

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

Отчетная работа

по результатам выполнения индивидуальных занятий учебной практики  
«Профильная учебная практика по биохимии»

на тему:

«Применение иммуноферментного анализа в клинической лабораторной  
диагностике»

Выполнила:

студентка 3 курса

Медико-биологического факультета

направления подготовки: Биология

(профиль Биохимия), 302 гр

Кулешова Лариса

Проверил:

Доцент кафедры фундаментальной

медицины и биологии, к.м.н.

Морковин Е.И.

*Отчет (92)*  
*Тема: Иммуноферментный анализ в диагностике заболеваний*  
*Е.И. Морковин Ф.И.*  
*20.04.2018*

Содержание	
Введение .....	3
Практическое применение ИФА. ....	4
Классификация ИФА. ....	6
Варианты постановки ИФА. ....	10
Прямой ИФА .....	11
Непрямой ИФА. ....	13
"Сэндвич" – метод ИФА. ....	14
Конкурентный ИФА. ....	15
Ингибиторный ИФА. ....	16
Метод иммуноферментных пятен (ELISPOT). ....	17
Заключение .....	20
Список литературы .....	21

## Введение

Методы иммунного анализа широко вошли в медицинскую практику. Во всех областях современной медицины используется иммунный анализ, преимущественно, с диагностической и аналитической целями. Важно то, что ИА дает возможность идентифицировать биологические компоненты (гормоны, ферменты, нейропептиды, продукты иммунной системы, антигены и т.д.) в низких и очень низких концентрациях. Все продукты, против которых возможно получение антител, выявляются этими методами.

Иммунный анализ основывается на взаимодействии антигена и антитела с использованием различных вариантов метки одного из компонентов (фермент, радионуклид, флуоресцентный краситель и другие). Оценка реакции проводится на специальной аппаратуре, что позволяет стандартизировать эти методы.

При постановке реакций в один или несколько этапов методы обозначаются как прямые или непрямые. Имеет значение среда, в которой проводится реакция. Если реакция проводится с реагентами, фиксированными на поверхности, то тест обозначается как твердофазный, например ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).

В данной работе будет рассмотрен только иммуноферментный анализ – метод широко распространенный в биологии и медицине.

## Иммуноферментный анализ

ИФА появился в середине 60-х годов и первоначально был разработан как метод для идентификации антигена в гистологическом препарате, а также для визуализации линий преципитации в тесте иммунодиффузии и иммуноэлектрофореза, а затем стал использоваться для количественного определения антигенов и антител в биологических жидкостях. В разработке метода принимали участия Е. Энгвалл и Р. Пэлман, а также независимо от них В. Ван Веeman и Р. Шурс.

Метод основан на специфическом связывании антитела с антигеном, при этом один из компонентов конъюгирован с ферментом, в результате реакции с соответствующим хромогенным субстратом образовывается окрашенный продукт, количество которого можно определить спектрофотометрически (рис. 1).

Открытие возможности иммобилизации антигена и антитела на различных носителях с сохранением их связывающей активности позволило расширить использование ИФА в различных областях биологии и медицины.

Разнообразие объектов исследования от низкомолекулярных соединений до вирусов и бактерий, а также необычайно широкий круг задач, связанных с многообразием условий применения ИФА, обуславливают разработку чрезвычайно большого количества вариантов этого метода.

### Практическое применение ИФА.

ИФА нашел широкое применение в различных областях медицины и биологии благодаря относительной простоте и высокой чувствительности метода. ИФА успешно применяется для:

- массовой диагностики инфекционных заболеваний (выявление различных специфических антигенов или антител к ним);
- выявления и определения уровня гормонов и лекарственных препаратов в биологических образцах;
- определения изотипов (IgG, IgM и другие) антител против конкретного антигена;
- выявления иммунных комплексов;
- выявления онкомаркеров;
- определения белков сыворотки крови (ферритин, фибронектин и др.);
- определения общего IgE и специфических IgE антител;
- скрининга моноклональных антител;
- определения цитокинов в биологических жидкостях.

#### Чувствительность метода

ИФА пришел на смену широко используемым ранее в клинической практике методам агглютинации, преципитации и РИА. По сравнению с вышеназванными методами, ИФА менее трудоемок и, менее продолжителен по времени, удобен для выполнения большого числа однотипных анализов.

В ИФА сочетается уникальная специфичность иммунохимического анализа с высокой чувствительностью определения ферментной метки. Чувствительность метода (под чувствительностью подразумевают минимальное выявляемое количество антител или антигена) определяется следующими факторами: аффинностью антител, предпочтительнее использование моноклональных антител;

специфической активностью фермента; интенсивностью сигнала; чувствительностью учета сигнала. Различные варианты ИФА различаются по своей чувствительности. Отдельные варианты твердофазного ИФА позволяют выявлять в образце единичные молекулы. Средняя чувствительность ИФА –  $10^{-9}$  –  $10^{-12}$  моль.

#### Классификация ИФА.

В основу классификации методов ИФА положено несколько подходов:

1. По типу реагентов, присутствующих на первой стадии ИФА, различают конкурентный и неконкурентный методы.

А) Конкурентный метод ИФА основан на конкуренции меченых (конъюгат) и немеченых (исследуемых) антител за связывание с антигеном, адсорбированным на твердой фазе. Количество фермента, присоединившегося к твердой фазе, уменьшится пропорционально содержанию в смеси свободных антител. Для определения антигена используется тот же вариант, но в этом случае искомым антигеном конкурирует с меченым, стандартным антигеном за связывание с антителами, иммобилизованными на поверхности твердой фазы.

Конкурентный метод требует минимального числа операций, незначительного расхода реагентов и легко может быть автоматизирован. При проведении конкурентного ИФА для выявления антител лучше использовать меченые моноклональные антитела, тогда конкуренция конъюгата с исследуемым образцом происходит за единственный эпитоп адсорбированного на твердой фазе антигена. Этот вариант ИФА применяется для определения различных соединений, таких как иммуноглобулины человека, раково-эмбриональный

антиген, инсулин и др. Он позволяет выявлять антитела к диагностически значимым эпитомам инфекционных агентов.

Б) Неконкурентный метод ИФА подразделяется на несколько видов по типу детекции (прямой конкурентный, косвенный (непрямой) конкурентный) и по типу иммобилизованного на твердой фазе вещества (антиген или антитело).

#### Прямой вариант ИФА

Может выполняться 2 способами. В первом случае исследуемое вещество (антиген) непосредственно иммобилизовано на твердой фазе; тогда связавшееся с антигеном меченое антитело является детектором. При выполнении теста иным способом используют иммобилизованные на твердой фазе антитела. В этом случае детектором является исследуемое вещество, меченное ферментом.

#### Косвенный (непрямой) вариант ИФА

При выполнении непрямого варианта ИФА антиген иммобилизован на твердой фазе. После блокировки к антигену прибавляют раствор специфических к нему антител. После инкубации образовавшийся комплекс антиген–антитело отмывают от несвязавшихся антител и добавляют меченный ферментом анти-иммуноглобулин (анти-Ig), выступающий в роли детектора. Анти-Ig детекторы коммерчески доступны для конкретных классов и подклассов Ig, что делает этот формат анализа удобным для изотипирования антител. Кроме того, использование меченого анти-Ig усиливает сигнал по сравнению с прямым методом иммуноферментного анализа, тем самым увеличивая чувствительность анализа.

## Метод «сэндвича»

Наиболее распространенным неконкурентным методом является «сэндвич» метод. При его выполнении на твердой фазе иммобилизуют первичные антитела с их последующей блокировкой. Затем к ним прибавляют исследуемое вещество, содержащее антиген, и инкубируют. После инкубации комплекс антиген–антитело отмывают от несвязавшегося антигена и добавляют вторичные антитела, меченные ферментом, и проводят детекцию.

Все методы ИФА делятся на гомогенные и гетерогенные.

Если все три стадии ИФА проходят в растворе, и между основными стадиями нет дополнительных этапов разделения образовавшихся иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов, метод относится к группе гомогенных.

В основе гомогенного ИФА, применяемого, как правило, для определения низкомолекулярных субстанций, лежит ингибирование активности фермента при его соединении с антигеном или антителом. Активность фермента восстанавливается в результате реакции антиген-антитело.

При связывании антитела с антигеном, содержащим ферментную метку, происходит ингибирование активности фермента на 95% по отношению к высокомолекулярному субстрату, что обусловлено стерическим исключением субстрата из активного центра фермента. По мере увеличения концентрации антигена связывается все больше антител и сохраняется все больше свободных конъюгатов антиген-фермент, способных гидролизовать высокомолекулярный субстрат. Анализ проводят очень быстро, для одного определения требуется 1



минута. Чувствительность метода достаточно высока. С его помощью можно определить вещество на уровне пикомолей.

Для гетерогенных методом характерно проведение анализа в двухфазной системе с участием твердой фазы – носителя, и обязательная стадия разделения иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов (отмывка), которые находятся в разных фазах (образовавшиеся иммунные комплексы находятся на твердой фазе, а непрореагировавшие комплексы – в растворе). Гетерогенные методы, в которых формирование иммунных комплексов на первой стадии протекает на твердой фазе, называют твердофазными методами.

Методы относятся к гомогенно- гетерогенным, если 1 стадия – образование специфических комплексов происходит в растворе, а затем для разделения компонентов используют твердую фазу с иммобилизированным реагентом.

По принципу определения тестируемого вещества:

А) Прямое определение концентрации вещества (антигена или антитела) по числу взаимодействующих с ним центров связывания. В этом случае ферментная метка будет находиться в образовавшемся специфическом комплексе АГ-АТ. Концентрация определяемого вещества будет прямо пропорциональна регистрируемому сигналу.

Б) Определение концентрации вещества по разности общего числа мест связывания и оставшихся свободными центров связывания. Концентрация определяемого вещества при этом будет возрастать, а регистрируемый сигнал снижаться, следовательно, в данном случае прослеживается обратная зависимость от величины регистрируемого сигнала.

## Варианты постановки ИФА.

### Общий принцип.

В настоящее время используется огромное количество всевозможных разновидностей и модификаций ИФА. Широкое распространение получили разные варианты твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

Твердофазный ИФА был предложен в 1971 году. Основные принципы твердофазного ИФА, независимо от модификации, заключаются в следующем:

1. На 1 этапе реакции адсорбируют антигены или антитела на твердой фазе. При этом не связавшиеся с твердой фазой реагенты легко удаляются отмыванием.

2. В сенсibilизированных лунках инкубируют исследуемый образец. В лунках с положительным контролем – стандартные реагенты. При этом на поверхности твердой фазы формируются иммунные комплексы. Несвязавшиеся компоненты удаляют отмыванием.

3. При добавлении конъюгата антитело-фермент или антиген-фермент и связывании его с иммобилизованным иммунным комплексом активный центр фермента остается доступным для последующего взаимодействия с субстратом. Инкубация субстрата в лунках с иммобилизованным конъюгатом приводит к развитию цветной реакции. Эту реакцию можно остановить на нужной стадии, выраженность окрашивания можно оценить визуально или по оптической плотности.

Важный этап любого варианта твердофазного анализа – процедура отмывки от несвязавшихся реагентов. Важно не просто сполоснуть фиксированные на твердой фазе компоненты, а удалить реагенты из всей глубины слоя. Это наиболее

длительные и трудоемкие этапы анализа. Промывание проб может производиться в автоматическом режиме с помощью специального прибора – вошера или вручную, многоканальным дозатором.

Для проведения ИФА необходимы:

- полистироловый планшет или другие используемые варианты твердой фазы;
- отмывающий раствор;
- конъюгат (меченные ферментной меткой антигены или антитела);
- смесь используемых субстратов;
- останавливающий раствор (Стоп-реагент – раствор для останавливания реакции);
- образцы, используемые для положительного и/или отрицательного контроля;
- стандартный антиген (для построения калибровочной кривой);
- одно- и многоканальные пипетки;
- вошер (промыватель);
- оптический прибор для определения оптической плотности исследуемого раствора (ИФА-ридер, считыватель, который последовательно фотометрирует все лунки);
- 5-100 мкл исследуемого биологического материала.

### Прямой ИФА

1. В лунках панелей адсорбируют антигены или антитела (исследуемый материал). Выше отмечалось, что антигены существенно различаются по

способности адсорбироваться на разных видах пластика в зависимости от того, к какому классу веществ (белкам, углеводам или липопротеинам) они принадлежат. Часто, в прямом ИФА, антиген, иммобилизованный на твердой фазе, это клетки и другие корпускулярные антигены.

Контроль. В качестве контроля используют лунки с адсорбированным положительным контрольным образцом, в котором обязательно содержится искомый антиген, и отрицательным контрольным образцом заведомо не содержащим исследуемого антигена. При наличии очищенного стандартного антигена реакцию проводят в нескольких разведениях, так чтобы можно было построить калибровочную кривую.

2. "Блокируют свободные места связывания, оставшиеся на твердой фазе, с помощью БСА казеина и др. (для предотвращения неспецифической сорбции конъюгата на твердой фазе).

3. В лунки вносят меченные ферментом антитела или антигены (конъюгат), инкубируют. Связывание конъюгата с твердой фазой будет происходить лишь в случае комплементарности обоих компонентов системы. После инкубации с конъюгатом лунки отмывают, удаляя, таким образом, не связавшуюся часть конъюгата.

4. Затем в лунки вносят субстрат, специфичный для используемого фермента, и инкубируют. По достижении оптимального уровня окрашивания в лунках с положительным контролем, ферментативную реакцию останавливают.

5. Учет реакции. Сначала результаты реакции учитывают визуально. Для более точного учета результатов интенсивность окрашивания оценивают на

ИФА-ридере с соответствующим светофильтром. По результатам проведенного анализа строят график зависимости оптической плотности от концентрации.

#### Непрямой ИФА.

Этот вариант ИФА используют обычно для выявления специфических антител. В лунках панелей адсорбируют стандартный антиген и инкубируют с образцами сыворотки или другого биологического материала, полученного от больного (спинномозговая жидкость, слюна и др.). Специфические антитела, связавшиеся с антигеном на твердой фазе, выявляют с помощью антиглобулинового конъюгата. В зависимости от цели анализа используют разные антиглобулиновые реагенты, выявляющие антитела всех изотипов, либо специфичные к отдельным классам и подклассам иммуноглобулинов. Основное достоинство метода состоит в универсальности конъюгата. Один и тот же конъюгат может служить для выявления антител человека к самым разным антигенам в любых образцах. Реакция методически проста.

Основные этапы непрямого ИФА для определения антител:

1. Антиген адсорбируют на твердой фазе, затем отмывают от несвязавшихся компонентов.
2. Блокируют свободные места связывания. Отмывают.
3. В лунки вносят исследуемый материал, инкубируют и затем проводят процедуру отмывки. Параллельно ставят пробы с положительным и отрицательным контролями.
4. Добавляют антиглобулиновый конъюгат в рабочем разведении, инкубируют, отмывают от несвязавшихся компонентов.

5. Вносят субстрат, инкубируют. По достижении оптимального уровня окрашивания в лунках с положительным контролем реакцию останавливают, добавляя стоп-раствор.

6. Измеряют количество продукта реакции на ИФА-ридере.

При оптимальных условиях проведения анализа метод высокоспецифичен и чувствителен. Он позволяет выявлять нанограммовые количества антител в сыворотках исследуемых больных. Для получения удовлетворительных результатов необходима стандартизация реагентов и методических приемов. Этот вариант ИФА может также использоваться для тестирования моноклональных антител.

"Сэндвич" – метод ИФА.

Вариант ИФА для выявления антигенов.

Антигены, определяемые с помощью данного варианта ИФА, должны иметь несколько эпитопов, способных связывать антитела, или обладать повторяющимися, пространственно-разделенными эпитопами одинаковой специфичности.

При проведении этого варианта ИФА высокоспецифичные поли- или моноклональные антитела, адсорбированные на твердой фазе, инкубируют с исследуемым образцом. После процедуры отмывания в лунки вносят меченные ферментом антитела (конъюгат) к тому же антигену и далее проводят все остальные этапы реакции. Эффективность образования специфического комплекса на каждой стадии анализа зависит от константы связывания реакции антиген-антитело.

Основные этапы анализа:

1. На твердой фазе иммобилизуют моноклональные антитела или аффинно-очищенные поликлональные антитела.
2. В лунки панелей вносят исследуемый образец, параллельно ставят положительный контрольный образец и отрицательный контрольный образец в различных разведениях. Инкубируют и отмывают.
3. В лунки вносят меченные ферментом моноклональные или поликлональные антитела – конъюгат. После инкубации проводят отмывку.
4. Вносят субстрат, инкубируют. Реакцию останавливают при достижении оптимального окрашивания в лунках с положительным контролем.
5. Учет результатов на ИФА-ридере.

Основным достоинством метода является высокая чувствительность, превосходящая возможности других схем ИФА.

#### Конкурентный ИФА.

Этот вариант анализа основан на конкуренции меченых (конъюгат) и немеченых (исследуемых) антител за связывание с антигеном, адсорбированным на твердой фазе. Количество фермента, присоединившегося к твердой фазе, уменьшится пропорционально содержанию в смеси свободных антител. Для определения антигена используется тот же вариант, но в этом случае искомый антиген конкурирует с меченым, стандартным антигеном за связывание с антителами, иммобилизованными на поверхности твердой фазы.

Конкурентный метод требует минимального числа операций, незначительного расхода реагентов и, легко может быть автоматизирован. При

проведении конкурентного ИФА для выявления антител лучше использовать меченые моноклональные антитела, тогда конкуренция конъюгата с исследуемым образцом происходит за единственный эпитоп адсорбированного на твердой фазе антигена. Этот вариант ИФА применяется для определения различных соединений, таких как иммуноглобулины человека, раково-эмбриональный антиген, инсулин и др. Он позволяет выявлять антитела к диагностически значимым эпитопам инфекционных агентов.

Основные этапы анализа для выявления антигена:

1. На твердой фазе иммобилизуют специфические для выявляемого антигена моноклональные антитела.

2. В лунки панелей вносят в известной концентрации антиген, меченный ферментом, и исследуемый образец. Проводят инкубацию и отмывку. Параллельно в соседних лунках ставят положительный и отрицательный контроли. Для построения калибровки используют стандартный немеченый антиген в различных разведениях.

3. Добавляют субстрат, инкубируют, останавливают реакцию при развитии оптимального окрашивания в лунках с положительным контролем.

4. Учет реакции на ИФА-ридере.

В этом случае количество антигена в исследуемом образце обратно пропорционально ферментативной активности на твердой фазе.

Ингибиторный ИФА.

В этом варианте ИФА антиген, присутствующий в исследуемом образце, связывается с моноклональными антителами, мечеными ферментной меткой, и



ингибирует их взаимодействие со стандартным антигеном, иммобилизованным на твердой фазе. Присутствие в образце даже следовых количеств специфичного к конъюгату антигена будет ингибировать связывание меченых антител с иммобилизованным антигеном. Степень ингибирования прямо пропорциональна содержанию антигена в растворе. Для проведения количественного анализа строят калибровочную кривую с помощью последовательных разведений стандартного антигена. Основные этапы ингибиторного ИФА для выявления антигена.

1. В лунках панелей адсорбируют стандартный антиген. Подбирают рабочее разведение меченых антител с помощью титрования.

2. Проводят предварительную инкубацию конъюгата в разведении, предшествующем рабочему, с разведениями исследуемого образца, стандартного антигена и положительных контрольных проб.

3. Смесь переносят в лунки панелей. Для контроля 100%-ного связывания в несколько лунок вносят только меченые антитела, без ингибирующего антигена.

Панели инкубируют, затем проводят отмывку.

4. Добавляют субстрат.

5. Проводят учет результатов.

Концентрация определяемого антигена в исследуемом образце обратно пропорциональна ферментативной активности на твердой фазе.

ИФА может использоваться не только для определения растворимого антигена или антитела, но и клеток, вырабатывающих различные белки.

#### Метод иммуноферментных пятен (ELISPOT)

В 1983 году адаптировали технологию твердофазного ИФА для определения

лимфоидных клеток, секретирующих антитела или антигены (например, цитокины), *in vitro*. Метод получил название ELISPOT (метод иммуноферментных зон или пятен). Основной принцип метода:

1. На поверхности полистироловой лунки (используют 24-х луночные панели для культивирования клеток) сорбируют антигены или антитела, которые служат "ловушечными" реагентами.

2. Добавляют исследуемые лимфоидные клетки, культивируют несколько часов при 37°C, давая им возможность занять определенное место и выполнить секреторную функцию. Антитела или антигены, секретируемые такими клетками, улавливаются адсорбированными на твердой фазе реагентами.

3. Клетки удаляют, используя для этого отмывающий раствор с детергентом, лизирующим клетки.

4. Участки накопления секреторных продуктов проявляют, добавляя связанные с ферментом антитела (антиглобулиновый реагент).

5. Добавляют смесь субстрата с агарозой (используемые субстраты должны растворяться в агарозе и образовывать нерастворимые продукты реакции), на поверхности твердой фазы образуются коричневые или голубые пятна (в зависимости от используемых ферментов и субстратов), выявляя участки, где располагались клетки.

- Образовавшиеся пятна подсчитывают под микроскопом, это и будет количество секретирующих клеток.

В качестве твердой фазы может быть использована нитроцеллюлозная мембрана. В этом случае есть ряд преимуществ: из-за высокой адсорбционной

способности НЦМ требуется значительно меньшее количество антигена, используемого в качестве "ловушечного" реагента, кроме того, отпадает необходимость во включении агарозы в субстрат.

При параллельном определении количества секретирующих клеток и общего количества секретируемого антигена или антитела в лунке, что возможно при использовании другого субстрата, можно выявить количество секретируемого вещества единичной клеткой.

Данный метод нашел широкое применение для оценки количества клеток, секретирующих антиген, улавливаемый адсорбированными антителами, используется для определения количества клеток, секретирующих цитокины (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ ).

## Заключение

Широкие возможности открывает использование моноклональных антител, специфичных строго к определённому антигенному участку анализируемого соединения. Путём подбора соответствующих антител можно создавать довольно сложные иммунохимические системы, позволяющие идентифицировать соединения самого разнообразного круга.

Метода ИФА находится в постоянном развитии. С одной стороны, расширяется число объектов исследования, с другой — углубляются и совершенствуются методы самого анализа. Это приводит к тому, что упрощается схема анализа, сокращается время его проведения, уменьшается расход реагентов. Идёт постоянный поиск всё новых и новых ферментов, используемых в качестве маркеров. Всё возрастающее влияние на ИФА оказывают химия высокомолекулярных соединений, клеточная и генная инженерия, под влиянием которых меняются технологии получения реагентов для ИФА. Так, если до внедрения генно-инженерных методов приходилось выделять антитела из биологических сред (а хорошая очистка требует существенных затрат и времени, и реагентов, и ресурса оборудования), то в настоящее время есть возможность использовать клетки насекомого (сверчка, цикады, таракана) или *E. coli* для производства требуемого рекомбинантного белка, который при сохранении требуемых биологических свойств вдобавок получается сравнительно чистым, так что его значительно проще выделить из смеси и сохранить в стабилизирующем растворе.

## Список литературы

1. А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. Теория и практика иммуноферментного анализа. — М.: Издательство "Высшая школа", 2005. — С. 3—42
2. Иммунохимический анализ в лабораторной медицине / В. В. Долгов. — М.-Тверь: ООО "Издательство "Триада"", 2015. — С. 34—38.
3. В. С. Морозова, О. А. Габрильянц, М. А. Мягкова. Диагностика и профилактика заболеваний зависимости. — М.: Издательство "Академия Естествознания", 2015г.