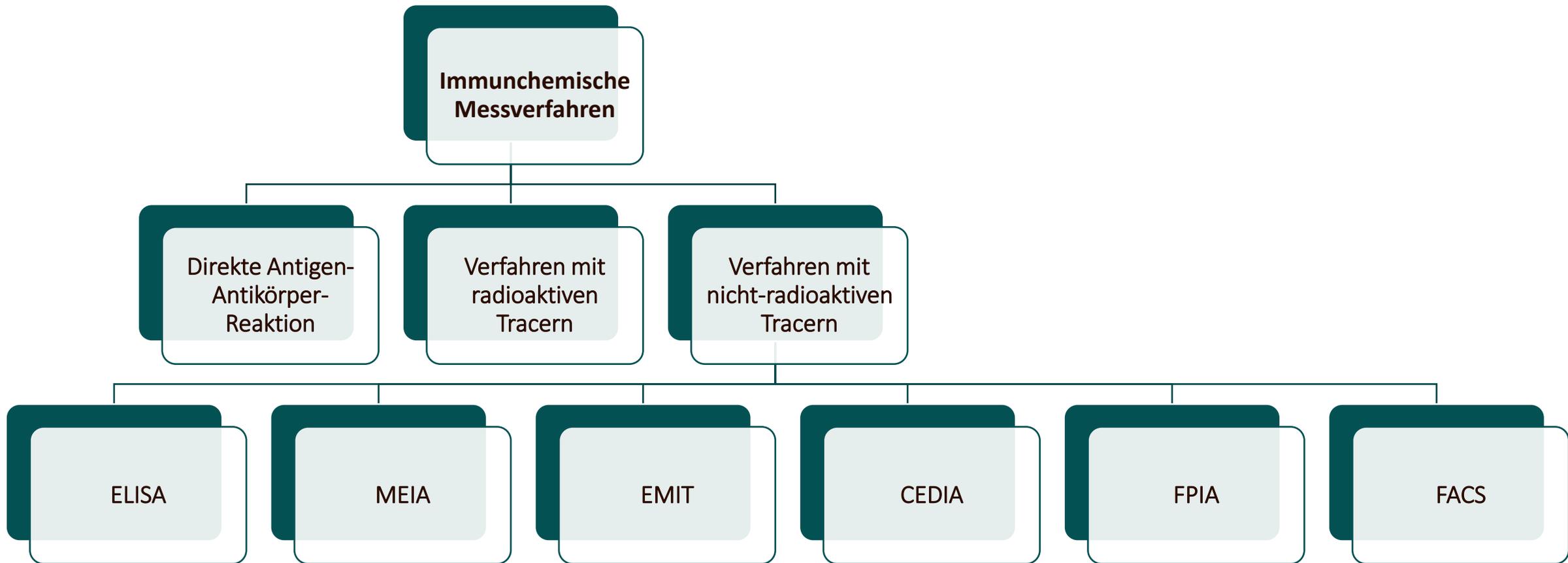
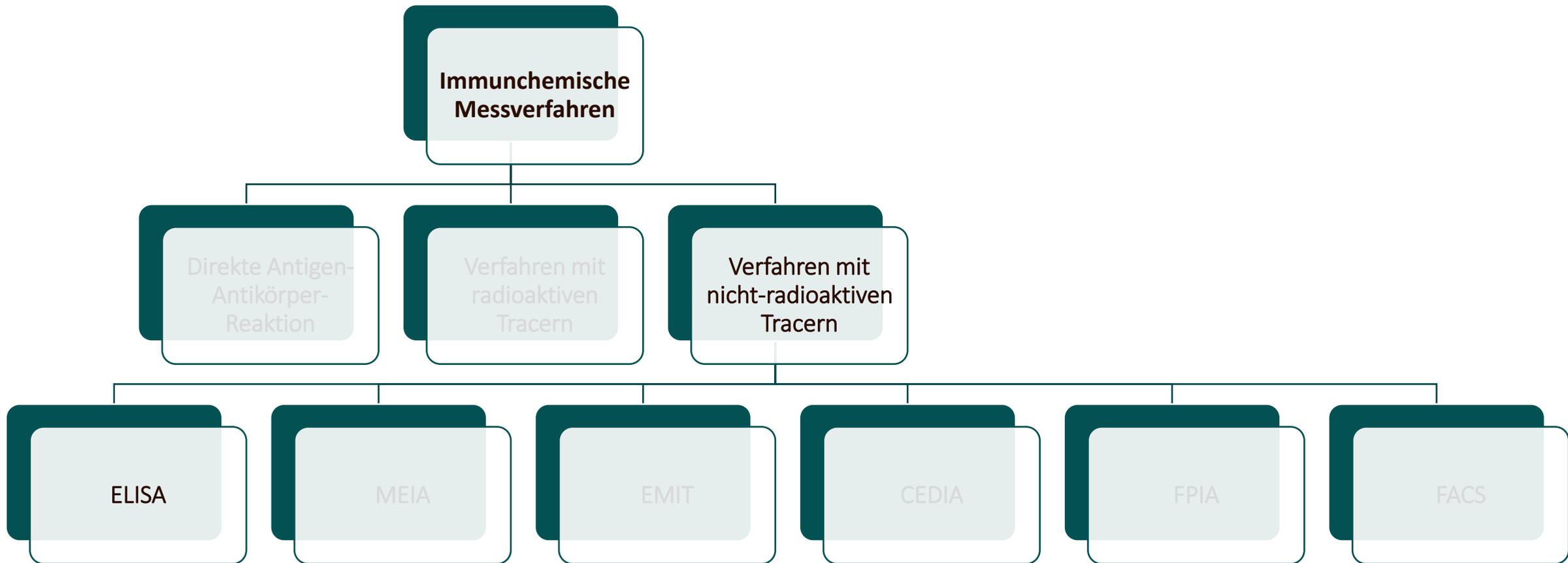


A hand wearing a blue nitrile glove is holding a white microplate. The microplate contains a grid of small circular spots, some of which are yellow and some are light blue. In the background, other similar microplates are visible, some with orange and blue spots. The overall scene is brightly lit, suggesting a laboratory setting.

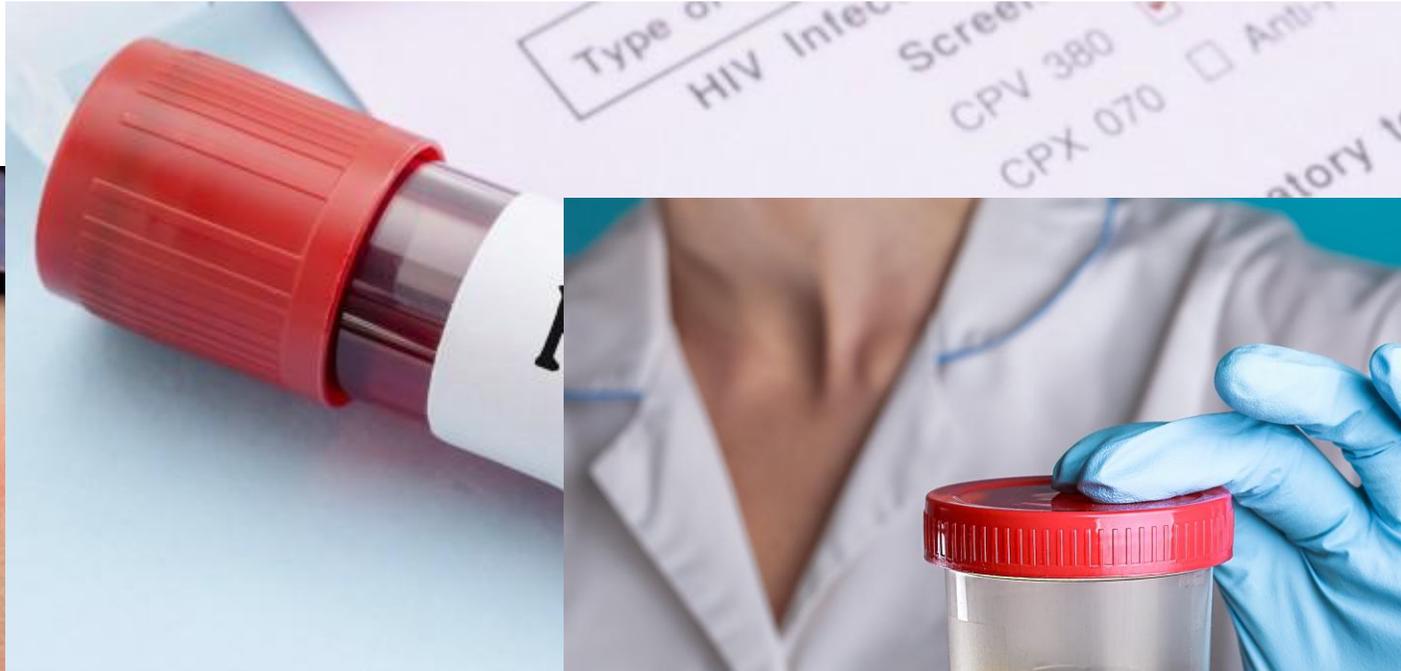
Immunchemische Messverfahren

ELISA





ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay



Lyme-Borreliose



Protein-Nachweis

Lernziele

Die Lernenden können...

- ...die Komponenten eines ELISA nennen. 
- ...den Aufbau eines ELISA designen und erklären. 
- ...die Auswertung eines ELISA erklären. 
- ...den Hook-Effekt anhand eines Beispiels erkennen und erklären. 

→ ... ELISA-Daten selbstständig auswerten.

→ ...verschiedene ELISA Varianten designen und erklären und die passende Variante für einen Test wählen.

→ ...selbstständig ein Troubleshooting für ELISA Setups durchführen.

Lektionsablauf



Repetition

- Antikörper
- Heidelberger Kurve

Lernaufgabe ELISA

- Partnerarbeit
- Diskussion in Klasse



Messergebnisse

- Auswertung
- Hook-Effekt

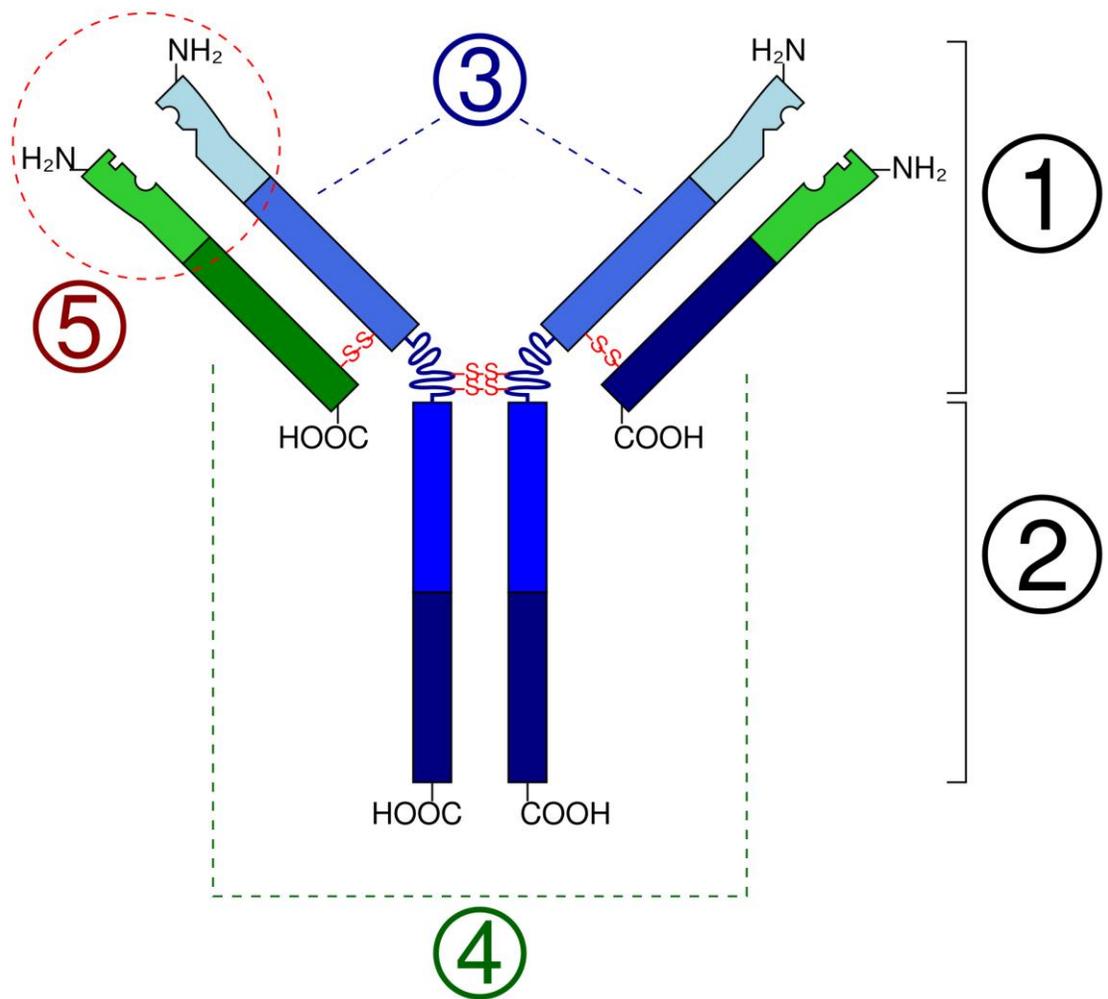
Ausblick

- ELISA-Varianten
- Troubleshooting





Repetition: Antikörper (Immunglobuline)

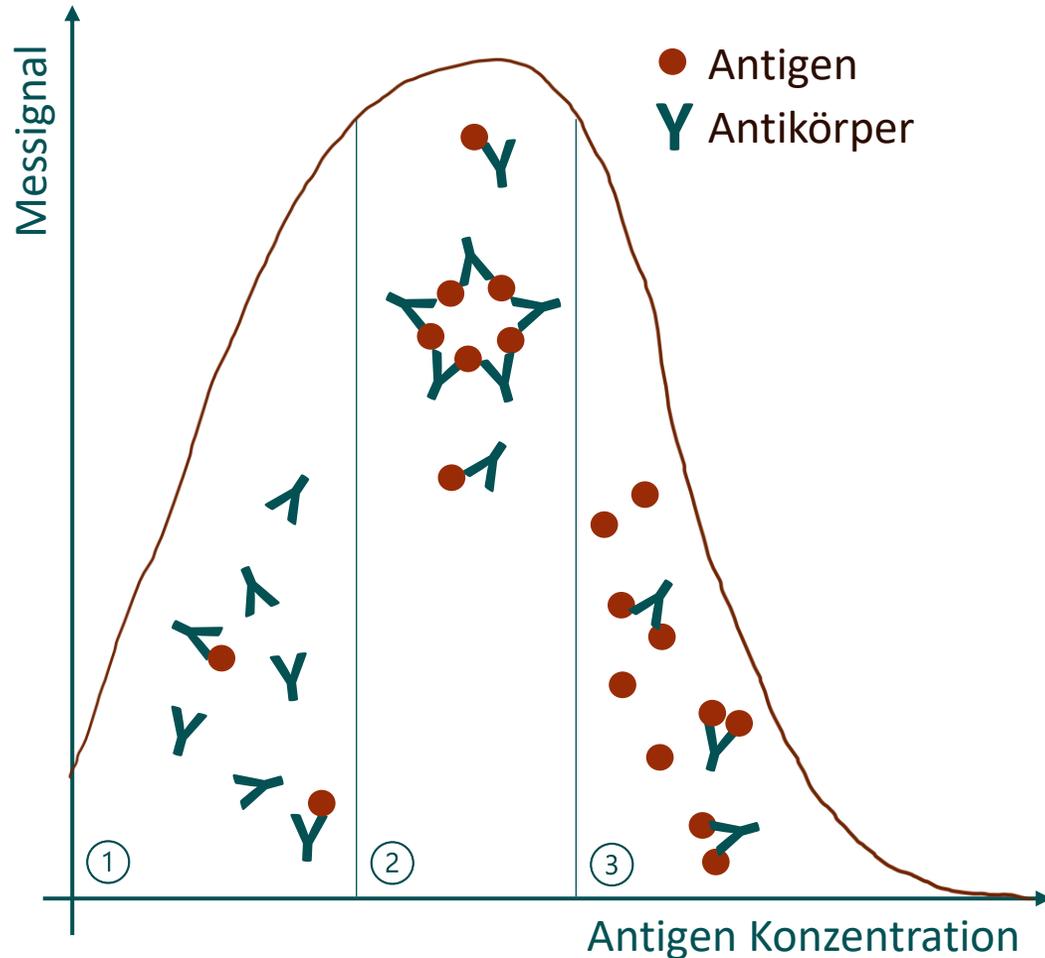


1. Fab-Abschnitt
2. Fc-Abschnitt
3. schwere Ketten
4. leichte Ketten
5. Antigenbindungsstelle (Paratop)
→ bindet das Epitop

Funktion: Bindung des Antigens

- Spezifisch
- Hohe Affinität

Repetition: Heidelberger Kurve



Messung von Antigen-Antikörper Komplexen

→ Antikörper Konzentration bleibt konstant

1. Antikörper-Überschuss
2. Äquivalenzzone
3. Antigen-Überschuss



Lernaufgabe – Aufbau eines ELISA



Lernaufgabe lösen

- 15 Minuten
- Partnerarbeit

Besprechung

- 7 Minuten
- Diskussion in Klasse



Lösung

- 3 Minuten
- Erklärung der Lösung





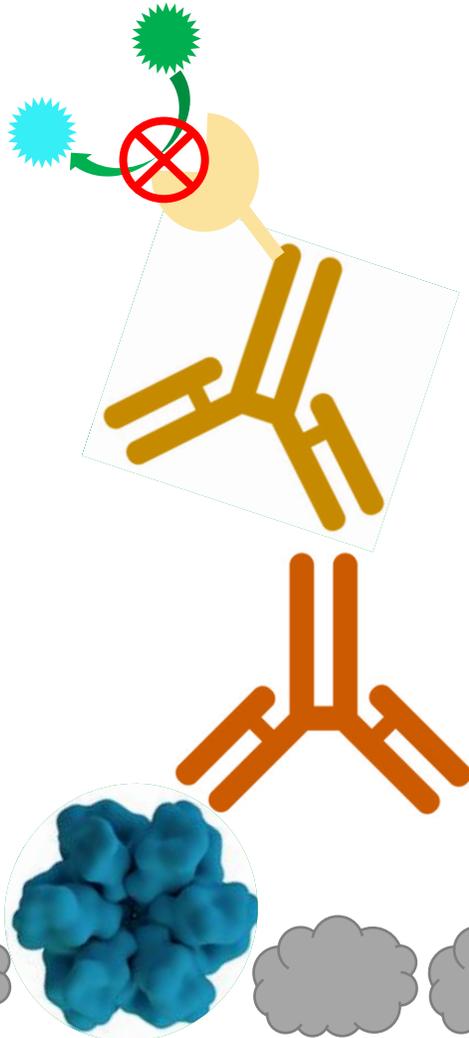


Diskussion

- Wieso braucht es zuerst (nach dem Antigen) einen Blocking-Puffer?
- Wieso muss zwischen den Schritten gewaschen werden?
- Welcher sekundärer Antikörper sollte gewählt werden? Wieso?



Lösung – Aufbau eines ELISA



1. Coating: Antigen (p24)
2. Blocking: BSA-Puffer, um unspezifische Bindung zu verhindern
3. Primärer Antikörper: bindet Antigen
4. Enzymgekoppelter sekundärer Antikörper: bindet primären Antikörper
5. Substrat: Farbveränderung durch Enzym
6. Stopp-Lösung: Säure deaktiviert Enzym

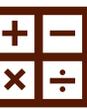


Entwicklung des ELISA

- **Horseradish Peroxidase (HRP)** ist ein Enzym, das Substrate mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oxidiert.
- **Tramethylbenzidin (TMB)** ist ein chromogenes Substrat, das farblos ist. Bei Oxidation gibt es eine Farbänderung zu blau.
- **Reaktion:** Wenn HRP in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid auf TMB trifft, katalysiert es die Oxidation von TMB.



- **Stopplösung (2M Schwefelsäure)** wird verwendet, um das Enzym zu deaktivieren und die Reaktion zu stoppen. Durch die Säure verändert sich Farbe von blau zu gelb.
- Diese Farbänderung ist proportional zur Menge des gebundenen Enzyms und somit zur Menge des Zielmoleküls in der Probe (Antigen).

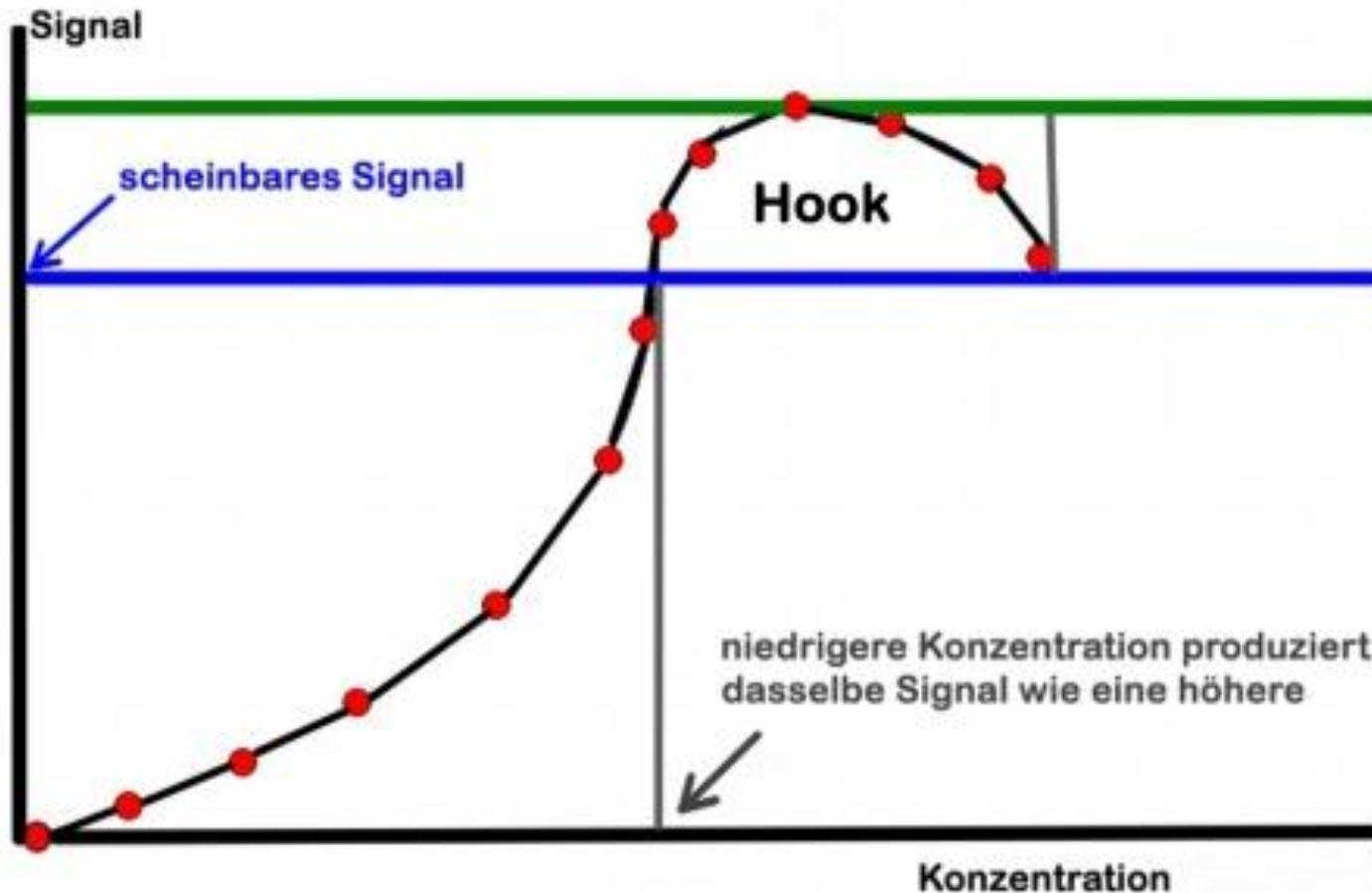


Auswertung Messergebnisse ELISA

- Die Farbintensität (OD: Optical Density) wird mit einem Mikrotiterplattenleser bei einer spezifischen Wellenlänge gemessen.
 - Die Intensität der Farbe (OD) ist proportional zur Menge des Zielmoleküls in der Probe.
 - Es wird immer eine Standardkurve mitgemessen, welche eine bekannte Menge des Zielmoleküls aufweist.
- Durch die Proportionalität und einer Standardkurve kann die Konzentration des Zielmoleküls bestimmt werden.



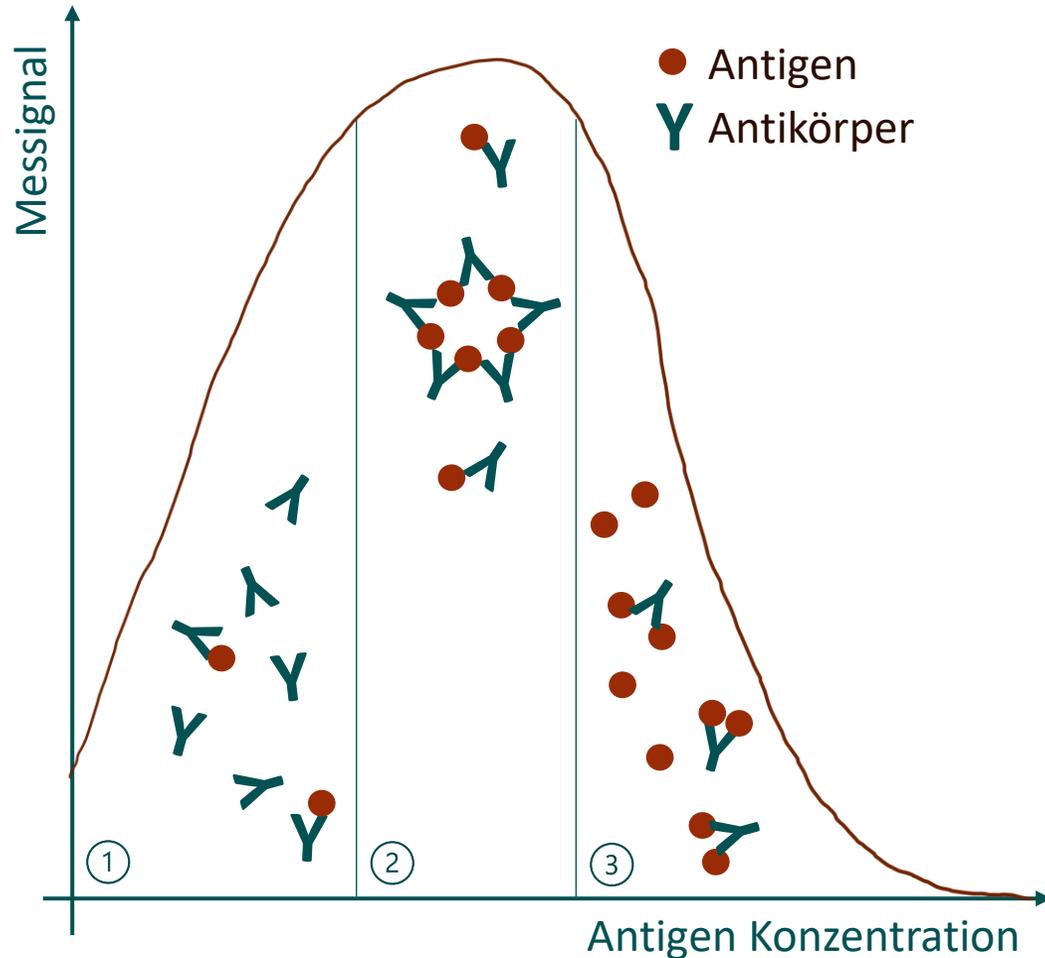
Hook-Effekt



- Typischer Fehler
- Bei Titrationen kann es vorkommen, dass bei hohen Konzentrationen das Signal wieder sinkt.
→ 2 unterschiedliche Konzentrationen mit gleichem Signal!



Hook-Effekt



- Tritt bei Antigen-Überschuss ein (rechter Schenkel der Heidelberger Kurve)

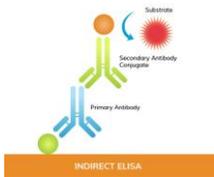
→ Messung mit verdünntem Probenmaterial wiederholen.

Ausblick

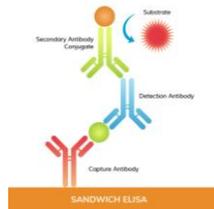
ELISA Varianten



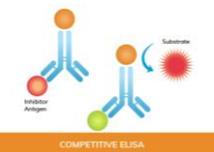
Direkter ELISA



Indirekter ELISA

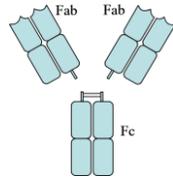


Sandwich ELISA

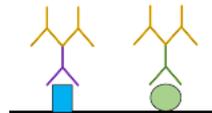


Kompetitiver ELISA

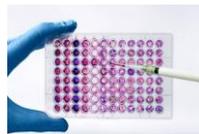
Troubleshooting



Störfaktoren



Interferenzen



Verschleppungsprobleme

