



Основы проведения иммуноферментного анализа

*Проведено в рамках выполнения научных
исследований Министерства науки
и высшего образования РФ
по теме № 0445-2021-0011*

22 июня 2022 ВНИИГРЖ



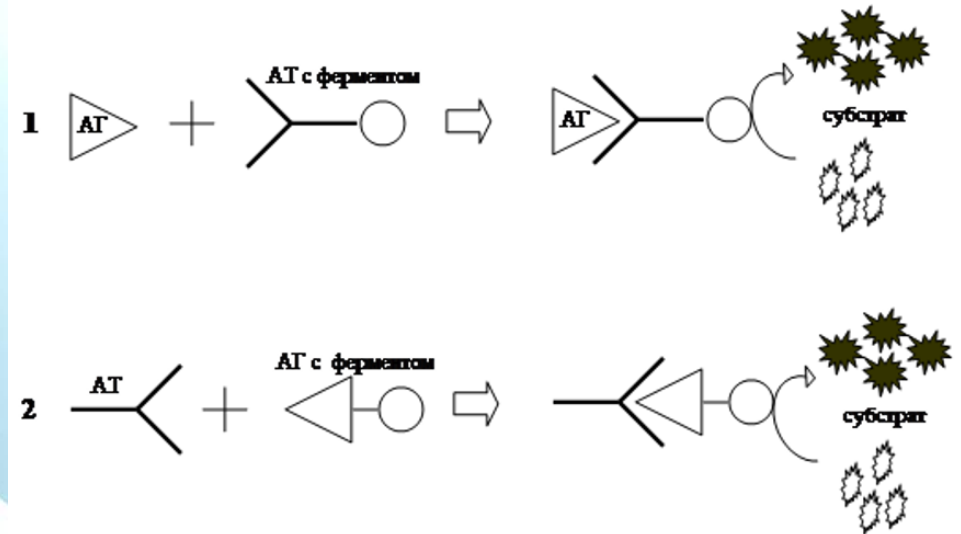
ИФА

(сокращённо **ИФА**, англ. *enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*) — лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных 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. В настоящее время является одним из основных методов лабораторной диагностики.



Основной принцип ИФА

- 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
- Открытие возможности иммобилизации антигена и антитела на различных носителях с сохранением их связывающей активности позволило расширить использование ИФА в различных областях биологии и медицины.
- Появление моноклональных антител послужило дальнейшему развитию ИФА, что позволило повысить его чувствительность, специфичность и воспроизводимость результатов.



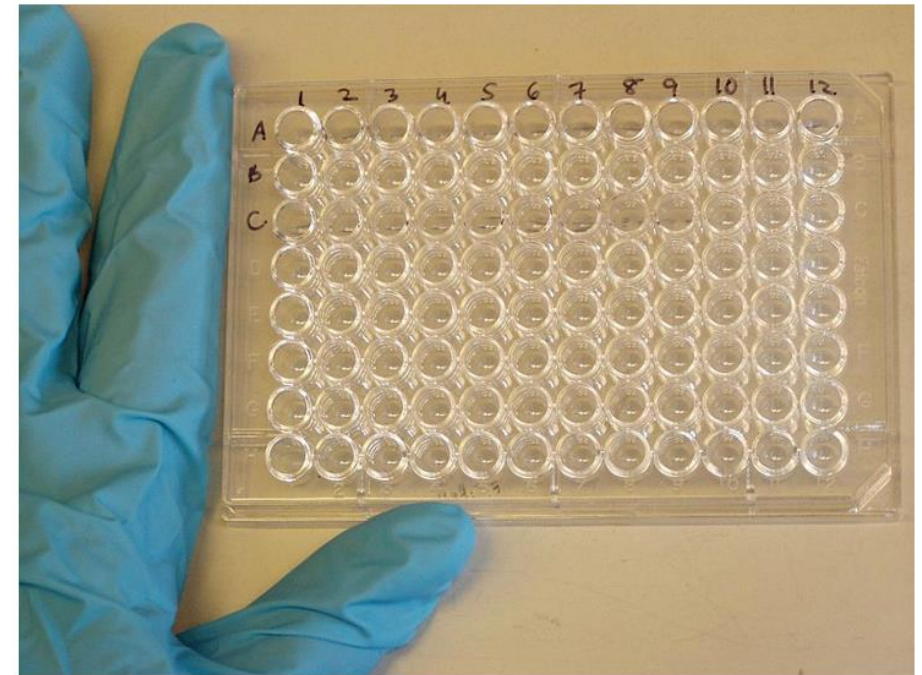
- 1) Для выявления антигенов.
- 2) Для выявления антител.



Основной принцип ИФА

Любой вариант ИФА содержит 3 обязательные стадии:

1. стадия узнавания тестируемого соединения специфическим к нему антителом, что ведет к образованию иммунного комплекса;
2. стадия формирования связи конъюгата с иммунным комплексом или со свободными местами связывания;
3. стадия превращения ферментной метки в регистрируемый сигнал.





Основной принцип ИФА

Из-за разнообразия объектов исследования — от низкомолекулярных соединений до вирусов и бактерий, и многообразия условий проведения ИФА существует большое количество вариантов этого метода.

Возможна *классификация по типу иммунохимического взаимодействия* на первой стадии анализа (в которой происходит связывание определяемого вещества):

- Если в системе присутствуют только анализируемое соединение и соответствующие ему центры связывания (антиген и специфические антитела), то метод является *неконкурентным*.
- Если же на первой стадии в системе одновременно присутствует анализируемое соединение и его аналог (меченное ферментом анализируемое соединение или анализируемое соединение, иммобилизованное на твердой фазе), конкурирующие за ограниченное количество центров специфического связывания, то метод является *конкурентным*.



Основной принцип ИФА

Примером неконкурентного формата ИФА является «сэндвич»-метод. 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. 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.

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.

«Сэндвич»-метод может быть использован для анализа только тех антигенов, на поверхности которых существуют, по крайней мере, две 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.



Основной принцип ИФА

Среди конкурентных схем твердофазного ИФА существует два основных формата:

- *Прямой конкурентный* формат ИФА использует иммобилизованные на твердой фазе специфические антитела, а меченый ферментом и немеченый антиген конкурируют за связь с иммобилизованным антителом.
К иммобилизованным антителам добавляют раствор, содержащий определяемое вещество и фиксированную концентрацию меченого антигена, инкубируют и после отмытки носителя от несвязавшихся компонентов регистрируют ферментативную активность образовавшихся на твердой фазе специфических иммунных комплексов. Величина детектируемого сигнала 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.



Основной принцип ИФА

В *непрямом конкурентном* формате ИФА используются меченные ферментом антитела (специфические или вторичные) и иммобилизованный на твердой фазе конъюгат антиген-белок-носитель. Непрямая схема с использованием меченых антивидовых антител является одной из наиболее распространенных схем ИФА. На поверхности носителя иммобилизуют конъюгат антиген-белок, к которому добавляют раствор, содержащий определяемый антиген и фиксированную концентрацию немеченых специфических антител, инкубируют и после удаления несвязавшихся компонентов добавляют фиксированную концентрацию меченых антивидовых антител. После инкубации и отмывки носителя детектируют ферментативную активность образовавшихся на твердой фазе специфических иммунных комплексов, причем величина сигнала находится в обратно-пропорциональной зависимости от концентрации определяемого антигена.

Применение универсального реагента — меченых антивидовых антител — 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.



gs-2027@yandex.ru

Спасибо за внимание!

Проведено в рамках выполнения научных исследований Министерства науки и высшего образования РФ по теме № 0445-2021-0011