

## 6. Immunkémiai eljárások a fehérjék azonosításában – Specifikus fehérjekimutatások oldatban és szilárd fázisú rendszerekben

BERKI TÍMEA

Hogyan tudunk egy bonyolult, összetett, akár több ezer komponenst tartalmazó biológiai mintából egy nagyon kis koncentrációjú anyagot meghatározni (pl. vérmintából pajzsmirigyhormont vagy egy sejt lízátumból egy fehérjét stb.)?

Erre kétféle megközelítés áll rendelkezésre:

- Valamilyen nagy hatékonyságú elválasztástechnikai módszerrel (pl. HPLC, GC, MS) a mintát komponenseire bontjuk, és a meghatározandó komponenst mérjük.
- Szelektíven kiválasztjuk az adott komponenst a mintából, majd mérjük (pl. immunoassay).

Az immunanalitikai módszerekkel egy speciális reakciót, az élő szervezetekben is lejátszódó, rendkívül szelektív antigén-antitest reakciót használnak ki arra, hogy a mintából a meghatározandó anyagot kiválasszák, majd valamilyen analitikai módszerrel (pl. spektrofotometriásan, fluoreszcenciáméréssel, radioaktív izotópos méréssel) detektálják.

*Immunkémiai eljárások* tágabb értelemben azok a laboratóriumi fehérjeazonosítási módszerek, amelyekben két ligandum, az antigén (haptén) és az antitest specifikus kapcsolódása révén határozzuk meg az analit (antigén vagy antitest) mennyiségét. Ebben az esetben a vizsgálandó molekula annak ellenére, hogy immunológiai módszerrel határozzuk meg, nem feltétlenül az immunválasz valamely eleme, hanem lehet akár a vas- vagy a csontanyagcsere markere, akár tumormarker, akár egy sejt alkotórésze is. Szűkebb értelemben *immunszerológiai módszerekkel* az immunválasz normális és kóros komponenseit (antitestek osztályai, akut fázis fehérjék, komplementkomponensek, autoantitestek stb.) tudjuk tanulmányozni.

Ezeknek az *immunoassay*-nek nevezett eljárásoknak a nagyfokú fajlagossága az antitestek nagy epitópspecifitásán és affinitásán alapul. Felhasználásukkal mérhető akár antigén, akár antitest mennyisége egy mintából. Az immunológiai elven működő laboratóriumi mérési technikákat forradalmasította az ellenanyagok előállítási módszerének fejlődése: az egyre tisztább poliklonális ellenanyagok mellett a monoklonális ellenanyagok előállításának és alkalmazásának elterjedése.

Az immunológiai mérőmódszerek érzékenységét nem csak az alkalmazott antitest típusa (poliklonális vagy monoklonális antitest) szabja meg, hanem az a mérőrendszer is, amelyben az antigén-antitest reakciót detektáljuk. Így az immunológiai elven alapuló tesztek érzékenységének széles skálája 0,1 pikogrammtól mg-ig terjedő analit jelenlétének kimutatását teszi lehetővé (6-1. táblázat). Az analit koncentrációjának meghatározását ismert kalibráló mintasorral kapott illesztőgörbéről való leolvasással végezzük.

6-1. táblázat. Az immunoassay-k érzékenysége

Eljárás	Kimutatható legkisebb ellenanyag-koncentráció
immunfluoreszcencia	1–100 ng
enzim-immunoassay (ELISA)	0,2–100 pg
lumineszcencia	0,1–100 pg
radioimmunoassay (RIA, Farr)	0,1–100 pg
immunoblott	0,2–100 pg

Az egyes testfolyadékok (plazma, szérum, liquor, vizelet) fehérjetartalmának mennyiségi és minőségi meghatározása fontos eszköz bizonyos betegségek diagnózisához, a terápia hatékonyságának nyomon követéséhez vagy a betegség aktivitásának megítéléséhez. A szérum-, liquor- és vizeletfehérjék analízisének alkalmazott kvantitatív és kvalitatív módszerek igen jelentős fejlődésen mentek keresztül az utóbbi néhány évben, különösen a gyakorlati alkalmazás és az érzékenység tekintetében. Ez az alkalmazott ellenanyagok minősége mellett a jelölő- és mérőrendszerek, műszerek egyre tökéletesedő voltának köszönhető.

Az immunkémia tárgykörébe tartozó *vizsgálatok profilja* széles körű, mivel plazmaproteinek (akut fázis fehérjék, immunglobulinok, cisztatin C), hematológiai paraméterek (transzferrin, szolubilis transzferrin receptor, ferritin, B<sub>12</sub>-vitamin, folsav), cardialis markerek (mioglobín, troponin T), sepsismarkerek (prokalcitonin, citokinek), valamint a szénhidrát-deficiens transzferrin meghatározása egyaránt ide tartozik. Ugyancsak ezzel a módszerrel detektáljuk azokat a molekulákat is, amelyeket a szervezet termel, de normális esetben nem fordulnak elő a plazmában (pl. tumorantigének), vagy azon molekulákat, amelyek normális esetben nincsenek a szérumban (pl. drogok, gyógyszerek).

A rutin diagnosztika mellett a *kutatólaboratóriumok* módszertanához is hozzátartozik az immunoassay típusú vizsgálatok széles köre, amely igen érzékeny, specifikus és ezért sokféle fehérjét tartalmazó, kis mennyiségű mintából tud egyetlen molekula jelenlétére információt adni. Így a sejtalkotórészek, sejtfelszíni antigének, sejtek által termelt citokinek, ellenanyagok mennyiségi meghatározását fehérjeszinten immunanalitikai módszerekkel végzik.

A vizsgálatokat a közös módszertan foglalja egy-egybe.

## Immunológiai alapok

### IMMUNOLÓGIAI FOGALMAK

Az *ellenanyagok* vagy *antitestek* a specifikus humorális immunválasz antigén által kiváltott aktivációjának eredményeként termelődnek az antigénfelismerő B-sejtekből differenciálódó plazmasejtekből. A specifikus immunválaszban az antigén ismétlődő meg-

jelenésekor (immunizálás) egyre nagyobb affinitású és nagyobb mennyiségű antitest termelődik. Ezek az antitestek a testfolyadékokban, így a szérumban is mérhetők, abból különböző tisztítási eljárással nyerhetők.

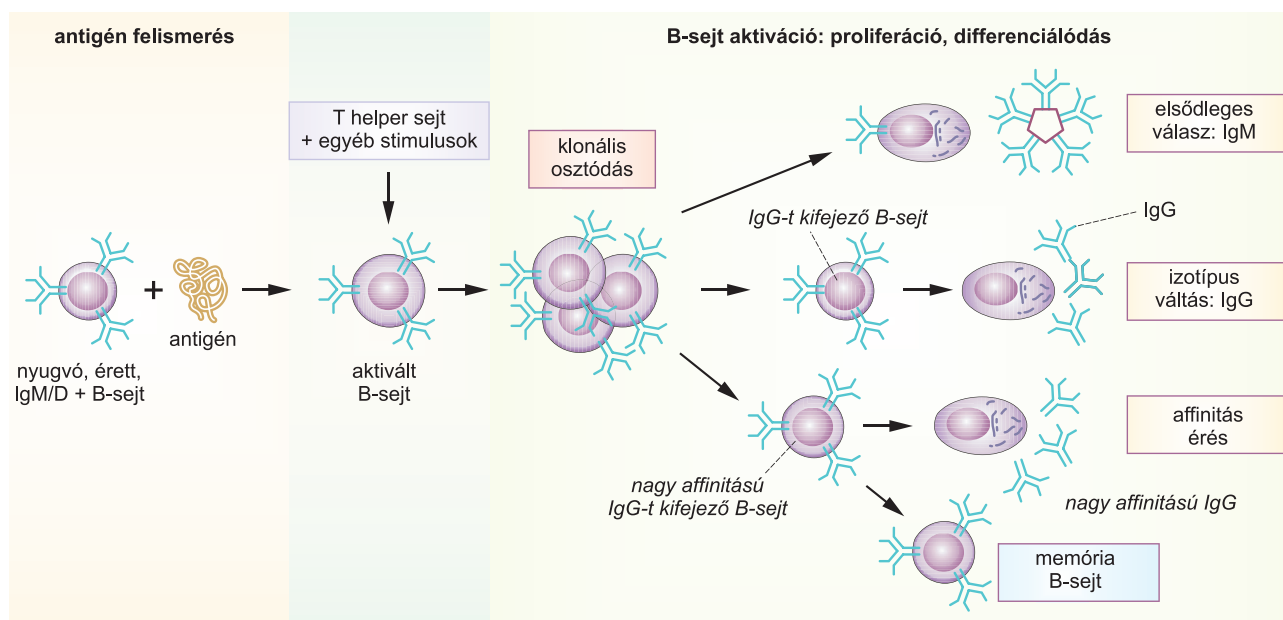
A *specifikus immunválasznak* 3 fő szakaszát különböztetjük meg:

1. A lymphocyták antigénfelismerése.
2. Az antigénspecifikus T- és B-sejtek differenciálódása és klonális osztódása.
3. Effektor és memóriasejtek és molekulák képződése, antigéneltakarítás.

Az emlősszervezetben a B-lymphocyták antigén-receptoruk (BcR) révén bármely kémiai természetű, idegen molekulát (natív antigént) képesek felismerni és megkötni. A felismert antigén kémiai természetétől, bejutása helyétől, mennyiségétől, valamint a gazdaszervezet állapotától függően vagy támadó jellegű immunválaszt, vagy toleranciát vált ki. A fehérje természetű antigének nagyrészt ún. T-sejt-függő (T-dependens) immunválaszt váltanak ki, ami azt jelenti, hogy az antigénmolekula egyes szakaszait nem csak B-sejtek, hanem T helper (Th-) sejtek is felismerik. Ehhez a folyamathoz a fehérjemolekulák antigénbemutató (APC) sejtek általi felvétele, feldolgozása és MHC-II-vel való bemutatása is szükséges a Th-sejtek számára. Az antigénspecifikus Th-sejtek és B-lymphocyták együttes aktivációja és kölcsönhatása eredményezi a B-lymphocytákban zajló izotípusváltást és affinitásérést (6-1. ábra), amelynek eredményeként nagy affinitású IgG, IgA vagy IgE izotípusú ellenanyagok termelődnek. In vitro laboratóriumi mérőmódszerekhez a leginkább ideális, ha IgG izotípusú ellenanyag keletkezik az immunválasz során.

### Antigén, epitóp

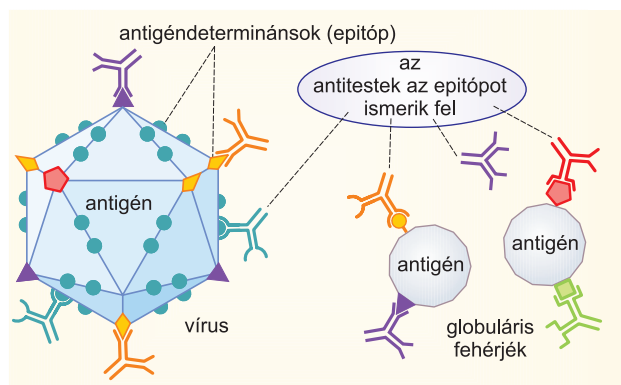
Az antigén fogalom DETRE LÁSZLÓ magyar mikrobiológus nevéhez fűződik, aki „*antitestgenerátornak*” nevezte azokat a molekulákat, amelyek immunválaszt váltanak ki. DETRE a Pasteur Intézetben a typhus elleni immunitást tanulmányozva dolgozta ki a specifikus ellenanyagok keletkezésének antigénteóriáját, az igazságügyi orvostanban elsőként alkalmazott immunbiológiai (szerológiai) eljárást, leírta az immunszuppresszióknak nevezett jelenséget, valamint a szérumdiagnosztikában nagy jelentőségű zónajelenséget.



6-1. ábra. A humorális B-sejtes immunválasz lépései

Mai, korszerűbb megfogalmazás szerint antigén az a molekula, amelyet az adaptív immunrendszer specifikusan felismer, és ellene vagy támadó jellegű immunválasz, vagy tolerancia kialakulását eredményezi. Szorosabb értelemben azok az anyagok, amelyek immunválaszt váltanak ki, az *immunogének*, míg az *antigének* olyan anyagok, amelyek specifikus antitestekhez kötődnek. Az immunogén választ kiváltó antigént *komplett* vagy *teljes antigénnek* nevezzük. Az antigénmolekula azon kisebb szakaszát, amely közvetlen kapcsolatot létesít a T- vagy B-lymphocyták antigénreceptorával, *epitóp*nak vagy *antigéndeterminánsnak* nevezzük (6-2. ábra).

Minél nagyobb és minél változatosabb egy molekula, annál több fajta epitóp helyezkedik el rajta, így annál több B-lymphocytá aktivációját eredményezi



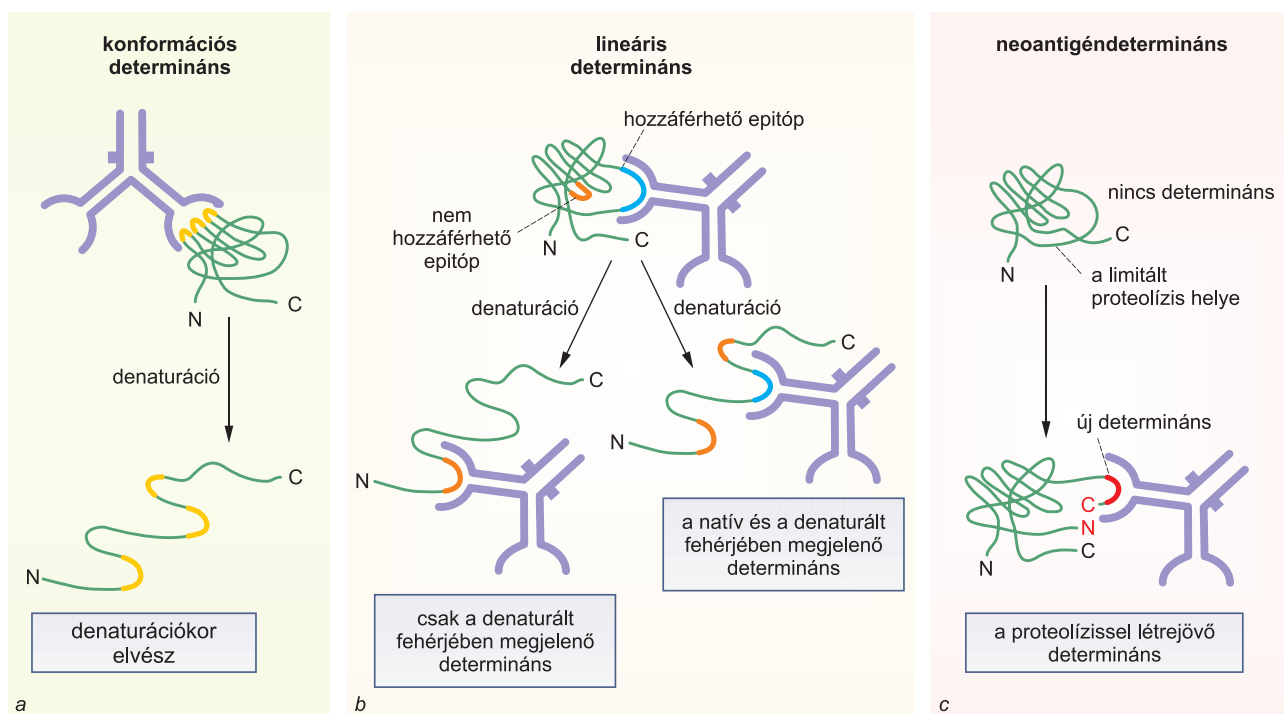
6-2. ábra. Az antitest felismeri a komplex antigén epitópjait (antigéndeterminánsait)

és annál több fajta (poliklonális) antitest termelődik ellene. Megkülönböztetünk *lineáris epitópokat*, amelyek a fehérje harmadlagos szerkezetének felbontása után is változatlanok maradnak és az ellenük termelődött antitestet továbbra is kötik. A *konformációs epitópok* – a fehérjék harmadlagos szerkezetéből adódóan – egymástól távoli aminosavak által alkotott felszínen jönnek létre, amelyet a fehérje denaturálása tönkretesz, vagyis az antitest kötődése nem jön létre. A *neo-antigének* a fehérjék harmadlagos szerkezetének felbontása után felszínre kerülő epitópok, amelyek ellen a natív formában nem generál antitestet az immunrendszer (6-3. ábra).

A B-lymphocyták felismernek olyan kis molekulákat is (szteroidhormon, antibiotikum, szervetlen vagy szerves kis molekulák stb.), amelyek önmagukban nem váltanak ki immunválaszt, csak ha hordozó fehérjéhez kapcsolódva jelennek meg. Ezeket *in-komplett antigénnek* vagy *hapténnek* nevezzük.

### Antitest szerkezet, izotípus, funkció

Az immunglobulinok a plazmasejtek által termelt *glikoproteinek*, szerkezetüket tekintve globulinok (a fehérjeelektroforézis  $\gamma$ -régiójában találhatók). Az N-, ritkábban az O-terminális (IgA<sub>1</sub> és IgD) aminosavmaradványokhoz kapcsolódó cukor oldalláncok (glikoziláció) főként a molekula in vivo effektor funkciói (FcR-kötés, komplementaktiválás) szempontjából nélkülözhetetlenek.



6-3. ábra. Az epitópok (antigendeterminánsok) fajtái

a) Konformációs determináns

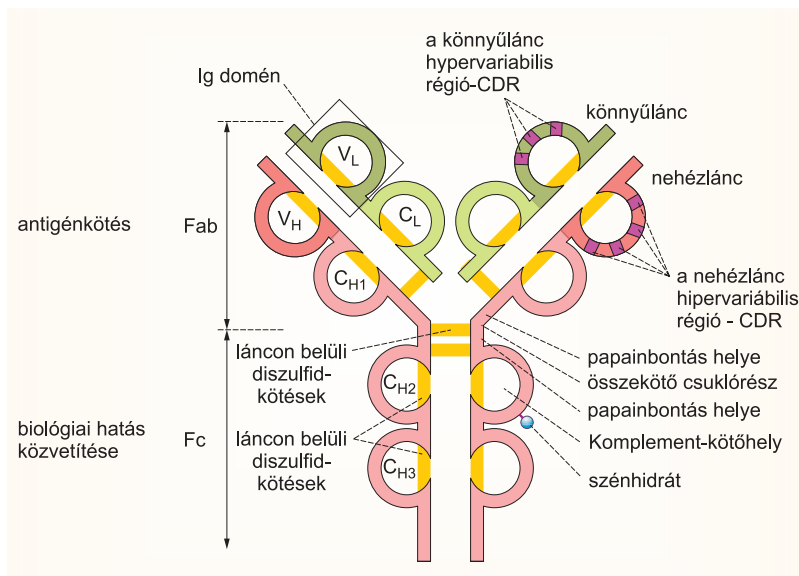
b) Lineáris determináns

c) Neoantigendetermináns (proteolízissel képződik)

**Szerkezet.** Az Y alakú, monomer immunglobulint 4 polipeptidlánc alkotja, 2 identikus nehéz- és 2 egyező könnyűlánc, amelyeket diszulfidhidak kapcsolnak össze. A globuláris szerkezetű polipeptidláncok alap-elemeit, a 110 aminosav hosszúságú *doméneket* szintén diszulfidhidak kötik össze (6-4. ábra). A könnyű-

láncok 2-2 doménből épülnek fel, egy variábilis (V) és egy konstans (C) doménből. A nehézláncokat egy V és 3-4 C domén alkotja. A könnyű- és nehézláncok V doménjei együtt hozzák létre a molekula N-terminális végén az antigénkötő helyet, vagyis a molekula specifikitását. Mind a nehéz-, mind a könnyűlánc variábilis

doménjének aminosavszekvenciájában 3-3 hipervariábilis szakasz alkotja az antigénkötő „komplementaritást determináló régiót” (CDR) (lásd 6-4. ábra). E molekulaszakaszok aminosav-variabilitása ellenanyagként eltér, így valósul meg az a sokféleség, amely lehetővé teszi szinte valamilyen létező molekula felismerését. A CDR régióban bekövetkező spontán mutációk okozzák a memória típusú immunválaszban tapasztalható *afinitásérés* folyamatát. Ez azt jelenti, hogy az antigénspecifikus aktiválódó és osztódó B-lymphocytákban az immunglobulin nehéz- és könnyűlánc V régióinak CDR szakaszai mutációk miatt változnak, így az ellenanyag af-



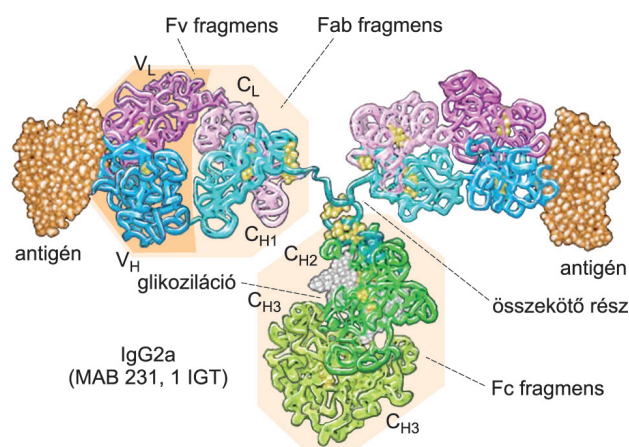
6-4. ábra. Az immunglobulin-molekula doménés szerkezete



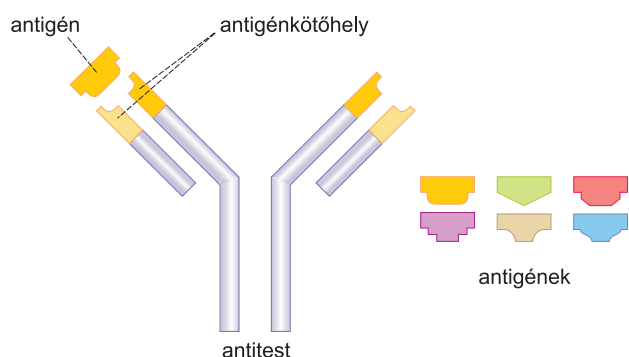
finitása is változik. A B-sejtek abban az esetben élnek túl és termelnek további immunglobulinokat, ha ez a mutáció az ellenanyag nagyobb affinitású kötőhelyét eredményezi. Ismételt immunizálás folyamán az ellenanyagok átlagos affinitása nő (affinitásérés).

Régebbi szerkezeti leírások a monomer immunglobulin-molekulát a *papain enzim*mel való hasítás során kapott két Fab- (fragment antigen binding) fragmentsre és egy Fc- (fragment crystallizable) fragmentsre bontják (6-5. ábra). Egy másik enzim, a *pepszin* a kapocsrégió alatt hasítja a molekulát, így egy F(ab)2-fragmens és egy Fc-fragmens keletkezik. A nehézlánc konstans domének az effektor funkciók létrehozásáért felelősek.

Az egy B-lymphocyta által termelt ellenanyagok a nehézlánc vonatkozásában különbözhetnek egymástól, ill. előfordul, hogy ugyanakkor több osztályba tartozó immunglobulint is termel a sejt. Mindazonáltal ezek az immunglobulinok antigénköti képességük szempontjából megegyeznek, amit a variábilis



6-5. ábra. Az immunglobulin-molekula harmadlagos szerkezete



6-6. ábra. Antigénfelismerés. Minden antitest (ellenanyag) specifikus antigént (epitópot) ismer fel, a kapcsolódás a kulcs–zár viszonyhoz hasonló

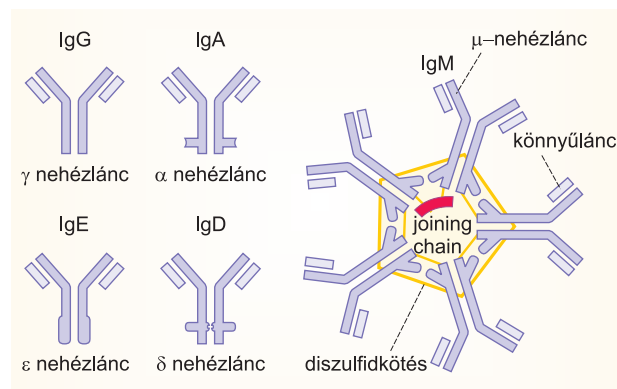
régió kódol (6-6. ábra). Ahhoz, hogy az óriási számú különböző specificitású antitest megjelenjen a szervezetben és védje azt a számtalan idegen anyaggal szemben, szervezetünk sok millió, egymástól eltérő B-lymphocytát állít elő. Amennyiben egy olyan rendszer biztosítaná ezt a sokszínűséget, amelyben minden egyes eltérő variábilis szakaszt egy önálló gén kódolna, akkor a teljes genom sem lenne elég erre a célra. Ezzel szemben, amint azt SUSUMU TONEGAWA 1976-ban kimutatta, a B-lymphocyták genomjának egyes részeiben olyan szerkezeti változások (génrekombinációs folyamatok) zajlanak le, amelyek az immunglobulinok változékonyságát biztosítják. TONEGAWA ezért a felfedezéséért orvosi Nobel-díjat kapott 1987-ben.

### Immunglobulin-izotípusok

Emlősök esetén az immunglobulinoknak a nehézlánc konstans doménjei alapján öt típusa (izotípusa) van:  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\delta$  és  $\epsilon$ . Ezek alapján az immunglobulinokat öt osztályba vagy izotípusba sorolhatjuk: IgG, IgA, IgM, IgD és IgE. Az IgG és IgA (6-7. ábra) molekulákat még tovább sorolhatjuk alosztályokba: IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, valamint IgA<sub>1</sub> és IgA<sub>2</sub>. A könnyűláncnak csak két izotípusa ismert:  $\kappa$  és  $\lambda$ , amelyek emberben hasonlóak egymáshoz, de minden egyes immunglobulinban csak egyikük fordul elő. Minden immunglobulin-izotípus más-más biológiai funkciót lát el (6-2. táblázat).

### IgM

Az IgM monomer formában az érett, de még antigénnel nem találkozott, „naív” B-lymphocyták antigénreceptora (az IgD mellett), a primer immunválaszban elsőként termelődő immunglobulin. A



6-7. ábra. Az immunglobulin-osztályok szerkezete; nehézlánc típusok

## 6-2. táblázat. Az immunglobulin-alosztályok szerkezeti és funkcionális eltérései\*

Jellemző	Osztály–Alosztály							
	IgM	IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>2</sub>	IgG <sub>3</sub>	IgG <sub>4</sub>	IgA <sub>1-2</sub>	IgE	IgD
forma	pentamer	monomer	monomer	monomer	monomer	dimer	monomer	monomer
szérum-koncentráció (mg/ml)	1,5	9	3	1	0,5	3,5	0,00005	0,03
komplement-aktiváció	+++	+++	+	+++	–	–	–	–
placenta-transzfer	–	+	+	+	+	–	–	–
Fc-receptor-kötés	–	+	–	+	–	–	–	–
megjelenés szekrétiókban	mucus stb.	tej	tej	tej	tej	mucus stb.	–	–

\*A – hiányt, a + valamely tulajdonság vagy aktivitás meglétét, többszörözéssel annak mértékét jelöli.

plazmasejtek által termelt, szekretált forma pentamer szerkezetű, ahol az 5 monomer IgM-et egy J (joining) lánc kapcsolja össze. A polimerszerkezet miatt a molekula igen nagy méretű, molekulatömege közel 900 kDa, ezért kapta az „M” (makro) jelölést. Főleg a vérérszékumban fordul elő, mert nehezen jut át az érfalon a szövetközi térbe. Ugyanakkor a poli-FcReceptor (pFcR) segítségével transzportálódik a nyálkahártyák felszínére. Miután a pentamer molekulát 10 antigén-kötő helye több antigén keresztkötésére teszi alkalmassá, jó precipitáló és agglutináló antitest. Polimer szerkezete miatt nagy aviditással köti az antigéneket, és ugyancsak hatékony a komplementrendszer aktiválásában is.

## IgD

Az IgM mellett a naiv B-lymphocyták antigénreceptora. Szekretált formában, nyomokban fordul elő, funkciója nem ismert.

## IgG

A memória B-sejtek antigénreceptora, a másodlagos immunválaszban termelődő, legnagyobb mennyiségű immunglobulin-osztály. Mind a szérumban, mind a szövetközi térben megtalálható. Az anyai IgG transzportfolyamatok révén a placentán átjut a magzatba, az újszülött immunvédekezését biztosítja, amíg

kb. 6 hónap alatt a saját immunrendszere át nem veszi ezt a feladatot. Az IgG számos patogén ellen termelődik, így vírusokat, baktériumokat, gombákat, azok toxinjait neutralizálja, a komplementrendszer aktiválásával (klasszikus út) azokat elpusztítja, vagy a kórokozók opszonizációjával azok fagocitózisát is elősegíti. Az egyes IgG alosztályok effektor funkciói eltérőek (lásd 6-2. táblázat).

## IgA

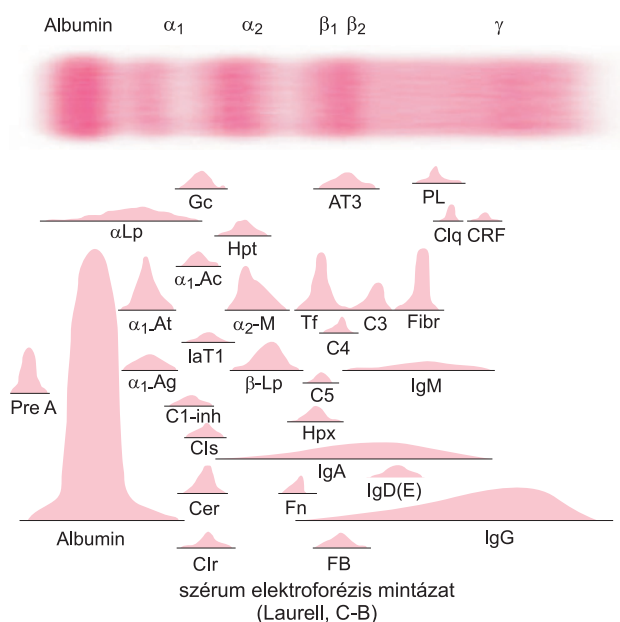
Elsősorban a nyálkahártyák védelmét szolgáló immunglobulin. Monomer formában a vérben és a szövetnedvekben fordul elő, a dimer formát egy J-lánc kapcsolja össze, nyálkahártyafelszínre való transzportját a pFcR biztosítja. A dimer IgA-val együtt lehasad a receptor extracelluláris része is, és mint szekretoros komponens védi a molekulát a proteolitikus enzimektől. Az IgA számos patogén ellen termelődik, így vírusokat, baktériumokat, gombákat, azok toxinjait neutralizálja, az alternatív komplementaktivációs út elindítója, ugyanakkor viszont a kórokozók opszonizációját és fagocitózisát csak kismértékben segíti elő.

## IgE

Monomer immunglobulin-molekula, amely a többi immunglobulintól eltérően 4 nehézlánc konstans doménből épül fel, amely jelentős mértékben gliko-

zilálódik, molekulatömege 190 kDa. Az IgE molekula termelődését követően nagy affinitással kötődik a basophil granulocyták, a hízósejtek és az eosinophil granulocyták Fcε-receptorához, vérbeli koncentrációja rendkívül alacsony. Az IgE-nek alapvető szerepe van az azonnali túlérzékenységi reakcióban és a paraziták (férgek) elleni immunitás kialakításában. Nem aktiválja a komplementrendszer, hőre érzékeny.

Az immunglobulinok koncentrációjának megközelítő mennyiségi meghatározását fehérjeelektroforézissel végzik (6-8. ábra). Ezzel a módszerrel a vérplazmafehérjéket albuminra, α<sub>1</sub>-, α<sub>2</sub>-, β<sub>1</sub>-, β<sub>2</sub>- és γ-globulinra választják szét, töltésüknek és méretüknek megfelelően. Az immunglobulinok a γ régióban vannak. Myeloma és néhány más betegség esetén egy



6-8. ábra. A fő szérumfehérje-frakciók és az azokhoz tartozó fehérjék

(Rövidítések, sorrendben – Gc: D-vitamin-kötő globulin; AT<sub>3</sub>: antitrombin III; pl: plazminogén; α<sub>1</sub>Lp: α<sub>1</sub>-lipoprotein; Hpt: haptoglobin; C1q: C1 komplementfaktor q része; CRP: C-reaktív protein; α<sub>1</sub>-Ac: α<sub>1</sub>-kimotripszin; α<sub>1</sub>-At: α<sub>1</sub>-antitripszin; α<sub>2</sub>-M: α<sub>2</sub>-makroglobulin; Tf: transferrin; C<sub>3</sub>: C3 komplementfaktor; Fibr: fibrinogén; pre-A: pre-albumin; α<sub>1</sub>-Ag: α<sub>1</sub>-sav-glikoprotein; β<sub>1</sub>-Lp: β<sub>1</sub>-lipoprotein; IαTI: inter-α-tripszinhinhibitor; C<sub>4</sub>: C4 komplementfaktor; IgM: M immunglobulin; C<sub>1</sub>-inh: C1-inhibitor; C<sub>5</sub>: C5 komplementfaktor; C<sub>1</sub>s: C1 komplementfaktor s része; Hpx: hemopexin; IgA: A immunglobulin; IgD(E): D (E) immunglobulin; Cer: cöruloplazmin; Fn: fibronektin; IgG: G immunglobulin; C<sub>1</sub>r: C1 komplementfaktor r része; FB: B faktor)

adott immunglobulin rendkívül nagy koncentrációban van jelen, amely monoklonálisnak tekinthető, és elektroforézissel egy éles sávot ad.

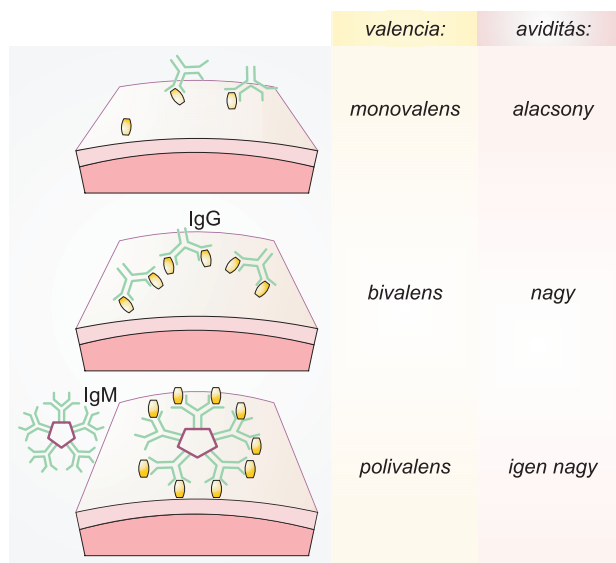
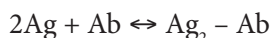
Az immunglobulin-izotípus meghatározás minőségi vizsgálata végezhető immundiffúzóval, immun-elektroforézissel vagy immunfixációval, mennyiségi mérésük nefelometriával, turbidimetriával vagy ELISA módszerrel.

### Ellenanyag-affinitás, aviditás

Az antigén-ellenanyag komplexben a két molekulát nem-kovalens kötések tartják össze. Ilyenek: Coulomb-erők, hidrogénhidak, elektrosztatikus erők, van der Waals-erők, hidrofób kapcsolatok. Az antigén-antitest kapcsolódás legegyszerűbb formája, amikor univalens ligandum (haptén) reverzibilisen kapcsolódik az immunglobulin antigénkötő helyéhez. Az egy immunglobulin-molekulához a telítettség állapotában kapcsolódó ligandumok száma fejezi ki az ellenanyag *valenciáját* (6-9. ábra).

Az antigénkötő hely és a ligandum kapcsolódása reverzibilis, a kölcsönhatás során az antigén koncentrációjától és a kötés erősségétől függő dinamikus egyensúlyi állapot alakul ki.

Az ellenanyagot Ab-vel (antibody), az antigént Ag-vel jelölve:



6-9. ábra. Az immunglobulin-valencia és -aviditás viszonya

Hagyományosan azonban a következő sémával jelölik a reakciót, vagyis a két egyforma kötőhely közül csak az egyikre vonatkozóan:

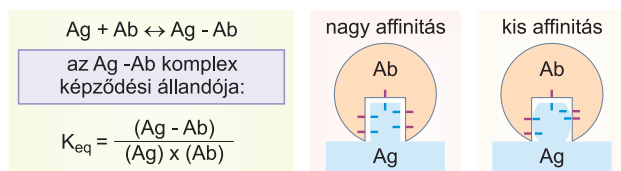


Ez annyiban jogos, hogy a két kötőhely általában egymástól függetlenül és egyforma egyensúlyi állandóval reagál. A reakció egyensúlyi állandója:

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{Ag} - \text{Ab}]}{[\text{Ag}] [\text{Ab}]}$$

Az egyensúlyi állandó széles határok között változik a különböző antigén-antitest párok esetén. Sok esetben  $K_{\text{eq}} > 10^8 \sim 10^{10}$ , ami azt jelenti, hogy a képződő komplexek nagyon stabilak, ill., hogy a reakció nagyon híg oldatban is a komplexképződés irányába történik.

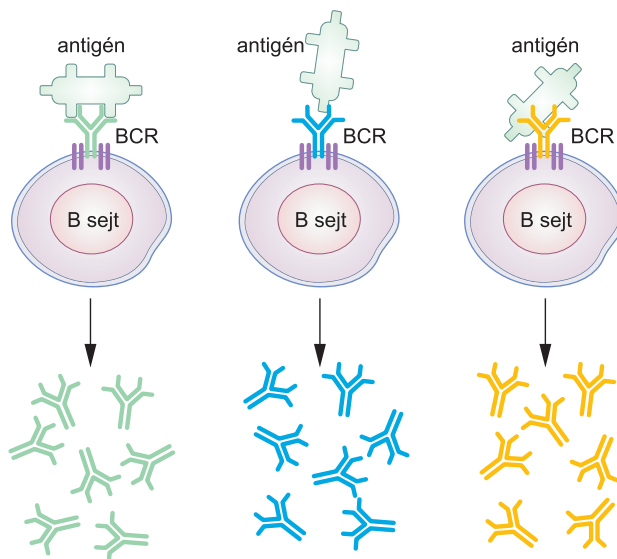
A kapcsolódás erősségének mértéke az ellenanyag *affinitása* (6-10. ábra), amelyet azzal az antigénkoncentrációval jellemezhetünk, amely a rendszerben



**6-10. ábra.** Az antigén-antitest reakció affinitása. Az antitest (Ab) affinitása kifejezi azt, hogy milyen erővel képes kötődni az antigénhez (Ag). Ezt az antigén-antitest komplex (Ag-Ab) képződésének egyensúlyi állandójával ( $K_{\text{eq}}$ ) írhatjuk le

$K_{\text{eq}} = 10^4$	$10^6$	$10^{10}$
affinitás	aviditás	aviditás
 antitest többlet      antigén többlet equivalencia-hálózati kialakítás		

**6-11. ábra.** Az antigén-antitest reakció aviditása. Az aviditás a több kötőhellyel rendelkező antigének és több kötőhellyel rendelkező antitestek között kialakuló kötések együttes erősségére utal (az affinitás egyetlen antitest és antigén között kialakult kötése erőssége)



**6-12. ábra.** A komplex antigén poliklonális immunválaszt vált ki, ami eltérő specificitású ellenanyagok termelődéséhez vezet

lévő antigénkötő helyek felének telítéséhez szükséges. Az antigénnek ez a mol-ban kifejezett koncentrációja a disszociációs konstans ( $K_d$ ). A kisebb  $K_d$ -érték nagyobb affinitást jelent, ami ellenanyagok esetében  $10^{-7}$ - $10^{-11}$  mol/l között változhat. Egy adott polivalens antigénnel reagáló immunsavó (poliklonális antitestek) számos egyedi affinitású antitestet tartalmaz, amelyek összessége az *aviditás* (6-11. ábra).

Poliklonális ellenanyagválasznál gyakran tapasztalható, hogy az ellenanyag-termelést indukáló antigénnel szerkezeti hasonlóságot mutató más molekulák, amelyek azonos epitópokat hordoznak, kisebb-nagyobb mértékben reagálhatnak a termelődött ellenanyaggal. Ilyenkor *keresztreakcióról* beszélünk. Mivel az antigének általában polivalensek, vagyis több különböző epitópot tartalmaznak, számos, különböző affinitású ellenanyag termelődését váltják ki (6-12. ábra).

## ANTITEST-ELŐÁLLÍTÁSI MÓDSZEREK

### Immunizálás

Immunanalitikai célra leginkább IgG osztályú ellenanyag előállítása a cél. Ehhez a megfelelő antigén kiválasztásán kívül a bejutás helye, módja és a kísérleti állat megfelelő kiválasztása is nélkülözhetetlen. Immunogenitás szempontjából az antigéneket osztályozhatjuk kémiai természetük (fehérje > polipeptid > polisacharid > lipid > nukleinsav), méretük, bio-



lógiai tulajdonságaik szerint. Megfelelő nagyméretű antigének (pl. vírusok, baktériumok, sejtek, fehérjék, polipeptidek, poliszacharidok) önmagukban is immunogének, míg kisebb molekulák csak polimer formájában vagy hordozóhoz kapcsoltan váltanak ki immunválaszt. Fehérjehordozóként leggyakrabban KLH-t (Keyhole Limpet Hemocyanin: extrém nagy méretű, vegyes összetételű, glikozilált, réziontartalmú protein, piros kúrtcsigákból nyerik ki), borjú szérumalbumint (BSA), vagy tireoglobulint (Tg) használunk, amelyek jó immunogének és megfelelő számban tartalmaznak haptének kapcsolódására alkalmas oldalláncokat ( $-NH_2$ ,  $-SH$ , fenol, imidazol). A poliszacharidok fehérje hordozó nélkül T-sejttől független immunválaszt váltanak ki, amelyet alacsony affinitású, IgM ellenanyagok túlsúlya jellemez.

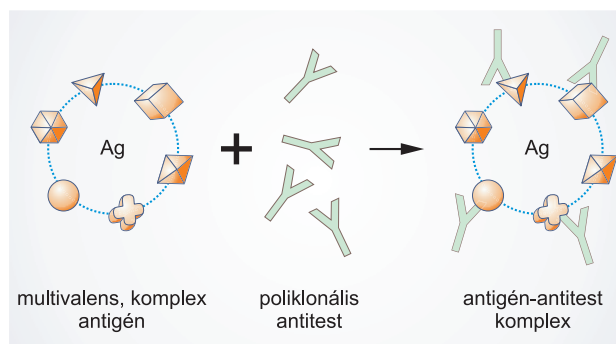
Az oltóanyagot leggyakrabban a bőrbe (intradermalis), a bőr alá (subcutan), izomba (intramuscularis), a hasüregbe (intraperitonealis), ritkábban intravenósan adjuk be a kísérleti állatnak. Az optimális immunválasz kiváltásához szükséges antigén mennyisége, a beadás módja, az ismételt oltások gyakorisága fajonként jelentősen eltér.

A létrejövő immunválasz minőségi és mennyiségi jellemzőit jelentősen befolyásolják az antigénnel beadott segédanyagok, az ún. *adjuvánsok*, amelyek a válasz specificitását nem befolyásolják. Szerepük az antigén felszívódásának, bomlásának lassítása (olajok, alumíniumgélek alkalmazásával), a nem specifikus gyulladásos reakció kialakulásának elősegítése (elölt, nem virulens kórokozók) és ezzel az antigénbeutatás hatékonyságának növelése. A leggyakrabban alkalmazott kórokozók közül egérben a *Bordetella pertussis* IgG<sub>1</sub> és IgE, a *Mycobacterium tuberculosis* IgG<sub>2a</sub>-termelését váltja ki.

### Poliklonális antitest

A hagyományos in vivo immunizálással előállított ellenanyagok poliklonális jellegűek, vagyis több B-sejt-klón termékei, ezért a szérumból izolálható ellenanyagok sok szempontból heterogének (6-13. ábra). Az olyan minőségi paraméterek, mint epitópspecificitás, affinitás, izotípusmegoszlás határozzák meg alkalmazhatóságukat és titerüket egy adott rendszerben. Az antitesttiter azt a szérumhígítást jelenti, amely az adott mérési rendszerben még pozitív eredményt ad.

A poliklonális ellenanyag ezen heterogenitása egyben az ellenanyag mint reagens előnye is, mert



6-13. ábra. A poliklonális antitest az antigén több epitópját ismeri fel

ugyanannak az antigénnek különböző determinánsait ismeri fel, így keresztkötésen, mint pl. *precipitáción, agglutináción, ill. az Fc-függő funkciókon alapuló módszerekben* (komplementaktiváció) jól alkalmazhatók. További előnyük viszonylag olcsó előállíthatóságuk, bár ha figyelembe vesszük a szükséges nagy tisztaságú antigén előállítás költségeit és a kiválasztott állatfaj költségeit, az egyes állatokból nyert szérumok ismételt minőségi vizsgálatait, hosszú távon nem biztos, hogy olcsóbb a hibridóma technikával előállított monoklonális ellenanyagok termelésénél. A poliklonális reagensek hátránya továbbá, hogy rokon szerkezetű antigénnel gyakori a keresztreakció, amit jelentős titervesztés árán, affinitás-előtisztítással lehet kiküszöbölni.

Poliklonális ellenanyag előállításakor célszerű párhuzamosan több állatot immunizálni és az antigén-specifikus ellenanyagok megjelenését egyedenként követni minden oltás után. Az ellenanyagtiter változását célszerű az oltások előtt vett ún. *preimmun* szérumhoz hasonlítani abban a tesztrendszerben, amelyben majd az ellenanyagot alkalmazni szeretnénk. A *hiperimmun savó* előállításához célszerű az oltások között 3-4 hetet várni és az újraoltásokat az első oltásnál kisebb antigénmennyiséggel végezni, az affinitásérés így növelhető. Hapténnel való immunizálásnál a teszteléshez és az immunizáláshoz célszerű a haptén molekulát más-más fehérje hordozóhoz kapcsoltan alkalmazni.

### Monoklonális ellenanyag előállítása

*Felfedezések.* A hetvenes években, a myelomák felfedezése és leírása kapcsán már sikerült megállapítani, hogy ezek a sejtek egységes típusú ellenanyagot termelnek, amelyet paraproteinnak nevezünk.

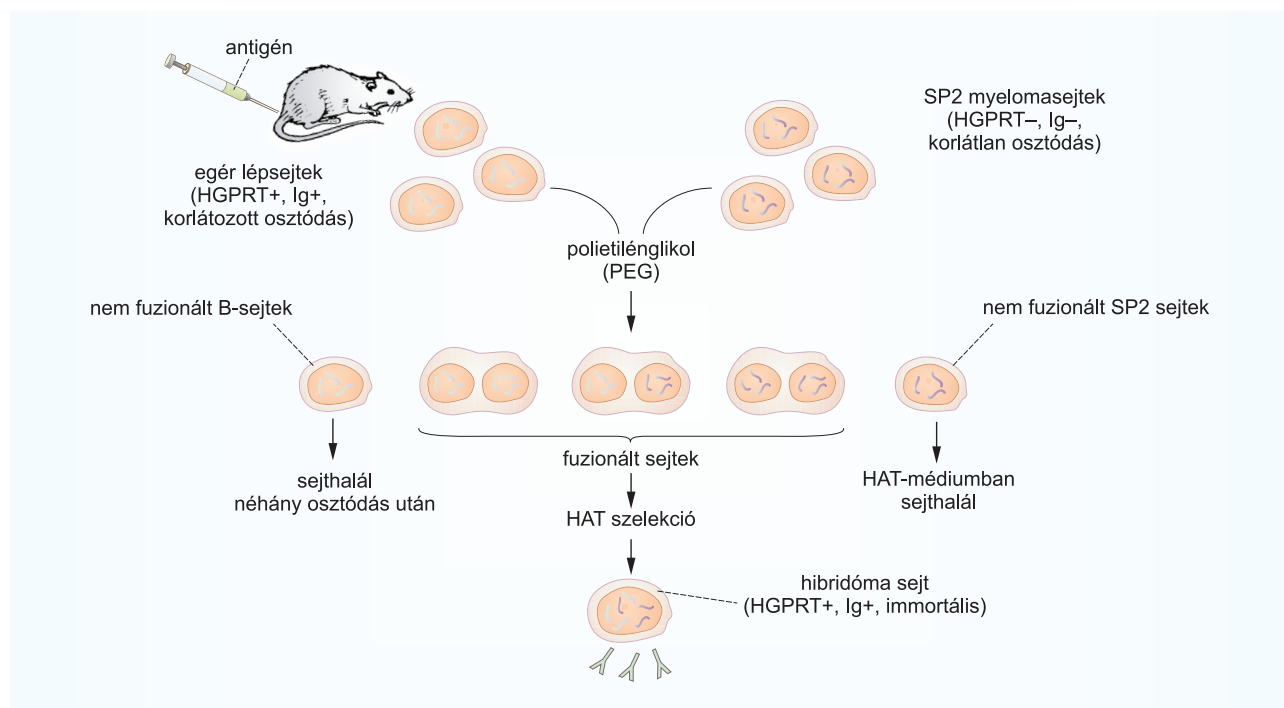


1973-ban JERROLD SCHWABER ember-egér hibrid monoklonális antitest előállítását írt le, majd 1975-ben CÉSAR MILSTEIN, GEORGES KÖHLER és NIELS JERNE tette először közzé a monoklonális antitestek létrehozásának elvét. 1984-ben orvosi Nobel-díjat kaptak érte.

Az eljárás sejtfúzió alapul, megpróbáltuk egy ellenanyagot termelő B-sejtet egy myeloma-sejtvonalal egyesíteni, ez a *hibridóma technológia* (6-14. ábra). A fúzió célja a kétféle sejt tulajdonságainak egyesítése volt. Az adott tulajdonságú antitestet termelő B-sejtet hiába izoláljuk, sejtenyészetben nem osztódik. A myelomasejtek viszont korlátlanul osztódnak (immortalitás). Egyesítésükkel tehát egy bizonyos antitestet termelő és korlátlanul, gyorsan szaporodó, stabil sejtvonalat kaphatunk. A monoklonális antitestek termelése során egy specifikus antigénnel ismételt oltanak beltenyésztett egereket (ma már patkányt és nyulat is), így a többlépcsős immunizálással a kívánt antitestet termelő B-sejtek száma nagymértékben növelhető. Ezek feldúsulási helye a lépben és a nyirokcsomókban van. A lépben izolált lymphocytákat in vitro fuzionáltatják egy folyamatos Sp-2/0-Ag14 egér myeloma-sejtvonallal. Fontos, hogy ez a sejtvonal ugyanabból a fajból származzék, mint az immunizált állat, stabil, könnyen fenntartható, gyors szaporodóképességgel rendelkeznek, továbbá önmagában

ne termeljen ellenanyagot, és rendelkezzen egy olyan enzimhiánnyal (HGPRT, hipoxantin-timidin-foszforibozil-transzferáz és TK, timidin-kináz), amelynek kihasználásával könnyen elkülöníthetők a B-sejt-myeloma hibridektől.

A sejtfúziót legegyszerűbben polietilén-glikol (PEG) segítségével lehet létrehozni, amely reverzibilisen megbontja a sejtek vízburokát, így a szorosan egymás közelébe került sejtek lipidmembránjai összeolvadhatnak. A véletlenszerű sejtfúzió után a kevert sejteket szelektálni kell, HAT médium (hipoxantin, aminopterin, timidin) segítségével, amelynek jelenlétében a myelomasejtek szaporodása leáll, csak a hibrid sejtek tudnak túlélni. A sejteket 96 lyukú steril szövettenyésztő lemezekben tenyésztjük, és kb. 7–10 nappal a fúzió után a sejtek felülúszóit teszteljük antigénspecifikus antitesttermelésre egy megfelelően gyors, sok minta vizsgálatára alkalmas módszerrel (pl. ELISA, áramlási citometria stb.). Az antitesttermelő, túlélő sejtek szétválogatását a *klónszelekció* módszerével végezzük, amikor a sejtenyészetet 96 lyukú lemezekre tesszük ki olyan hígítással, hogy elvileg minden lyukba 1 sejt kerüljön. A hibrid sejtek növekedését invert mikroszkópos vizsgálattal tudjuk ellenőrizni. Mivel ez véletlenszerű esemény, a pozitív, antitestet termelő sejtvonalakat ismételt klónszelekciónak (stabilizálás) tesszük ki mindaddig, amíg a klónozás összes sejt-



6-14. ábra. Monoklonális ellenanyag (antitest) előállítása hibridómatechnikával

vonala a kívánt antitestet termeli. A kiválasztott klón sejtjeit ezután egyre nagyobb tenyésztőedénybe helyezve felszaporítjuk, egy részüket dimetil-szulfoxid- (DMSO-) tartalmú tápfolyadékban lefagyaszttva tároljuk, másik részüket antitesttermelésre használjuk fel. A felülcszóból nyert antitestet tovább jellemezzük izotípus, affinitás, keresztreakciók, egyes módszerekben való alkalmazhatóság, tisztíthatóság szempontjából (<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/monoclonalantibodies.html>).

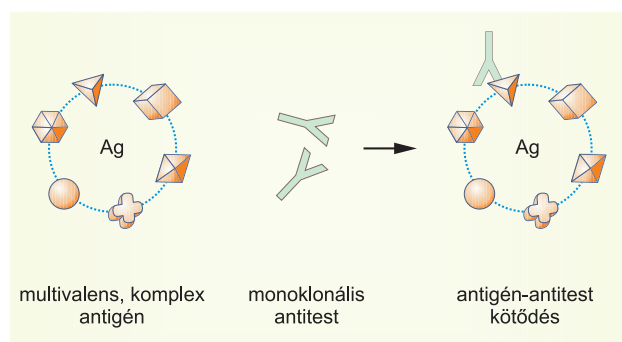
A *monoklonális ellenanyagok előnyei immunanalitikai módszerekben*. A monoklonális ellenanyagok nagyfokú specificitásuk miatt alkalmasak molekulák epitópról epitópra való analízisére. Ugyanakkor a monoklonális ellenanyag – szemben a poliklonális ellenanyagokkal – nem alkalmas az egész molekula felismerésére (6-15. ábra). Előfordulhat, hogy egy monoklonális ellenanyag többféle antigén azonos epitópjait ismeri fel: ezt keresztreaktivitásnak nevezzük. Ennek a keresztreakciónak az oka lehet közös aminosavszekvencia, szénhidrát- vagy lipidoldallánc a különböző molekulákban. Az anti-CA 19-9 antitest olyan közös szénhidrátepitópot ismer fel, amely mint



6-15. ábra. Ellenanyagok összehasonlítása

a) Monoklonális ellenanyag: azonos specificitású ellenanyag-molekulák; egyetlen B-sejtből származó sejtvonal (sejtklón) termeli ezeket; egyetlen epitóp felismerésére képesek

b) Poliklonális ellenanyag: eltérő specificitású több ellenanyag keveréke; több B-sejt-klón termékei; egy adott antigén eltérő epitópjait ismerik fel



6-16. ábra. A monoklonális antitest az antigén egyetlen epitópját ismeri fel

tumormarker különböző méretű és formájú molekulák mérésére alkalmas. Ugyanakkor a nagyfokú specificitás miatt a különböző monoklonális antitestekkel különbség tehető izoenzim, fehérjeizotípusok, molekulák konformációs eltérései között. A monoklonális ellenanyagok előnye, hogy a stabil sejtklónból gyakorlatilag korlátlan mennyiségben lehet ugyanazon minőségű, egy epitóp felismerésére alkalmas, azonos izotípusú, ritkán keresztreaktáló antitestet előállítani (6-16. ábra). Ezért a monoklonális ellenanyag technológia rendkívül hasznos és csaknem ideális reagenseket biztosít a klinikai laboratóriumnak az immunoassay tesztrendszerekben.

A monoklonális ellenanyagok immunanalitikai felhasználásának előnyei:

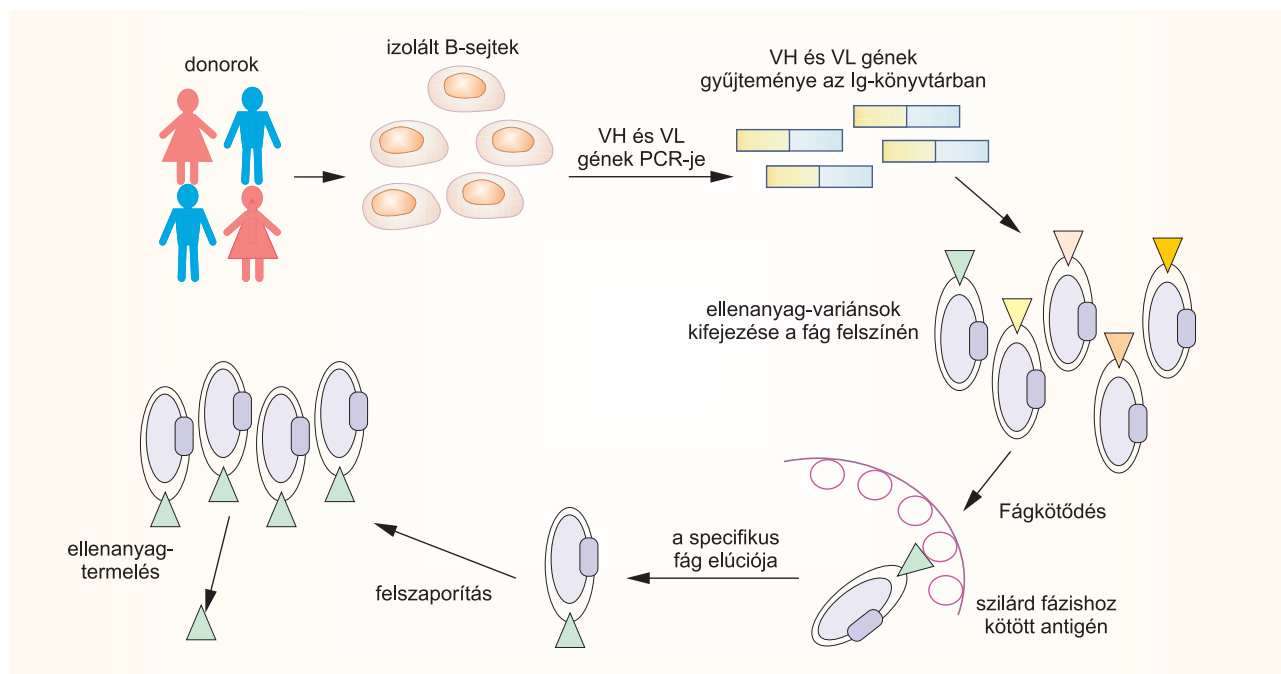
- A monoklonális ellenanyagok jól definiálható reagensek.
- Korlátlan mennyiségben előállítható, homogén, állandó affinitású és specificitású reagensek.
- Monoklonális ellenanyag előállítható nem tisztított antigénnel végzett immunizálással is.

A monoklonális ellenanyagok felhasználásának korlátai:

- Elégtelen precipitációs és agglutinációs reaktivitásuk, mert egyetlen monoklonális ellenanyag nem vagy csak mérsékelten tud nagy immun-komplex-kialakulást eredményezni.
- Nagy, heterogén epitópokkal rendelkező antigént nehezebb egyetlen epitópjára specifikus monoklonális ellenanyaggal immunkémiaiilag jellemezni.

### Antitest előállítása rekombináns technológiával

Elsőként SKERRA és PLUCKTHUN (1988) állította elő rekombináns technikával egy specifikus antitest Fv-fragmensének variábilis doménjeit *E. coli*-ban expresszáltatva. Ez a technológia tette lehetővé enzimmel fuzionáltatott kiméra antitestek előállítását. A „phage display” technológia (Winter, 1994) segítségével antitestfragmenseket állítanak elő előre meghatározott kötőspecificitással, immunizálás nélkül. Ehhez egy random antitest variábilis régió (V) gén-könyvtár (génrepertoire) kerül megalkotásra elsőként in vitro, amelyet bakteriofágban expresszáltatnak (6-17. ábra). Ebből a fágkönyvtárból az antigén segítségével ki lehet válogatni a megfelelő V-géneket expresszáló fagot, azt föl lehet szaporítani és baktériumban meg-



6-17. ábra. A fág-display technika ellenanyag előállítására

termeltetni. A kiválasztott antitest affinitása mutációkkal tovább növelhető. Ezzel a módszerrel nagy aviditású ellenanyagokat lehet előállítani laboratóriumi felhasználásra.

### Ellenanyagok tisztítása

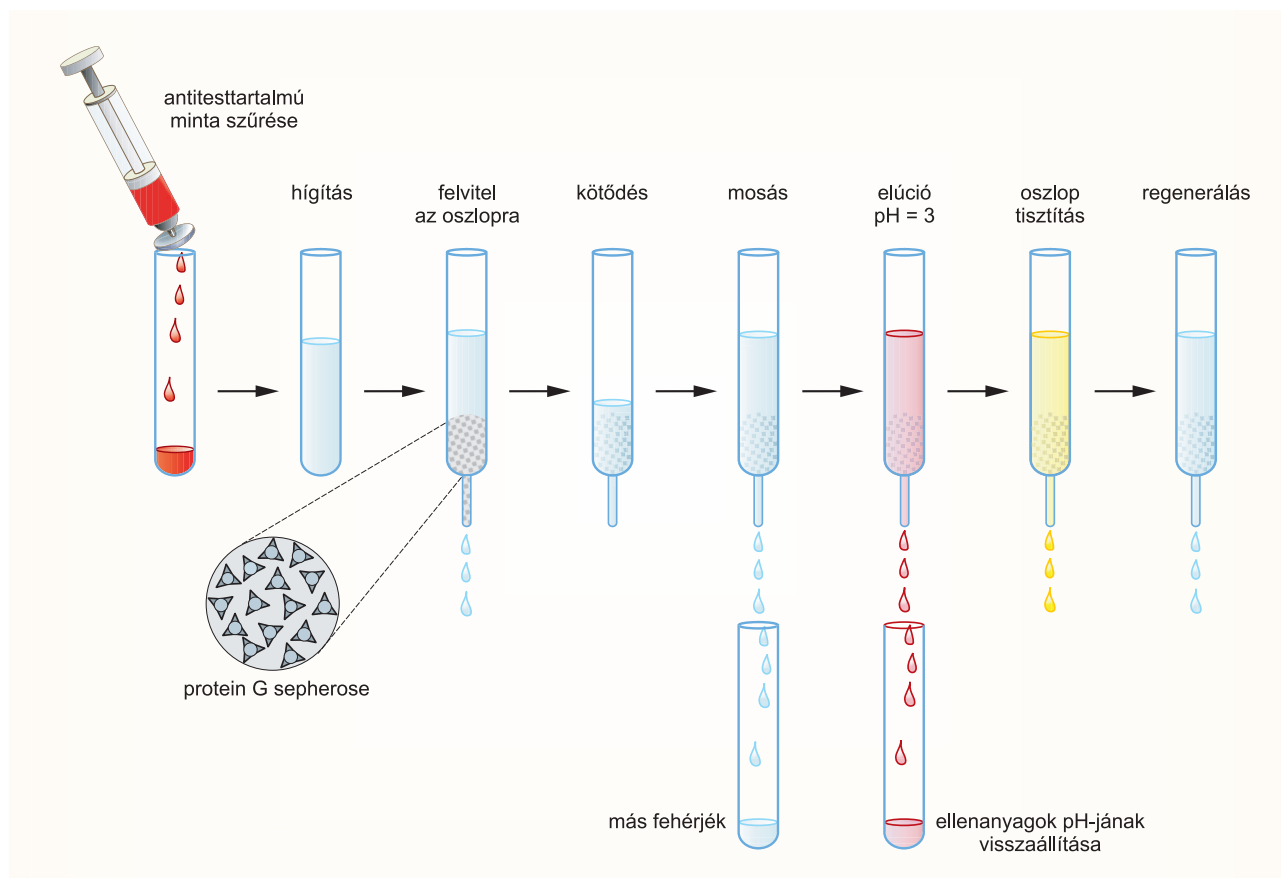
Különböző mértékben tisztított ellenanyagra számos módszer alkalmazásakor szükség van. A jó hiperimmun szérumok antigénspecifikus poliklonális ellenanyag tartalma általában 0,1–1 mg/ml. Az in vitro tenyésztett hybridomák által termelt monoklonális ellenanyagok koncentrációja pedig nem több mint 10–20 µg/ml.

Ezeket a  $\gamma$ -globulinok családjába tartozó fehérjét az egyéb szérumkomponensektől, ill. a tápfolyadék egyéb elemeitől a molekula fizikai-kémiai tulajdonságai alapján kidolgozott biokémiai módszerekkel (sóval kicsapás, ioncserélő kromatográfia, gelszűrés stb.) vagy affinitáskromatográfia segítségével választjuk el. Ez utóbbi módszer alapja az, hogy a különböző osztályba tartozó ellenanyagok bizonyos molekulákhoz, pl. növényi lektinekhez (Mannose Binding lektin) vagy bakteriális fehérjékhez (Staphylococcus Protein A, Streptococcus Protein G, Peptostreptococcus Protein L) szelektíven kötődnek (6-3. táblázat). Ezeket a molekulákat immobilizálva (pl. Sepharose-gyöngy-höz kötve), oszlopkromatográfiával szelektíven tisztíthatók a megfelelő osztályba tartozó immunglobulinok (6-18. ábra).

Ha a Sepharose-gyöngyökhöz antigént kötünk kovalensen, az immunszérumból vagy felulúszóból az antigénspecifikus ellenanyagok szelektíven izolálhatók. Az oszlop molekuláihoz kötődő antitesteket megfelelő alacsony pH-jú és ionerősségű pufferrel tudjuk eluálni. Ugyanígy fordítva is, megfelelő tisztaságú antitestet immobilizálva Sepharose-gyöngyökhöz, kis mennyiségű antigént tudunk kevert oldatból tisztítani affinitáskromatográfia segítségével (6-19. ábra).

### ELLENANYAGOK, ANTIGÉNEK JELÖLÉSE

Mivel az antigén-ellenanyag immunkomplex létrejötte nem okoz minden esetben mérhető változást, ezért az immunanalitikai mérésekhez legtöbbször szükségünk van egy jelölő molekulára, amely a teszt típusától függően lehet akár az antigén, akár az ellenanyag egy jelölt változata. A jelölés annyit jelent, hogy a molekulához általában kovalensen hozzákötünk egy analitikailag jól mérhető részt. Fontos, hogy a jelölő anyag lehetőleg minél kevésbé változtassa meg az immunreagens kötődési tulajdonságait. A jelölő molekula lehet radioaktív izotóp, enzim, fluoreszcens molekula, kemilumineszcens molekula vagy mágneses nanopartikulum.



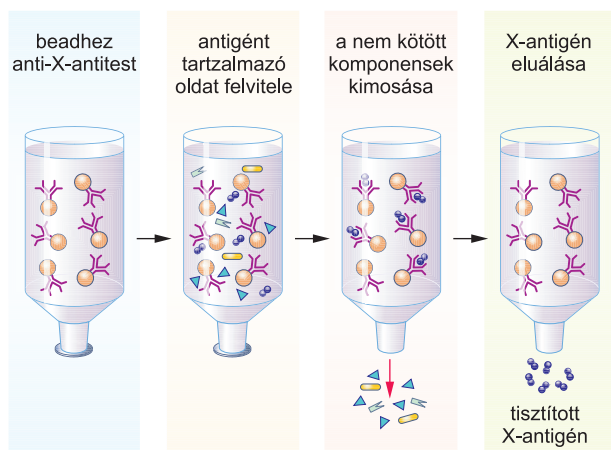
6-18. ábra. Ellenanyag tisztítása Protein-G Sepharose affinitáskromatográfiával

### Radioizotópos jelölés

Ez volt az első jelölési technika, amit az ötvenes évektől alkalmaztak az immunoassay-knél (RIA, IRMA). Az izotóp beépítése gyakorlatilag nem változtatja meg az antigén vagy ellenanyag kötődési tulajdonságait. Míg ez az egyik legérzékenyebb eljárás, de mivel drága, és különleges kezelést igényel a radio-

aktív izotópok miatt, mára már visszaszorult. A módszer egyik kidolgozója ROSALYN SUSSMAN YALOW 1977-ben Nobel díjat kapott az inzulin radioimmunoassay-vel való meghatározásáért.

- Jelölő izotópok:
  - $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$  ( $\gamma$ -sugárzók).
  - $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  (lágy  $\beta$ -sugárzók)
- Az eljárás hátrányai:
  - A hulladékok elhelyezése gond.
  - Korlátozott felhasználási idő.
  - Veszélyes anyagokat kell tárolni.
  - Költséges mérőberendezés szükséges.
  - Állandó szervezett ellenőrzésre, a dolgozók és a munkahely egészségügyi felügyeletére van szükség.
- A  $\gamma$ -sugárzó izotópos jelzés jellemzői:
  - Jól kidolgozott, gyors, olcsó jelölés.
  - Érzékeny módszer ( $10^{-8}$ – $10^{-12}$  mol/l tartomány).
  - Viszonylag rövid felezési idő ( $^{125}\text{I}$ : 60 nap,  $^{131}\text{I}$ : 8 nap).



6-19. ábra. Antigén tisztítása affinitáskromatográfiával

**6-3. táblázat.** Különböző fajok ellenanyagainak affinitása protein A-hoz és protein G-hez

Faj	Protein A	Protein G
<i>Ellenanyag</i>		
humán IgG <sub>1</sub>	++++	++++
humán IgG <sub>2</sub>	++++	++++
humán IgG <sub>3</sub>	–	++++
humán IgG <sub>4</sub>	++++	++++
humán IgA	++	–
humán IgD	++	–
humán IgE	++	–
humán IgM	++	–
egér IgG <sub>1</sub>	+	++
egér IgG <sub>2a</sub>	++++	++++
egér IgG <sub>2b</sub>	+++	+++
egér IgG <sub>3</sub>	++	+++
egér IgM	+ / –	–
patkány IgG <sub>1</sub>	–	+
patkány IgG <sub>2a</sub>	–	++++
patkány IgG <sub>2b</sub>	–	++
patkány IgG <sub>2c</sub>	+	++
patkány IgM	+ / –	–
nyúl IgG	++++	+++
hörcsög IgG	+	++
tengerimalac IgG	++++	++
szarvasmarha IgG	++	++++
birka IgG	+ / –	++
kecske IgG	+ / –	++
sertés IgG	+++	+++
csirke IgG	–	+
<i>Fragmensek</i>		
humán Fab	+	+
humán F(ab') <sub>2</sub>	+	+
humán scFv	+	–
humán Fc	++	++
humán κ	–	–
humán λ	–	–

- „Lebomlási katasztrófa” – a kémiai szerkezet is nagymértékben sérül.
- Kiváló minőségű számláló szükséges.

- A β-sugárzó izotópos jelzés jellemzői:
  - Jól kidolgozott jelöléstechnika.
  - Érzékeny módszer (10<sup>-8</sup>–10<sup>-12</sup> mol/l tartomány).
  - Hosszú felezési idő (<sup>3</sup>H: 12,3 év, <sup>14</sup>C: 5760 év).
  - Bonyolult és igen drága számlálóberendezést igényel.
  - Bonyolult és környezetszennyező vegyszeres előkészítés.
  - Kereskedelmi forgalomban nemigen kapható.

### Enzimjelölés

A hetvenes években kifejlesztett technika, kevésbé érzékeny, mint a radioizotópos technika, de sokkal stabilabb jelölés, nem sugárveszélyes, nem igényel speciális egészségügyi ellenőrzést, tárolási feltételeket, ezért jobban elterjedt. Alkalmazásánál az enzimet nem közvetlenül detektáljuk, hanem annak kromogén vagy fluorogén szubsztrátját, amelyből az enzimkatalízis hatására színes termék képződik. A színreakció egyszerű fotométerrel detektálható, az abszorbanciaváltozás arányos az enzimaktivitással, amelynek mértékéből meghatározható a szilárd fázishoz kötött antigén vagy antitest mennyisége. Az enzimjelölést alkalmazó immunoassay-k legelterjedtebb formája az ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) technika, ahol egy speciális, 96 lyukú műanyag lemez mélyedéseiben (mikrotiter-tálca) végzik az immunreakciót, a lemez mélyedései (angolul well) szolgálnak küvettaként is a fotometriás mérésnél. A használt jelölő enzim leggyakrabban alkali-kus foszfatáz és peroxidáz, ritkábban β-galaktozidáz vagy glükóz-oxidáz.

### Fluoreszcens jelölés

Az ehhez alkalmazott jelölő anyagok (festékek) nagyenergiájú (kis hullámhosszú) fénnel megvilágítva más, alacsonyabb frekvenciájú fényt bocsátanak ki. Ezt a jelenséget fluoreszcenciának nevezik. Néhány mintának önmagában is van fluoreszcens tulajdonsága, az alkotó vegyületektől függően, ezt autofluoreszcenciának nevezik.



**Probléma:** biológiai mintákban fluoreszcens anyagok (pl. fehérjék, bilirubin, egyes vitaminok) interferálhatnak, ami háttér-fluoreszcencia, autofluoreszcencia formájában jelentkezik.

**Előnyei:**

- Az enzimjelöléssel szemben nagyobb érzékenység, kisebb mérési tartomány ( $10^{-14}$  mol/l vs.  $10^{-8}$  mol/l).
- Nagyon érzékeny és segítségével kis molekulák is kimutathatók, ezért elterjedt a modern biológiai kutatásokban

Sok különféle fluoreszcens jelölőfesték létezik, pl. fluorescein, rodamin B, lantanida kelátkomplexek, umbelliferonszármazékok.

### Kemilumineszcencia

A gerjesztés kémiai reakcióban történik. A gerjesztett állapotú termék molekula-fénykibocsátással tér vissza alapállapotba. Általában oxidációs reakciókban fordul elő, amikor egy molekulát erős oxidálószerrel (pl. hidrogén-peroxiddal) lúgos közegben oxidálunk.

### Biolumineszcencia

A kemilumineszcencia sajátos esete, amikor a kémiai reakciót enzim katalizálja. Ilyen a szentjánosbogárban lejátszódó reakció, amelyet a luciferáz enzim katalizál:

luciferin + oxigén = oxiluciferin + foton

**Jellemzői:**

- Érzékenyebb, mint a fluoreszcens módszerek, jelenleg az egyik legérzékenyebb jelölés.
- Probléma, hogy a szennyeződések és a biológiai mátrix zavarhatja a mért jelet.
- Jelölő anyagok: luminol, izoluminol, akridínium-észterek stb.

### KONJUGÁLÁSI MÓDSZEREK

A kiválasztott immunoassay sikeres működése nagymértékben függ attól, hogy a jelölő molekula (enzim, fluorofor stb.) kapcsolódása ne változtassa meg az antigén/antitest biológiai tulajdonságait (konformáció, affinitás, antigenitás stb.).

*Glutáraldehiddel* való konjugálás esetén (Avrameas, 1978) a glutáraldehid aldehidcsoportjai kapcsolódnak a fehérjék aminocsoportjaihoz. Ez magas pH-n lezajló, kevert reakció, amely különböző formátumú konjugátumokat eredményez, mivel több aktív csoport kapcsolódik össze.

A *perjodátos módszer* (Nakane, 1966) az antitestek peroxidáz enzimmel való jelölésére terjedt el, mivel szénhidrátot tartalmaz a molekula.

E módszerek nem alkalmasak a molekulák térbeli konfigurációjának megtartására, ezért újabb konjugálási eljárásokat fejlesztettek ki *bivalens reagensek* felhasználásával, mint az m-maleimidobenzil-N-hidroxiszukcinimid-észter (MBS), ahol annak aktivált észter- és maleimidcsoportjai reagálnak  $-NH_2$  és  $-SH$  csoportokkal egyaránt, összekapcsolva azokat. N-hidroxiszukcinimid (NHS) felhasználásával a molekulák karboxics csoportjait is használhatjuk jelölésre, ami a fehérjék  $-NH_2$  csoportjaihoz kapcsol. Ez a módszer felhasználható fehérjék szilárd fázisú hordozóhoz kapcsolására is.

### Immunológiai alapú laboratóriumi módszerek csoportosítása

- Elválasztás-technikai mérőmódszerek: affinitás-kromatográfia, immundiffúzió, immun-elektroforézis. Ezek a 4. fejezetben már részletezésre kerültek.
- Optikai mérőmódszerek: turbidimetria, nefelometria
- Immunanalitika: immunoassay

### ANTIGÉN-ANTITEST REAKCIÓKON ALAPULÓ MÓDSZEREK

Az antigén- és ellenanyag-molekula kölcsönhatása az antigénkötő hely és a megfelelő epitóp kapcsolódásán alapul, amelyet elsődleges kölcsönhatásnak nevezünk. Bivalens vagy polivalens antigének két vagy több antitest összekapcsolódását eredményezhetik, ami az Fc-részek interakciójához vezethet. Az így kialakuló másodlagos kölcsönhatások az antigén-antitest között kialakuló térhálószerkezet, vagyis *immunkomplex* keletkezéséhez vezetnek. Ezek általában az oldatból kiválva az antigén természetétől

függően *precipitálódnak* vagy *agglutinálódnak*. Az *in vitro* immunkomplex-képződés számos immunológiai módszer alapja, így a laboratóriumi gyakorlatban igen elterjedt.

### PRECIPITÁCIÓN ALAPULÓ ELJÁRÁSOK

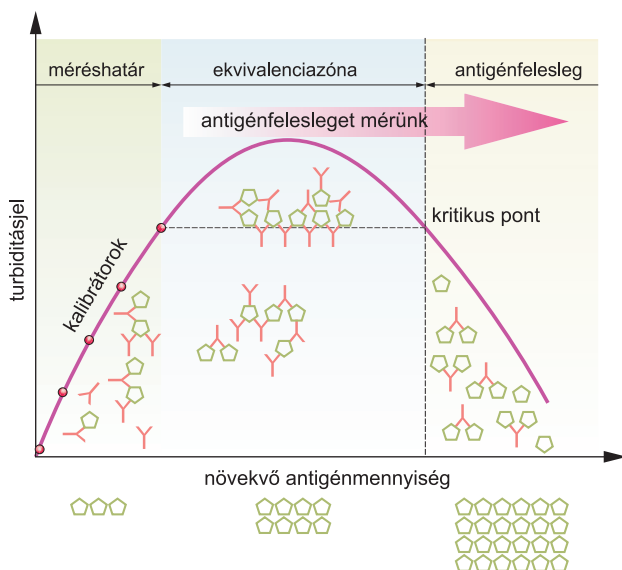
Egy oldott polivalens antigénmolekula és az ellenanyag kölcsönhatása precipitátum képződéséhez vezethet, ha a két komponens megfelelő arányban van jelen. A reakcióban a komponensek optimális kapcsolódásához azok megfelelő aránya, a közegben fennálló megfelelő pH, ionerősség és hőmérséklet szükséges, valamint fontos az ellenanyag affinitása és aviditása is. A végleges térháló kialakulása optimális tényezők jelenlétében is hosszabb ideig tart (30–120 perc). Azonos antigénmennyiséghez növekvő ellenanyag-mennyiséget adva, vagy fordítva, állandó antitestkoncentrációhoz növekvő antigénmennyiséget adva ún. *precipitációs görbét* írhatunk le, ez jellegzetesen Gauss-görbe alakú (6-20. ábra), és HEIDELBERG írta le 1935-ben. A jellegzetesen 3 szakaszra osztható függvény segítségével mennyiségileg meghatározható az antigén : antitest arány. A görbe első szakaszára jellemző az antitesttúlsúly, amikor a precipitátumtól elválasztott felülúszóban szabad antitest mutatható ki. Tovább növelve a hozzáadott antigén mennyiségét egyre több és nagyobb térháló képződik, elérve az ún. ekvivalenzázónát, ahol szabad antigén és szabad an-

titest nem található. A görbe harmadik szakaszában antigéntúlsúly jön létre, amikor a precipitátum mennyisége újra csökken. Valamely analit meghatározásához optimalizálni kell azt az antitestkoncentrációt, amellyel az ekvivalenzázónában tudunk mérni egy molekulát dinamikus határok között.

Immunprecipitátumokat oldatban a nefelometria és turbidimetria segítségével, gélben immundiffúziós eljárások segítségével tudunk festés után vagy UV fényben meghatározni. A módszer előnye a specifitás és az egyszerűség, hátránya a viszonylag alacsony szenzitivitás, amely 0,1–0,5 mg/dL között mozog. Ez a szenzitivitás ugyanakkor elégséges a fő szérumban komponensek mennyiségi meghatározásához.

### Precipitációs módszerek:

- Kvalitatív precipitációs módszerek
  - Egyszerű immundiffúzió (Williams, 1970).
  - Kettős immundiffúzió (Garvey, 1977).
  - Kétdimenziós immundiffúzió (Williams, 1970).
  - Elektroimmunodiffúzió (Ritzmann, 1975).
  - Immunoelektroforézis (Rose, 1973).
- 2. Szemikvantitatív precipitációs módszerek
  - Egyszerű, radiális immundiffúzió (Fahey, 1965; Mancini, 1965).
  - Egydimenziós elektroimmunodiffúzió (Axelsen, 1975) („rocket”-elektroforézis).
- 3. Kvantitatív precipitációs módszerek
  - Nefelometria (Ritchie, 1978).
  - Turbidimetria.



6-20. ábra. Heidelberg-görbe. Az antigén-antitest reakcióban képződő immunkomplex keletkezésének jellemzői

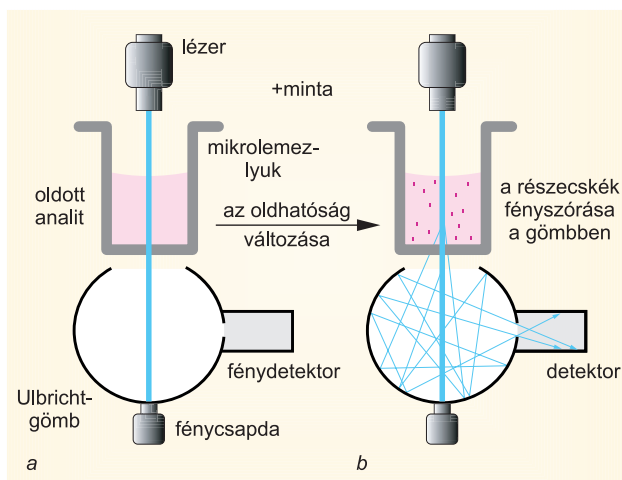
### Nefelometria és turbidimetria

E mérőmódszereket nagyobb partikulumok koncentrációjának mérésére használjuk (mint antigén-antitest komplex, micropartikulumok stb.), amelyeket méretük miatt nem tudunk abszorpciós spektrofotometriával vizsgálni. A nefelometria elve, hogy a mintán áthaladó fény különböző irányban történő szóródását mérjük, a kapott gyenge optikai jel felerősítésével. Ezzel ellentétben a turbidimetriánál a mintán áthaladó fény elnyelődését detektáljuk, vagyis a fényintenzitás-csökkenést.

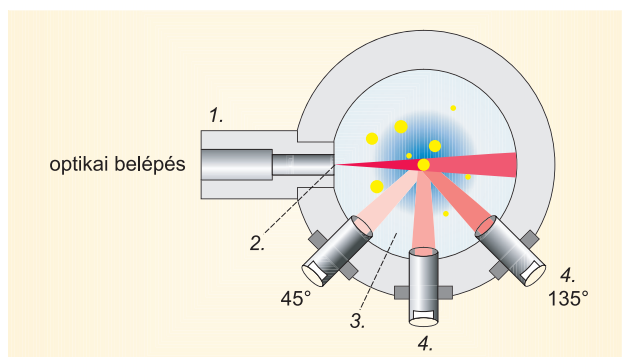
Tehát a nefelometria és a turbidimetria egy szuszpenzióban keletkezett részecskék okozta fénysugárzás szóródásának mérésén alapul (6-21., 6-22., 6-23. ábra). Amikor egy párhuzamos fénysugár a szuszpenzióban egy részecskéhez ér, a fény egy része elnye-

lődik vagy reflektálódik, szóródik, a nagyobbik része viszont áthalad a mintán. Egy adott oldat részecskéinek fényszórását mérjük a nefelometriában. A fény hullámhosszától függően 3 különböző fényszóródás jöhet létre:

- Ha a fény hullámhossza ( $\lambda$ ) sokkal nagyobb, mint a részecske átmérője, akkor a fény szóródása szimmetrikus a részecske körül. A legkisebb fényszóródás a beeső fénysugárra  $90^\circ$ -os szögben mérhető.
- Ha a fény hullámhossza jóval kisebb a részecske átmérőjénél, a fény előre felé szóródása romlik a hátrafelé szóródásnak köszönhetően (Mie-teória).
- Ha a hullámhossz nagyrészt megegyezik a részecske méretével, nagyobb az előre felé történő fényszóródás, mint más irányokba, amit a Rayleigh–Debye teória ír le.

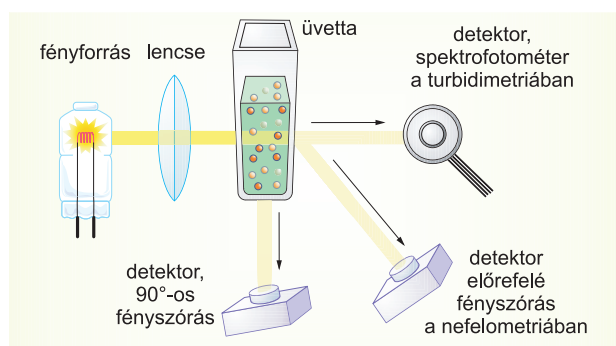


6-21. ábra. A nefelometria mérési elve



6-22. ábra. A nefelometria elve

1. bejövő fény; 2. nyílás; 3. reakciós lombik; 4. fénydetektor



6-23. ábra. A nefelometria és a turbidimetria optikai részei

Mivel az antigén-antitest komplexek átmérője a 250–1500 nm tartományba esik, a nefelometriában használt 320–650 nm-es fénysugár főként előre felé szóródik (Rayleigh–Debye típus).

### Nefelométer

Egy tipikus nefelométer részei: fényforrás, kolimátor, monokromátor, mintatartó küvette, szórt fény csapda és fotodetektor. A részecskék által szórt fényt tipikusan a küvetából kijövő fényre  $15\text{--}90^\circ$ -os szögben detektáljuk. A megvilágító lézert fény általában kisteljesítményű hélium-neon lézertől származik, amely koherens, monokromatikus (632,8 nm hullámhosszúságú) és polarizált. A biológiai anyagok önmagukban ezen a hullámhosszon nem mutatnak elnyelődést. A nefelometria a turbidimetriánál jóval érzékenyebb módszer, mivel nem a fényszórással arányos fényintenzitás-csökkenés mérését, hanem magának a szórt fénynek a mérését jelenti.

### Turbidimetria

Valamely részecske képződése következtében egy áthaladó fénynyaláb intenzitásának csökkenését méri a turbidimetria. A szuszpenzióban abszorbeált fény arányos a minta koncentrációjával és a részecskemérettel. A nagy érzékenységű fotodetektorok alkalmazásával a látható fény kis intenzitásváltozásai is detektálhatók, így a módszer érzékenysége megközelíti a nefelometriáét.

### AGGLUTINÁCIÓN ALAPULÓ MÓDSZEREK

A folyamat abban különbözik a precipitációtól, hogy az antigén vagy antitest nem oldott állapotban, hanem részecskék (sejtek, vörösvérsejtek, baktériumok vagy partikulumok) felszínéhez kötve helyezkedik el.

Így az antigénnel kapcsolódó ellenanyag méretében és valenciájában is különbség van: általában az IgM izotípusú ellenanyagok agglutinálnak jól. A dimer szerkezetű IgA szintén jobb agglutinin, mint az IgG. Az *agglutináció* úgy jön létre, hogy a két vagy több valenciával rendelkező antitest egyik antigénkötő helye az egyik, a másik antigénkötő helye egy másik részecske felszínén elhelyezkedő epitóphoz kapcsolódik. Az agglutináció mértéke ugyanolyan függvény-nyel jellemezhető, mint a precipitáció.

Agglutinációval meghatározhatunk egy mintából antitestmennyiséget, ha az antigén van a hordozó felszínéhez kapcsolva (*passzív vagy direkt agglutináció*). *Reverz agglutinációról* beszélünk, ha a megfelelő antitest van a partikulumhoz hozzákötve, és segítségével szolubilis antigént mérünk egy mintából. Kis molekulák, amelyek csak egy kötőhelyet tartalmaznak, mint a haptének (gyógyszerek, drogok, hormonok stb.), nem tudnak keresztkötéseket létesíteni, így nem agglutinálnak. Ezt úgy lehet áthidalni, hogy a haptént immobilizáljuk a hordozóhoz, és egy agglutinációt gátló kompetíciós assay segítségével mérjük a mintában lévő haptén mennyiségét. Ezt használják ki a terhességi gyors tesztek, ahol ily módon vizeletből tudunk humán koriogonadotropint (hCG) meghatározni.

### Passzív agglutináció – hordozó felszín

Vörösvérsejtek, zselatinpartikulumok, liposzómák és különböző latexpartikulumok alkalmasak hordozó felszínnek. Az agglutinációban használt hordozó részecske mérete 7–0,01  $\mu\text{m}$  között változik, fontos a töltése, a hidrofobicitás és a stabilitása. E nagy méretkülönbség miatt a felszínükön lejátszódó antigén-antitest reakciót nem lehet egyetlen mechanizmussal leírni. A 3–5  $\mu\text{m}$ -nél nagyobb partikulumokra a Brown-mozgás jellemző, és szobahőmérsékleten nem zavarja a diffúzió. Ugyanakkor a kis latex-mikropartikulumoknál a kolloid koagulációs reakciót figyelembe kell venni. A multivalens IgM antitest 750-szer jobb agglutináló ágens, mint a bivalens IgG, mert a részecskék közti távolság 120 nm-nél kisebb kell hogy legyen az antitest hossza miatt.

### Hemagglutináció

A vörösvérsejtet mint passzív hordozót előszerezettél alkalmazták agglutinációs tesztekhez, mivel a reakciót egyszerű végrehajtani és nem igényel spe-

ciális felszereltséget. Főleg a fejlődő országokban terjedt el számos infekciót jelző antitestet meghatározó passzív agglutinációs eljárás, mint a *Treponema pallidum*, a hepatitis B vírus (HBV), a hepatitis C (HCV), a humán immundeficienciavírus (HIV-1, HIV-2) elleni antitest szerológia. Reverz agglutinációs tesztet használnak a HBV surface (felületi) antigénje, az  $\alpha$ -fötóprotein (AFP), a humán hemoglobin szérum-mintából való meghatározásához. Az ilyen antigén-meghatározó gyári teszteknek a szenzitivitása közel 50 ng/mL antigén (analit).

### Zselatinrészecske agglutinációja

A hidrofíl felszínű speciális, kb. 3  $\mu\text{m}$  átmérőjű zselatinrészecskék előnye, hogy nincs saját antigénitásuk, viszont nagyobb a szenzitivitásuk, mint a vörösvérsejteknek, és a teszt elvégzése nem igényel pontos hőmérséklet kontrollt. Infekciós szerológiai vizsgálatoknál érzékenysége megközelíti az ELISA érzékenységét.

### Latexagglutináció

Leginkább a terhességi gyors tesztekben terjedt el, de használják plazmafehérjék detektálására is. A latex mint szilárd fázis jó kinetikai tulajdonságú. Rövidebb immunreakciós idővel kell számolni. Kvantitatív tesztként adaptálták turbidimetriára és nefelometriára is, ahol az 1  $\mu\text{m}$ -nél kisebb részecskék fényszóródást okoznak. A teszt érzékenysége tized ng/mL, míg a precipitáción alapuló immunkomplexet mérő turbidimetriás módszereké kevesebb mint 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . Ma már működnek latexpartikulum alapú automata rendszerek, amelyekkel óránként közel 200 tesztet végezhetünk el ng/mL érzékenységgel. A részecske alapú immunoassay-k előnye, hogy egyszerűek, mert nem igényelik a kötött és a szabad reaktánsok szeparálását.

## IMMUNOASSAY

### IMMUNOASSAY-TÍPUSOK CSOPORTOSÍTÁSA

#### Csoportosítás a jelölő molekula szerint

Minden immunoassay-ben szükség van jelölt molekulára, hogy a mintában jelen lévő antigén vagy antitest mennyiségét meg tudjuk mérni. A jelölő molekula részt vesz az immunreakcióban, így a létrejövő szignálváltozást mérhetjük a mintában. A módszer tí-



pusa szerint akár az antigént, akár az ellenanyagot is jelölhetjük, mint reaktáns (6-24. ábra).

YALOW és BERTSON 1959-ben fejlesztette ki és tette közzé a *radioimmunoassay* (RIA) módszert, amelyben radioizotópos jelölést használtak. Ez áttörést jelentett nyomokban jelen lévő molekulák (analitok) mennyiségi meghatározásában, és nagymértékben hozzájárult az alap kutatás és a klinikai laboratóriumi módszerek fejlődéséhez. Így pl. az inzulinbioassay-t helyettesítette az inzulin mennyiségi meghatározása RIA-val. A szolid fázisú RIA-ban lehetőség van az izotóppal jelzett kötött és szabad molekulák egyszerű elkülönítésére. A radioizotópos módszer veszélyessége miatt azonban egyre inkább előtérbe kerülnek a nem izotópos immunoassay-k, amelyek enzimet, fluorokrómot vagy más jelölő anyagot használnak az antigén-ellenanyag reakció kimutatására (6-25. ábra).

Az *enzimimmunoassay* (EIA) a korai hetvenes években került kifejlesztésre (Engvall, 1971; Van Weeman, 1971), és hamarosan nagy népszerűsége lett szert. A jelölő enzim katalitikus aktivitásának turnover szerint felerősíti a jelet. Az egyre újabb, érzékenyebb és jobb kromogének, fluorofórok és kemi-

lumineszcens molekulák megjelenésével a rendelkezésre álló szubsztrátok köre lehetővé tette a módszer szenzitivitásának növelését. A kiválasztott szubsztrát-tól függően beszélünk fluoreszcens enzimimmunoassay-ról vagy kemilumineszcens enzimimmunoassay-ról (Thorpe, 1984).

A *fluoreszcens immunoassay*-k (FIA) fluorofórokat használnak jelölő molekulának. A fluorofórokat megfelelő hullámhosszúságú fényenergiával kell aktiválni (excitáció), hogy mérhető fényemissziót adjanak. A FIA szenzitivitása kissé alacsonyabb az EIA-énál a biológiai minták jelentős háttér-fluoreszcenciája miatt. A 100 ns tartamú késleltetett fluoreszcencia emissziós fluorofórok az *időeltolódásos FIA-ban* használhatók. Az új típusú fluorofórok bevezetése nagymértékben javított a FIA érzékenységi tartományán, mivel olyan hullámhosszon működnek, ahol eltűnt a háttérzaj. A fejlett műszeres háttér bevezetése oly mértékben növelte a FIA érzékenységét, hogy extrém kis koncentrációk is mérhetőek vele ( $10^{-15}$  mol/l).

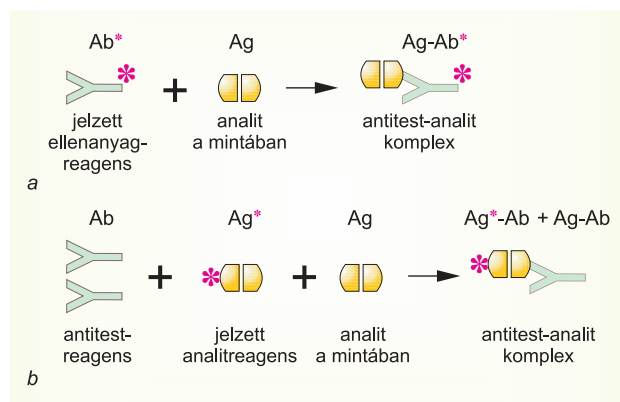
*Kemilumineszcens immunoassay-ben* mesterséges vagy a természetben előforduló (aequorin) kemilumineszcens jelölő molekulát használunk. A kemilumineszcens molekula nem fény-, hanem fizikai (pl. elektromos) gerjesztő energiát igényel ahhoz, hogy fényemissziót generáljon. Az oxidoredukciós elven alapuló reakcióban nincs lehetőség amplifikálásra, mivel egy foton generálódik a molekula alapállapotba történő visszatérésekor. Számos új, egyre jobb molekula került felhasználásra az *elektrokemilumineszcens immunoassay-ben*. A tribifenilek fémkelátjai folyamatosan emittálnak fényt egy oxidoredukciós reakcióban elektródok felszínén. (Blackburn, 1991).

Az eddig említett különböző eljárásoknál a módszer érzékenységét nagymértékben meghatározza a reaktánsok asszociációs konstansa (affinitás vagy aviditás), a jelölő molekula jelintenzitása és a jel : zaj arány is.

A  $^{125}\text{I}$  izotópok esetében 7 millió molekula generál 1 foton/s jelet, míg enzimek kemilumineszcens szubsztrátjait alkalmazva 6 nagyságrenddel lehet növelni a teszt érzékenységét. Ez az enzimek katalitikus aktivitása miatti amplifikációnak köszönhető.

### A mérés elve szerinti csoportosítás

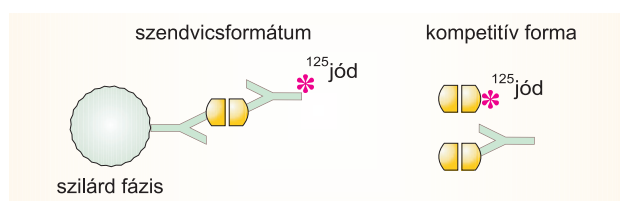
Az immunoassay-technológiák különböző formáiban az antigén-ellenanyag komplex különbözőképpen kerül elválasztásra a szabad (jelölt) reaktáns-



6-24. ábra. Immunoassay-formátumok a jelölés helye szerint

a) Indirekt immunoassay-ben és szendvicsformátumban jelölt antitestet alkalmaznak

b) Kompetíciós formátumú immunoassay-ben jelölt antigént alkalmaznak



6-25. ábra. RIA; radioaktív jelölést használnak



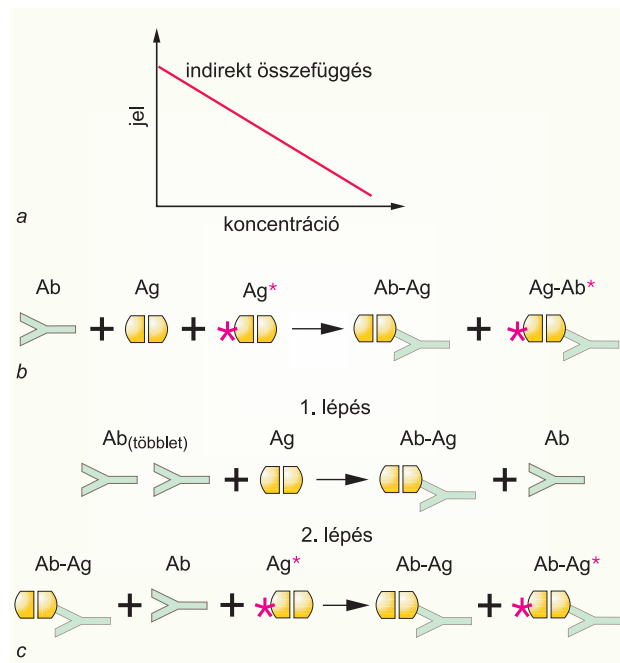
tól. Ezek alapján e módszerek 4 kategóriára oszthatók: nem-kompetitív és kompetitív immunoassay-k, valamint homogén és heterogén immunoassay-k.

### Kompetitív immunoassay-forma

Ebben az immunoassay-formátumban a mintában lévő mérendő molekula, vagyis a jelöletlen analit (legtöbbször az antigén) verseng a jelölt antigénnel az antitest kötőhelyeiért. A jelöletlen antigén elfoglalja az antitest kötőhelyeit, így az utólag a mintához adott jelölt antigén nem tud az antitesthez kapcsolódni. Így a kompetitív immunoassay-ben a mért kisebb jel azt jelenti, hogy több jelöletlen antigén van a mintában. A kompetitív formában tehát az antigén mennyisége fordított arányosságot mutat a mért jellel (6-26. ábra).

Az *egylépéses kompetitív formában* mind a jelölt antigén, mind a mintában lévő antigén egyszerre vettélkednek a kismennyiségű antitest kötőhelyiért.

A *kétlépéses kompetíciós formában* az antitest mennyisége többletben van az antigén koncentrációjához képest. Az antitestet mint reagenst először a vizsgálati mintában lévő antigénnel inkubáljuk, majd a második lépésben adjuk hozzá a jelölt antigént. A kétlépéses kompetitív assay forma nagyságrendekkel nagyobb szenzitivitású, mint az egylépéses forma.



6-26. ábra. Kompetíciós assay

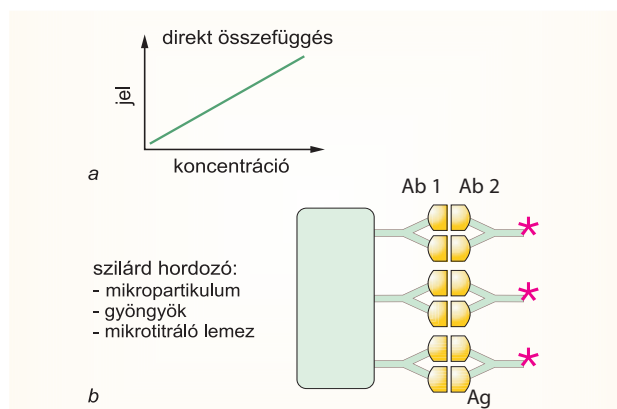
- a) Fordított arány a jel és az analit koncentrációja között  
b) Egylépéses kompetíciós immunoassay  
c) Kétlépéses kompetíciós immunoassay

### Nem kompetitív (szendvics) módszer

A nem kompetitív tesztformátumok nyújtják általában a legnagyobb szenzitivitást, specificitást; és leginkább olyan kritikus paraméterek mérésére használjuk, mint a cardialis és a hepatitismarkerek. Ezt a nagyérzékenységű formátumot „szendvics”-assay-nek nevezzük, mert a mérendő molekula (analit) két specifikus antitest (reagens) közé kötődik be (6-27. ábra). Ezt a formátumot is *alkalmazhatjuk egy- vagy kétlépéses formában is*. A kétlépéses formában egy mosási lépéssel elkülönítjük az összekapcsolódott szendvicskomplexet a fölöslegben maradt jelölt reagenstől, ill. más zavaró molekuláktól. Ez a kétlépéses nem kompetitív formátum biztosítja a legnagyobb specificitást és szenzitivitást az itt tárgyalt tesztípusok közül. A nem kompetitív módszernél a jelölt reagens (általában antitest) mennyisége egyenesen arányos a mintában lévő antigén mennyiségével. Ezt egy dózis-hatás görbén ábrázolhatjuk, ahol az x tengelyen az antigén koncentrációját, az y tengelyen a hatást ábrázoljuk, amely jelen esetben a mért jel erőssége. Így minél több antigén van jelen, annál több jelölt antitest kötődik hozzá, ami egyenes arányosságot jelent.

### Homogén és heterogén immunoassay-módszerek

Azokat az immunoassay módszereket, amelyekben a kötött antigén-antitest komplex szeparálása szükséges a szabad jelölt reagenstől, heterogén immunoassay-nek nevezzük. Azokat a módszereket, amelyekben nem szükséges szeparálási lépést közbeiktatni, homogén immunoassay-nek hívjuk (6-28. ábra). Ho-



6-27. ábra. Nem kompetitív szendvics-assay

- a) Egyenes arány a jel és az antigén koncentrációja között  
b) Szendvicsassay; az antitestek az antigén két epitópját ismerik fel (Ab 1 = befogó antitest, Ab 2 = jelölt antitest, Ag = antigén)

mogén módszereket alkalmazunk kis molekulák, mint gyógyszerek, drogmáradványok kimutatására, pl. EMIT alkalmazásakor. Mivel a homogén módszereknél nincs szükség az antitest jelölt antigénkomplex (Ab-Ag\*) elkülönítésére a szabad jelölt antigéntől (Ag\*), ezek a technikák sokkal egyszerűbbek és gyorsabb a kivitelezésük, mint a heterogén módszereké, amelyekben a két komponens elkülönítésére gyakran egy szilárd fázisú hordozót alkalmazunk, pl. a mágneses partikulumokat vagy műanyag gyöngyöket.

A szilárd fázis (hordozó) jellemzői heterogén immunoassay-kben. Minden heterogén immunoassay-ben legalább egy szeparálási lépést szükséges beiktatni, amelyben a szilárd fázishoz kötött immunkomplext elkülönítjük a szabadon maradt jelölt reaktánstól. Az antigén vagy antitest szolid fázishoz kapcsolására alkalmas a kovalens kötés vagy egyszerű fizikai abszorpció, nem kovalens interakciók. Szilárd fázisként alkalmazhatunk agaróz- vagy poliakrilamidgél-partikulumokat, műanyag mikrogöngyöket (beads), polisztrén, ill. polipropilén csöveket, mikrotitráló lemezeket vagy vas-oxiddal fedett partikulumokat, amelyeket mágneses térben szeparálhatunk.

A műanyag csövek vagy mikrotitráló lemez mélyedéseiben a nagy felület miatt az immunreakció gyorsítására célszerű a reakcióelegyet rázni.

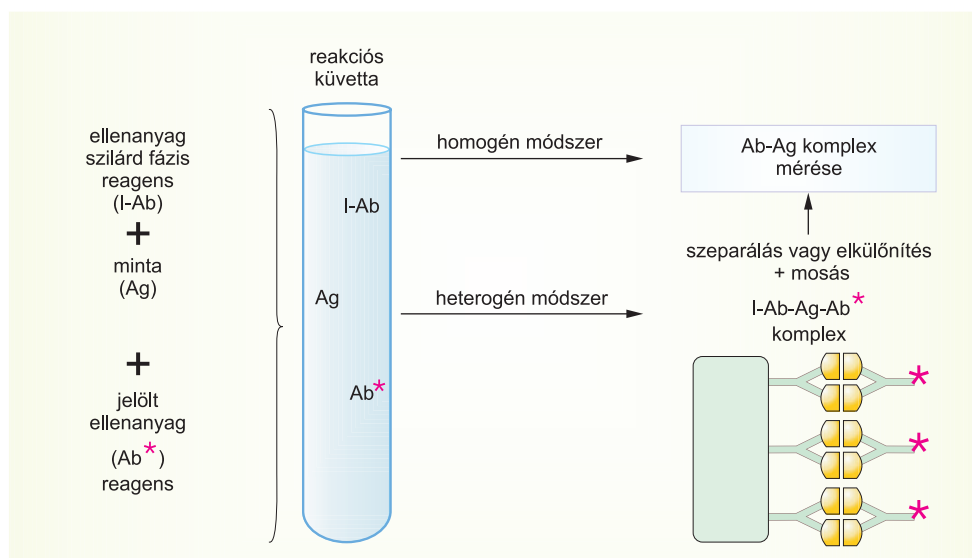
A pro zóna vagy „hook”-effektus, amelyet az analit magas koncentrációja okozhat, akkor áll elő, ha az egy lépéses módszerben kevés az alkalmazott szilárd fázishoz kötött vagy jelölt antitest. Mikrotiterlemezen vagy -csíkon gyakran tapasztalható ún. „széli effektus”, ami az immunreakció kimutatására használt en-

zim hőmérsékletfüggő működésének köszönhető. A lemez széle és közepe között akár 2 °C hőmérsékleti különbség is lehet. A szilárd fázis alakja és mérete is fontos tényező az antigén- vagy antitest befogó képesség és az immunreakció kinetikája szempontjából. Szférikus, 3 µm nagyságú, kis mágneses vagy latexpartikulumok a legideálisabb szilárd hordozófel-színek, amelyek a legjobb reakcióidőt biztosítják.

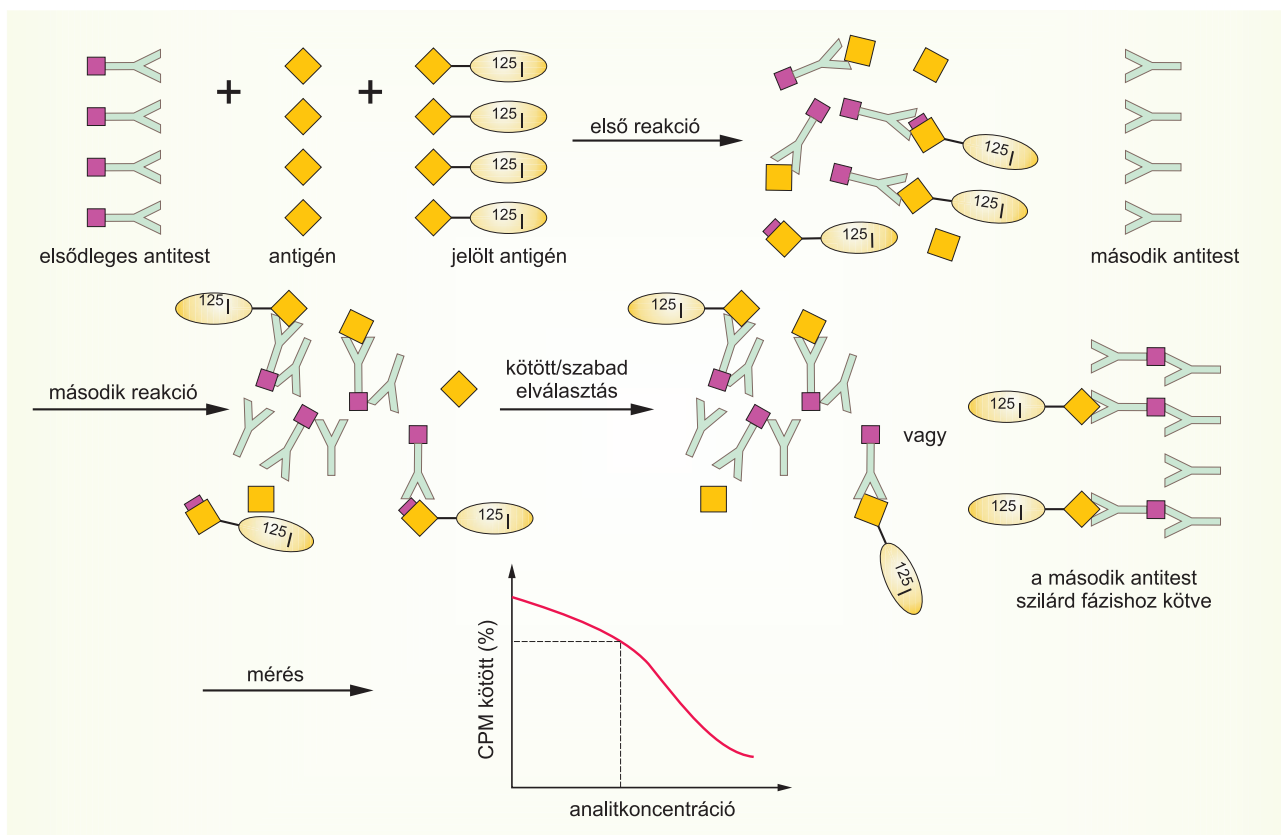
## MÓDSZEREK

### Radioimmunoassay (RIA)

Az immunoassay-k gyakorlati felhasználása a hatvanas években kezdődött a radioimmunoassay (RIA) elvének alkalmazásával, amely forradalmasította a kutatást és számos területen a klinikai gyakorlatot is, pl. az endokrinológiában, a véradásban, az allergia-diagnosztikában. A RIA radioaktív izotópot használ jelölő molekulaként, és a mért radioaktivitás arányos a mintában lévő analit mennyiségével. Két fő RIA-típust alkalmazunk, a kompetitív és a nem kompetitív heterogén formátumot, amelyek mosási lépést igényelnek a kötött és szabad jelölt molekulák elkülönítésére. A nem kompetitív szendvics formában a jel egyenesen arányos a mintában lévő antigén mennyiségével, a kompetitív formában viszont a mintában lévő antigén fordítottan arányos a jelintenzitással (6-29., 6-30., 6-31. ábra). RIA-t ma is használnak nagy szenzitivitása miatt, különösen nagyon kis mennyiségű analit meghatározására. Nagy affinitású antitestet használva ( $K_0 = 10^8 - 10^{11} M^{-1}$ ) néhány pg-nyi ( $10^{-12}$  g) antigén is kimutatható a mintából. Ugyanakkor a



6-28. ábra. Homogén és heterogén immunoassay

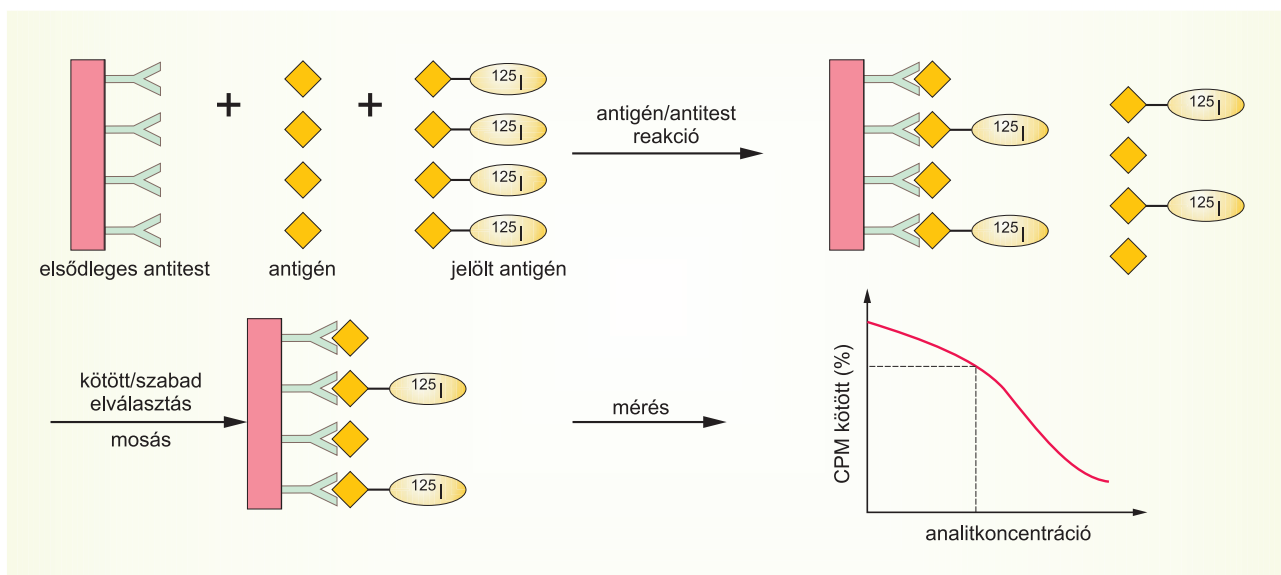


6-29. ábra. Kompetitív RIA; második antitestet használnak a kötött és a szabad frakció elválasztására (jelölés  $^{125}\text{I}$ jóddal)

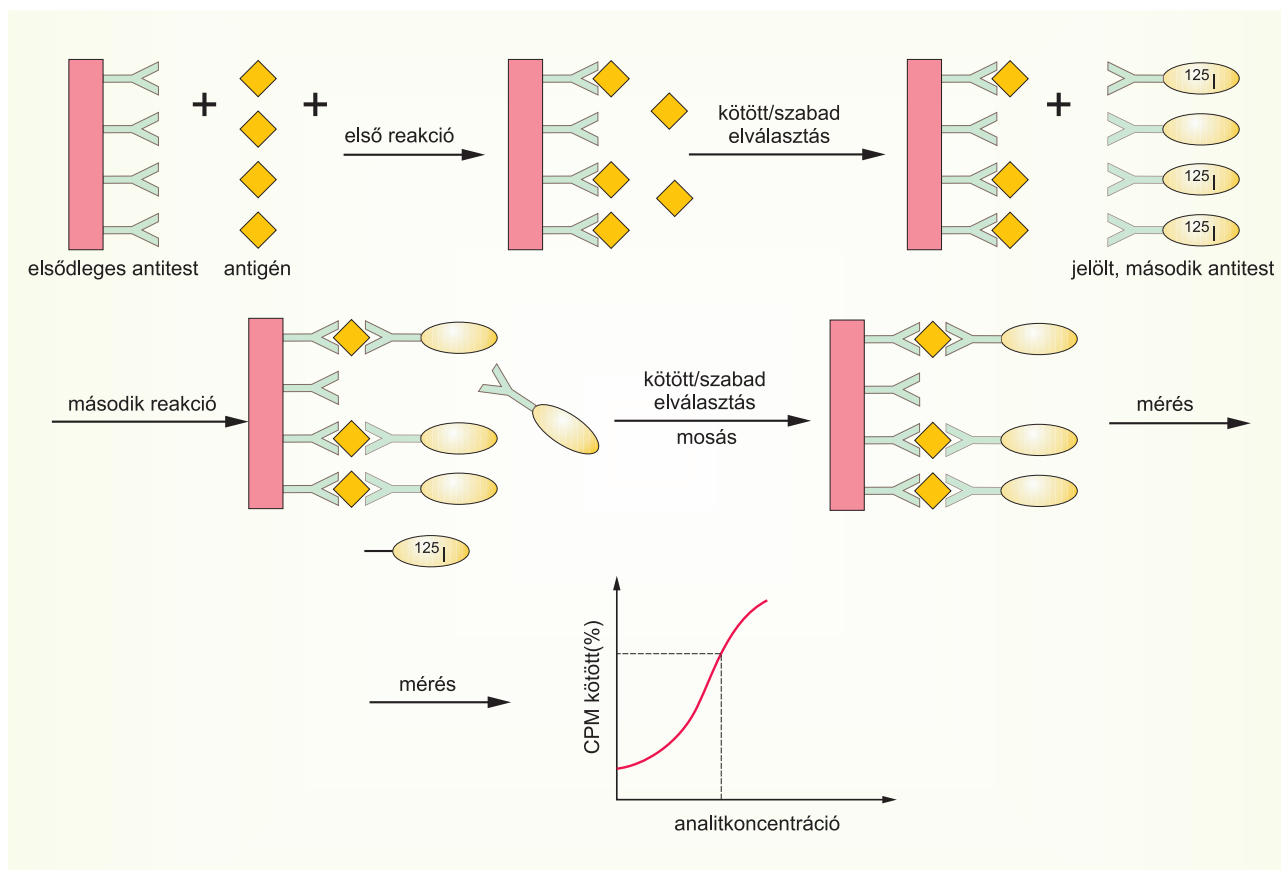
radioaktív anyag bonyolult kezelése, tárolása miatt a klinikai laboratóriumok ma már kevésbé gyakran alkalmazzák, mint a különböző típusú enzimimmunoassay-eket (EIA).

A radioaktív sugárzást, mint a  $^{125}\text{I}$ -jód-izotóp  $\gamma$ -sugárzását beütés/perc (counts per minute, CPM)

egységekben mérjük  $\gamma$ -szcintillációs számláló segítségével. A kiválasztott radioaktív jelölő molekula meglehetősen befolyásolja a vizsgálat menetét. A legnépszerűbb  $^{125}\text{I}$ -jód-izotóp esetén a beütésszám detektálása viszonylag rövid ideig tart, de rövid féleletideje miatt a jelölt anyagnak rövid a felhasználhatósági ide-



6-30. ábra. Kompetitív RIA; az elsődleges antitest szilárd fázishoz van kötve (jelölés  $^{125}\text{I}$ jóddal)



6-31. ábra. Szendvics-RIA; immunoradiometrikus assay, a befogó antitest a szilárd fázishoz van kötve (jelölés  $^{125}\text{I}$ jóddal)

je. Ugyanakkor a trícium- ( $^3\text{H}$ -) jelölésnél hosszabb mérési idő szükséges, ami megnöveli a vizsgálat kivitelezésének időtartamát. Ma a legtöbb RIA-ban  $^{125}\text{I}$ jód jelölést használnak, egyrészt az egyszerű kapcsolási technika miatt, másrészt nem változtatja meg a reaktáns biológiai aktivitását. A legáltalánosabban klóramin-T (Hunter, 1962) módszert használják, mely a fehérjék tirozincsoportjaihoz köti a jóddizotópot. Az enzimekkel ellentétben az izotópjelölés nem zavarja még a kis molekulák (haptének) antigenitását sem, mert nem okoz szterikus gátlást.

#### A kompetitív RIA-módszer elve (6-32., 6-33. ábra).

- Összemérjük a következőket:
  - A  $^{125}\text{I}$  vagy  $^{131}\text{I}$ -el jelzett radioaktív antigént („meleg” antigen)
  - Az antigenre specifikus antitestet szolid fázishoz kapcsoltan
- Ismert mennyiségű, jelöletlen („cold”) antigént adunk a mintákhoz (standard sor), amely vetélkedik az antitest kötőhelyeiért.
- Növekvő koncentrációjú jelöletlen antigen

növekvő mennyiségű radioaktív antigént szorít le az antitest kötőhelyeiről.

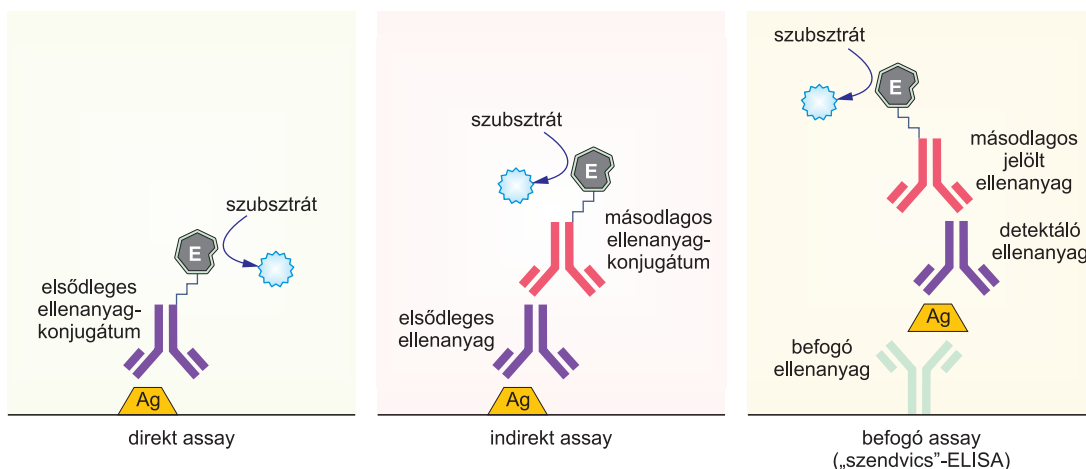
- Az antitesthez kötött antigént elválasztjuk a szabad antigéntől, és az immunkomplex radioaktivitását mérjük.
- Ezen eredményekből a készülék komputerprogramja kalibrációs görbét szerkeszt.
- Az ismeretlen mintákat párhuzamosan mérjük.
- A minták antigenkoncentrációját a program a kalibrációs görbére illesztve meghatározza (lásd 6-29. ábra).

#### A szendvics RIA-módszer elve

Az immunoradiometrikus assay (IRMA) a szendvics formátumot használja antigenmérésre (lásd 6-31. ábra). Ez a módszer a nagy specificitású monoklonális ellenanyagok előállítása óta vált népszerűvé olyan molekulák mérésére, amelyek legalább két epitóppal rendelkeznek. A szendvics formátumban antitest-főlösleget alkalmazunk és az érzékenysége nagyobb, mint a kompetíciós módszereké. A szilárd fázishoz kötött első ellenanyag (capture antibody) mint be-

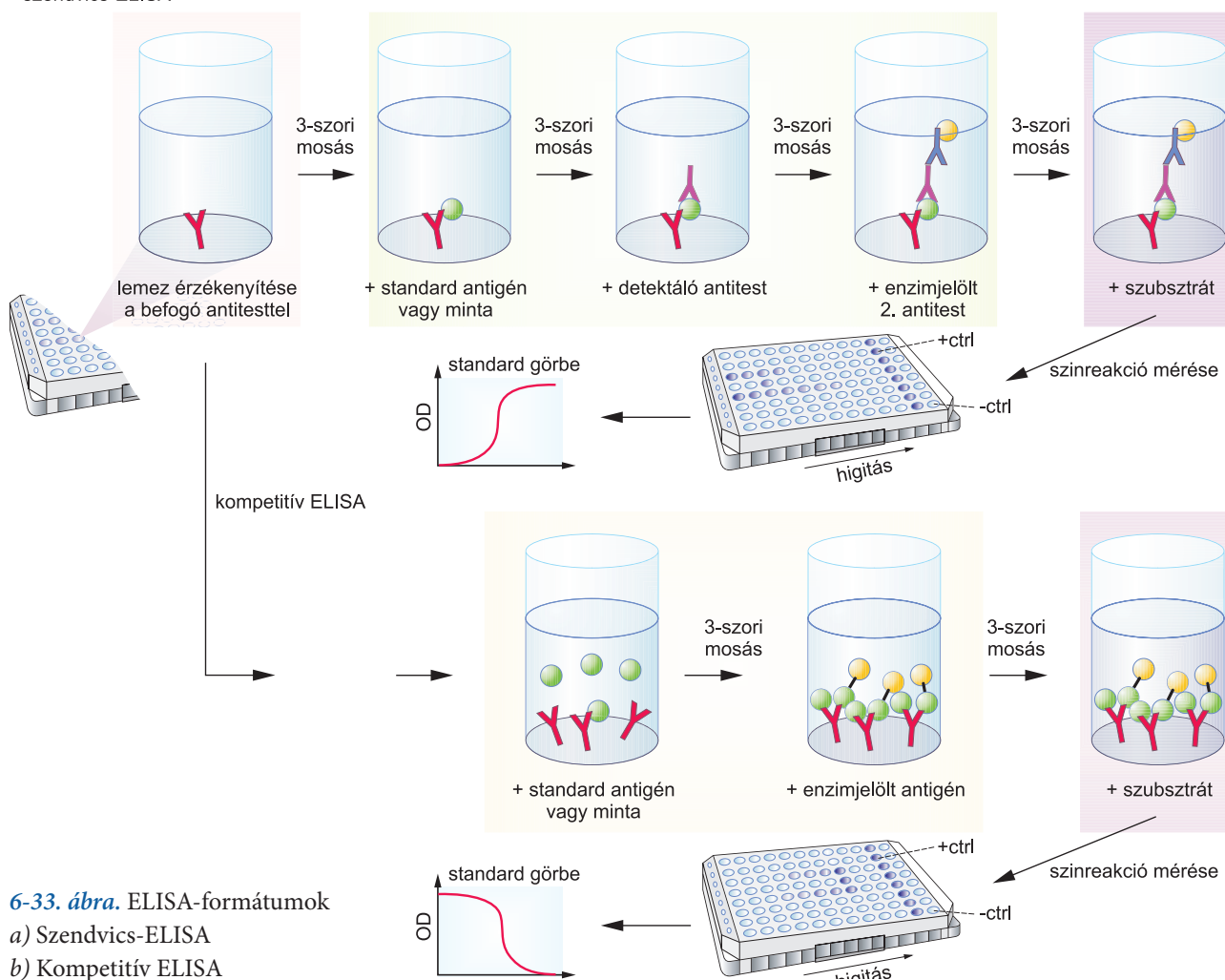
fogó ellenanyag a mintából megköti az antigént. Ezt követően mosási lépés után adjuk a mintához a második, jelölt antitestet, amely kapcsolódik a szilárd fázishoz kötődött antigénhez. A szabad, jelölt reak-

táns mosási lépéssel való eltávolítása után mérjük az immunkomplex radioaktivitását. A mérés során nem jöhet létre interferencia, mivel a két monoklonális antitest az antigén két különböző epitópját ismeri fel.



6-32. ábra. ELISA-formátumok (<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/ELISA.html>)

#### szendvics-ELISA



6-33. ábra. ELISA-formátumok

a) Szendvics-ELISA

b) Kompetitív ELISA



Ezért a két antitestet egyszerre is össze lehet keverni a mintával és egy mosási lépés után mérni a szilárd hordozóhoz kötődött immunkomplex radioaktivitását. A szendvics-assay formátum érzékenysége nagy. Példaként a thyroideastimuláló hormon (TSH) immunoradiometrikus meghatározásának szenzitivitása a 0,07  $\mu\text{U/mL}$  alatt van, míg a konvencionális, radioaktív antigént alkalmazó assay érzékenysége 0,7  $\mu\text{U/mL}$ .

#### A kötött és szabad jelölt molekula eltávolításának lehetőségei:

- Egy második antitesttel precipitálni az antigén-antitest komplexet. Ha pl. az első ellenanyagot egérben termelték, akkor egy anti-egér IgG hozzáadásával (lásd 6-29. ábra).
- Az antigénspecifikus antitestet a tesztcső falához kötjük.
- Az antigénspecifikus antitestet egy részecskéhez kötjük, pl. Sephadex gyöngyhöz. Ebben az esetben a tesztcső centrifugálásával különítjük el a kötött (pellet) és szabad (felülúszó) jelölt molekulát.

#### Enzimimmunoassay (EIA)

Az enzimjelölést alkalmazó kvantitatív immunoassay-k a radioizotópos módszerek alternatíváiként kerültek kifejlesztésre a hetvenes évek elején (Engvall, 1971; Van Weeman, 1971). A legelterjedtebb közülük az enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA), az EIA és az enzyme-multiplied immunoassay technique (EMIT). A heterogén EIA-k alapvetően hasonlítanak a RIA-hoz, azzal a különbséggel, hogy enzimjelölést alkalmazunk.

Az enzimjelölés lehetővé teszi a homogén EIA-k kifejlesztését, elhagyva az amúgy szükséges mosási lépéseket. Az egyre innovatívabb EIA formátumok kifejlesztése különböző szenzitivitású, pontosságú, bonyolultságú és különböző ideig tartó módszerekhez vezetett (lásd 6-32. ábra).

#### Heterogén EIA

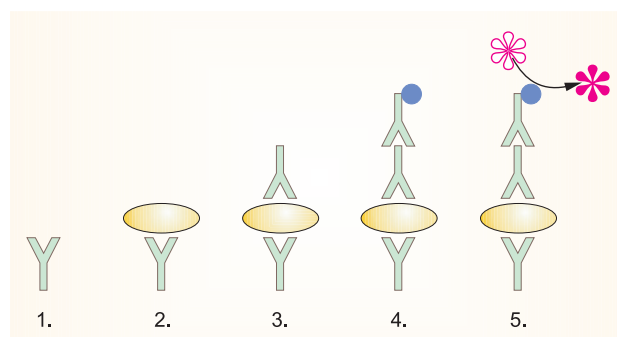
A radioaktív detektáláshoz képest itt szükséges egy másodlagos reakciót elvégezni, hogy az enzim katalitikus reakcióját láthatóvá tegyük. Az enzim szubsztátjainak egyre bővülő köre lehetővé tesz fotometriás, fluorimetriás és kemilumineszcens detektálási módot.

Szilárd fázist használunk a kötött és szabad konjugátumok elkülönítésére, ez lehet mikrotitráló lemez mélyedése, műanyag beadek vagy csövek felszíne, mágneses partikulumok vagy latexfilterek. A különféle heterogén EIA-kban leggyakrabban alkalmazott enzimek: peroxidáz (PO), alkalikus foszfatáz,  $\beta$ -galaktozidáz, glükóz-oxidáz, ureáz és kataláz. Az enzimmel elérhető érzékenységet az enzim turnover és a jel mérési módszere határozza meg, közülük a kemiluminometriás detektálás a legérzékenyebb.

A heterogén EIA formátuma hasonlít a RIA-ra, ugyanúgy lehet kompetitív és nem kompetitív forma. A kompetitív módszer (analittúlsúly) antigén-enzim konjugátumot használ, míg a nem kompetitív teszt (reaktánsfelesleg) lehet kétoldalú immunometrikus szendvics assay és indirekt módszer antitestmérésre (lásd 6-33. ábra). Az immunometriás szendvics tesztformátum nagyon elterjedt olyan antigének meghatározására, mint hormonok, tumormarkerek, plazmaproteinek és fertőző ágensek. Indirekt mérési módszert fejlesztettek antitestmérésekre, mint az infekciós szerológia (pl. anti-HIV, HBV, HCV IgG/A/M)) és az autoantitest-meghatározás.

#### Színreakción alapuló (kolorimetrikus) EIA

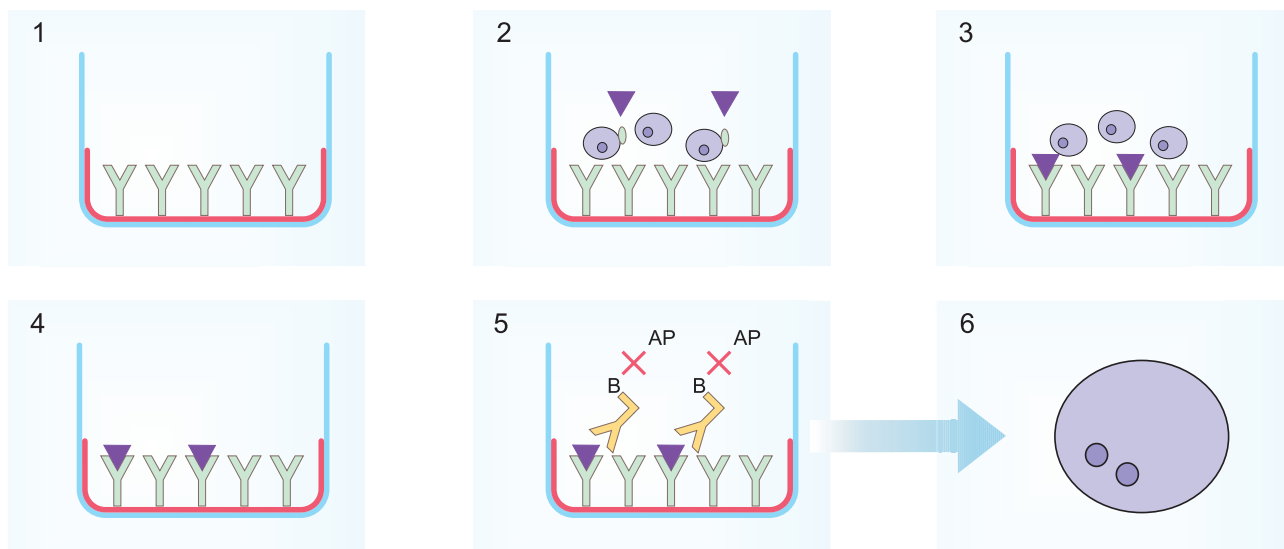
Ebben az assay-formátumban az enzimreakciót kromogén szubsztát hozzáadásával végezzük, amely az enzim katalitikus reakció eredményeként színes termék alakul. A kromogén színreakcióját, azaz op-



6-34. ábra. Indirekt szendvics-ELISA

Lépések:

1. A lemezt a befogó antitesttel érzékenyítik
2. A mintában lévő antigén kötődik a befogó antitesthez
3. A detektáló antitest kötődik az antigén egy másik epitópiájához
4. Enzimmel jelölt másodlagos antitest kötődik a detektáló antitesthez
5. Szubsztát hozzáadása színreakciót eredményez



### 6-35. ábra. ELISPOT

1. Antihumán IFN $\gamma$ -val bevont nitrocellulózfilter a vályú alján
2. IFN $\gamma$ -t termelő stimulált sejtek
3. A szekretált IFN $\gamma$  a befogó antitesthez kötődik
4. A spotokat precipitáló szubsztráttal előhívják
5. AP/HRPO enzimmel konjugált riporter antitesttel detektálják a lekötődött IFN $\gamma$ -t
6. A sejteket és a nem kötődő fehérjéket lemossák

tikai denzitását (OD) spektrofotométerrel detektáljuk (lásd 6-33. ábra; 6-34. ábra). Különböző készülékek állnak rendelkezésre a színreakció mérésére, csövekben vagy mikrotitráló lemezek mélyedéseiben a manuális módozattól a teljes automatizáltságig. Ha az enzimmel jelzett immunreakciót nitrocellulóz- vagy egyéb membránon (ELISPOT, Dot blot, Western blot) végezzük (6-35. ábra), oldhatatlan szubsztrátot használunk (6-4. táblázat). A terhelességi gyorsteszt ezen az elven alapulnak, mert a szilárd hordozóra az enzimreakció eredményeként lerakódó színes termék szemmel is leolvasható.

Elvben a fényabszorbanancia mérése a 0 és 3,0 A közötti tartományban mozoghat, ezért azon analitoknak a meghatározása, amelyek széles dinamikus tartományban vannak jelen, problémás lehet annak ellenére, hogy főlegben alkalmazzuk a konjugátumot és nagy kötőkapacitású hordozót alkalmazunk a szendvics EIA-hoz. ISHIKAWA (1989) kifejlesztett egy ultraszenzitív EIA-t, amely képes 3 fmol specifikus IgG antitest mérésére. Ahhoz, hogy ezt a szenzitivitást elérje, számos bonyolult lépés szükséges, mint pl. az immunkomplex áthelyezése egyik hordozóról a másikra, hogy csökkentse a háttér jelet.

### Fluoreszcens EIA

Az előzőektől abban különbözik, hogy az enzim egy fluoreszcens szubsztrátot bont, amely ennek eredményeként fluorofórrá alakul. A fluorofór megfelelő hullámhosszúságú fénnel való gerjesztéssel karakterisztikus hullámhosszúságú fényt emittál. A mintában előforduló autofluoreszcencia növelheti a háttér jelet és csökkenti az assay szenzitivitását. Ugyanakkor a fotometriás EIA-hoz képest a fluoreszcens assay egy nagyságrenddel nagyobb jelintenzitást generál.

*Microparticle Enzyme Immunoassay* (MEIA). Olyan szendvics immunoassay, amelyben az antigén-antitest komplexet szilárd hordozóhoz, ún. mikropartikulumokhoz kötjük, immobilizáljuk. A MEIA-t automatákon alkalmazzák nagy fehérjemolekulák mérésére, mint cardialis markerek, fertilitás, tumormarkerek, metabolikus fehérjék, hepatitis és pajzsmirigyfehérjék vizsgálatára (6-36., 6-37. ábra).

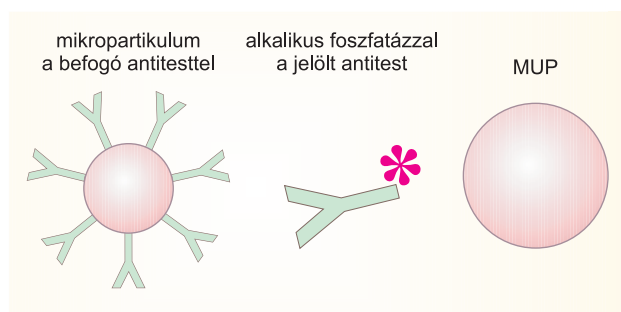
A MEIA komponenseit egy speciális pufferben szuszpendálják:

- Mikropartikulum-antitest szilárd fázis: latex-göngyöök antigénspecifikus antitesttel (befogó antitest) fedve.
- Antitest-enzim konjugátum: alkalikus foszfatáz-Ig konjugátum (jelölő antitest).

## 6-4. táblázat. Az alkalikus foszfatáz és a peroxidáz enzim tulajdonságai

Enzim	Szubsztrátrendszer	Színreakció	Végtermék oldhatósága	Alkalmazás
alkalikus foszfatáz	p-nitrofenil-foszfát (pNPP)		oldható	ELISA
	5-bromo-4-kloro-3-indolil-foszfát/nitro-kék tetrazolium (BICP/NBT)		oldhatatlan	immunoblotting, immunhisztológia
	gyors vörös (Fast Red)/naftanol-AS-TR-foszfát		oldhatatlan	immunoblotting, immunhisztológia
peroxidáz	2,2'-azino-bisz(3-etilbenziazolin-6-szulfonsav) (ABTS)		oldható	ELISA
	o-feniléndiamin (OPD)		oldható	ELISA
	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB)		oldható	ELISA
	o-dianizidin		oldható	ELISA
	5-aminoszalicilsav (SAS)		oldható	ELISA
	3,3'-diaminobenzidin (DAB)		oldhatatlan	immunoblotting, immunhisztológia
	3-amino-9-etilkarbazol (AEC)		oldhatatlan	immunoblotting, immunhisztológia
	4-kloro-1-naftanol (4CIN)		oldhatatlan	immunoblotting, immunhisztológia

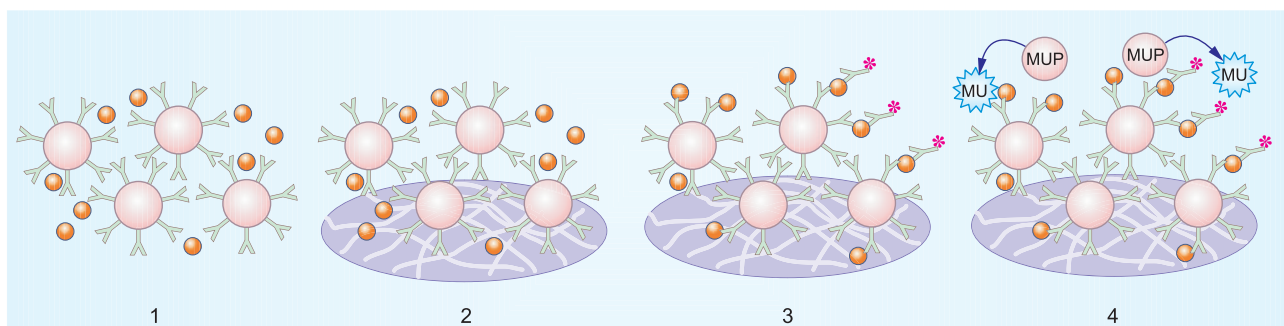
- Enzimszubsztrát: fluoreszcens 4-metil-umbelliferon-foszfát (MUP).



6-36. ábra. Mikropartikulum enzim immunoassay (MEIA); heterogén szendvicsformátum, amelyben az immunkomplexek mikrogöngyökön jönnek létre (MUP: 4-metil-umbelliferon-foszfát)

### Kemilumineszcens EIA

A kemilumineszcens enzimreakció fényt generál, a biolumineszcenciához hasonlóan, és természetes szubsztrátokat használ, mint a luciferin-adenozin-tri-foszfát. Az elmúlt 20 évben számos kemilumineszcens enzimszubsztrátrendszer került kifejlesztésre. A mai nagy érzékenységu rendszerek vagy valamely luminolderivátumot használnak a peroxidázhoz erősítéssel, vagy dioxetánszármazékokat az alkalikus foszfatáz enzimhez. A luminolanalógok enzimatis oxidációja peroxidáz enzim és  $H_2O_2$  jelenlétében régóta alkalmazott módszer a rutin laboratóriumi diagnosztikában. A fenolderivátumok vagy aromás vegyületek alkalmazása mint erősítő tovább javította az assay szenzitivitását. A luminol-peroxidáz p-iodofenol mint erősítő jelenlétében a fénykibocsátás kb. 2800-szorosára növelhető egy optimalizált reak-



6-37. ábra. Mikropartikulum enzim immunoassay (MEIA) (MUP: 4-metil-umbelliferon-foszfát)

Lépések:

1. Antitesttel fedett mikropartikulum + minta keveréke együtt inkubálva
2. A reakciókeveréket üvegszálmátrixra helyezik, majd mossák
3. Alkalikus foszfatázzal jelölt antigénspecifikus antitest hozzáadása, kötődése
4. MUP hozzáadása; a fluoreszcens termék metilumbilliferon (MU) mérése

cióelegyben. Ez az assay alkalmas  $0,04 \mu\text{U/mL}$  TSH meghatározására szérumban. Ugyanakkor az oxidációs reakciókkal számos faktor interferál, ami növeli a nem specifikus háttér zajt.

BRONSTEIN 1989-ben kifejlesztette az alkalikus foszfatáz enzimnek egy kemilumineszcens szubsztrátját, az AMPPD-t (dinátrium 3-(4-metilspiro-[1,2-dioxetán-3,2'-tricyklo-[3.3.1.1]dekan]-4-il) fenilfoszfát), egy adamantil-dioxetán-származékot. Ennél nincs szükség egyéb hozzáadott oxidáló molekulára a kemilumineszcens fény emittálásához. Az AMPPD egy új, komplett szubsztrát, mert az adamantilcsoport stabilizálja a molekulát, a dioxetánkötés szolgál energiaforrással, a foszforilészter az enzimbontás helye, és a fenilcsoport adja a kemilumineszcenciát, mind együtt vannak a molekulában. A foszfoészterkötés enzimatis bontása elindítja a kémiai indukált elektroncserélő lumineszcenciát (CIEEL). 477 nm-es hullámhossz maximummal kemilumineszcencia detektálható néhány perctől néhány óráig tartó időtartamban a szubsztrát koncentrációjától függően. E technika érzékenysége kisebb mint  $10^{-21}$  mol. Ezt a reakciót alkalmazzák teljesen automata műszereken is nagy érzékenysége és gyorsasága miatt.

A kemilumineszcens mágneses immunoassay-hez (CMIA) szilárd fázisként  $0,3 \mu\text{m}$  vasparkikulumokat alkalmazva nő a felszín és csökken a reakcióidő is kb. 30 percre. A kemilumineszcens jel és az analit koncentrációjának összefüggése lineáris, kb. hét nagyságrend dinamikus tartományban. Egy AFP-meghatározó tesztben a CL-EIA érzékenysége kb. 10-szer

nagyobb volt, mint a konvencionális RIA érzékenysége,  $30 \text{ pg/mL}$  30 perces assay időtartammal.

### Homogén EIA

Az enzimjelölés lehetővé teszi a hosszadalmas mérési módszerek egyszerűsítését, a mosási lépések kihagyásával a homogén típusú formátum alkalmazását, mert az enzimaktivitást könnyen lehet változtatni az antigén-antitest reakció környezeti tényezőinek módosításával. A homogén formátum ugyan kevésbé érzékeny, mint a RIA vagy a heterogén formátumok, de a komplex immunkémiai reagensek ellenére gyors, egyszerű és a szokásos készülékekre adaptálható. Minden ilyen technikánál az antigén-antitest kapcsolódása módosítja az enzimaktivitást a szubsztrát jelenlétében, amely arányos az immunreakcióval. A homogén EIA-k is felhasználhatók kompetitív és nem kompetitív technikákra. A kompetitív formában az antigént jelzik vagy az enzimmal, vagy a szubsztráttal, vagy az enzim egy prosztetikus csoportjával. Ezzel ellentétben a nem kompetitív formában az antitest a jelölt molekula.

A következő homogén assay-formátumok a leggyakoribbak:

*Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique (EMIT)*. Ez volt az első kifejlesztett homogén EIA. Ebben az esetben enzimmal jelölt haptént adunk a rendszerhez, mely ha a hapténspecifikus antitesthez kapcsolódik, a kötés gátolja az enzim aktivitását, mert meggátolja az ehhez szükséges konformációváltozást. Szabad

haptén a standardban vagy az ismeretlen mintában vetélkedik a kötőhelyért, és leszorítja a jelölt haptén kötődését, így feloldva az enzimaktivitás gátlását. Így az enzimaktivitás egyenesen arányos a mintában lévő haptén koncentrációjával. Ez alól az elv alól kivétel a tiroxin-EMIT, ahol az antitesthez kötődés nem gátolja, hanem aktiválja az enzimet. Ezekkel a tesztekkel általában kis molekulákat, mint pl. gyógyszereket mérünk mg/L koncentrációtartományban, kivétel a digoxin-assay, amelynek érzékenysége a 0,8–2 µg/L tartományban van.

*Substrat-Labeled Fluorescent Immunoassay (SLFIA).* Antigénhez kapcsolt umbelliferil-β-galaktozidot használ szubsztrátként, amelyet a β-galaktozidáz enzim bont fluoreszcens umbelliferonra. Ha a jelölt antigén a specifikus antitesthez kötődik, a β-galaktozidáz nem fér a szubsztráthoz, és azt nem tudja fluoreszcens terméké alakítani. A mintában lévő szabad antigén (analit) vetélkedik a kötőhelyekért, leszorítja a jelölt antigént, amelyet az enzim bontani tud. Így a mintában lévő antigén koncentrációja arányos a fluoreszcenciaintenzitással. Az SLFIA nem csak gyógyszerek, haptének mérésére alkalmas, hanem fehérjemolekulák detektálására is. A hátránya, hogy nincs lehetőség amplifikációra, ezért érzékenysége  $10^{-9}$ – $10^{-10}$  mol tartományba esik.

*Apoenzim Reaktivációs Immunoassay (ARIS).* A glükóz-oxidáz apoenzim egy prosztetikus csoportjával, a flavin-adenin-dinukleotiddal (FAD) konjugált antigént használ. A mintában lévő antigén vetélkedik a mintához adott konstans mennyiségű, jelölt antigénnel az antitest kötőhelyeiért. Egyensúlyi helyzetben a szabadon maradt jelölt antigén arányos a mintában lévő antigénnel. Az apoenzimet csak a szabadon maradt jelölt antigén tudja aktiválni, így az enzimaktivitás arányos a szabadon maradt jelölt antigénnel. A tesztbe egy erősítési lépést is betettek, növelve az érzékenységet. A módszer kis molekulák mellett alkalmas nagy fehérjék mérésére is (pl. thyroid binding globulin).

*Enzyme Inhibitory Homogeneous Immunoassay (EI-HIA).* Enzimmal konjugált antitestet és oldhatatlan szubsztrátot használ nagy antigének (analit) mérésére. A nagy fehérje kötődése a jelölt antitesthez gátolja a szilárd fázison lévő szubsztrát enzimatis bontását. α-amiláz enzimmal jelölt antitestet használnak

pl. a ferritin vagy az AFP meghatározására. A reakció igen gyorsan, kb. 10 perc alatt éri el platóját, és ferritin esetében 10–800 ng/mL, AFP esetében –5–200 ng/mL érzékenységgel mér.

*Cloned Enzyme Donor Immunoassay (CEDIA).* A rekombináns DNS technológia óta vált lehetségessé, amikor a β-galaktozidáz enzimet mint fehérjét kettévágták egy nagy polipeptidre (ez az enzimakceptor) és egy kisebb polipeptidre (enzimdonor). Az akceptor és donor enzim összekapcsolódása hozza létre az enzimatisan aktív tetramert. Az eljárásban az antigénhez konjugálják az enzimdonort, és az antigénspecifikus antitest akadályozza meg az enzim aktív formába történő spontán összekapcsolódását. A beteg mintájában lévő antigén vetélkedik az antitest kötőhelyeiért az enzimdonorral konjugált antigénnel. Minél több a mintában a szabad antigén, annál jobban leszorítja a jelölt antigént a kötésből, annál több enzim jön létre és okoz színreakciót. Ez a rendszer alkalmas kémiai automatában végzett mérésre is.

### *Fluoreszcens Immunoassay (FIA)*

Ma már a minta háttér-fluoreszcenciáját kiküszöbölő eljárások állnak rendelkezésre új szubsztrátok bevezetésével és új mérőműszerek használatával. Így a FIA ma már elterjedt hormonok, fehérjék, polipeptidek  $10^{-15}$  mol/L koncentrációjú antigén meghatározására.

Fontos a megfelelő fluorokróm kiválasztása (6-5. táblázat). Az ismert fluoreszcein izothiociánát esetében 1 ns az excitáció és emisszió közti időtartam, miközben a ma használatos késleltetett fluoreszcenciájú molekulák (pl. europium) néhány száz ns késéssel fluoreszkálnak. Ezért alkalmasak rövid időtartamú megvilágítás után késleltetett fluoreszcenciára, amikor már a minta komponenseinek autofluoreszcenciája rég lezajlott.

A különböző FIA formátumok hasonlóak az előzőkhöz, lehetnek heterogének vagy homogének, ligand- vagy antitestjelöltek, kompetitívek vagy nem kompetitívek és szilárd fázisúak vagy nem.

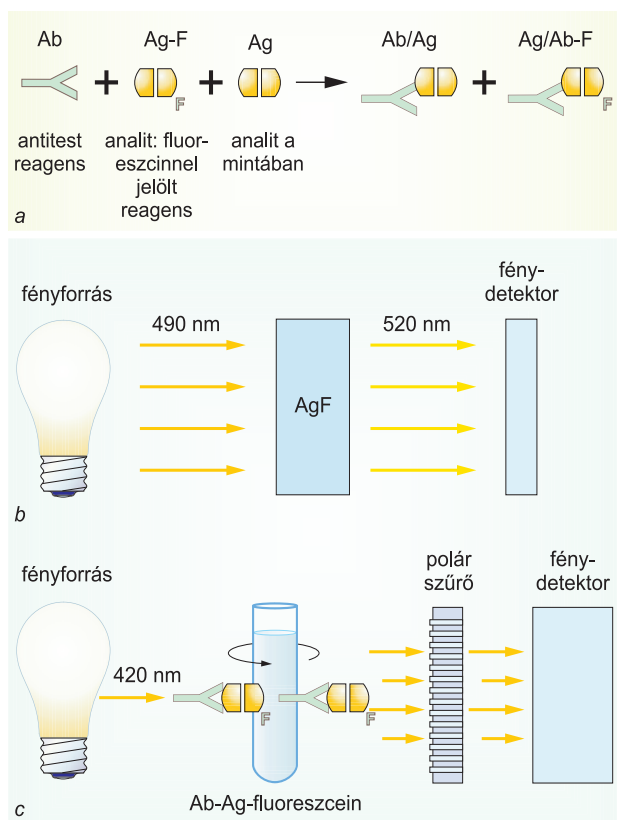
### *Heterogén FIA*

Egy mosási lépést közbeiktatva elkülönítjük a kötött és szabad fluoreszcensen jelzett molekulákat. Ezzel eltávolítjuk a mintában lévő fluoreszcens tulajdonságú zavaró komponenseket (autofluoreszcencia) is.



## 6-5. táblázat. Néhány fontosabb fluoreszcens jelölőmolekula

Fluoreszcens festék	Fluoreszcens emissziós szín	Emissziós maximum (Em-Max; nm)
BD Horizon™ V450	kék	448
Pacific Blue™	kék	452
Alexa Fluor® 448	zöld	519
FITC	zöld	519
PE	sárga	578
PE-Texas Red®	narancsszín	615
Texas Red®	narancsszín	615
APC	vörös	660
Alexa Fluor® 647	vörös	668
PE-Cy™5	vörös	667
PerCP	vörös	678
PerCP-Cy™5.5	távoli vörös	695
Alexa Fluor® 700	távoli vörös	719
PE-Cy™7	infravörös	785
APC-Cy7	infravörös	785
BD APC-H7	infravörös	785



**Fluoroimmunometrikus módszer.** Az analit folyadék-fázisban reagál a fölöslegben hozzáadott jelölt antitesttel. A fölöslegben maradt jelölt antitestet eltávolítjuk egy szilárd fázishoz kötött antigénhez kacsolással. A szolid fázisú mátrixot mossuk, és mérjük a fluoreszcencia intenzitását, amely fordított arányban áll az analit koncentrációjával. Ezt a módszert használják mikroorganizmusok elleni antitest koncentrációjának mérésére, autoantitestdetektálásra és szérumfehérjék, hormonok meghatározására is.

**Radiális megosztású immunofluorometrikus assay.** Radiális kromatográfiát alkalmaznak, és a reakció üvegszál filterpapíron megy végbe.

**6-38. ábra.** Fluoreszcens polarizációs immunoassay (FPIA)  
a) Az assay folyamata  
b) A fluoreszcens konjugátum fluoreszcenciája  
c) A nagy antigén jelölt antitestkomplex lassabban mozog, nem forog, a polarizált fényt előre felé átengedi

*Késleltetett fluoreszcenciájú immunoassay (DELFA).* Az eljárás során speciális készüléket és fluoreszcens molekulát használnak az eljárás érzékenységének növelésére. A 100 ns-os vagy hosszabb idejű késleltetett fluoreszcenciájú jelzőmolekula és az impulzus üzemmódban való gerjesztés alkalmazásával elkerülhető a zavaró háttér-fluoreszcencia, amely rendszerint 10 ns alatt lezajlik.

### Homogén FIA

Nem igényel mosási lépést, viszont kevésbé érzékeny, standard készülékkel mérve kb.  $10^{-10}$  M az érzékenysége.

*Fluoreszcens Polarizációs Assay.* A fluoreszcens detektálás különleges változata a fluoreszcenciapolarizációs immunoassay (6-38. ábra). Ez a mérési módszer a fluoreszcencia jelenség egy sajátos vonásán alapszik. Ha a fluoreszcenciát egy oldatban (amelyben – az egyszerűség kedvéért tegyük fel, hogy – csak a vizsgálandó anyag képes fluoreszcenciára) síkban polarizált fénynyalábbal idézzük elő, akkor a fluoreszcens fény (amit, mint tudjuk, a gerjesztett mintamolekulák bocsátanak ki) lehet továbbra is síkban polarizált, de el is veszítheti polarizált jellegét. Ez attól függ, hogy milyen gyorsan forognak a molekulák. Ha a gerjesztés és a fénykibocsátás között eltelt időben (amely általában a ns dimenzióba esik) a molekulák térhelyzete változatlan, akkor a kibocsátott fény polarizációs síkja megegyezik az elnyelt fényével. Ellenkező esetben a molekula elfordulásának megfelelő más irányban lesz polarizált a kibocsátott fény. Mivel az egyes molekulák egymástól függetlenül forognak, ekkor a kibocsátott fény összességében már nem polarizált.

A molekulák forgási sebessége nagyban függ a méretüktől. A néhány száz dalton molekulatömegű fluoreszcensen jelzett mintamolekulák olyan gyorsan forognak, hogy a fluoreszcens fény polarizációja eltűnik, vagy nagyon lecsökken. Ha viszont egy ilyen molekula egy nagy fehérjéhez, pl. ellenanyaghoz kötődik, akkor az így létrejött komplex forgási sebessége (amely nagyjából azonos magának a fehérjének a forgási sebességével) olyan kicsi, hogy a fluoreszcens fény polarizált marad. Ha tehát a kis molekulájú fluoreszcensen jelzett antigén és a nagy molekulájú ellenanyag oldatát elegyítjük, és ezután mérjük a poláros fény által kiváltott fluoreszcencia polarizációs fokát, akkor azt tapasztaljuk, hogy a reakció időbeni előre-

haladásával a polarizációs fok egyre nő. Ezzel a módszerrel tehát követhető a reakció kinetikája is, majd az egyensúly beállása után a keletkezett komplex mennyiségére is következtetni lehet. Adott mennyiségű ellenanyagot és kompetíciót alkalmazva az egyensúlyi polarizációs fok és a fluoreszkáló anyag koncentrációja közti kalibrációs összefüggés kimérhető.

Ennél a módszernél nincs szükség elválasztásra, ez tehát homogén eljárás. Számos egyéb homogén mérési technika ismeretes. Ezek nagy része szintén kompetitív eljárás, ahol a mérendő antigénnel a jelzett antigén versenyez az antitestek kötőhelyeiért, és a jelzett antigén szabad, ill. kötött formájának nem egyforma a jelintenzitása. Így pl. lehet, hogy a kötött formában a jelzett molekulák gyengébben fluoreszkálnak, mint a szabad formában. Mivel ilyenkor a szabad és a kötött forma egyaránt ad jelet (csak eltérő intenzitással), ezért az ilyen módszerek csak viszonylag nagy koncentráció ( $10^{-5}$ – $10^{-6}$  mol/l) mérésére alkalmasak.

*Fluoreszcens Protection Immunoassay.* A fluoreszcens jelölt antigén reagál a specifikus antitesttel. A kapcsolódás térbelileg megakadályozza egy második, a fluoreszcenre specifikus antitest odakötődését a fluoroforra. Ez az antitest, ha a fluorofórhoz kötődik, kioltja (quencher) annak a fluoreszcenciáját. A mintában lévő antigén lezorítja a jelölt antigént a kötődésből, több olyan szabad jelölt molekula marad, amelynek fluoreszcenciáját a második antitest meggátolja.

### Chemiluminescent Immunoassay (CLIA)

Jelölésre kemilumineszcenciát gerjesztő molekulát használunk: luminolderivátumokat, akridíniumésztereket, nitrofenil-oxalát-derivátumokat, valamint ruténium-tri-bipridil-tripropilamint (TPA) az elektrokemilumineszcenciában.

A heterogén assay formátumok lényegében nem különböznek a RIA és a FIA formátumaitól. Mivel a kemilumineszcens anyag elektrokémiaiilag bocsát ki fényt elektródok felszínén, így alkalmazható homogén assay formátumban is.

*Akridíniumészter jelölésű CLIA* esetén az használjuk ki, hogy az aktivált, kemilumineszcens molekulák igen gyorsan, az oxidációs reakció megindulása után 5–10 s múlva nagyenergiájú villanófényt emittálnak. A villanófény típusú (flash-type) fluoreszcencia miatt ennek a detektálása növeli a módszer érzékenységét.

## 6-6. táblázat. A MEIA és a CMIA összehasonlítása

Módszer	Szilárd fázis	Szeparációs lépés	Jelölés	Érzékelő módszer
MEIA	latex mikrorészecske	üvegszál mátrix	alkalikus foszfatáz enzim	fluoreszcenciadetektor
CMIA	mágneses mikrorészecske	mágnes	kemilumineszcens vegyület	kemilumineszcenciás fotosokszorozó cső

*Elektrokemilumineszcens Immunoassay* (ECLIA). A jelölő anyag elektrokémiai generál fényt, egy oxidoredukciós reakcióban.

Az assay-protokoll a következő: antitesttel fedett mágneses mikropartikulumok szilárd fázisként a mintából megkötik az antigént, amelyet egy második, jelölt antitesttel hozunk komplexbe (6-39. ábra, 6-6. táblázat). A szabad konjugátumot mosással távolítjuk el, majd a szilárd fázisú szuszpenzió kemilumineszcenciáját mérjük elektród segítségével. Az assay érzékenysége 0,2–0,4 ng/mL CEA és 0,4 ng/mL AFP esetében. Előnye, hogy nem igényel bonyolult műszert, és gyors a szignálmérés.

## AZ IMMUNOASSAY-T BEFOLYÁSOLÓ FAKTOROK

## Pontosság, precizitás

Ez a két elvárható követelmény egy laboratóriumi méréstől. A *pontosság* azt jelenti, hogy az assay képes azt az eredményt adni a laboratóriumi analitikusnak és a klinikusnak, amely a mintában lévő analit valódi mennyisége. Vagyis a laboratórium képes mintában lévő anyag valós koncentrációját kimutatni. A *precizitás* pedig azt jelenti, hogy az adott reagensekkel és mérőműszerrel, standard körülmények között az eredmény reprodukálható.

Egy immunoassay, amely pontosan és precízen képes eredményt adni anélkül, hogy hamis pozitív ered-

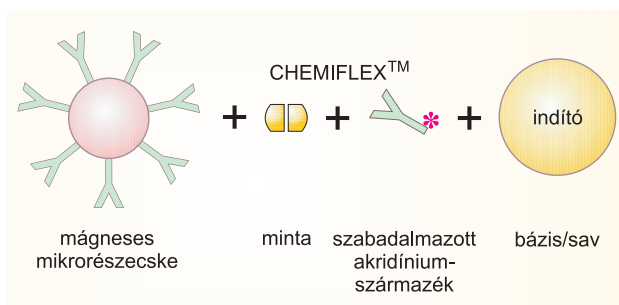
ményt mérne, klinikai szempontból specifikusnak mondható (6-40. ábra).

Egy immunoassay klinikai szenzitivitása azt jelenti, hogy pontosan és reprodukálhatóan méri a legkisebb mennyiségeket is, vagyis nem ad hamis negatív eredményt.

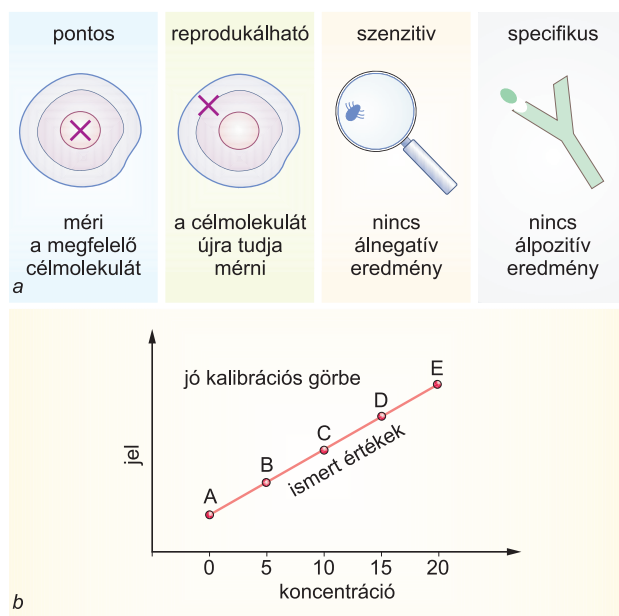
## Kalibrátorok és kontrollrok

Megfelelő alkalmazásuk meghatározza az említett faktorokat.

A *kalibrátorok* olyan ismert mennyiségű mérendő molekulát tartalmazó oldatok, amelyek meghatározzák a jelerősség és az analit koncentrációjának viszonyát. Kalibrációs sort alkalmazva kalibrációs (dózis–hatás) görbe írható le a készülék szoftverének segítségével, amelyben a jel korrelál a standard koncentrációjával. Az ismeretlen beteg mintájának jelintenzitását megmérve a kalibrációs görbe segítségével meghatározható a mintában lévő analit koncentrá-



6-39. ábra. Kemilumineszcens mágneses immunoassay (CMIA)



6-40. ábra. Az immunoassay követelményei

a) Követelmények

b) Megfelelő kalibrációs görbe

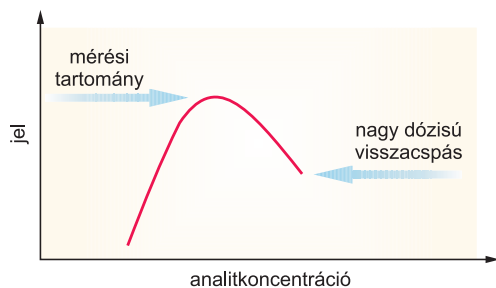
ciója. Fontos, hogy a kalibrátorokat a gyártó utasításai szerint kezeljük, ellenkező esetben pontatlan a mérés, a beteg mintájának hamis mérését eredményezi. Ha a kalibrátorok használatra kész formában állnak rendelkezésre, megfelelő az oldószerük (szérum), kisebb a tévedési lehetőség.

A *kontrollok* (pozitív, negatív) ismert koncentrációjú analitot tartalmazó minták, amelyeket a mérés pontosságának és reprodukálhatóságának ellenőrzésére használunk. Amennyiben a gyártó által megadott tartományban vissza tudjuk mérni azokat, ez azt jelenti, hogy a beteg mintáját is jól mértük meg. A kontrollok le- vagy fölfelé történő hamis mérése jelzi a reagensek, a kalibrátorok vagy az analízis hibáját.

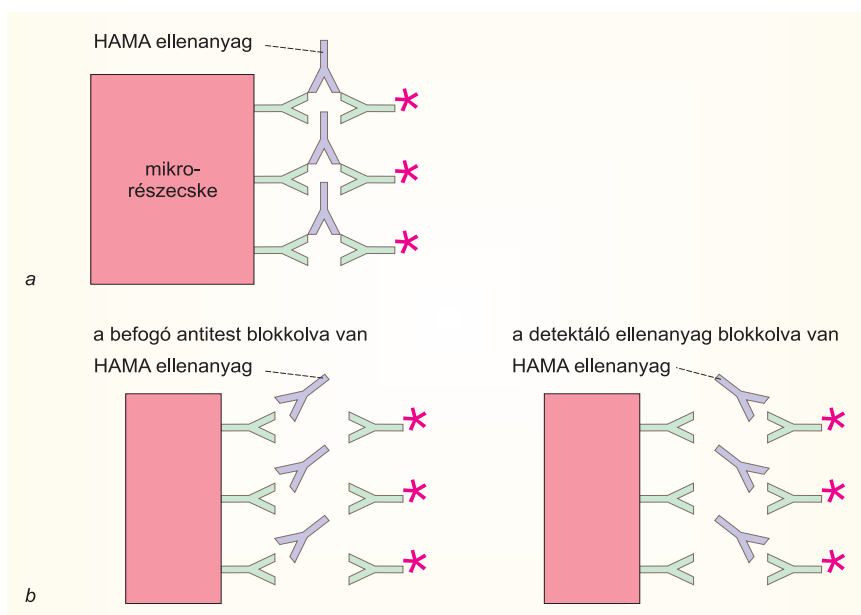
#### A mérésre ható tényezők (assay-interferencia)

Azt jelenti, hogy valamely külső tényező zavarja a mérés pontosságát, legtöbbször az antigén-antitest összekapcsolódását. Az egylépéses módszereknél az interferencia általában megváltoztatja a mérés specifitását és szenzitivitását is. A kétlépéses módszerek pontosságát általában kevésbé zavarják külső tényezők (mint nem specifikus kötőfehérjék, interferáló anyagok, általános mátrixeffektus), mert a mosással ezeket eltávolítjuk.

*Nagy dózis-visszacsapási („hook”) effektus.* Nagy antigénfelesleg (prozóna-fenomén) nagy dózis-visszacsapási effektust okozhat, ami egylépéses szendvics-assay esetében fordulhat elő (6-41. ábra). Ekkor a nagy antigénkoncentráció telíti mind a befogó, mind



6-41. ábra. Szendvics-assay. A mintában lévő extrém nagy antigénkoncentráció visszacsapási effektusa



6-42. ábra. Az antiéger antitest (HAMA) zavaró hatásai

- A HAMA okozhat álpozitív eredményt
- HAMA okozta álnegatív eredmény

a jelölő antitest összes antigénkötő helyét, meggátolva a szendvics kialakulását. Ilyen körülmények között a mért antigénmennyiség sokkal kisebb lesz, mint a minta valós antigénkoncentrációja. Ez a dózis-hatás görbén jól látható, ahol emelkedő antigén koncentráció egy adott ponton csökkenő jelintenzitást ad. Ezt a jelenséget prozóna effektusnak is hívják.

*Humán Anti-Mouse Antitestek (HAMA).* A mintában előforduló egérantigének ellen kialakult antitestek okozzák ezt a fajta interferenciát (6-42. ábra). Ennek különféle okai lehetnek, mint pl. egér monoklonális antitest terápia, egerekkel dolgozó személyek szintén immunizálódhatnak egérantigénekkel.

A beteg mintájában lévő HAMA okozhat hamis pozitív és hamis negatív reakciót egyaránt olyan tesztben, ahol egér monoklonális antitestet használnak mint reagenst.

- Hamis pozitív* eredmény HAMA miatt: ebben az esetben a hamis pozitivitás oka, hogy az anti-egér antitest szendvicsként összeköti a szolid fázison lévő befogó antitestet a jelölt antitesttel, vagyis úgy tűnik, mintha a mintában lévő antigén kapcsolta volna össze a komplexet.
- HAMA okozta *hamis negatív* eredmény: két mechanizmussal jöhet létre: gátlás révén vagy a

szolid fázison lévő befogó antitestet blokkolja a HAMA, vagy a jelölő antitestet.

*Carryover (átszennyezés).* Azt jelenti, hogy egy extrém nagy analitkoncentrációjú mintából minimális mintamennyiség átkerül egy mellette lévő csőbe (kontamináció), amelyik ezért alacsony pozitív eredményt ad. A legtöbb készülék az extrém magas minta melletti alacsony pozitív mintát jelzi, és azt újramérik.

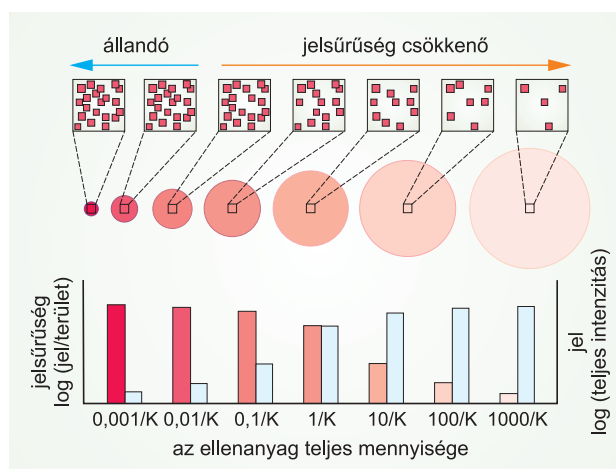
#### AZ IMMUNOASSAY-K FEJLESZTÉSI IRÁNYAI

##### Multiplex immunoassay-k: fehérje-biochip, micro-bead-array

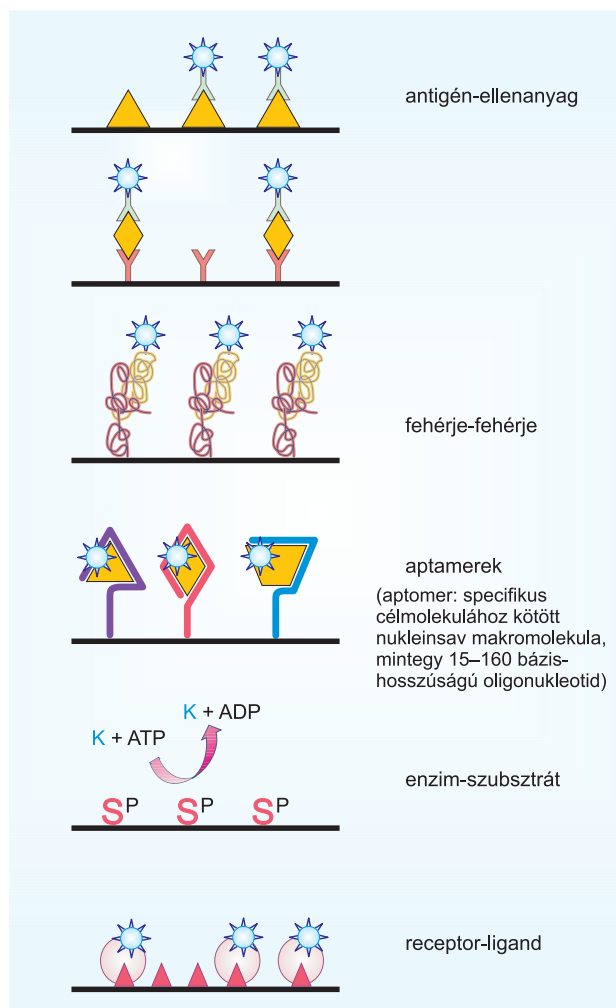
A legújabb technológiai fejlesztések olyan irányba haladnak, hogy a minta egyszeri felhasználásával, egy méréssel 5–100 különböző analitmolekula koncentrációját tudjuk detektálni. Ezek az ún. *multiplex mérési módszerek* két nagy kategóriába sorolhatók az alkalmazott szilárd hordozó alapján. Az egyik esetben a microchip-technológiára adaptálták az immunoassay-t, a másikban egymástól méret vagy fluoreszcencia alapján jól elkülöníthető mikropartikulumokra. Mikrochipet alkalmazva a mérendő fehérjék mennyisége szinte határtalan, a mikrogöngyök viszonz a rendelkezésre álló bead-fajták korlátozzák az egyszerre mérhető paraméterek számát. Ezek a miniatürizált technikák kis mennyiségű reagenst és mintát igényelnek, ezért környezetkímélők, olcsók és energiakímélők.

##### MicroSpot Assay

A microchip hordozó felszínén kis, elkülönített területekre viszik fel a különböző reagenst az ún. micro-dot technológiával. Így 100–200 különböző reakcióhelyet tudnak létrehozni („nyomtatni”) egy 3 mm átmérőjű poliszitirénlemez felszínén (Ekins, 1998). Minden egyes reakcióhely egy 80 µm átmérőjű terület, amelyre kevesebb mint 1 nL mennyiségű reagenst „nyomtatnak” egy automatával (6-43. ábra). Ez a módszer az EKINS által leírt „ambiens assay teória”-n alapul, amelyben az assay érzékenysége és mérési határa a befogó antitest telítettségének mértékétől és nem a szilárd fázis felszínének méretétől függ (6-44. ábra). Ebben az eljárásban a microspot felszínén befogott analit mennyisége olyan kicsi, hogy ez nem befolyásolja az analit koncentrációját a mintában még kis koncentrációban jelen lévő célmolekula



6-44. ábra. A multiplex „ambiens assay” teória elve: a jel és a jelsűrűség aránya a mikrospoton. Növekvő méretű spoton a befogó molekulák, ha ugyanolyan sűrűségben vannak nyomtatva, nő a teljes jel. Ha viszont csökken a befogó molekulák száma, és eléri a  $< 0,1/K$  értéket, a jeldenzitás nő



6-43. ábra. A protein-mikroarray lehetséges befogó molekulái



esetében sem és akkor sem, ha a kötés nagy affinitású. Ez akkor igaz, ha  $< 0,1/K$  befogó molekulát immobilizálnak, ahol  $K$  az immunreakció affinitáskonstanta. Ilyen körülmények között a mintából kifogott célmolekula mennyisége közvetlenül tükrözi annak koncentrációját. Érdekes, hogy a koncentrációmérés ilyen környezeti („ambiens”) analit körülmények között független a minta volumenétől, és a kis mennyiségű mintafelhasználás ellenére nagyon szenzitív. Ennek két oka van: egyrészt a kötés a legmagasabb célmolekula-koncentráción zajlik, másrészt a befogó antitestmolekula–antigén- (analit) komplex nagyon kis felületen található, nagy jelet okozva ott.

A Roche Diagnostics cég avidinnal fedett szolid fázist használ, amelyre biotinnal jelölt befogó antitestet vagy antigént nyomtatnak. Különböző paraméterek (mint anti-HIV, anti-HBsAg, anti-hepatitis-C és rubeolaantitestek) detektálhatók egy mintából egy méréssel a microchip felszínén. Az assay-formátum egy háromlépéses fluoreszcens immunoassay, ahol a fluoreszcens jelet egy lézer szkennel detektálja.

#### Áramlási citometriás immunoassay – multiplex microbead-assay

A Luminex cég (Austin, TX) kifejlesztett egy áramlási citometriás mérési elven alapuló, multiparametrikus fluoreszcens immunoassay-t. Ebben a rendszerben két különböző fluorofór különböző koncentrációival feltöltött latexpartikulumok (latexbead) szolgálnak szolid fázisként. Ezek a partikulumok az áramlási citométeren mind külön bead-populációként jelennek meg. A több mint 60 különböző tulajdonságú partikulum mindegyike külön célmolekula mérésére szolgál, egy mintából. Egy adott microbead-ból kb. 1000 darab képezi a reakciófelszínt, amelyhez vagy a befogó antitestet, vagy antigént kapcsolnak. Az analit kötődését a mikrogöngyhöz egy másik színű fluoreszcens molekulával jelölt antitesttel tesszük láthatóvá.

A mérés kivitelezése a következő. A mintát összekeverjük a befogó antitestet tartalmazó microbeaddal és a fikoeritrinnel (PE) jelölt második antitesttel. A keveréket 10–30 perc inkubáció után mérjük egy áramlási citométeren, amely több paraméteres fluoreszcens detektálásra alkalmas. A készülék egyetlen méréssel minden göngyecsoporból 1000–1000 partikulomot lemérve elkülöníti azokat fluoreszcens jelzésük és intenzitásuk alapján, és külön jelként de-

tektálja az adott bead-csoportnak a jelölő fluoreszcenciaintenzitását is. Ez a jel egyenesen arányos a befogott analit mennyiségével.

Ezt az elvet alkalmazzák pl. 15féle citokin egyidejű méréseire, egy mintából (Carson, 1999), de autoantitestek vagy mikrobák elleni antitestek mérésére is alkalmas. A szimultán mérés kevésbé érzékeny, mint az individuális citokinszendvics-ELISA-k, de így is elég érzékeny, pl. 100 pg/ml IL-2-re, 10 pg/ml IL-4-re, 100 pg/ml GM-CSF-re és 200 pg/ml interferon- $\alpha$ -ra.

A multiplex technikai eljárások területén nagy fejlődés mutatkozik, de néhány megoldandó probléma még mindig maradt, így nem vonultak be a rutin diagnosztikába. Az egyik probléma, hogy a miniatürizálás nem valósul meg az assay-ben minden ponton. Így kis folyadék- és mintamennyiség kezelése nincs megoldva, ezért azok gyakran elpárolognak és zavarják a reakciót. Néhány esetben a szenzitivitást és a specificitást is vizsgálni kell. Ugyanakkor a miniatürizálás mint végső cél fontos a laboratóriumi diagnosztikában, mert költséghatékonyabb, gyorsabb, klinikailag hasznos, és nem utolsósorban kevésbé terheli a beteget.

#### IRODALOM

- CARSON, R. T., VIGNALI, D. A.: Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *J. Immunol. Methods* 227(1-2):41–52, 1999.
- CZIRJÁK LÁSZLÓ: Klinikai Immunológia 1. kiadás. 775–857. old. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2006.
- DEBRECZENI LÓRÁND, KOVÁCS L. GÁBOR: Gyakorlati laboratóriumi medicina. 2. kiadás. Literatura Medica, 2008.
- DOORBAR, J., WINTER, G.: Isolation of a peptide antagonist to the thrombin receptor using phage display. *J. Mol. Biol.* 244(4):361–369, 1994.
- EKINS, R. P.: Multi-analyte immunoassay. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 7:155–168, 1989.
- ENGVAL, E., PERLMANN, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8(9):871–874, 1971.
- ERDEI ANNA: Immunológiai Módszerek. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2006.
- FINCKH, P. et al.: Microspot – an ultrasensitive microarray-based ligand assay system. A practical application of ambient analyte assay theory. *Proc. UK NEQAS Meeting* 3:155–165, 1998.
- GERGELY JÁNOS, ERDEI ANNA: Immunbiológia. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2004.

- HOZUMI, N., TONEGAWA, S.: Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *J. Immunol.* 173(7):4260–4264, 1976.
- HUNTER, W. M., GREENWOOD, F. C.: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 5(194):495–496, 1962.
- ISHIKAWA, E., HASHIDA, S., TANAKA, K. et al.: Development and applications of ultrasensitive enzyme immunoassays for antigens and antibodies. *Clin. Chim. Acta* 15;185(3):223–230, 1989.
- JOOS, T. O. et al.: A microarray enzymelinked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics. *Electrophoresis* 21:2641–2650, 2000.
- KOMISSARENKO, S. V., AVRAMEAS, S.: Properties of immunoadsorbents prepared by antigen coupling to glutaraldehydeactivated polyacrylamide gel, BrCN-activated Sepharose and by copolymerization of antigens by glutaraldehyde. *Ukr. Biokhim. Zh.* 50(4):500–511, 1978.
- KÖHLER, G., MILSTEIN, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. *Biotechnology* 24:524–526, 1992.
- MCPHERSON, PINCUS: *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 21<sup>st</sup> ed. W. B. Saunders Company, 2006.
- NAKANE, P. K., PIERCE, G. B. JR.: Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.* 14(12):929–931, 1966.
- RUBENSTEIN, K. E., SCHNEIDER, S., ULLMAN, E. F.: „Homogeneous“ enzyme immunoassay. A new immunochemical technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26;47(4):846–851, 1972.
- SKERRA, A., PLÜCKTHUN, A.: Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240(4855):1038–1041, 1988.
- SCHWABER, J., COHEN, E. P.: Human × mouse somatic cell hybrid clone secreting immunoglobulins of both parental types. *Nature* 244(5416):444–447, 1973.
- TEMPLIN, M. F., STOLL, D., SCHRENK, MONIKA et al.: Protein microarray technology *TRENDS in Biotechnology*. 20(4), 2002.
- THORPE, R., BIRD, C. R., SPITZ, M.: Immunoblotting with monoclonal antibodies: loss of immunoreactivity with human immunoglobulins arises from polypeptide chain separation. *J. Immunol. Methods* 73(2):259–265, 1984.
- [http://en.wikipedia.org/wiki/Monoclonal\\_antibodies](http://en.wikipedia.org/wiki/Monoclonal_antibodies)
- <http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/ELISA.html>
- <http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/pregtest.html>