ВЗАЄМОДІЯ АНТИГЕН-АНТИТІЛО. МЕТОДИ ЇЇ ВИЗНАЧЕННЯ.

Будова активного центру антитіл

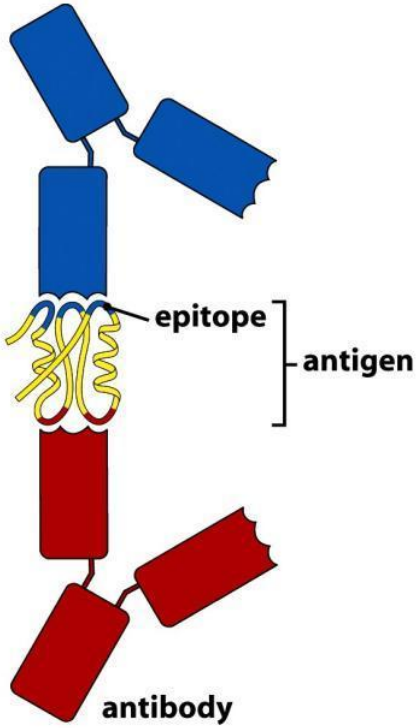


Figure 1-15 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

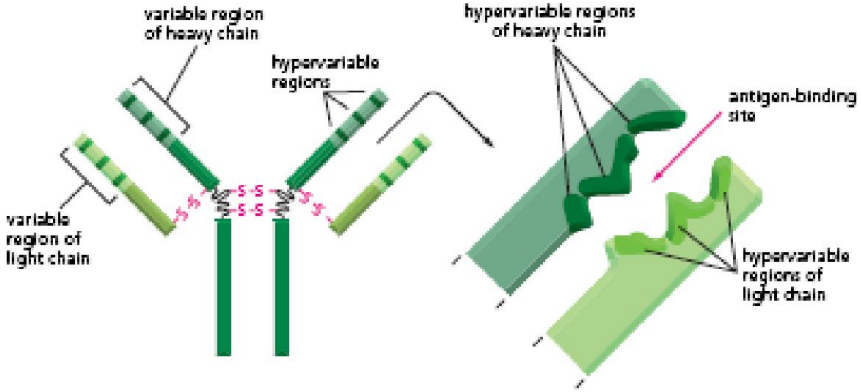


Figure 25–31 Antibody hypervariable regions. Highly schematized drawing of how the three hypervariable regions in each light and heavy chain together form the antigen-binding site of an antibody molecule.

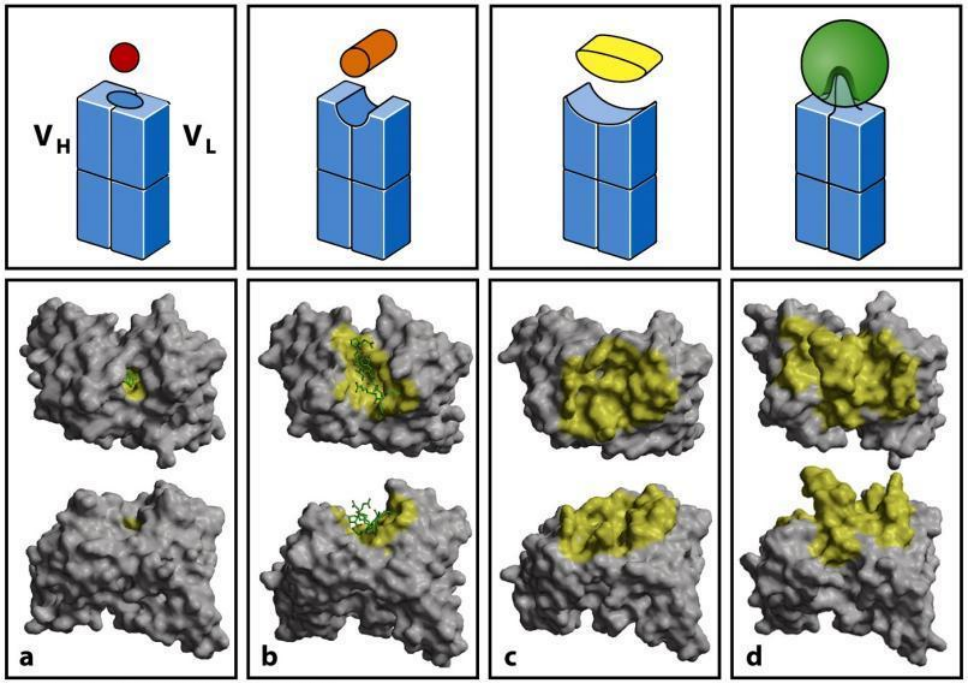


Figure 3-8 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Силы межмолекулярного притяжения

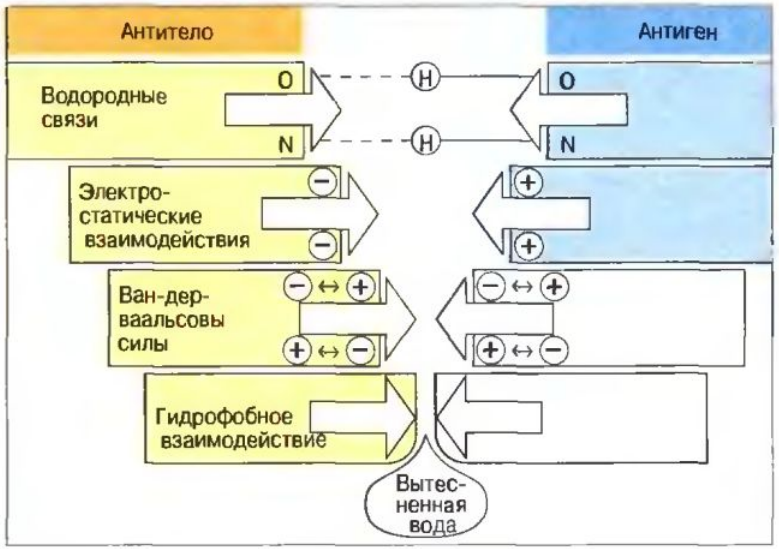


Рис. 9.2
Для возникновения сил связывания (между антителом и антигеном) требуется тесное сближение взаимодействующих атомных групп. Водородные связи образуются за счет водородных мостиков между такими группами. Электростатическое взаимодействие возникает вследствие притяжения противоположно заряженных атомных групп, расположенных на боковых цепях связывающихся белков. Ван-дер-ваальсовы связи обусловлены взаимодействием между электронными оболочками молекул (в данном случае между индуцированными колебательными диполями). Гидрофобное взаимодействие, способное обеспечивать до 1/2 общей энергии связи между антигеном и антителом, – это сильное притяжение в воде между неполярными (гидрофобными) группами, которое почти полностью устраняет их контакт с водой. В зависимости от типа связи различаются величины оптимального для связывания расстояния между взаимодействующими группами.

Нековалентні зв’язки між антитілом та антигеном

Noncovalent forces	Origin	
Electrostatic forces	Attraction between opposite charges	$-\overset{\oplus}{N}H_3 \quad \overset{\ominus}{O}OC-$
Hydrogen bonds	Hydrogen shared between electronegative atoms (N,O)	$\delta^- \quad \delta^+ \quad \delta^-$
Van der Waals forces	Fluctuations in electron clouds around molecules oppositely polarize neighboring atoms	$\delta^+ \quad \delta^- \quad \delta^- \quad \delta^+$
Hydrophobic forces	Hydrophobic groups interact unfavorably with water and tend to pack together to exclude water molecules. The attraction also involves van der Waals forces	$\delta^+ \quad \delta^- \quad \delta^- \quad \delta^+$

Figure 3-9 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

АФІННІСТЬ АНТИТІЛ

Афінністю або спорідненістю антитіл до антигену називають результуючу силу їх взаємодій, яка є сумою сил притягання та відштовхування, що діють між активним центром АТ і епітопом АГ. Афінність відображає здатність антитіл формувати стабільні імунні комплекси.

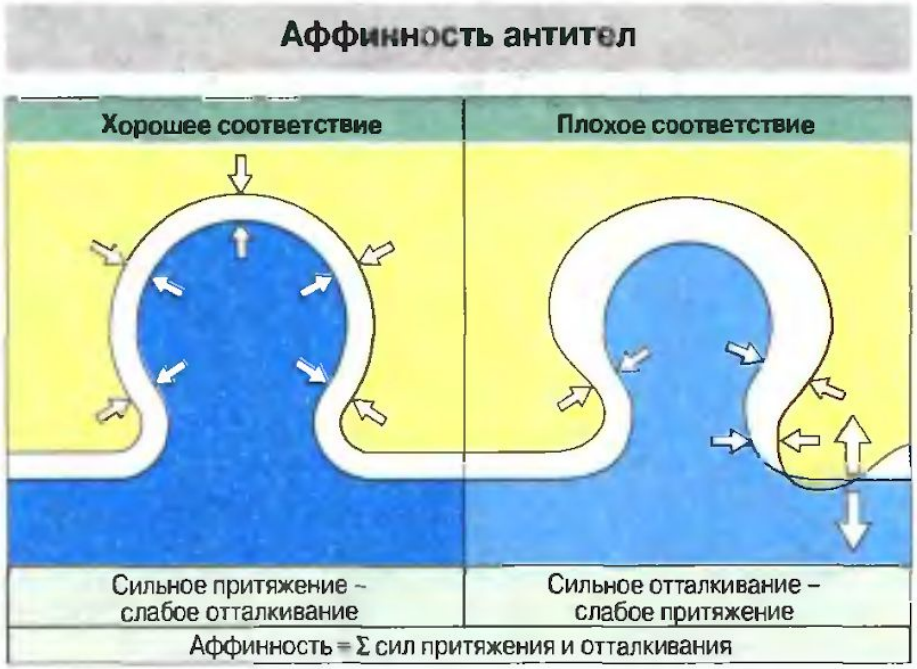


Рис. 9.5
Аффинность антитела к антигену – это результирующая возникающих между ними сил притяжения и отталкивания. Высокоаффинные антитела точно комплементарны по конформации антигену, а низкоаффинные, напротив, неточно.

$$\underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}}$$

(1) **хімічна реакція першого порядку [*АГ*] + [*АТ*] [*АГАТ*]**

АГ – вільний антиген;

АТ – вільне антитіло;

АГАТ – комплекс антиген-антитіло;

***к*$_1$ - константа швидкості асоціації;**

***к*$_2$ - константа швидкості дисоціації комплексу антиген-антитіло (АГАТ)**

$$V_1 = k_1 \cdot [АГ] \cdot [АТ]$$

$$V_2 = k_2 \cdot [АГАТ]$$

За умов рівноваги, коли $V_1 = V_2$, можна записати:

$$k_1 \cdot [АГ][АТ] = k_2 \cdot [АГАТ]$$

$$k_a = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[АГАТ]}{[АГ] \times [АТ]} \quad (2)$$

Константа афінності, **$М^{-1}$ або л/моль**

Розрахунок афінності антитіл

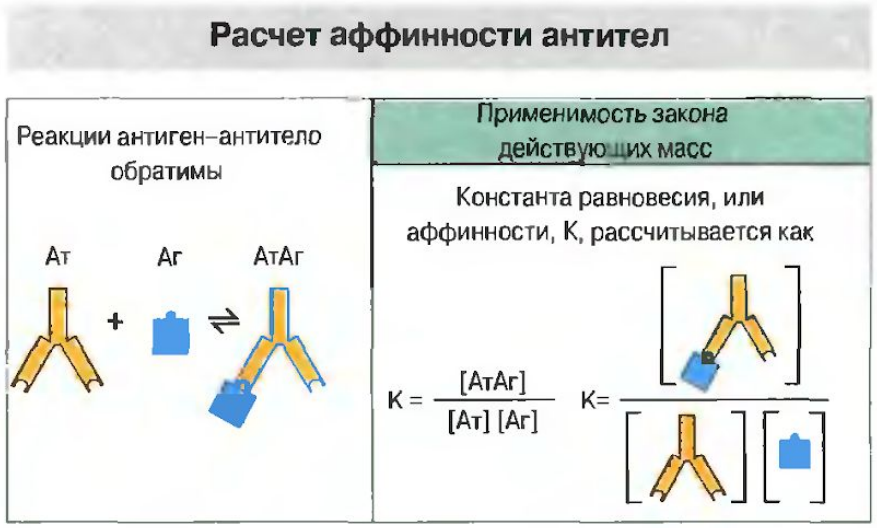


Рис. 9.6
Все реакции антиген–антитело обратимы. Поэтому они описываются законом действующих масс, что позволяет рассчитать аффинность антител как константу равновесия, K. (Квадратные скобки означают концентрацию реагентов.)

$\mathbf{K_d = 1/K_a}$ **-** константа дисоціації;

$\mathbf{K_a > 10^5 M^{-1}}$ **-** специфічне зв′язування;

$\mathbf{K_a > 10^8 M^{-1}}$ **-**високоспецифічне зв′язування;

$\mathbf{K_a < 10^5 M^{-1}}$**-** низькоспецифічне (антитіла проти вуглеводів)

K_a- термодинамічний параметр:

$\Delta F = - R T \ln K_a$, де R- газова постійна;T- абсолютна температура (Кельвін); ΔF - зміна вільної енергії взаємодії АГ-АТ.

$$\underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}}$$

(1) хімічна реакція першого порядку **[*АГ*] + [*АТ*]** **[*АГАТ*]**

АГ – вільний антиген;

АТ – вільне антитіло;

АГАТ – комплекс антиген-антитіло;

***к*$_1$ - константа швидкості асоціації;**

***к*$_2$ - константа швидкості дисоціації комплексу антиген-антитіло (АГАТ)**

$$V_1 = k_1 \cdot [АГ] \cdot [АТ]$$

$$V_2 = k_2 \cdot [АГАТ]$$

За умов рівноваги, коли $V_1 = V_2$, можна записати:

$$k_1 \cdot [АГ][АТ] = k_2 \cdot [АГАТ]$$

$$k_a = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[АГАТ]}{[АГ] \times [АТ]}$$ **(2)** **Константа афінності**, **М$^{-1}$ або л/моль**

Кінетичні розрахунки

Згідно з **(1)** та **(2)** і системою рівнянь матеріального балансу

$$\begin{cases} [АТ]_з = [АТ] + [АГ \cdot АТ] \\ [АГ]_з = [АГ] + [АГ \cdot АТ] \end{cases} \quad \textbf{(3)},$$

де $[АТ]_з$ і $[АГ]_з$- загальна концентрація АТ і АГ,
[АГ·АТ] - концентрація зв'язаних АТ чи АГ,
[АТ] і [АГ]- концентрація вільних АТ чи АГ,
одержуємо **(4)**

$$\mathbf{[АГ \cdot АТ] = к_а [АТ]_з [АГ] / 1 + к_а [АГ]}$$

За умови - $[АГ]_з >> [АТ]_з$, отримуємо **(5)**

$$\mathbf{[АГ \cdot АТ] = к_а [АТ]_з \cdot [АГ]_з / 1 + к_а [АГ]_з}$$

- аналог рівняння Міхаеліса-Ментен;
при високих концентраціях $[АГ]_з$ $[АГ \cdot АТ] = [АТ]_з$ – концентрація комплексу спрямована до загальної концентрації антитіл (графік).

При розрахунку **Ка** визначають таку концентрацію антигену $[АГ]'_з$, при якій половина антитіл знаходиться у вигляді комплексу з антигеном $[АГ \cdot АТ] = [АТ]_з /2$. Враховуючи (3) і (4), отримуємо (6):

$$\mathbf{[АГ]_з' = 1/ к_а + [АТ]_з/2}$$

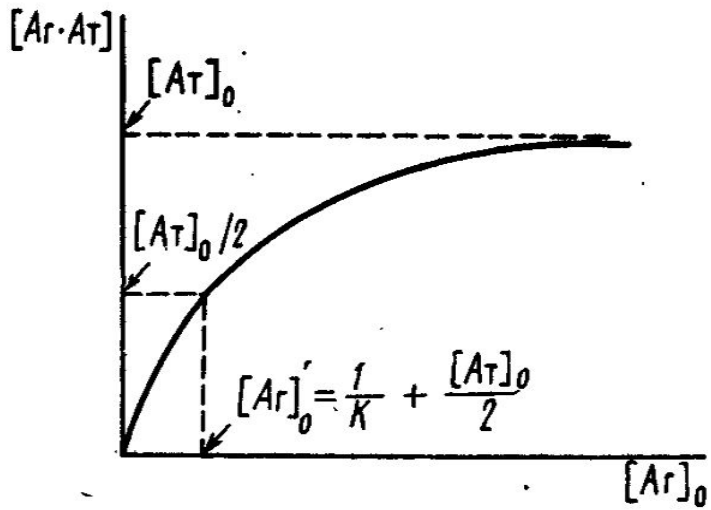


Рис. 9. Зависимость концентрации образующегося комплекса [Аг·Ат] от общей концентрации антигена в растворе $[Аг]_0$

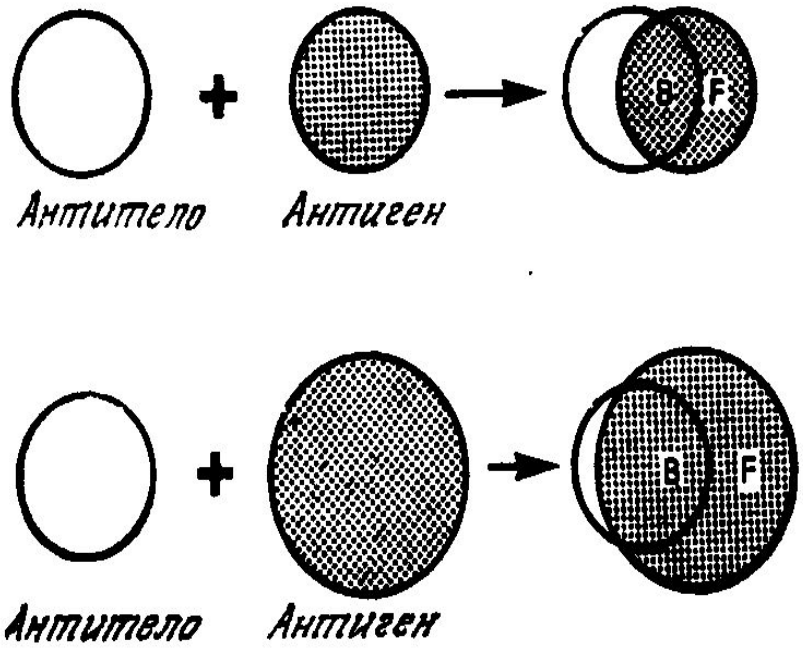


Рис. 1.1. Основной принцип метода связывания, рассмотренный на примере радиоиммунологического анализа. Допустим, что антиген и антитело в определенных количествах (*вверху*) взаимодействуют друг с другом, образуя комплекс антиген — антитело; в состоянии равновесия в системе будет содержаться комплекс антиген — антитело (перекрывающаяся зона B) и некоторое количество свободного антитела и свободного антигена (зона F). Допустим теперь, что количество антитела остается прежним, а количество антигена увеличивается (*внизу*). Тогда в состоянии равновесия количество комплекса антиген — антитело (зона B) тоже увеличится, но количество свободного антигена (зона F) увеличится в еще большей степени, и отношение связанного антигена к свободному таким образом уменьшится.

Рівняння Скетчарда:

B - концентрація зв'язаного антигену;

F - концентрація вільного антигену**;**

n - кількість центрів зв'язування антитіл

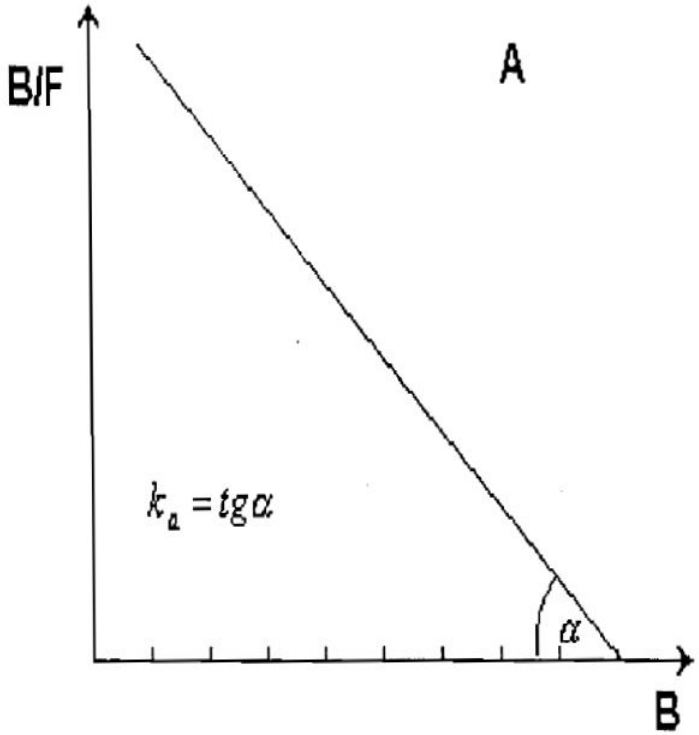
$[АГ \cdot АТ] / [АГ] = к_а [АТ]_з - к_а [АГ \cdot АТ] =$

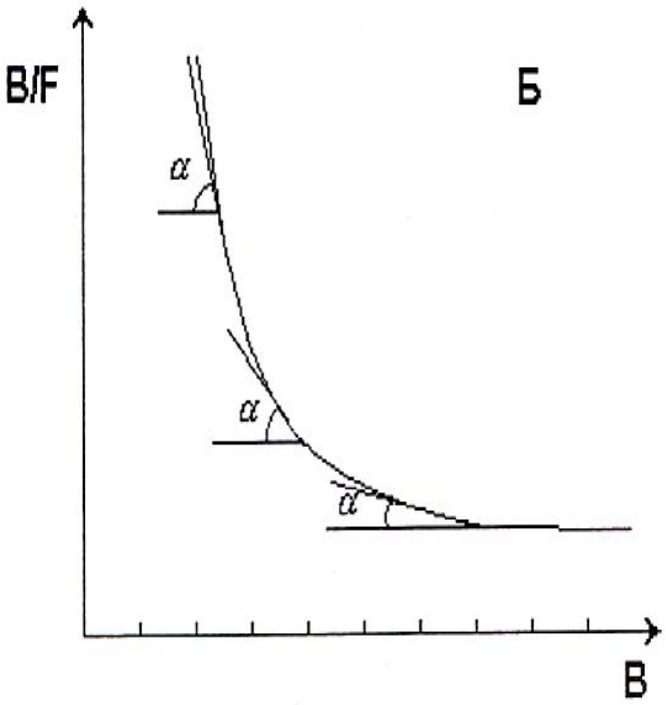
$= к_а([АТ]_з - [АГ \cdot АТ])$ - згідно з рівняннями 1, 2, 5

$$\frac{B}{F} = k_a \left(n - B \right)$$

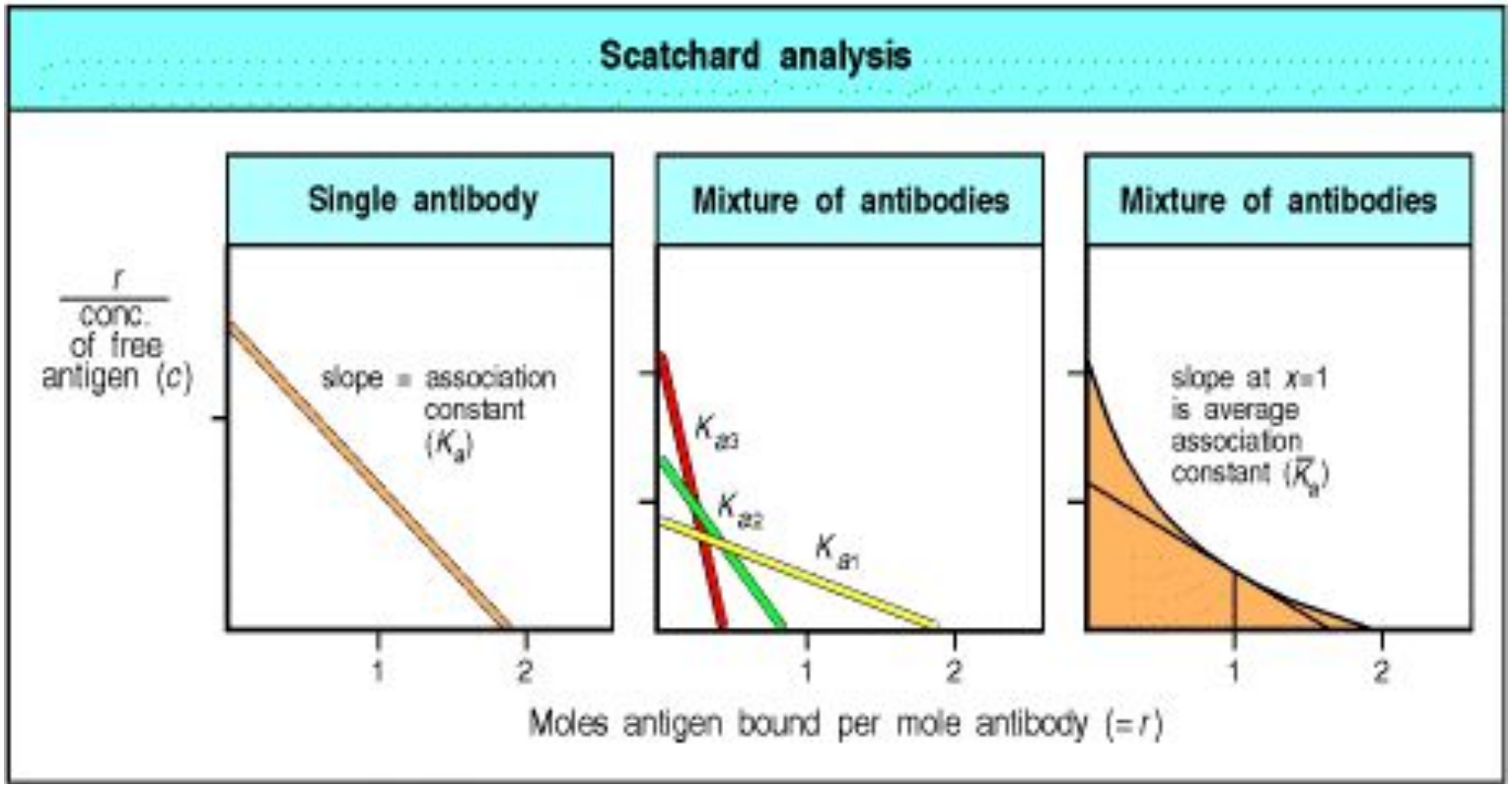
Графік Скетчарда для моноклональних (А) і поліклональних (Б) антитіл

$$\frac{B}{F} = k_a(n - B)$$





Графік Скетчарда для моноклональних і поліклональних антитіл



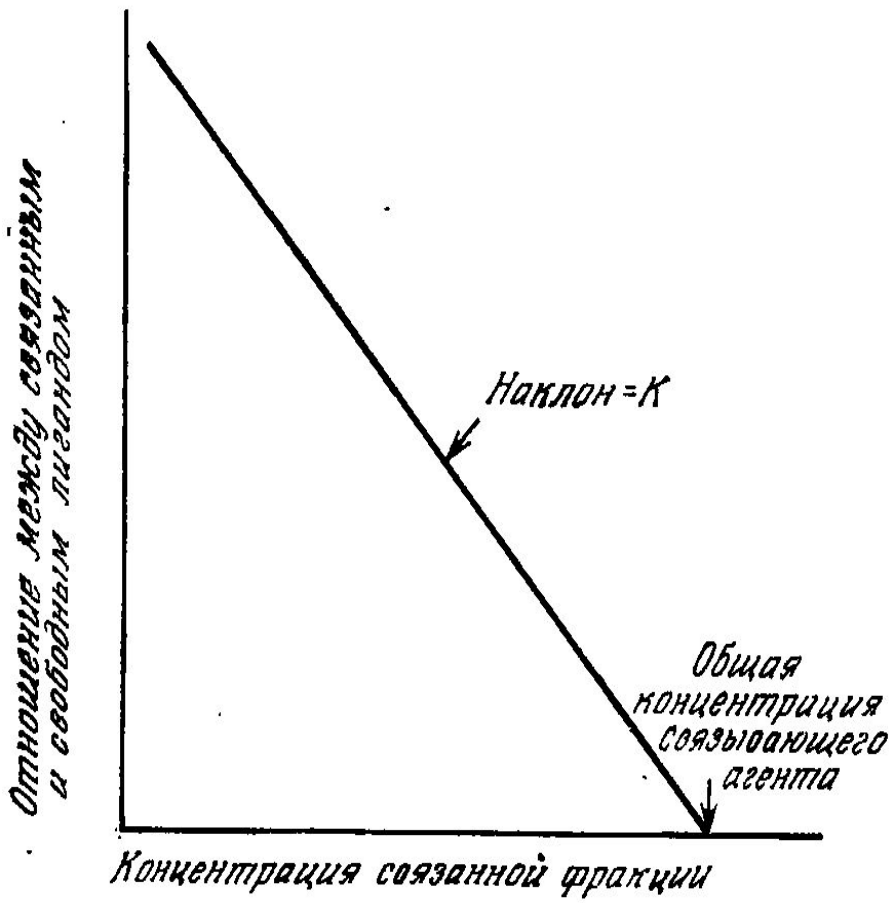


Рис. 1 16. Применение графика Скэтчарда для определения величины *K*. Для системы, характеризующейся одной константой равновесия (*K*), получают прямую линию, наклон которой численно равен величине *K*, а точка пересечения с осью абсцисс отсекает от нее отрезок, равный общей концентрации связывающего агента.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ АНТИГЕН-АНТИТІЛО. ІМУНОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ.

Методи імунохімічного аналізу

- Прямі (безпосередні) методи визначення реакції антиген-антитіло. Комплекси, що при цьому утворюються, ідентифікують візуально або за допомогою простих оптичних приладів. До таких методів належать преципітація в розчині, гелі, аглютинація бактерій, аглютинація еритроцитів вірусами, антитілами (пряма гемаглютинація).
- Реакції пасивної аглютинації (тобто аглютинації частинок, з поверхнею яких зв’язані АТ чи АГ). Це - методи пасивної (непрямої) гемаглютинації, латексаглютинації, коаглютинації.
- Індикаторні методи, засновані на використанні різних міток (ізотопних, флуоресцентних, парамагнітних, ферментних), для виявлення реакції антиген-антитіло. Це - імуноферментний, імунофлуоресцентний, радіоімунологічний аналіз, імунохроматографічний аналіз і т.д.
- Метод імуносенсорів та метод генного зондування (Fish method).

Чутливість різних імунохімічних методів досліджень

TABLE 6-3 Sensitivity of various immunoassays

Assay	Sensitivity* (μg antibody/ml)
Precipitation reaction in fluids	20–200
Precipitation reactions in gels	
Mancini radial immunodiffusion	10–50
Ouchterlony double immunodiffusion	20–200
Immunoelectrophoresis	20–200
Rocket electrophoresis	2
Agglutination reactions	
Direct	0.3
Passive agglutination	0.006–0.06
Agglutination inhibition	0.006–0.06
Radioimmunoassay	0.0006–0.006
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	<0.0001–0.01
ELISA using chemiluminescence	<0.0001–0.01†
Immunofluorescence	1.0
Flow cytometry	0.06–0.006

*The sensitivity depends upon the affinity of the antibody as well as the epitope density and distribution.

†Note that the sensitivity of chemiluminescence-based ELISA assays can be made to match that of RIA.

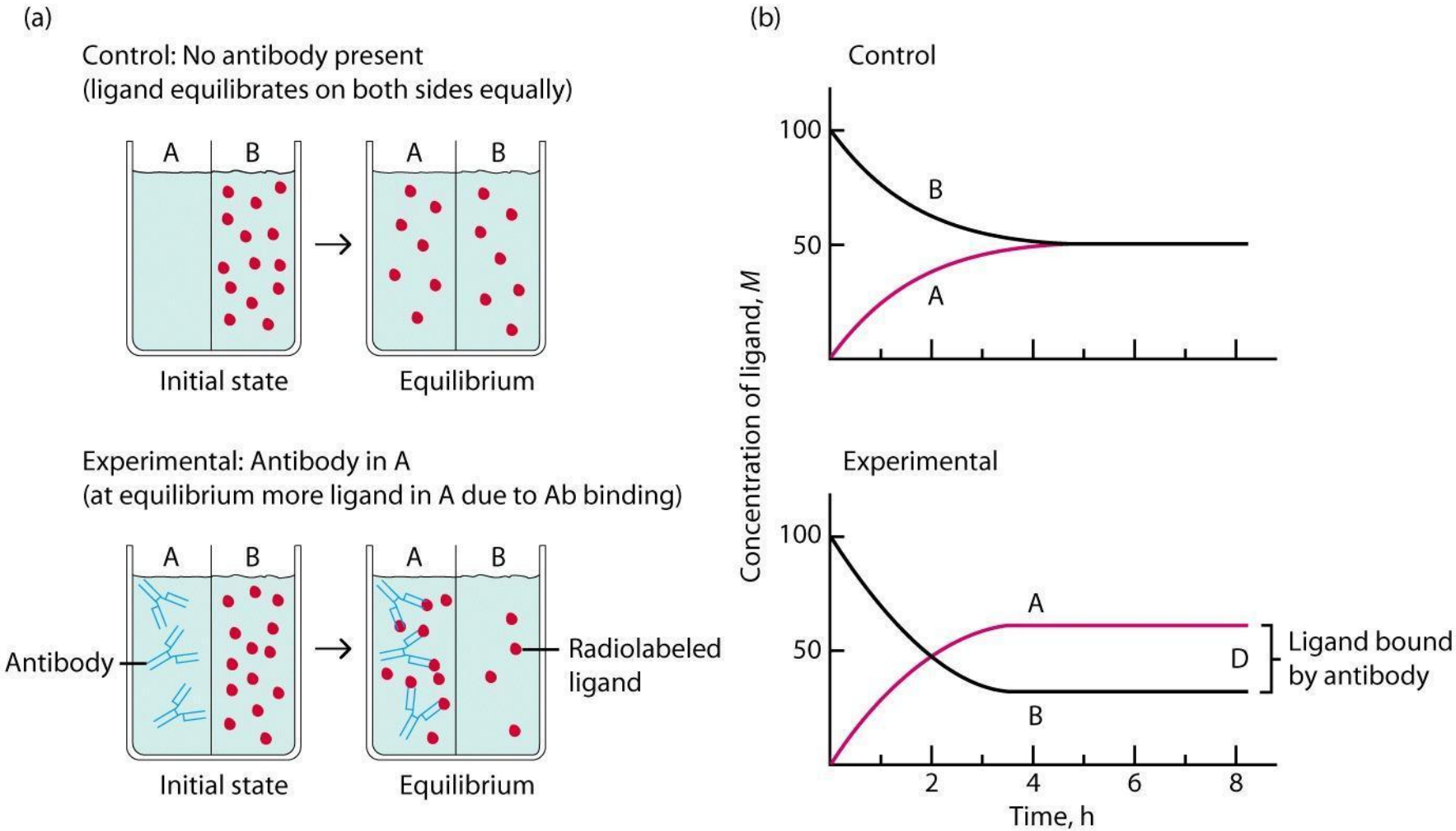
SOURCE: Adapted from N. R. Rose et al., eds., 1997, *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 5th ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Експериментальні підходи, які використовуються в імунохімічних методах

- Методичні підходи, що засновані на зміні фізико-хімічних властивостей антигенів (антитіл) під час утворення комплексу: зміна флуоресценції, зміна ступеня поляризації флуоресценції і т.д.
- Розділення вільного і зв'язаного антигену, яке відбувається з залученням методів фракційного осадження (центрифугування), рівноважного діалізу, гель-фільтрації.

Рівноважний діаліз. Визначення афінності антитіл методом рівноважного діалізу

$$\kappa_a = B / F \cdot (n - B)$$



Рівноважний діаліз

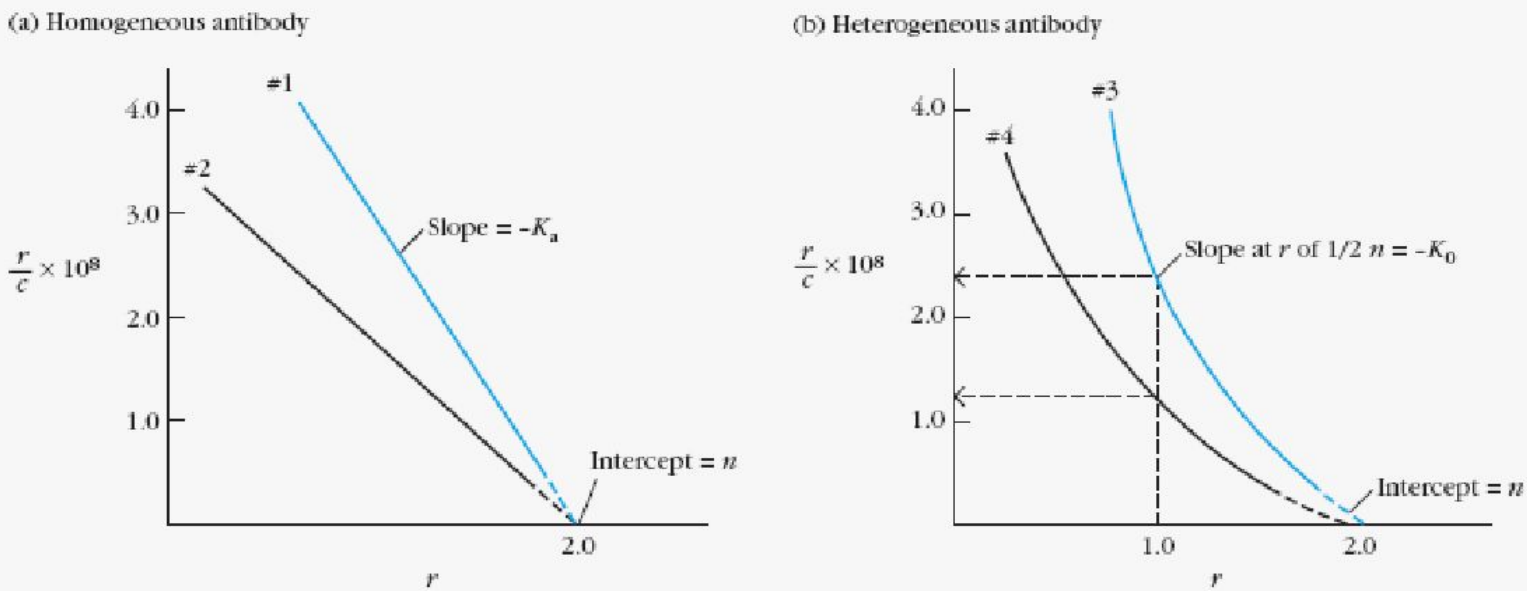
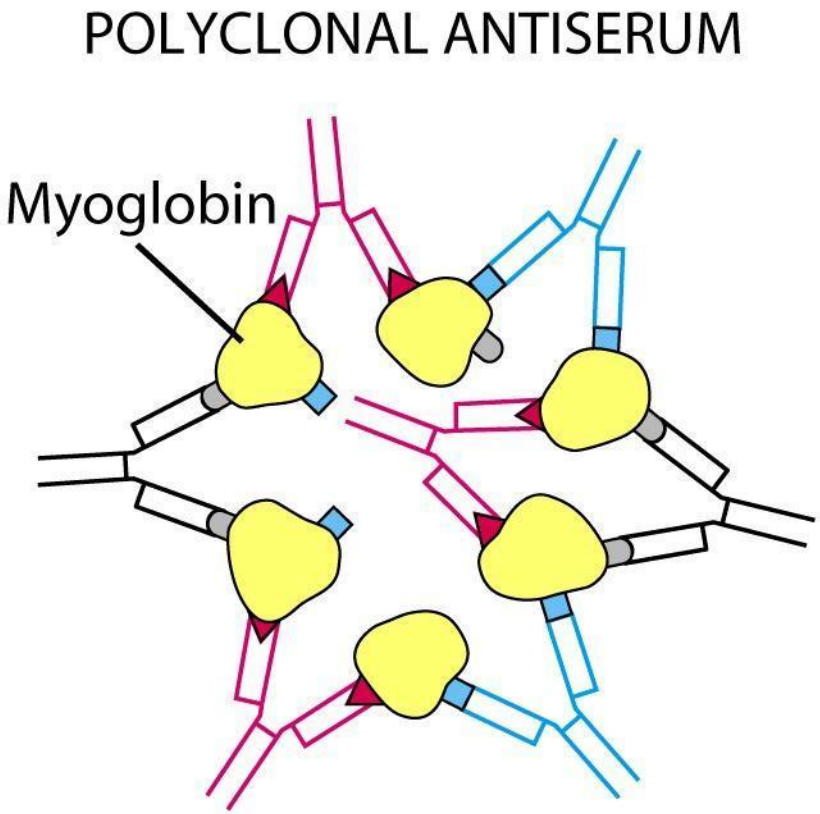
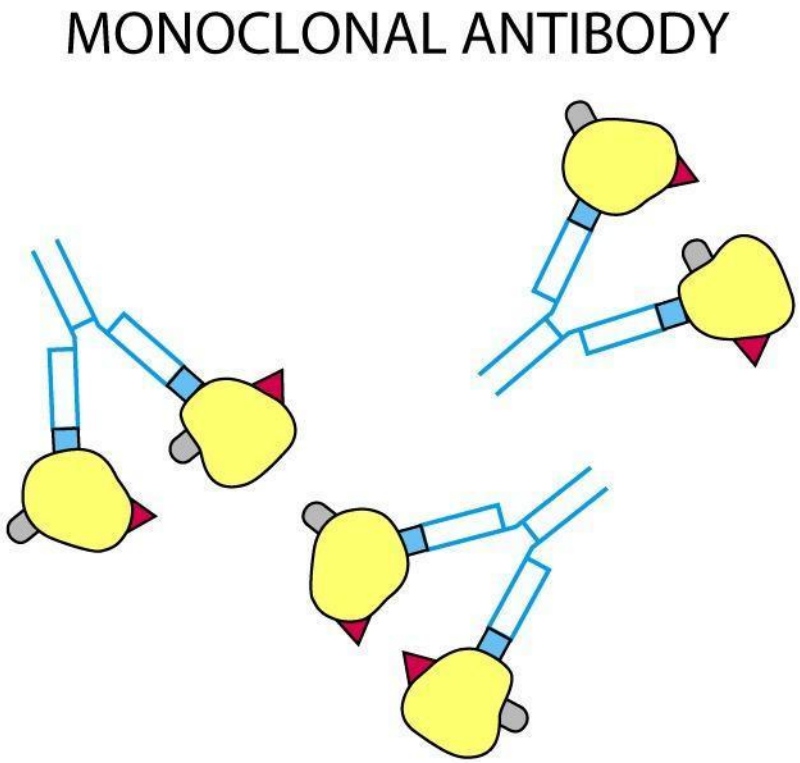


FIGURE 6-3 Scatchard plots are based on repeated equilibrium dialyses with a constant concentration of antibody and varying concentration of ligand. In these plots, r equals moles of bound ligand/mole antibody and c is the concentration of free ligand. From a Scatchard plot, both the equilibrium constant (K_a) and the number of binding sites per antibody molecule (n), or its valency, can be obtained. (a) If all antibodies have the same affinity, then a Scatchard plot yields a straight line with a slope of $-K_a$. The x intercept is n, the valency of the antibody, which is 2 for IgG and other divalent Igs. For IgM, which is pentameric, $n = 10$, and for dimeric IgA, $n = 4$. In this graph, antibody #1 has a higher affinity than antibody #2. (b) If the antibody preparation is polyclonal and has a range of affinities, a Scatchard plot yields a curved line whose slope is constantly changing. The average affinity constant K_0 can be calculated by determining the value of K_a when half of the binding sites are occupied (i.e., when $r = 1$ in this example). In this graph, antiserum #3 has a higher affinity ($K_0 = 2.4 \times 10^8$) than antiserum #4 ($K_0 = 1.25 \times 10^8$). Note that the curves shown in (a) and (b) are for divalent antibodies such as IgG.

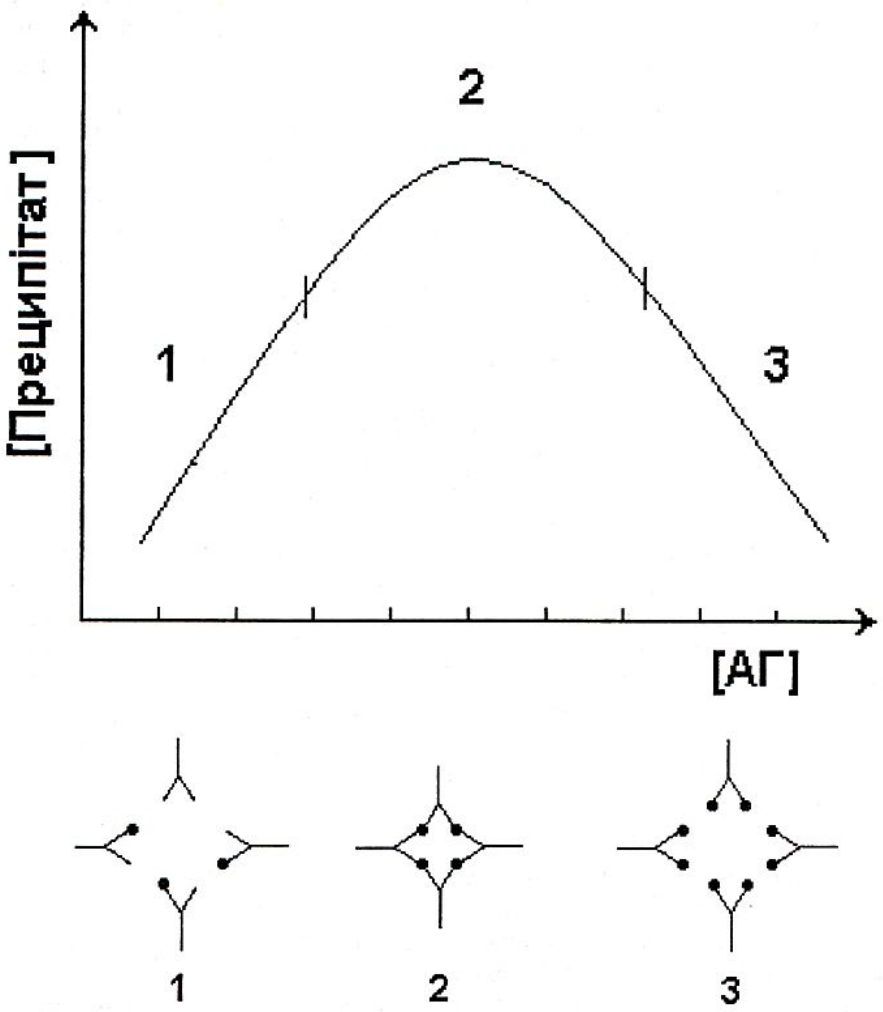
РЕАКЦІЇ ПРЕЦИПІТАЦІЇ

Характеристика антигенів і антитіл , що утворюють комплекси в реакціях преципітації і аглютинації

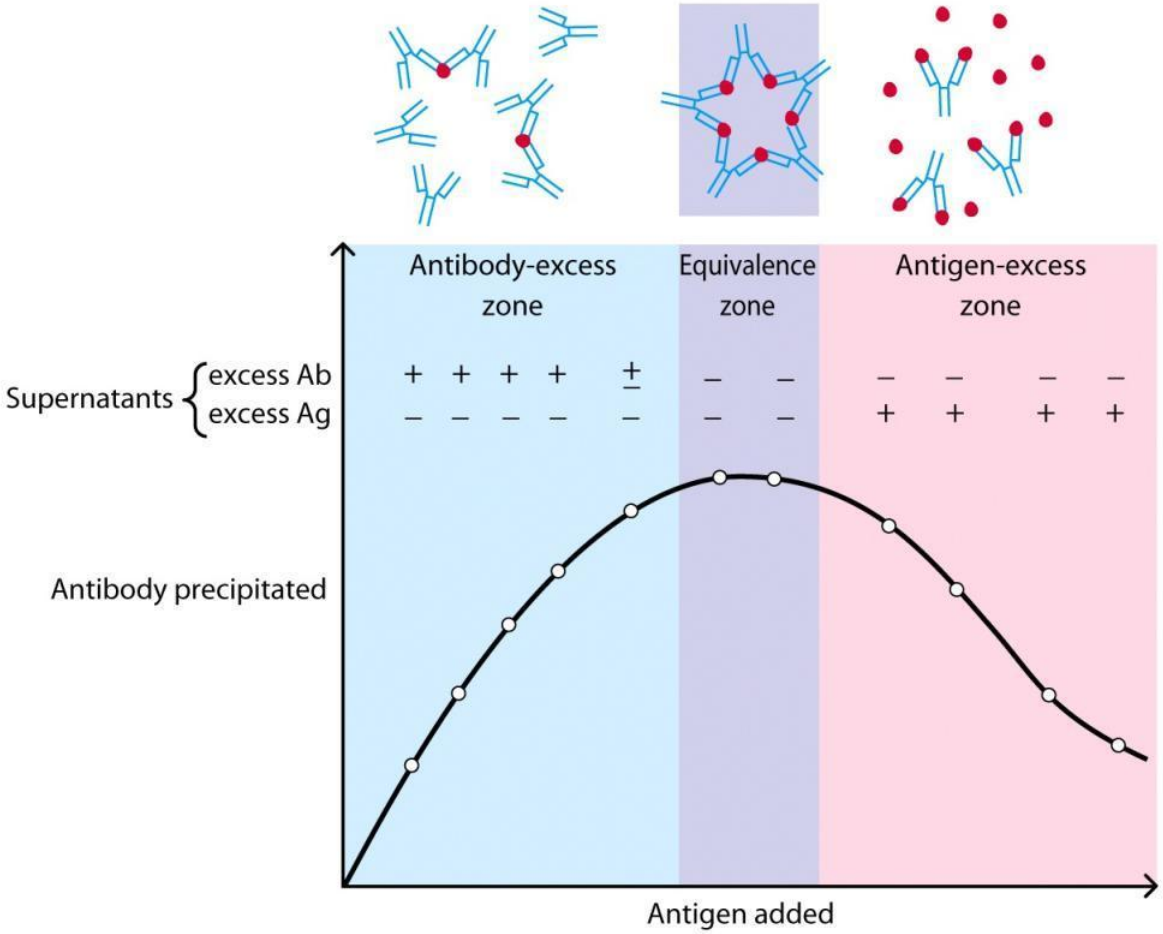




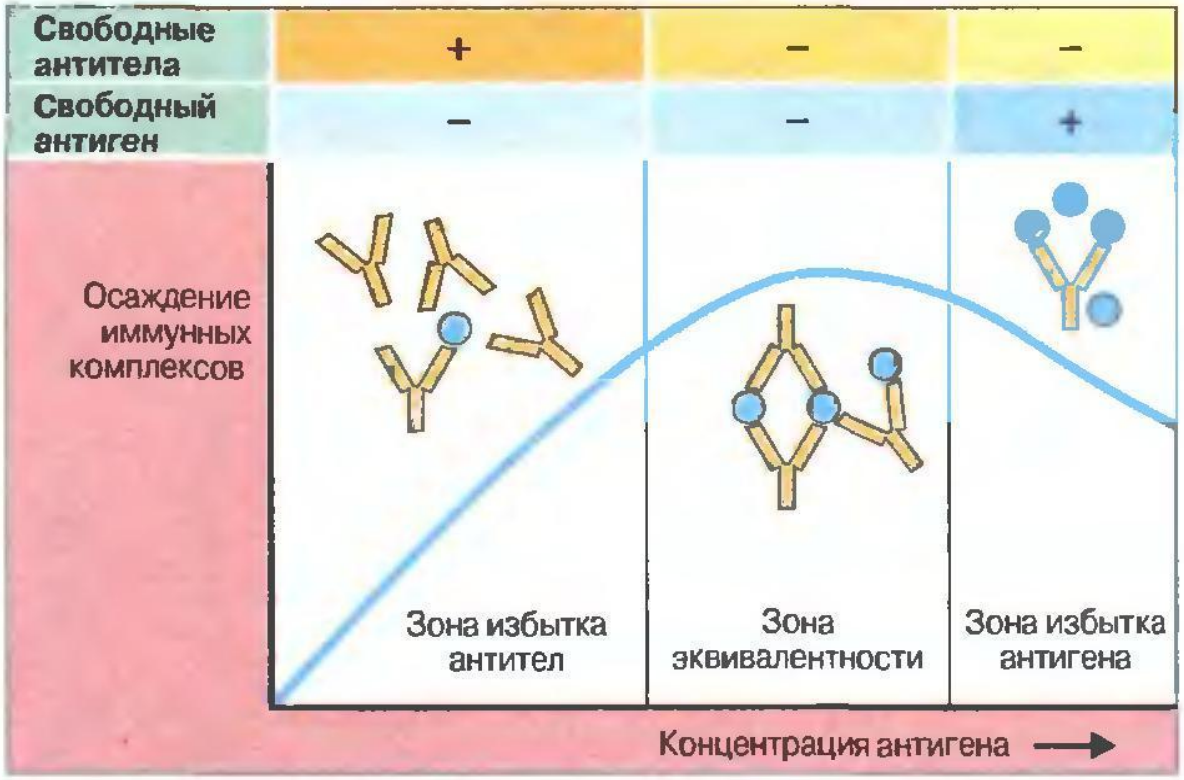
Крива преципітації Гейдельберга і типи утворених імунних комплексів при різних співвідношеннях вмісту антигену і антитіл



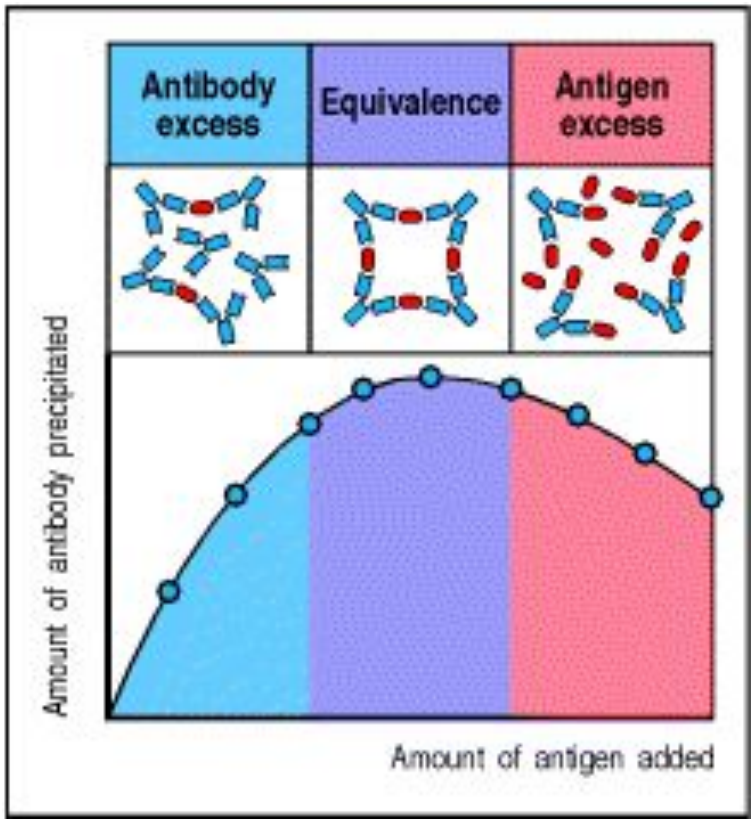
Співвідношення концентрацій антигенів і антитіл, коли спостерігається утворення максимального осаду (преципітату), називається <u>точкою еквівалентності</u> реакції. Мінімальні і максимальні значення співвідношень АГ/АТ, в межах яких ще спостерігаються доступні оку осади, визначають як <u>зону еквівалентності</u>.



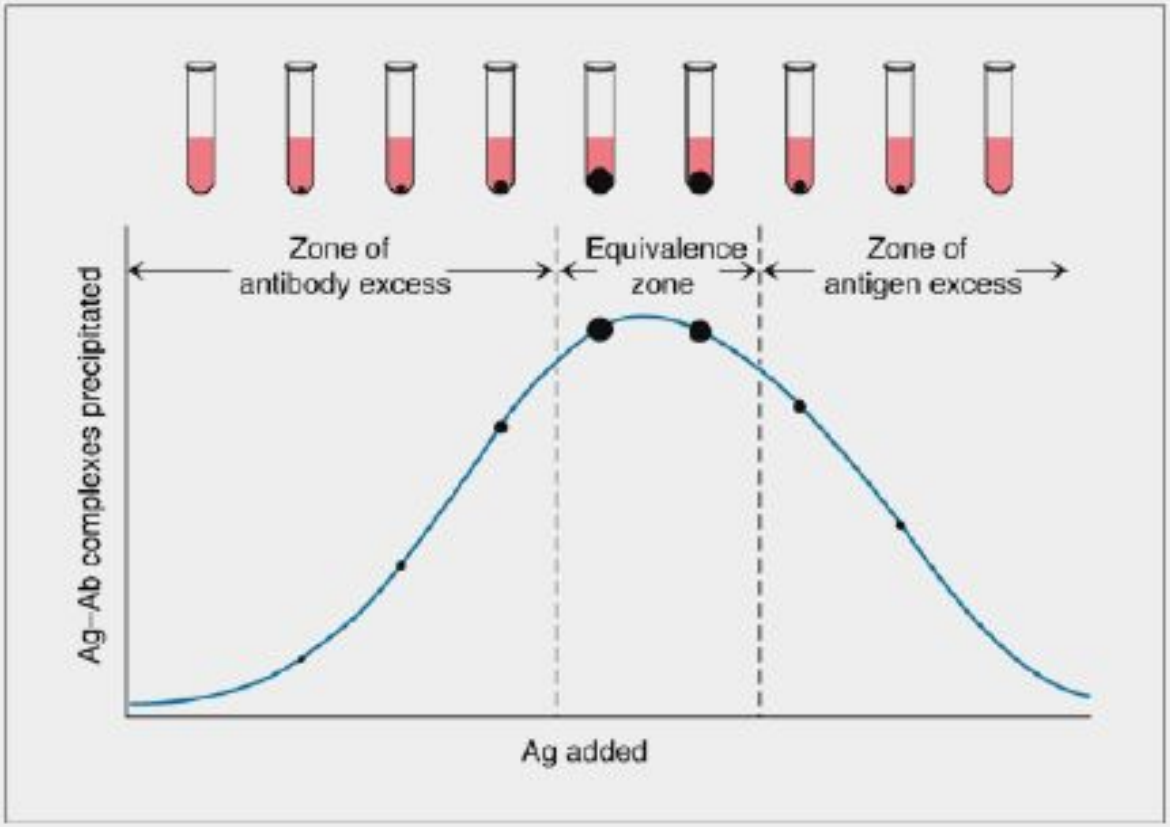
Реакция преципитации



Антитіла преципітують розчинний антиген. Крива Гейдельберга.



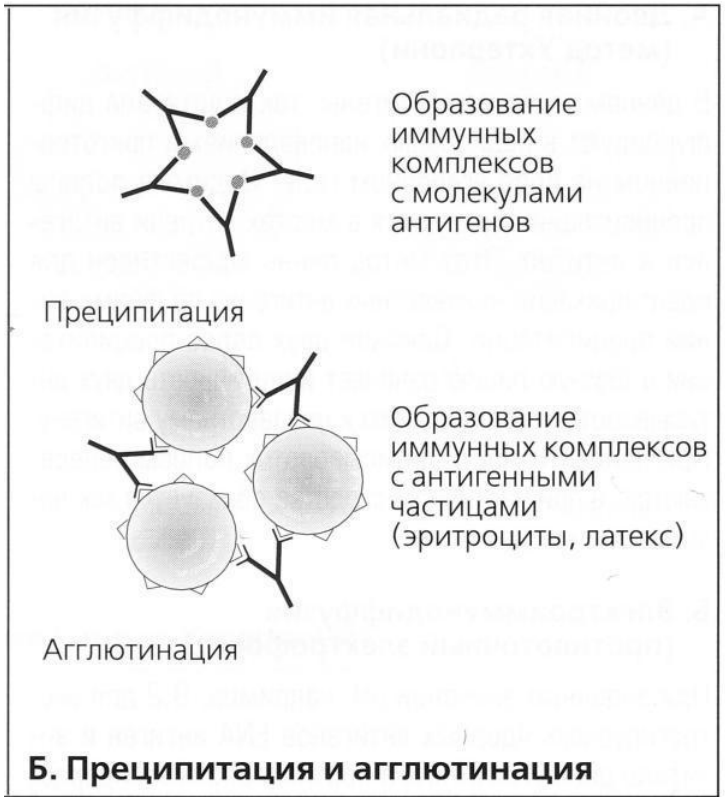
Representation of Precipitin Reaction



Реакції аглютинації – осадження антитілами корпускулярних антигенів (клітин, вірусних часточок і т.д), реакції преципітації- осадження молекул, що мають антигенні властивості.

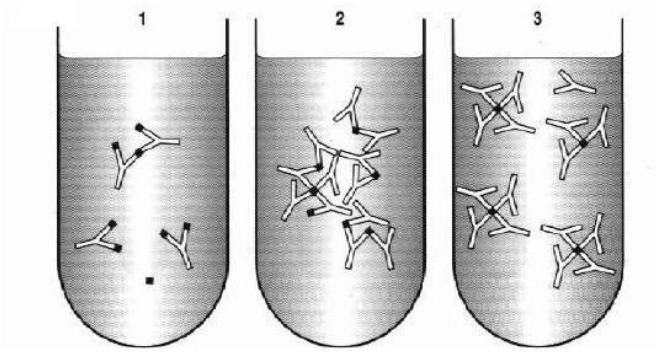
Реакції преципітації використовують для високодисперсних антигенів, які визначаються окремими молекулами. На відміну від реакцій аглютинації реакція утворення осаду в реакції преципітації йде досить повільно, сам

преципітат має нижчу щільність і може з часом дисоціювати.



Б. Преципитация и агглютинация

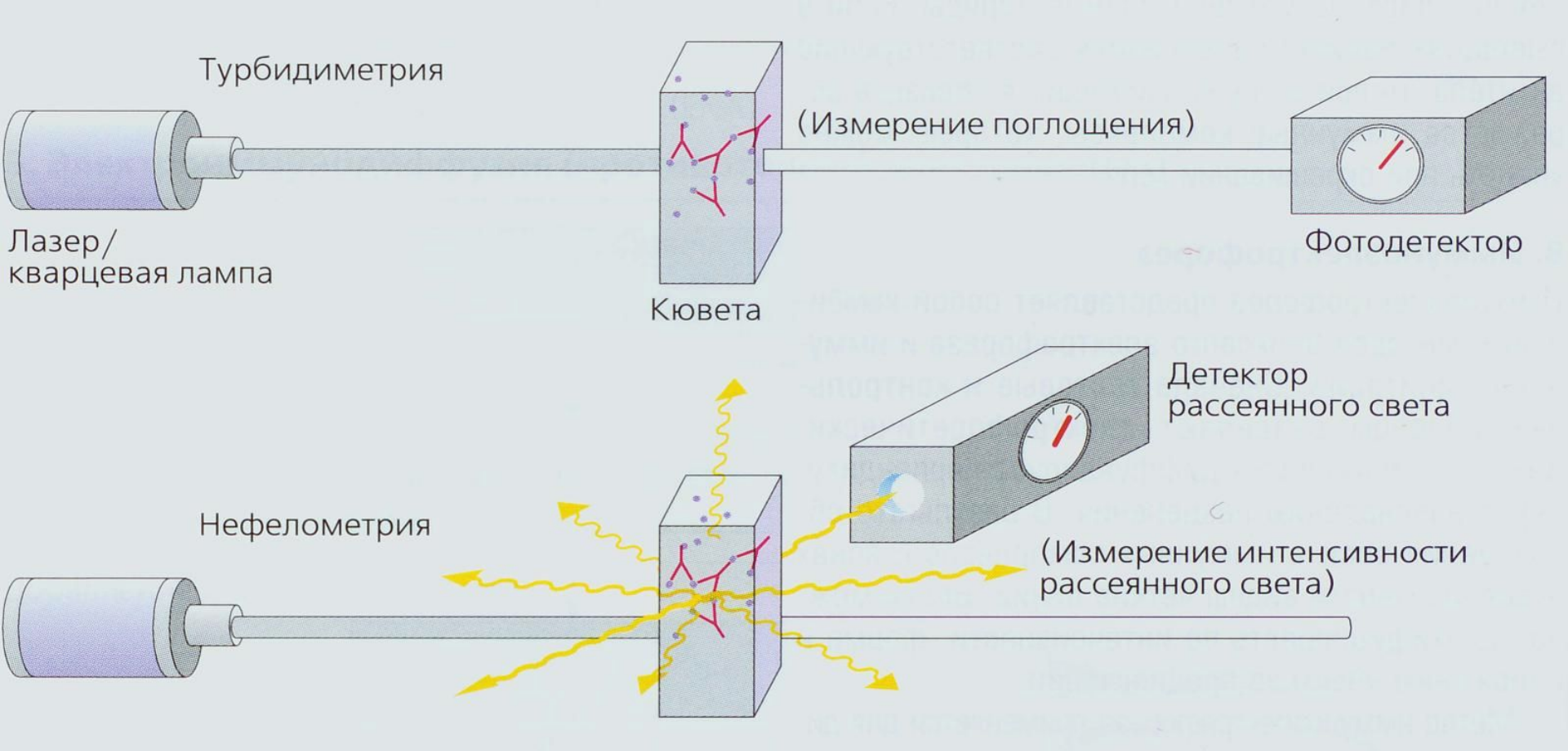
КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ОТНОШЕНИЯ АНТИГЕН–АНТИТЕЛО ПРИ АГГЛЮТИНАЦИИ И ПРЕЦИПИТАЦИИ



	1	2	3
Антиген / Антитело	4 / 8	12 / 8	16 / 4
Соотношение	1 : 2	1,5 : 1	4 : 1
	Избыток антигена	Оптимальное соотношение	Избыток антител
	Небольшие агрегаты	Большие агрегаты	Небольшие агрегаты
	Минимум осадка	Максимум осадка	Минимум осадка

Антиген 4- валентный, т. е. способен реагировать с 4-мя антителами
Антитело имеет 2 антигенсвязывающих участка

Реакція преципітації в рідкій фазі

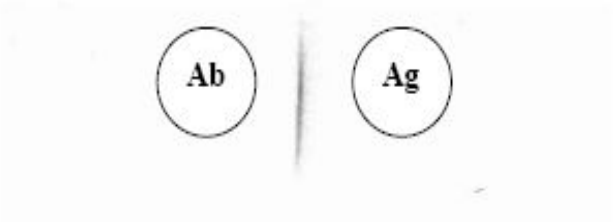


Реакції преципітації в гелі

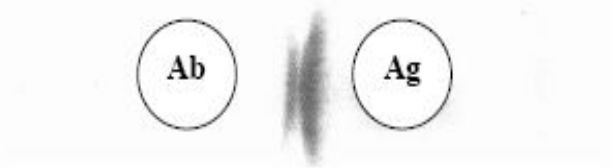
Подвійна імунодифузія-метод Ухтерлоні

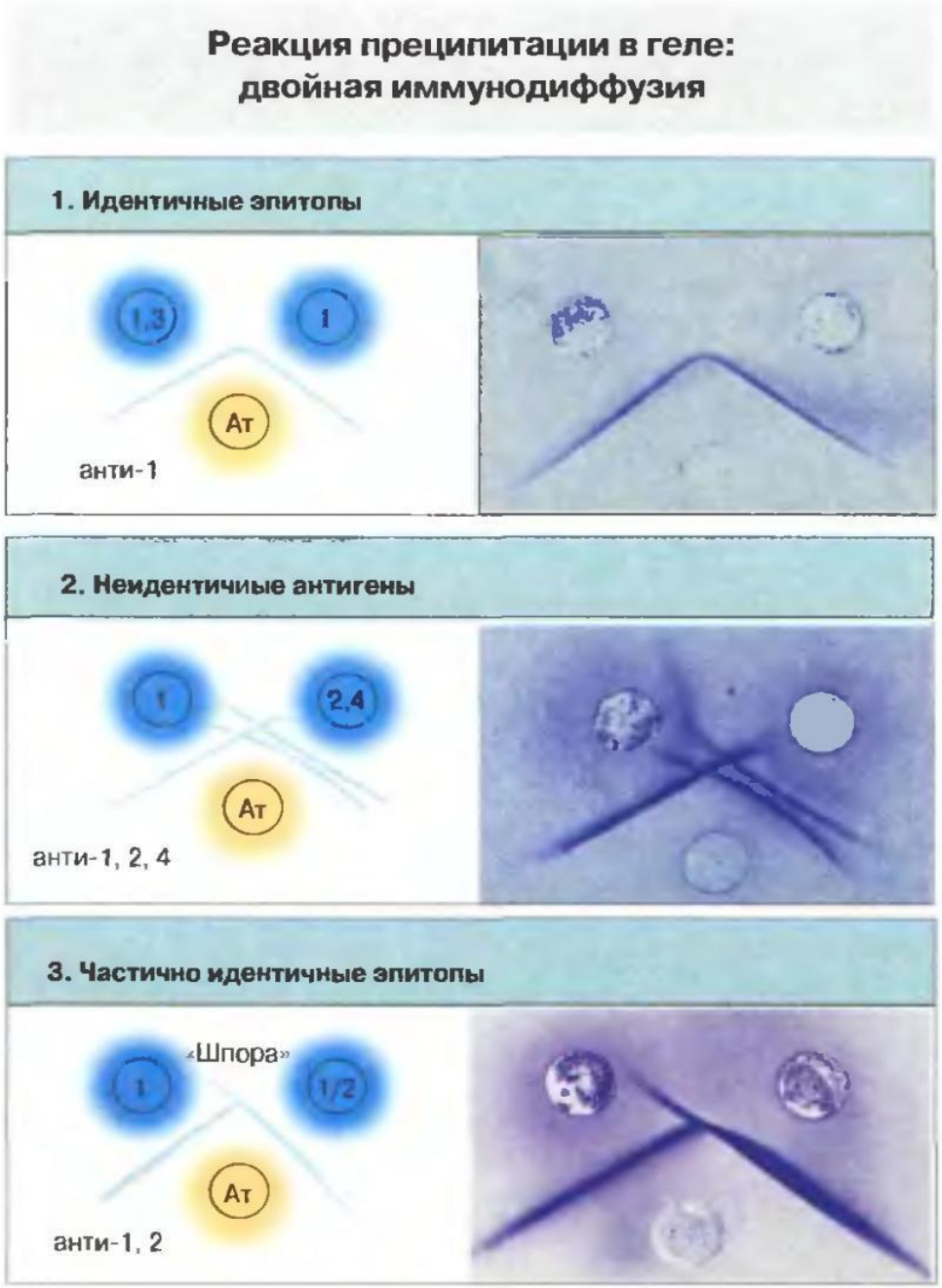
1. В отдельные лунки вносят раствор, содержащий антиген и суспензию антител.
2. Оставляют систему в условиях, обеспечивающих диффузию обоих компонентов.
3. Через положенное время фиксируют образование осадка в геле между лунками. При необходимости гель отмывают от не вошедших в комплексы белков и окрашивают красителем, связывающимся с белками (например, Кумасси синим)

А. В исследуемом образце присутствует один антиген



В. В исследуемом образце присутствует два антигена, способных взаимодействовать с данными антителами



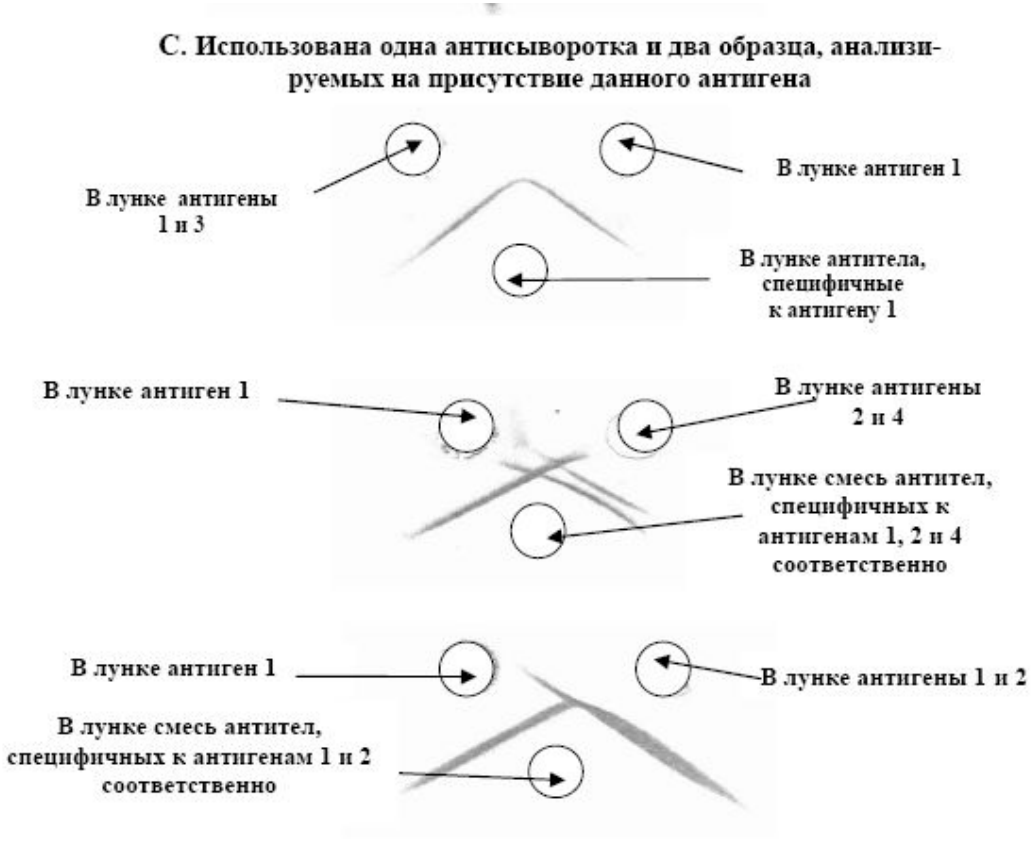


Подвійна імунодифузія-метод Ухтерлоні

Використовується одна антисироватка і два зразка, які аналізують на присутність даного антигена

Подвійна імунодифузія - метод Ухтерлоні

Використовується одна антисироватка і два зразка, які аналізують на присутність данного антигена

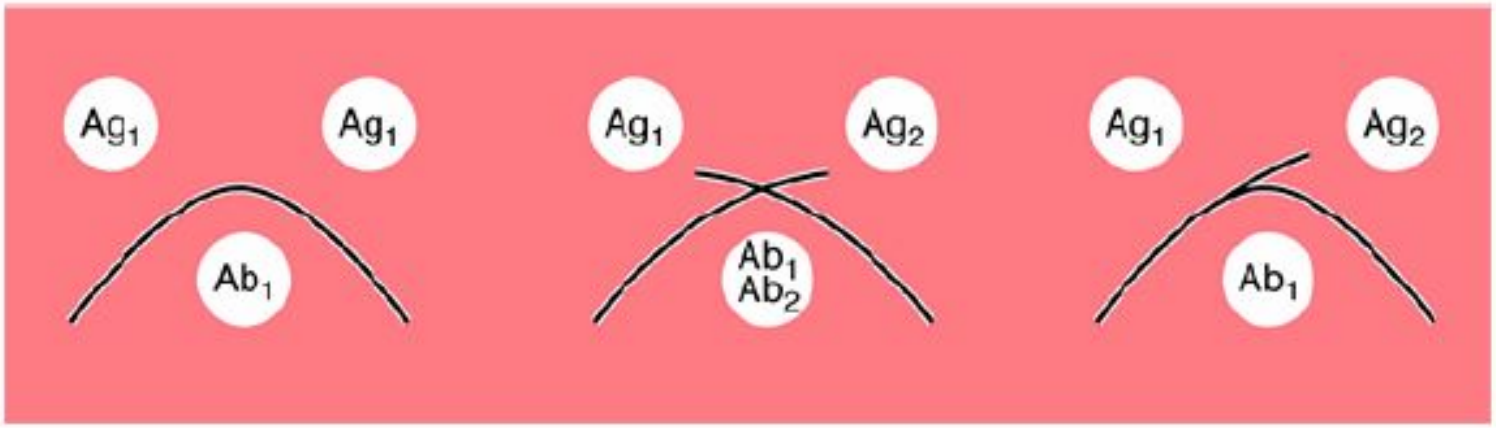


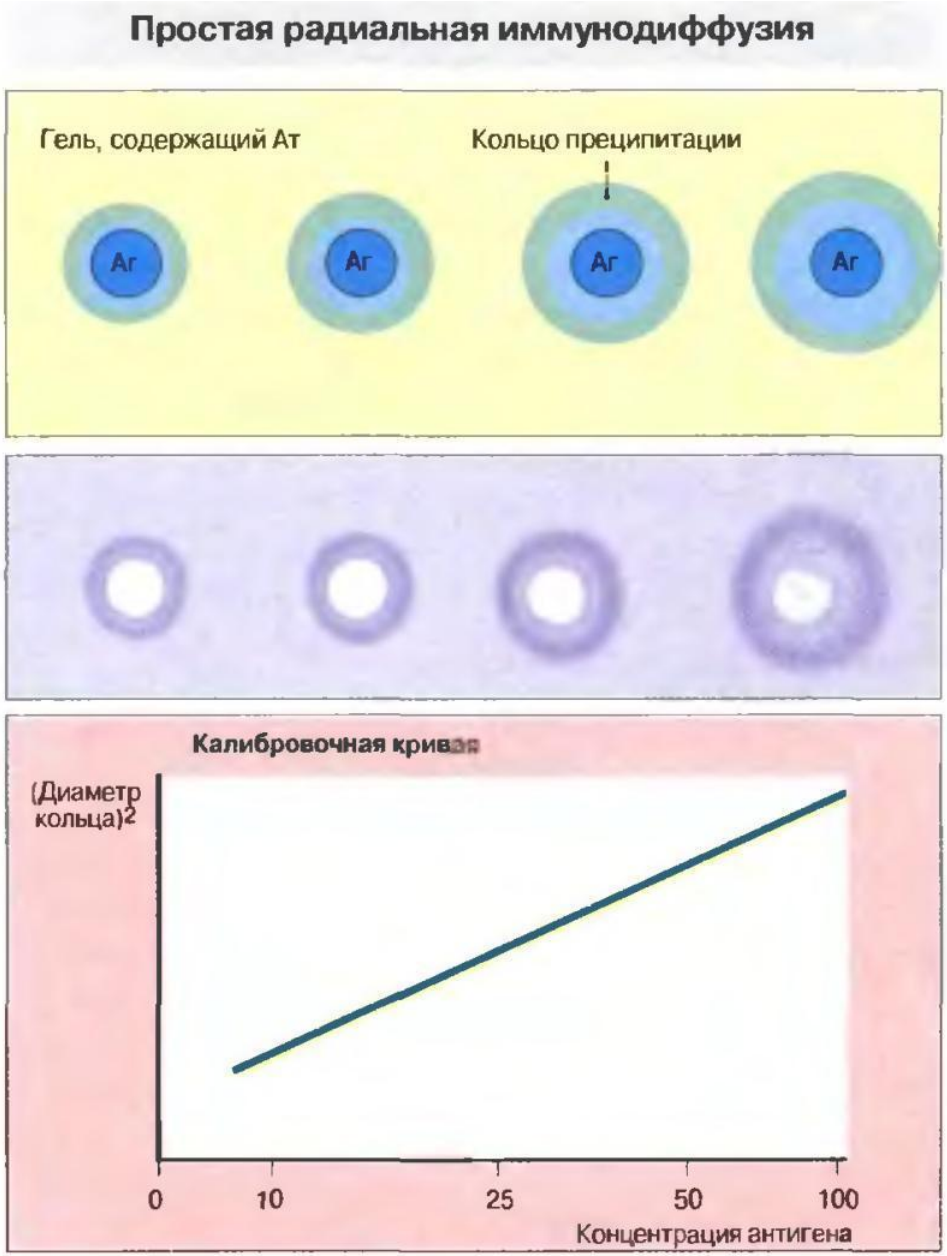
Подвійна імунодифузія - метод Ухтерлоні

Double Diffusion (Ouchterlony)

When both Ab and Ag diffuse towards each other and give different patterns

1. Patterns of Identity (identical ag in the wells)
2. Patterns of Non-identity (non identical ab and ag in the wells)
3. Patterns of Partial Identity (Ag_2 has some epitopes of Ag_1)





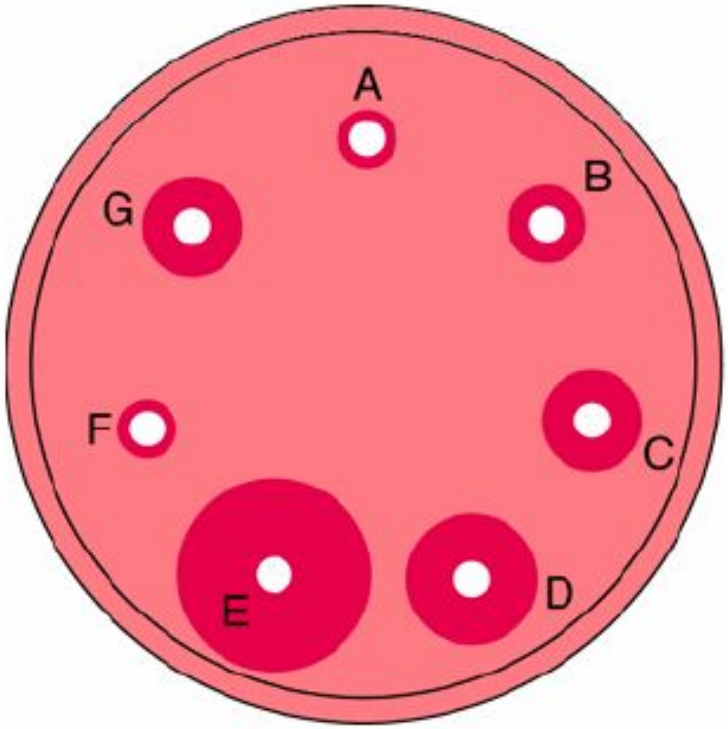
Проста радіальна імунодифузія.

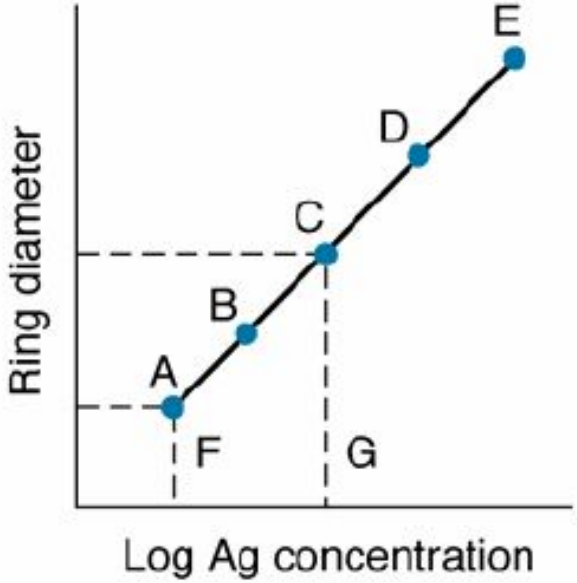
Метод Манчіні.

Проста радіальна імунодифузія. Метод Манчіні.

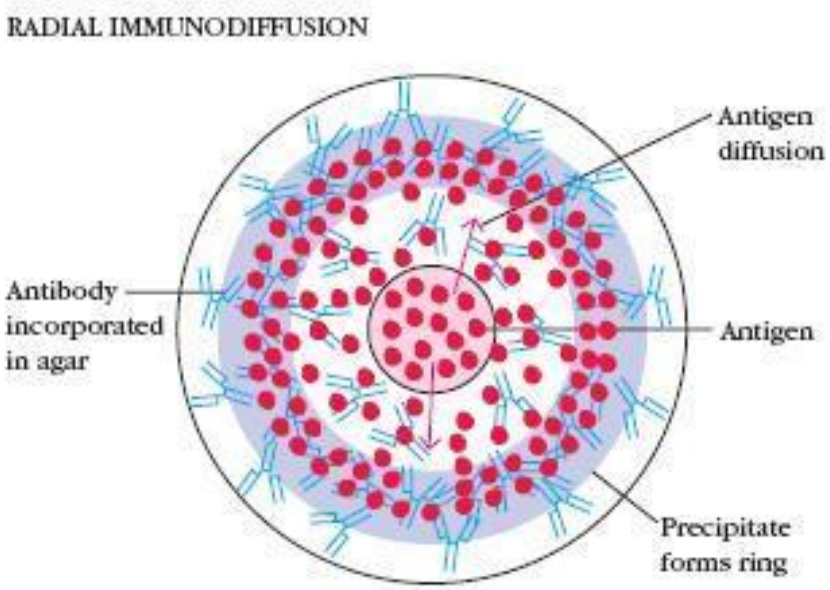
Radial Immunodiffusion

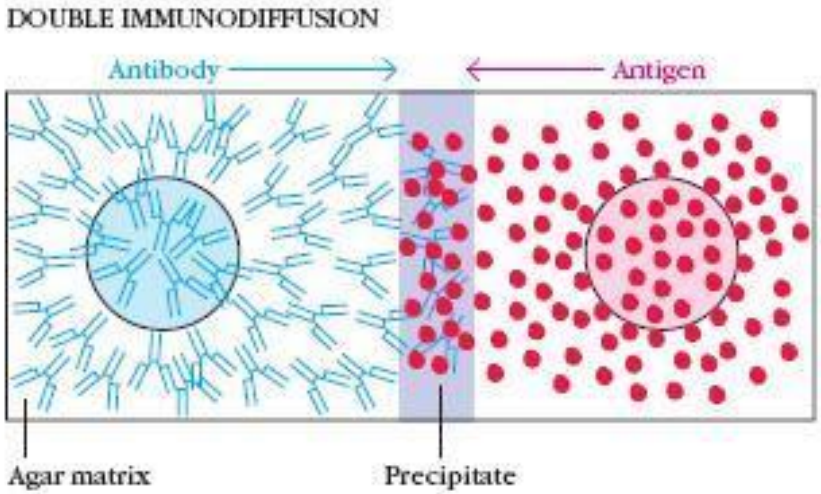
The wells contain ag at different concentration while the ab is distributed uniformly in the agar. Thus the precipitin line is replaced by the diffusion ring. The distance the precipitin ring migrates from the center of the ag well is directly proportional to the concentration of the ag. Concentration of the unknown can be calculated by plotting the graph comparing the diameter of the rings of the known concentration.



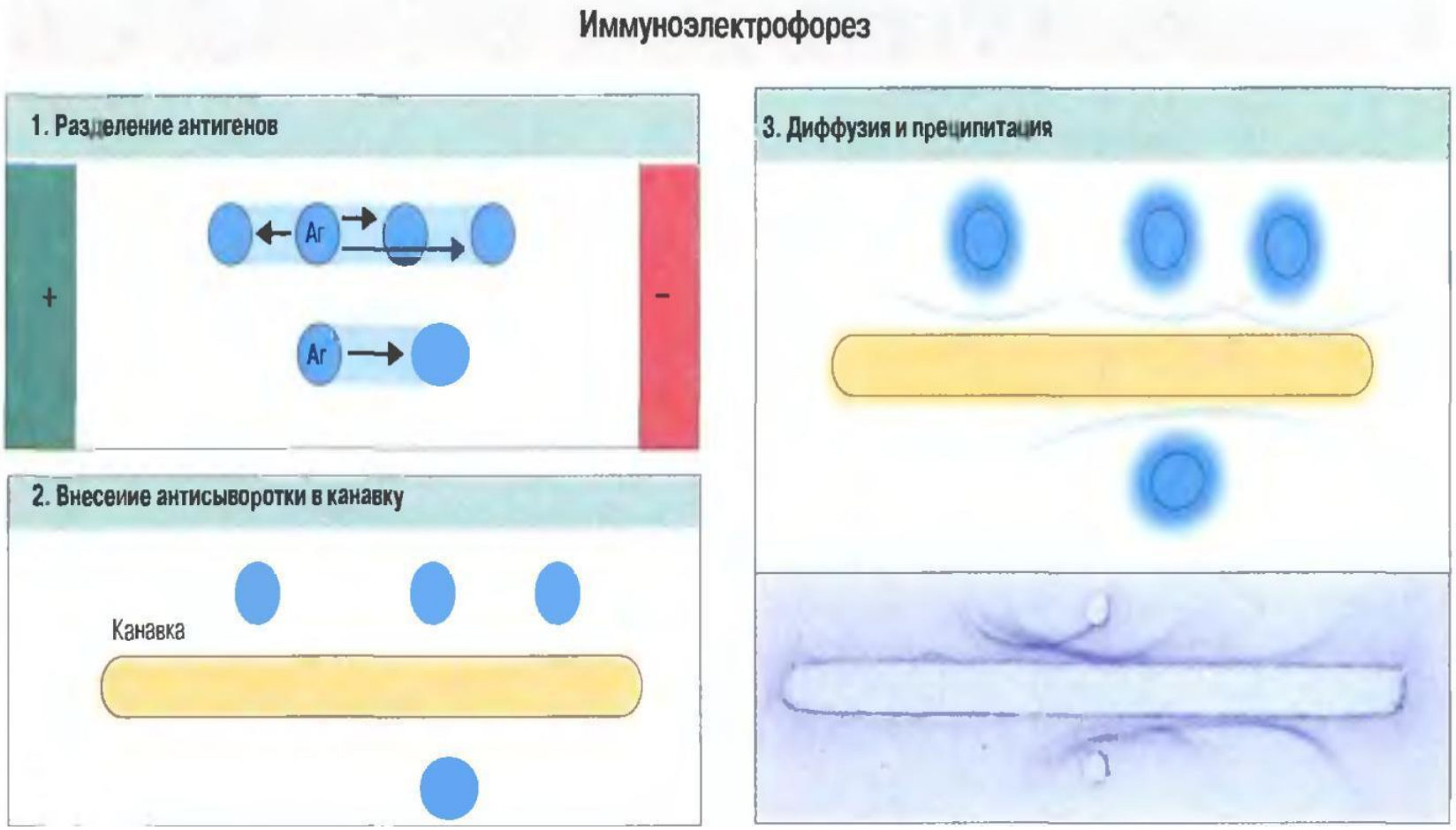


Проста радіальна імунодифузія. Подвійна імунодифузія.

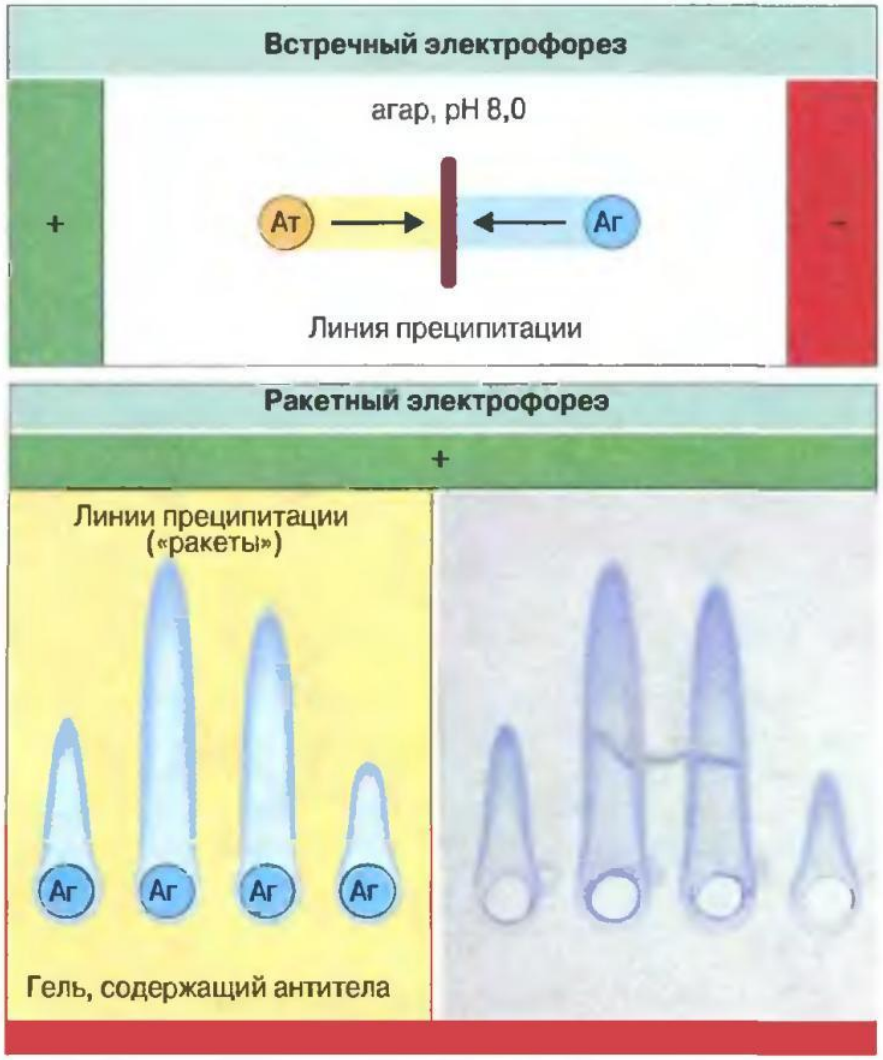




Імуноелектрофорез

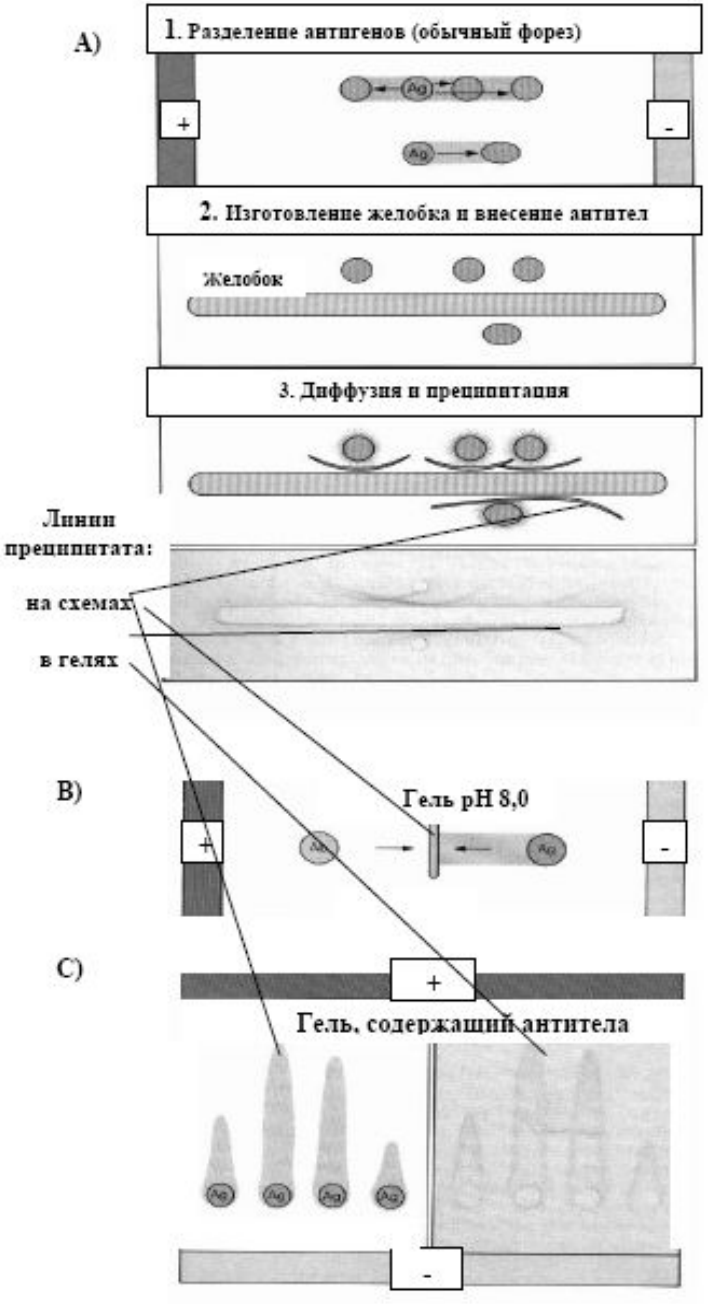


Встречный электрофорез и ракетный электрофорез



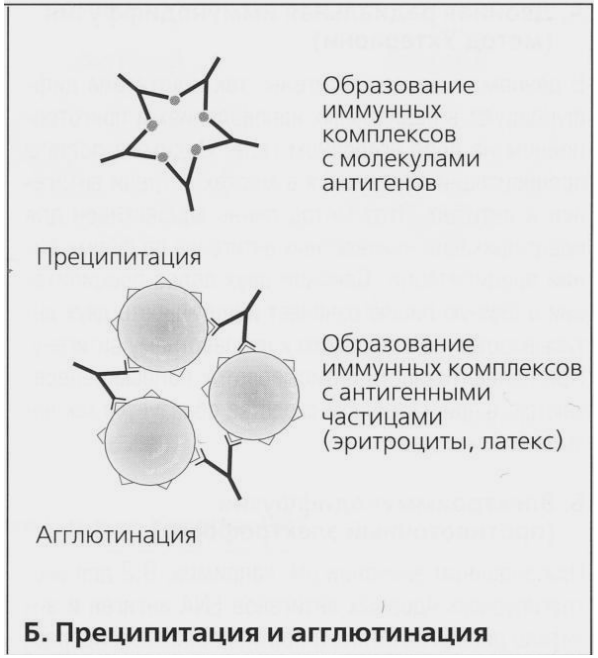
ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ

А) – обычный, В) – встречный, С) – ракетный



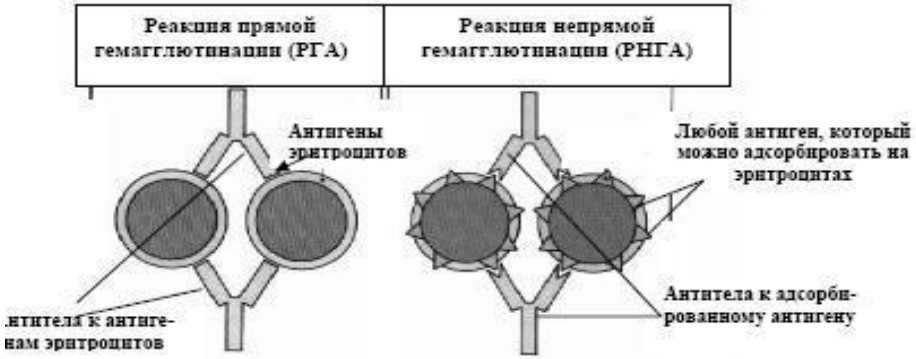
Реакції (гем)аглютинації

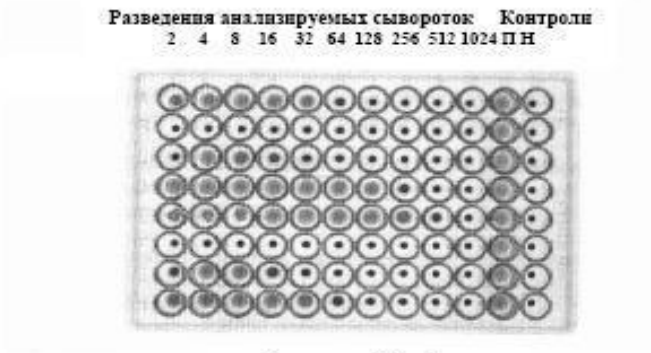
Реакції аглютинації – осадження антитілами корпускулярних антигенів (клітин, вірусних часточок і т.д), реакції преципітації- осадження молекул, що мають антигенні властивості.



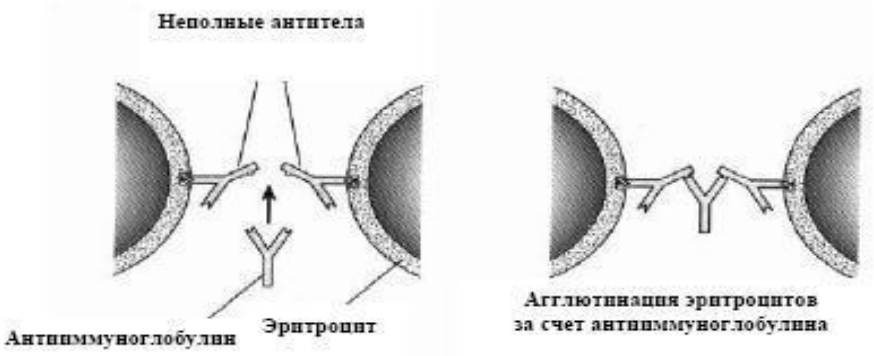
Б. Преципитация и агглютинация

РЕАКЦИИ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ



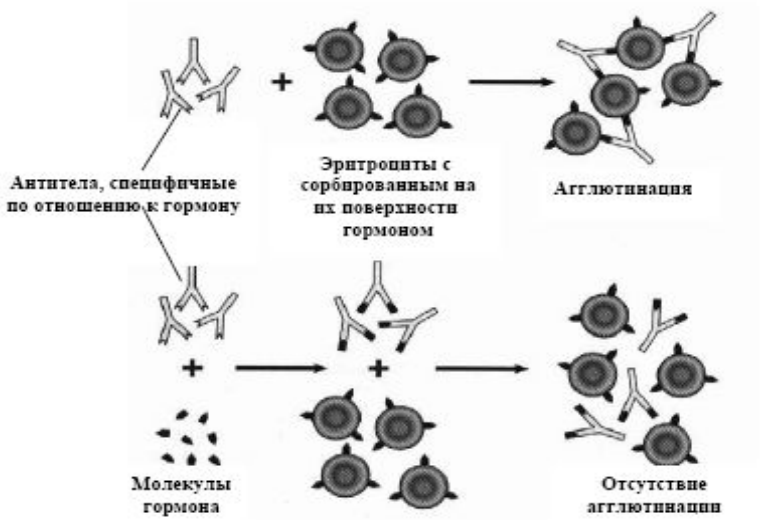


Реакция Кумбса

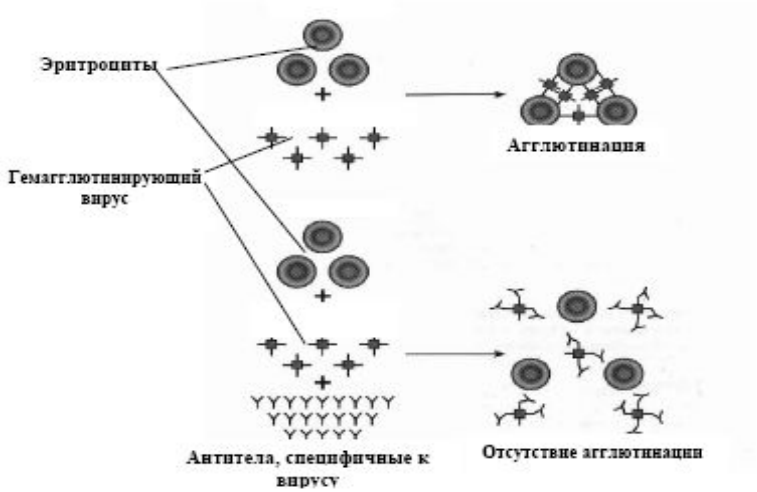


ИНГИБИРОВАНИЕ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

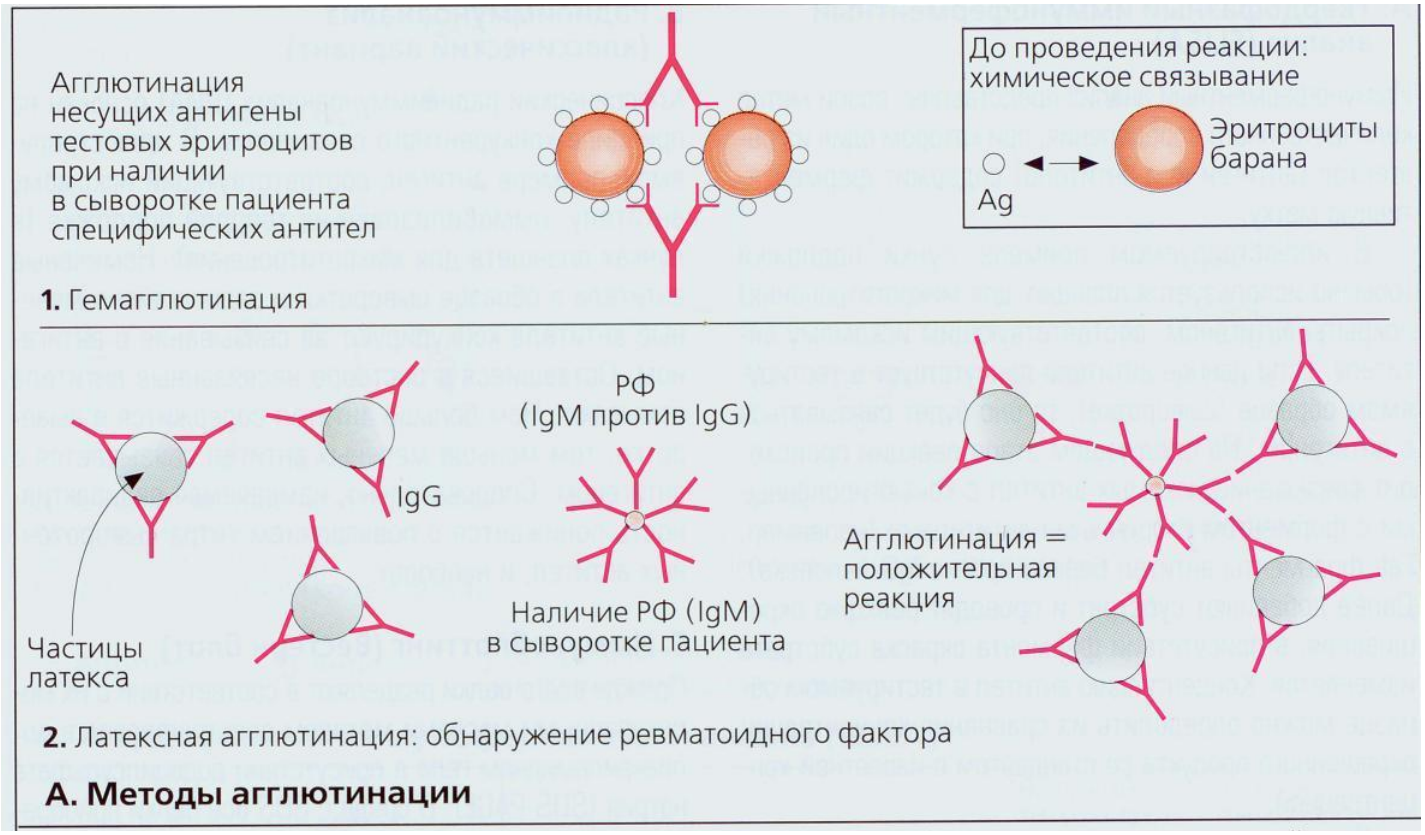
А. Определение гормонов



В. Тест на выявление антител против гемагглютинирующих вирусов (грипп, эпидемический паротит)



Методи аглютинації

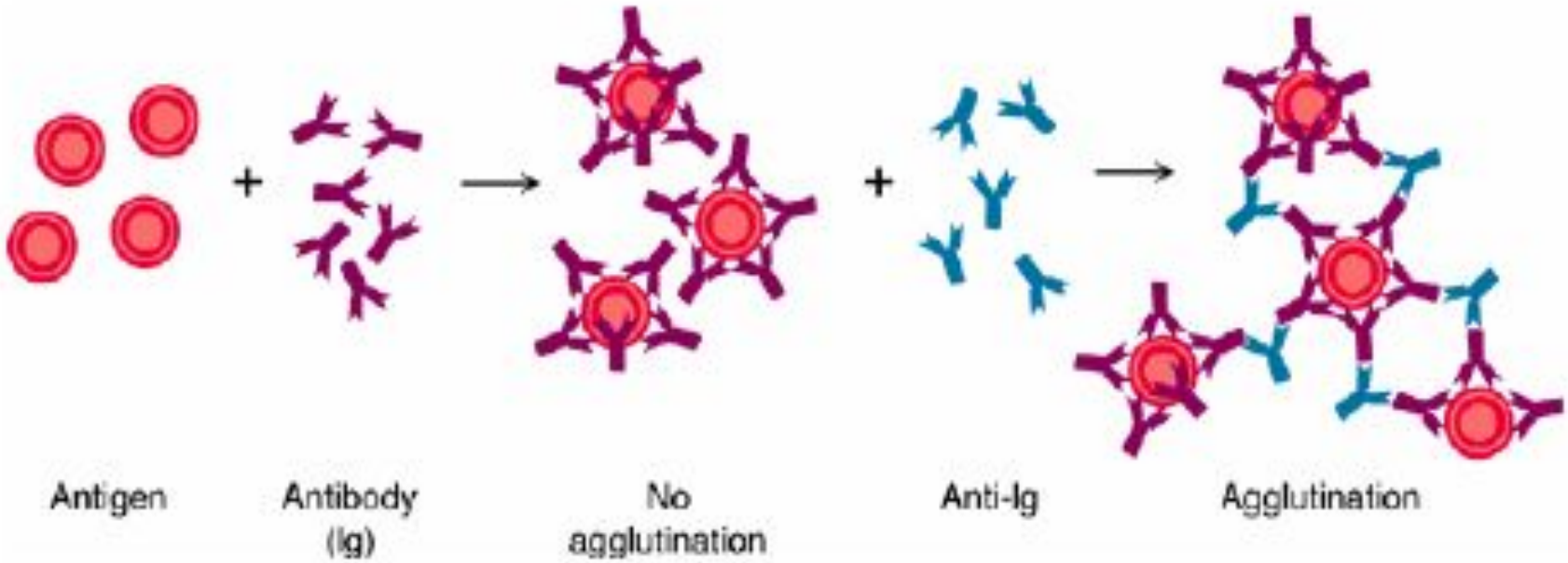


The Coombs Test

Antibodies against Immunoglobulins also called anti-immunoglobulin test.

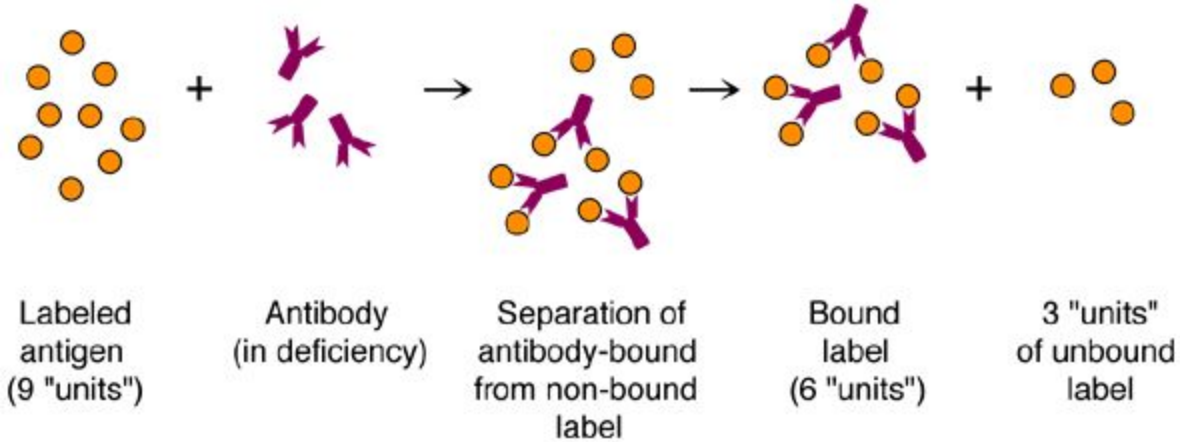
Assumptions:

1. Ig from one species are immunogenic when injected to another species
2. many of anti-immunoglobulin bind with antigenic determinants present on the Fc portion of the antibody and leave the Fab portion free to react with antigen

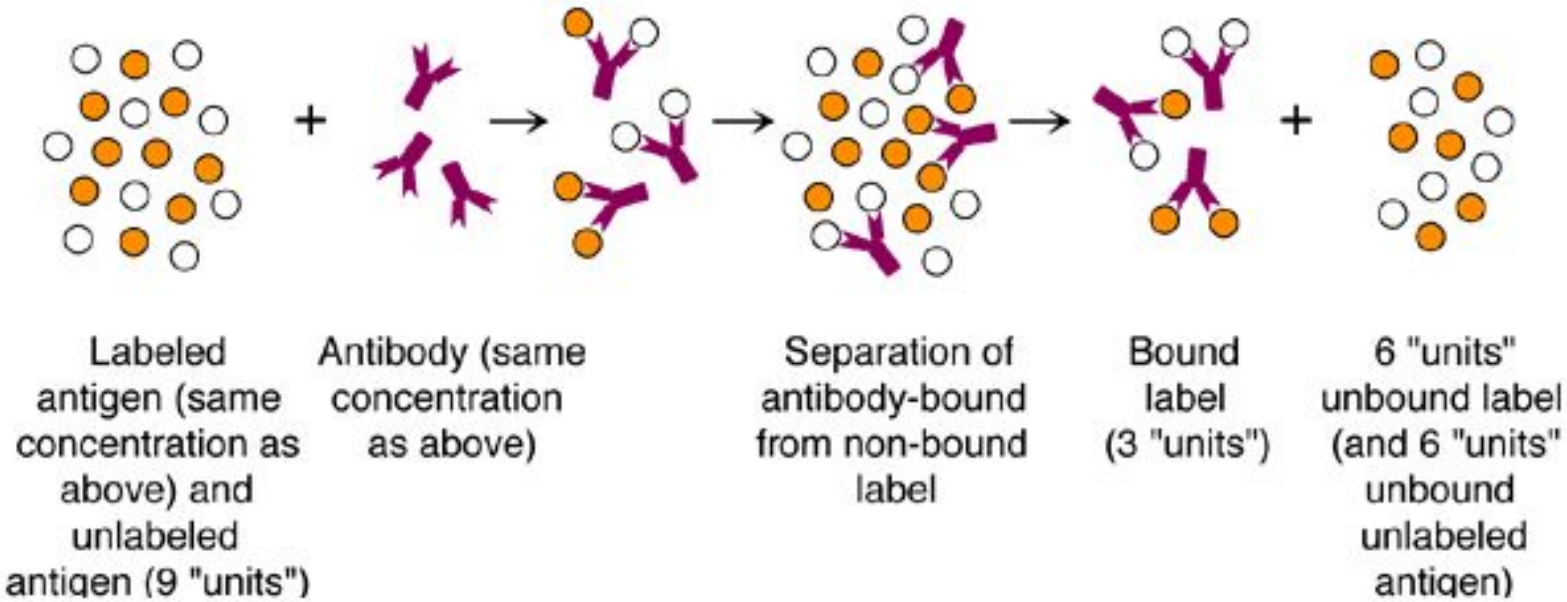


Конкурентні імунохімічні методи

Amount of label bound to antibody after incubation of constant amounts of antibody and labeled antigen

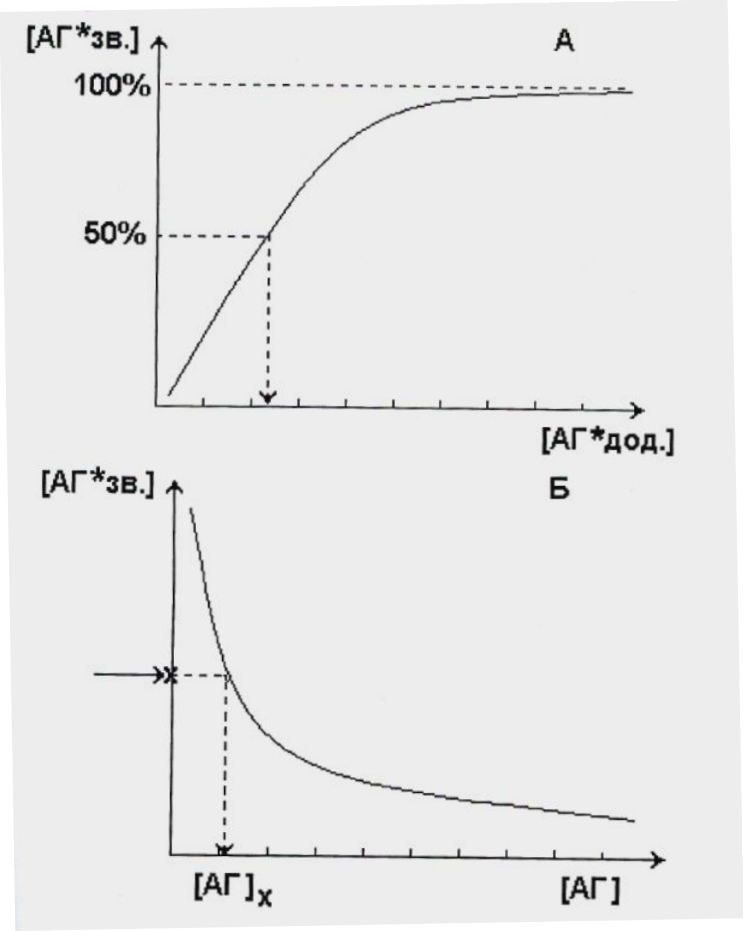


РІА
радіоімунний аналіз



В основі класичного РІА – конкуренція міченого і немміченого антигену за зв’язування зі специфічними антитілами

Аналіз зв'язування антигену з антитілом. Для РІА: А — крива насичення зв'язування міченого (*) антигену з постійною кількістю антитіл. В — крива конкуренції зв'язування міченого і неміченого антигену і визначення концентрації досліджуваного антигену Х ([АГ]х)



Різні методи побудови калібрувальних кривих

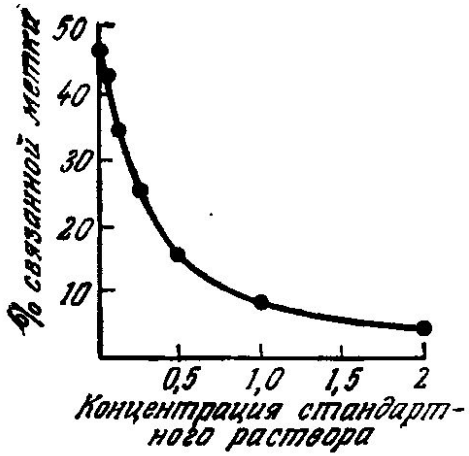


Рис. 1.8

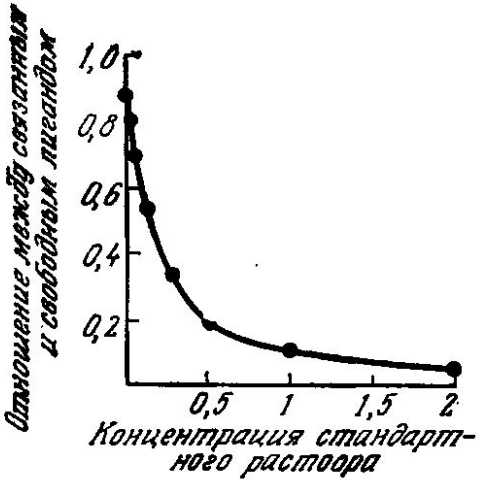


Рис. 1.9

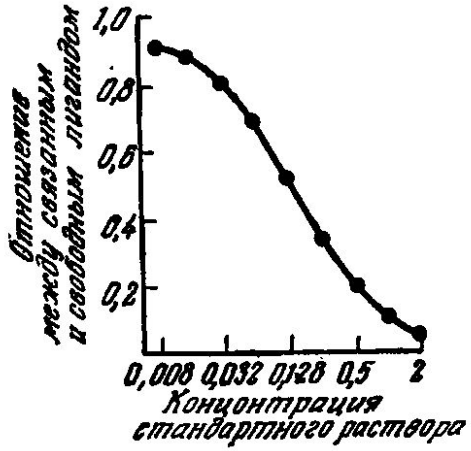


Рис. 1.10

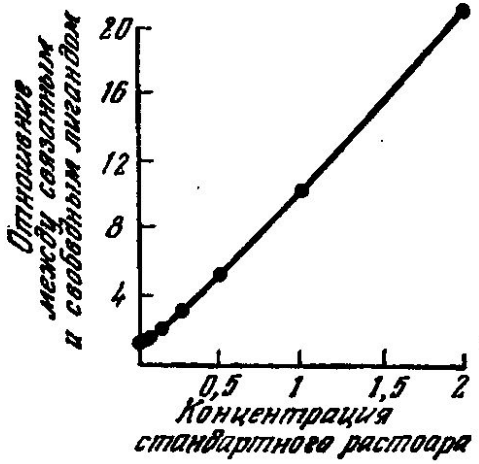


Рис. 1.11

Різні методи побудови калібрувальних кривих

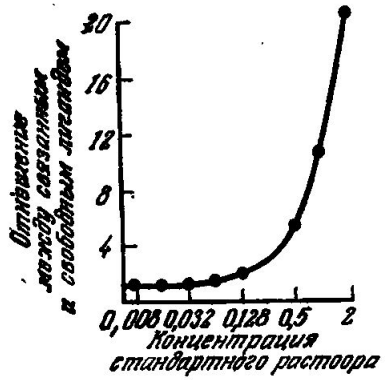


Рис. 1.12.

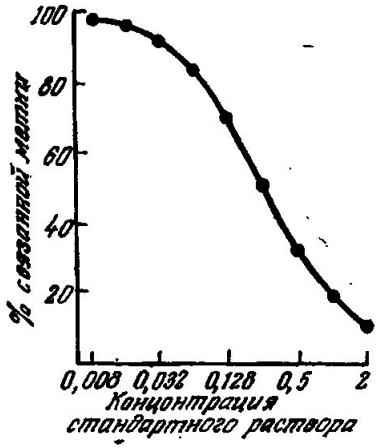


Рис. 1.13

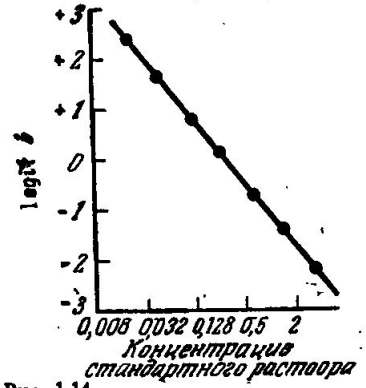


Рис. 1.14

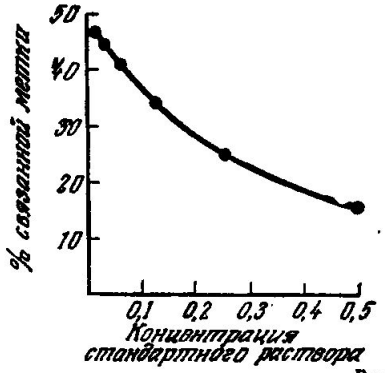
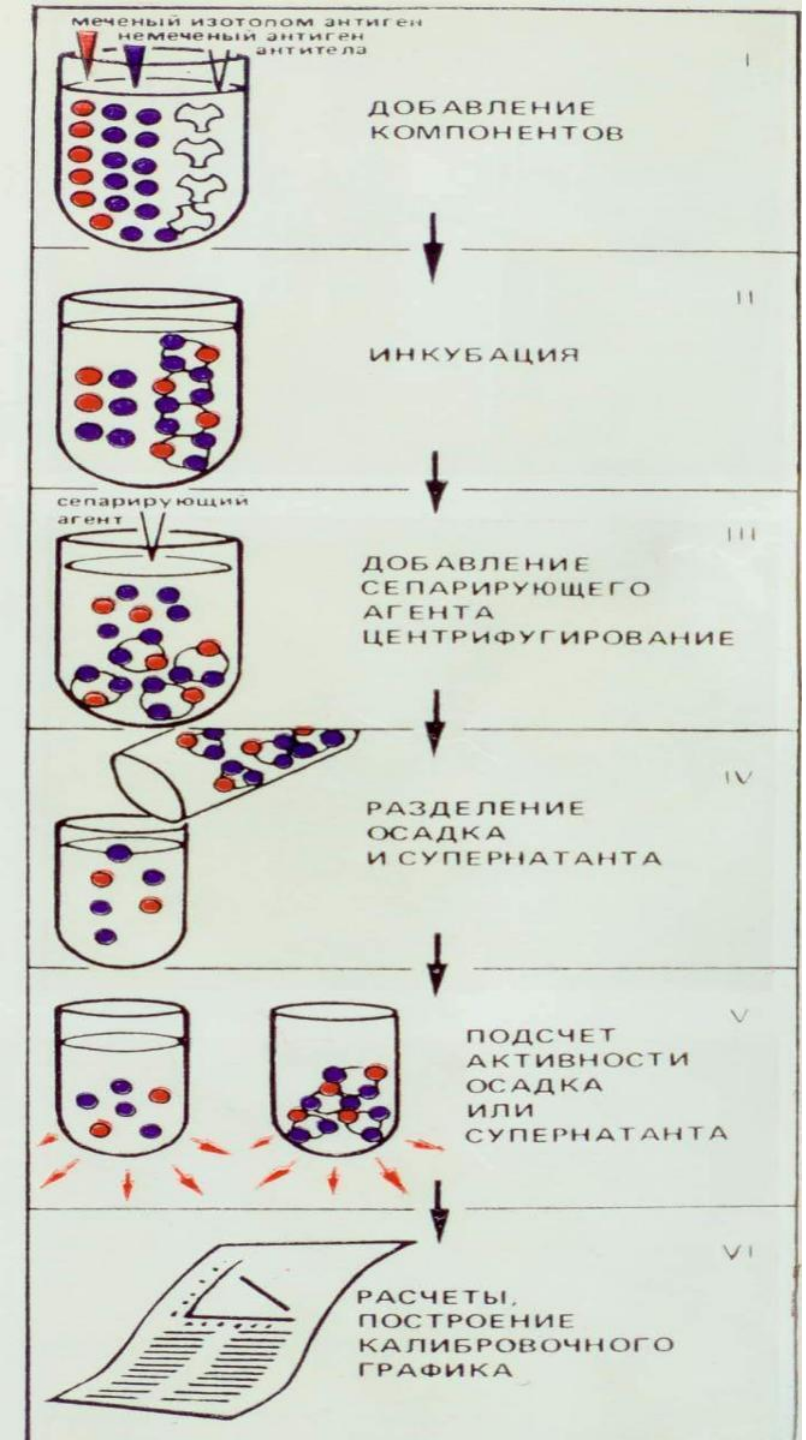


Рис. 1.15

Рис. 1.8.—1.15. Различные способы построения калибровочной кривой, приведенной на рис. 1.3. Внешний вид кривых сильно различается, хотя все они построены на основании одних и тех же данных.



РІА
радіоімунний аналіз

Набор реактивов СТЕРОН–E_3–^{125}j предназначен для прямого (безэкстракционного) определения эстриола в сыворотке крови человека методом радиоиммунологического анализа.

Количественное определение эстриола в сыворотке крови человека может представлять диагностическую ценность при оценке состояния фетоплацентарной системы.

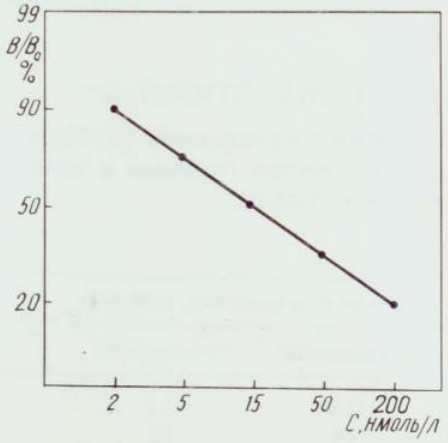
СОСТАВ НАБОРА

1 флакон ^{125}j – эстриол (90–180 кБк)
6 флаконов калибровочные пробы сыворотки крови, содержащие 0, 2, 5, 15, 50, 200 нмоль/л эстриола
1 флакон антисыворотка к эстриолу
1 флакон преципитирующий реагент.
Набор рассчитан на 100 определений.

СТАДИИ АНАЛИЗА

1. Добавление в инкубационные пробирки следующих компонентов:
– калибровочных и определяемых проб;
– ^{125}j–эстриола;
– смеси антисыворотки с преципитирующим реагентом.
2. Инкубация 2,0 часа при 18–25°С.
3. Центрифугирование и удаление надосадочной жидкости.
4. Измерение активности осадка на гамма-счетчике.
5. Расчеты, построение калибровочного графика, определение концентрации E_3 в сыворотке крови.

Типичный калибровочный график

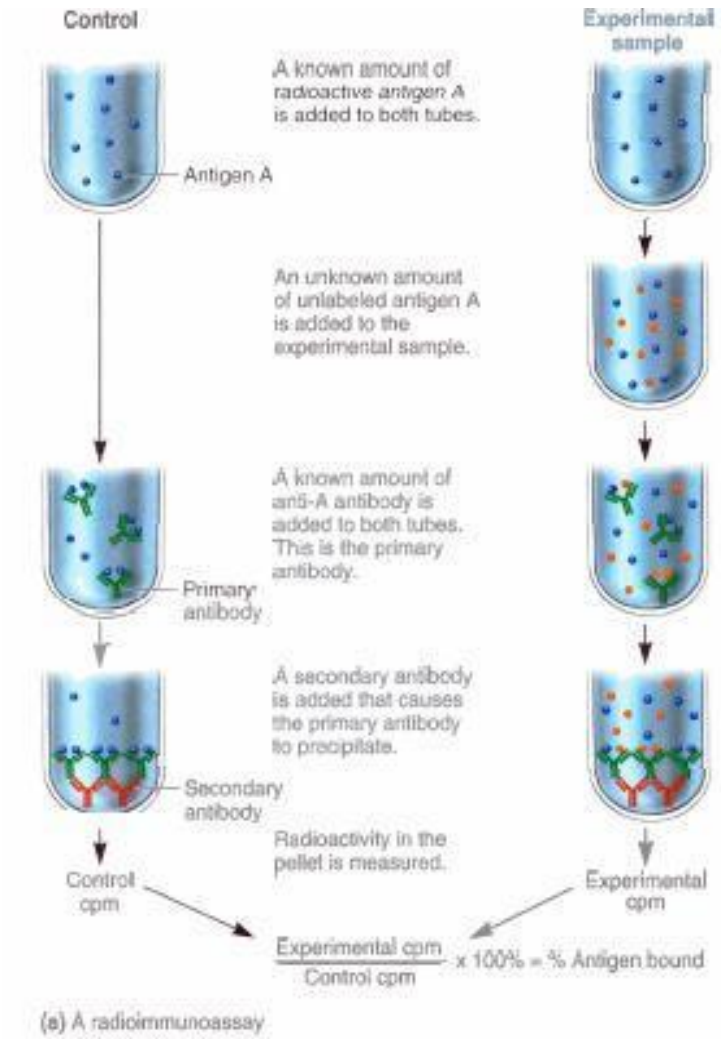


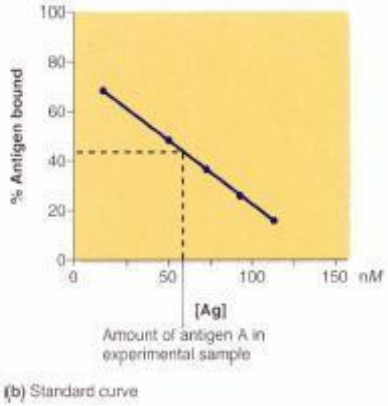
B - рівень зв’язаного в результаті реакції АГ-АТ міченого ^{125}I-АГ;

B_0 - загальний рівень радіоактивно-міченого ^{125}I-АГ, внесений в пробірку

Естріол – стероїдний гормон, різкі зміни рівня якого при вагітності можуть свідчити про порушення у розвитку плоду

PIA метод





The method of radioimmunoassay (a) and the construction of a standard curve (b)
Figure A.9

РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ (РИА)

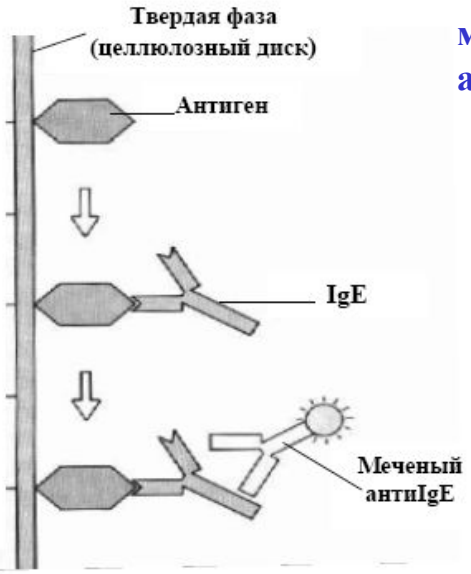
A) – Radioallergosorbent test (RAST)

B) - Radioimmunosorbent test (RIST)

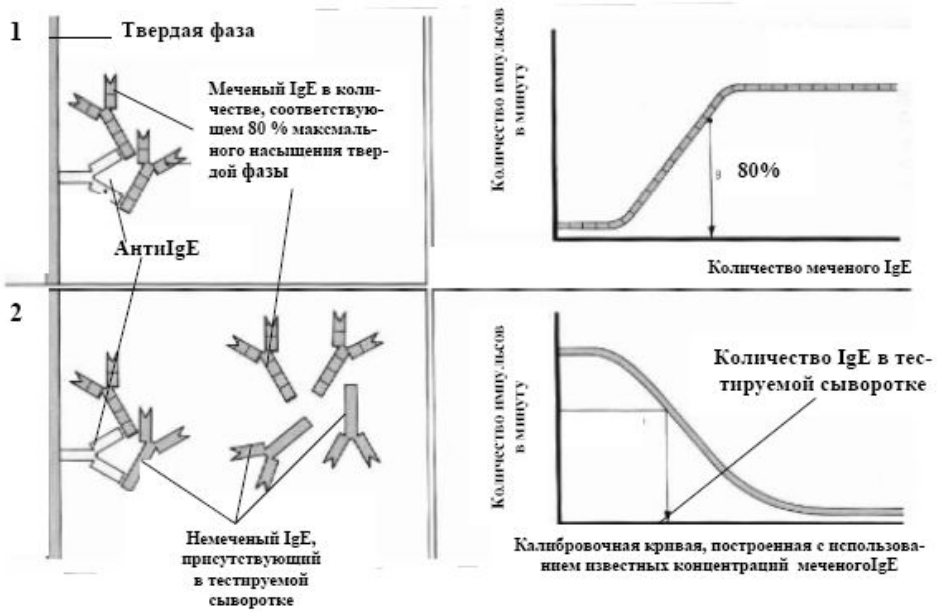
Прикладом використання РІА можуть бути методи для тестування алергійних станів у людини

A)

1. Сорбировать антиген (аллерген) на твердой фазе (например, на целлюлозном диске)
2. Блокировать диск в отношении неспецифического связывания антител
3. Добавить сыворотку, проверяемую на присутствие IgE, комплементарного данному антигену
4. Отмыть диск от несвязавшихся антител
5. Добавить лиганд (антиIgE-антитела, меченые радиоактивным изотопом)
6. Отмыть диск от несвязавшегося лиганда
7. Измерить радиоактивность диска



B)



Скринінг донорської крові на присутність вірусу гепатиту В методом твердофазного РІА

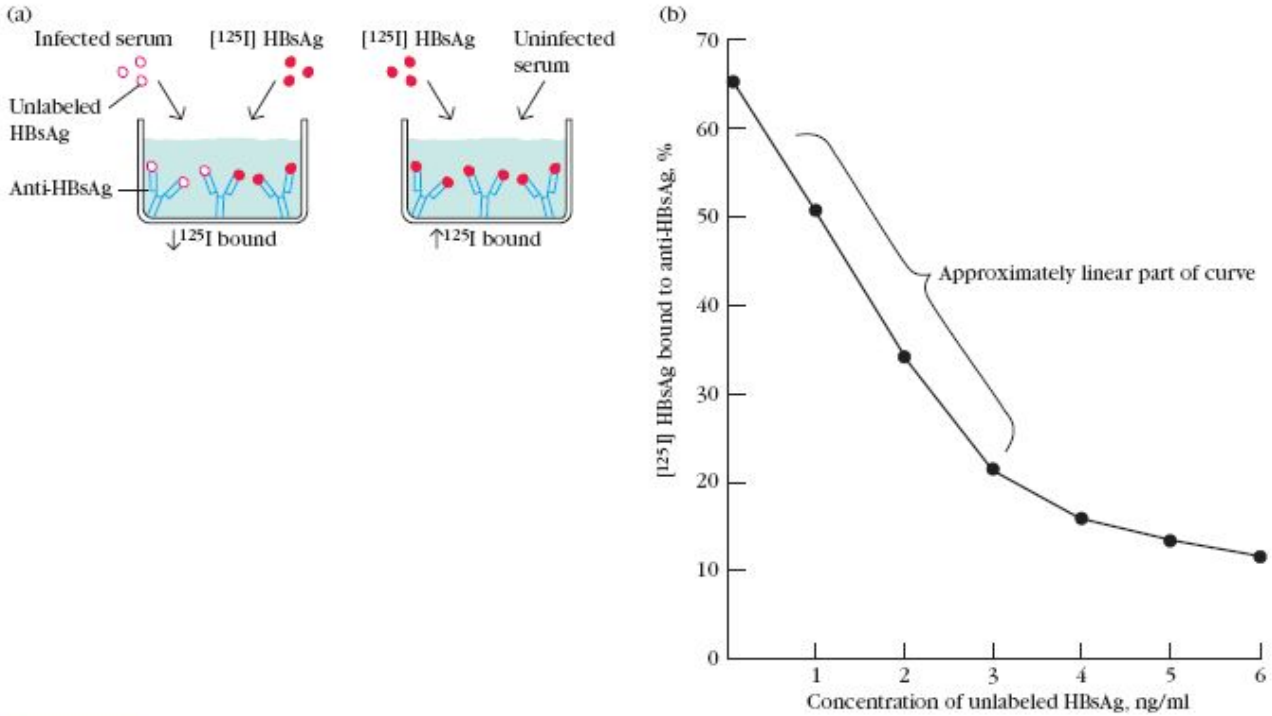
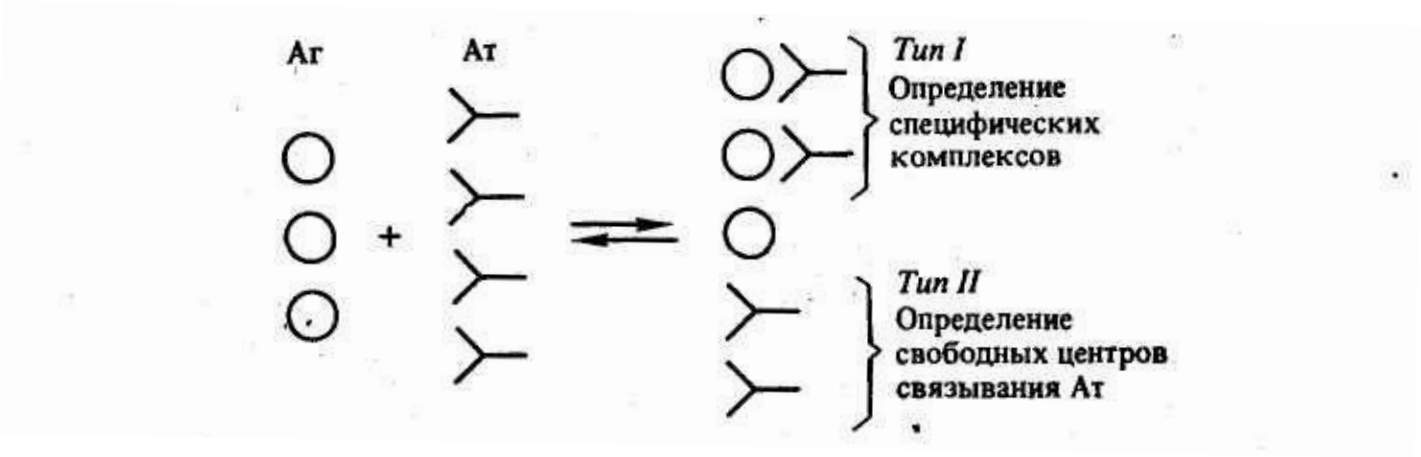


FIGURE 6-9 A solid-phase radioimmunoassay (RIA) to detect hepatitis B virus in blood samples. (a) Microtiter wells are coated with a constant amount of antibody specific for HBsAg, the surface antigen on hepatitis B virions. A serum sample and [^{125}I]HBsAg are then added. After incubation, the supernatant is removed and the radioactivity of the antigen-antibody complexes is measured. If the sample is infected, the amount of label bound will be less than in controls with uninfected serum. (b) A standard curve is obtained by adding increasing concentrations of unlabeled HBsAg to a fixed quantity of [^{125}I]HBsAg and specific antibody. From the plot of the percentage of labeled antigen bound versus the concentration of unlabeled antigen, the concentration of HBsAg in unknown serum samples can be determined by using the linear part of the curve.

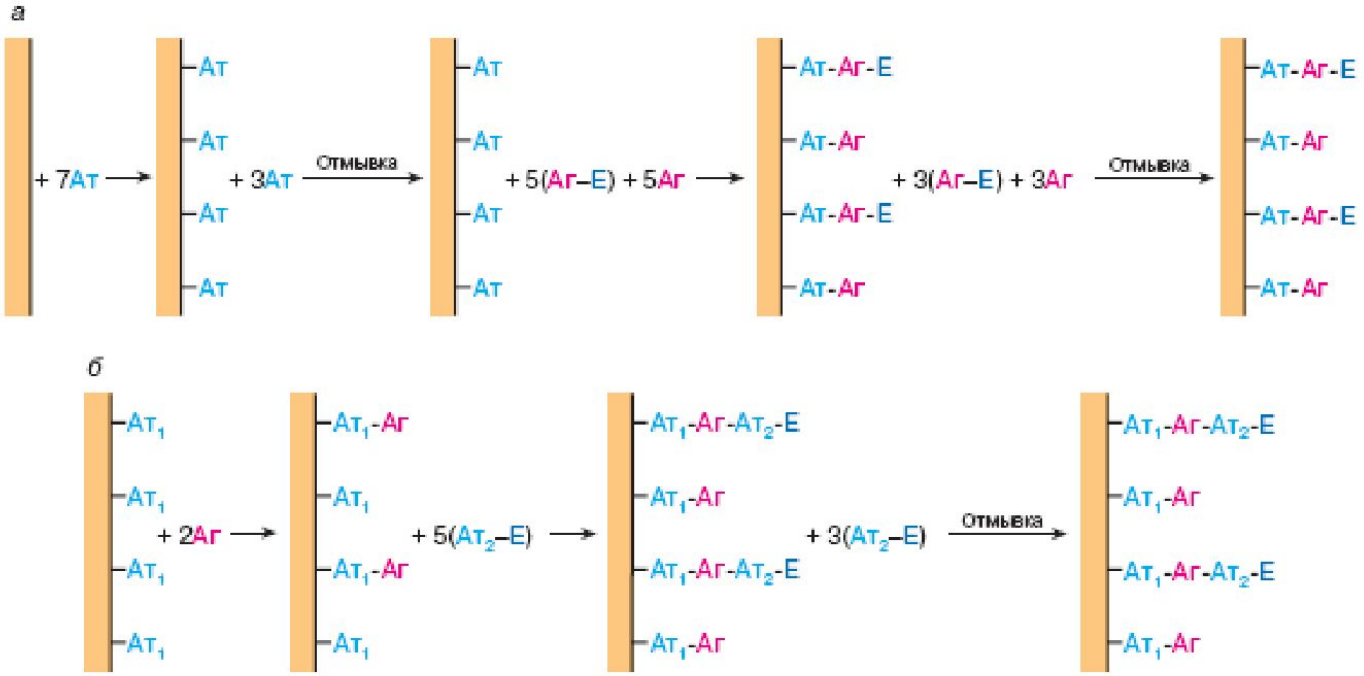
ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ

Методы ИФА
Тип I
Определение специфического иммунного комплекса анализируемого соединения
Тип II
Определение оставшихся свободными центров специфического связывания
Неконкурентные
Неконкурентные
Конкурентные
Гетерогенные
Гетерогенные
Гомогенные
Гетерогенные
Гомогенные
Твердофазные
Твердофазные
Гомогенно-гетерогенные
Твердофазные
Гомогенно-гетерогенные
Различные схемы анализа, основанные на использовании индивидуальных меченых или иммобилизованных компонентов иммунохимических реакций

Групи методів в імуноферментному аналізі



КОНКУРЕНТНИЙ (а) ТА НЕКОНКУРЕНТНИЙ (б) ГЕТЕРОГЕННИЙ ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ



ОСОБЛИВОСТІ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

1. Імуносорбенти
2. Твердофазні носії
3. Імобілізація антигенів чи антитіл на твердій фазі
4. Ферменти і субстрати
5. Кон’югати та їх створення

ОСОБЛИВОСТІ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

Ферменти і субстрати

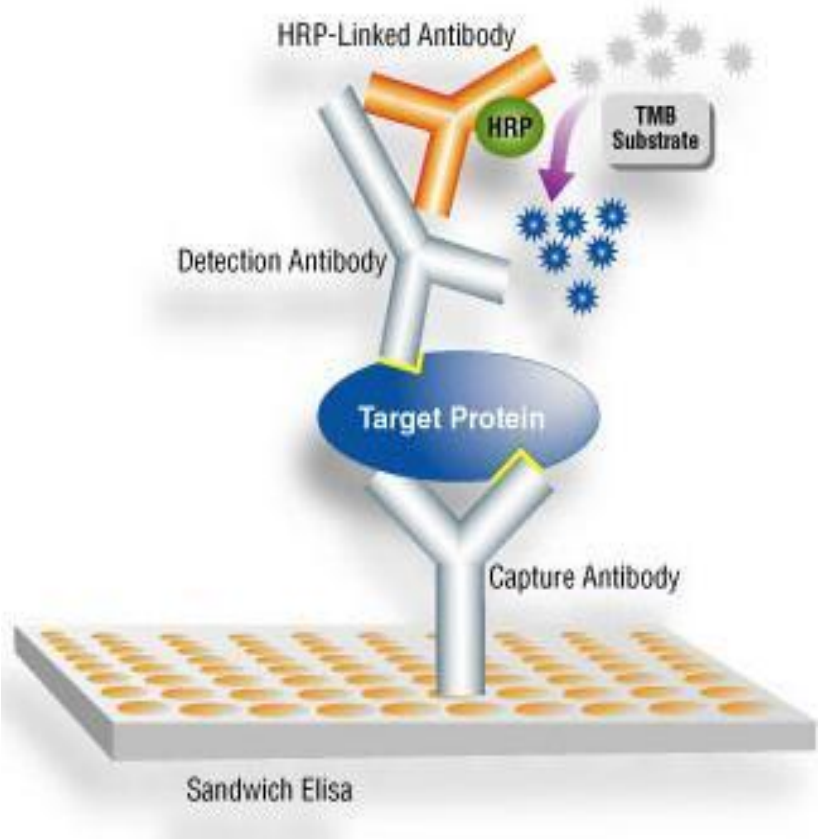
Пероксидаза хрону (ПХ)-Horse radish peroxidase (HRP). Субстрати при фотометрії - тетраметилбензидин (англ.**TMB**) та **ABTS (**2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)

Лужна фосфатаза – субстрат при фотометрії – паранітрофенілфосфат

Галактозидаза- субстрат при фотометрії – нітрофенілгалактозид

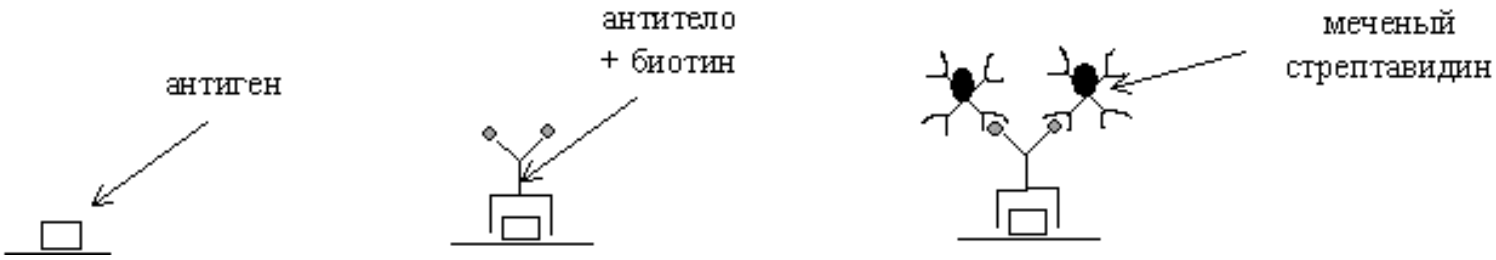
ELISA- E*nzyme-*L*inked* I*mmuno*S*orbent* A*ssay*

Сорбційний імуноферментний аналіз

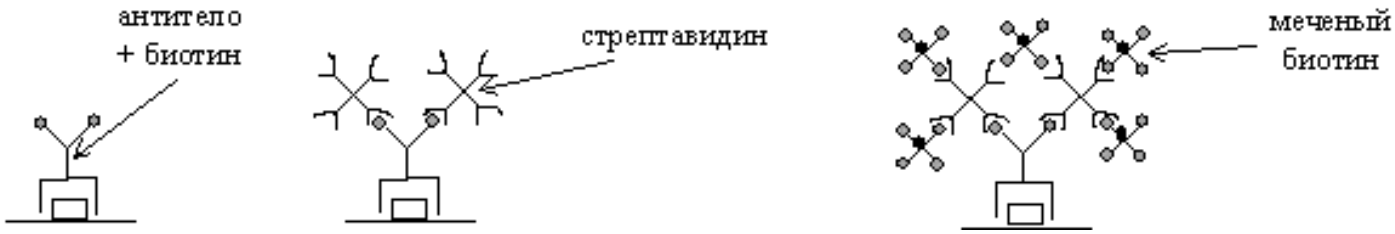


ELISA

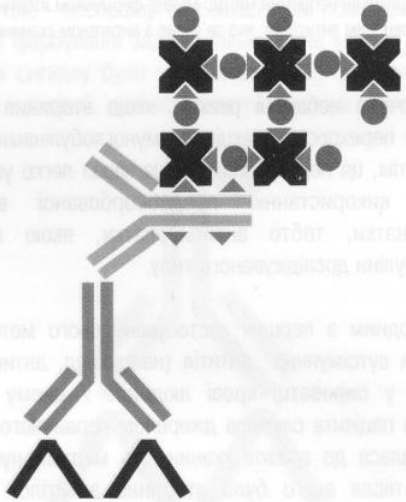
Кон’югат з використанням пари біотин- стрепт(авідин)



Система “ антиген +антитіло-біотин + мічений стрептавідин”



Система “антитіло - біотин + (стрепт)авідин + мічений біотин”



Мал.10 В технології ABC, авідин або стрептавідин-біотин-ферментний комплекс реагує з біотинізованими антитілами

Перше первинне антитіло (моноклональне)

Друге первинне антитіло (моноклональне)

вторинне антитіло (анті - кроляче)

вторинне антитіло (анті - мишаче)

Перший антиген тканини

Другий антиген тканини

Фермент HRP

Фермент AP

Блок подвійного фарбування

DAB

FAST Red

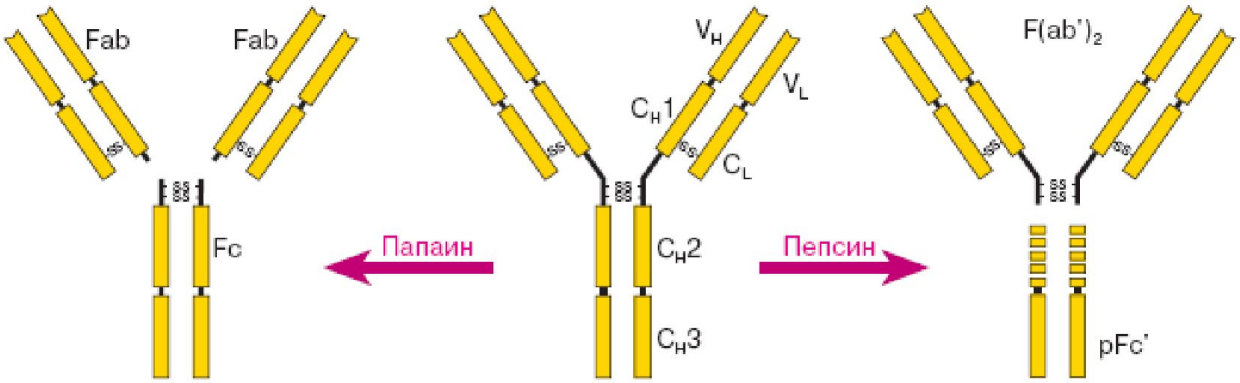
Полімер (Голкова молекула)

Мал.11 В технології LAB та LSAB, мічений ферментом (стрепт)авідин реагує з біотинільованими вторинними антитілами

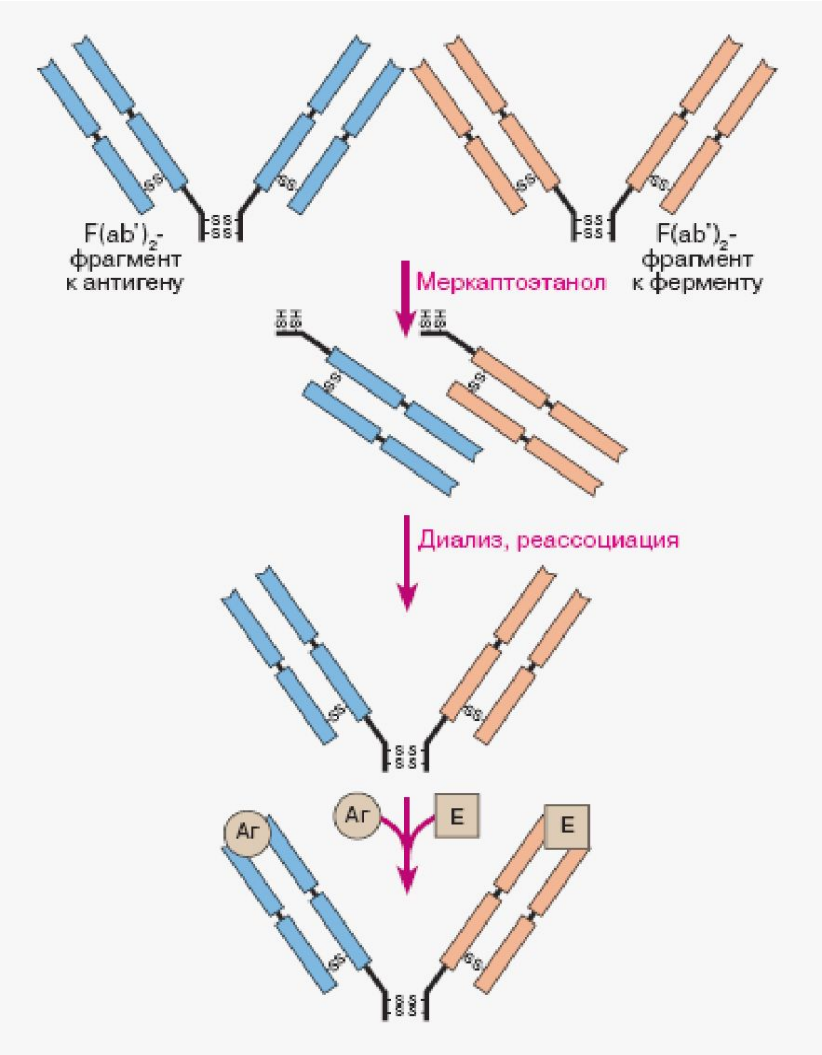
ОСОБЛИВОСТІ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

Отримання кон’югату - комплексу антигену і фермента методом гібридних антитіл.

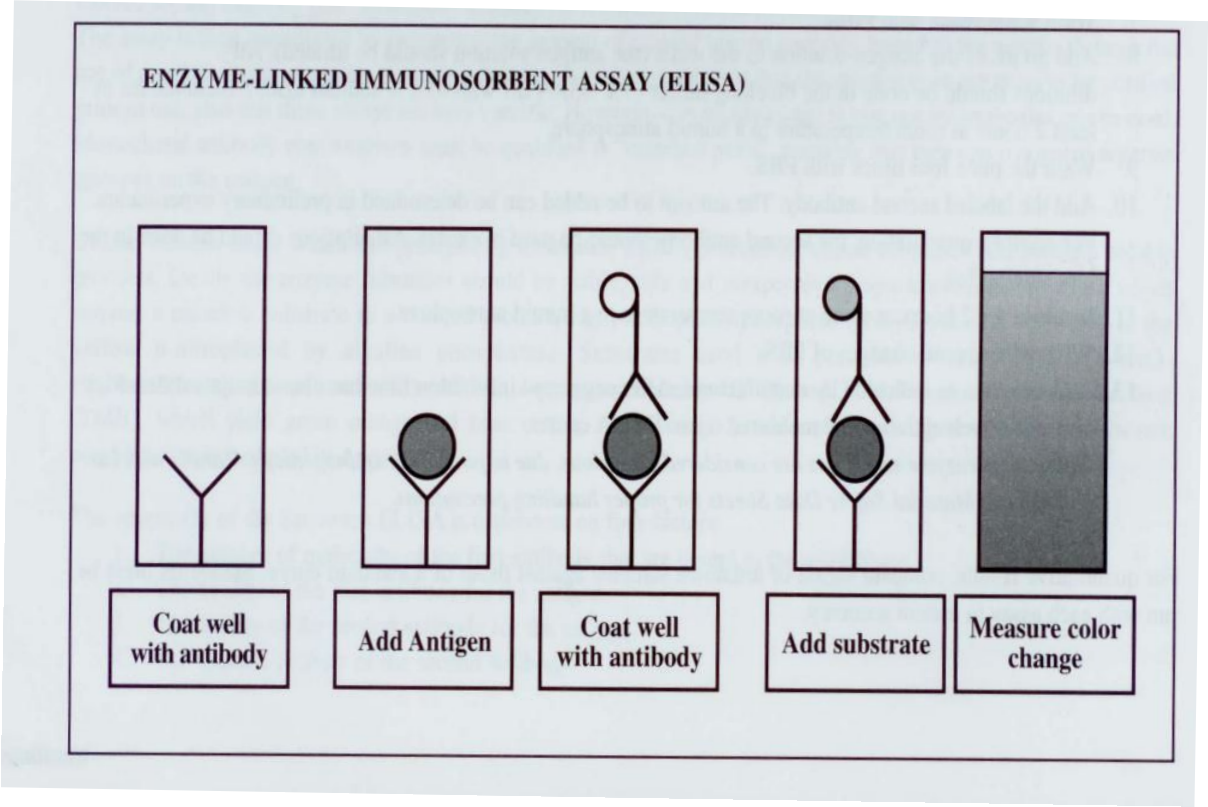
1 етап - накопичення протеолітичних фрагментів. Антитіло класу G: дія папаїну і пепсину.



Отримання комплексу антигена і фермента методом гібридних антитіл. 2етап- власне створення гібридних антитіл.

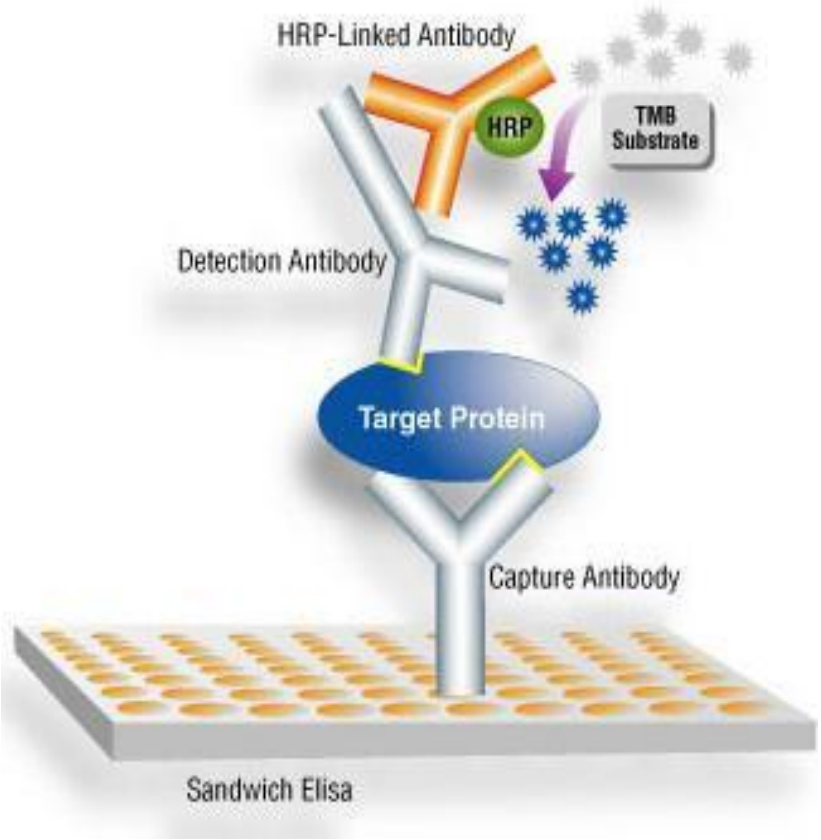


ELISA- E*nzyme-*L*inked* I*mmuno*S*orbent* A*ssay*
Сорбційний імуноферментний аналіз

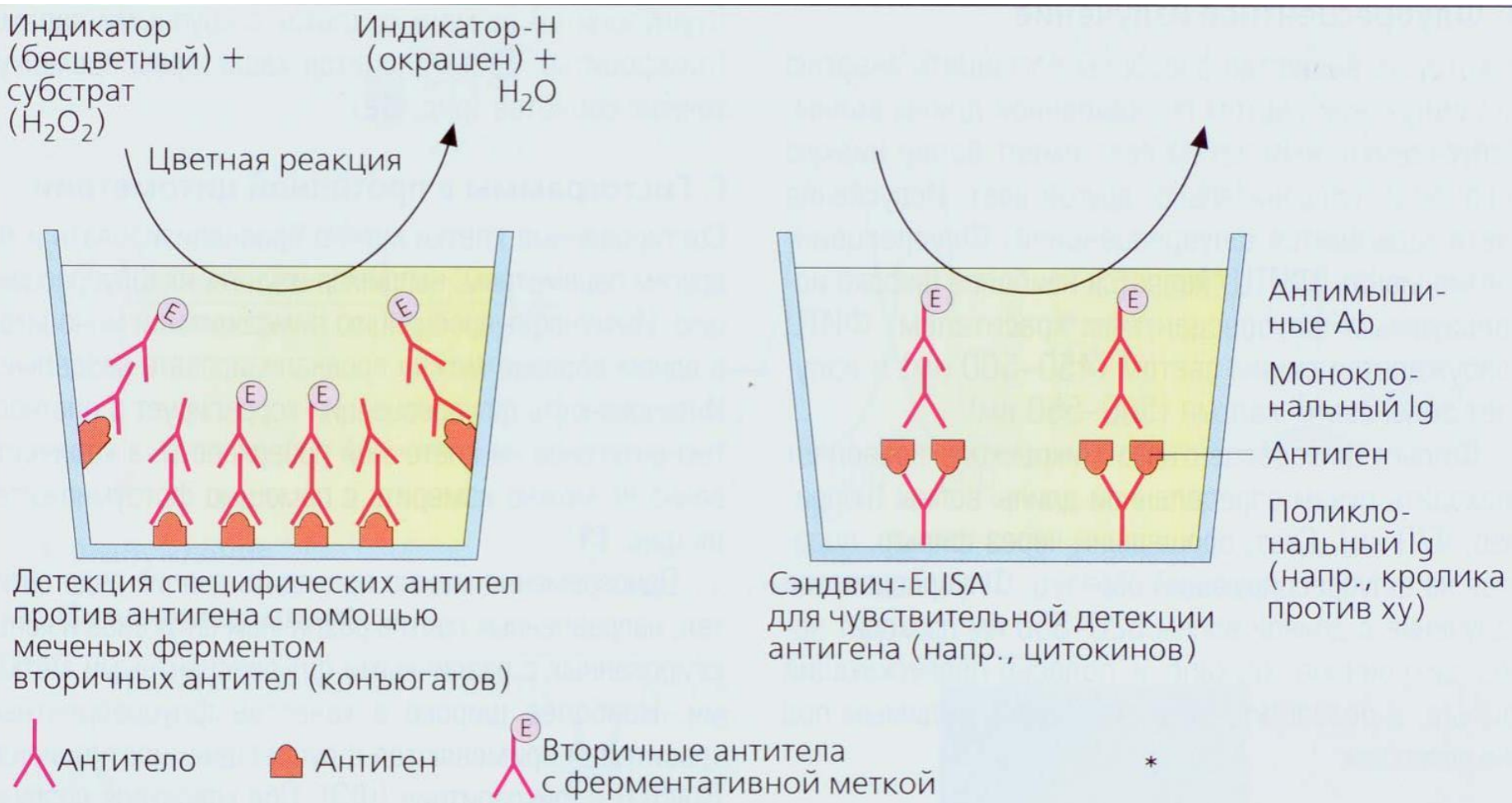


ELISA- E*nzyme-*L*inked* I*mmuno*S*orbent* A*ssay*

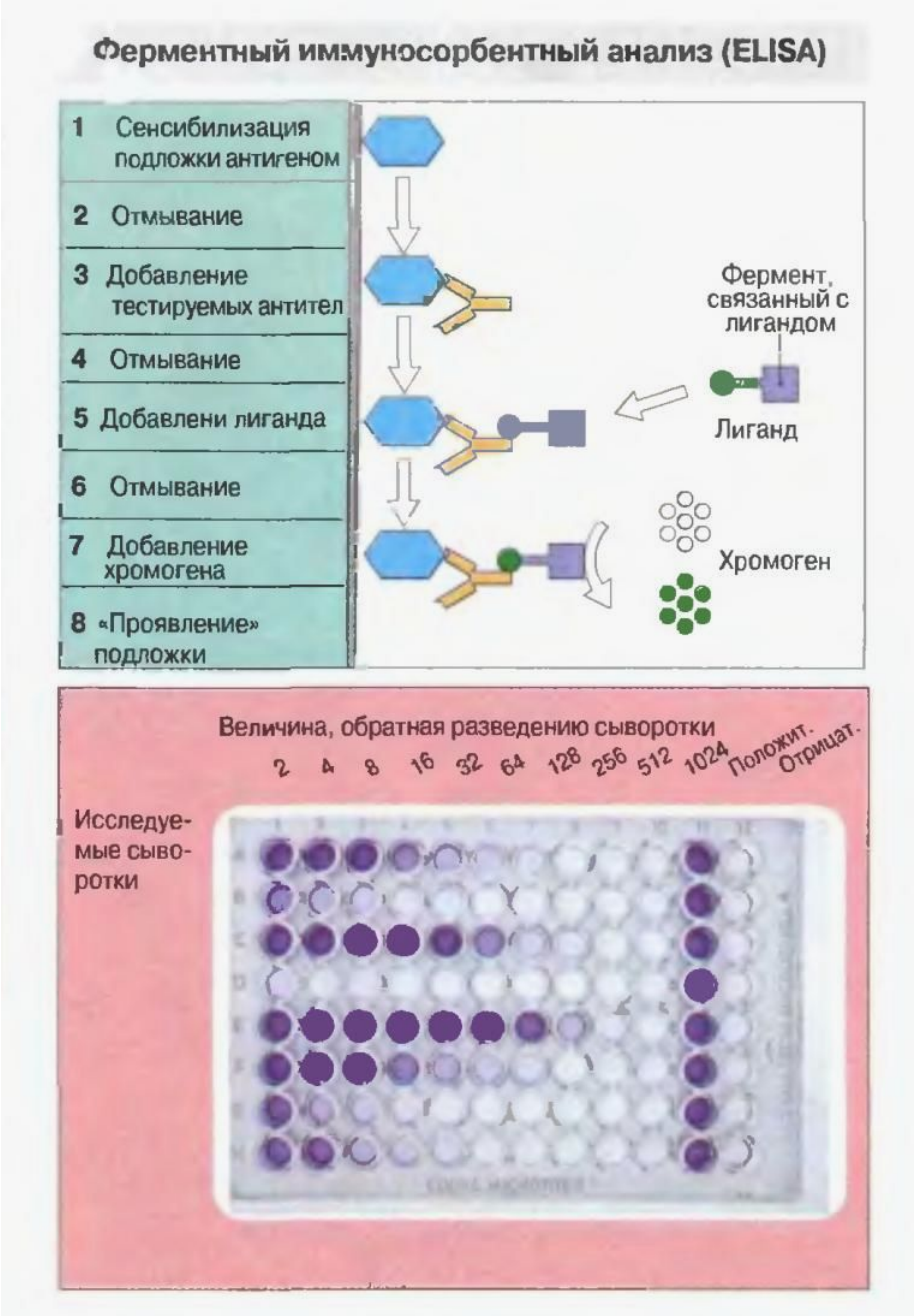
Сорбційний імуноферментний аналіз



ELISA

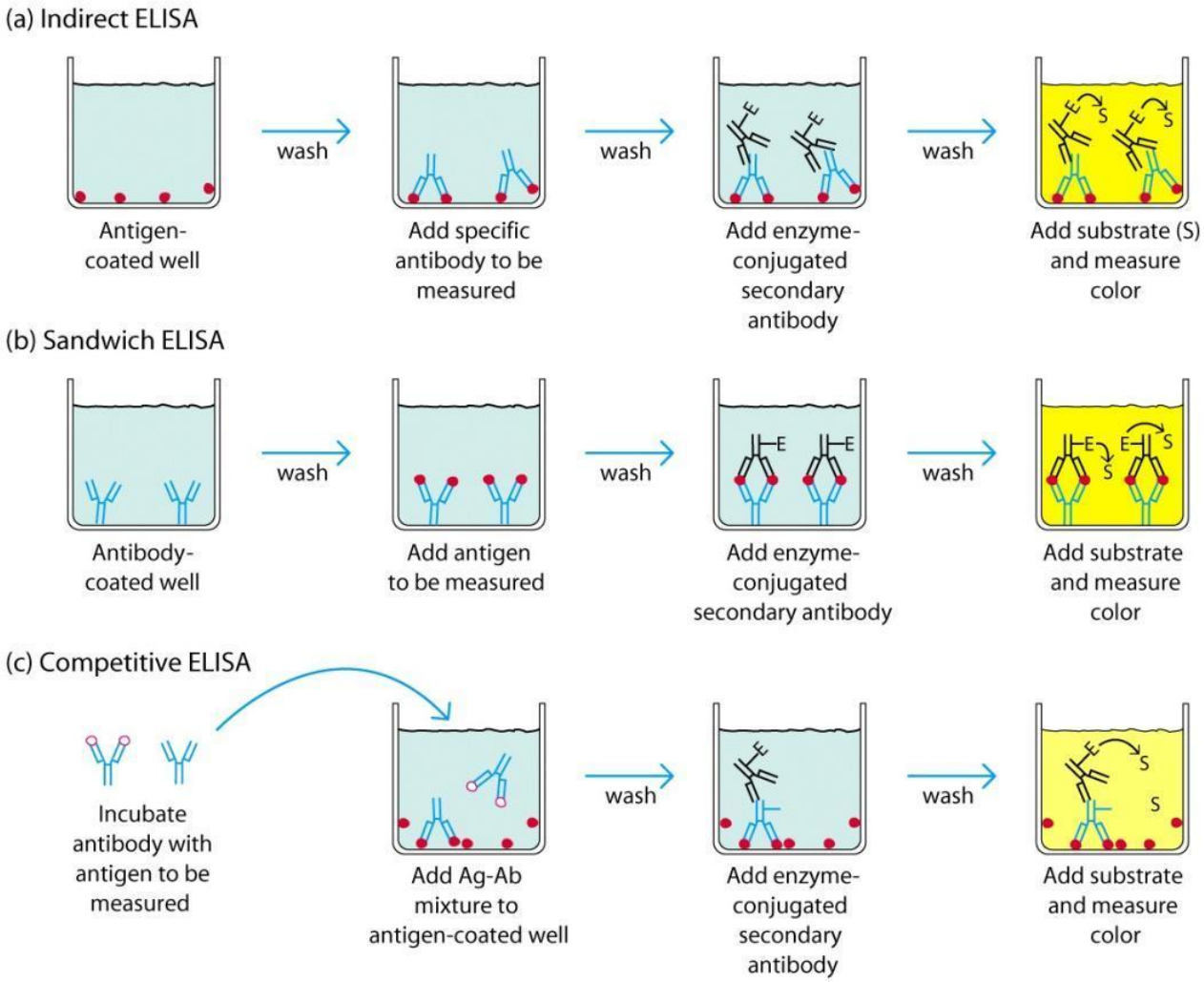


А. Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA)

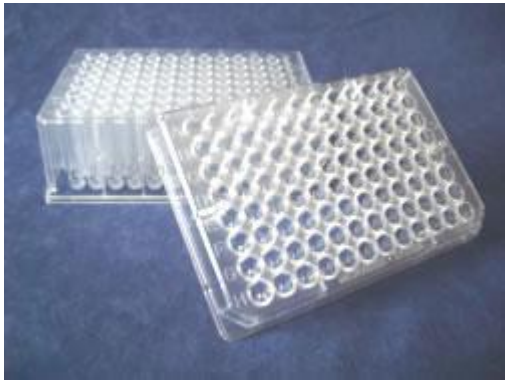

Ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA)
1 Сенсибилизация подложки антигеном
2 Отмывание
3 Добавление тестируемых антител
4 Отмывание
5 Добавлени лиганда
6 Отмывание
7 Добавление хромогена
8 «Проявление» подложки
Фермент, связанный с лигандом
Лиганд
Хромоген
Величина, обратная разведению сыворотки
2 4 8 16 32 64 128 256 512 1024 Положит. Отрицат.
Исследуемые сыворотки

ПРЯМА *ELISA*

Різновиди методу **ELISA**



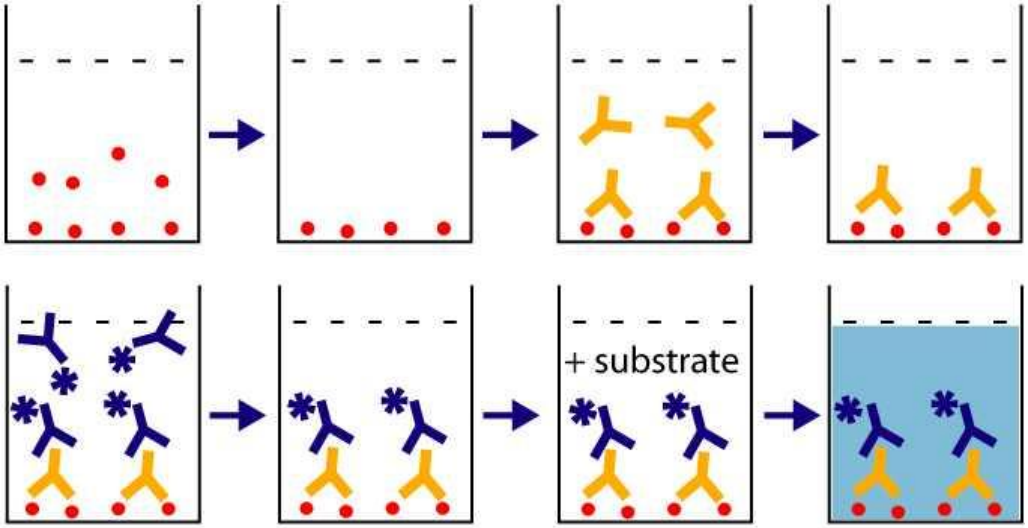
ELISA-Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
Сорбційний імуноферментний аналіз (1) непрямий метод

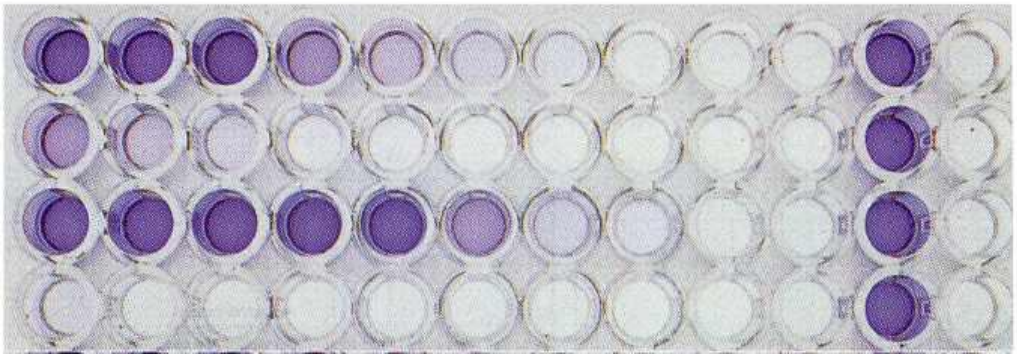


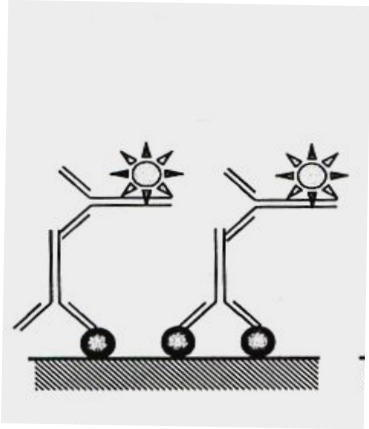
What you need to do the assay

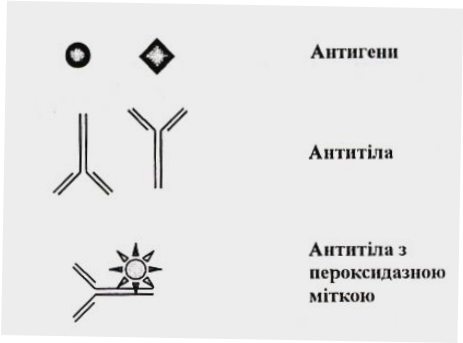
- Purified antigen (if you want to detect or quantify antibody).
- Purified antibody (if you want to detect or quantify antigen).
- Standard solutions (positive and negative controls).
- Sample to be tested.
- Microtiter dishes: plastic trays with small wells in which the assay is done.
- Wash fluid (buffer).
- Enzyme-labeled antibody and enzyme substrate.
- ELISA reader (spectrophotometer) for quantitative measurements.

Метод визначення антитіл (непряма **ELISA)**





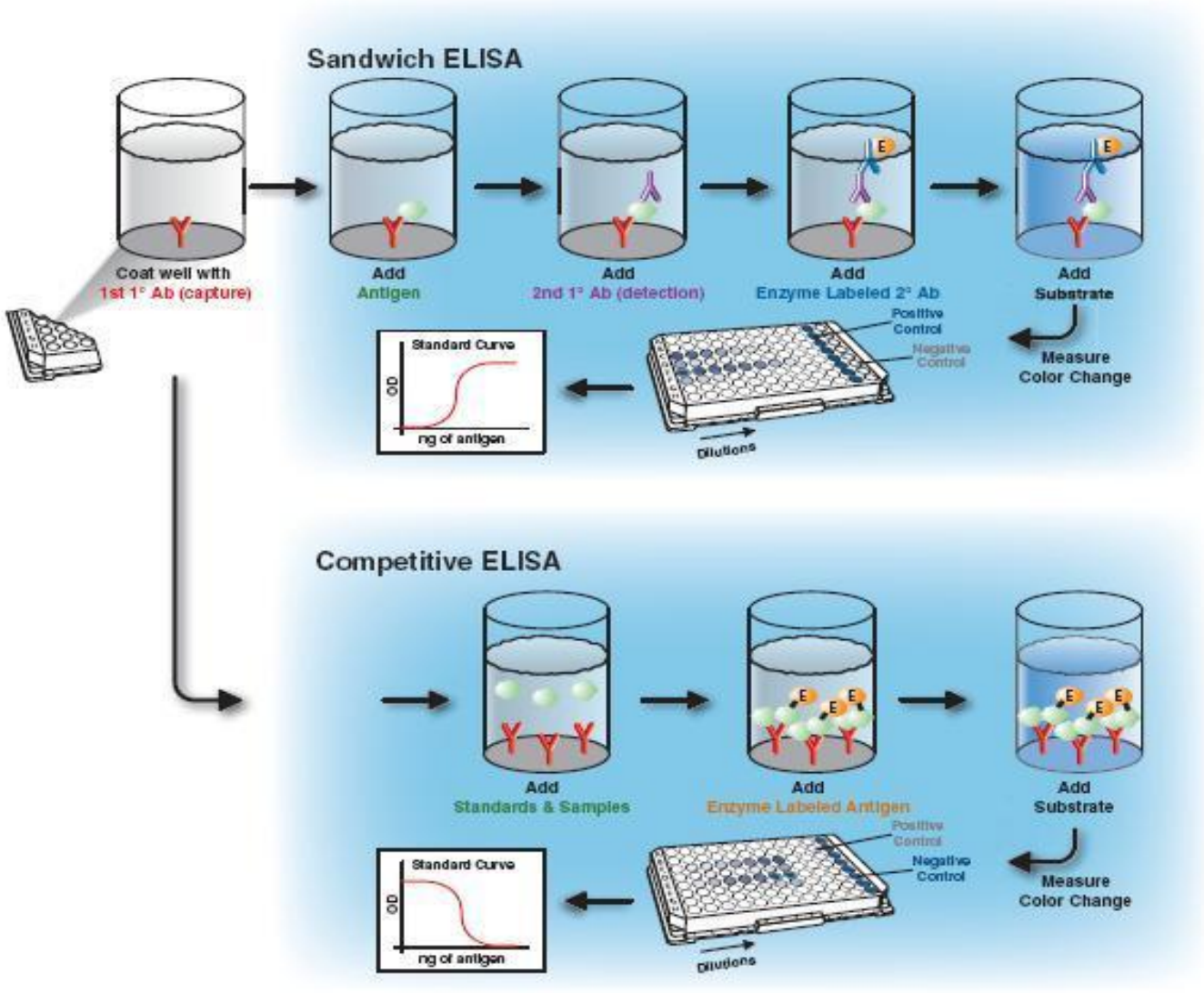


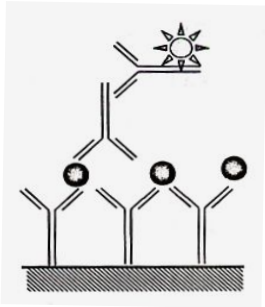


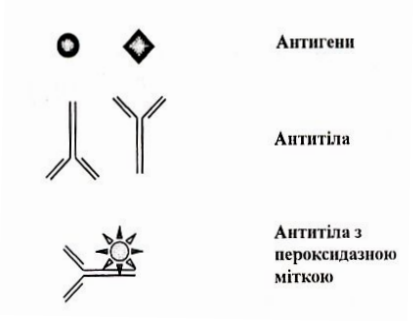
ELISA :1- *сандвіч-метод визначення антигену ; 2-конкурентний метод визначення антигену*

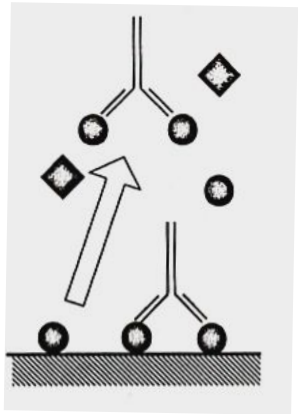
1

2





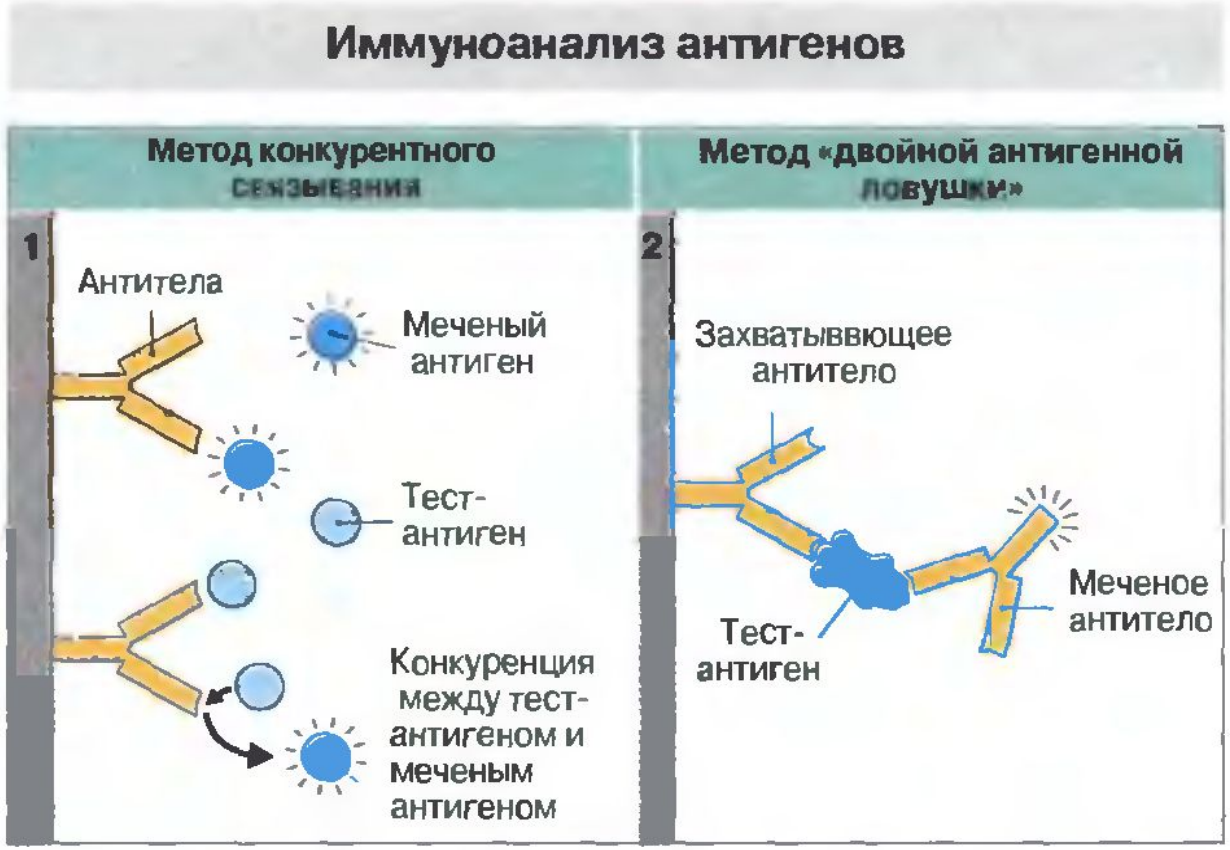




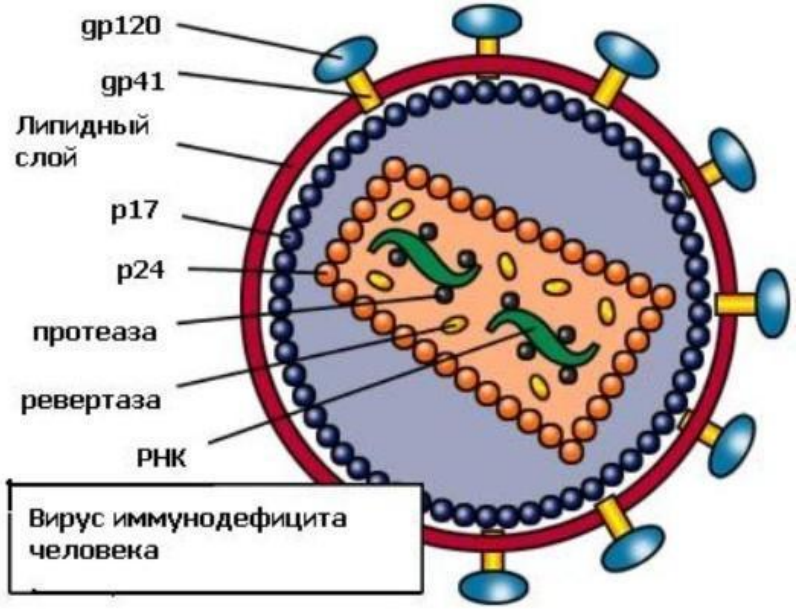
1 варіант конкурентної ELISA

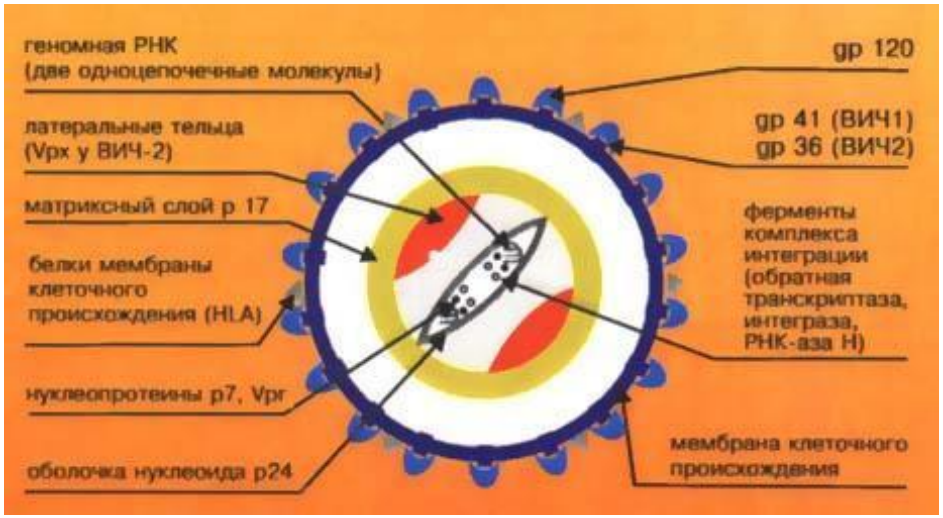
2 варіант цього ж методу

Метод визначення антигенів



Будова вірусу імунодефіциту людини

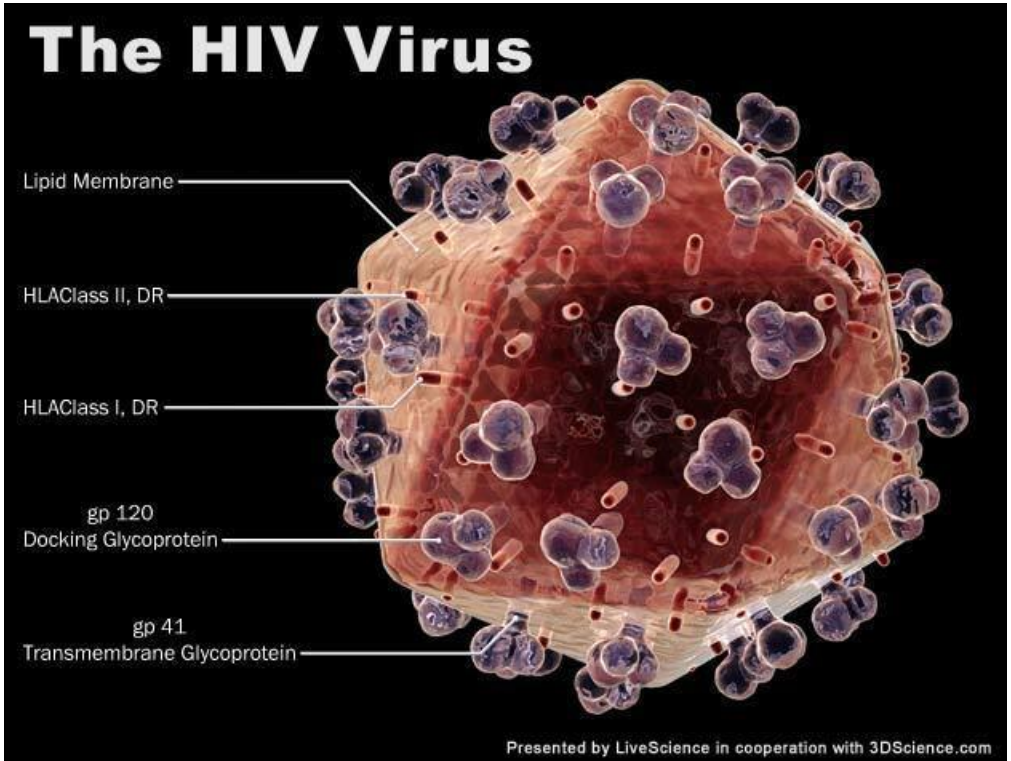




Віріони ВІЛ мають вид сферичних часточок, діаметр яких складає приблизно 100—120 нм. Оболонка утворена подвійним шаром ліпідів і містить ряд білків, її походження - від зовнішньої мембрани клітини-господаря. Отже, відбруньковуючись, вірус може захопити частину зовнішньої мембрани клітини-господаря, що містить "експресовані" на ній молекули МНС, а саме людські лейкоцитарні антигени HLA класів I, II і молекули адгезії. Завдяки цьому певна частина пацієнтів, які проходять тест на наявність антитіл до ВІЛ з використанням методу ELISA, може мати ***хибно-позитивні результати*** (false positive), оскільки мають антитіла проти молекул HLA, які також є на мембрані клітини-хазяїна (0,02-0,5%). ***Хибно-негативні*** (false negative) результати можуть бути отримані, якщо сироватки пацієнтів були в стадії сероконверсії – **зазору** = віконця (window) у часі між інфікуванням і напрацюванням специфічних антитіл до вірусу (3 — 5%) .

Хибно-позитивні результати

"For instance, some, but not all, people who have had blood transfusions, prior pregnancies or an organ transplant will make HLA antibodies. And some, but not all, test kits (both ELISA and Western blot) will be contaminated with HLA antigens to which these antibodies can react. Only if these two conditions coincide might you get a false-positive due to HLA cross-reactivity".



ELISA Activity

(n_animation.mov, p_animation 1.mov)

An HIV ELISA, sometimes called an HIV enzyme immunoassay (EIA) is the first and most basic test to determine if an individual is positive for a selected pathogen, such as HIV. The test is performed in a 8 cm x 12 cm plastic plate which contains an 8 x 12 matrix of 96 wells, each of which are about 1 cm high and 0.7 cm in diameter. The next page illustrates how an HIV ELISA is performed.

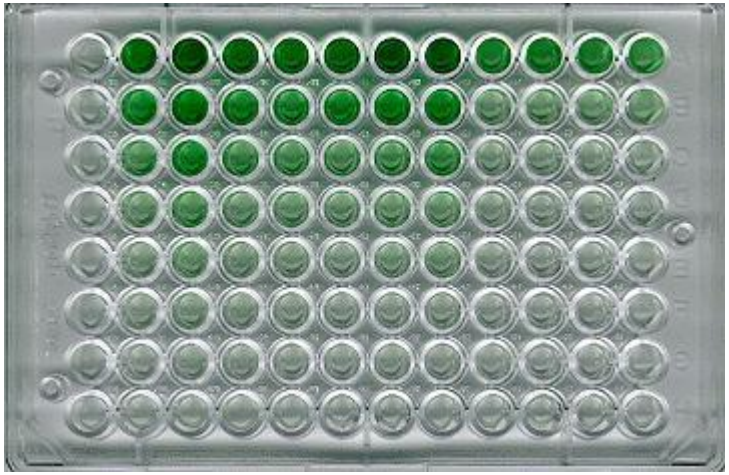


Plate ELISA

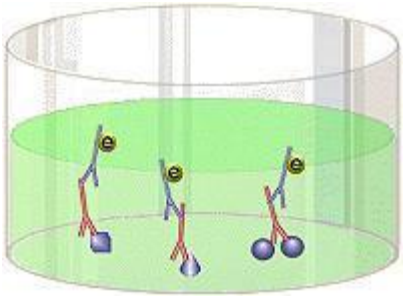
The ELISA Method (n_animation.mov, p_animation 1.mov)

Partially purified, inactivated HIV antigens pre-coated onto an ELISA plate

Patient serum which contains antibodies. If the patient is HIV+, then this serum will contain antibodies to HIV, and those antibodies will bind to the HIV antigens on the plate.

Anti-human immunoglobulin coupled to an enzyme. This is the second antibody, and it binds to human antibodies.

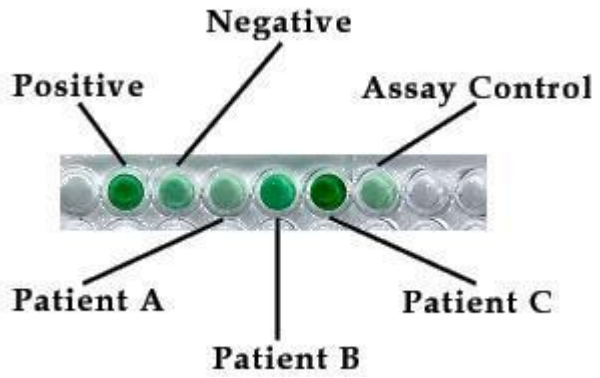
Chromogen or substrate which changes color when cleaved by the enzyme attached to the second antibody.



Positive ELISA Test

Negative ELISA Test

ELISA Activity
ELISA data from three patients



Positive Control	Negative Control	Patient A	Patient B	Patient C	Assay Control
1.689	0.153	O.055	0.412	1.999	0.123

Above is ELISA data from three patients. Numbers are expressed as optical density at 450 nm. The cutoff value indicating a positive result is 0.500. Optical densities of 0.300 to 0.499 are indeterminate and need to be retested. Values below 0.300 are considered to be negative. In most cases, a patient will be retested if the serum gives a positive result. If the ELISA retests are positive, the patient will then be retested by western blotting analysis

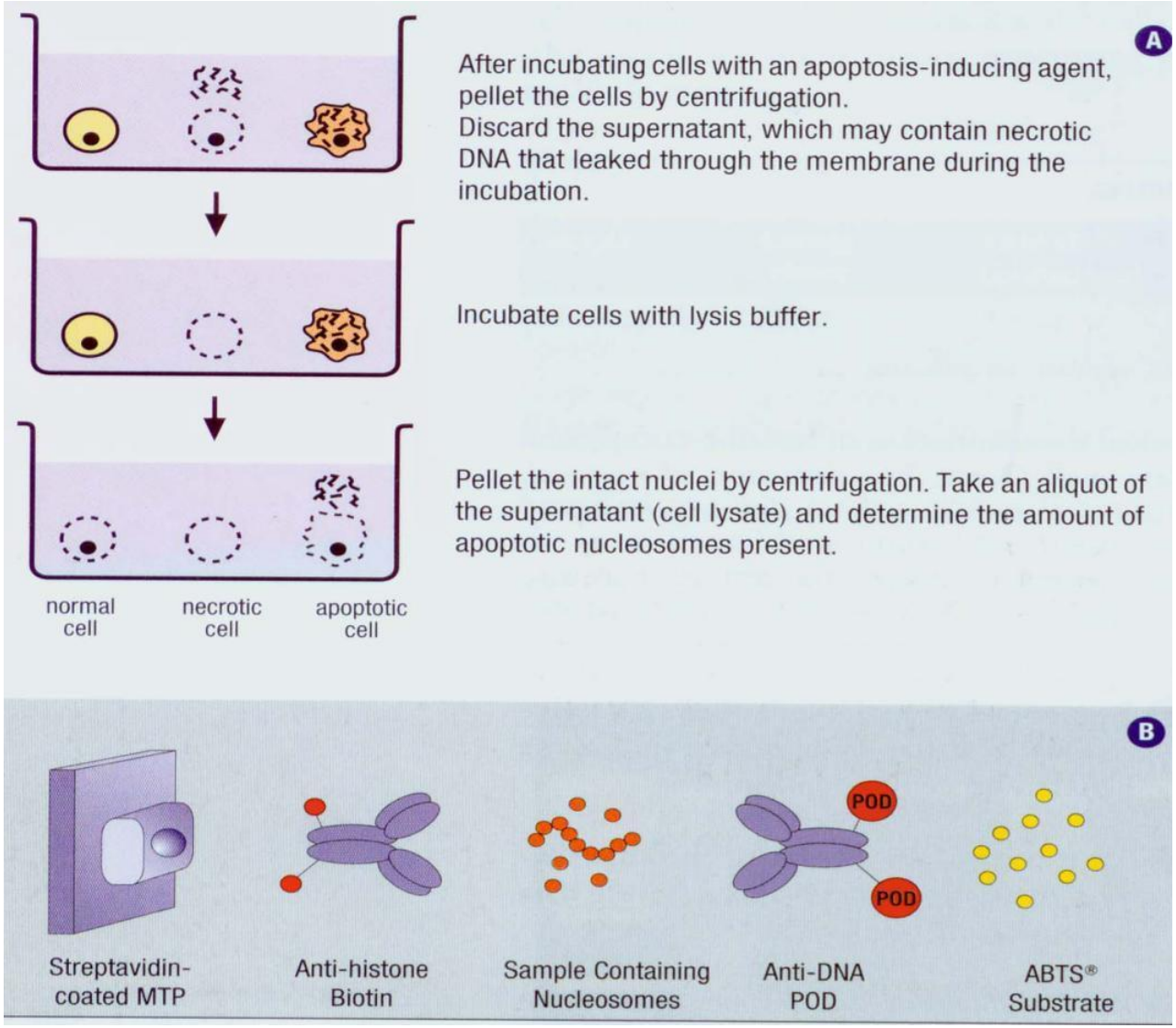
Перша російська тест-система для виявлення сумарних антитіл до ВІЛ-1,2 (1999)

Використання методу ELISA для детекції рівня клітинної загибелі-

Cell Death Detection ELISA ^{PLUS} Kit

панель А-приготування проб;

панель В- власне ELISA



p53 pan ELISA-one-step immunoreaction – Photometric enzyme immunoassay for the quantification of p53 in cells, homogenates, plasma, or serum

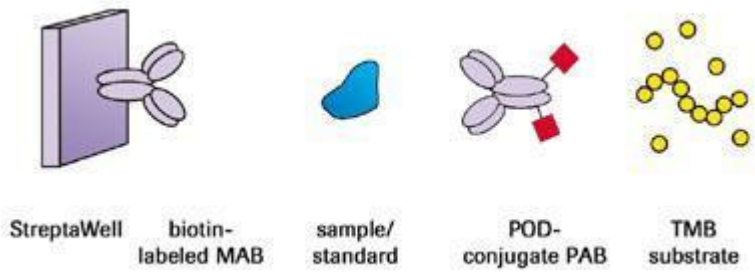
Contents

- Anti-human-p53 pan-peroxidase (POD), polyclonal from sheep, lyophilizate
- Human p53 standards, lyophilized (six vials, from 0 pg/ml up to 1,200 pg/ml; see lot-specific data)
- Incubation Buffer/Sample Diluent, 50 ml, ready-to-use solution
- 10x Washing Buffer, 100 ml
- TMB Substrate Solution, 26 ml, ready-to-use
- TMB Stop Solution, 8 ml, ready-to-use
- Streptavidin-coated Microplate, 96-well; 8-well modules in a frame, precoated with anti-p53-biotin monoclonal antibody from mouse
- Self-Adhesive Plate Cover Foils, 2 foils

Principle

The p53 pan ELISA assay is based on the quantitative "sandwich enzyme-immunoassay" principle using two monoclonal antibodies directed against human p53. During a one-step incubation in the precoated wells of the microplate, p53 from the sample binds to the plate surface, and the peroxidase (POD)-conjugated detection antibody interacts with the immobilized p53. Following a washing step, the POD bound within the "sandwich" complex is detected with the colorimetric substrate tetramethylbenzidine (TMB), and levels are spectrophotometrically determined. The kit provides standards with defined concentrations of p53, allowing for the creation of a standard calibration curve; unknown sample values are calculated from this plot.

Figure 1: Test principle.



Typical Experiment

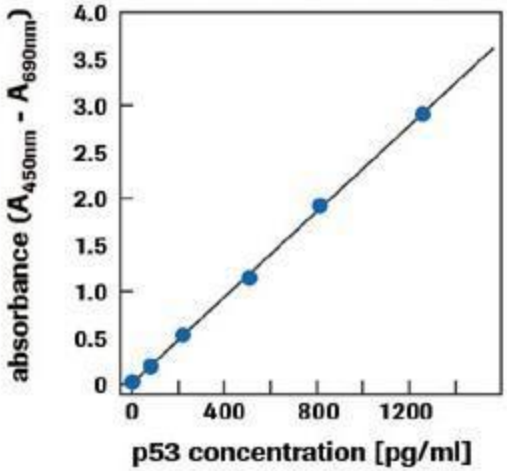


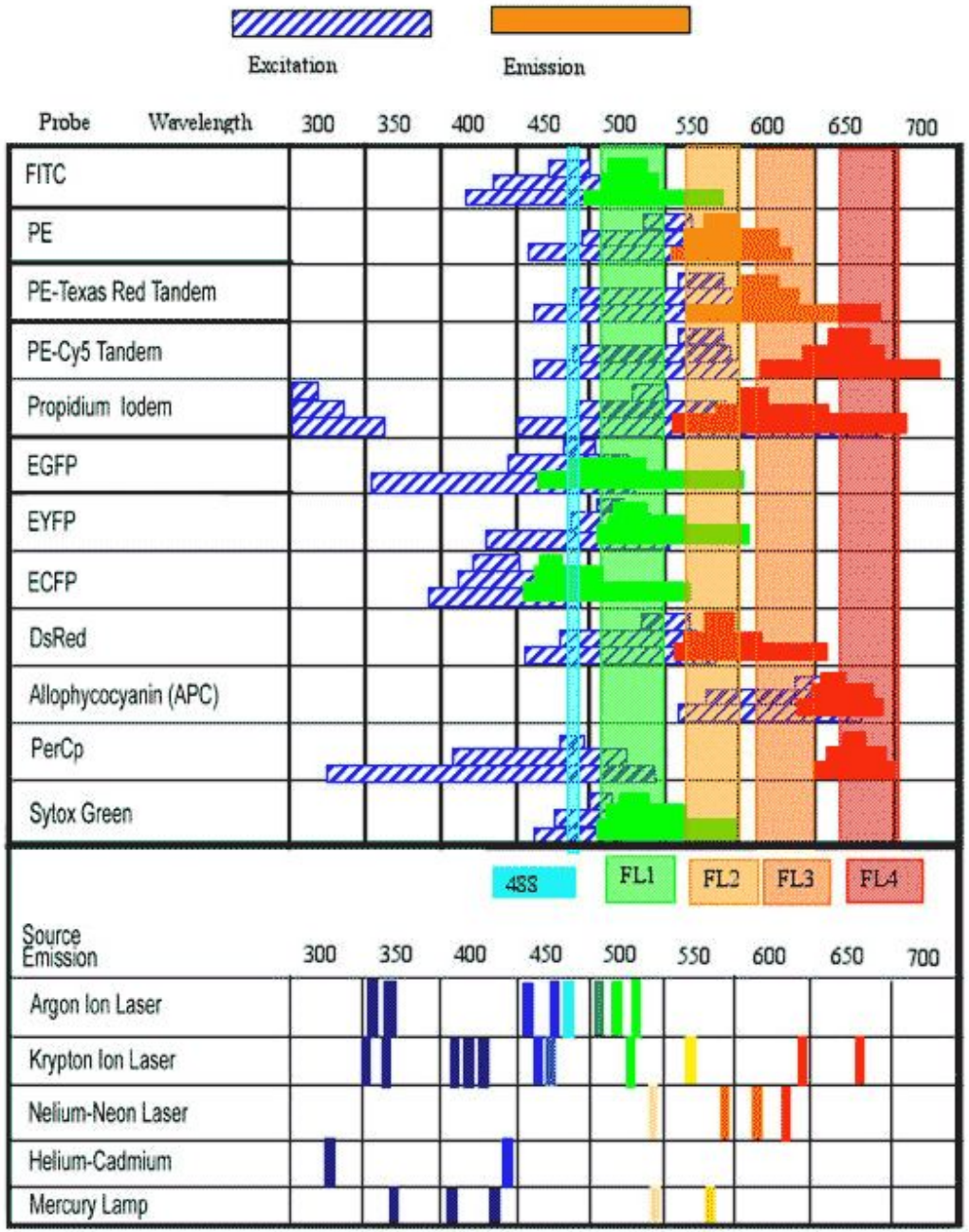
Figure 2: Typical standard curve, plotted with each experiment, and used for the calibration of prediluted serum samples.

Метод імунофлуоресценції

Флуоресцентне випромінювання

Деякі речовини здатні поглинати фотони певної енергії (довжини хвилі) при опроміненні світлом певної довжини хвилі. Світло (фотони), що випромінюється ними потім, має нижчу енергію й, отже, більшу довжину хвилі і в зв'язку з цим інший колір світла. Таким чином виділяють хвилю збудження (excitation) або спектр поглинання та хвилю випромінення=емісії (emission =испускать = emit). **Таке випромінювання світла називається флуоресценцією.**

В 1944 р. Albert Coons показав, що антитіла можна мітити молекулами, які флуоресціюють. Коли молекула антитіла зв'язується з флуоресцентним барвником **(флуорохромом)**, імунний комплекс, що містить це мічене антитіло, можна детектувати за рахунок емісії після збудження світлом певної довжини хвилі. Цю детекцію (світло, яке випромінюють після збудження флуорохроми) проводять з використанням флуоресцентного мікроскопа, який має у своєму складі джерело УФ – випромінення, або проточного цитофлуориметра, що містить лазер. Саме такий підхід отримав загальну назву "Методи з використанням **імунофлуоресценції**".



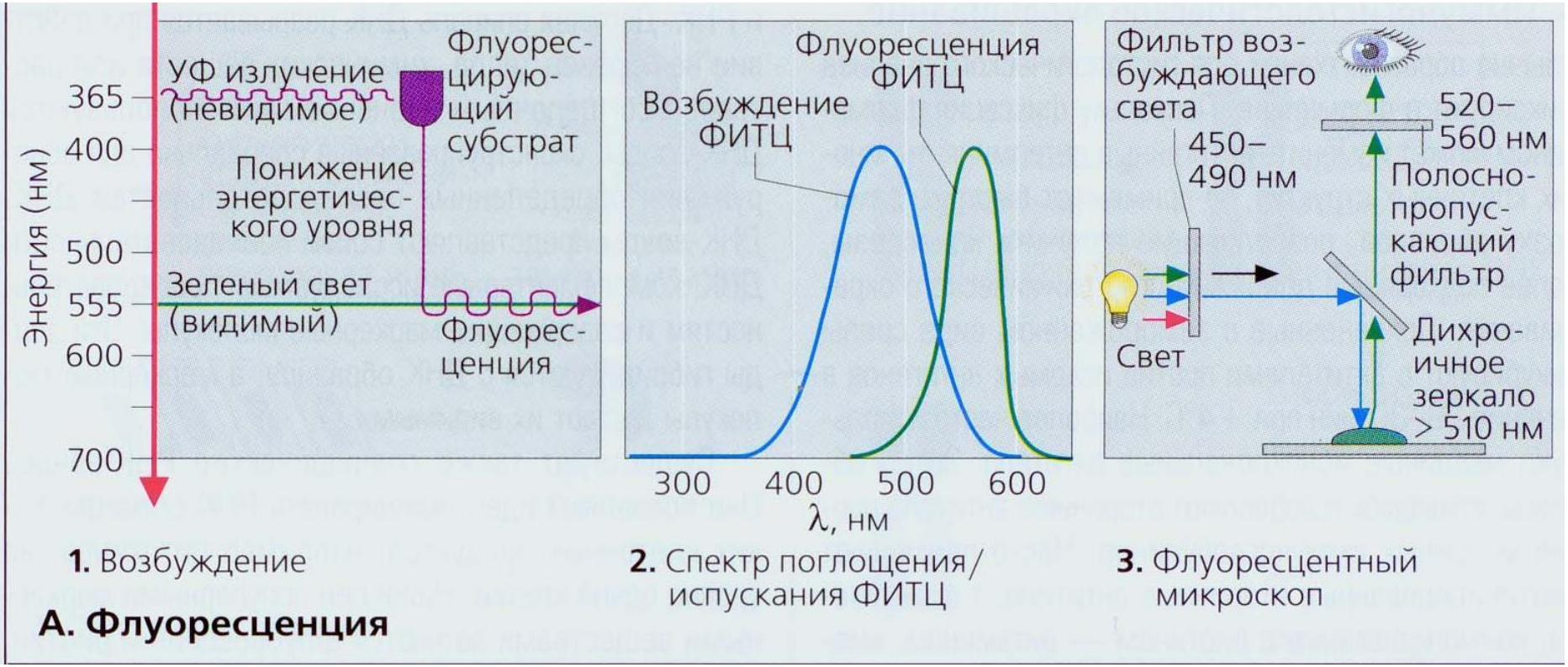
Fluorescence spectra of commonly used fluorochromes. Excitation spectra is represented by the gray lines while emission spectra is in black. The bottom part of the table summarizes the emission wavelengths of various light sources used in flow cytometry. The 488nm line of the argon ion laser is extended over the spectra. (From Practical Flow Cytometry, Third Edition, Howard M. Shapiro. P. 245).

Таблица 1. Спектральные характеристики широко применяемых флюорохромов			
Флюорохром	Максимумы **поглощения** (нм)	Максимумы **излучения** (нм)	**Цвет**
Флуоресцеин (FITC)	494	518	зеленый
Родамин (TRITC)	550	580	красный
Texas Red™	595	615	красный
Р-фикоэритрин (PE)	565	575	оранжевый/красный

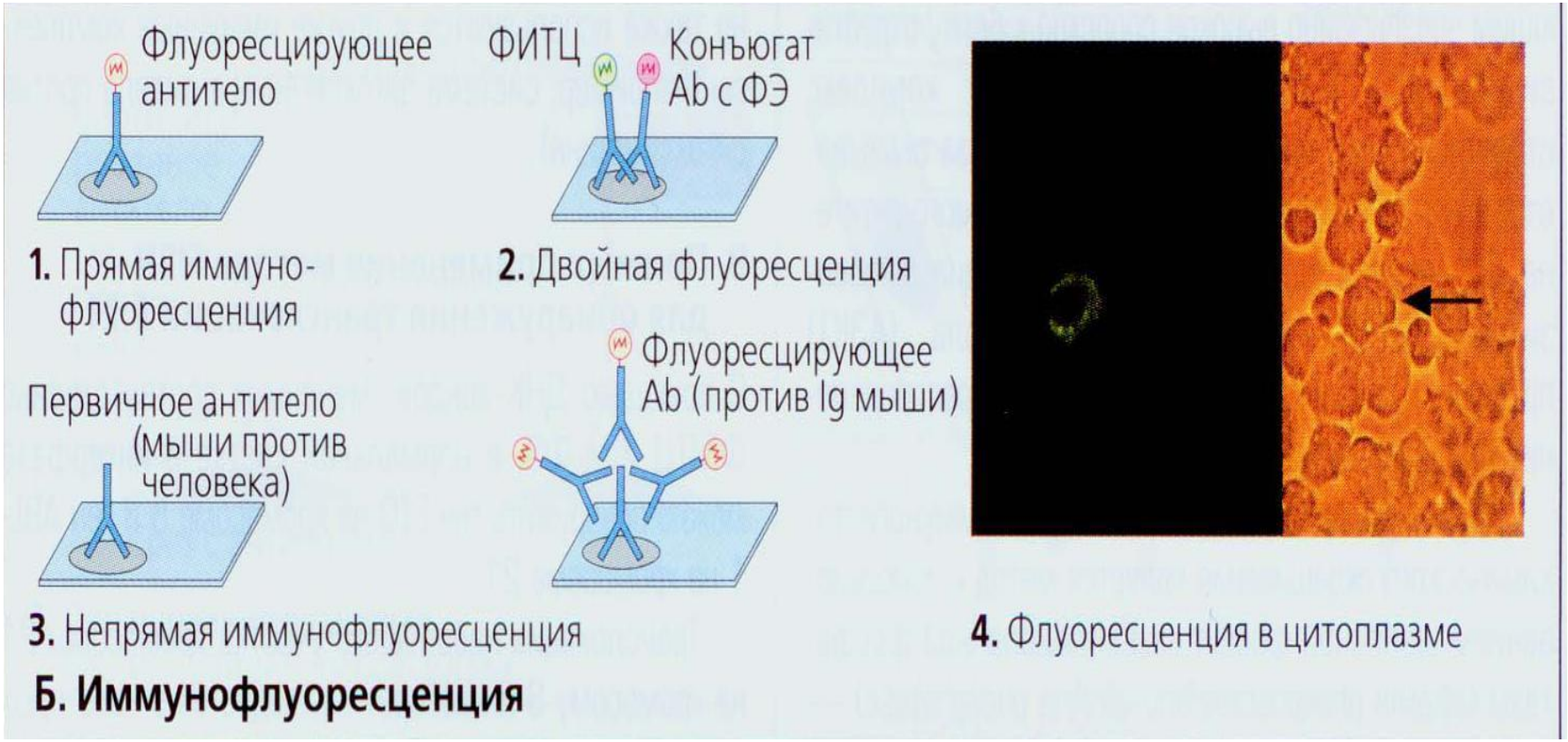
- ***Флуоресцеїн* (*Fluorescein*)-** органічний барвник, який широко використовують в імунофлуоресценції. Хвиля збудження в діапазоні синього світла (490 нм) і емісії- зелено-жовтому діапазоні (517 нм).
- ***Флуоресцеїн - ізотіоціанат (ФІТЦ), Fluorescein isothiocyanate(FITC)*** похідне флуоресцеїну, широко використовується як флуоресцентний барвник. ФІТЦ збуджується синім світлом (494-495 нм) і випромінює в зелено-жовтому діапазоні (518- 521 нм).
- ***Родамін (Rhodamine)* -** органічний барвник, збуджується в жовто-зеленому діапазоні (515 нм) і випромінює в червоному діапазоні (546 нм). Оскільки його хвиля емісії лежить в більш довгохвильовому діапазоні, то саме він може бути використаним в імунофлуоресцентному аналізі з застосуванням двох барвників. Так, антитіло, специфічне до однієї антигенної детермінанти, мітиться флуоресцеїном, в той час як інше- родаміном. Локалізацію флуоресцеїн- міченого антигену візуалізують в жовто-зеленому діапазоні, і її легко відрізнити від емісії в червоному діапазон при зв'язуванні антигену з міченими родаміном антитілами. Саме таким чином можна візуалізувати два різних мембрано-зв'язані антигени на поверхні однієї і тієї ж клітини.
- **Фікоеритрин (Phycoerythrin=PE) –** високофлуоресцентний пігмент, який отримують з водоростей, хвиля збудження -565 нм - синя область, емісії- 575 нм - червона область спектра. Його вважають ~ в 30 раз ефективнішим, ніж флуоресцеїн.
- **DAPI- 4**,6-diamedine-2-phenylindole-dihydrochloride – хвиля збудження/емісії- 358/461нм- ДНК-звязуючий барвник, ядра яскраво блакитні.
- **Пропідій йодид (PI)-** хвиля збудження/емісії- 535/617 нм - ДНК-звязуючий барвник, ядра червоні.

Метод імунофлуоресценції

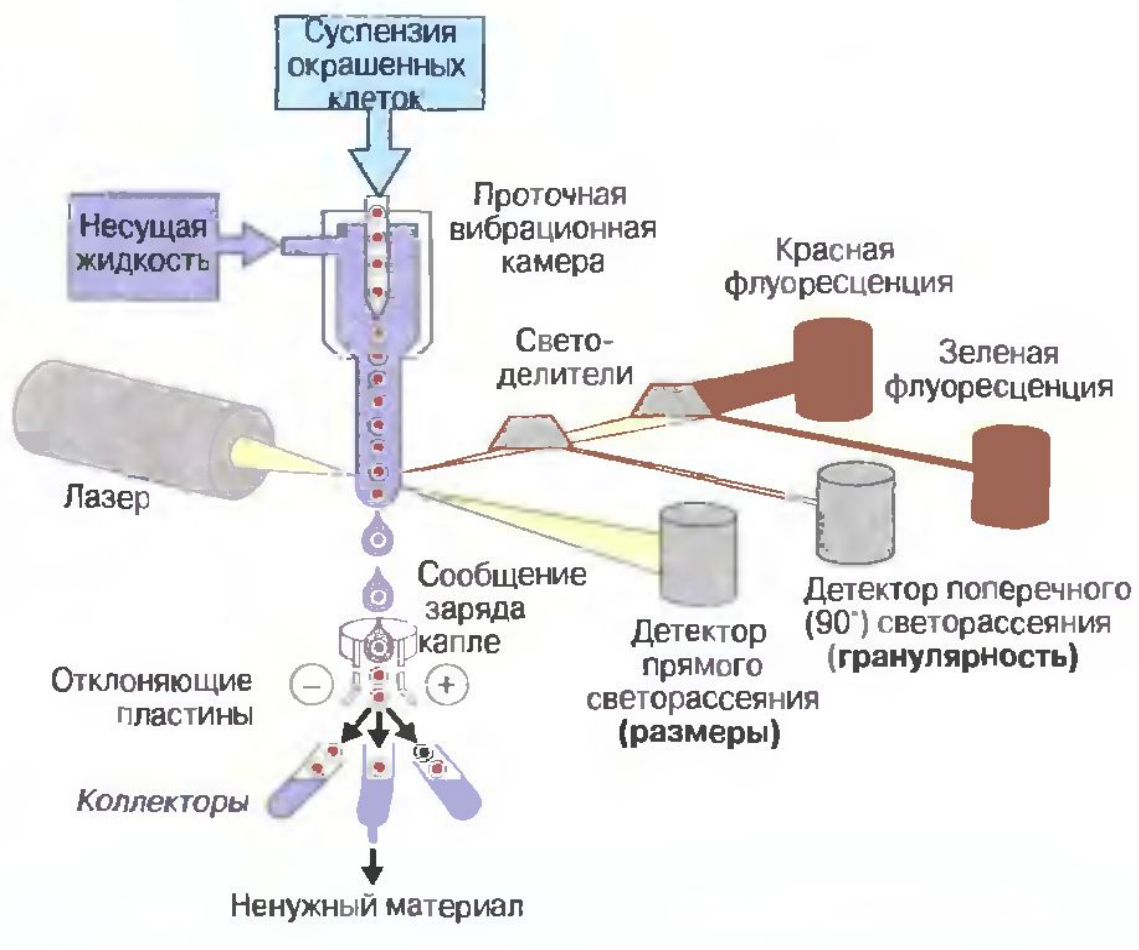
ФІТЦ- флуоресцеїн-ізотіоціанат- довжина хвилі збудження- 450-500 нм, випромінення (емісії)-500-550 нм



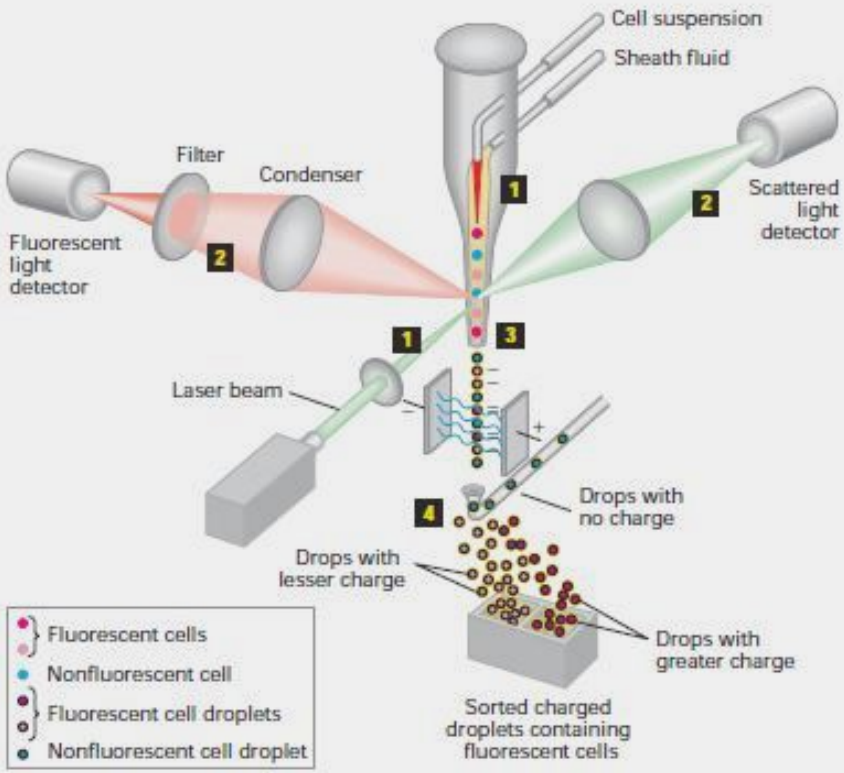
Метод імунофлуоресценції



Протоковий цитофлуориметр (клітинний сортер)

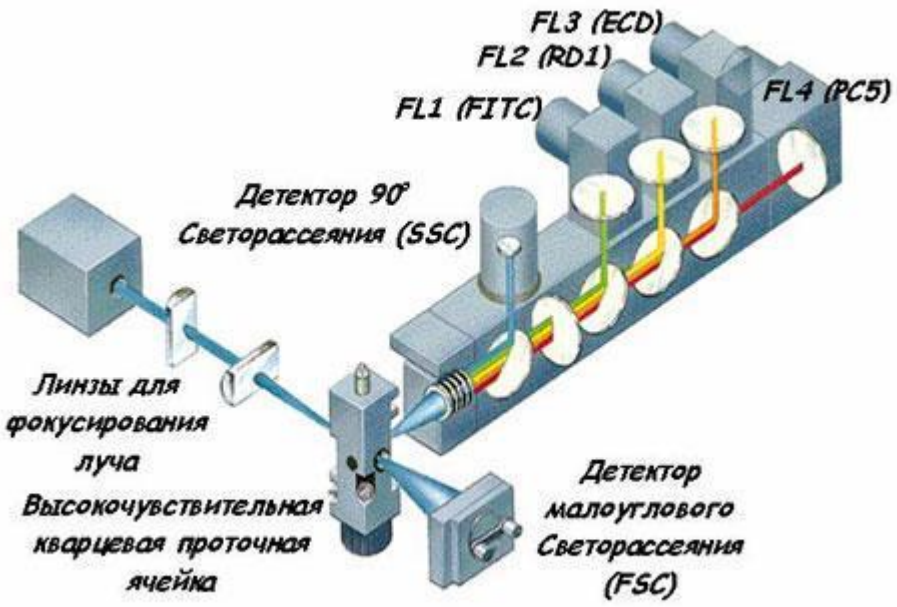


Протоковий цитофлуориметр (клітинний сортер)



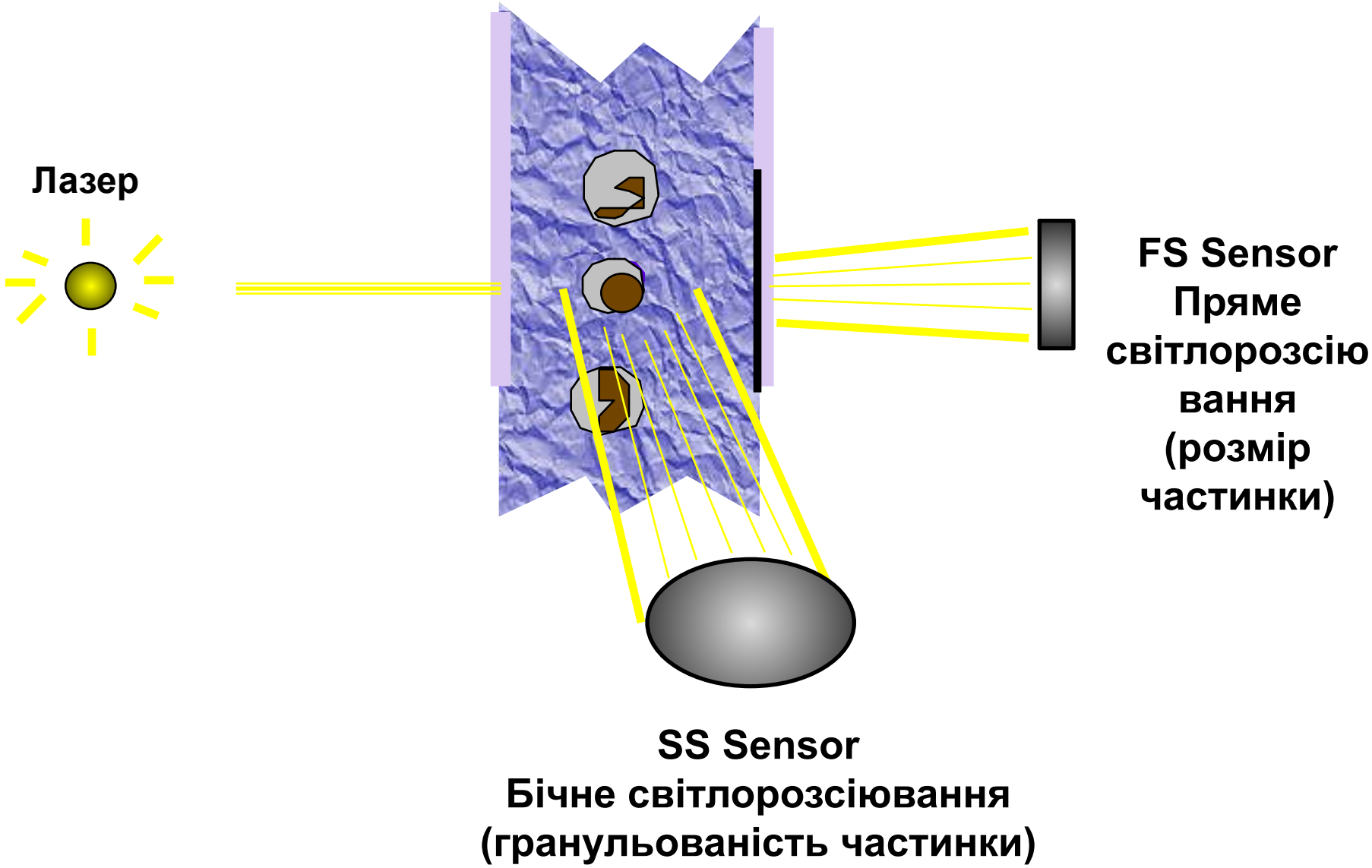
◀ EXPERIMENTAL FIGURE 5-34
Fluorescence-activated cell sorter (FACS) separates cells that are labeled differentially with a fluorescent reagent. Step 1: A concentrated suspension of labeled cells is mixed with a buffer (the sheath fluid) so that the cells pass single-file through a laser light beam. Step 2: Both the fluorescent light emitted and the light scattered by each cell are measured; from measurements of the scattered light, the size and shape of the cell can be determined. Step 3: The suspension is then forced through a nozzle, which forms tiny droplets containing at most a single cell. At the time of formation, each droplet is given a negative electric charge proportional to the amount of fluorescence of its cell. Step 4: Droplets with no charge and those with different electric charges are separated by an electric field and collected. It takes only milliseconds to sort each droplet, and so as many as 10 million cells per hour can pass through the machine. In this way, cells that have desired properties can be separated and then grown. [Adapted from D. R. Parks and L. A. Herzenberg, 1982, *Meth. Cell Biol.* **26**:283.]

Протоковий цитофлуориметр



Світлорозсіювання

- Клітини, які проходять через лазерний промінь, розсіюють (відбивають) світло
- Тінь, яку створює клітина, називається прямим світлорозсіюванням
- Також можливе розсіювання в інших напрямах
- Детектори, які реєструють пряме світлорозсіювання (**FSS– Forward Scatter Sensor)**, розташовані навпроти лазерного променя, а ті, що реєструють бічне світлорозсіювання (**SSS– Side Scatter Sensor)**, – під кутом 90° до лазерного променя


Лазер
FS Sensor
Пряме
світлорозсію
вання
(розмір
частинки)
SS Sensor
Бічне світлорозсіювання
(гранульованість частинки)

Пряме світлорозсіювання

По значенню сигналу прямого світлорозсівання можна оцінити розмір (тобто об'єм) клітини

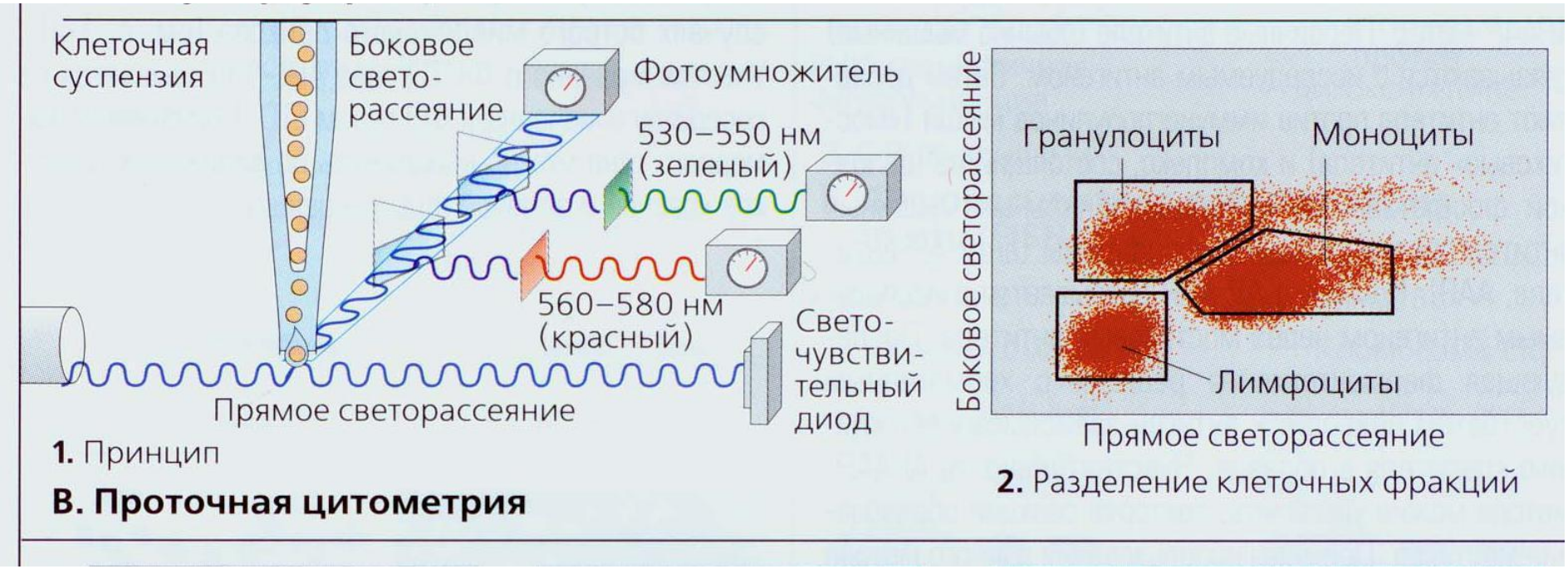
Великі клітини, наприклад, нейтрофіли, відкидають великі тіні; у менших по розміру клітин, наприклад, лімфоцитів, і тіні менші.

Бічне світлорозсіювання

Бічне світлорозсіювання, або ортогональне, є мірою неоднорідності внутрішньої структури клітини (наприклад, зернистості цитоплазми)

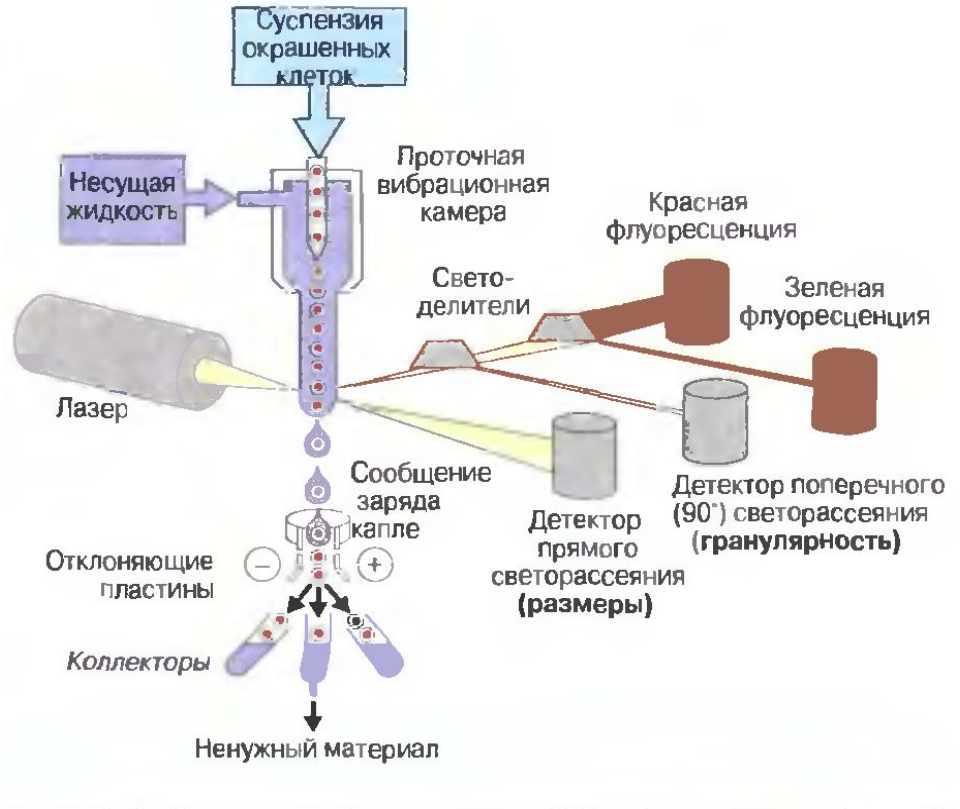
- Нейтрофіли з сегментованим ядром і високогранулярною цитоплазмою характеризуються високими показниками бічного світлорозсіювання
- Лімфоцити, які характеризуються високим ядерно-цитоплазматичним співвідношенням (невисокий вміст цитоплазми), мають нижчі показниками бічного світлорозсіювання

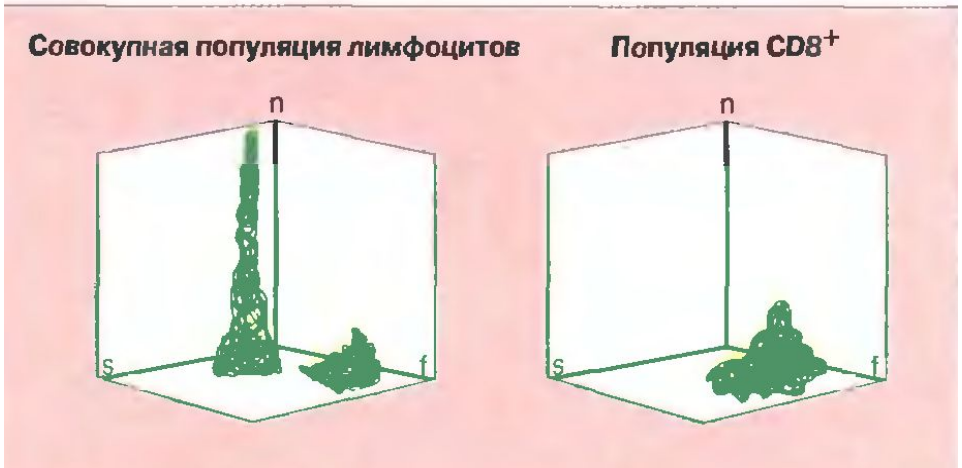
Протокова цитометрія



Флуоресценція при протоковій цито(флуоро) метрії та методи її реєстрації

- При протоковій цитофлуориметрії клітини мітять одним чи декількомами флуорохромами. Випромінення кожного флуорохрому можливо зареєструвати окремо, використовуючи відповідні фільтри.
- Детектори флуоресценції розташовані під кутом 90° до осі променя поряд з детекторами бічного світлорозсіювання.
- Може працювати від 2 до 13 детекторів флуоресценції **(FLS= Fluorescence light Sensor)**.
- Ці детектори складаються з фотоелектронних помножувачів (ФЕУ), що підсилюють низькі сигнали флуоресценції клітин, які мечені флуоресцентно.





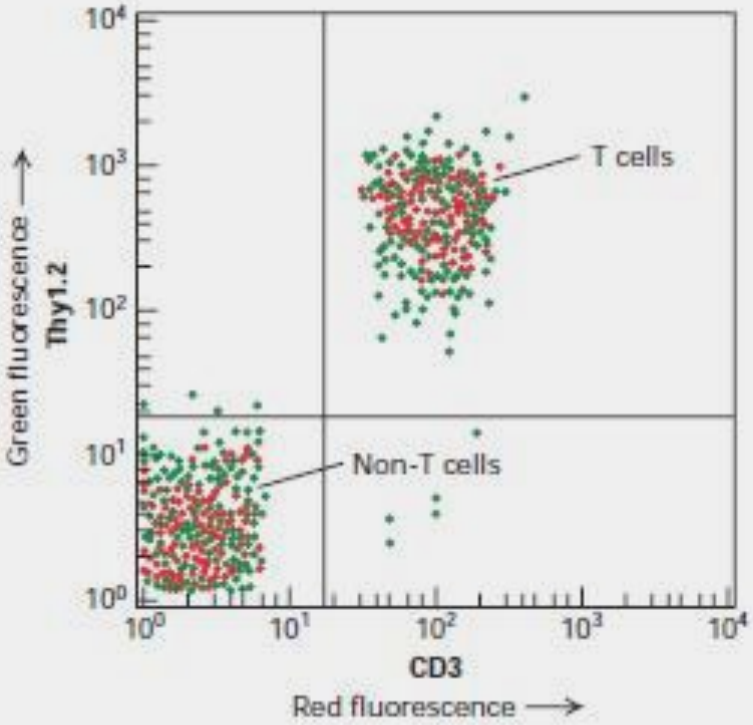
Виокремлення популяції лімфоцитів

Необхідно мати суспензію лімфоцитів;
антитіла до CD8, мічені флуоресцентним барвником.

На трьохмірній діаграмі (рис. б) показані розміри (**s**), число (**n**) і флуоресценцію

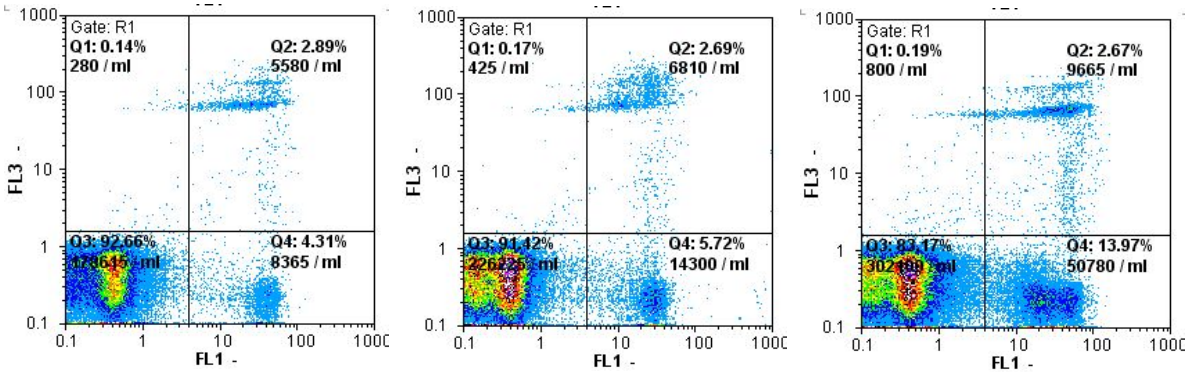
(**f**) лімфоцитів цілої клітинної

популяції і популяції CD 8+, які отримані на клітинному сортері з використанням анти- CD 8 антитіл



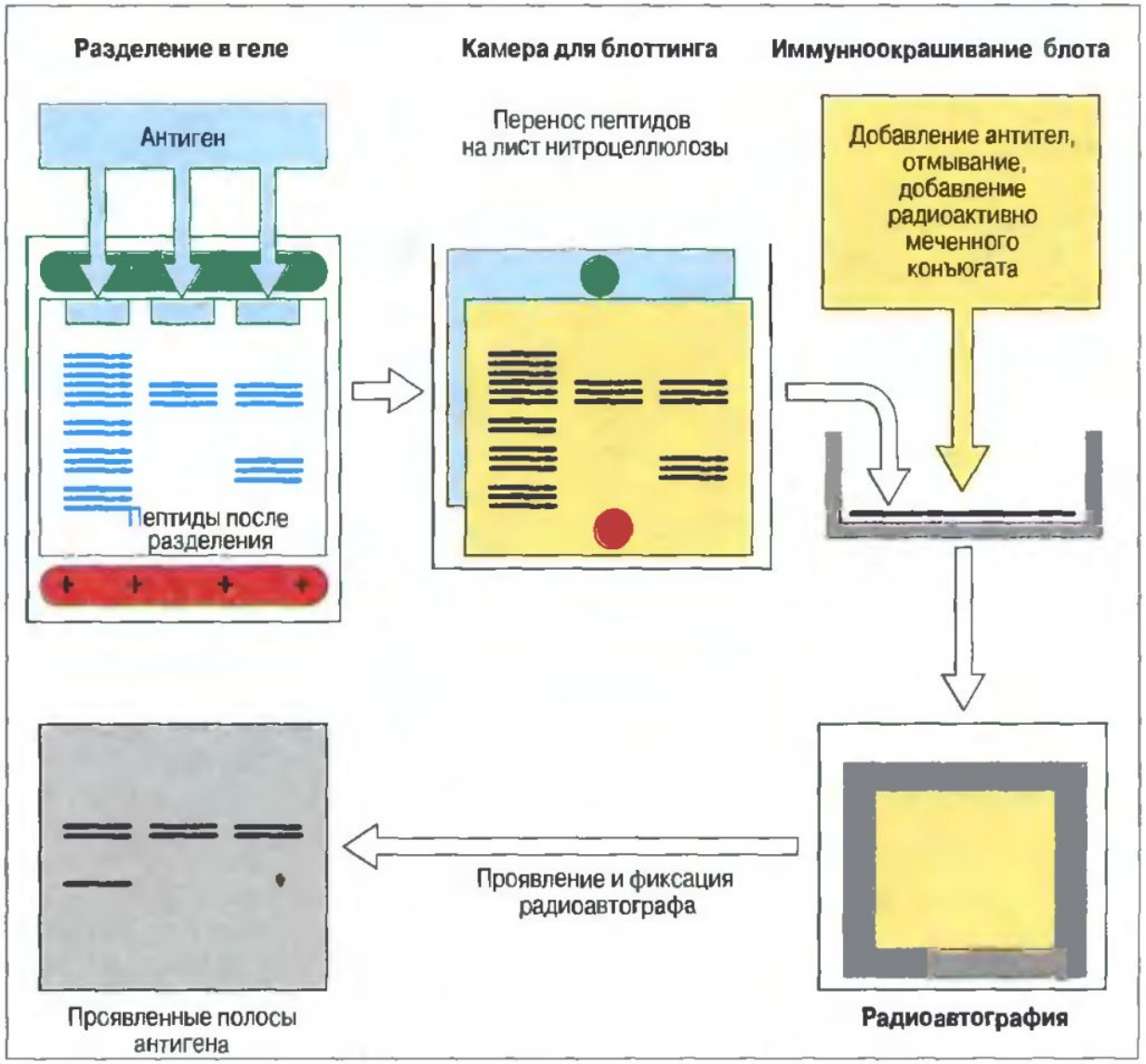
◀ **EXPERIMENTAL FIGURE 5-35 T cells bound to fluorescence-tagged antibodies to two cell-surface proteins are separated from other white blood cells by FACS.** Spleen cells from a mouse reacted with a fluorescence-tagged monoclonal antibody (green) specific for the CD3 cell-surface protein and with a fluorescence-tagged monoclonal antibody (red) specific for a second cell-surface protein, Thy1.2. As cells were passed through a FACS machine, the intensity of the green and red fluorescence emitted by each cell was recorded. This plot of the red fluorescence (vertical axis) versus green fluorescence (horizontal axis) for thousands of cells shows that about half of the cells—the T cells—express both CD3 and Thy1.2 proteins on their surfaces (upper-right quadrant). The remaining cells, which exhibit low fluorescence (lower-left quadrant), express only background levels of these proteins and are other types of white blood cells. Note the logarithmic scale on both axes. [Courtesy of Chengcheng Zhang.]

Проточно-цитофлуориметричний аналіз лімфоцитів

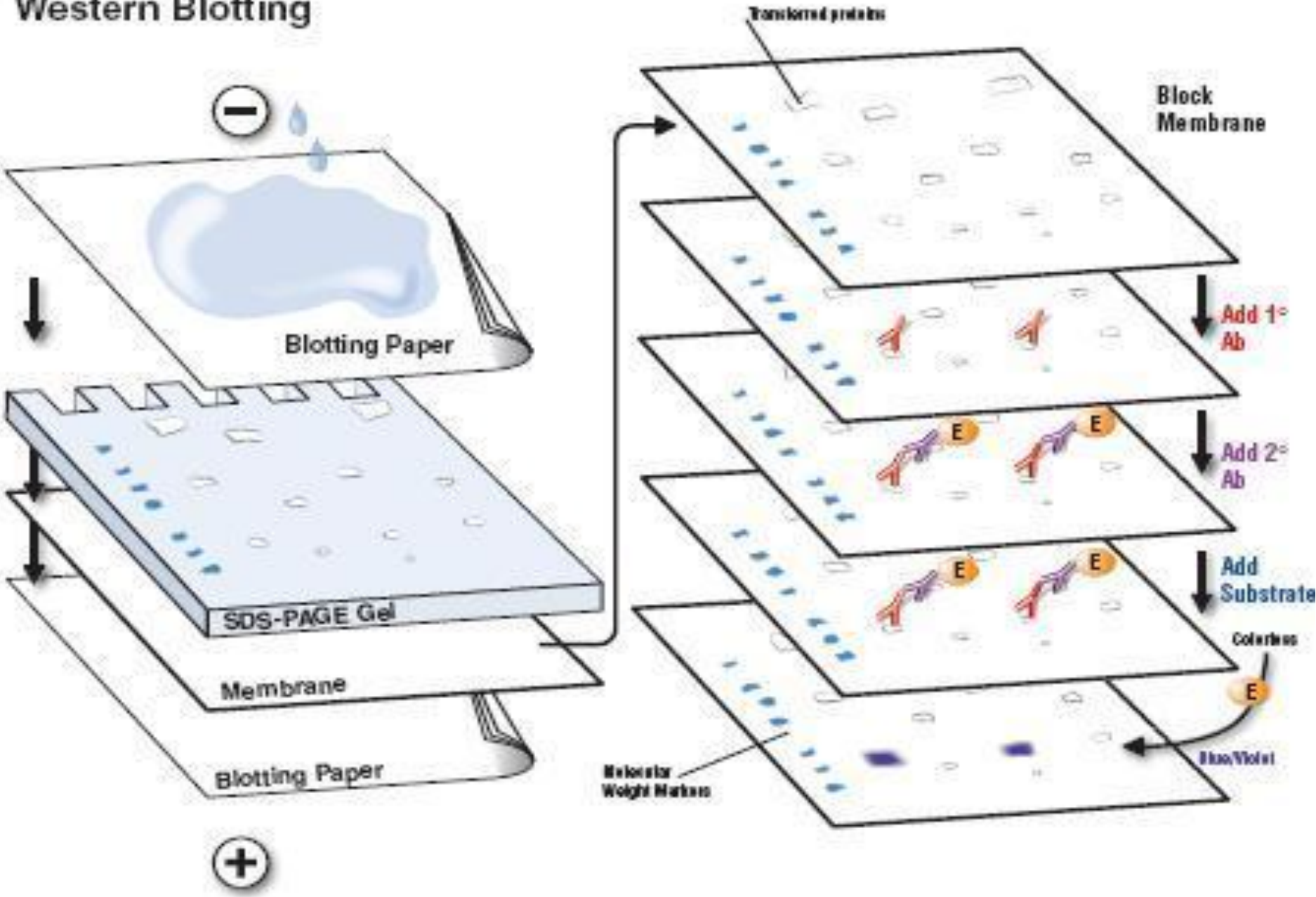


	Анексин $V^{ФІТЦ}$ (-) / пропідій йодид (-), %	Анексин $V^{ФІТЦ}$ (+) / пропідій йодид (-), %	Анексин $V^{ФІТЦ}$ (+) / пропідій йодид (+), %	Мертві клітини, %
Контроль (А)	92,66	4,31	2,89	0,14
30 хв після опромінення (Б)	91,43	5,72	2,69	0,17
3 год після опромінення (В)	83,17	13,97	2,67	0,19

ІМУНОБЛОТИНГ (Western blotting)

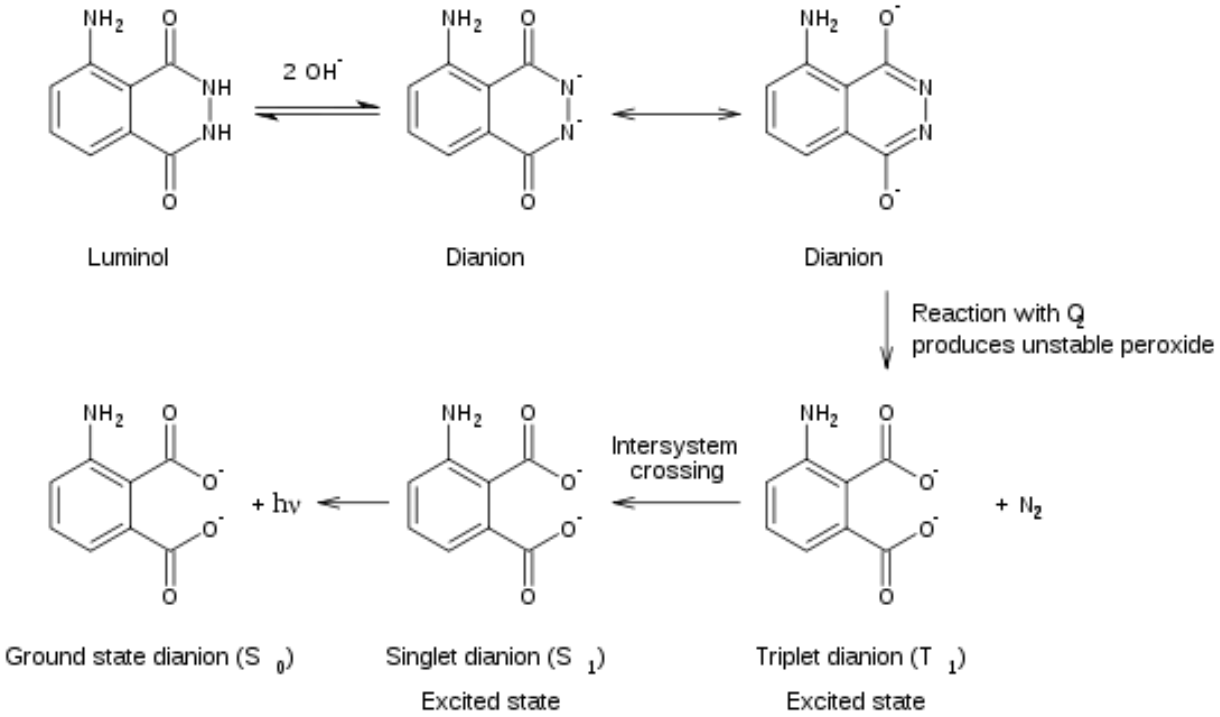


Western Blotting



Люмінесценцією називають природне світіння, що супроводжує ряд біохімічних реакцій, і виникає при переході збуджених молекул в основний електронний стан. Підсилення процесу за рахунок окиснення перекисом водню люмінолу і деяких його похідних з

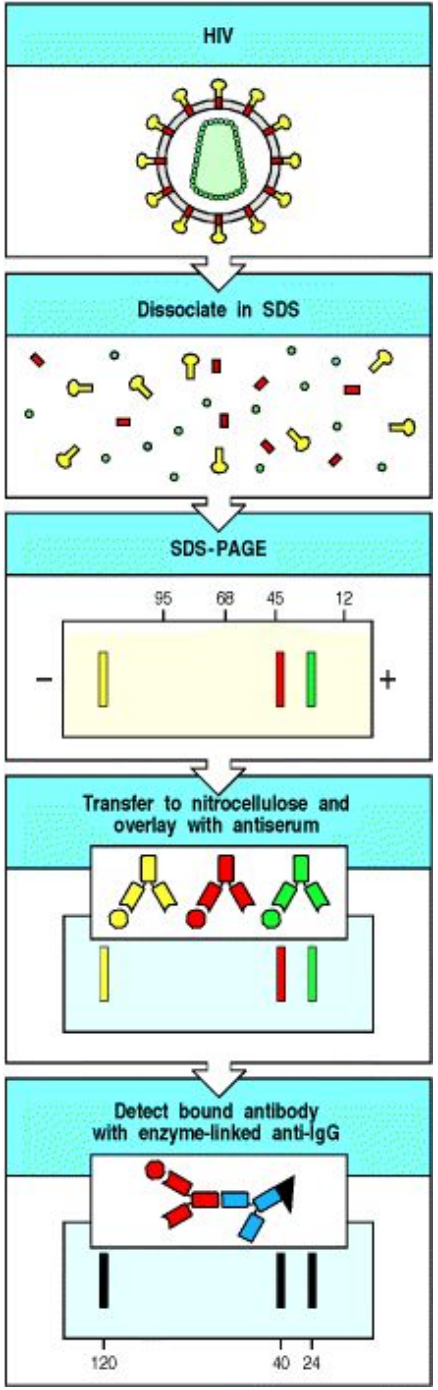
залученням пероксидази чи каталази - **хемілюмінісценція**



Використання хемілюмінесцентних підходів в імуно - блот аналізі

Насьогодні широко використовується метод посиленної хемілюмінесценції **ECL- метод (Enhanced Chemiluminescence).** В реакції пероксидаза хрону, коньюгована з вторинними антитілами, каталізує окиснення люмінолу до діаніону при додаванні перексиду водню, що пов'язано з емісією квантів світла. Чутливість реакції посилюється при додаванні фенольної похідної – **кумарової кислоти.** Візуалізація результатів відбувається з використанням рентгенівської плівки, з подальшим її проявленням.

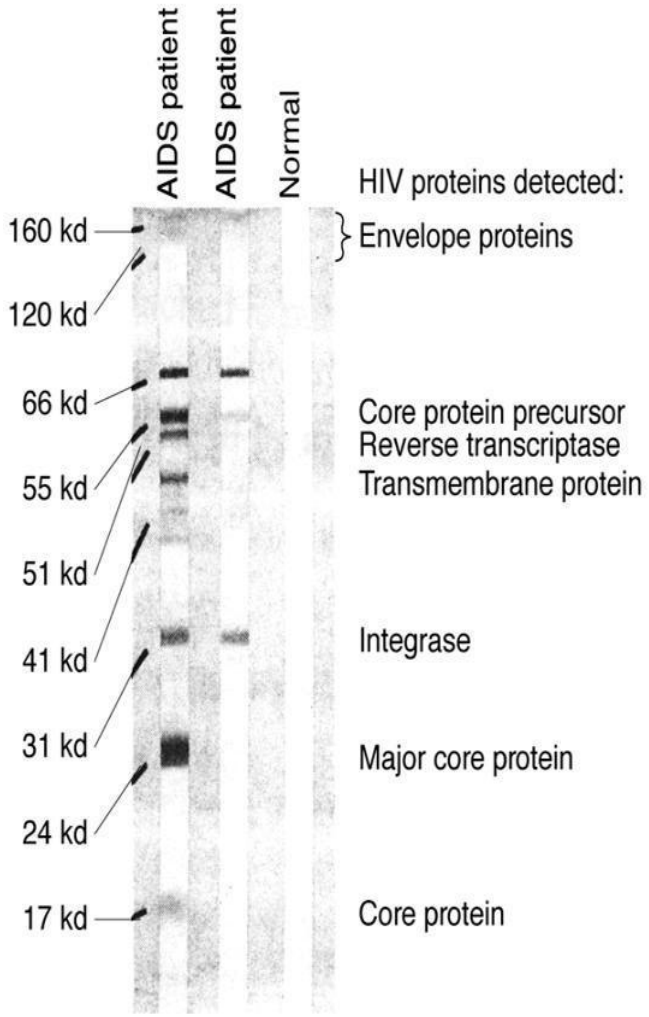
Застосування імуноблотингу (Western blotting) для виявлення антитіл до ВІЛ



Western blotting is used to identify antibodies to the human immunodeficiency virus (HIV) in serum from infected individuals

The virus is dissociated into its constituent proteins by treatment with the detergent SDS, and its proteins are separated using SDS-PAGE. The separated proteins are transferred to a nitrocellulose sheet and reacted with the test serum. Anti-HIV antibodies in the serum bind to the various HIV proteins and are detected with enzyme-linked anti-human immunoglobulin, which deposits colored material from a colorless substrate. This general methodology will detect any combination of antibody and antigen and is used widely, although the denaturing effect of SDS means that the technique works most reliably with antibodies **that recognize the antigen when it is denatured.**

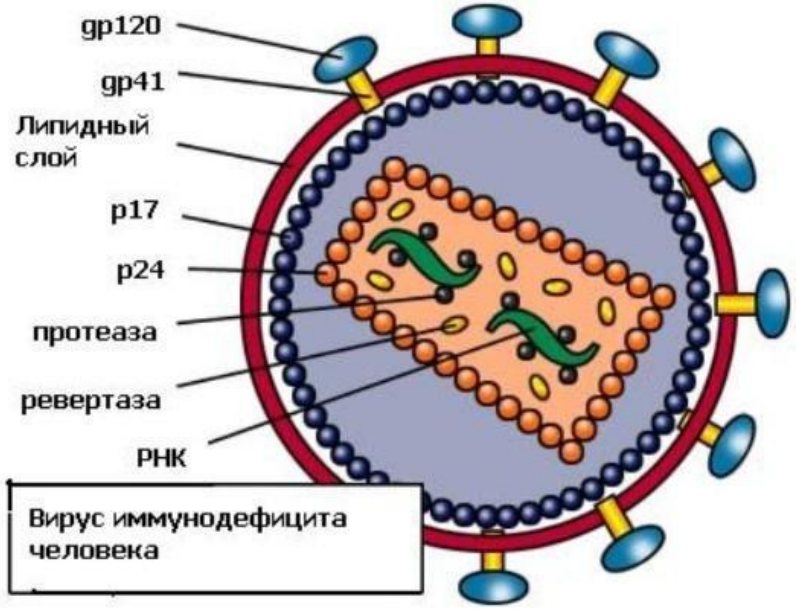
Western blots of serum samples from two HIV-infected individuals and one control subject

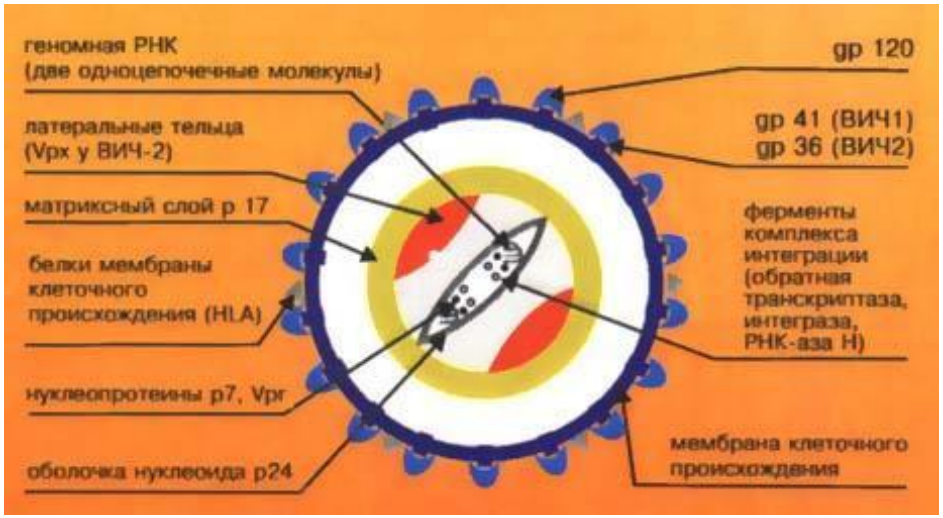


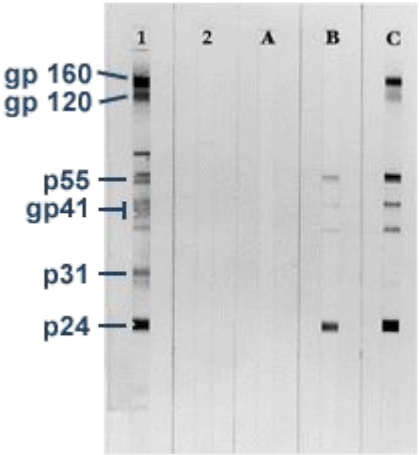
Всемирная Организация Здравоохранения **(ВОЗ, 1991)** рекомендует следующую оценку результатов исследований, проведенных **методом ИБ,** а именно наличие полос на определённых участках нитроцеллюлозной пластины,что подтверждает присутствие в исследованной сыворотке антител к строго определённым антигенам ВИЧ :

- Положительный результат — обнаружение в сыворотке антител к *двум вирусным белкам из группы* ***env*** (**gp41** -TM, transmembrane; **gp120 -** SU, surface; **gp 160** - SU; **gp 36** –SU, характерный для ВИЧ-2) с наличием или отсутствием белков — продуктов других структурных генов ***gag*** **(p24 - CA, capsid) и** ***pol*** **(p31- Int, integrase).**
- Отрицательный результат — отсутствие антител к вирусоспецифическим белкам;
- Неопределенный результат — обнаружение в сыворотке антител к белкам из групп *gag или pol.*
- **Трактовка результата.**. При исследовании методом ИБ обнаружено, что чаще всего в сыворотках больных СПИДом выявляются антитела к gp 41, причем обнаружение p24 у лиц, обследуемых с профилактической целью, требует дополнительных исследований на наличие у них ВИЧ-инфекции. Тест-системы для ИБ на основе рекомбинантных белков, полученных путем генной инженерии, оказались более специфичными, чем обычные системы на основе очищенного вирусного лизата.

Будова вірусу імунодефіциту людини





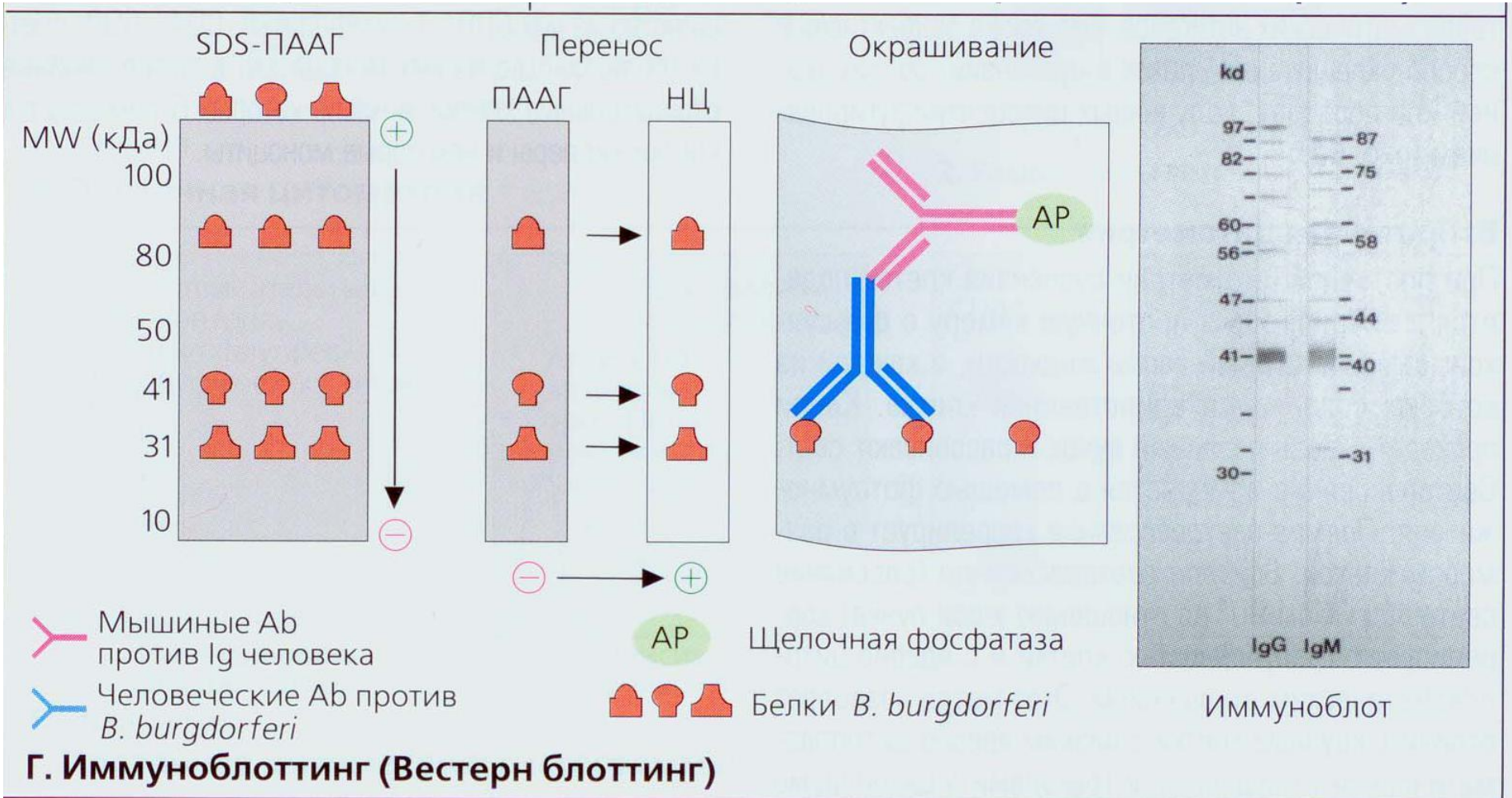


Band pattern Interpretation

- Lane 1, HIV+ serum (positive control)
- Lane 2, HIV- serum (negative control)
- Lane A, Patient A
- Lane B, Patient B
- Lane C, Patient C

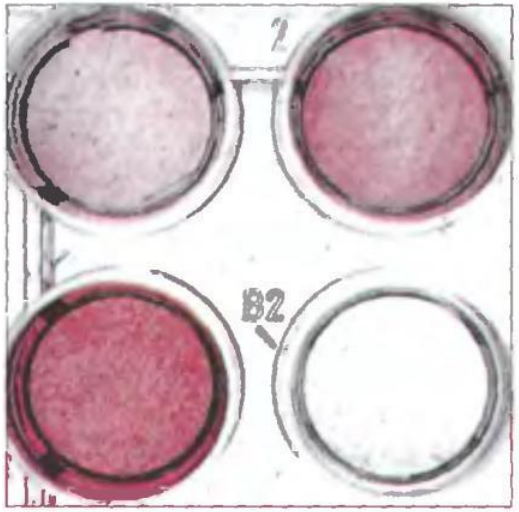
No bands present	**Negative**
Bands at either **gp160** or **gp120** and bands present at either **p31** or **p24**	**Positive**
Bands present, but pattern does not meet criteria for positivity	**Indeterminate**

Визначення присутності грампозитивних бактерій класу спірохет Borrelia burgdorferi, які спричиняють хворобу Лайма, методом імуноблотингу



Г. Иммуноблоттинг (Вестерн блоттинг)

Метод ELISPOT



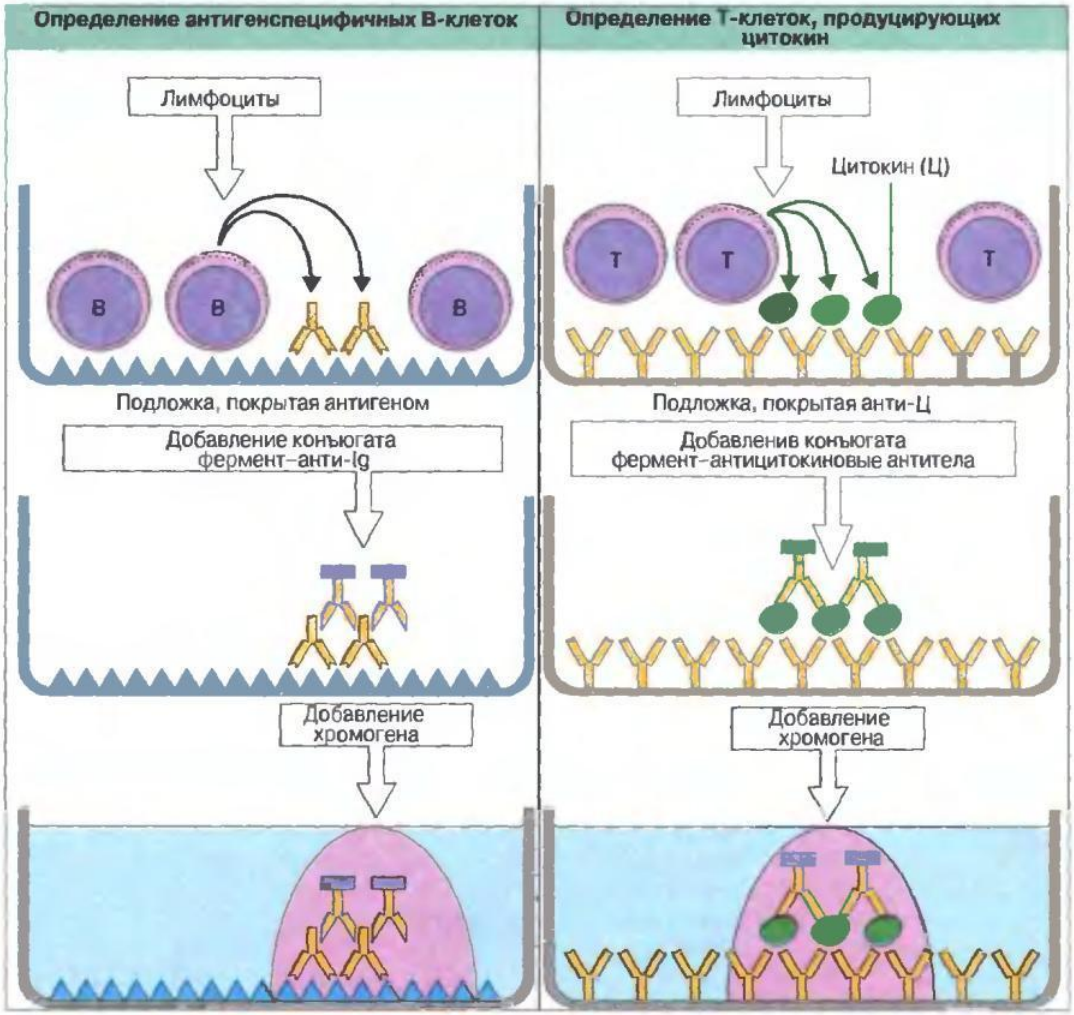
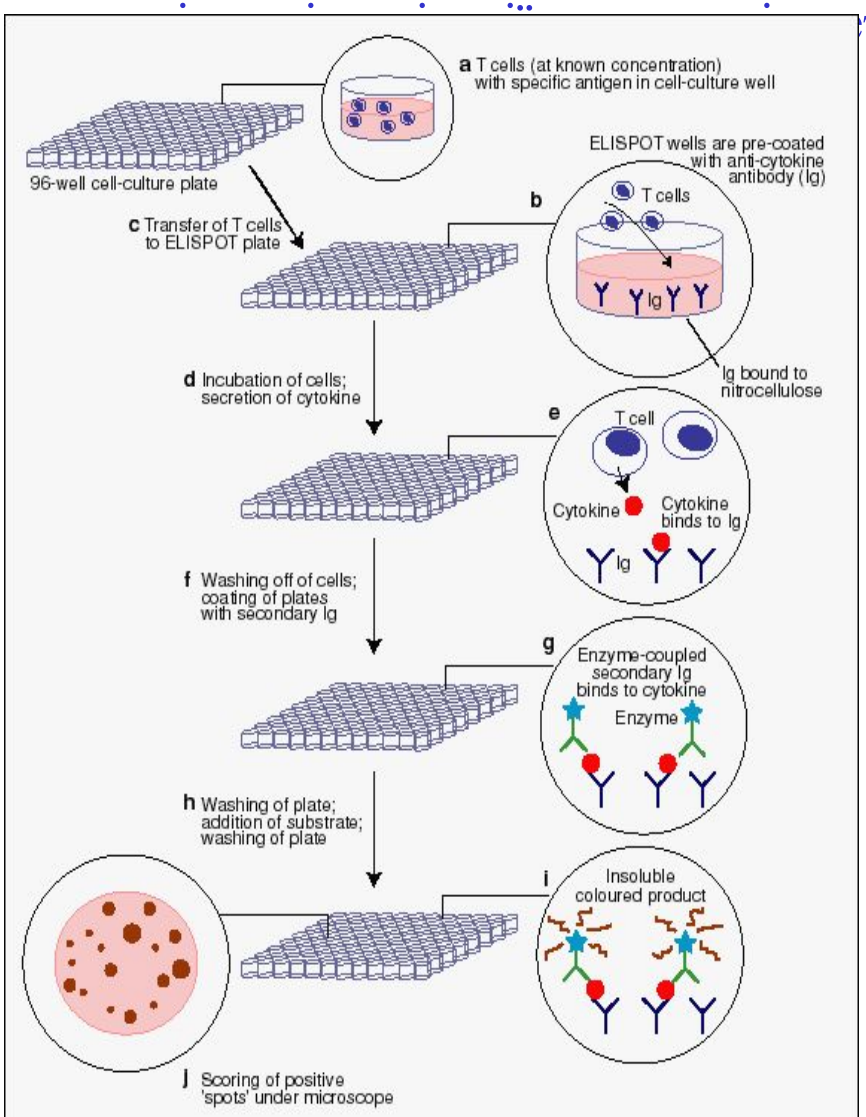


Рис. 29.24
Для определения отдельных В-клеток, продуцирующих специфические антитела, или индивидуальных Т-клеток, секретирующих те или иные цитокины, применяют метод ELISPOT – иммуноферментный тест с локальным связыванием. Чтобы выявить антителообразующие клетки, лимфоциты наносят на сенсибилизированную антигеном подложку. Секретируемые специфические антитела связываются с антигеном в непосредственной близости к продуцирующей их клетке. Места связывания (пятнышки – англ. spots) выявляют хроматографически с использованием конъюгированных с ферментом антител анти-Ig и хромогена. Если нужно идентифицировать клетки, продуцирующие цитокины, на подложке иммобилизуют антицитокиновые антитела и определяют связывание их с цитокином при помощи конъюгированных с ферментом антител к другому эпитопу цитокина. Вид обработанной таким образом подложки показан вверху слева. (Фотография любезно предоставлена P. Hutchings и издательством Blackwell Scientific Publications.)

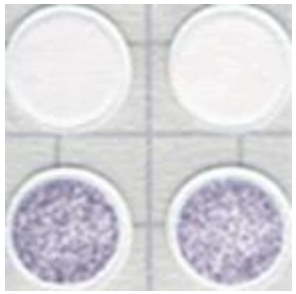
Метод ELISPOT

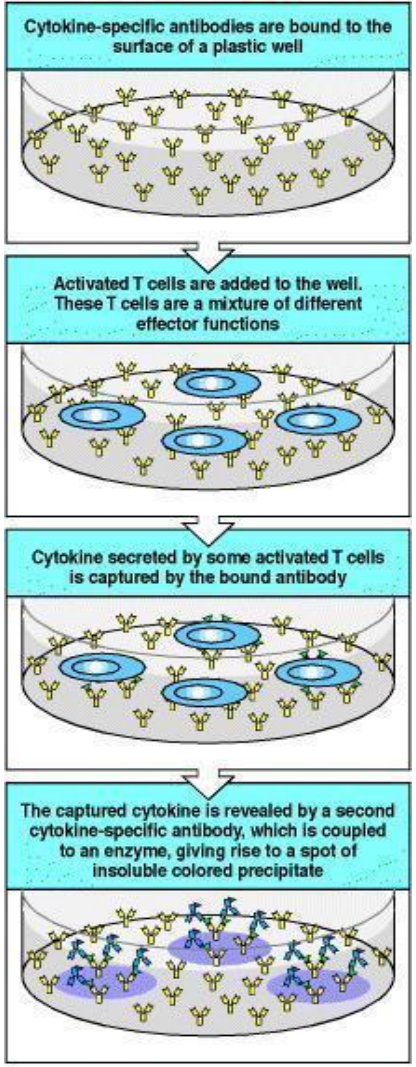
а) методичний підхід, б) візуалізація результатів, в) лунка планшета
текції відразу двох різних цитокінів

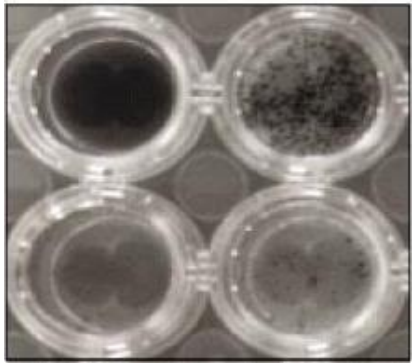


ELISPOT assay to quantify secretion of cytokines by T lymphocytes (T cells)

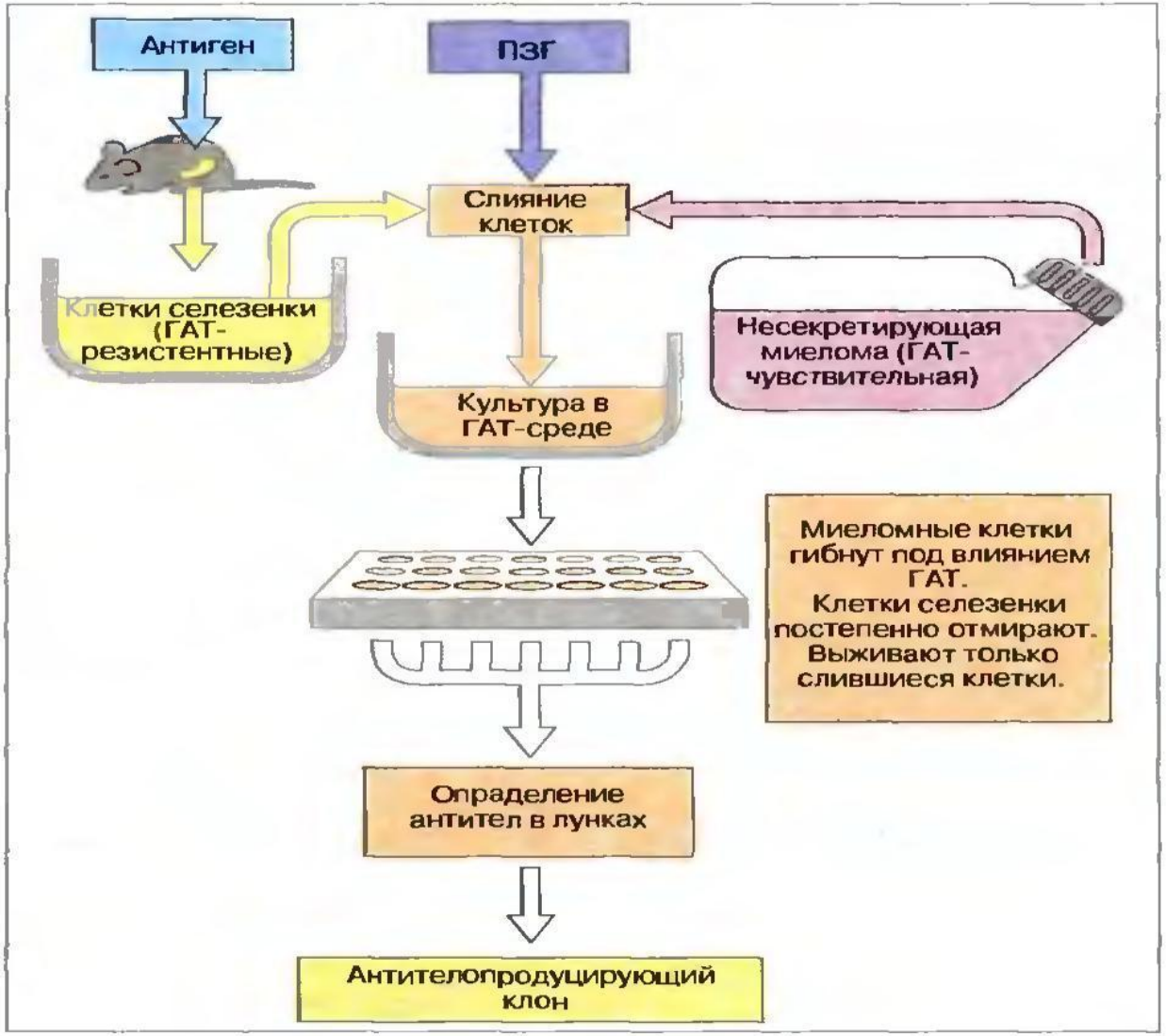
Expert Reviews in Molecular Medicine







Метод ELISPOT

The frequency of cytokine-secreting T cells can be determined by the ELISPOT assay. The ELISPOT assay is a variant of the ELISA assay in which antibodies bound to a plastic surface are used to capture cytokines secreted by individual T cells. Usually, cytokine specific antibodies are bound to the surface of a plastic tissue-culture well and the unbound antibodies are removed (top panel). Activated T cells are then added to the well and settle onto the antibody-coated surface (second panel). If a T cell is secreting the appropriate cytokine, this will then be captured by the antibody molecules on the plate surrounding the T cell (third panel). After a period of time the T cells are removed, and the presence of the specific cytokine is detected using an enzyme-labeled second antibody specific for the same cytokine. Where this binds, a colored reaction product can be formed (fourth panel). Each T cell that originally secreted cytokine gives rise to a single spot of color, hence the name of the assay. The results of such an ELISPOT assay for T cells secreting IFN-γ in response to different stimuli are shown in the last panel. In this example, T cells from a patient with melanoma were stimulated with the mitogen PHA (top left), a peptide from cytomegalovirus (top right), a peptide from a melanoma tumor associated antigen (lower left), and with no peptide (lower right). You can see the greater response to the cytomegalovirus peptide compared to the melanA peptide by the greater number of spots..

Получение моноклональных антител