

1. Grundlagen

Als **Immunassays** werden Nachweisverfahren bezeichnet, die Antigen-Antikörper-Bindungsreaktionen beinhalten. Bei diesen Tests wird die hohe Spezifität der Bindung zwischen Antigenen und Antikörpern nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip zum Nachweis ausgenutzt. Je nach Assay kann entweder das Antigen oder der Antikörper der nachzuweisende Analyt sein.

Bsp. eines Antigen-Assays *Bsp. eines Antikörper-Assays*

1.1 Bei welchen Untersuchungen dient ein Antikörper, bei welchen ein Antigen als Analyt? Nennen Sie Beispiele!

.....

.....

.....

Der Analyt liegt zu Beginn meist gelöst in einem Puffer vor. Ebenfalls möglich ist die direkte Verwendung von verdünnten Körper- und Probenflüssigkeiten, wie beispielsweise Wasserproben. Selten handelt es sich beim Analyten auch um Partikel mit antigenen Oberflächenmerkmalen, wie zum Beispiel Viren oder Zellen.

2. Markierung, Detektion und Quantifizierung

Beim Immunassay werden markierte Reagenzien eingesetzt. Sie tragen besondere Strukturen/chemische Gruppen, die bewirken, dass die Anwesenheit oder der Aufenthaltsort der Reagenzien leicht nachweisbar ist. Einfaches Beispiel: Besprüht man ein Gewebeschnitt mit einem markierten Antikörper, dann lagern sie sich an die passenden Antigene, beispielsweise Rezeptoren auf Zelloberflächen. Nach Waschschrinen zur Entfernung von ungebundenem AK kann man durch die Markierung des Antikörpers (**Marker**) sehen, ob, wo und wie viel Antikörper vorliegt, und damit auch ob, wo und wie viel Antigene vorliegen. Um die Sensitivität zu Erhöhen, werden signalverstärkende Methoden eingesetzt: Ein einzelnes Analytmolekül führt letzten Endes zu einem 100 - 100.000.000 fach verstärkten Signal.

2.1 Markierung mit (Fluoreszenz)farbstoffen

In einfachen Fällen kann die Markierung nur aus Farbstoffmolekülen bestehen. Wenn sich die markierten Reagenzien an eine Stelle aufkonzentrieren bzw. anreichern, so kann mit der Auge eine Farbveränderung beobachtet werden. So sind in vielen immunologischen Schnelltests (z.B. Schwangerschaftstest) häufig die Reagenzien mit kolloidalen Goldpartikeln markiert. Bei

Anreicherung der markierten Reagenzien auf einer Linie, ist dann mit dem Auge ein roter Strich zu sehen. Weiterhin kann die Markierung aus **Fluoreszenzfarbstoffen** bestehen. Bei Bestrahlung gibt ein Leuchten den Aufenthaltsort der markierten Moleküle (z.B. markierte Antikörper) preis. Durch Bestimmung der Farbintensität bzw. Leuchtintensität lassen sich auch quantitative Analysen durchführen.

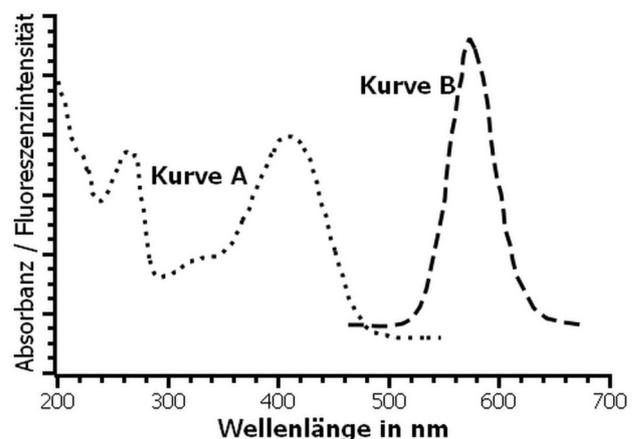


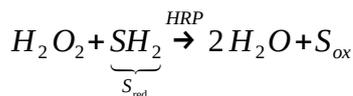
Abb. 2.1.1: Fluoreszenz- und Absorptionsspektrum eines Fluoreszenzfarbstoffs (Quelle: eigenes Werk)

2.1.1 Ordnen Sie in Abb. 2.1.1 Kurve A und Kurve B die Begriffe Fluoreszenzspektrum und Absorptionsspektrum begründet zu.

2.2 Markierung mit Enzymen – EIA (enzyme immuno assay)

Sehr weit verbreitet ist die Markierung mittels Enzymen. Auf Enzymmarkierungen basierende Assays an festen Phasen werden als **Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)** bezeichnet. Zur Markierung werden an die Reagenzmoleküle Enzyme chemisch gebunden. Bei Zugabe von entsprechendem Substrat, kann das Enzym beispielsweise die Bildung von Farbstoffen katalysieren. Die Bildung des Farbstoffs verrät die Anwesenheit bzw. den Aufenthaltsort der markierten Moleküle, weshalb die entsprechenden Enzyme auch häufig als **Reporterenzyme** bezeichnet werden. Besonders häufig kommen als Reporterenzyme hierbei die **Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP)** und die **alkalische Phosphatase (alkaline phosphatase, AP)** zur Anwendung.

Die Meerrettichperoxidase katalysiert die Reduktion von Peroxiden, meistens Wasserstoffperoxid mit Elektronendonoren. Mit anderen Worten: Mithilfe des Cosubstrats H₂O₂ werden also verschiedene reduzierte Substrate (S_{red} = SH₂) zu S_{ox} aufoxidiert. Reaktionsgleichung:



Interessanterweise werden je nach verwendetem Substrat durch die HRP mit dem Cosubstrat H₂O₂ verschiedene Detektions- bzw. Markierungarten ermöglicht:

- Zum einen können mit bestimmten Substraten (S_{red}) durch das Markerenzym gewöhnliche Farbstoffe entstehen, die dann nach bestimmter Zeit, nachdem die Enzyme durch z.B. Säurezugabe inaktiviert wurden (**Abstoppen**), fotometrisch quantifiziert werden. Solche **chromogenen Substrate** („chromogen“ = griechisch für „farb bildend“) sind z.B. ABTS

oder TMP. Weiterhin gibt es für die HRP auch Substrate (S_{red}), die zu Bildung von **Fluoreszenzfarbstoffen** (z.B. S_{red} = Homovanillinsäure) führen, die erst bei entsprechender Anregung leuchten.

- Es können jedoch auch Substrate (S_{red}, z.B. Luminol) eingesetzt werden, bei der die enzymatische Reaktion ein eigenständiges Leuchten erzeugt (**Chemolumineszenz**). Die Leuchtintensität innerhalb eines Zeitintervalls (z.B. registrierte Lichtquanten in 1 Sekunde) wird mit **Luminometern** gemessen, die ähnliche Größe wie Fotometer besitzen und häufig ganze Mikrotiterplatten (vgl. Abb. 3.1, unten) aufnehmen können. Ein Vorteil solcher **Chemolumineszenz-Immunoassays (CIA, = CLIA)** ist, dass die Lösung nicht manuell abgestoppt (siehe oben) werden muss, sondern nach Substratzugabe direkt ins Messgerät gestellt werden können. Auch sind die Wartezeit nach Substratzugabe wesentlich kürzer bis kaum vorhanden, da nicht erst ein Farbstoff gebildet werden muss, sondern die Reaktion selbst von Anfang an das Signal liefert. Weiterhin wird zur Detektion keine aufwändige Strahlenquelle mit Monochromator o.ä. benötigt, sondern das Signal wird durch das System eigenständig generiert. All dies erleichtert die Automatisierung, so dass CLIA häufig in der Routine und bei Hochdurchsatz-Tests eingesetzt werden, z.B. in der Labormedizin. So ist der moderner HIV-Test ein solcher CLIA, häufig kombiniert mit den Vorteilen eines Particle-Assays (siehe unten, Frage 3.4).

2.2.1 Zu Abb. 2.2.1: Eine Probe zeigt unter denselben Bedingungen wie die Kalibrierlösungen ein Lumineszenz-Signal von 1 200 000 Einheiten. Geben Sie den Gehalt des Wachstumsfaktors β(Wachstumsfaktor) in µg/L an!

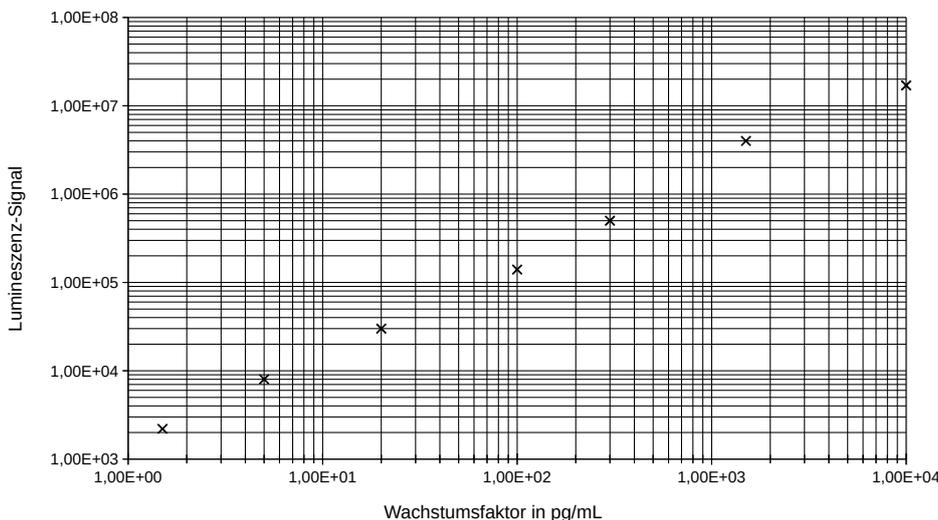


Abb. 2.2.1: Kalibrierdiagramm eines Chemolumineszenz-Assays (Quelle: eigenes Werk)

Das zweitwichtigste Markerenzym ist die **alkalische Phosphatase (AP)**. Sie hydrolysiert Phosphorsäureester ($R-OPO_3^{2-}$) im alkalischen Bereich. Je nach gewünschter Detektionsvariante gibt es auch hier verschiedene Substrate.

2.2.2 Reaktionsgleichung formulieren:

► **2.3 Markierung durch Elektrochemolumineszenz: Der Elektrochemolumineszenz-Immunassay (ECLIA)**

Auch bei dieser Markierung kommt es zu einer Leuchterscheinung, diesmal jedoch ohne Beteiligung empfindlicher Enzyme! Im Vergleich zu anderen Chemolumineszenzreaktionen wird bei der ECL das Licht nicht frei in Lösung, sondern elektrisch an einer Elektrodenoberfläche erzeugt. Dazu wird der Nachweiskomplex zuerst direkt oder indirekt an die Oberfläche einer Elektrode gebunden (in der Regel über kleine magnetische Metallkügelchen, beads, siehe unten). Legt man nun eine elektrische Spannung an, kommt es zu einer elektrochemischen Reaktion, bei der der Marker des Nachweiskomplexes Photonen aussendet. Als Marker werden häufig Rutheniumhaltige Komplexe genutzt (RuR_3). Zusammen mit Hilfsreagenzien (HR, z.B. Tripropylamin) in der Lösung, kommt es an der Elektrodenoberfläche schematisch und stark zusammenfassend zu folgenden Reaktion:

kaskadenartig verstärkt. Es kann am Ende des Photomultiplier mit einer Spannungsmesser detektiert und das anschließend digital ausgewertet werden. Insgesamt ergeben so selbst einzelne Photonen ein messbares Signal. Es handelt sich also um eines der stärksten Signalverstärkungsinstrumente, das ein Lichtsignal um bis zu 100 Millionen mal (10^8) verstärken kann.

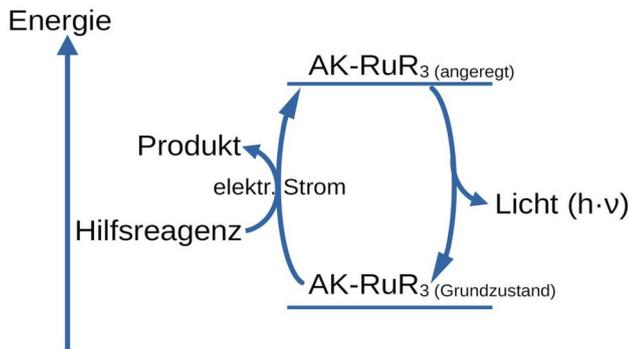


Abb. 2.3.1: Lumineszenzreaktion beim ECLIA (Quelle: e.W.)

Zur Signalverstärkung dient ein Photomultiplier. Die Photonen treffen zuerst auf eine Photokathode (vgl. Abb. 2.3.2). Treffen auf negativ geladene Metalloberflächen Photonen auf, so werden aus dieser Elektronen herausgeschlagen. Dieses Phänomen wird als photoelektrischer Effekt bezeichnet. Die freigesetzten Photoelektronen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und treffen auf weitere Elektroden (sog. Dynoden, gebogene Strukturen in Abb. 2), aus deren Oberfläche jedes auftreffende Elektron mehrere Sekundärelektronen herausschlägt ($n=3..10$). Durch die Vervielfachung des Elektronenflusses wird das Signal also

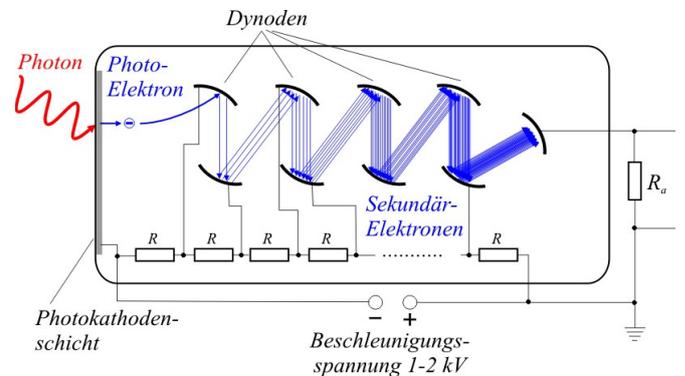


Abb. 2.3.2 Schematische Skizze eines Photomultipliers.

(www.wikicommons, Autor: Jkrieger)

Die ECL-IA verbreitet sich zunehmend in der medizinischen Diagnostik. Ohne Wartezeiten (z.B. für Enzymreaktionen) ermöglicht er hochsensitive Testergebnisse in unter 20 Minuten, beispielsweise beim AK-Such-Test für SARS-CoV2 („Corona“).

2.4 Markierung mit Radioisotopen

In **Radioimmunassays (RIA)** werden schwachradioaktive Substanzen zur Markierung verwendet, der Nachweis und die Quantifizierung erfolgt dann durch Messung der Radioaktivität. Radioimmunassays werden oft in einzelnen Teströhrchen aus Kunststoff durchgeführt. Hier entstehen aus der ionisierenden Strahlung in speziellen chemische Stoffen (*Szintillatoren*) freie Photonen. Das Lichtsignal wird dann auch hier über einen Photomultiplier in ein messbares elektrisches Signal umgewandelt (siehe oben). Durch den schwierigen Umgang mit der Radioaktivität und der ständig steigenden Empfindlichkeit anderer Immunassays, ist die Anwendung stark rückläufig. Die gleiche Sensitivität wird auch durch die Immuno-PCR erreicht oder sogar übertroffen.

2.5 Markierung mit DNA Immuno-PCR (IPCR)

Will man geringste Mengen an Antigenen nachweisen, so kann man spezifische Antikörper über Verbindungsstücke mit **dsDNA-Fragmenten** (typische Länge: 246 bp) markieren, so das **AK-Oligonucleotid-Konjugate** entstehen. Die Verbindung kann beispielsweise zwischen **biotinylierten AK** und biotinylierten dsDNA (d.h. mit anhängendem **Biotin**) über verbrückendes **Avidin** zustande kommen. Details zu dieser Methode werden in wenigen Schulstunden besprochen. Eine nachgeschaltete quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) vervielfältigt die DNA um bis zu Faktor 10^8 und quantifiziert diese. Insgesamt ist das Verfahren bis zu tausend mal sensitiver als klassische ELISA-Verfahren. Die IPCR findet demnach auch Verwendung bei Analyten deren Konzentrationen so niedrig sind, dass sie mit anderen Verfahren nicht nachweisbar oder quantifizierbar sind, beispielsweise von Giftstoffen oder Signalmolekülen.

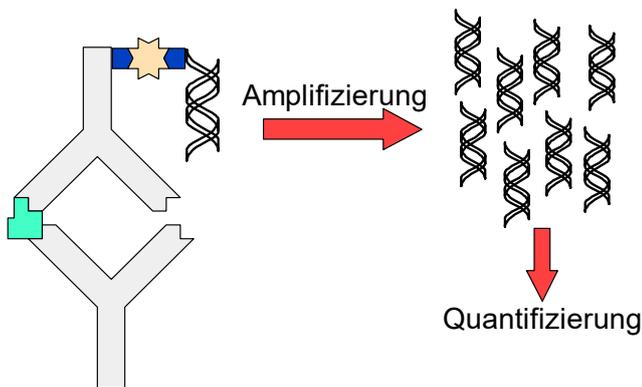


Abb. 2.5.1: Schema einer IPCR (Quelle: eigenes Werk)

2.5.1 Beschriften Sie die Abbildung 2.5.1 mit den fettkursiv gedruckten Worten des Textes.

2.6 Quantifizierung

Wenn ein Immunassay nur zum Ja/Nein-Nachweis eines Analyten eingesetzt wird, spricht man von einem **qualitativen Nachweis**. Ein **semi-quantitativer Nachweis** ermöglicht über den Vergleich mit Proben mit bekannter Analytkonzentration eine "Mehr als"- oder "Weniger als"-Aussage. Für eine exakte Konzentrationsbestimmung ist hingegen eine Kalibrierkurve notwendig, für die ebenfalls Proben mit bekannter Analytkonzentration gemessen werden. Nach der Erstellung einer Kalibrierkurve, bei der die gemessenen Aktivitäten im Assay (z.B- Farbstoffkonzentration) gegen die jeweiligen Konzentrationen des Analyten in den Vergleichsproben aufgetragen werden, lässt sich die Konzentration des Analyten in den Proben aus der Kurve berechnen.

3. Feste Phasen

Während sich der Analyt in einer Probenflüssigkeit befindet, wird sein Bindungspartner während der Analyse i.d.R. an eine feste Phase gebunden. Die am häufigsten verwendete Möglichkeit ist die Verwendung von **Mikrotiterplatten**. Dabei handelt es sich um Kunststoffplatten, mit einer bestimmten Anzahl von **Kavitäten (Wells, Näpfe)** mit einem bestimmten Volumen enthalten, auf der 96-well plate z.B. acht 12er-Reihen. Insbesondere Polystyrol hat sich stark durchgesetzt, da an diesem Kunststoff Proteine besonders stark adsorbieren. Der eine Bindungspartner wird also an die Kavitätenböden fixiert. Anschließend kann man die Reagenzien und die Analytlösung in die Kavitäten einfüllen, so dass sie auf den Bindungspartner einwirken.

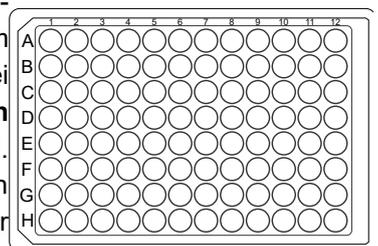


Abb. 3.1: 96-well plate (Quelle: wikicommons. Nessa Carsons)

3.1 ELISA-Verfahren verwenden meistens Mikrotiterplatten. Nennen Sie die größten Vorteile beim Arbeiten damit.

Findet die Immunreaktion auf Membranen statt, spricht man auch vom **Dot Blot** (= engl. 'punktförmiger Klecks') bzw. Immunoblot bei Kombination mit einem Blotting-Verfahren). Auch die **Lateral Flow Assays** genannten Teststreifen, die zum Beispiel für Schwangerschaftstests verwendet werden, sind die entsprechenden Antikörper an Membranen gebunden.

In den letzten Jahren ist mit den **Particle Immunoassay (PIA)** noch die Bindung von Antikörpern an festen kleinen Partikeln dazugekommen, den sogenannten **Beads** (bead = engl. 'Perlen'). Neben Kunststoffbeads, gibt es Latex-Beads, metallische Beads, magnetische Beads oder Beads mit Eigenfluoreszenz. Der Vorteil von solchen Beads liegt auf der Hand: Sie können leicht in Reaktionslösungen eingebracht und dann anschließend auch leicht von diesen separiert werden, beispielsweise mit einer Zentrifuge. So kann man Antikörperbeschichtete magnetische Beads in eine Lösung tauchen. Die Antikörper binden- falls vorhanden – die passenden

Antigene. Anschließend kann man die Beads mit den anhaftenden Antigenen aus der Lösung mit einem Magneten entfernen. In einem neuen Reaktionsgefäß kann man die Bindung zwischen Ag und AK mit speziellen Puffern wieder lösen. So hat man sich aus einer Probelösung, die zu isolierenden Stoffe vom Rest getrennt.

Es können auch mehrere verschiedenartige Beads (z.B. magnetische und nichtmagnetische Beads oder Beads die sich in der Fluoreszenzfarbe unterscheiden) eingesetzt werden, die mit unterschiedlichen AK belegt werden. Das Beadgemisch kann dann die verschiedenen Reaktionslösungen durchlaufen und vor der Detektion die einzelnen Beads separiert und/oder getrennt ausgewertet werden. So können die beads nach Vereinzelung einer Messeinheit auf Fluoreszenzsignale untersucht werden. Treten bestimmte Signale gleichzeitig auf, so ist das entsprechende Antigene nachgewiesen. So kann man eine Probelösung auch gleichzeitig auf mehrere Analyte testen (**Multiplex-Assay**)

3.2 [mit Lehrkraft entwickeln]: Schema eines Particle Immunassays mit Multiplex-Fähigkeit und Bead-Trennung.

3.3 Beschriften und diskutieren Sie folgende Abbildung eines Fluoreszenz-Particleimmunoassays (FPIA). Diskussionspunkte: Welche Markierungart? Weshalb mehrere Bead-Arten? Wie sind sie belegt? Weshalb?

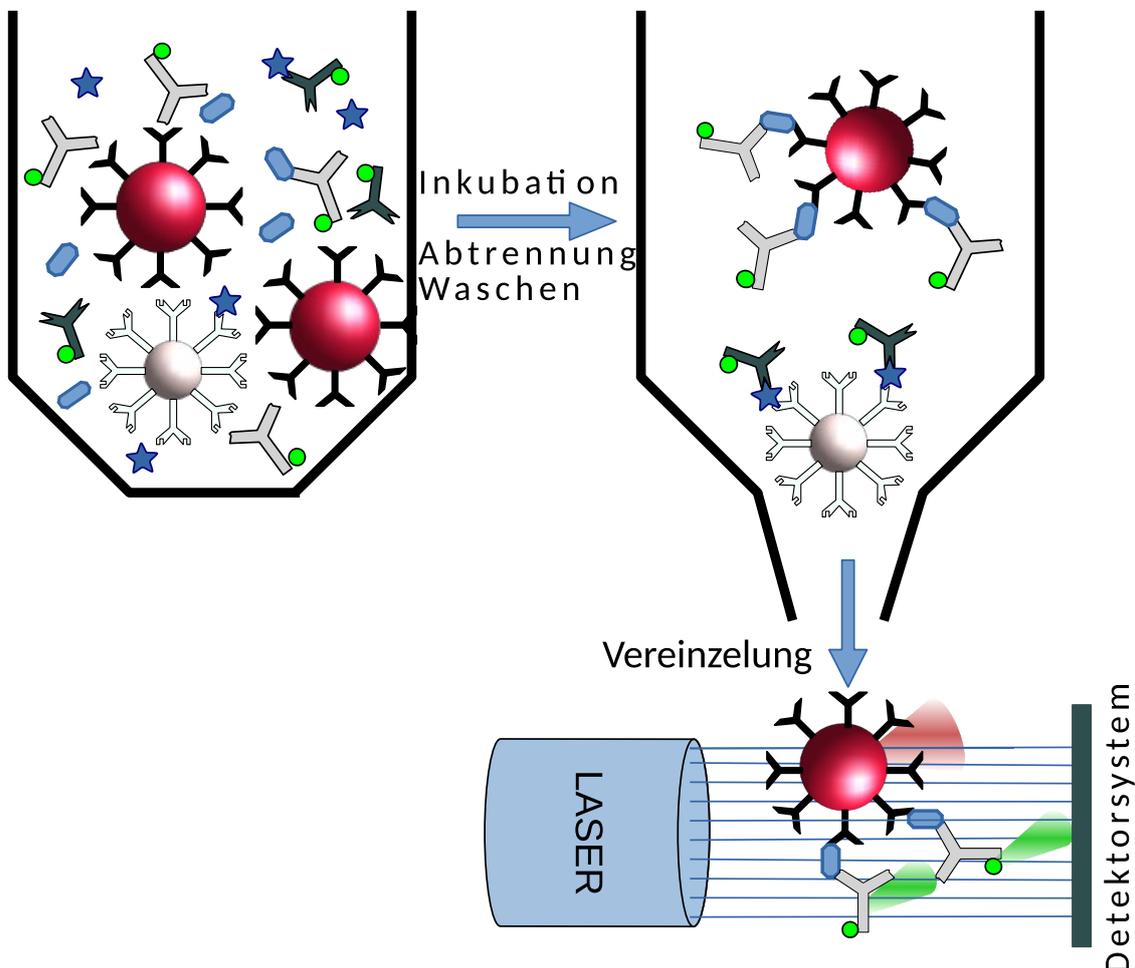


Abb. 3.1: Fluoreszenz-Particleimmunoassay, FPIA (Quelle: e.W)

Beispiel eines PIA: Moderne HIV-Tests der 4. Generation

Moderne HIV-Tests prüfen im verdünnten Blutserum des Probanden gleichzeitig auf:

- AK gegen HIV-1 Erst ca. 12 Wochen nach Infektion nachweisbar
- AK gegen HIV-2 Erst ca. 12 Wochen nach Infektion nachweisbar. In Deutschland sehr selten mit ca. 0,5% aller HIV-Neuinfektionen.
- p24-Ag des HIV1 Charakteristisches Protein auf dem Kapsid der HI-Viren des Typs 1 (HIV-1). Schon nach 6-8 Wochen nach der Infektion nachweisbar, aber dann nur für ca. 4 Wochen!

3.3 HIV-Tests der jüngeren Generationen sind häufig Chemoluminescent particle immunoassays. Erläutern Sie die Bestandteile eines solchen Testsystems.

3.4 Bei HIV-Test kann es in Einzelfällen zu einer zweiten diagnostischen Lücke kommen. Schließen Sie aus den Informationen was hiermit gemeint ist und für was die erste diagnostische Lücke steht.

.....

.....

.....

4. Überblick und Einteilung in die wichtigsten Assay-Methoden

4.1 Direkter Assay

Ein *direkter Immunassay* dient dem Nachweis von Antigenen. Dabei wird die Probelösung mit dem zu testenden Antigen an eine feste Phase gebunden, z.B. einen Objektträger. Nach der Zugabe der Antikörperlösung bindet der darin enthaltene markierte Antikörper an das Antigen. Nach Waschschrinen wird die erfolgreiche Bindung des markierten Antikörpers durch das Messsignal nachgewiesen (z.B. Fluoreszenzlicht unter dem Fluoreszenzmikroskop). Das Vorhandensein eines ausreichend starken Messsignals beweist also die Anwesenheit des gesuchten Antigens.

Das charakteristische Kennzeichen von direkten Assays ist, dass man markierte Primär-AK einsetzt. Antigen und der markierte Antikörper sind direkt miteinander verbunden sind.

Abb. 4.1: Schema eines direkten Assays

4.2 Indirekter Assay

Charakteristisch für *indirekte Assays* sind die Nutzung markierten Sekundär-AK. Das bedeutet, dass das Antigen und der markierte Antikörper (AK*) nicht direkt, sondern nur indirekt miteinander verbunden sind.

Ein indirekter Immunassay kann sowohl ein Antigen-Suchtest oder ein Antikörper-Suchtest sein.

Abb. 4.2: Schema des indirekten Assays

4.3 Kompetitiver Assay

Beim kompetitiven Assay wird ein spezifischer Antikörper gegen das nachzuweisende Antigen an eine feste Phase gebunden. Anschließend erfolgt die Zugabe der Probenlösung, sowie einer zweiten Lösung mit dem markierten Antigen in definierter Konzentration. Sowohl das in der Probelösung in unbekannter Konzentration vorliegende unmarkierte Antigen als auch das markierte Ag konkurrieren um die Bindung an den gebundenen Antikörper. Die Versuchsbedingungen sind also so zu gestalten, dass der limitierende Faktor die Paratope bzw. die AK sind. Je höher die Konzentration des Antigens in der Probe, umso weniger markiertes Antigen wird demzufolge an den Antikörper gebunden. Über die Erkennung und gegebenenfalls eine quantitative Bestimmung der Markierung ist damit der Nachweis des Antigens und die Messung seiner Konzentration möglich..

Abb. 4.3: Bsp. eines kompetitiven Assays

4.1 In einem Lehrbuch steht: "Je schwächer das detektierte Signal bei einem kompetitiven Immunassay, desto höher die Analytkonzentration." Erklären Sie die scheinbar widersprüchliche Aussage.

4.4 Sandwich-Assay

Für den Nachweis eines Antigens mittels eines auch als **Sandwich-Assay** bezeichneten nicht-kompetitiven Assays werden zumindest zwei verschiedene Antikörper benötigt, die an das gleiche Antigen binden, sich dabei aber nicht in ihrer Bindung an das Antigen gegenseitig behindern. Von Vorteil beim Vergleich mit dem kompetitiven Format ist insbesondere die bei den meisten Anwendungen höhere Sensitivität.

Auch bei einem **Sandwich-Assay** wird zunächst einer der beiden Antikörper an eine feste Phase immobilisiert. Dieser Antikörper wird auch als Fänger oder coating-Antikörper bezeichnet. Nach der Zugabe der Probelösung bindet das darin enthaltene Antigen an diesen Primärantikörper. Anschließend wird die Probelösung entfernt und ein zweiter Primärantikörper (**Detektions-Antikörper**) in gelöster Form auf die feste Phase gegeben. Der Detektions-AK bindet nun ebenfalls an das durch den coating-Antikörper gebundene Antigen. Für den Nachweis und die Quantifizierung ist der Detektions-Antikörper entweder selbst markiert, oder er wird über ein markiertes Reagenz (markierter Sekundär-AK der sich gegen den Detektions-AK richtet) nachgewiesen. Einen Sandwich-Assay mit Beads können Sie in Abb. 3.1 sehen (siehe oben).

Abb. 4.4: Bsp. eines Sandwich-Assays

5. Anwendung

Immunassays bieten aufgrund der reversiblen Schlüssel-Schloss-Bindung zahlreiche analytische und präparative Anwendungsmöglichkeiten. Hinzu kommt noch die hohe Sensitivität aufgrund extremer Verstärkungsmöglichkeiten des Signals. Der apparativen Aufwand ist häufig relativ gering. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit zur Automatisierung und zur Konstruktion von Hochdurchsatz-Geräten (z.B. ELISA-Reader)

Immunassays werden in der Labormedizin für die Bestimmung einer Vielzahl von Parametern in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum oder Urin verwendet. Dabei dienen sie der Diagnose und der Verlaufskontrolle

von Krankheiten ebenso wie dem Nachweis von Giftstoffen oder der Überwachung von Arzneistoffen im Körper. In der Mikrobiologie können sie zur Bestimmung von Krankheitserregern genutzt werden.

Es gibt zunehmend Formate die von Laien durchgeführt und ausgewertet werden können. Diese Tests sind als Teststreifen konzipiert und dementsprechend einfach in der Handhabung. Einige dieser Tests, wie beispielsweise Schwangerschafts- und Drogentests,.