

Einleitung

Der ELISA-Test (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ist eine weit verbreitete und sehr empfindliche immunologische Methode mit der bestimmte Moleküle (hauptsächlich Proteine) nachgewiesen werden können.

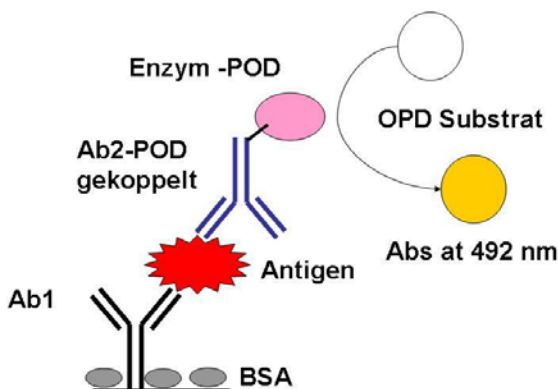
Dabei nutzt man die Mechanismen des Immunsystems: Wird eine Substanz (Antigen) vom Immunsystem als fremd erkannt, bildet es „Antikörper“, die an das fremde Molekül andocken und es so markieren. Diese so genannte Antikörper-Antigen-Reaktion wird für den ELISA-Test genutzt. Soll ein bestimmtes Protein (Antigen) nachgewiesen werden, müssen die dazu passenden Antikörper verfügbar sein, welche zuvor mit verschiedenen gentechnischen oder zellbiologischen Verfahren hergestellt werden.

Ist dann in einer Probe das gesuchte Protein vorhanden, binden es die auf ein Trägermedium aufgebrachten Antikörper und immobilisieren es. Ein zweiter Antikörper bindet nun an eine andere Stelle am Antigen. Dieser Antikörper ist direkt oder indirekt an ein Enzym gebunden, welches eine Reaktion auslöst, die zu einer messbaren Farbänderung führt.

Der Aufbau eines ELISA

Es gibt verschiedene Varianten des ELISA. In der unten aufgeführten Abbildung ist ein direkter Sandwich-ELISA abgebildet. Der erste Antikörper (Ab1, Antibody), auch primärer Antikörper genannt, wird auf eine spezielle Oberfläche in einer Mikrotiterplatte gebunden (gecoatet). Damit das Antigen nicht auch auf dieser Oberfläche bindet und so falsche Resultate entstehen, wird eine Proteinlösung (BSA, Bovines Serum Albumin) auf die Platte gegeben, diese verhindert eine Bindung von Antigen oder Störsubstanzen an dieselbe Oberfläche (wird dadurch blockiert).

Der Ausdruck "Sandwich" demonstriert, dass die beiden Antikörper Ab1 und Ab2-POD mit dem Antigen in der Mitte quasi ein "Sandwich" bilden.



Zeigt den Aufbau eines direkten Sandwich ELISA's

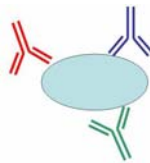
An dem zweiten Antikörper (Ab2-POD), auch sekundärer Ab genannt, ist ein Enzym gekoppelt. Dieses Enzym (POD, Peroxidase) setzt im letzten Schritt des ELISA's das Substrat z. B. OPD (ortho-Phenylendiamin) um, was zu einer Farbentwicklung führt. Nach einer in Vorversuchen erprobten Zeit wird die Farbentwicklung mit 25%iger Schwefelsäure abgestoppt.

Die Platte wird anschliessend in einem Spektralphotometer ausgewertet. Durch die Farbentwicklung und die verwendeten Standardreihe können verschiedene Proben quantitativ oder qualitativ auf den Gehalt des gesuchten Proteins (Antigen) untersucht werden.

Antikörper

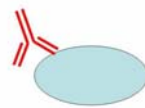
Die Suche oder Herstellung der entsprechenden Antikörper ist ein sehr wichtiger Schritt für einen guten ELISA. Alles hängt von der Spezifität, Sensitivität und den Matrixeffekten der Antikörper ab. Antikörper werden in zwei Gruppen unterteilt: polyklonale und monoklonale.

Polyklonale Antikörper (Antiseren)



Auf der Oberfläche eines Antigens befinden sich mehrere Epitope (mögliche Bindungsstellen von Antikörpern). Injiziert man ein Protein (Antigen) z. B. einem Kaninchen, so bildet dies als Immunantwort einen Satz verschiedener Immunglobuline (Antikörper, IgG) gegen unterschiedliche Epitope des Antigens. Man erhält einen sehr sensitiven Assay, der aber zu Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen neigen kann.

Monoklonale Antikörper



Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern ist wesentlich aufwändiger. Monoklonale Antikörper sind sehr spezifische Antikörper, die nur ein Epitop auf einem Antigen erkennen. Sie neigen weniger zu Kreuzreaktivitäten, sind aber meist aus Gründen der hohen Spezifität weniger sensitiv.

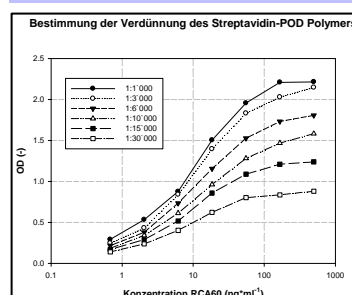
Enzyme

Das Enzym ist ein biochemischer Katalysator der hilft, ein Substrat (Edukt) zu spalten oder anderweitig zu verändern und als Folge davon zu einer Farbänderung oder Fluoreszenz führt. Das Enzym nimmt an der biochemischen Reaktion teil, geht mit den umzusetzenden Stoffen sogar eine vorübergehende Verbindung (den Enzym-Substrat-Komplex) ein, wird aber durch die Reaktion nicht verändert. Es sind heute über 2.000 verschiedene Enzyme bekannt. Die in einem ELISA-Format gebräuchlichsten Enzyme sind in der Tabelle mit deren Substrat und Farbe des Produktes aufgeführt.

| Enzym | Substrat | Produkt |
|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| POD / HRP Horseradish Peroxidase | OPD ortho-Phenylendiamin | orange Messung bei 490 nm |
| POD / HRP Horseradish Peroxidase | TMB Tetramethylbenzidin | gelb Messung bei 450 nm |
| AP Alkaline Phosphatase | PNPP para-Nitrophenyl phosphat | gelb Messung bei 405 nm |

Die gebräuchlichsten Enzyme, deren Substrate und Farbprodukte

Auswertung



Beispiel einer grafischen Auswertung

Die fertigen Platten können mit Hilfe von Spektralphotometern quantitativ oder qualitativ ausgewertet werden. Anhand von Hilfsprogrammen z. B. Sigma-Plot oder Excel können die Resultate grafisch erfasst und somit gut ausgewertet werden.



Beispiel einer ELISA-Platte