

КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии

А.А. АХУНЗЯНОВ
Э.М. БИКТАГИРОВА
Р.Г. КИЯМОВА

Иммуноферментный анализ:
применение в клинической диагностике
Учебно-методическое пособие



КАЗАНЬ
2021

УДК 57.083.3
ББК 28.072
X15

Печатается по рекомендации учебно-методической комиссии

Института фундаментальной медицины и биологии КФУ

(протокол №2 от 20 января 2021 г.)

Рецензенты:

К.х.н., с.н.с. НИЛ OpenLab «Генные клеточные технологии» НКЦ
ПРМ ИФМБ КФУ Р.Ф. Хайруллин;

К.м.н., ассистент поликлинической терапии и общей врачебной практики ФГБОУ ВО Казанский ГМУ МЗ России С.Р. Абдулхаков

Ахузянов А.А.

X15 Иммуноферментный анализ: применение в клинической диагностке.: учеб. пособие / А.А. Ахузянов, Э.М. Биктагирова, Р.Г. Киямова. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2021. – 25с.

Учебное пособие составлено в соответствии с современной структурой изучения учебных биологических дисциплин и является дополнением к практическому курсу «Большой практикум» бакалавров. В учебном пособии подробно рассмотрены основные принципы метода иммуноферментного анализа и протокол проведения твердофазного непрямого неконкурентного ИФА. Учебно-методическое пособие предназначено для студентов вузов, аспирантов и преподавателей.

УДК 57.083.3
ББК 28.072

© Ахузянов А.А., Биктагирова Э.М., Киямова Р.Г., 2021
© Издательство Казанского университета, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

Список определений.....	4
Введение	5
Принцип метода	6
Методика проведения анализа	13
Практическая работа	16
Оборудование и расходные материалы.....	16
Подготовка планшетов с иммунносорбентом	18
Измерение оптической плотности	20
Учет результатов.....	23
Вопросы для самоконтроля	26
ЛИТЕРАТУРА.....	27

Список определений

Антиген — любая молекула, специфично связывающаяся с антителом. Чаще всего антигенами выступают белки и полисахариды.

Антитела — компоненты плазмы крови белковой природы, вырабатываются в ответ на антигены для нейтрализации патогенов и чужеродных элементов.

Иммуносорбент — твердофазный носитель с иммобилизованными на нем антигенами или антителами.

Конъюгат — искусственная молекула, в которой состоящая из химически соединенных ферментной метки и антитела либо антигена.

Проявитель — смесь ферментного субстрата с хромогеном, используемая для обнаружения иммуноферментной реакции.

Субстрат — соединение, на которое направлено действие фермента, в результате взаимодействия фермента с субстратом происходит окрашивание реакционной смеси под действием хромогена.

Хромоген — бесцветное вещество, способное образовывать окрашенное соединение в результате взаимодействия с продуктом ферментативной реакции.

Введение

Иммуноферментный анализ (ИФА, от англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) — это лабораторный иммунологический метод, который основан на определении комплекса «антиген-антитело» за счет введения в один из компонентов реакции ферментативной метки с последующей ее детекцией с помощью соответствующего субстрата, изменяющего свою окраску. Данный метод дает возможность качественно или количественно определить различные низкомолекулярные соединения, макромолекулы, вирусы и т.п. [1]. Основой любого варианта ИФА является определение продуктов ферментативных реакций при исследовании тестируемых образцов в сравнении с отрицательными и положительными образцами

В зависимости от вида исследуемого объекта (низкомолекулярные соединения, пептидные и стероидные гормоны, фармакологические препараты, пестициды, вирусы, бактерии), а также многообразия принципов связывания и условий проведения ИФА различают несколько десятков модификаций ИФА.

Одним из принципов классификации методов ИФА является их разделение по типу проводимых на каждой из иммунохимических стадий реакций. В соответствии с этим все методы можно разделить на две группы — гомогенные и гетерогенные. Если в ходе выполнения анализа все реакции, включая ферментативную стадию, протекают в растворе, то метод является гомогенным. Гетерогенный ИФА объединяет методы, при которых анализ проводится в двухфазной системе, при этом разделение на фазы может происходить на любой стадии определения.

В клинической практике наиболее широко используется гетерогенный, или, так называемый, твердофазный, вариант проведения ИФА. Использование твердой фазы упрощает процесс разделения компонентов реакции за счет иммобилизации одного из компонентов на твердой фазе и удаления субстанций, которые не участвуют в реакции. Твердофазный ИФА основан на двух принципах:

1. Способность ферментов и антител, ковалентно или нековалентно связанных с твердой основой, сохранять свою функциональную активность, то есть расщеплять субстрат (ферменты) и связывать антигены/антитела;
2. Создание комплекса антитело-фермент в виде конъюгата, который сохраняет свою биологическую активность в растворе. Конъюгаты характеризуются высокой специфичностью и чувствительностью, достигающей 97- 99% [1].

Принцип метода

В настоящее время существуют различные варианты проведения метода ИФА и в литературе нет четкой классификации разнообразия данного метода.

На основе структуры иммуносорбента можно выделить следующие виды ИФА:

1. Прямой ИФА;
2. Непрямой ИФА;
3. «Сэндвич» ИФА [2].

При **прямом ИФА** во время инкубации биологический образец, содержащий целевой АГ переносится в лунки микропланшета, во время инкубации различные молекулы биообразца, в том числе и целевой АГ закрепляется на поверхности лунок. После отмывки несвязавшихся молекул АГ детектируется количественно с помощью меченых ферментами антител АТ к искомому АГ.

При **непрямом ИФА** на поверхности лунок микропланшета закрепляются молекулы АГ (чаще всего очищенные, но иногда применяют и лизаты клеток). Биообразец, содержащий антитела к целевому АГ (сыворотка, плазма крови) добавляется в лунки микропланшета и если в нем присутствуют специфические антитела к АГ, они образуют иммунный комплекс. Этот иммунный комплекс АГ-АТ выявляется с помощью конъюгатов антивидовых антител с ферментативной меткой.

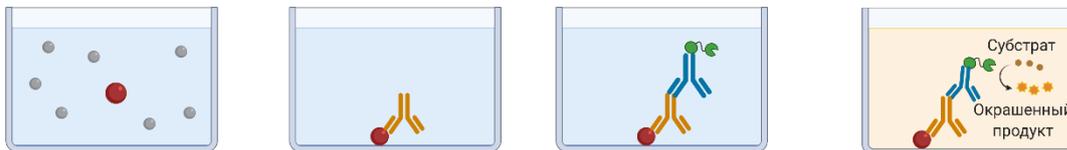
При «сэндвич» ИФА на поверхности лунок микропланшета закрепляются специфические антитела к выявляемому АГ. Эти антитела связывают АГ из биообразца, образуя иммобилизованный иммунный комплекс. Детектирование АГ осуществляется также с помощью антител к АГ, но меченых ферментативной меткой (рис. 1).

Прямой ИФА



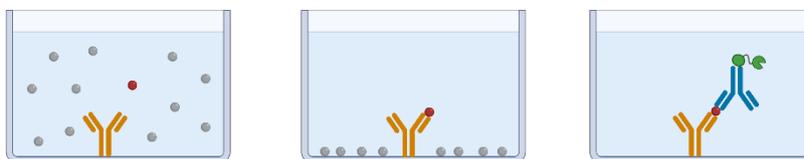
- ① Биообразец с антигеном добавляется в чистые лунки
- ② Меченое ферментом антитело связывается с антигеном
- ③ Добавляется субстрат и происходит детекция

Непрямой ИФА

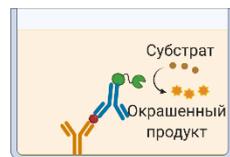


- ① Очищенный антиген иммобилизуется в лунках
- ② Антитела из биообразца связываются с антигеном
- ③ Меченое антитело связывается с антителом
- ④ Добавляется субстрат и происходит визуализация

"Сэндвич" ИФА



- ① Антитело иммобилизуется в лунках
- ② Антитело связывает антиген
- ③ Меченое антитело связывается с антигеном



- ⑤ Добавляется субстрат и происходит визуализация

Рис. 1 Схемы проведения ИФА

По типу иммунохимического взаимодействия на первой стадии анализа (при которой происходит связывание АГ с антителом АТ) различают неконкурентный и конкурентный виды ИФА. АТ определенного вида реагируют с АГ, прикрепленным к твердой фазе. Любые связанные АТ обнаруживаются путем добавления антивидовой антисыворотки, меченной ферментом. Это широко используется в диагностике.

Неконкурентный метод характеризуется присутствием в системе анализируемого соединения и соответствующего ему центров связывания (АГ и специфических АТ).

При **неконкурентном** методе на первой стадии в системе одновременно присутствует анализируемое соединение и его аналог, меченый ферментом, конкурирующие за ограниченное количество центров специфического связывания [3]. При повышении концентрации антигена в образце меньшее количество меченых аналогов будет связываться со специфическими антителами (рис. 2).

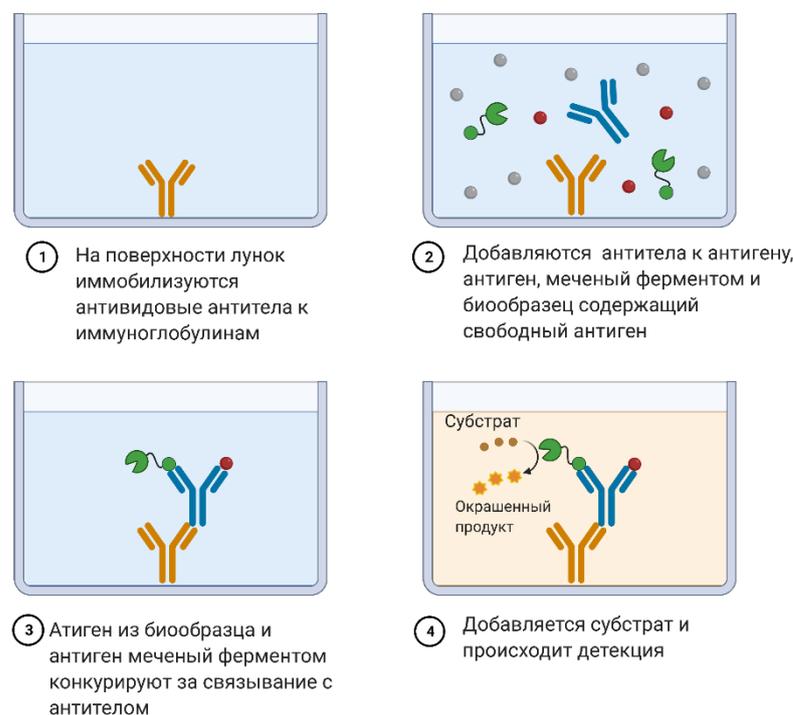


Рис. 2. Неконкурентный ИФА

Конкурентный тип часто используется для определения АГ с одним центром связывания (например гормоны) [3].

Таким образом, возможны различные варианты сочетания прямого, непрямого, «сэндвич» ИФА с конкурентным и неконкурентным методом проведения реакции.

При **прямом конкурентном** формате ИФА используются иммобилизованные на твердой фазе специфические антигены, а меченные ферментом и немеченые антитела конкурируют за связь с иммобилизованным антигеном. После инкубирования образуются иммунные комплексы двух видов: содержащие ферментную метку (меченые) и без неё (немеченые). Чем больше определяемых (немеченых) антител содержит исследуемый образец, тем больше конкуренция с мечеными антителами и, следовательно, образуется меньше меченых иммунных комплексов. Далее, после отмывки носителя от несвязавшихся компонентов, добавляют субстрато-хромогенный реагент и регистрируют ферментативную активность образовавшихся на твердой фазе специфических иммунных комплексов.

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.

В **непрямом конкурентном** формате ИФА используются меченные ферментом антивидовые АТ (специфические или вторичные) и иммобилизованный на твердой фазе конъюгат антиген-белок-носитель. На поверхности носителя иммобилизуют конъюгат антиген-белок, к которому добавляют раствор, содержащий определяемый АГ и фиксированную концентрацию намеченных специфических антител, инкубируют. После удаления не связавшихся компонентов добавляют фиксированную концентрацию меченых вторичных антивидовых антител. После инкубации и отмывки носителя детектируют ферментативную активность образовавшихся на твердой фазе специфических иммунных комплексов. Величина детектируемого сигнала также, как

и при использовании прямого конкурентного метода, находится в обратно-пропорциональной зависимости от концентрации определяемого антигена. Применение универсального реагента — меченых антивидовых АТ — даёт возможность выявлять АТ к разным антигенам. Кроме того, анализируемый образец и меченый реагент вводятся в систему на разных стадиях, что устраняет влияние различных эффектов, содержащихся в образце, на каталитические свойства ферментной метки. Однако такая схема анализа усложняет его проведение из-за введения дополнительных стадий. Данный метод применяется для качественного и количественного выявления, например, опиатов (морфин, героин), каннабиноидов (марихуана, гашиш), амфетаминов и метамфетаминов, барбитуратов.

В данном пособии будет рассмотрен протокол метода твердофазного **непрямого неконкурентного ИФА**. Схема данного метода представлена на рисунке 3.

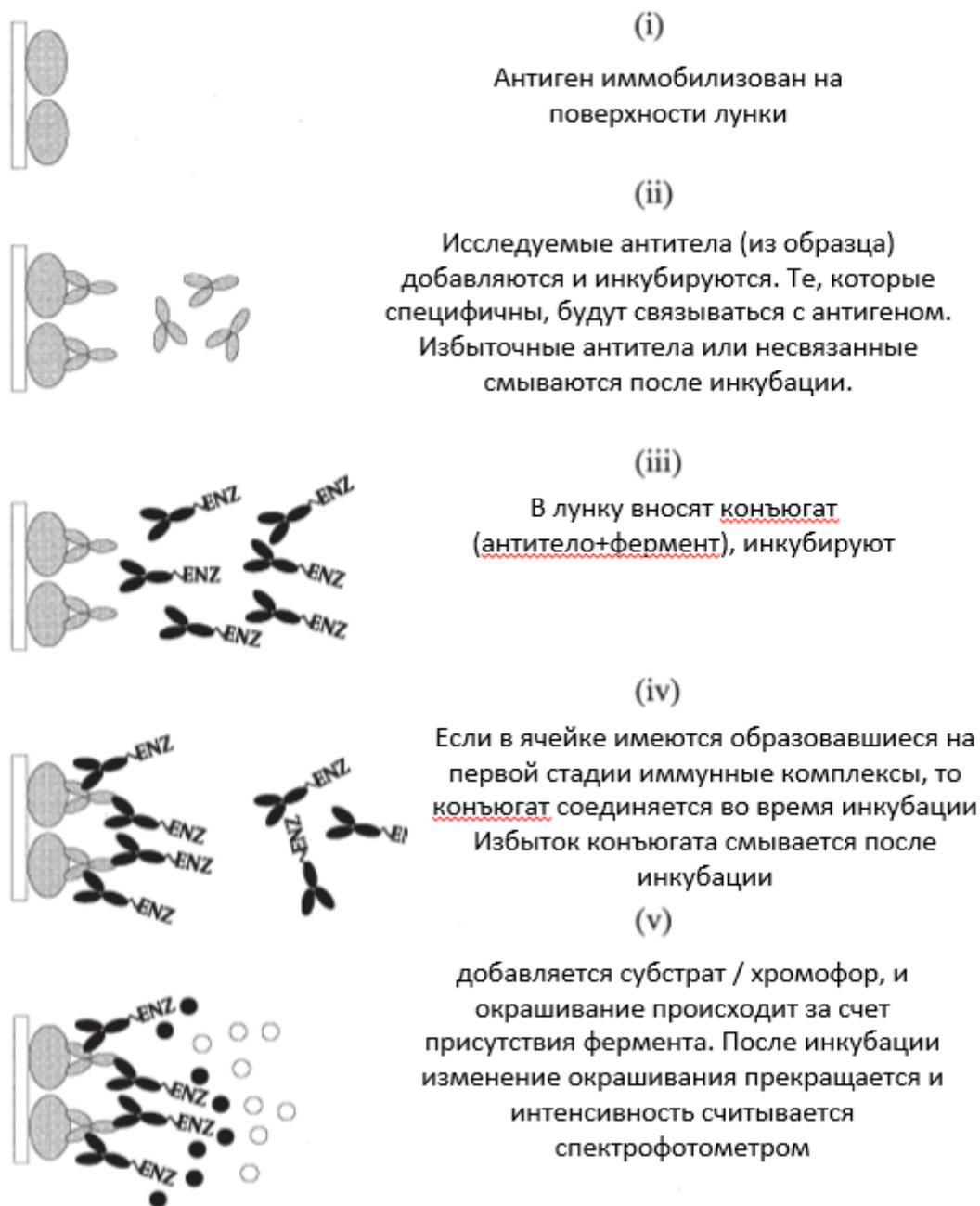


Рис. 3. Схема непрямого неконкурентного ИФА.

При **непрямом неконкурентном ИФА** на поверхность лунок, где предварительно сорбирован АГ, вносятся АТ. Во время инкубации происходит связывание этих двух компонентов, несвязавшиеся АТ удаляются. Далее вносят конъюгат (АТ, соединенные с ферментной меткой, например, пероксидазой хрена). 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 [2,6].

Иммуносорбент для ИФА

Иммуносорбент – это твердая носитель (твердая фаза) с иммобилизованными на ней антигенами либо антителами. Носитель должен прочно связывать сорбированные соединения, быть удобным для автоматизированного анализа, обладать достаточной сорбционной емкостью, при этом для воспроизводимости результатов она должна быть однородной на всей поверхности носителя [4].

В качестве твердофазного носителя для проведения ИФА чаще всего используют планшеты с плоским дном, так как они позволяют проводить одновременно множество реакций образования иммунного комплекса при минимальном расходе реагентов с и последующей детекцией. Планшет может быть изготовлен из прозрачного материала для колориметрической детекции либо быть матовым для флуориметрической, хемилюминесцентной детекции. Благодаря использованию разборных стрипованных планшетов можно оптимизировать рабочий процесс и расход материалов при анализе небольшого количества образцов. В отличие от монолитных в стрипованных планшетах ряды разделены по 8/16 лунок. В зависимости от природы молекулы белка и выбора материала иммобилизация происходит благодаря гидрофильному, гидрофобному либо ковалентному взаимодействию. Чаще всего в качестве материала для планшетов используют полистирол, благодаря оптической прозрачности при длинах волн поглощения широко используемых хромогенов, высокой сорбционной емкости, доступности материала.

Связывание с носителем может достигаться за счет пассивной сорбции благодаря водородным, гидрофобным, донорно-акцепторным связям. При связывании методом пассивной сорбции в лунки планшета вносят раствор иммунореагентов и инкубируют в течение определенного времени. Излишки несвязавшихся антител либо антигена

удаляют на этапе отмывок. Для предотвращения неспецифического связывания во время анализа планшеты обрабатывают блокирующими агентами. Связывание иммунореагента с носителем зависит от множества факторов, в том числе от нанесенной концентрации, сорбционной способности белков, а также от сорбционной емкости самого носителя. Обычно концентрация иммунореагента, используемая для иммобилизации составляет от 1-10 мкг/мл [5]. Для разведения антигена либо антител чаще всего применяют 0,05 М карбонат-бикарбонатный буфер с рН 9,6. Сорбционная способность молекулы зависит от природы вещества и её пространственной структуры, ионной силы и рН буфера. Сорбционная емкость носителя — от физико-химических свойств использованных материалов, технологии производства носителя, температуры инкубации. Так, например, за определенное время полистироловая поверхность носителя связывает в 2 раза больше иммунореагента при температуре 37 °С, чем при 4 °С. Сорбционная емкость носителя может достигать 650 нг/см² белка. Для воспроизводимости результатов критически важно, чтобы не было различий в сорбционной емкости, как между лунками одного планшета, так и между планшетами одного типа из одной партии.

Специфичность и чувствительность тест-системы для иммуноферментного анализа зависит от использованных антигенов. Чаще всего в качестве антигенов применяют рекомбинантные белки и синтетические полипептиды, лизаты очищенных микроорганизмов. Использование рекомбинантных и синтетических антигенов позволяет добиться большей специфичности. Для создания тест-системы на основе рекомбинантных белков выбирают антигены инфекционных агентов, обладающие высокой иммуногенностью. При этом крайне важно, чтобы не было перекрестной реакции с другими антителами.

Методика проведения анализа

В клинической диагностике для выявления специфических антител либо антигенов в качестве анализируемых образцов используются различные биологические жидкости: плазму/сыворотку крови, слюну,

молоко, мочу, спинномозговую жидкость. Для проведения анализа биологические образцы разводят в буферном растворе, обеспечивающий оптимальный рН и ионную силу для образования иммунного комплекса, а также включающий в себе добавки для предотвращения неспецифической сорбции компонентов биообразца.

В случае прямого иммуноферментного анализа детекция осуществляется благодаря ферментативной активности метки, конъюгированной с антителом или аналогом определяемого антигена. В широко применяемом в клинической лабораторной диагностике для выявления антител к возбудителям инфекционных заболеваний непрямом ИФА применяются конъюгаты антивидовых антител с ферментными метками. В качестве меток чаще всего применяют пероксидазу хрена и щелочную фосфатазу. Данные ферменты способны сохранять ферментативную активность в составе конъюгатов с антителами либо антигенами, обладают высокой каталитической активностью и стабильны при длительном хранении. Перед применением в иммуноферментном анализе крайне важно определить оптимальную концентрацию конъюгата. Слишком низкая концентрация конъюгата будет влиять на чувствительность, а при высоких концентрациях конъюгат неспецифично связывается с носителем, что приводит к повышению фонового сигнала. Оптимальное разведение конъюгата обеспечивает баланс между специфичностью и чувствительностью анализа.

В состав проявителя входит субстрат и хромоген. Субстрат позволяет детектировать наличие конъюгата с ферментом в лунке планшета и, таким образом, обеспечивает чувствительность анализа. Хромоген приводит к изменению цвета содержимого лунок в результате взаимодействия между ферментом и субстратом при положительном результате. При этом образующийся окрашенный продукт должен быть растворимым и иметь высокий молярный коэффициент экстинкции. Данная величина характеризует способность молекулы поглощать свет при определенной длине волны. Чаще всего для иммуноферментного анализа в качестве фермента и субстрата используют пероксидазу

хрена и перекись водорода. Для регистрации сигнала можно применять фотометрические, хемилюминесцентные и флюорометрические методы детекции. Для колориметрической детекции в качестве хромогена применяют тетраметилбензидин (ТМБ) и ортофенилендиамин (ОФД) [5].

Под действием пероксидазы высвобождается атомарный кислород, в результате воздействия атомарного кислорода из хромогена образуется окрашенный продукт. Далее для учета результатов иммуноферментного анализа используют инструментальные методы регистрации сигнала. На планшетном ридере (спектрофотометре) измеряют величину оптической плотности при определенной длине волны. Чем выше концентрация исследуемой молекулы в образце, тем больше комплексов с конъюгатом будет образовываться в лунке, тем выше будет ферментативная активность и, соответственно, интенсивность окрашивания.

Метод ИФА можно использовать не только для качественного, но и для количественного анализа. Для этого используют эталонные стандартные образцы (рекомбинантные антигены) и строят калибровочную кривую.

Практическая работа

Оборудование и расходные материалы

Для проведения иммуноферментного анализа необходимо следующее оборудование и расходные материалы:

- 1) Центрифуга;
- 2) Набор автоматических одноканальных лабораторных микродозаторов, рассчитанных на работу с диапазоном объемов: 2-20, 20-200, 100-1000 мкл со сменными наконечниками;
- 3) Автоматические восьмиканальные лабораторные микродозаторы, рассчитанные на работу с диапазоном объемов: 30-300 мкл;
- 4) Мерный цилиндр;
- 5) Мерная колба;
- 6) Коническая колба;
- 7) Ванночки для многоканальных дозаторов;
- 8) Планшеты для иммуноферментного анализа;
- 9) Термошейкер для планшетов, позволяющий поддерживать температуру 37°C;
- 10) Дистиллятор лабораторный;
- 11) Планшетный ридер (спектрофотометр) многоканальный, позволяющий проводить измерения при 450 нм.

Рабочие растворы

Буфер для иммобилизации антигена

Для приготовления карбонат-бикарбонатного буферного раствора (50 мМ натрий карбонатно-бикарбонатный буфер, рН 9,6) смешайте компоненты согласно таблице 1.

Таблица 1

Состав карбонат-бикарбонатного буферного раствора (рН 9,6)

№	Компонент	Масса
1	Карбонат натрия безводный (Na_2CO_3)	1,59 г
2	Гидрокарбонат натрия (NaHCO_3)	2,93 г
3	Дистиллированная вода	1000 г

Отмывочный буфер для ИФА

Для приготовления отмывочного буферного раствора для иммуноферментного анализа (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na_2HPO_4 , 1,8 мМ KH_2PO_4 , 0,1% твин-20; рН 9,0) смешайте компоненты согласно таблице 2.

Таблица 2

Состав отмывочного буферного раствора (рН 9,0)

№	Компонент	Масса
1	Хлорид натрия (NaCl)	8,00 г
2	Хлорид калия (KCl)	0,20 г
3	Гидрофосфат натрия (Na_2HPO_4)	1,44 г
4	Дигидроортофосфат калия (KH_2PO_4)	0,24 г
5	Твин-20	1,1 г
6	Дистиллированная вода	1000 г

Подготовка планшетов с иммунсорбентом

Перед проведением гетерогенного иммуноферментного анализа необходимо приготовить планшеты с иммунсорбентом.

Таким образом, **процедура сорбции антигена** состоит из следующих этапов:

- 1) В лунки планшета вносят от 1 – 10 мкг белка в 100 мкл 0,05 М карбонат-бикарбонатного буферного раствора с рН 9,6. Оптимальная концентрация иммунореагента подбирается экспериментальным путем. При этом используемая концентрация должна обеспечивать высокую чувствительность и специфичность анализа.
- 2) Далее планшет заклеивается пленкой для предотвращения испарения и инкубируется в течение 16 часов при температуре 4°C.
- 3) Для отмывки и удаления несвязавшихся молекул лунки планшета промывают фосфатно-солевым буфером с 0,1% твин-20.
- 4) Для блокирования неспецифического связывания антигенов либо антител в лунки планшета вносят 350 мкл фосфатно-солевого буферного раствора с 1% бычьим сывороточным альбумином. Также для блокировки можно использовать желатин, сухое молоко, казеин. Далее планшет инкубируют при комнатной температуре 2 часа.
- 5) Приготовленный иммунсорбент после тщательного удаления жидкости можно хранить при -20°C в течение продолжительного времени.

Методика проведения анализа включает следующие этапы:

- 1) Подготовка исследуемых образцов. На данном этапе в случае работы с образцами после длительного хранения выполняют разморозку, важно избегать резких перепадов температур. При работе с образцами крови необходимо избавиться от

- эритроцитов и фибрина. Для этого образцы откручивают в центрифуге при 3000 об/мин в течение 10 мин;
- 2) Образцы вносят в лунки иммуносорбента. Каждый образец анализируют в 2-3 повторностях. В случае количественной оценки исследуемые образцы титруют в серийных разведениях. Например, титрование антител можно использовать для определения титра либо оптимальной концентрации, при этом готовят серию последовательных разведений образца в лунках планшета;
 - 3) Планшет либо стрипы заклеивают пленкой. Образцы инкубируют при постоянном встряхивании на шейкере для планшетов. Температура инкубации зависит от вида анализа и используемых иммунореагентов. На данной стадии происходит образование комплексов между антигеном и антителом;
 - 4) Лунки планшета промывают 3-8 раз фосфатно-солевым буферным раствором с 0,1% твин-20 (рН 9.0) для удаления не связавшихся молекул; этапы отмывок позволяют повысить специфичность анализа;
 - 5) В случае прямого ИФА далее переходят к этапу детекции (п. 8), при непрямом ИФА в лунки вносят по 100 мкл раствора конъюгата антивидовых антител с ферментативной меткой. Чаще всего используют кроличьи или козьи моноклональные либо поликлональные антитела, конъюгированные с ферментом. Оптимальная концентрация конъюгата подбирается экспериментальным путем на основе анализа заведомо-положительных и отрицательных образцов. Значение оптической плотности в положительных образцах должно находиться в интервале от 0,6 до 1,0 оптических единиц;
 - 6) Планшет либо стрипы заклеивают пленкой. Образцы инкубируют в течение 30 мин при постоянном встряхивании на шейкере для планшетов. Температура инкубации зависит от вида анализа;

- 7) Далее лунки планшета промывают 3-8 раз фосфатно-солевым буферным раствором с 0,1% твин-20 (рН 9.0) для удаления несвязавшихся молекул конъюгата;
- 8) Для детекции в лунки вносят по 100 мкл раствора проявителя и инкубируют при постоянном перемешивании при комнатной температуре в течение 10-20 мин в зависимости от интенсивности окрашивания. На данном этапе благодаря ферментативной реакции образуется окрашенный продукт;
- 9) Для остановки ферментативной реакции во все лунки добавляют стоп-реагент. Чаще всего в качестве стоп-реагента используют 0,5 М серную кислоту. При работе с большим количеством образцов крайне важно добавлять стоп-реагент в той же последовательности, что и раствор проявителя. Измерение оптической плотности необходимо провести в течение 5-10 мин после остановки реакции.

Измерение оптической плотности

При использовании в качестве хромогена ТМБ измеряют величину оптической плотности при длине волны 450 нм, с ОФД – при длине волны 492 нм. Для достоверности измерение проводят при длине волны детекции и при референсной длине волны (650 нм). В первом измерении регистрируется оптическая плотность образовавшегося окрашенного продукта и полистирола, при референсной длине волны измеряют оптическую плотность планшета. Для анализа используют значения, получаемые в результате вычитания первого значения от второго:

$$ОП_{рез} = ОП_{450} - ОП_{650}.$$

Для регистрации результатов анализа используются многоканальные спектрофотометры (планшетные ридеры). Прежде, чем приступить к измерениям, необходимо заблаговременно включить и прогреть прибор. Для корректной оценки результатов измерение оптической плотности проводят при двух длинах волн. Достаточно часто прибор в

автоматическом режиме высчитывает разницу между полученными значениями при основной и референсной длине волны.

Далее в качестве примера представлено поэтапное описание процедуры регистрации результатов иммуноферментного анализа на микропланшетном ридере «Tecan Infinite M200 PRO» (Австрия):

- 1) Необходимо заблаговременно включить прибор для прогрева. Общий вид микропланшетного ридера представлен на Рис.4. Тумблер питания расположен на задней стенке прибора. Важно соблюдать порядок включения устройств: сначала микропланшетный ридер и только затем настольный компьютер;



Рис. 4. Общий вид микропланшетного ридера «Tecan M200 Pro»

- 2) Далее на настольном компьютере необходимо запустить программу для работы с прибором «Tecan i-control»;
- 3) После успешного подключения микропланшетного ридера к компьютеру появляется рабочее окно программы «Tecan i-control» (Рис.5);

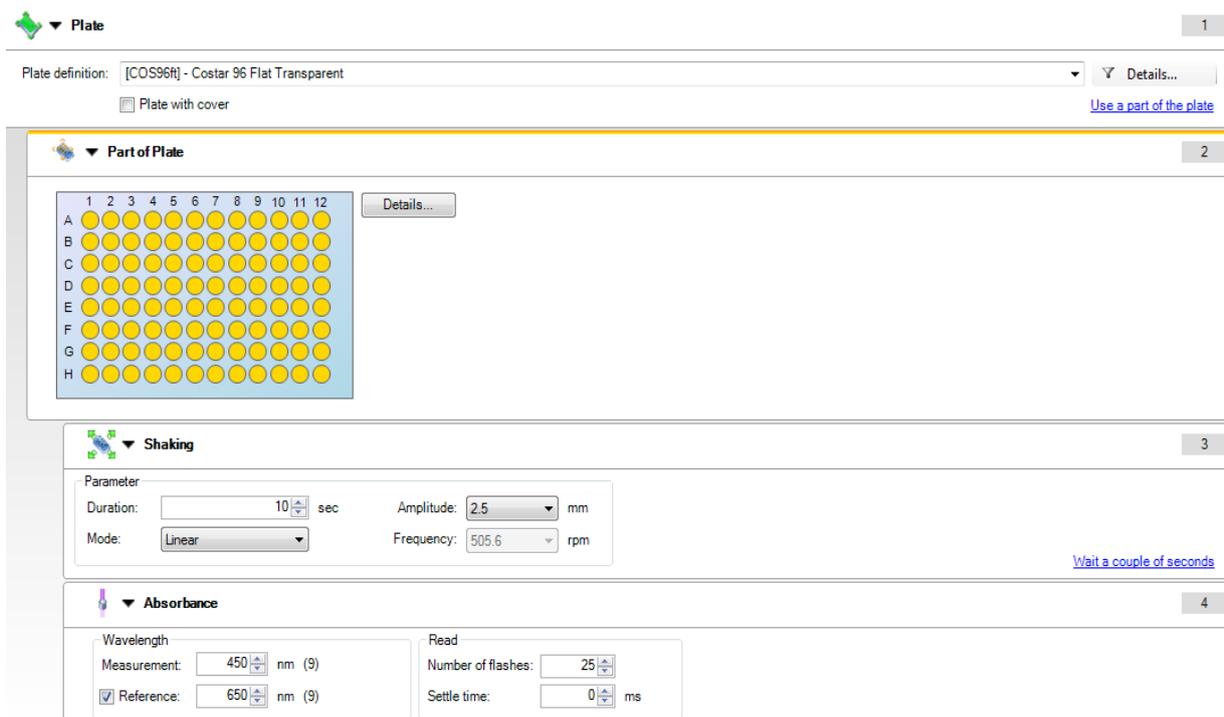


Рис. 5. Вид рабочего окна программы «Tecan i-control»

- 4) В меню быстрого доступа необходимо выбрать вкладки «Shaking» и «Absorbance»;
- 5) Во вкладке «Plate definition» (рис. 5) выбрать тип используемого носителя, так как геометрические параметры планшета могут отличаться в зависимости от производителя;
- 6) Во вкладке «Part of Plate» выбираются лунки с образцами, в которых нужно измерить величину оптической плотности; активные лунки подсвечиваются желтым цветом;
- 7) Во вкладке «Shaking» можно выбрать амплитуду, режим и временной интервал встряхивания планшетов; предварительное встряхивание необходимо для равномерного распределения окрашенного продукта в лунке;
- 8) Во вкладке «Absorbance» необходимо выбрать длину волны, при которой регистрируется оптическая плотность окрашенного продукта и референсную длину волны; при использовании для анализа тетраметилбензида измерения проводятся при 450 нм и 650 нм, а с орто-фенилендиамином при 492 нм и 650 нм, соответственно;

- 9) Перед началом измерения необходимо загрузить планшет с образцами, для этого можно нажать на элемент управления в верхней правой части устройства (Рис. 6). При нажатии из устройства выдвигается держатель для планшетов. Планшет необходимо расположить на держателе без крышки либо пленки таким образом, чтобы угол у лунки A12 примыкал к черному фиксатору в правой части держателя;



Рис. 6. Держатель для планшетов устройства «Tecan M200 Pro» в выдвинутом положении

- 10) Для начала измерения необходимо нажать иконку «Start» в верхней панели в рабочем окне программы «Tecan i-control». Выключение устройств осуществляется в обратном порядке. Для интерпретации полученных результатов необходимо произвести вычисления, подробно описанные в следующей главе.

Учет результатов

Помимо качественного анализа, метод позволяет проводить и количественную оценку. Концентрацию анализируемого антигена либо антитела указывают в титрах. Титр выражает разведение аналита, при

котором наблюдается положительный сигнал. Также можно определять концентрацию, используя очищенный иммунореагент. Для этого параллельно анализируют стандартные растворы с заранее известной концентрацией и далее строят калибровочную кривую по полученным значениям оптической плотности. Определив значение оптической плотности в исследуемом образце, можно рассчитать концентрацию антигена. Для интерпретации результатов необходимо произвести следующие расчеты:

- 1) Вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательными ($ОП_{ср. К-}$) и отдельно с положительными контрольными образцами ($ОП_{ср. К+}$);
- 2) Результаты исследования можно учитывать только при соблюдении следующих условий: среднее значение оптической плотности в лунках с К- не более 0,2, а в лунках с К+ не менее 0,5;
- 3) Далее необходимо определить пороговый уровень оптической плотности: рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в отрицательных образцах и вычислить стандартное отклонение (σ); пороговое значение превышает значение $ОП_{ср. К-}$ на 3 величины стандартного отклонения: $ОП_{порог.} = ОП_{ср. К-} + 3\sigma$;
- 4) В случае если значение оптической плотности в образце выше порогового уровня, то образец считается положительным;
- 5) Если значение оптической плотности равно значению порогового уровня, необходимо провести повторный анализ;
- 6) Если значение оптической плотности в образце ниже порогового уровня, то образец считается отрицательным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод ИФА впервые был разработан в начале 70-х гг. прошлого столетия и на сегодняшний день является активно развивающимся направлением химической энзимологии. Это обусловлено тем, что метод сочетает в себе специфичность и высокую чувствительность анализа. ИФА широко применяется в клинической диагностике, сельском хозяйстве, промышленности и научных исследованиях. В современных клинических лабораториях и станциях переливания крови ИФА является основным методом детекции специфических АТ или АГ в биологических образцах и используется для диагностики различных заболеваний. Это стало возможным благодаря простоте процедуры проведения анализа и регистрации результатов, высокой стабильности используемых реагентов. Ограничения чувствительности данного аналитического метода связаны с появлением фонового неспецифического сигнала, обусловленным природой детектирующей системы. Поэтому высокие требования предъявляются к качеству и чистоте используемых реагентов. Метод позволяет решать широкий спектр задач и исследовать различные объекты: от низкомолекулярных соединений до микроорганизмов. С учетом вышеизложенного для эффективного применения метода важно освоить теоретические основы и этапы проведения ИФА.

Таким образом, в настоящем учебно-методическом пособии подробно рассмотрены основные принципы метода иммуноферментного анализа, протоколы подготовки иммуносорбента и проведения твердофазного непрямого неконкурентного ИФА. Это будет полезно, как для тех, кто использует готовые диагностические наборы, так и для разработчиков.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Как и в каких областях применяется ИФА? Содержание каких компонентов в исследуемом образце можно определить с помощью метода ИФА?
- 2) Какие материалы используются в качестве твёрдой фазы для ИФА?
- 3) Какие преимущества у метода ИФА?
- 4) Объясните принцип непрямого неконкурентного ИФА. Каким образом производят измерение АТ к определенному АГ?
- 5) Какие факторы влияют на сорбционную способность молекулы и сорбционную емкость носителя?
- 6) Какие ферменты используются в составе конъюгата для ИФА? Почему?
- 7) Какие требования предъявляются к носителю для иммуносорбента?
- 8) Какие методы детекции применяются для регистрации сигнала?
- 9) Какие компоненты входят в состав проявителя для колориметрической детекции?
- 10) Почему при регистрации результатов анализа проводят измерение сигнала при двух длинах волн?
- 11) Как ИФА может применяться для определения концентрации антигена/антител в образце?

ЛИТЕРАТУРА

1. *Егоров А.М.* Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. // Москва: Высш. шк., 1991. – 287 с.
2. *Crowther J.R.* The ELISA guidebook / J.R. Crowther. // Methods Mol Biol - 2000. - V.149. – P. 413
3. *Шалепо К.В.* Иммуноферментный анализ (ИФА) в клинической лабораторной диагностике. Общие принципы: учебно-методическое пособие / К.В. Шалепо, Е.В. Спасибова, О.В. Будиловская, Т.А. Хуснутдинова, А.А. Крысанова, Е.В. Шипицына, С.В. Воробьев, А.М. Савичева. // – Санкт-Петербург: СПбГПМУ, 2018. – 24 с.
4. *Ванеева Л.И.* Изучение сорбционной способности полистирольных планшетов, используемых в иммуноферментном анализе / И.Ю. Гридина, О.Н. Пантелеева // ЖМЭИ- №9.- 1989.-С. 86-89.
5. *Иванская Н.В.* Практическое пособие по иммуноферментному анализу / Н.В. Иванская, Е.Н. Кислых, Е.В. Максименок // Киев: НАНУ- 2003. - 68 с.
6. *Жаворонок С.В.* Иммуноферментный анализ: учеб. пособие / С.В. Жаворонок, Д.В. Тапальский. // Гомель: ГомГМУ, 2004. - 28 с.