

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Отчетная работа
по результатам выполнения индивидуальных заданий учебной практики
«Профильная учебная практика по биохимии»
на тему:
«Методические основы ИФА. Основные виды ИФА»

Выполнили:

студенты 3 курса 2 группы
Медико-биологического факультета
Направления подготовки Биология
Профиль Биохимия
Васильченко Юлия Витальевна
Меликова Саран Абульфат-Кызы

Проверил:

Доцент кафедры фундаментальной
медицины и биологии, к.м.н.
Морковин Евгений Игоревич

Док.
Тематическая работа, но есть
существенные
погрешности в оформлении
20.07.2017 *Морковин Е.И.*

Содержание

Введение

Прямой ИФА

Непрямой неконкурентный ИФА

«Сэндвич»-метод

Конкурентные: прямой и непрямой ИФА

ср?

Введение

Иммуноферментный анализ — лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных низкомолекулярных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала. Теоретические основы ИФА *не всегда* опираются на современную иммунохимию и химическую энзимологию, знание физико-химических закономерностей реакции антиген-антитело, а также на основные принципы аналитической химии.

ИФА является одним из наиболее активно развивающихся направлений химической энзимологии. Это обусловлено тем, что в ИФА уникальная специфичность иммунохимической реакции (то есть антитела связываются исключительно с определёнными антигенами, и ни с какими другими) сочетается с высокой чувствительностью детекции ферментативной метки (вплоть до 10^{-21} моль в образце). Высокая стабильность реагентов, простота методов регистрации, возможность создания каскадных систем усиления различных химических сигналов, относительно низкая цена и многие другие достоинства метода ИФА способствовали его широкому внедрению в различные области медицины, сельское хозяйство, микробиологическую и пищевую промышленность, охрану окружающей среды, а также в научные исследования.

Прямой ИФА

В прямом иммуноферментном анализе вносимый материал (антиген) закрепляется во время инкубации на поверхности чистых лунок. Количество исследуемого материала детектируется с помощью антител к выявляемому антигену, соединенных со специфической меткой, обеспечивающей ферментативную реакцию.

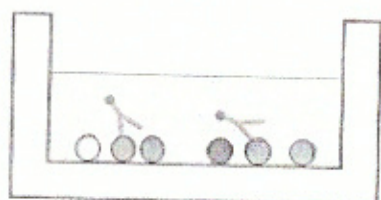


Рисунок 1

Принцип

прямого

ИФА

Примечание:

разноцветные круги — различные антигены из внесённой в лунку сыворотки; Y с лиловой точкой — антитела, меченные ферментом, обеспечивающим цветовую реакцию (конъюгат).

Структура анализа

Биологический материал (кровь, соскобы со слизистых, мазки) помещается в чистые лунки на некоторое время (обычно 15—30 минут), достаточное, чтобы антигены могли приклеиться к поверхности лунок.

Далее в лунки добавляют антитела к выявляемому антигену. Это значит, что выявляя антигены, например, сифилиса, добавляются антитела против антигенов сифилиса. Данную смесь исследуемого материала и антител оставляют на некоторое время (от 30 минут до 4—5 часов), чтобы антитела смогли найти и связаться со «своим» антигеном. Чем больше в биологической пробе антигенов, тем больше антител свяжется с ними. Поскольку антитела добавляются в избытке, то не все они свяжутся с антигенами, а если антигена вообще нет в пробе, то, соответственно, ни одно антитело не свяжется с искомым антигеном. Для того чтобы убрать «лишние» антитела, содержимое из лунок выливают (или вымывают методом декантации). В результате этого все «лишние» антитела убираются,

а остаются те, которые связались с антигенами, поскольку антигены «приклеены» к поверхности лунок.

Следующий этап \ominus ферментативная реакция. В промытые лунки добавляют раствор с ферментом и оставляют на 30-60 минут. Данный фермент имеет сродство к веществу (специфической метке), с которым связаны антитела. Фермент проводит реакцию, в результате которой эта специфическая метка (субстрат) превращается в окрашенное вещество (продукт).

Краткая схема: (Антиген) \rightarrow Антитело

Поскольку добавленная специфическая метка связана с антителами, значит, концентрация окрашенного продукта реакции равна концентрации антител. А концентрация антител равна концентрации антигенов.

Непрямой неконкурентный ИФА

В лунки, на твёрдой поверхности которых предварительно сорбирован антиген, вносится исследуемый биологический материал (чаще всего сыворотка или плазма крови человека), содержащий антитела к антигену. Образец исследуется на содержание антител.

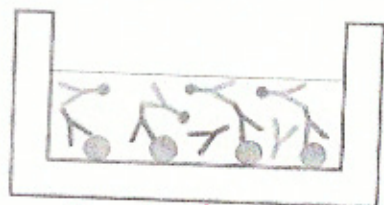


Рисунок 2 Назначение

Принцип непрямого неконкурентного ИФА
синие круги — антиген, иммобилизованный на поверхности лунки;
Y, Y, Y, Y — антитела из внесённой в лунку сыворотки;
Y с лиловой точкой — антитела, меченные ферментом, обеспечивающим цветовую реакцию (конъюгат).

Структура анализа

Исследуемые антитела из внесённого образца биологического материала во время инкубации связываются с антигеном и таким образом иммобилизуются на поверхности лунки. Несвязавшиеся антитела удаляют отмыванием.

В лунку вносят конъюгат, то есть антитело с заранее прикреплённым к нему ферментом (например, пероксидазой хрена), способное связаться с антителом, иммобилизованным на первой стадии. Если в ячейке имеются образовавшиеся на первой стадии иммунные комплексы, то конъюгат соединяется с ними во время второй инкубации, а несвязавшийся конъюгат удаляется последующим отмыванием.

Далее в лунку добавляется субстратно-хромогенный реагент, который превращается в окрашенный продукт под влиянием ферментного компонента конъюгата.

Краткая схема: Антиген → (Антитело) → Антитело-К

Таким образом, отличие от прямого метода состоит в том, что исследуемые антитела не приклеиваются к поверхности чистой лунки, а связываются с иммобилизованным на планшете антигеном.

«Сэндвич»-метод

«Сэндвич» является вариантом непрямого неконкурентного гетерогенного ИФА, в котором в качестве иммуносорбента выступает антитело.

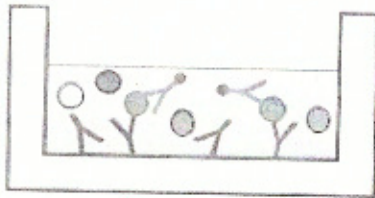


Рисунок 3

Принцип непрямого неконкурентного ИФА «сэндвич»
разноцветные круги \ominus различные антигены из внесённой в лунку сыворотки;
Y \ominus антитела, иммобилизованные на поверхности лунки;
Y с лиловой точкой \ominus антитела, меченные ферментом, обеспечивающим
цветовую реакцию (конъюгат)

Структура анализа.

К носителю с иммобилизованными антителами добавляют раствор, содержащий анализируемый антиген. В процессе инкубации на первой стадии на твердой фазе образуется комплекс антиген-антитело.

Затем носитель отмывают от несвязавшихся компонентов и добавляют меченные ферментом специфические антитела.

После вторичной инкубации и удаления избытка конъюгата антител с ферментом определяют ферментативную активность носителя, которая пропорциональна начальной концентрации исследуемого антигена. Ферментативная реакция (цветная реакция) проходит в присутствии перекиси водорода и субстрата, представленного неокрашенным соединением, которое в процессе пероксидазной реакции окисляется до окрашенного продукта реакции на заключительном этапе проведения

исследования. Интенсивность окрашивания зависит от количества выявленных специфических антител.

Результат оценивается спектрофотометрически или визуально.

Краткая схема: Антитело → (Антиген) → Антитело-К

На стадии выявления специфического иммунокомплекса антиген оказывается как бы зажатым между молекулами иммобилизованных и меченных антител, что послужило поводом для широкого распространения названия «сэндвич»-метод. По аналогичной схеме работают тест-системы для определения антител, но в качестве иммуносорбента в них используется антиген, а конъюгат содержит раствор антигена, меченного ферментом.

«Сэндвич»-метод может быть использован для анализа только тех антигенов, на поверхности которых существуют, по крайней мере, две пространственно удалённые антигенные детерминанты. На этом формате основано большое количество тест-систем для иммуноферментной диагностики различных инфекций: ВИЧ-инфекция, вирусные гепатиты, цитомегаловирусная, герпесная, токсоплазменная и другие инфекции.

В настоящее время получили распространение тест-системы с использованием стрептавидина и биотинилированных моноклональных антител (которые представляют собой смесь высокоочищенных специфичных моноклональных антител к различным эпитопам). Стандарты, контроли и пробы пациентов добавляются в микроячейки, покрытые стрептавидином, затем добавляют биотинилированные антитела, и антитела, меченные ферментом (конъюгат). После перемешивания результатом реакции становится образование «сэндвич»-комплекса, который связывается со стрептавидином в ячейках. Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. После инкубации с субстратным раствором фотометрически определяется относительная плотность растворов в лунках. Особенностью

таких систем является отдаление ферментной реакции от стенки планшета, поэтому окраска развивается в объёме и тест-система аналитически становится более чувствительной.

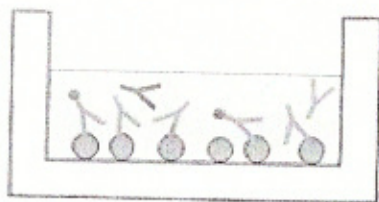
Конкурентные: прямой и непрямой ИФА

В случае конкурентного ИФА определяемые антигены или антитела конкурируют с аналогичными мечеными антигенами или антителами конъюгата за места связывания с иммуносорбентом. Анализ этого типа часто используют для определения антигенов, присутствующих в высоких концентрациях или гормонов, имеющих только один антиген-связывающий центр.

Среди конкурентных схем твердофазного ИФА существует два основных формата: прямой и непрямой.

Прямой конкурентный ИФА

Прямой конкурентный формат ИФА использует иммобилизованные на твердой фазе специфические антигены, а меченые ферментом и немеченые антитела конкурируют за связь с иммобилизованным антигеном.



Рисунок

Принцип прямого конкурентного ИФА
синие круги \rightarrow антиген, иммобилизованный на поверхности лунки;
Y, Y, Y, Y \rightarrow антитела из внесённой в лунку сыворотки;
Y с лиловой точкой \rightarrow антитела, меченные ферментом, обеспечивающим цветовую реакцию (конъюгат).

Структура анализа.

В лунку планшета, на поверхности которой сорбированы антигены, вносят исследуемый образец (сыворотку или плазму крови человека) и конъюгат, который представляет собой антитела, меченные ферментом. После инкубирования образуются иммунные комплексы двух видов:

содержащие ферментную метку (меченные) и без неё (немеченные). Чем больше определяемых (немеченных) антител содержит исследуемый образец, тем больше конкуренция с мечеными антителами и, следовательно, образуется меньше меченных иммунных комплексов.

Далее, после отмывки носителя от несвязавшихся компонентов, добавляют субстрато-хромогенный реагент и регистрируют ферментативную активность образовавшихся на твердой фазе специфических иммунных комплексов.

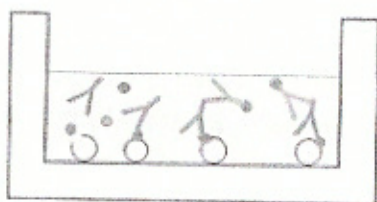
Краткая схема: Антиген \rightarrow (Антитело) + Антитело-К

Таким образом, величина детектируемого сигнала, получаемого прямым конкурентным ИФА, находится в обратной зависимости от концентрации антигена.

Преимуществом прямой схемы является небольшое число стадий, что позволяет легко автоматизировать анализ. К недостаткам схемы относятся сложность методов синтеза ферментных конъюгатов, а также возможное влияние компонентов образца на активность фермента.

Непрямой конкурентный ИФА

В непрямом конкурентном формате ИФА используются меченные ферментом антивидовые антитела (специфические или вторичные) и иммобилизованный на твердой фазе конъюгат антиген-белок-носитель. Одна из наиболее распространенных схем ИФА.



Рисунок

Принцип

непрямого

конкурентного

ИФА

большие жёлтые круги \rightarrow конъюгат антиген-белок, иммобилизованный на

поверхности лунки;
малые красный, зелёный и синие круги — различные антигены из внесённой в лунку сыворотки (например, наркотические вещества);
Y с немечеными антителами, специфическими к конкретному антигену;
Y с лиловой точкой с вторичными антивидовыми антителами, меченными ферментом, обеспечивающим цветовую реакцию (конъюгат).

Структура анализа.

На поверхности носителя иммобилизуют конъюгат антиген-белок, к которому добавляют раствор, содержащий определяемый антиген и фиксированную концентрацию немеченых специфических антител, инкубируют.

После удаления несвязавшихся компонентов добавляют фиксированную концентрацию меченых вторичных антивидовых антител.

После инкубации и отмывки носителя детектируют ферментативную активность образовавшихся на твердой фазе специфических иммунных комплексов.

Краткая схема: Антиген-К → (Антитело) + Антиген → Антитело-К

Величина детектируемого сигнала также, как и при использовании прямого конкурентного метода, находится в обратно-пропорциональной зависимости от концентрации определяемого антигена.

Применение универсального реагента с мечеными антивидовыми антителами даёт возможность выявлять антитела к разным антигенам. Кроме того, анализируемый образец и меченый реагент вводятся в систему на разных стадиях, что устраняет влияние различных эффекторов, содержащихся в образце, на каталитические свойства ферментной метки. Однако такая схема анализа усложняет его проведение из-за введения дополнительных стадий.

Список литературы:

1. А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. Теория и практика иммуноферментного анализа. — М.: Издательство "Высшая школа", 1991. — С. 3-42.
2. Иммунохимический анализ в лабораторной медицине / В. В. Долгов. — М.-Тверь: ООО "Издательство "Триада"", 2015. — С. 34-38.