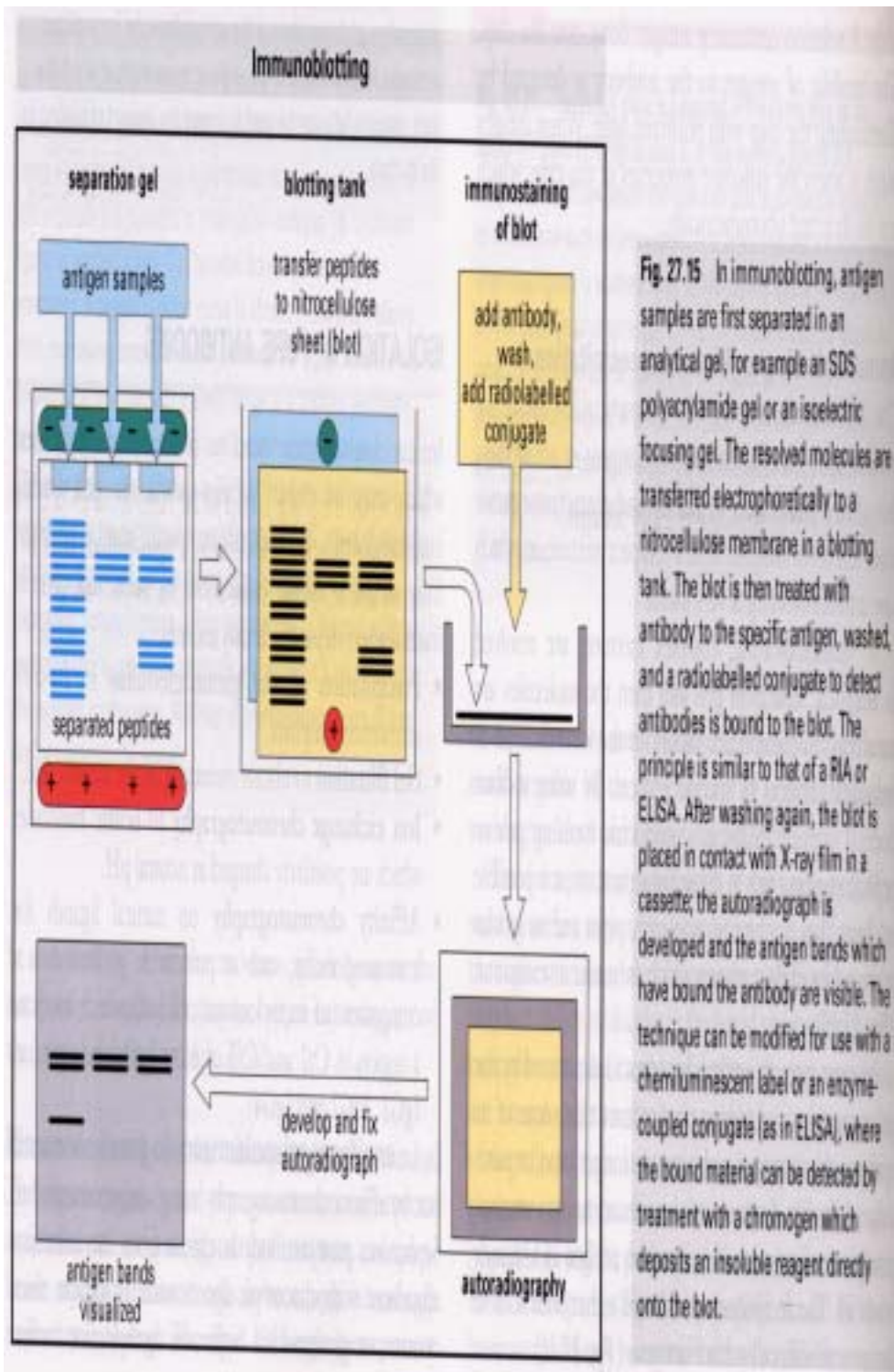
Ανοσοστύπωμα (Στύπωμα Western)

Διαλυτοποίηση των κυτταρικών πρωτεϊνών με απορρυπαντικό, ηλεκτροφόρηση του κυτταρολύματος σε SDS-PAGE, μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε σταθερό υποστήριγμα, π.χ. χαρτί νιτροκυτταρίνης εντοπισμός των πρωτεϊνών από τα αντισώματα και αποκάλυψη της θέσης των πρωτεϊνών από την αντι-ανοσοσφαιρίνη που έχει σημανθεί με ραδιοϊσότοπα ή με ένζυμο (αντίδραση του ενζύμου με άχρωμο, χρωμογόνο υπόστρωμα → αλλοίωση του υποστρώματος σε ορατή χρωστική και απόδοση χρώματος)

Αποδιάταξη του αντιγόνου → αντισώματα που αναγνωρίζουν το αντιγόνο όταν αυτό έχει αποδιαταχθεί



Ανοσοτύπωμα (Western)



Σημειώσεις

Τα περισσότερα αντιγόνα ή αντισώματα προσδένονται λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στο πλαστικό, δηλαδή γίνεται παθητική προσκόλληση του αντιγόνου. Το πλαστικό χρησιμοποιείται ως στερεά φάση. Συνήθως χρησιμοποιείται χλωριούχο πολυβυνίλιο ή πολυστυρένιο. Το χλωριούχο πολυβυνίλιο προσροφά μεγαλύτερες ποσότητες πρωτεΐνης από ότι το πολυστυρένιο. Γενικά, για την προσκόλληση χρησιμοποιείται μια συγκέντρωση πρωτεϊνών που κυμαίνεται από 1 έως 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Η προσκόλληση εξαρτάται από τη συγκέντρωση του αντιγόνου, από τον τύπο του αντιγόνου, από τα επιφανειακά χαρακτηριστικά του πλαστικού, από το χρόνο και τη θερμοκρασία.

Τα πιο συνηθισμένα ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην ELISA είναι η αλκαλική φωσφατάση και η υπεροξειδάση. Σε αντίθεση με την τεχνική του ανοσοστυπώματος, η τεχνική της ELISA χρησιμοποιεί υποστρώματα που παράγουν διαλυτά προϊόντα. Το υπόστρωμα πρέπει να παράγει ένα διαλυτό προϊόν αντίδρασης, ένα χρωματισμένο τελικό προϊόν. Ένα από τα πιο κοινά υποστρώματα της υπεροξειδάσης είναι η διαμίνη το φαινυλενίου (ο-orthophenyldiamine, OPD). Η υπεροξειδάση διασπά/ανάγει το υπεροξειδίο του υδρογόνου, και οξειδώνει το δεύτερο υπόστρωμα (τη διαμίνη του φαινυλενίου) το οποίο παράγει ένα χρωματισμένο (πορτοκαλο-κίτρινο) αντιδρώντα προϊόν. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου είναι απαραίτητο μαζί με το δεύτερο υπόστρωμα.

Ο συνδυασμός της συγκέντρωσης του αντιγόνου και της αραίωσης του σημασμένου αντισώματος θα πρέπει να δίνει ως βέλτιστες μονάδες απορρόφησης τις παρακάτω τιμές: τιμή PBS ή H_2O < 0.05, τιμή του αρνητικού μάρτυρα < 0.2, και τιμή του υψηλού θετικού μάρτυρα > 1.0. Όταν καθορισθούν οι βέλτιστες συγκεντρώσεις, τότε μπορούν να εξετασθούν παράλληλα πολλά δείγματα.