

# İMMÜNÖLOJİK TEKNİKLER

Doç.Dr. Mustafa ALTINIŞIK

ADÜTF Biyokimya AD

2004

# Temel ilkeler

**İmmünolojik teknikler**, antijen-antikor etkileşmesine dayanan analiz yöntemleridir.

Bu yöntemlerde bilinen bir antijen olduğunda örnek materyal içerisinde özgül antikor veya bilinen bir antikor olduğunda örnek materyal içerisinde özgül antijen saptanabilir. Ayrıca örnek materyal içerisindeki özgül antijen veya antikor miktarları niceliksel testlerle saptanabilir.

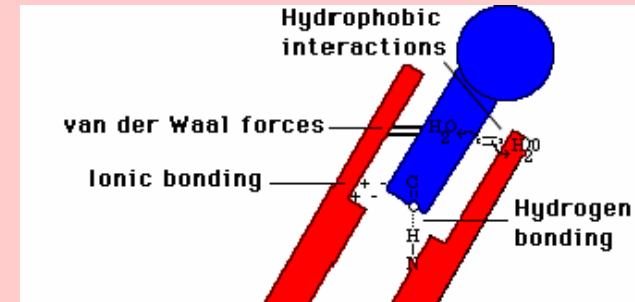


# Antijen-antikor birleşmesinin özellikleri 1

-Antijen-antikor birleşmesi spesifik bir olaydır. Fakat birbirine benzeyen gruplar arasında da birleşme olabilir. Buna *çapraz reaksiyon* adı verilir.

-Antijen-antikor birleşmesi kimyasal bir olaydır. Bu birleşmede kovalent olmayan bağlar rol oynar.

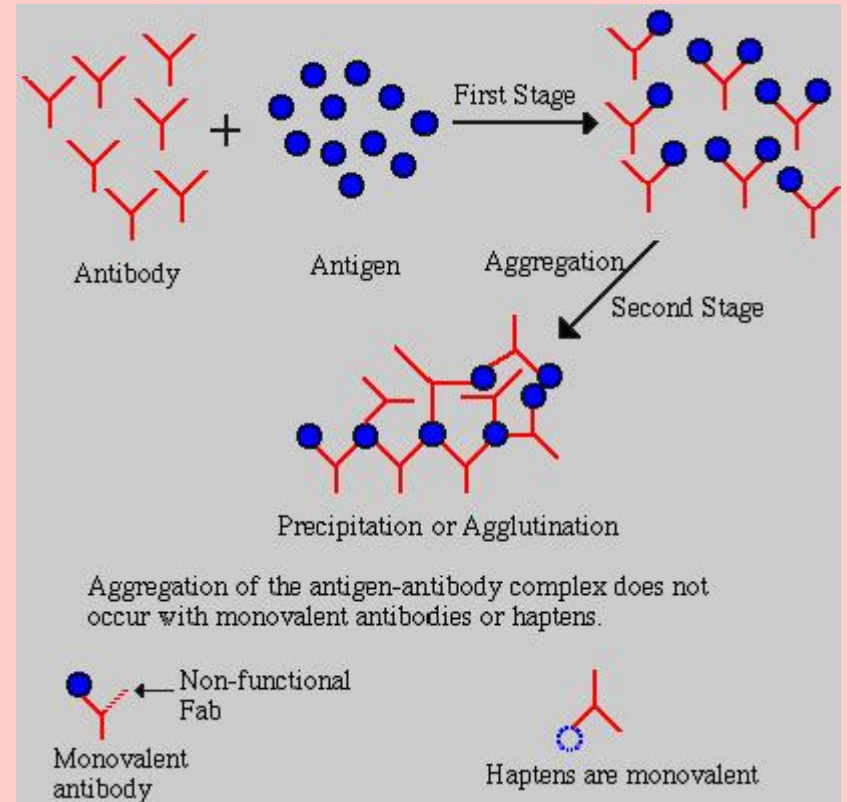
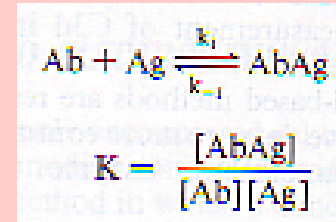
-Antijen ve antikor molekülü tam olarak reaksiyona girer ve birleşen moleküller parçalanmazlar.

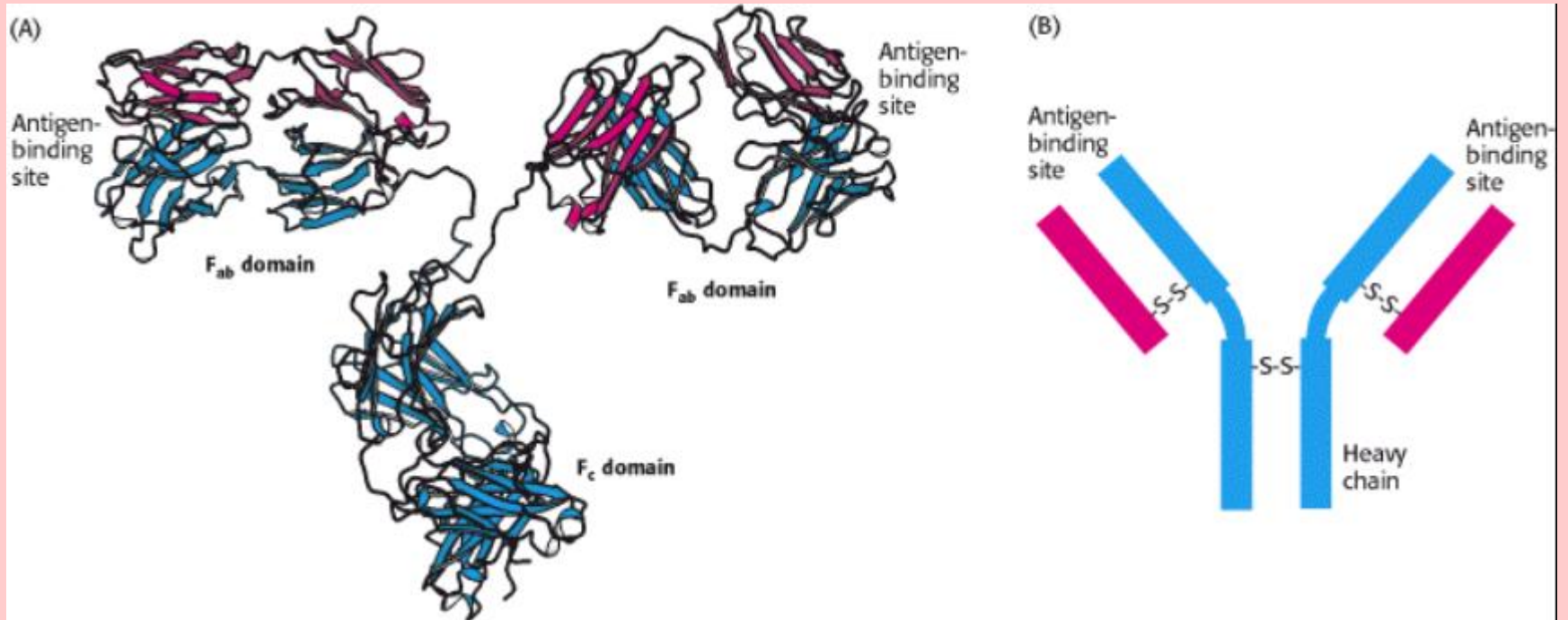


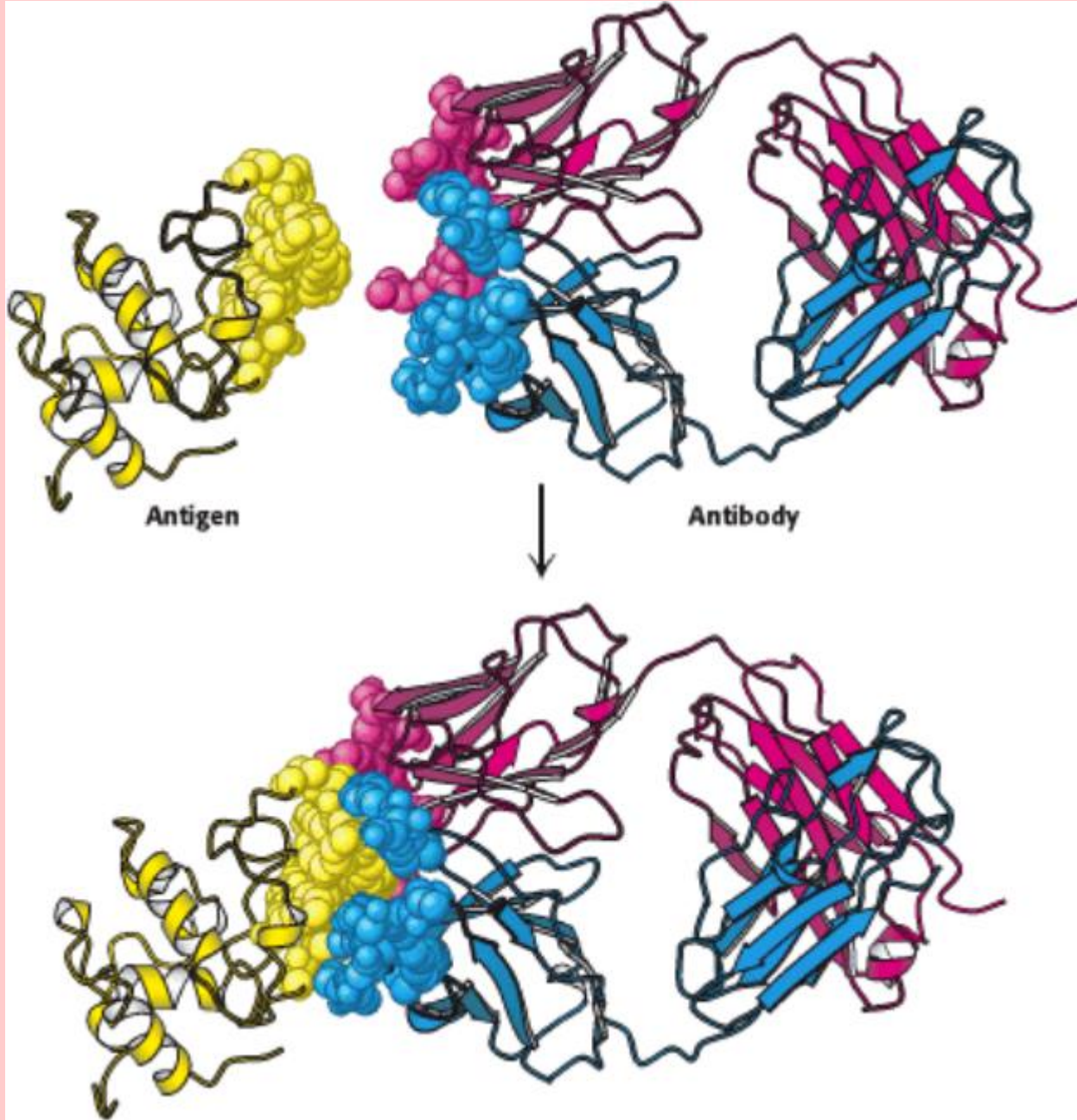
# Antijen-antikor birleşmesinin özellikleri 2

-Antijen-antikor birleşmesi reversibl bir olaydır.

-Antijen ve antikor multivalan olduklarından ve reaksiyon için bütün valansların doyması şart olmadığından değişik oranlarda birleşir.







Antijen-antikor birleşmesinde pH, tuz konsantrasyonu ve ısının da etkisi vardır.

# İmmünolojik teknikler 1

- Kalitatif yöntemler

- Presipitasyon

- Ring testi (halka deneyi)

- Tüpte sulandırma yöntemi

- Jelde presipitasyon (immünodifüzyon)**

- Radyal immünodifüzyon

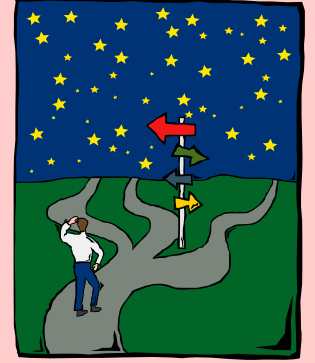
- Çift yönlü immünodifüzyon

- İmmünoelektroforez

- Flokülasyon

- Aglütinasyon

- Kompleman fiksasyon testi



# İmmünolojik teknikler 2

- Kantitatif yöntemler
  - Türbidimetrik ve nefelometrik ölçümler
  - İşaretlenmiş immünokimyasal ölçümler
    - Radioimmunoassay (RIA)
    - Enzyme immunoassay (EIA)

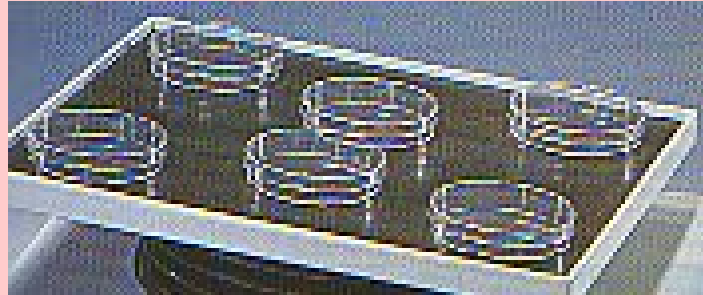




# Presipitasyon 1

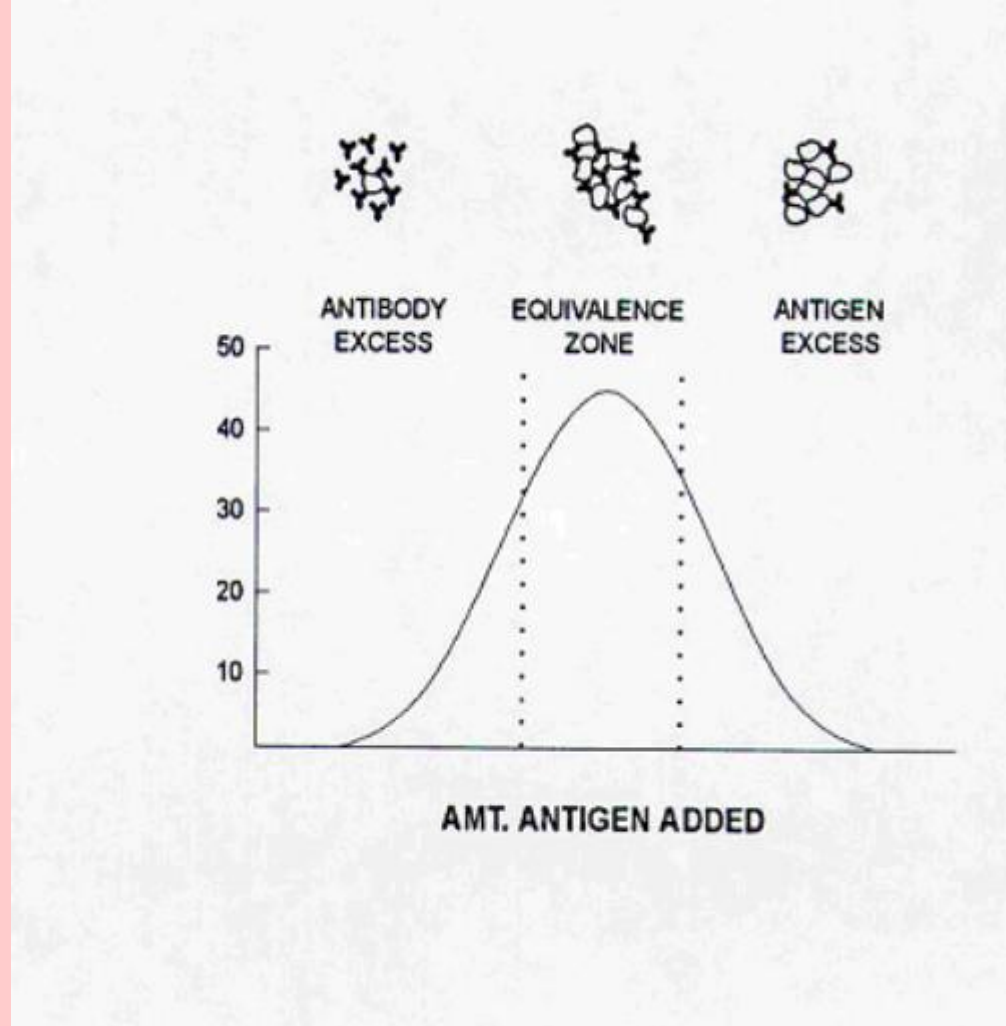
Suda çözünen bir antijen ile spesifik antikorun karıştırılmasıyla suda çözünmeyen geniş antijen-antikor komplekslerinin meydana gelmesine **presipitasyon** ve çökeltiye **presipat** denir.

Bu test solüsyonda ve tüpte yapıldığında **presipitasyon testi**, agar jelde yapıldığında **jel presipitasyon testi** olarak adlandırılır.



# Presipitasyon 2

Antijen veya antikor fazla olduğunda küçük ve genellikle solubl kompleksler meydana gelir; antijen-antikor oranları optimale yakın olduğunda ise geniş ve suda çözünmeyen kompleksler meydana gelir.



# Presipitasyon 3

**Ring testi**, sıvı ortamda yapılan presipitasyonun en basit formudur. İnce tüplere konulan sabit miktardaki antikor solüsyonu üzerine bir tabaka oluşturacak şekilde artan oranlarda antijen eklenir. Eğer temas yerinde halka şeklinde bir presipat oluşursa deney pozitifdir.

# Presipitasyon 4

**Tüpte sulandırma yöntemi**, optimal antijen-antikor oranını araştırmak için tüpte yapılan en eski yöntemdir. Bir sıra tüpe konulan belli miktardaki antikorum üzerine değişen miktarlarda suda çözünür antijen eklemesi yapılır. Uygun antijen ve antikorum bulunması halinde azdan başlayarak gittikçe artan ve sonra azalarak kaybolan bir bulanıklık görülür. İlk tüplerde antikor fazlalığı, son tüpte ise antijen fazlalığı vardır; bulanıklığın en fazla olduğu tüpte ise antijen-antikor oranı birbirine denktir.

# Presipitasyon 5

**Jelde presipitasyonda** (immünodifüzyon), presipitasyon reaksiyonları antijen ve antikor moleküllerinin birbirine doğru yayılabildiği jel veya yarı katı ortamlarda yapılır. Böyle bir ortamda birbirine doğru yayılan antijen ve antikor optimal oranda buldukları bölgelerde karşılaştıklarında bir presipitasyon çizgisi veya bandı oluşturarak çökerler.

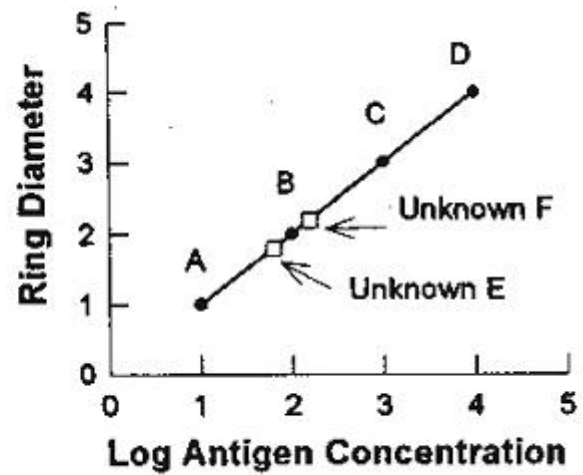
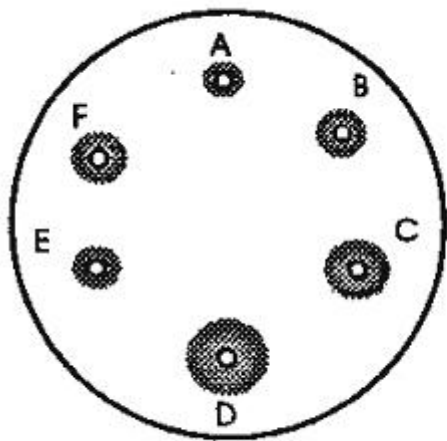
# Presipitasyon 6

**Jelde presipitasyon (immünodifüzyon) işlemi çeşitli şekillerde yapılmaktadır:**

- Radyal immünodifüzyon (Mancini metodu)
- Çift yönlü immünodifüzyon (Ouchterlony metodu)
- İmmunoelektroforez
- Zıt yönlü immünoelektroforez
- Laurell (Roket) immünoelektroforez

# Presipitasyon 7

**Radyal immünodifüzyonda (Mancini metodu)**, bir antijen için monospesifik antikor agarla karıştırılır ve bir tabaka oluşturacak şekilde bir plağa dökülür. Daha sonra agarda çukurlar açılır ve açılan çukurlara ölçülecek antijen solüsyonu konur. Antijen çukurdan agarın içerisine yayılır ve bir presipat oluştuğunda çukurun çevresinde bir halka veya hale meydana gelir. Mancini, halkanın çapının karesi ile çukurdaki antijenin konsantrasyonu arasında doğru orantının olduğunu belirlemiştir. *Standart eğri hazırlayarak kantitatif ölçüm de yapılabilir.*





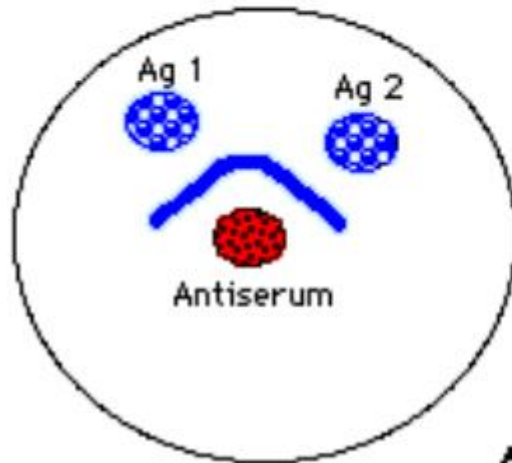
# Presipitasyon 8

**Çift yönlü immünodifüzyonda (Ouchterlony metodu)**, solubl antijen ve antikor molekülleri agar plağı üzerinde açılmış karşı çukurlara konur. Antijen ve antikor bu çukurlardan birbirlerine doğru agar içerisinde yayılırlar ve optimal konsantrasyonlarda karşılaştıklarında bir presipitasyon bandı veya çizgisi oluşur. Bu testte aynı seruma karşı teste tabi tutulan birçok antijenin birbirine yakınlığı da ortaya çıkarılabilir.

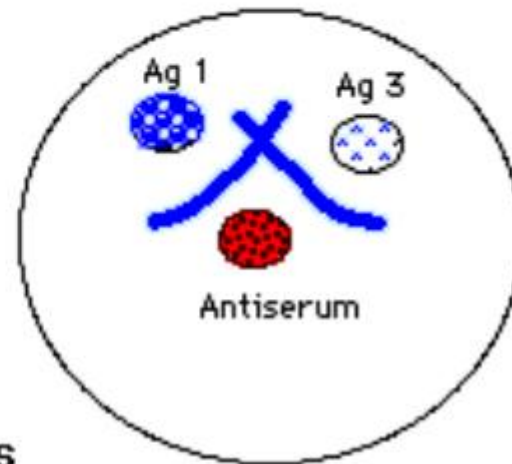
Plağa dökülmüş agarın ortasına bir ve çevresine birkaç çukur açılır; ortadaki çukura antiserum ve çevredeki çukurlara antijenler konur.

## Double dimension double diffusion (Ouchterlony)

**Identical**

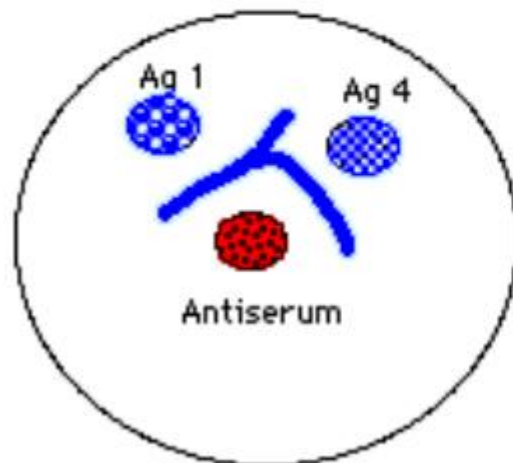


**Antigen are different**

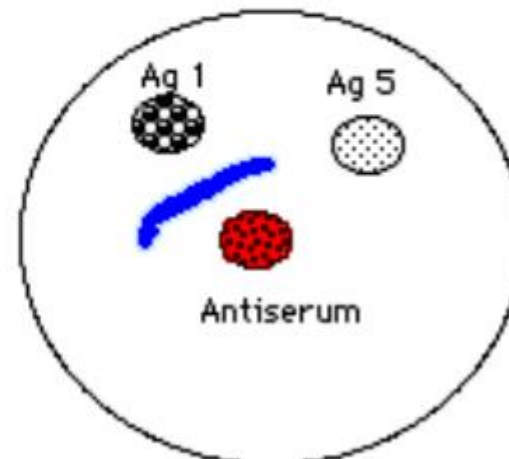


**Agar plates**

**Crossreactive**



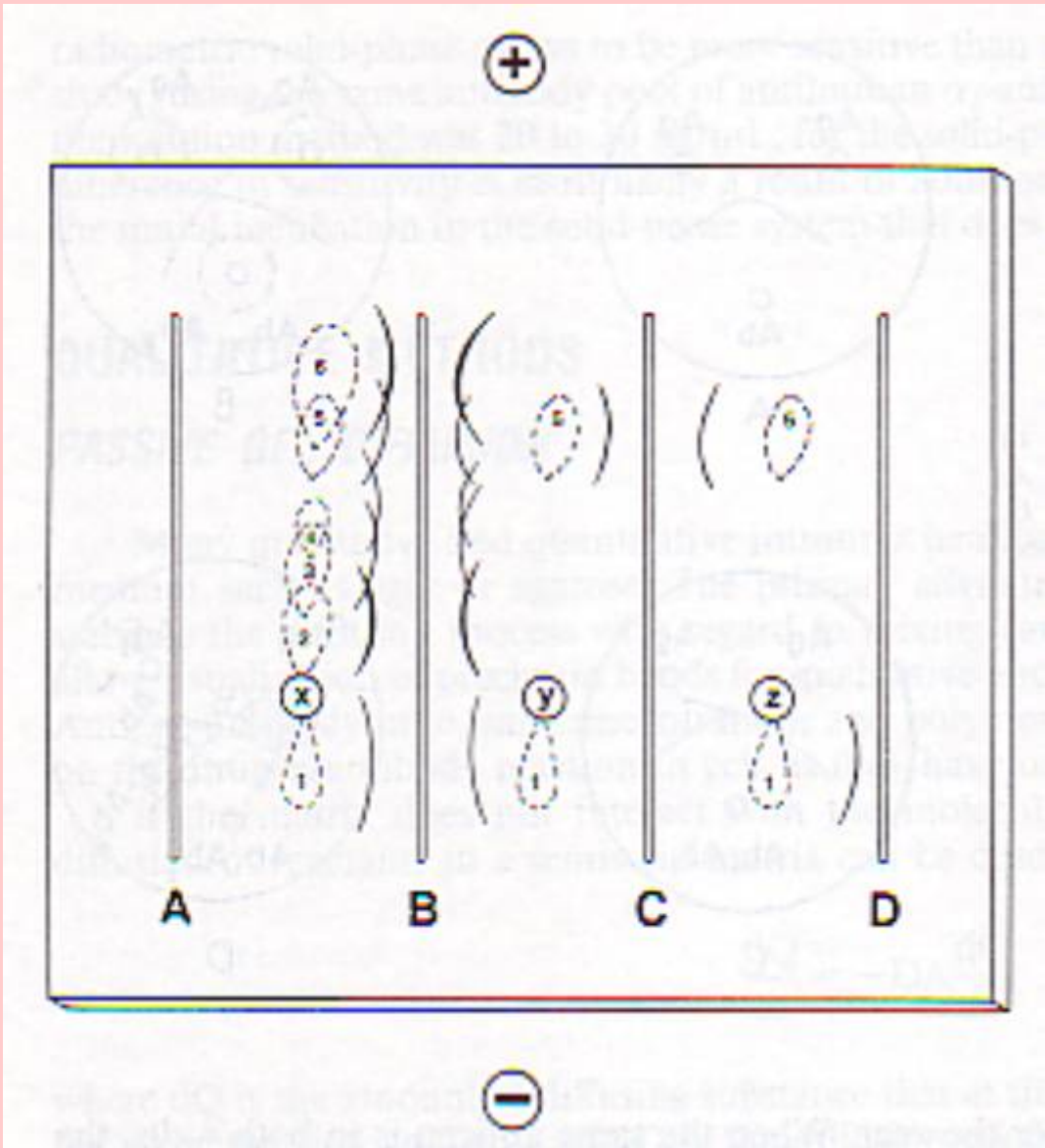
**Antigens are different**



# Presipitasyon 9

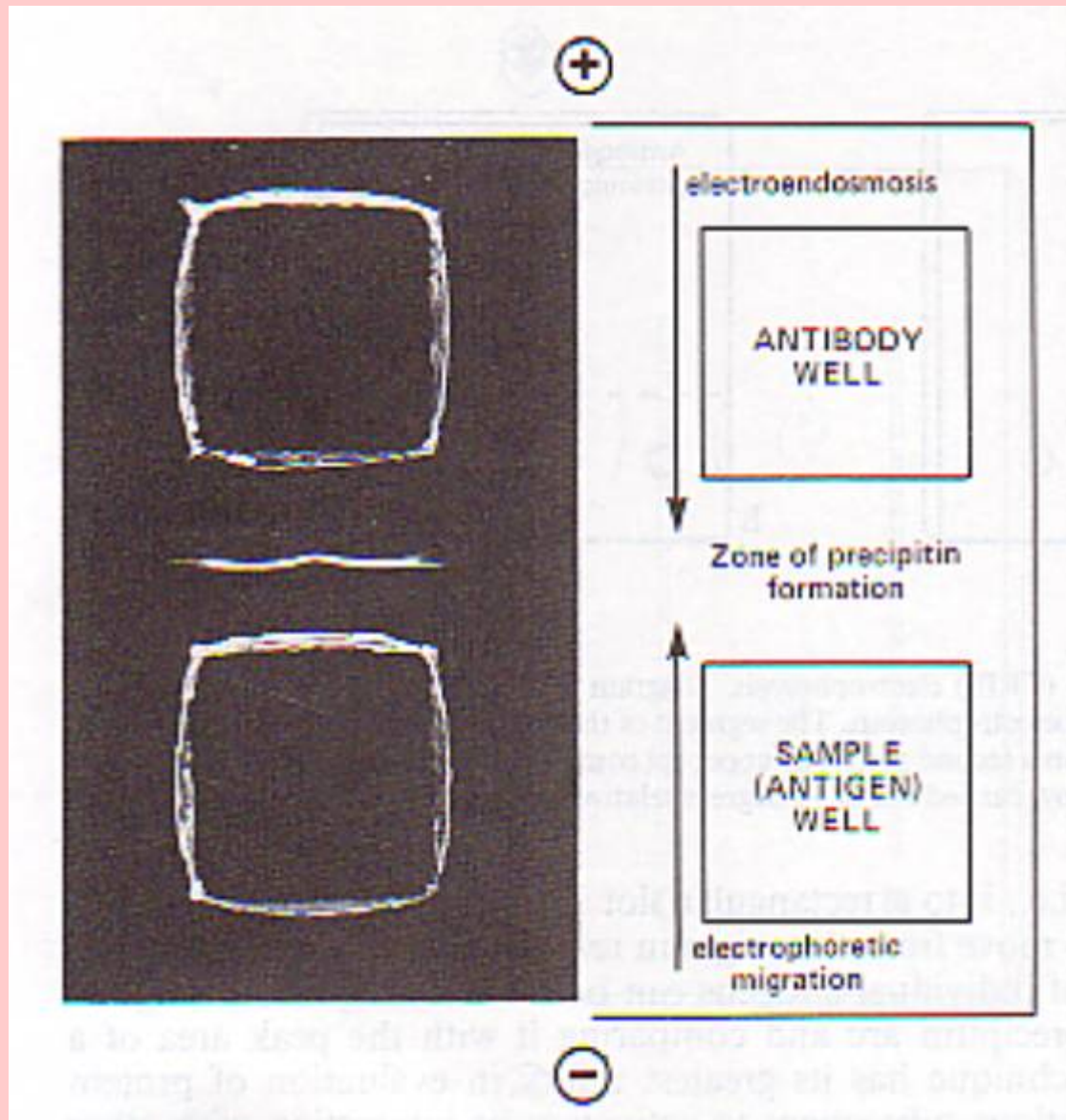
**İmmunoelektroforez**, çift yönlü jel difüzyonunun hızlandırılmış şekilde yapılan modifikasyonudur. Bu sistemde agar, ince bir tabaka halinde lama yayılır ve agarda çukur açılır. Daha sonra bu çukura antijen eklenir ve lam bir elektrik alanına konur. Antijen molekülleri bu elektrik alanında hareket eder ve spesifik pH'da elektrik yüklerinin farklı olması sebebiyle birbirlerinden ayrılırlar.

Elektroforezden sonra agardan hareket yönüne paralel olacak şekilde bantlar kesilip çıkarılır ve yerlerine antiserumlar doldurulur. Antiserumun yayılması için bir süre beklenir. Uygun antijen antikorla karşılaştığında presipitasyon bandı oluşur.



# Presipitasyon 10

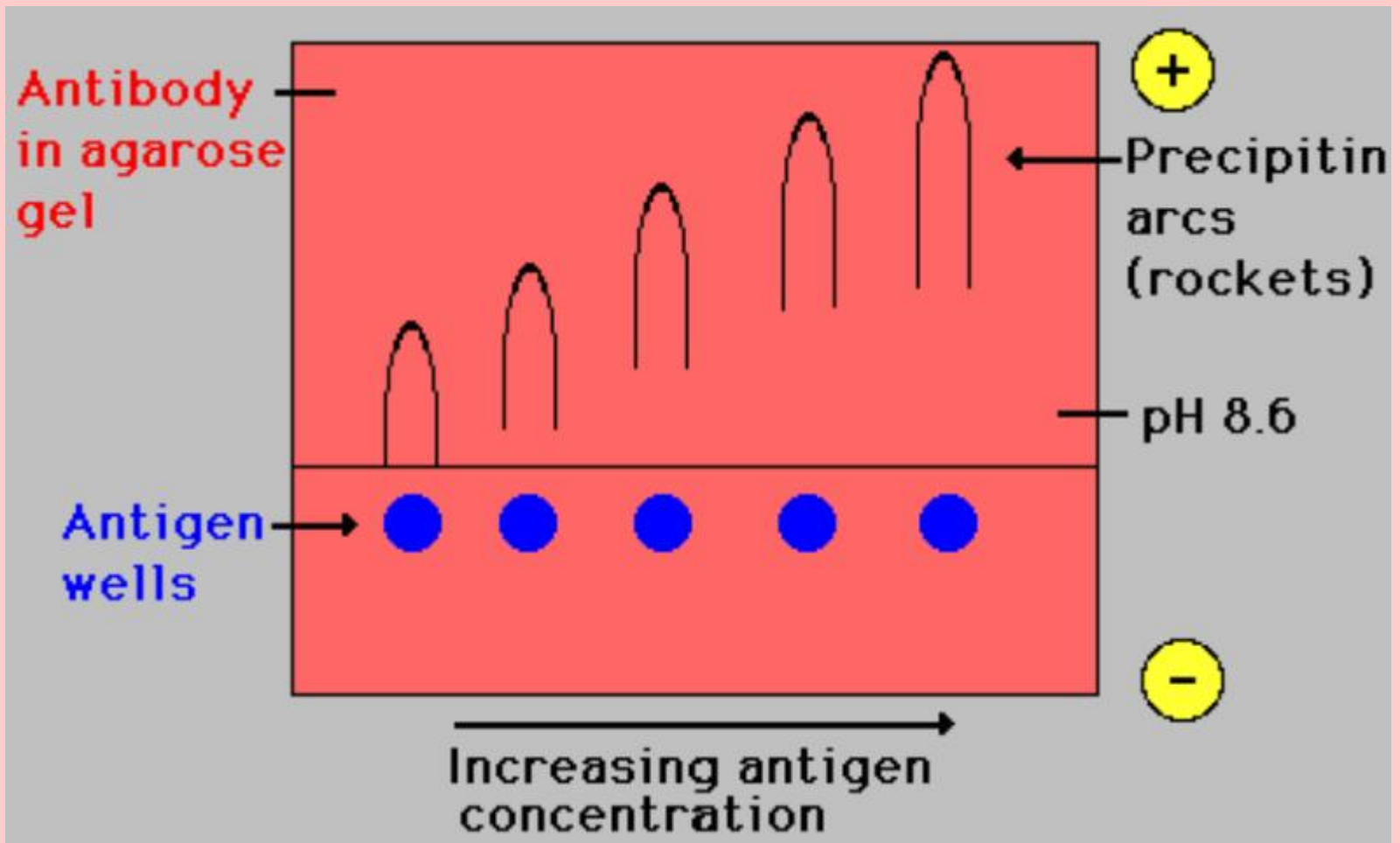
**Zıt yönlü immünoelektroforez**, çabuk yapılan çift yönlü jel difüzyon deneyidir. Hazırlanıp lama yayılan agarın iki ucuna iki çukur açılır. Çukurun birine antijen, diğerine antiserum konur. Antikorun bulunduğu taraf pozitif kutba, antijenin bulunduğu taraf ise negatif kutba bağlanır. Negatif yüklü olan antijen antiseruma doğru, antikor ise elektroendozmozla antijene doğru hareket eder ve karşılaştıkları yerde bir presipitasyon bandı oluşur.



# Presipitasyon 11

**Laurell (Roket) immünoelektroforezde**, antikor içeren ve pH'ı antikorun hareketsiz antijenin negatif yüklü olmasını sağlayacak şekilde ayarlanmış agarda açılan çukurlara değişen konsantrasyonlarda antijen veya değişik antijenler eklenir. Elektriksel alan uygulandığında rokete benzer şekilde presipitasyon bandları oluşur.

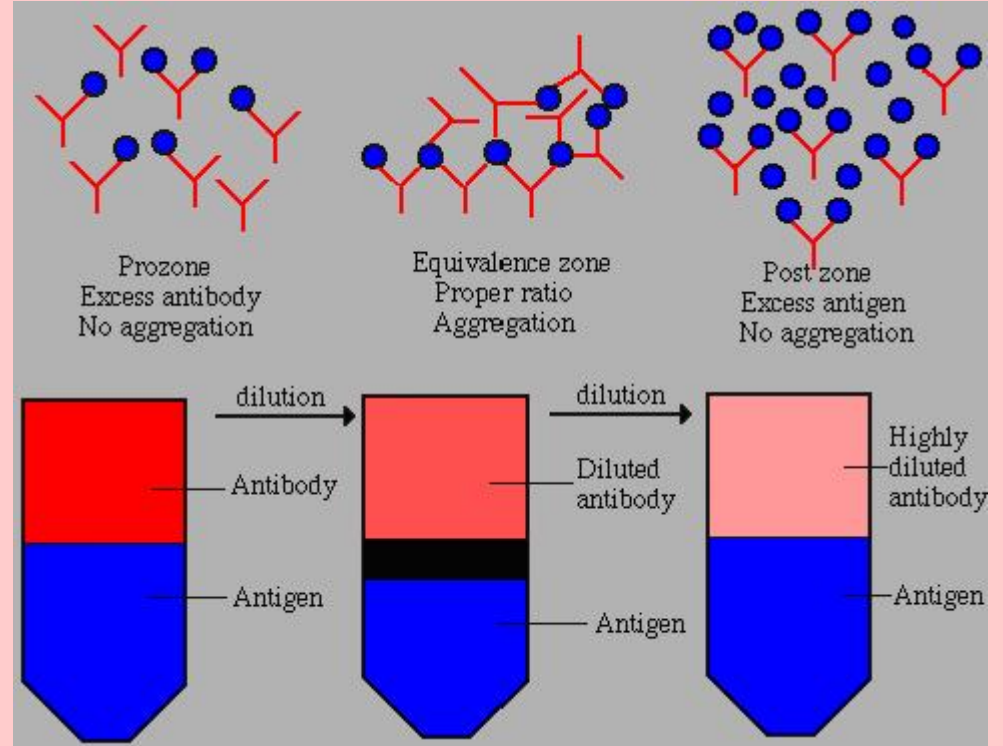
Oluşan presipitasyon bandlarının yüksekliği eklenen antijen konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. ***Standart eğri hazırlayarak kantitatif ölçüm de yapılabilir.***





# Flokülyasyon 1

**Flokülyasyon**, toksin (antijen) ve antitoksin (antikor) arasındaki reaksiyonla tüpte yaygın bir bulanıklığın meydana gelmesidir. Flokülyasyonda denge bölgesi çok dardır; bu bölge dışında prozon ve post zon olayları görülür.



# Flokülasyon 2

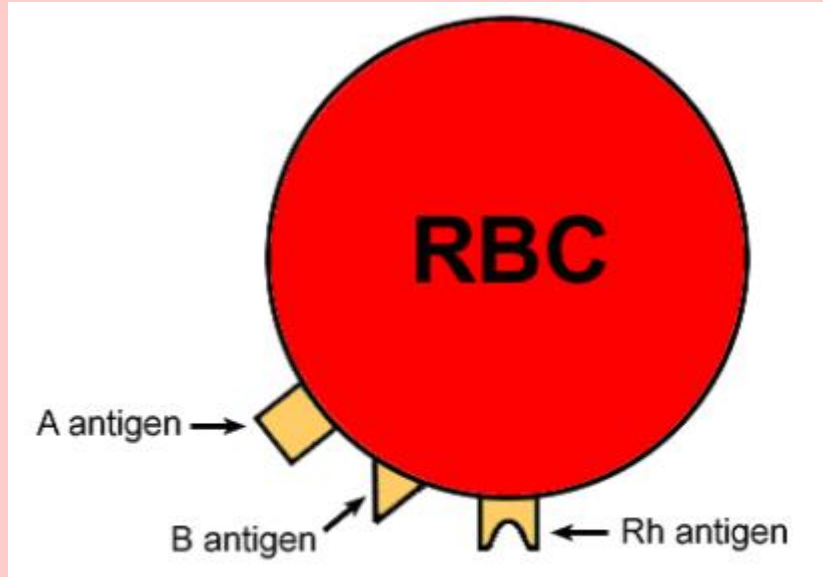
**Flokülasyon** testinde toksin (antijen) ve antitoksinden (antikor) biri sabit tutulurken diğeri sulandırılarak buna eklenir ve karışım 52°C'de tutulur. Tüpler sık sık kontrol edilir ve ilk bulanıklık görülen tüp flokülasyon titresini verir.

Toksinin miktarı  $L_f$  (flokülasyon sınırı birimi) cinsinden ifade edilir. Bir  $L_f$  birimi, bir birim antitoksini en çabuk floküle eden toksin miktarıdır.

# Aglütinasyon 1

Partiküler yapıdaki antijenin özgül antikor ile birleşmesi sonucu oluşan reaksiyona “**aglutinasyon reaksiyonu**” denir.

Aglütinasyon reaksiyonunda rol oynayan antijenler, bakteri hücresi, eritrosit gibi partiküler özelliktedir.



# Aglütinasyon 2

Aglütinasyonun meydana gelmesi için bazı şartlar gerekir:

-Ortamda elektrolitler olmalıdır. Bu nedenle aglütinasyon testleri serum fizyolojikle yapılır.

-pH'ın nötral veya nötrale yakın olması gerekir.

-Isının önemi vardır; aglütinasyon optimal ısı derecesinde yapılmalıdır.

-İyi bir aglütinasyon elde etmek için antijenin tuzlu suda iyi süspanse olması gerekir.

# Aglütinasyon 3

**Aglütinasyon testleri için**, bazı çözünen antijenler inert yapıdaki lateks, polystiren veya bentonit gibi partiküller hale getirilmiş taşıyıcı maddeler üzerine bağlanırlar. Bazı antijenler taze veya formalin ile işlem görmüş eritrosit yüzeyine direkt olarak bağlanabilmektedir.

Sıvı ortamda karıştırılan partiküller yapıdaki antijen ile özgül antikorun (aglutinan antikor) homojen görünümü zamanla çıplak gözle görülebilen kümeleşme haline dönüşür.

Partiküller antijen olarak eritrositin kullanıldığı aglutinasyon testlerine **hemaglutinasyon testleri** denir.

# Aglütinasyon 4

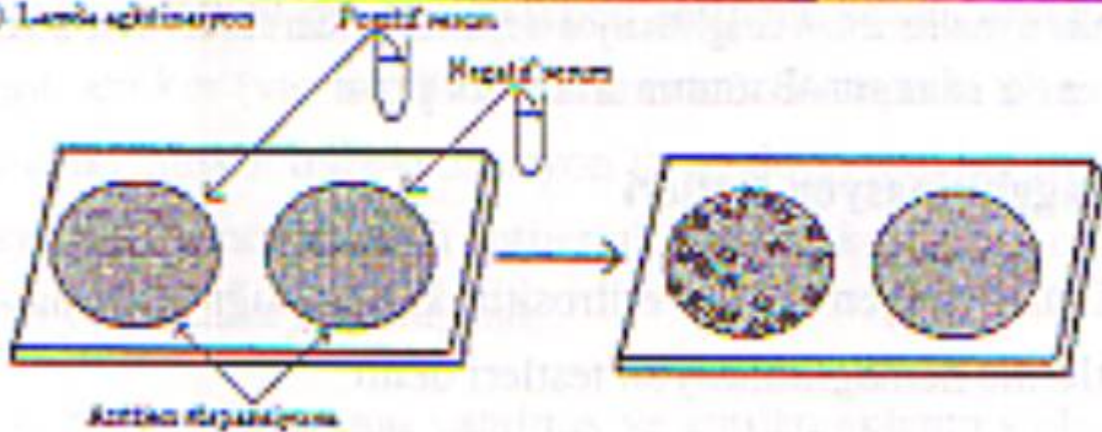
## a) Agglütinasyon matrisiyumu



## b) Tüpte agglütinasyon



## c) Lamda agglütinasyon



Aglütinasyon testleri mikroskopta, tüpte, lamda yapılabilir.

Aglütinan antikorlar genel olarak IgM ve IgG karakterinde antikorlardır.

# Kompleman fiksasyon testi 1

Antijen–antikor birleşmesinin komplemanı uyarmasına dayanarak geliştirilen iki basamaklı testtir.

-Özgül antikor varlığı araştırılan serum örneğinin tüplerde  $\frac{1}{2}$  oranında azalan seri dilüsyonları yapılır.

-Serum dilüsyonu yapılmış tüplerin her birine eşit miktarda antijen eklenir. Eklenen antijenle serum örneğindeki antikor (var ise) birleşerek immün kompleks oluşur. Belirli bir titreden sonra immün kompleks oluşmaz veya yeterli düzeyde oluşmaz.

# Kompleman fiksasyon testi 2

-Serum titrasyonu yapılmış ve antijen eklenmiş olan tüplerin her birine eşit miktarda kompleman eklenir. Eklenen kompleman immün kompleks oluşmuş tüplerde aktive olur ve tüketilir (antijen-antikor kompleksine bağlanır). Belirli bir tüpten sonra dilüsyon nedeniyle serumdaki antikor miktarının azalmasına bağlı olarak eklenen kompleman tüketilemez.

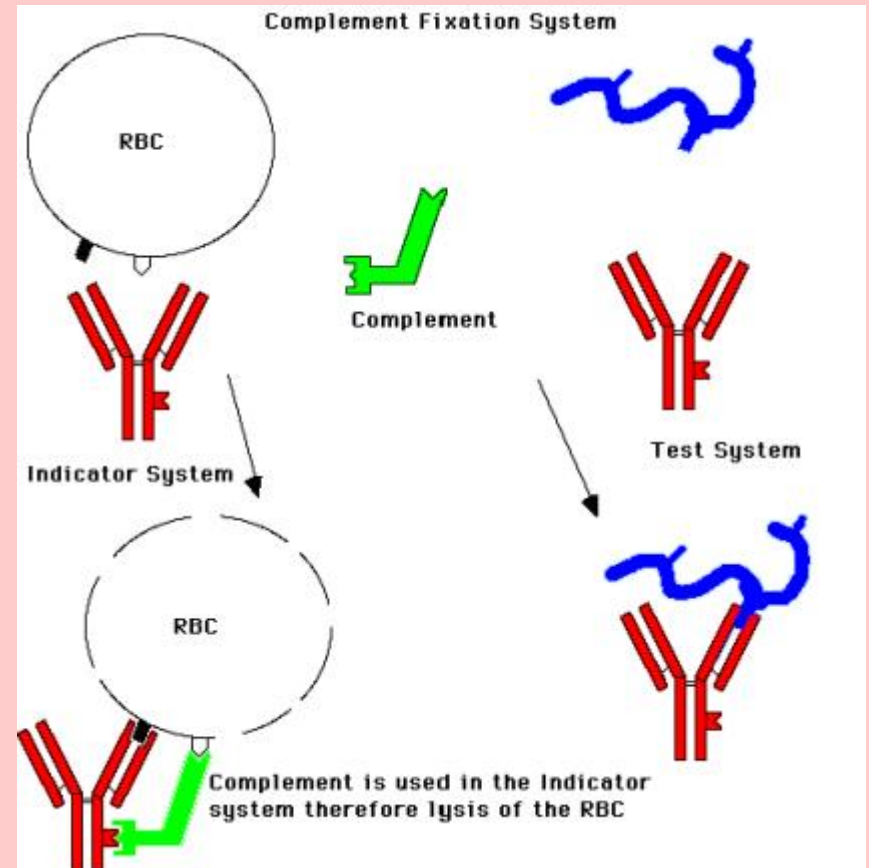
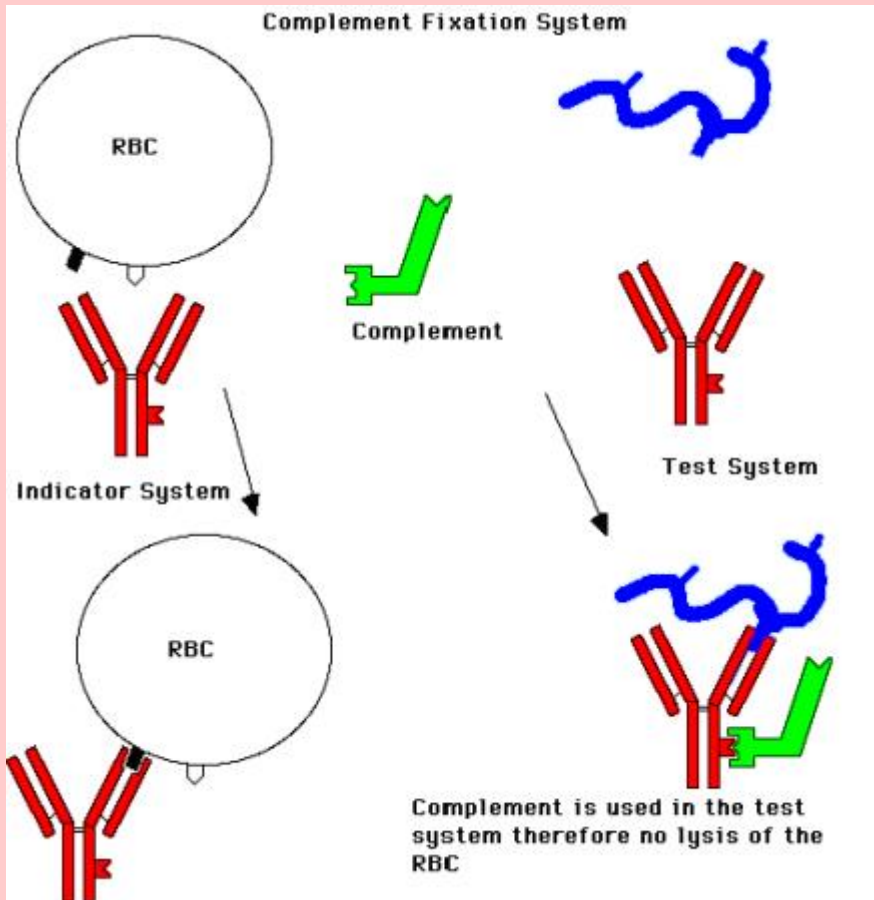
-Bütün tüplere indikatör hücreler (anti-eritrosit antikor kaplı eritrositler) eklenir. İmmün kompleks aracılığı ile tüplere eklenen kompleman tüketilmiş ise eklenen indikatör hücrelerde parçalanma olmaz zamanla tüpün dibine çökerler.



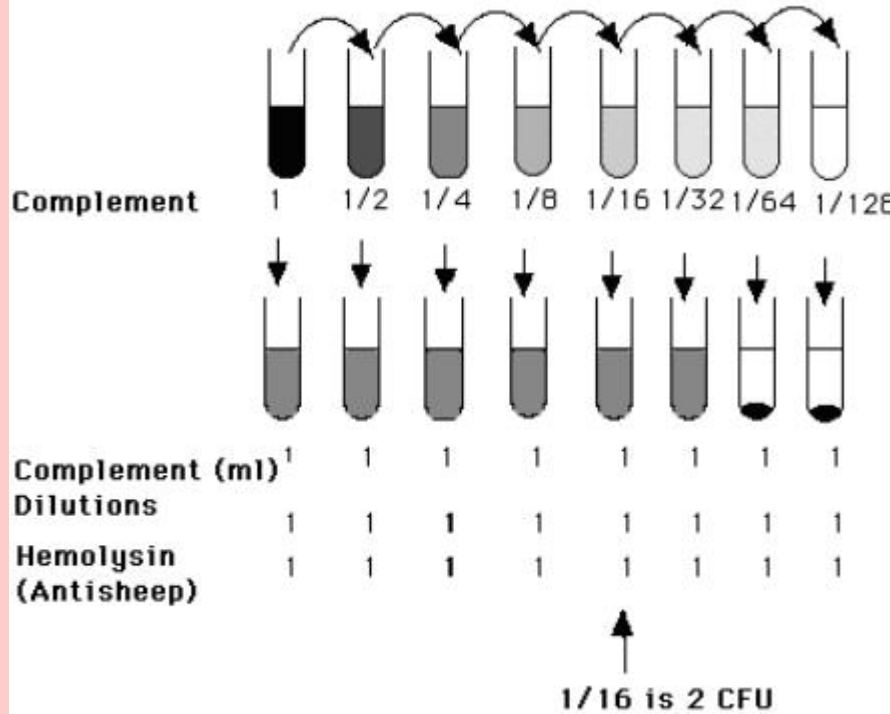
# Kompleman fiksasyon testi 3

-Tüplerde antijen-antikor kompleksi aracılığı ile tüketilmemiş kompleman kalmış ise kalan aktif kompleman miktarı ile ilişkili olarak indikatör hücrelerin tamamında veya bir kısmında lizis (hemoliz) olur.

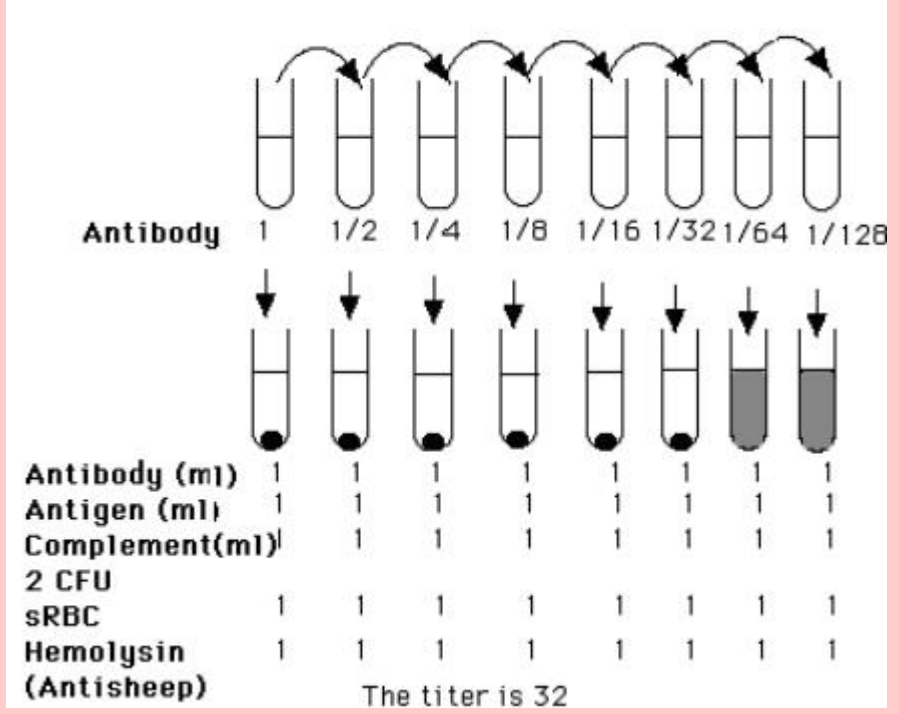
-Hemoliz olan ilk tüpten bir önceki tüpteki serum titrasyonu antikor miktarını tanımlamak için kullanılır.



### Complement Titration



### Complement Fixation (Dilution of Antiserum)



# İmmünotürbidimetrik ve immünonefelometrik ölçümler 1

Antijen-antikor bağlanması ile oluşan immün kompleks süspansiyonunu içeren küvete gönderilen monokromatik ışığın hem absorbe edilmesi hem de defleksiyona (sapmaya) uğratılması özelliğinden yararlanılan ölçümlerdir.

**Türbidimetrik yöntemde**, immün kompleks tarafından absorbe edilen ışık miktarı spektrofotometrik olarak ölçülür.

# İmmünotürbidimetrik ve immünonefelometrik ölçümler 2

**Nefelometrik yöntemde**, immün kompleksler tarafından defleksiyona uğratılan ışık miktarı orijinal ışık kaynağına belirli açılarda yerleştirilmiş olan dedektörler ile ölçülür.

Hem türbidimetrik yöntemde hem nefelometrik yöntemde absorbe edilen veya defleksiyona uğratılan ışık miktarı, sıvı ortamdaki immün kompleks miktarı ile doğru orantılıdır.

*Standart eğri hazırlayarak antijen veya antikorun kantitatif ölçümü yapılır.*

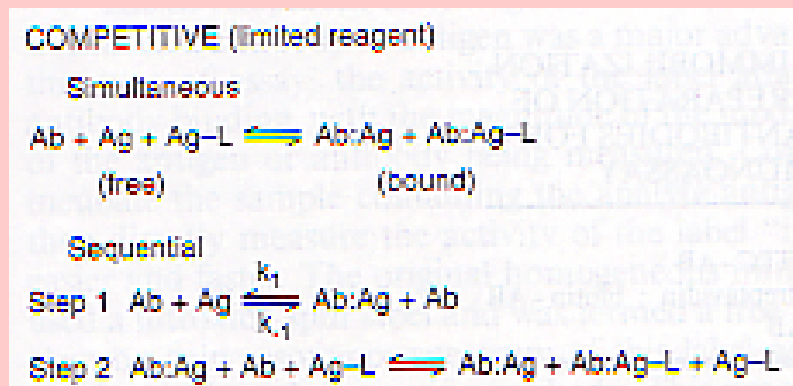
# İşaretlenmiş immünokimyasal ölçümler 1

İşaretlenmiş immünokimyasal ölçümler, genel olarak **kompetitif** veya **nonkompetitif** ve *heterojen* veya *homojen* olarak sınıflandırılabilir.



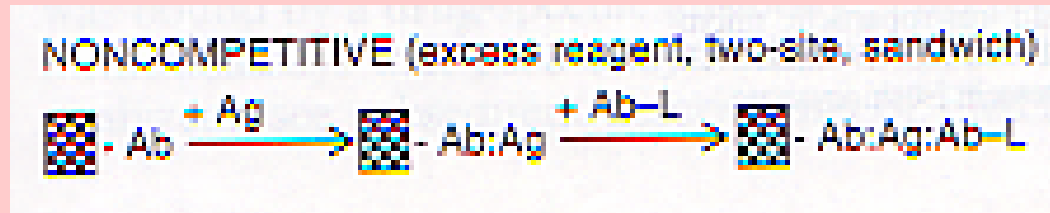
# İşaretlenmiş immünokimyasal ölçümler 2

**Kompetitif reaksiyonlar**, genellikle işaretlenmiş antijen kullanır ve aşırı antijen varlığında antijen ölçümü için yapılır. Bir adımda uygulanan yöntemde bütün reaktifler aynı zamanda karıştırılır, iki adımda uygulanan yöntemde belli zaman sırasıyla karıştırılır. Analit ve işaretlenmiş analit, antikor üzerindeki bağlanma yeri için yarışır.



# İşaretlenmiş immünokimyasal ölçümler 3

**Nonkompetitif ölçümler**, genellikle işaretlenmiş bir antikor kullanılarak ve aşırı antikor varlığında antijen ölçümü için yapılır. Plastik bir tane veya test tüpü gibi bir solid faza bağlı antikor ve çözeltide işaretlenmiş antikor içeren ikinci faz vardır.





# İşaretlenmiş immünokimyasal ölçümler 4

**Heterojen ölçümlerde**, serbest işaretli antijeni ( $Ag^*$ ) bağlı işaretli antijenden ( $AbAg^*$ ) ayırmak için fiziksel ayırma teknikleri gerekir.

**Homojen ölçümlerde**, serbest işaretli antijeni ( $Ag^*$ ) bağlı işaretli antijenden ( $AbAg^*$ ) ayırmak için fiziksel ayırma teknikleri gerekli değildir; antikor bağlanmasıyla antijenin işaretinin aktivitesi modüle edilir ve modülasyonun büyüklüğü ölçülen antikor veya antijen konsantrasyonu ile orantılıdır.

# İşaretlenmiş immünokimyasal ölçümler 5

Radyoimmünoassay (RIA), Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ve Time-resolved fluorescence immunoassay, heterojen immünokimyasal ölçüm teknikleridirler.

Fluorescence polarization immunoassay (FPIA), Enzyme-multiplied immunoassay (EMIT) ve cloned enzyme donor immunoassay (CEDIA), homojen immünokimyasal ölçüm teknikleridirler.

# Heterojen, nonkompetitiv, işaretlenmiş antikoru immünokimyasal teknikler 1

Bu tekniklerin ilk basamağında **bir solid fazda immobilize edilmiş antikoru** kullanılır.

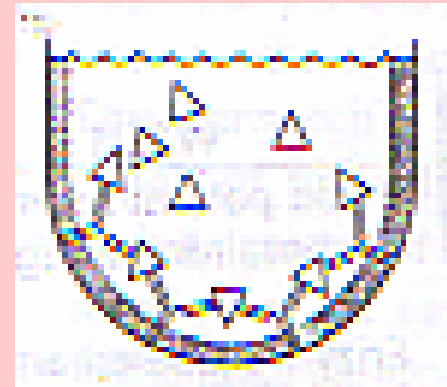
Antikoru, polystyrene microtiter plate, latex veya ferromagnetik partiküllerde immobilize edilebilirler.



# Heterojen, nonkompetitiv, işaretlenmiş antikoru immünokimyasal teknikler 2

İkinci basamakta, immobilize antikorla serum örneğinde ölçülmek istenen antijen bağlanır; **antikor-antijen kompleksi** oluşur.

Yıkama ile **antikor-antijen** kompleksi dışındaki maddeler ortamdan uzaklaştırılır.



# Heterojen, nonkompetitiv, işaretlenmiş antikoru immünokimyasal teknikler 3

Üçüncü basamakta, işaretlenmiş ikinci bir **antikor\*** solid fazda immobilize antikora baęlanmiř olan antijene (antikor-antijen kompleksine) baęlanarak sandwich formu (**antikor-antijen-antikor\***) oluřturur.

Yıkama ile **antikor-antijen-antikor\*** kompleksi dışındaki maddeler ortamdan uzaklaştırılır.



# Heterojen, nonkompetitiv, işaretlenmiş antikoru immünokimyasal teknikler 4

Dördüncü basamakta, işaretlenmiş ikinci **antikor**\*un işareti enzim ise, uygun kofaktörle birlikte substrat eklenir ve oluşan ürünün miktarı renk (ELISA'da), fluorescence (FIA'da) veya ışık (chemiluminescence immunoassay'de) olarak ölçülür.

*Bu basamakta oluşan ürünün miktarı, test örneğindeki antijenin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.*



# Heterojen, nonkompetitiv, işaretlenmiş antikoru immünokimyasal teknikler 5

Serumda bulunan allerjen antijene özgül antikorumun (spesifik IgE antikoru) ölçülmesi için geliştirilen **RAST testinde** solid fazda immobilize test antijenleri ve enzimle işaretlenmiş anti-immünoglobulinler kullanılmaktadır.



# Heterojen, kompetitiv, işaretlenmiş antikorlu immünokimyasal teknikler 1

Bu tekniklerin ilk basamağında **bir solid fazda immobilize edilmiş antikorlar** kullanılır.

Antikorlar, polystyrene  
microtiter plate, latex veya  
ferromagnetik partiküllerde  
immobilize edilebilirler.

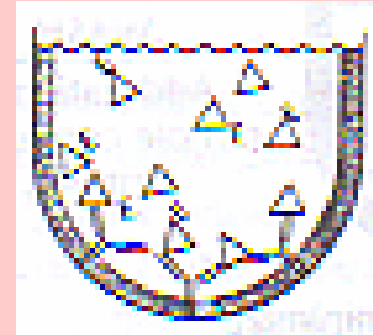




# Heterojen, kompetitiv, işaretlenmiş antikoru immünokimyasal teknikler 2

İkinci basamakta, immobilize antikorla bağlanmak için serum örneğinde ölçülmek istenen antijen ve işaretli antijen\* yarışır; **antikor-antijen** ve **antikor-antijen\*** kompleksleri oluşur.

Yıkama ile **antikor-antijen** ve **antikor-antijen\*** kompleksleri dışındaki maddeler ortamdan uzaklaştırılır.



# Heterojen, kompetitiv, işaretlenmiş antikorlu immünokimyasal teknikler 3

Üçüncü basamakta, işaretlenmiş **antijen**\*'nin işareti enzim ise, uygun kofaktörle birlikte substrat eklenir ve oluşan ürünün miktarı renk (ELISA'da), fluorescence (FIA'da) veya ışık (chemiluminescence immunoassay'de) olarak ölçülür.

*Bu basamakta oluşan ürünün miktarı, test örneğindeki antijenin konsantrasyonu ile ters orantılıdır.*



# Radioimmunoassay 1

Radyoimmunoassay'de temel mekanizma, radyoizotop bir madde ile işaretli antijen veya antikor aracılığı ile karşılığı olan (özgül olduğu) antikor veya antijenin varlığını ve miktarını saptamaktır. En fazla kullanılan madde radyoaktif iyottur ( $^{125}\text{I}$  veya  $^{131}\text{I}$ ).

Kompetisyon mekanizmasına dayalı (RIA) ve sandwich yöntemi şeklinde (IRMA) uygulanabilir.

Bu yöntemle pikomolar konsantrasyonlarda hormonlar, plazma proteinleri, koagulasyon faktörleri ve izoenzimler ölçülebilir.

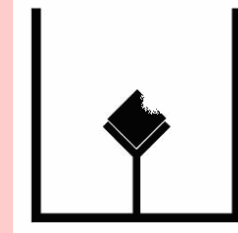
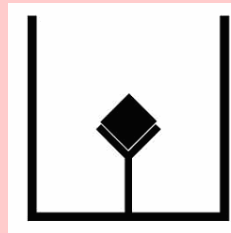
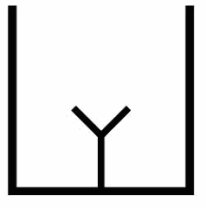
# Radioimmunoassay 2

## Kompetisyon mekanizmasına dayalı RIA yönteminde;

-Serumda varlığı araştırılan antijene özgül antikor katı faza (plastik veya polistren tüpün iç yüzeyi) bağlanmıştır.

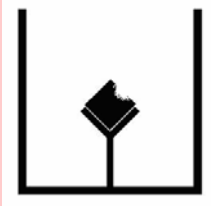
-Tüp içerisine serum örneği ve radyoizotop ile işaretli antijen (antijen\*) eklenir.

-İnkübasyon süresince, varsa serumdaki ve eklenen radyoizotop işaretli antijenler antikorlara bağlanmak için yarışır; **antikor-antijen** ve **antikor-antijen\*** kompleksleri oluşur.



# Radioimmunoassay 3

-İnkübasyondan sonra yıkama ile çözeltideki **antikor-antijen** ve **antikor-antijen\*** kompleksleri dışındaki maddeler ortamdan uzaklaştırılır.

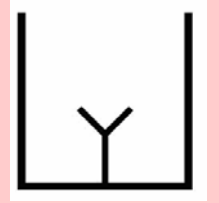


-Ölçüm tüpündeki **antikor-antijen\*** kompleksinin radyoaktivitesi bir gamma sayacı kullanılarak ölçülür.

-Serum örneğinde aranan antijen azsa gamma sayacında yüksek düzeyde okuma elde edilir; serum örneğinde aranan antijen fazlaysa gamma sayacında düşük düzeyde okuma elde edilir. *Standart inhibisyon eğrisi kullanılarak miktar tayini yapılır.*

# Radioimmunoassay 4

## Sandwich yöntemine dayalı IRMA (immunoradiometric assay) yönteminde;



-Serumda varlığı araştırılan antijene özgül antikor katı faza (plastik veya polistren tüpün iç yüzeyi) bağlanmıştır.

-Tüp içerisine serum örneği eklenir ve bir süre beklenir (inkübe edilir).

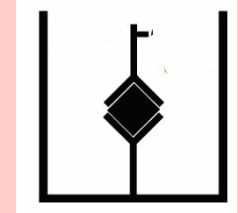


-İnkübasyon süresince, varsa serumdaki antijenler antikorlara bağlanırlar; **antikor-antijen** kompleksi oluşur.

- İnkübasyondan sonra yıkama ile **antikor-antijen** kompleksi dışındaki maddeler ortamdan uzaklaştırılır.

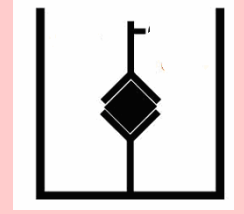
# Radioimmunoassay 5

- Yıkama işlemi sonrası tüpe aynı antijene özgül ve radyoizotop işaretli antikor (antikor\*) eklenerek inkübe edilir.
- İnkübasyon süresince radyoizotop işaretli antikor, katı fazdaki antikor aracılığı ile tutulmuş olan antijene bağlanır; **antikor-antijen-antikor\*** kompleksi oluşur.
- İnkübasyondan sonra yıkama ile çözeltideki **antikor-antijen-antikor\*** kompleksi dışındaki maddeler ortamdan uzaklaştırılır.



# Radioimmunoassay 6

-Ölçüm tüpündeki **antikor-antijen-antikor\*** kompleksinin radyoaktivitesi bir gamma sayacı kullanılarak ölçülür.



-Gamma sayacında okunan değer, serum örneğindeki antijen miktarı ile ilişkilidir. *Standart eğri kullanılarak miktar tayini yapılır.*

IRMA (immunoradiometric assay) yöntemi, RIA'ya göre daha hızlı ve daha duyarlıdır; serum proteinleri, faktör VIII, ferritin, tiroksin bağlayıcı globulin, CEA, AFP, IgE, PSA, TSH, prolaktin, GH, hCG gibi hormonların ölçümünde kullanılır.



# Radioimmunoassay 7

**Radioallergosorbant test (RAST)**, radioimmunoassay yöntemiyle yapılan testlerden biridir. Bu test ile serumda allerjen antijene özgül IgE antikoru aranır.

**Radioimmunosorbant test (RIST)**, kompetisyon esasına dayalı olarak yapılan RIA testlerinden biridir. Bu test ile total IgE ölçülür.

# Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 1

**ELISA yöntemi**, özgül antijen-antikor bağlanmasının antikorlara alkalen fosfataz veya horseradish peroksidaz gibi bir enzim bağlanması ve bu enzim substratının renkli ürünlere dönüştürülmesi suretiyle gösterilmesi esasına dayalı immünokimyasal ölçüm tekniğidir.

ELISA yönteminde özgül antikor kullanılarak örnekteki antijenin miktarını, özgül antijen kullanarak örnekteki antikorun miktarını ölçebiliriz.

ELISA yöntemi, çeşitli şekillerde uygulanabilir.

# Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 2

## **Kompetitif ölçümde;**

-Ölçüm tüpünde bir katı destek üzerine bir antijen veya antikor adsorbe edilmiştir (immobilize antijen veya antikor).

-Ölçüm tüpüne serum (işaretsiz ligand içerir) ve reaktif (enzim işaretli ligand\* içerir) pipetlenir.

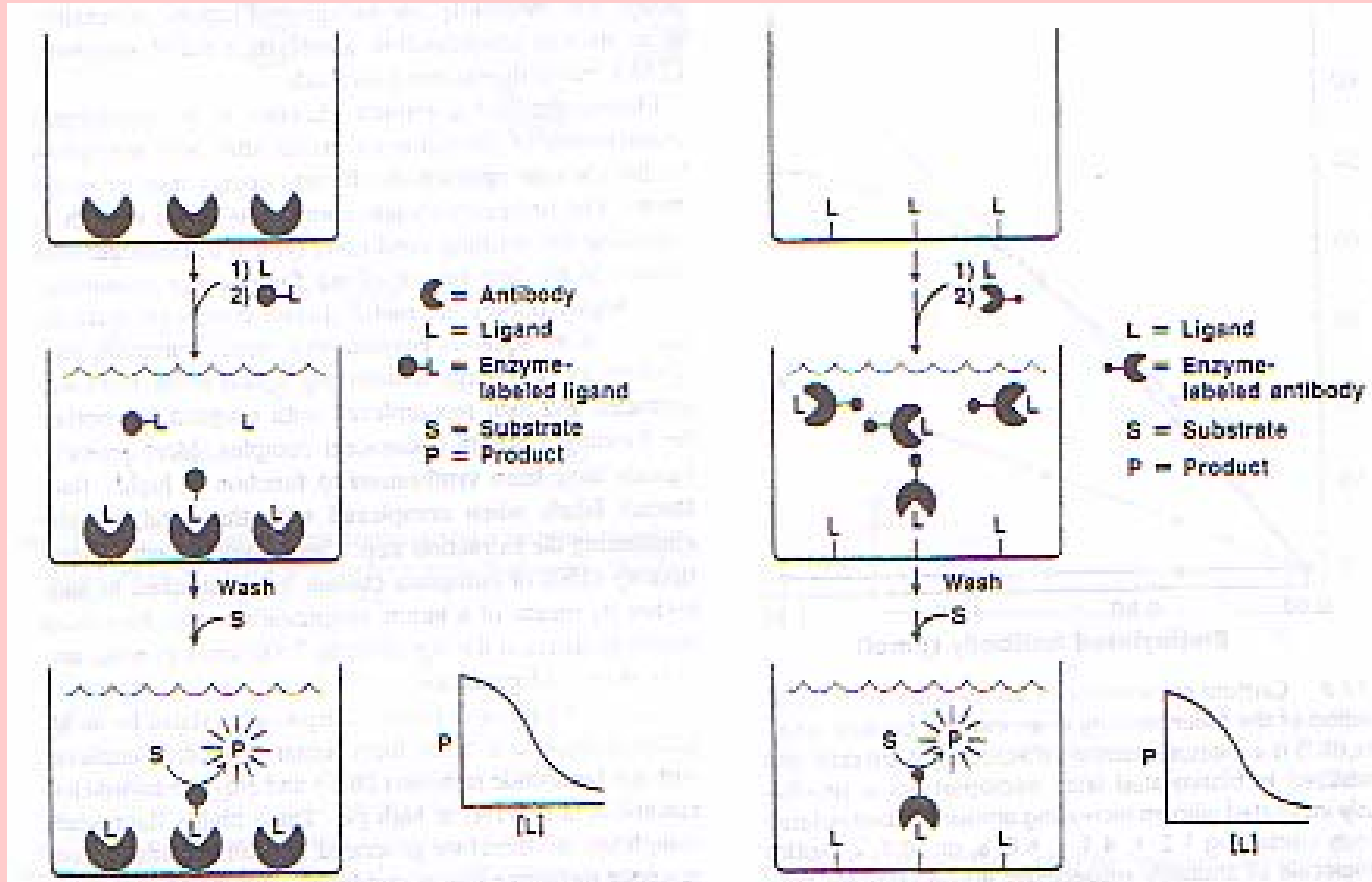
# Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 3

-Kısa inkübasyon süresince immobilize antijen veya antikora bağlanmak için işaretli ligand ile enzim işaretli ligand\* yarışır; **antijen (veya antikor)-işaretsiz ligand ve antijen (veya antikor)-enzim işaretli ligand\*** kompleksleri oluşur.

-Yıkama ile **antijen (veya antikor)-işaretsiz ligand ve antijen (veya antikor)-enzim işaretli ligand\*** kompleksleri dışındaki ürünler ortamdan uzaklaştırılır.

# Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 4

- Enzimin substratı ortama eklenir.
- Renkli ürün oluşumu end-point veya kinetik ölçümle izlenerek ölçülür.
- Renkli ürün oluşumu, işaretli ligandın (serumdaki antijen veya antikör) konsantrasyonu ile ters orantılıdır.
- Standart grafikten konsantrasyon belirlenir.



Kompetitif ELISA yöntemi, sıklıkla antikor ölçümünde kullanılmaktadır; bu durumda ölçüm tüpünün iç duvarı antijen ile kaplıdır.

# Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 5

## **Nonkompetitif ölçümde (sandwich yöntemi);**

-Polistren ölçüm tüplerinin iç duvarına antijen için spesifik antikolar fazla miktarda adsorbe edilmiştir (immobilize antikolar).

-Ölçüm tüpüne örnek pipetlenir.

-İnkübasyon süresince örnekteki antijenlerin hepsi immobilize antikolar tarafından bağlanırlar; **antikor-antijen** kompleksleri oluşur.

# Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 6

-Yıkama ile **antikor-antijen** kompleksleri dışındaki maddeler ortamdan uzaklaştırılır.

-Ölçüm tüpüne reaktif (enzim işaretli antikor\* içerir) pipetlenir.

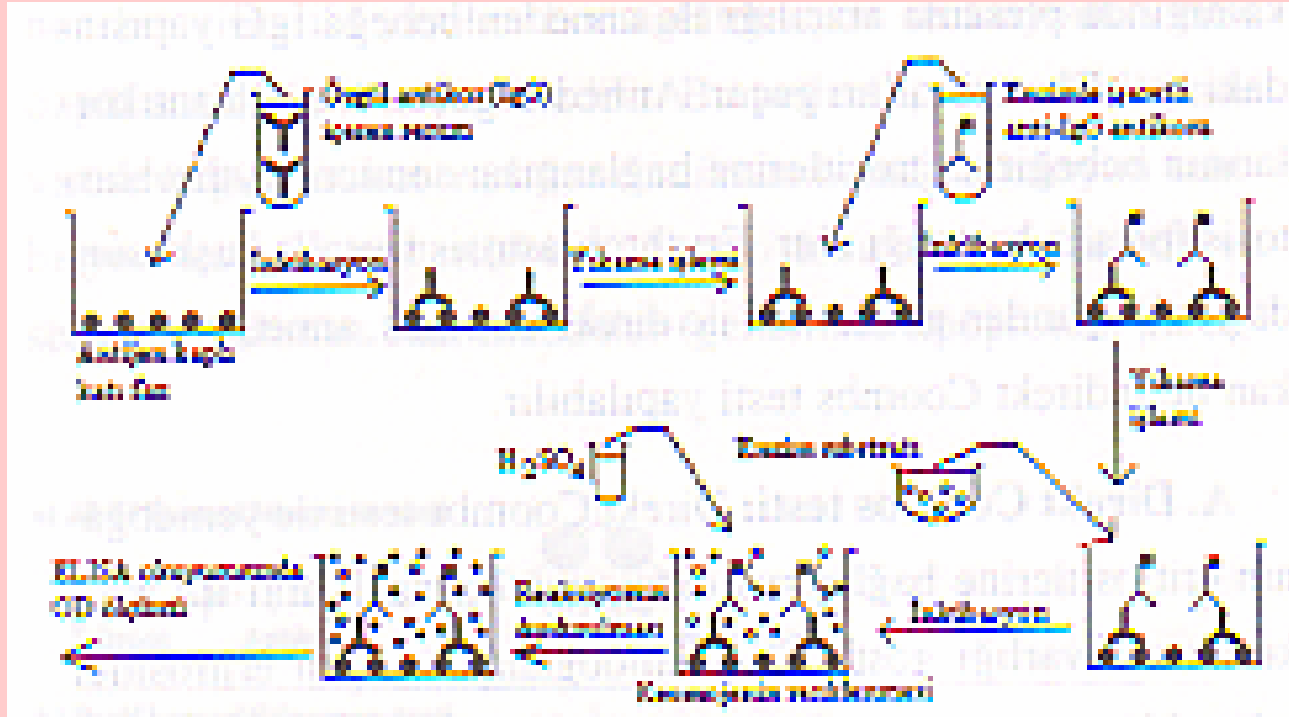
-İkinci inkübasyon süresince **primer antikor-antijen-enzim işaretli antikor\*** kompleksi oluşur.

-Yıkama ile **primer antikor-antijen-enzim işaretli antikor\*** kompleksi dışındaki maddeler ortamdan uzaklaştırılır.



# Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 7

- Enzimin substratı ortama eklenir.
- Renkli ürün oluşumu end-point veya kinetik ölçümle izlenerek ölçülür.
- Renkli ürün oluşumu, işaretli ligandın (serumdaki antijen veya antikör) konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.
- Standart grafikten konsantrasyon belirlenir.

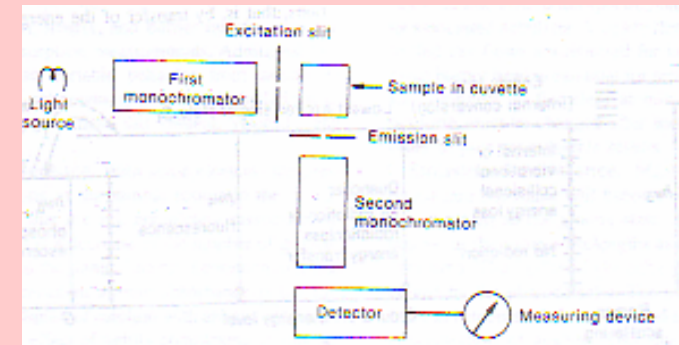
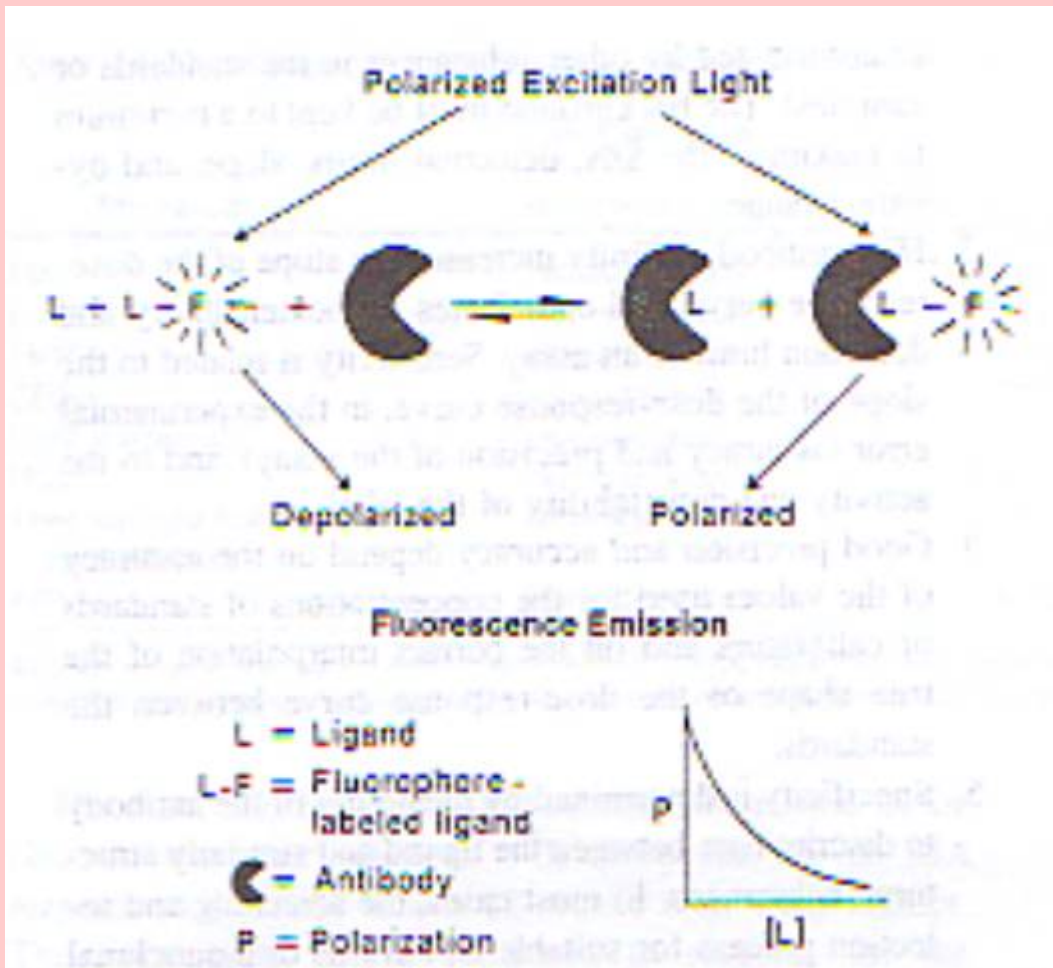


ELISA’da kullanılan antijen ve antikorlar steril koşullarda yıllarca saklanabilir. ELISA, faktör VIII ile ilgili antijenler, CEA, AFP, hCG gibi tümör belirteçleri ve IgG, IgM gibi antikorların ölçümünde kullanılır.

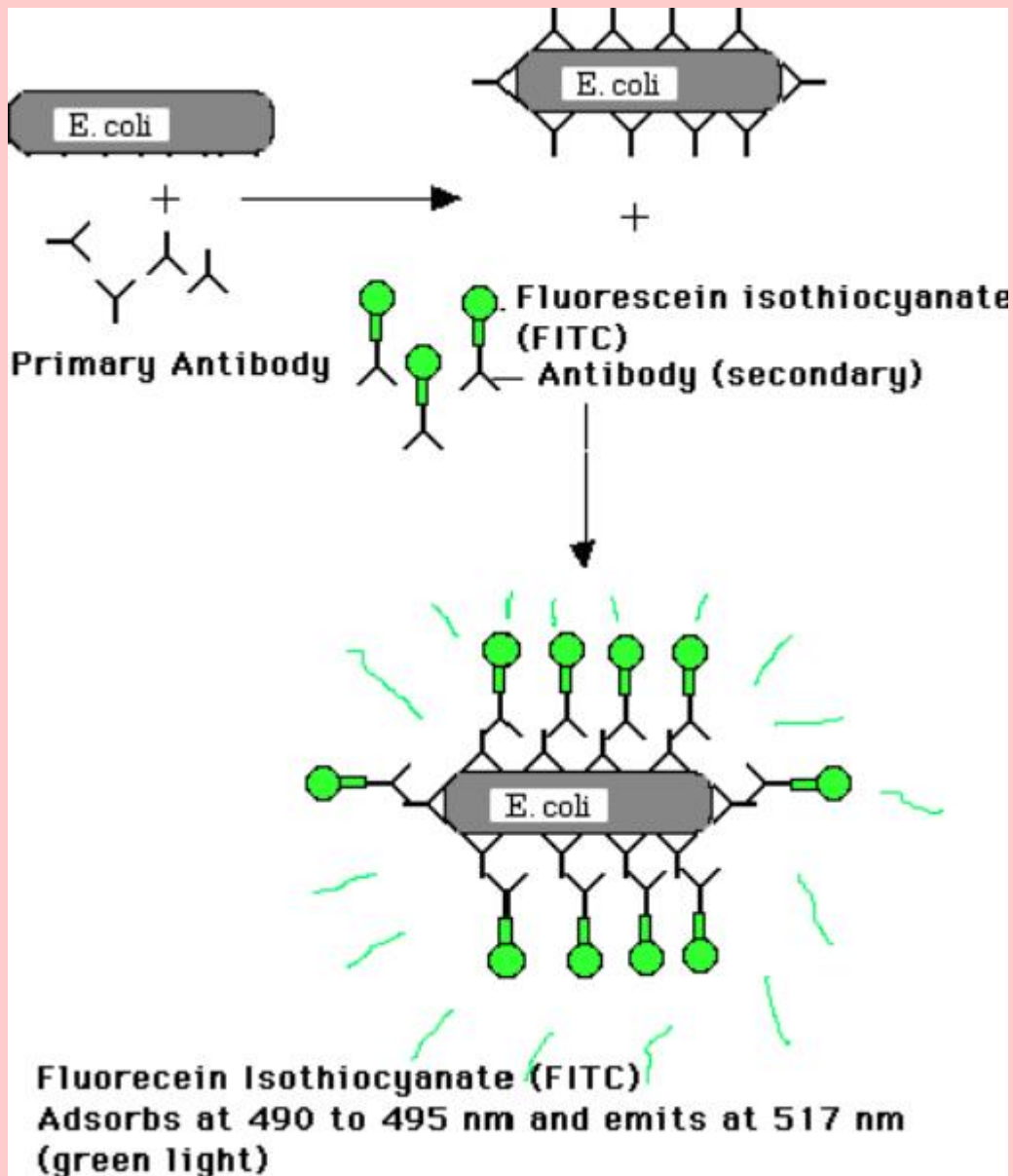
# Fluoroimmunoassay (FIA)

**Fluoroimmunoassay (FIA) yöntemler**, özgül antijen-antikor bağlanmasının gösterilmesinde bazı maddelerin fluoresans özelliklerinden yararlanılan immünokimyasal ölçüm teknikleridir.

Time-resolved fluorescence immunoassay ve Fluorescence polarization immunoassay (FPIA) gibi çeşitli fluoroimmunoassay yöntemler vardır.



Fluorescence polarization immunoassay (FPIA) homojen bir teknik olduğu halde Time-resolved fluorescence immunoassay heterojen tekniktir.



Abbott Axsym System’de, fluorescence polarization immunoassay (FPIA) yöntemi ve microparticle enzyme immunoassay (MEIA) yöntemi ile analiz yapılmaktadır.

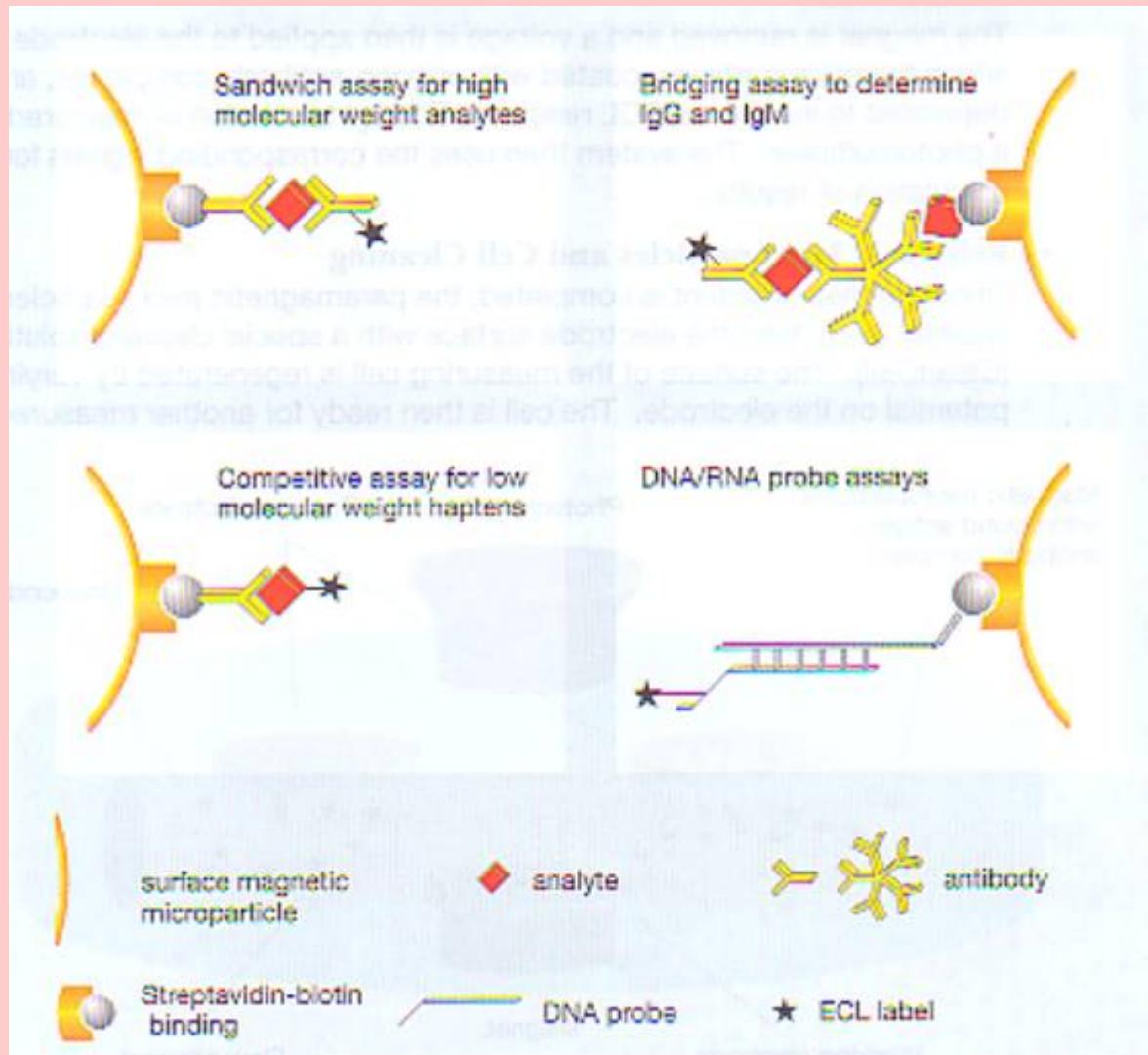


# Chemiluminescent immunoassay

**Chemiluminescent immunoassay (CL)**, özgül antijen-antikor bağlanmasının gösterilmesinde bazı maddelerin kimyasal tepkimedен sağlanan enerji ile uyarılmasıyla luminesans özelliği göstermesinden yararlanan immünokimyasal ölçüm tekniğidir.

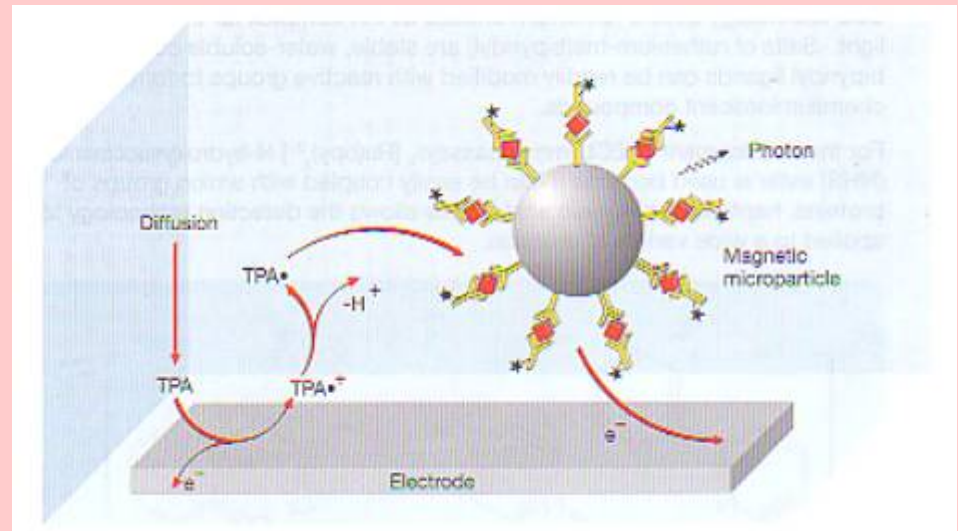
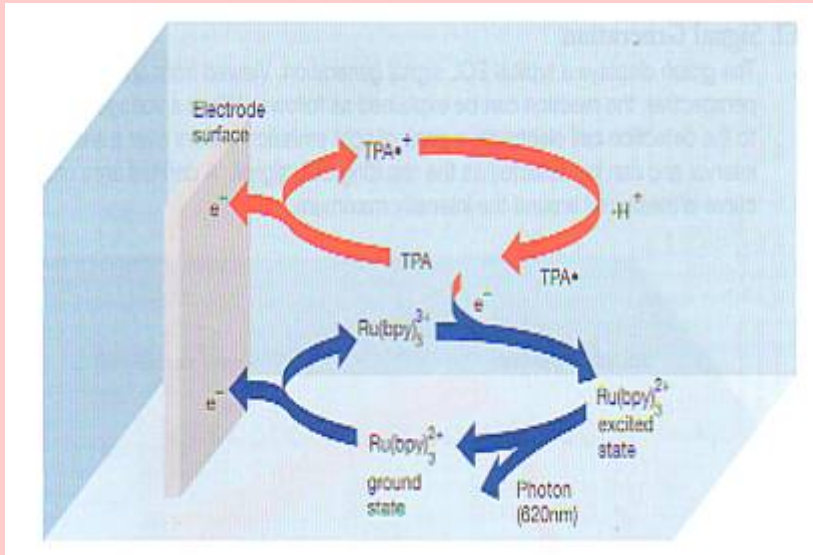
**Elektroluminesans veya elektrokemiluminesans (ECL)** tekniğinde luminesans özelliği için gerekli enerji elektrot tepkimesinden sağlanmaktadır.

# Kompetitif ve nonkompetitif ECL uygulamaları olabilir.



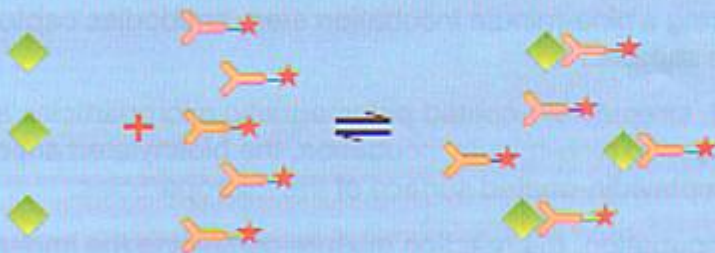


Ruthenium (II)-tris (bipyridyl) kompleksi  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  ve tripropylamine (TPA), ECL tekniğinde luminesans işaret için kullanılmaktadır.



# COMPETITIVE PRINCIPLE

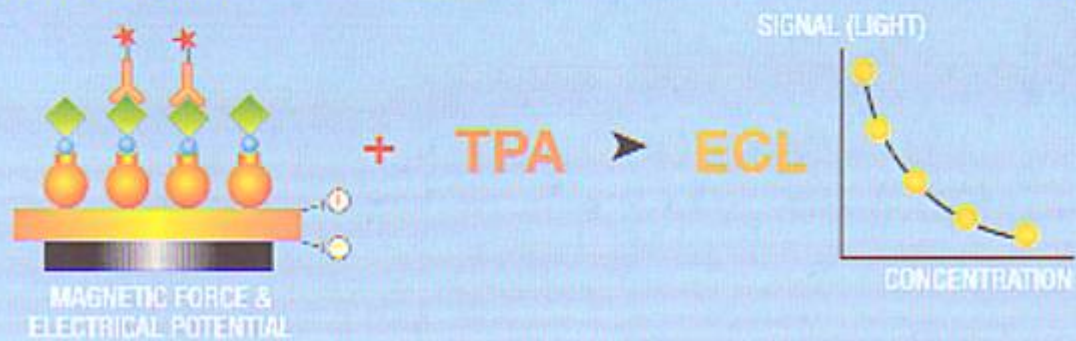
## FIRST REACTION



## SECOND REACTION



## LIGHT REACTION

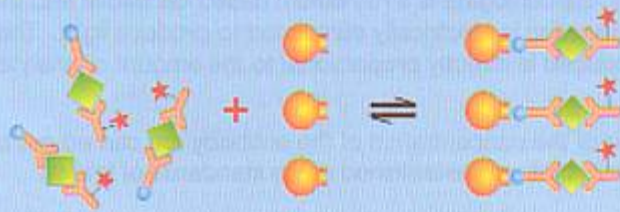


# SANDWICH PRINCIPLE

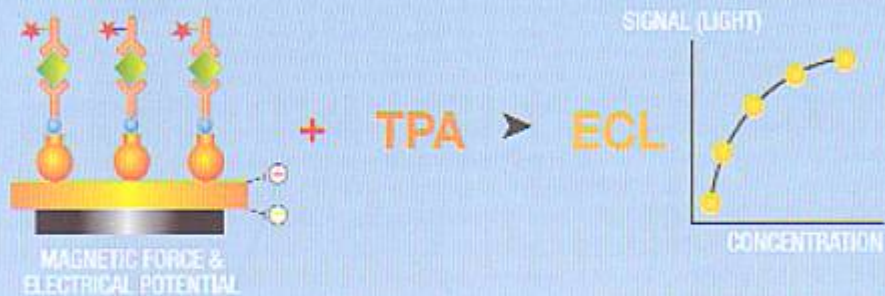
## FIRST IMMUNOLOGICAL REACTION



## SECOND REACTION



## LIGHT REACTION



◆ ANTIGEN

Y BIOTINYLATED ANTIBODY

Y\* RUTHENIUM LABELED ANTIBODY

● STREPTAVIDIN-COATED MICROPARTICLE

TPA TRIPROPYLAMINE

Elecsys 2010 immunoassay system'de ECL yöntemi ile analiz yapılmaktadır.

Kompetitif prensip; T4, T3, FT4, FT3, E2, Progesteron, Testosteron, DHEA-S, Kortizol, Folat, Vitamin B<sub>12</sub> analizlerinde uygulanmaktadır.

Sandwich prensip; TSH, FSH, LH,  $\beta$ -hCG, Prolaktin, Total PSA, Free PSA, İnsülin, PTH, AFP, CEA, CA 19-9, CA 125-5, CA 15-3 analizlerinde uygulanmaktadır.