

ELISA: Ein mächtiges immunologisches Nachweisverfahren mit klangvollem Namen



Der **Enzyme Linked Immunosorbent Assay** (ELISA, *enzymgekoppelter Immunassay*), ist ein immunologisches Nachweisverfahren (Assay), das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Mithilfe des ELISA können Proteine (z.B. Antikörper), Viren, aber auch niedermolekulare Verbindungen wie Hormone oder Toxine in einer Probe (Blutserum, Milch, Urin, etc.) nachgewiesen und/oder quantifiziert werden. Der ELISA beruht auf die spezifische Reaktion zwischen Antikörper und Antigen. Es lassen sich 4 Hauptverfahren unterscheiden, die nun im Einzelnen vorgestellt werden.

1. Direkter ELISA

Der **direkte ELISA** ist das einfachste und am schnellsten durchzuführende ELISA-Verfahren zum Antigennachweis. Kennzeichen aller direkter ELISA-Verfahren ist, dass das Antigen und der markierte Antikörper direkt aneinander gebunden werden:

Zuerst werden die Kavitäten der Mikrotiterplatte mit der Probelösung/Kalibrierlösungen inkubiert, so dass die zu quantifizierenden Antigene an die Kavitätenböden gebunden werden (**Coating**). Nach dem Coating und einem Waschschrift werden noch freie Plätze auf den Böden der Vertiefungen durch Zugabe einer Proteinlösung (Rinderserumalbumin-Lösung oder Casein-Lösung) belegt (**Blocking**). Nach diesem Abblocken und einem erneuten Waschschrift wird nun mit dem Nachweisreagenz inkubiert, einer Lösung mit dem enzymmarkierten Antikörper (**konjugierte Antikörper, Konjugat**) das spezifisch an das nachzuweisende Antigene binden kann. Gibt man nach einem letzten Waschschrift das Substrat in die Kavität, so zeigt dessen Umsetzung zu einem Farbstoff an, dass eine bestimmte Menge Enzym in Form von Konjugaten vorgelegen haben muss. Damit ist nachgewiesen, dass die Probelösung das gesuchte Antigen enthielt. Eine fotometrische Quantifizierung der Farbstoffkonzentrationen bei gleichzeitiger Benutzung von Vergleichslösungen bekannter Antigenkonzentrationen kann genutzt werden, um mithilfe einer Kalibrierkurve den Gehalt an Antigenen auch quantitativ zu bestimmen. Zur quantitativen Auswertung ist es wichtig, die Zeit in der evtl. vorhandenes Enzym auf das Substrat einwirken kann, in allen Kavitäten exakt gleich lang zu halten. Deshalb wird die Farbstoffentwicklung in den Vertiefungen nach einer gewissen Zeitspanne durch Zugabe einer starken Säure oder Base gestoppt („**Abstoppen**“). Nun hat man genug Zeit, in Ruhe die fotometrischen Messungen durchzuführen.

1.1 [Zusammen mit Lehrkraft]: Notieren Sie die einzelnen Arbeitsschritte für einen direkten ELISA mit jeweils erläuternden Hintergründen.

1.2 Zeichnen Sie, ähnlich Abb. 2.1 oder Abb. 4.1 (siehe dort!), eine beschriftete Skizze zu einem direkten ELISA.

1.3 Notieren Sie Faktoren, von der die Konzentration des Farbstoffs abhängt.

Durch die Verwendung von nur einem Antikörper handelt es sich beim direkten ELISA um ein relativ schnelles Nachweisverfahren. Als Nachteil entpuppt sich jedoch, dass für jedes zu analysierende Antigen passende enzymmarkierte Antikörper vorhanden sein müssen. Die Herstellung solcher Konjugate aus unmarkierten Antikörpern ist zeitaufwändig, der Kauf fertiger Konjugate teuer.

Weiterhin muss die Probenflüssigkeit beim direkten ELISA in der Regel aufgereinigt werden, denn sonst besetzen viele unerwünschte/irrelevante Stoffe die Bindungsstellen des Plattenbodens, während nur ein geringer Anteil des Analyts gebunden wird. Das detektierte Signal wäre dann relativ schwach.

2. Indirekter ELISA

Alle Methoden, bei denen das Antigen und der markierte Antikörper nur indirekt über einen verbrückenden Antikörper gekoppelt sind, werden indirekte ELISA-Methoden

genannt. Ein indirekter ELISA kann sowohl zum Antikörpernachweis als auch zum Antigennachweis eingesetzt werden.

a) indirekter ELISA zum Nachweis spezifischer Antikörper

Hierbei werden bestimmte Antikörper nachgewiesen. *Beispiel:* Eine Infektion eines Versuchstier/Patienten wird dadurch nachgewiesen, dass im Blut spezifische Antikörper gegen den Krankheitserreger existieren. Ob diese Antikörper im Blut vorhanden sind, kann mit ELISA geklärt werden. Der HIV-Test früher Jahre folgt diesem Prinzip, ist heute allerdings kein ELISA-Verfahren mehr (siehe gesondertes Arbeitsblatt).

Es wird eine Lösung des Antigens benötigt, an das die nachzuweisenden Antikörper spezifisch binden. Diese Lösung wird in die Vertiefungen der *Mikrotiterplatten* gegeben. Über Nacht binden die Antigene auf dem Boden der Vertiefungen (coating). Die Lösung wird anschließend ausgewaschen. Noch freie Bindungsstellen an den Mulden-Böden können durch Inkubation mit *Rinderserum-albumin*-Lösung o.ä. abgesättigt werden. So wird verhindert, dass dort störende Stoffe (z.B. Antikörper) haften bleiben.

Nun wird die Mikrotiterplatte mit der Probelösung inkubiert, in der die entsprechenden Antikörper (AK1) nachgewiesen werden sollen. Sind die passenden Antikörper vorhanden, so binden sie spezifisch an die Antigene auf den Muldenböden, wobei der Antigen-Antikörper-Komplex (Antigen-AK1) gebildet wird. Andere Stoffe (z.B. andere Antikörper) können wegen der Spezifität der Bindung nicht an die Antigene binden.

Um diesen Antikörper-Antigen-Komplex nachzuweisen wird eine zweite Antikörperart, die **Detektionsantikörper** (*Nachweisantikörper*, AK2) benötigt. Sie binden spezifisch an die nachzuweisenden Antikörper. Vor ihrem Einsatz werden sie jedoch noch jeweils an ein Enzym gebunden (**konjugiert**), meist an **Meerrettichperoxidase** (horseradish peroxidase, HRP) oder an **alkalischer Phosphatase** (alkaline phosphatase, ALP). Enzymgekoppelte oder allgemein markierte Antikörper werden auch *Konjugate* genannt. Nach Inkubieren auf der Mikrotiterplatte binden die Konjugate an die konstanten Regionen des ersten Antikörpers (AK1). Insgesamt liegt also folgender Komplex vor: *Antigen-AK1-AK2-Enzym*.

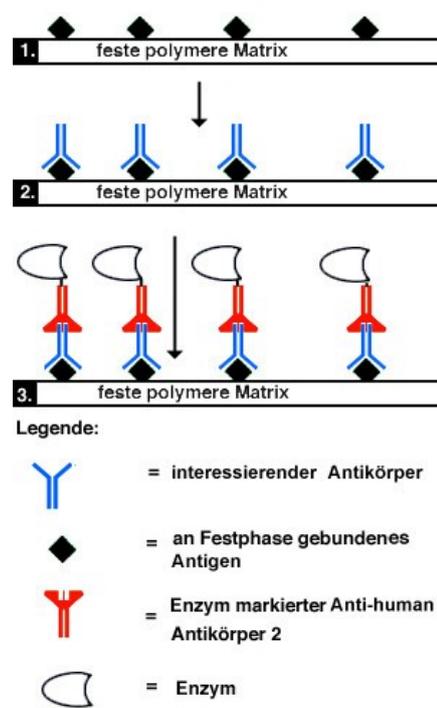


Abb. 2.1: Indirekter ELISA zum AK-Nachweis. wikipedia.de

Gibt man nun in die Vertiefung eine Lösung mit dem Substrat (S), dann kann (evtl. mithilfe eines Cosubstrats) ein Farbstoff gebildet werden:



In der Lösung reichert sich der Farbstoff an, seine Konzentration kann fotometrisch erfasst werden.

b) indirekter ELISA zum Antigennachweis

Bei dieser Methode liegt die gleiche Anordnung wie in Abb. 2.1 vor. Der Unterschied ist nur, dass der Analyt nun das Antigen ist.

Im Gegensatz zum direkten ELISA, werden beim indirekten ELISA zum Antigennachweis zwei Antikörper benutzt, so dass der Test aufwendiger ist. Ein Nachteil ist eine relativ hohe Hintergrundaktivität, d.h. trotz Abwesenheit des Analyten kann es relativ leicht zu Fehlbindungen von AK kommen (zwei (!) Fehlermöglichkeiten: versehentliche Bindung des Primär-AKs und/oder des Sekundär-AKs), so dass sich anschließend Farbstoff bildet. Dafür ist dieses Verfahren jedoch insgesamt häufig empfindlicher, weil an ein und denselben Primärantikörper oft mehrere enzymmarkierte Sekundärantikörper spezifisch binden können, wodurch es zu einer Signalverstärkung kommt. Ein weiterer sehr wichtiger Vorteil ist, dass mit ein- und demselben Konjugat viele Antigene nachgewiesen werden können!

2.1 Begründen Sie anhand des Nachweisprinzips, warum dies möglich ist. Worin liegt der Vorteil in der Verwendung von nur einem oder wenigen Konjugaten?

3. Sandwich-ELISA

Die Sandwich-Assays dienen dem Nachweis von Antigenen. Das Charakteristische ist, dass diese wie in einem Sandwich (AK₁-Ag-AK₂) zwischen zwei Antikörpern liegt.

Coating: Zuerst werden die Mikrotiterplatten mit poly- oder monoklonalen AK (**Fänger-AK**) inkubiert, die an die Bindungsstellen auf den Muldenböden adsorbieren. Man kann akzeptieren, dass ein gewisser Teil der AK beim Coating falsch herum an die Platte bindet, so dass die Paratopregionen nicht mehr zugänglich sind. Alternativ kann man zuerst mit **Protein G** coat und dadurch erreichen, dass alle AK richtig herum gebunden werden, also ihre Paratoparme nach oben strecken.

Blocking: Nach dem Waschen werden noch unbesetzte Bindungsstellen beispielsweise mit BSA abgesättigt.

Anschließend wird in die Mulden die Probe mit den nachzuweisenden Antigenen gegeben. Nach Inkubation „fischen“ sich die Antikörper die passenden Antigene aus der Lösung. Der Nachweis erfolgt mit einem zweiten Antikörper (**Detektions-AK**), der ebenfalls an das Antigen, jedoch an andere Bindungsstellen (**Epitope**) als der Fänger-AK bindet. Zumeist ist zumindest einer der beiden verwendeten AK (Detektions-AK oder Fänger-AK) monoklonal, um eine hohe Spezifität zu erreichen.

Die Detektion ist auf zwei Weisen möglich:

a) Nachweis mit markiertem Primär-Antikörper (= „direkte“ Variante): Nach Zugabe des markierten Detektionsantikörpers liegt folgender Komplex vor: AK1-Antigen-AK2-Enzym. Fügt man nun Substrat zu, so wird der Farbstoff gebildet oder es kommt zur Chemolumineszenz.

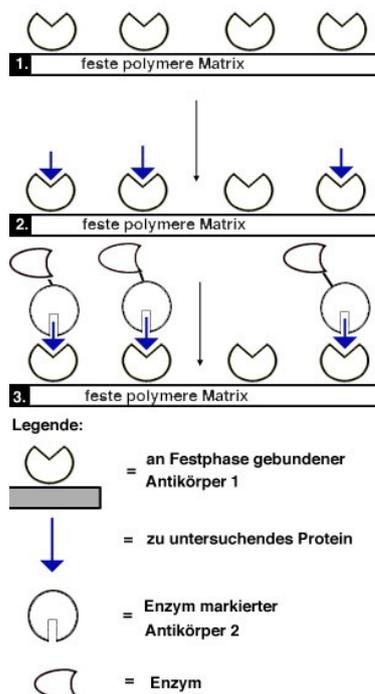


Abb. 3.1: Nachweis mit markiertem Primär-AK. Q: wikicommons.

b) Nachweis mit markiertem Sekundär-Antikörper (= „indirekte Variante“): Man inkubiert zuerst mit einem Detektions-AK. Der nun entstehende AK1-Antigen-AK2-Komplex wird mit einem weiteren Enzym-markierten dritten AK (*enzyme-linked secondary antibody*) versetzt. Dieser kann sowohl monoklonal als auch polyklonal sein. Statt dem Sekundär-AK lässt sich auch enzymmarkiertes Protein G benutzen. Nach Bindung an den Detektions-AK kann die Farbreaktion erfolgen (vgl. Abb. 2.2):

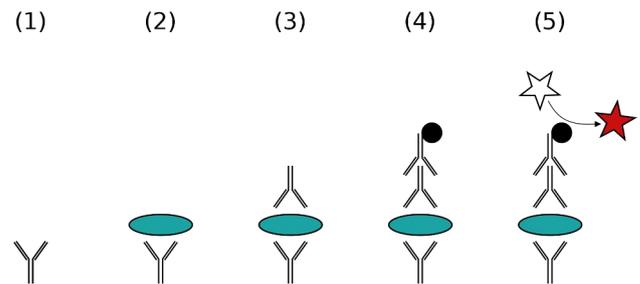


Abb. 3.2: Sandwich-ELISA mit Sekundär-AK. Q: wikicommons. A:

3.1 Welche Vorteile bietet die Benutzung eines enzymmarkierten Sekundär-AK gegenüber dem Nachweis mit einem enzymmarkierten Primär-AK?

Insgesamt erreicht der Sandwich-ELISA durch die kombinierte Verwendung von 2 spezifischen Reagenzien für den Analyten eine sehr hohe Spezifität. Falsch positive Ergebnisse oder hohe Hintergrundaktivität treten also kaum auf. Leider sind für den Test nur Antigene geeignet, die mindestens zwei, unabhängig voneinander zugängliche AK-Bindungsstellen (Epitope) besitzen. Kleinere Antigene kommen also deshalb nicht in Frage.

4. Kompetitiver ELISA

Das Kennzeichen dieser ELISA-Methoden ist, dass der Analyt mit dem markierten Nachweisreagenz um die spezifischen Bindungsstellen (Epitope bzw. Paratope) konkurriert. Je mehr Analyt enthalten ist, desto weniger markiertes Nachweisreagenz wird gebunden und desto geringer fällt die enzymatische Farbstoffentwicklung aus (vgl. Abb. 4.1).

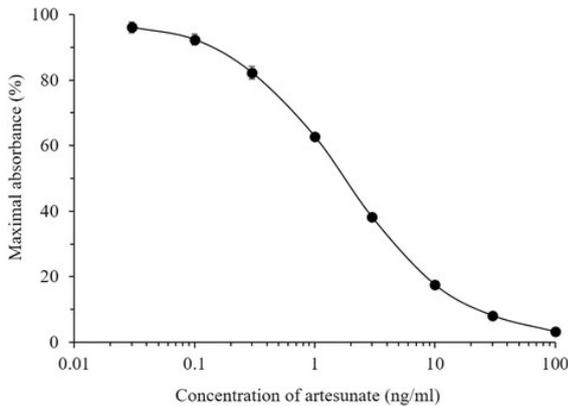


Abb. 4.1: Kalibrierkurve aus komp. ELISA, x: β (Analyt) in ng/mL, y: Absorbanz. Q (CC): Y.Mitsui: Development of a simple and specific direct competitive ELISA for the determination of artesunate using an anti-artesunate polyclonal antiserum

a) Kompetitiver ELISA zum Antigennachweis

Dieser eignet auch für besonders kleine Analyte, an die aus räumlichen Gründen nur ein AK binden kann. Der AK kann direkt an die Platte gebunden werden. Das hat allerdings den Nachteil, dass die Bindung unspezifisch ist und ein bestimmter Anteil der Paratope blockiert wird, d.h. wenn der AK „falsch herum“ an die Platte bindet. Um diesen Nachteil zu vermeiden, kann man den AK auch erst mal frei in der Lösung belassen.

Man inkubiert den freien oder fixierten AK mit der Problelösung und gibt dabei einer definierten Menge markiertem Antigen (Ag^*) hinzu. Es kommt jetzt zur kompetitiven Bindung: Ag und Ag^* konkurrieren um den AK.

Liegt der Immunkomplex ($AK-Ag$ oder $AK-Ag^*$) frei in Lösung vor, so muss er durch Zugabe in eine Kavität, die mit einem Sekundärantikörper (oder Protein G) beschichtet wurde, herausgefischt werden. Nach anschließender Farbstoffzugabe ergibt sich folgendes Schema:

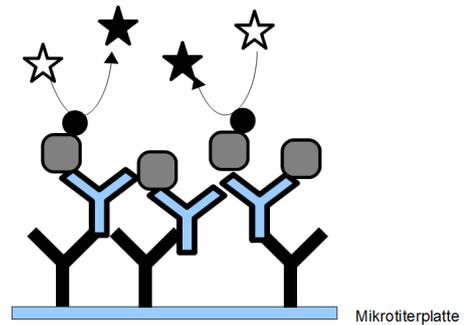


Abb. 4.2: Kompetitiver ELISA zum Nachweis eines Antigens

4.1 Beschriften Sie Abb. 4.2.

b) Kompetitiver ELISA zum Antikörpernachweis

Bei diesem ELISA-Verfahren arbeitet man mit markierten Antikörpern (AK^*), die mit den Analyten (native AK) um die Bindungsstellen an Platten-gebundenen Antigenen konkurrieren.

4.2 Zeichnen Sie den entsprechenden Nachweiskomplex wie in Abb. 4.2

5. Quellen

www.wikipedia.de, zahlreiche Stichworte; Raem A., Rauch P. (Hrsg., 2007): Immunoassays; Lottspeich F., Engels J. (Hrsg., 2006): Bioanalytik (2. Auflage); www.antikoerper-online.de,

6. Zusatzfragen

6.1 Welche ELISA-Methode setzt die Anwesenheit von 2 Epitopen auf einem Antigen voraus? Mit welcher ELISA-Methode lassen sich Antigene mit nur einem Epitop nachweisen?

6.2. Welche ELISA-Methode zum Nachweis eines Antigens kommt mit nur einem Antikörper aus, welche Methoden brauchen zwei, welche Methoden brauchen drei Antikörper?