

**2^ο ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ. ELISA ΤΥΠΟΥ SANDWICH: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗΣ-2 (IL-2) ΣΕ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ
ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

Η ιντερλευκίνη-2 (IL-2) είναι μία κυτταροκίνη που παράγεται από τα T λεμφοκύτταρα, αποτελώντας αυξητικό τους παράγοντα, και εμπλέκεται σε πλήθος κυτταρικών διεργασιών και σηματοδοτικών μονοπατιών. Κύρια ιδιότητά της είναι η ενίσχυση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων, αλλά και των B και NK λεμφοκυττάρων όπου στα B αυξάνει την παραγωγή αντισωμάτων ενώ στα NK την κυτταρολυτική τους ικανότητα. Στα T λεμφοκύτταρα επάγει την μετάβαση από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου, ενεργοποιώντας διάφορες πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε αυτόν. Επίσης, επάγει την έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 και την παραγωγή άλλων κυτταροκινών, όπως οι IL-4 και IFN- γ , και έχει κομβικό ρόλο στην ανάπτυξη και λειτουργία των T ρυθμιστικών κυττάρων.

Η IL-2 μπορεί να παραχθεί *in vitro* μετά από διέγερση T λεμφοκυττάρων με κατάλληλους διεγέρτες. Λεμφοκύτταρα απομονώνονται από σπλήνα ποντικού και καλλιεργούνται, σε συγκέντρωση 10^6 κύτταρα/ml, σε θρεπτικό υλικό που περιέχει τους διεγέρτες PMA και Ιονομυκίνη. Το PMA είναι χημική ουσία που ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), ένζυμο που συμμετέχει στη μετάδοση του μηνύματος ενεργοποίησης των T κυττάρων. Η Ιονομυκίνη είναι ιονοφόρο του ασβεστίου που χρησιμοποιείται για την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου, που επίσης συμμετέχει στη μετάδοση του μηνύματος ενεργοποίησης των T κυττάρων. Ο συνδυασμός των δύο αυτών ουσιών σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων ποντικού έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την παραγωγή κυτταροκινών από T λεμφοκύτταρα. Στην άσκηση αυτή γίνεται συνδυασμός διαφορετικών συγκεντρώσεων PMA και Ιονομυκίνης ώστε να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες για την παραγωγή IL-2. Έτσι στις καλλιέργειες προστίθενται οι παρακάτω συγκεντρώσεις PMA και Ιονομυκίνης:

1. 1 ng/ml PMA + 100 ng/ml Ιονομυκίνη
2. 1 ng/ml PMA + 200 ng/ml Ιονομυκίνη

3. 2 ng/ml PMA + 50 ng/ml Ιονομυκίνη

4. 2 ng/ml PMA + 100 ng/ml Ιονομυκίνη

5. 2 ng/ml PMA + 200 ng/ml Ιονομυκίνη

Σε μία επιπλέον καλλιέργεια δεν προστίθενται διεγέρτες για να ελεγχθεί η αυθόρμητη παραγωγή IL-2 (αναμένεται να είναι μη ανιχνεύσιμη). Τα κύτταρα καλλιεργούνται υπό τις ανωτέρω συνθήκες για χρονικό διάστημα από 24 έως 48 ώρες. Μετά την πάροδο του προαναφερόμενο χρονικού διαστήματος, συλλέγονται τα υπερκείμενα των καλλιιεργειών.

Με την παρακάτω πειραματική διαδικασία πρόκειται να προσδιοριστεί η ποσότητα της IL-2 που έχει παραχθεί στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- **Στερεά επιφάνεια.** Πλακίδια 96 φρεατίων (8 × 12 cm) από πολυπροπυλένιο ή πολυστυρένιο.
- **Διάλυμα αναφοράς της IL-2.**
- **Υπερκείμενα** καλλιιεργειών διεγερμένων και μη διεγερμένων λεμφοκυττάρων.
- **Αντισώματα:**
 - Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού **αντι-IL-2 (Jes61A12)**.
 - Βιοτινυλιωμένο μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού, **αντι-IL-2 (Jes5H4-Biot)** που αναγνωρίζει άλλο επίτοπο του αντιγόνου από το προαναφερόμενο [αντι-IL-2 (Jes61A12)].
- **Ένζυμο.** Ραφανική υπεροξειδάση (HPO).
- **Υπόστρωμα.** TMB (3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη).
- **Στρεπταβιδίνη-HPO.**
- **Φωτόμετρο.** Αυτόματο φωτόμετρο ειδικό για πλακίδια 96 φρεατίων.

• Ρυθμιστικά διαλύματα:

- 0.1M NaHCO₃, pH 9.5.
- PBS, pH 7.2.
- PBS + Tween-20 0.1%
- PBS + Tween-20 0.1% + 1% BSA
- 1M H₃PO₄

ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ:

- Όλες οι αραιώσεις πραγματοποιούνται σε διάλυμα εργασίας.
- Ο όγκος που προστίθεται σε κάθε φρεάτιο είναι σταθερά 50 μl.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Αρχικά, πραγματοποιείται η ευαισθητοποίηση των πλακιδίων με την προσθήκη σε κάθε φρεάτιο όγκου 50 μl διαλύματος μονοκλωνικού αντισώματος ποντικού αντι-IL-2 (**Jes61A12**), συγκέντρωσης 5 μg/ml σε NaHCO₃ 0.1M, και ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 4°C.

(Έχει προετοιμαστεί από τους διδάσκοντες)

2. Στη συνέχεια, το πλακίδιο εκπλένεται 3 φορές με εμβάπτιση σε διάλυμα PBS + Tween-20 0.1%.

3. Τα φρεάτια επωάζονται με το αντιγόνο. Συγκεκριμένα, στα φρεάτια της αριστερής κάθετης στήλης του πλακιδίου προστίθεται το τυφλό (**blank**). Στα άλλα φρεάτια, προς τα δεξιά, προστίθενται 50 μl υπερκειμένων μη διεγερμένων σπληνοκυττάρων (**αρνητικός μάρτυρας**) και υπερκειμένων σπληνοκυττάρων διεγερμένων με 5 διαφορετικές συνθήκες σε αραιώσεις 1:5 έως 1:40 (4 διαδοχικές αραιώσεις υπερκειμένων 1:2). Τέλος, στα φρεάτια της τελευταίας σε χρήση κάθετης στήλης προστίθεται ποσότητα 50 μl οκτώ διαδοχικών αραιώσεων 1:2 διαλύματος αναφοράς της IL-2 από 1000 pg έως 7.8125 pg (**standard**). Ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

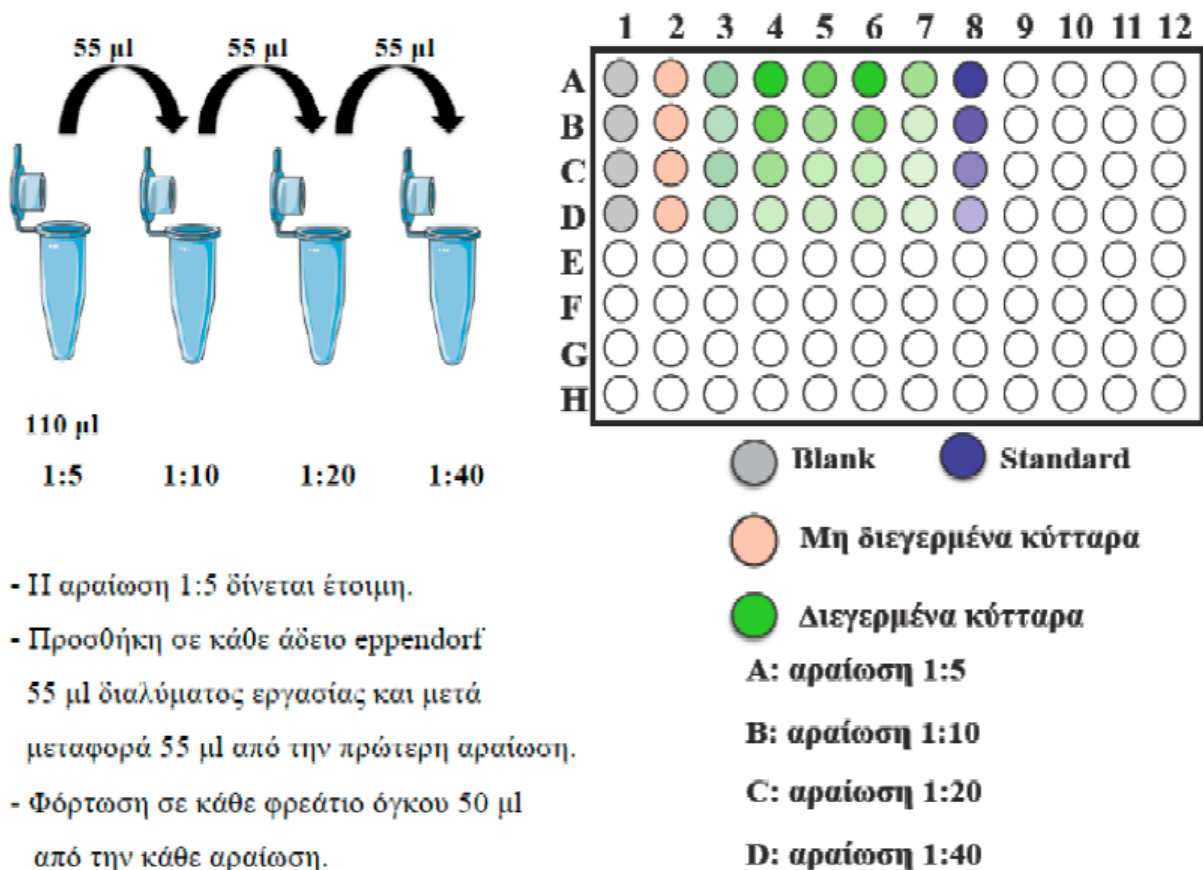
(Βλέπε επεξήγηση εκτέλεσης της άσκησης στα παρακάτω σχήματα)

- **Blank:** αντίδραση με όλα τα αντιδραστήρια εκτός του υπερκειμένου. Αντί αυτού προστίθεται όγκος 50 μl διαλύματος εργασίας (PBS + 0.1% Tween-20 + 1% BSA).

- **Standard:** περιέχει διαδοχικές αραιώσεις 1:2 διαλύματος αναφοράς IL-2 με συγκεντρώσεις 1000 pg (A8), 500 pg (B8), 250 pg (C8), 125 pg (D8), 62.5 pg (E8), 31.25 pg (F8), 15.625 pg (G8) and 7.8125 pg (H8).

- **Αρνητικός μάρτυρας:** Υπερκειμένο μη διεγερμένων κυττάρων.

- **Διεγερμένα κύτταρα:** αραιώσεις (αραιώσεις 1-4) υπερκειμένου διεγερμένων κυττάρων με διαφορετικούς συνδυασμούς PMA και Ιονομυκίνης.



- Η αραιώση 1:5 δίνεται έτοιμη.

- Προσθήκη σε κάθε άδειο erpendorf
55 μl διαλύματος εργασίας και μετά
μεταφορά 55 μl από την πρώτη αραιώση.

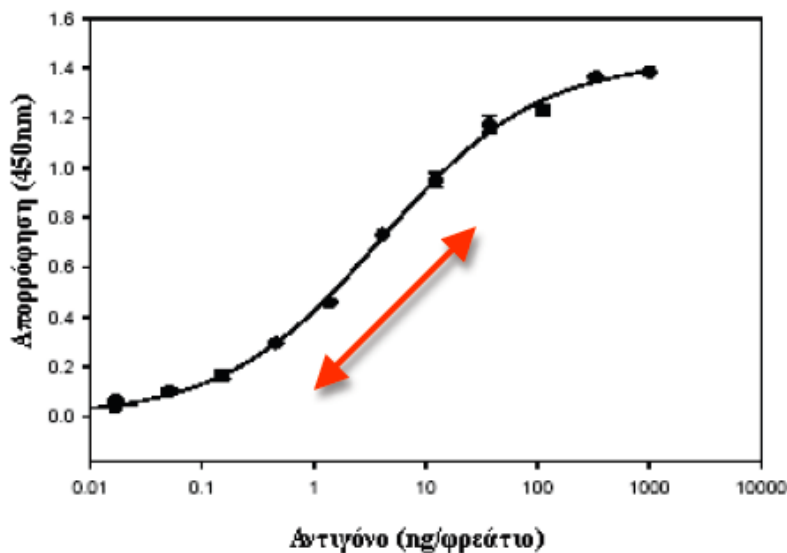
- Φόρτωση σε κάθε φρεάτιο όγκου 50 μl
από την κάθε αραιώση.

4. Στη συνέχεια το πλακίδιο εκκλίνεται όπως παραπάνω, σε κάθε φρεάτιο προστίθενται 50 μl βιοτινυλιωμένου μονοκλωνικού αντισώματος ποντικού αντι-IL-2 (**Jes5H4-Biot**) σε αραιώση 1:1.000 και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. (Το αντίσωμα δίνεται έτοιμο από τους διδάσκοντες).

5. Το πλακίδιο εκπλένεται και σε κάθε φρεάτιο προστίθεται όγκος 50 μl στρεπταβιδίνης-HPO σε αραιώση 1:10.000 (δίνεται έτοιμη αραιωμένη από τους διδάσκοντες) και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Πραγματοποιείται εκ νέου έκπλυση, στη συνέχεια προστίθενται 50 μl μείγματος 1:1 υποστρώματος TMB και H₂O₂ και λαμβάνει χώρα επώαση για χρονικό διάστημα 15 λεπτών προκειμένου να τελεστεί η ενζυμική αντίδραση. (Η προσθήκη του υποστρώματος θα γίνει με χρήση πολυπιπέτας από τους διδάσκοντες). Η εμφάνιση έντονου μπλέ χρώματος υποδηλώνει την ύπαρξη IL-2. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της IL-2.
7. Μετά την ανάπτυξη έντονου μπλέ χρώματος η ενζυμική αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 50 μl διαλύματος 1M H₃PO₄ σε κάθε φρεάτιο. Στους θετικούς ορούς αναπτύσσεται κίτρινο χρώμα και η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη του τίτλου των ορών.
8. Τέλος, πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 450 nm σε φωτόμετρο ειδικό για πλακίδια 96 φρεατίων.
9. Ανάλυση και συζήτηση αποτελεσμάτων.

Προσδιορισμός συγκέντρωσης

Σε ανοσοδοκιμασίες ELISA τύπου Sandwich προσδιορισμού συγκέντρωσης, οι τιμές της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος αναφοράς με γνωστές και αυξανόμενες συγκεντρώσεις αντιγόνου χρησιμοποιούνται για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Η καμπύλη είναι **σιγμοειδής** και ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η καμπύλη της εικόνας 7.



Εικόνα 7. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς ανοσοδοκιμασίας ELISA προσδιορισμού συγκέντρωσης. Με το βέλος υποδεικνύεται το γραμμικό τμήμα της σιγμοειδούς καμπύλης.

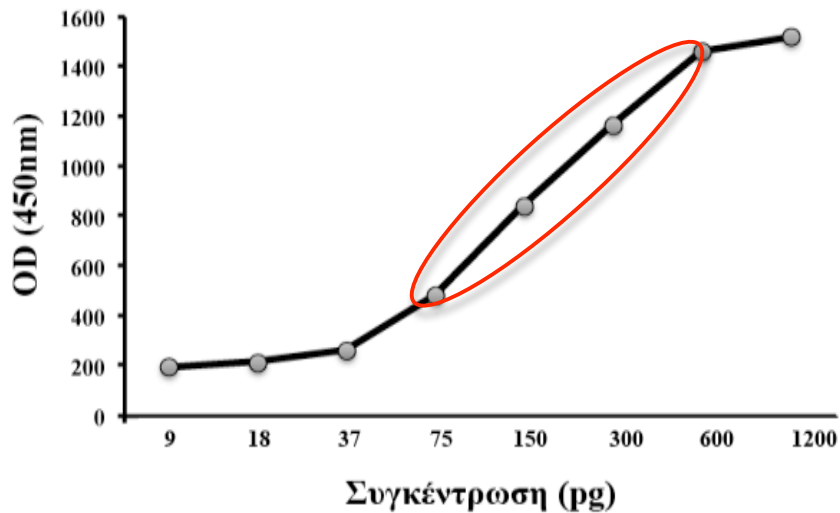
Για παράδειγμα, σε μία πειραματική διαδικασία ELISA τύπου Sandwich για τον προσδιορισμό συγκέντρωσης σε υπερκείμενα καλλιιεργειών προκύπτουν οι παρακάτω τιμές. Ας υποθέσουμε ότι το διάλυμα αναφοράς και οι αραιώσεις των δειγμάτων προετοιμάστηκαν μετά από διαδοχικές αραιώσεις 1:2, με το διάλυμα αναφοράς να αρχίζει από συγκέντρωση 1200 pg και τα δείγματα από αραιώση 1:10, αντίστοιχα.

Τυφλό	Διάλυμα Αναφοράς	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Δείγμα 4
0.107	1.520	0.640	0.148	0.160	1.802
0.112	1.460	0.312	0.161	0.175	1.640
0.121	1.164	0.244	0.145	0.103	1.520
0.101	0.840	0.182	0.121	0.138	0.924
0.119	0.482	0.161	0.120	0.130	0.680
0.105	0.261	0.152	0.145	0.120	0.473
0.108	0.212	0.137	0.123	0.148	0.260
0.129	0.196	0.150	0.112	0.100	0.184

Πρώτον, πρέπει να ελεγχθούν οι τιμές οπτικής πυκνότητας στο τυφλό. Οι τιμές στην προκειμένη περίπτωση είναι εντός των αναμενόμενων ορίων, υποδηλώνοντας τη μη ύπαρξη διασταυρούμενων αντιδράσεων, επιμόλυνσης των αντιδραστηρίων ή πιθανής χρήσης λάθος αντιδραστηρίων.

Δεύτερον, πρέπει να ελεγχθούν οι τιμές στα υπόλοιπα φρεάτια με σκοπό την επιβεβαίωση της σωστής πειραματικής εκτέλεσης. Οι τιμές μειώνονται καθοδικά που σημαίνει πως οι αραιώσεις έχουν γίνει σωστά.

Τρίτον, με βάση τις τιμές της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος αναφοράς θα πρέπει να δημιουργηθεί το γράφημα της πρότυπης καμπύλης αναφοράς.



Τέταρτον, θα πρέπει να καθορισθεί το κατώφλι ευαισθησίας. Οι τιμές οπτικής πυκνότητας του τυφλού χρησιμεύουν για να καθορίσουμε το κατώφλι ευαισθησίας, το οποίο συνήθως ορίζεται ως το διπλάσιο του μέσου όρου των μετρήσεων του τυφλού.

Στην προκειμένη περίπτωση, το κατώφλι ευαισθησίας ισούται με $(0.902 \div 8) \times 2$, δηλαδή **0.2255**. Τα δείγματα 2 και 3 έχουν μετρήσιμες τιμές οπτικής πυκνότητας μικρότερες από το κατώφλι ευαισθησίας και συνεπώς είναι αρνητικά και η εξεταζόμενη πρωτεΐνη βρίσκεται σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα σε αυτά.

Πέμπτον, για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων με τιμές οπτικής πυκνότητας μεγαλύτερες από το κατώφλι ευαισθησίας επιλέγονται τιμές που βρίσκονται στο γραμμικό τμήμα της σιγμοειδούς καμπύλης, δηλαδή από την τιμή 1.460 ως 0.482. Στο δείγμα 1, η τιμή που βρίσκεται εντός αυτού του ορίου είναι μόνο η πρώτη που ισούται με 0.640. Στο δείγμα 4, οι αντίστοιχες τιμές είναι η τέταρτη και η πέμπτη, δηλαδή οι τιμές 0.924 και 0.680. Η συγκέντρωση των δειγμάτων υπολογίζεται βάση εξειδικευμένων πολύπλοκων μαθηματικών τύπων. Εντούτοις, μπορούν να χρησιμοποιηθούν απλοί μαθηματικοί τύποι που υπολογίζουν τη συγκέντρωση με πολύ καλή προσέγγιση, όπως ο παρακάτω:

$$\text{Συγκέντρωση δείγματος} = \text{Αραίωση} \times \text{Συγκέντρωση standard} \times (\text{OD}_{\text{δείγματος}} \div \text{OD}_{\text{standard}})$$

Προσοχή:

1. Δεν ξεχνάμε να πολλαπλασιάσουμε με το συντελεστή αραίωσης που αντιστοιχεί στην OD του δείγματος.
2. Η τιμή OD του διαλύματος αναφοράς (standard) που πρέπει να χρησιμοποιηθεί στον προαναφερόμενο τύπο θα πρέπει να είναι η πλησιέστερη με αυτή του δείγματος.
3. Η αραίωση αναφέρεται στην αραίωση του δείγματος που αντιστοιχεί στην τιμή OD που θα χρησιμοποιηθεί στον τύπο.

Δείγμα 1:

$$\text{Συγκέντρωση δείγματος 1} = 10 \times 75 \text{ pg} \times (0.640 \div 0.482) = \mathbf{995 \text{ pg}}$$

Δείγμα 4:

Δεδομένου ότι η απόσταση της τιμής του δείγματος από τις δύο πλησιέστερες τιμές του διαλύματος αναφοράς (0.924 και 0.680) είναι περίπου ίδια, η συγκέντρωσή του υπολογίζεται συναρτήσει και των δύο αραιώσεων και η τελική τιμή είναι ο μέσος όρος και των δύο αποτελεσμάτων.

Άρα:

$$(\text{Συγκέντρωση δείγματος 4})_A = 80 \times 150 \text{ pg} \times (0.924 \div 0.840) = 13.200 \text{ pg} = 13,2 \text{ ng}$$

$$(\text{Συγκέντρωση δείγματος 4})_B = 160 \times 150 \text{ pg} \times (0.680 \div 0.840) = 19.428 \text{ pg} = 19,4 \text{ ng}$$

Στην προκειμένη περίπτωση, η συγκέντρωση της εξεταζόμενης πρωτεΐνης στο δείγμα προσδιορίζεται υπολογίζοντας το μέσο όρο των δύο τιμών, δηλαδή

$$\text{Συγκέντρωση δείγματος 4} = [(\text{Συγκέντρωση δείγματος 4})_A + (\text{Συγκέντρωση δείγματος 4})_B] \div 2$$

$$\Rightarrow \text{Συγκέντρωση δείγματος 4} = (13,2 \text{ ng} + 19,4 \text{ ng}) \div 2 = \mathbf{16,3 \text{ ng}}$$

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην άσκηση θα χρησιμοποιηθούν υπερκείμενα καλλιέργειών που δεν περιέχουν ή περιέχουν IL-2 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Θα υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις IL-2 των υπερκειμένων καλλιέργειών με βάση δείγματα γνωστής συγκέντρωσης και την προκύπτουσα από αυτά καμπύλη αναφοράς.

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Ποια είναι τα πλεονεκτήματα της ELISA σε σχέση με άλλες μεθόδους;
2. Αναφέρατε τρόπους με τους οποίους μπορεί να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου ELISA. Ποια είναι τα πλεονεκτήματα του συστήματος της βιοτίνης;
3. Πότε εφαρμόζεται το σύστημα Sandwich ELISA;
4. Ποιές είναι οι διαφορές στην έκφραση των αποτελεσμάτων στον ποσοτικό προσδιορισμό αντιγόνου και στον ποσοτικό προσδιορισμό τίτλου αντισωμάτων;

ΣΥΝΔΕΣΜΟΙ

Για την πραγματοποίηση προσομοίωσης της πειραματικής διαδικασίας της τεχνικής ELISA καθώς και εύρεση άλλων σχετικών πληροφοριών μπορείτε να επισκεπτείτε την ιστοσελίδα:

- <http://www.hhmi.org/biointeractive/vlabs/immunology/index.html>.
- <http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/ELISA.html>

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. E. Engvall, P. Perlman (1971). *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin G*. *Immunochemistry* 8: 871-879.
2. F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.
3. R.A. Goldsby, T.J. Kindt, B.A. Osborne, J. Kubly, *Immunology* (5th Edition), W.H. Freeman and Company, New York.
4. H. Van Vunakis, J.J. Langone (1980). *Immunochemical techniques. Methods Enzymol.* 70:1-525.
5. E.T. Maggio (1981). *Enzyme Immunoassay*. CRC Press, Boca Raton, Fla.