

Aufgabe 1.1: Arbeitsschritte des direkten ELISA

1. Coating mit Ag-Lösung: Ag werden an die Böden der Platte gebunden. Mehrere Möglichkeiten

- Adsorptive Anhaftung: Ag binden aufgrund unpolarer WW an das Polystyrol (Kunststoff)
- kovalente Kopplung: Spezialkunststoffe auf den Plattenböden, die bei Bestrahlung mit UV unspezifisch Atombindungen zu den Ag bilden.
- sonstige Spezialbeschichtungen, z.B. Protein G, Avidin etc.

2. Blocking: Absättigen der restlichen noch freien Bindungsstellen durch Inkubation und Adsorption von Proteinen (BSA oder Casein) => Reduktion der Hintergrundaktivität durch unspezifisch gebundene AK (falsch positives Signal).

3. Waschen: Mit H₂O oder Waschpuffer

4. Inkubation mit AK*-Lösung (markierte AK = konjugierte AK = Konjugat) => spezifische Bindung zwischen Ag und AK*.

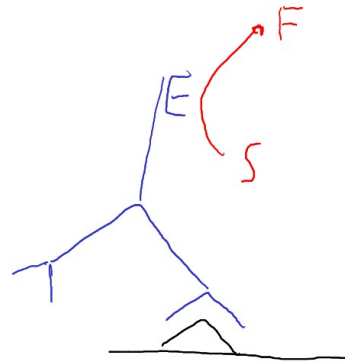
5. Waschen

6. Zugabe des Substrats, in der Regel: chromogenes Substrat und Inkubation => Farbstoffbildung

7. Abstoppen: Denaturierung (Zerstörung) des E durch Zugabe von Säure oder Base.

8. Fotometrische Messung. Auswertung mit Kalibrierlösungen mit bekannter Ag-Konzentration auf der gleichen Platte (!).

Aufgabe 1.2



Aufgabe Nr. 1.3

Faktoren sind:

- Ag-Konzentration der Probelösung bzw. adsorbierte Ag-Stoffmenge
- Temperatur, pH-Wert und andere Parameter die Enzymaktivität beeinflussen
- Substratkonzentration (normalerweise optimale Konz.)
- Reaktionszeit, d.h. bis zum Abstoppen der enzym. Reaktion

Aufgabe Nr. 2.1

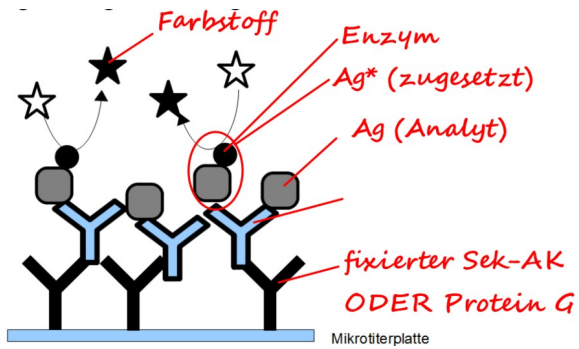
- Mit ein und demselben markierten Sekundär-AK lassen sich viele verschiedene Analyte nachweisen, da es an die konstanten Regionen bindet.
- Markierte Reagenzien (z.B. markierte AK) sind teuer. Es ist ein Vorteil nur ein solches Reagenz zu brauchen.

Aufgabe Nr. 3.1

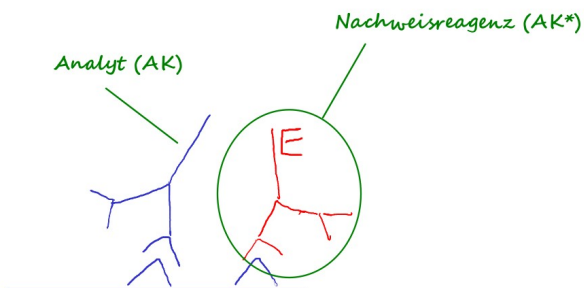
siehe Aufgabe 2.1

- nur ein markierter AK muss Vorrätig sein
- Signalverstärkung, da mehrere Sek-AK* an Primär-AK binden.

Aufgabe 4.1



Nr. 4.2



Aufgabe 6.1

2 Epitope:

- Sandwich-ELISA

1 Epitop:

- kompetitiver ELISA (geht auch mit ganz kleinen Ag!)
- direkter ELISA zum Ag-Nachweis

Aufgabe 6.2

- Nur 1 AK:
 - kompetitiver Assay
 - Direkter ELISA zum Ag-Nachweis
- 2 AK:
 - indirekter ELISA zum Ag-Nachweis
 - Sandwich-ELISA (direkte Variante)
 - kompetitiver ELISA mit Fänger-AK (siehe Aufgabe 4.1)
- 3 AK
 - Sandwich-ELISA (indirekte Variante)