

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

Кафедра «фундаментальной медицины и биологии»

Факультет: медико-биологический

Направление подготовки: 06.03.01 «Биология»

(профиль «Биохимия»)

Отчетная работа

по результатам выполнения индивидуальных заданий

профильной учебной практики:

«Профильная учебная практика по биохимии»

на тему:

«Теоретические основы иммуноферментного анализа: принципы основных
видов ИФА, области применения в биомедицине»

*Обращение по соотв. фид-бэк;
- нет стилизации изображений
- нет нумерации страниц
Отсутств. иллюстрации и сведения
о соотв. опыте применения ИФА.
В целом, тема раскрыта.*

Хор


Выполнили:

студентки 3 курса

302 группы

Костина А.С.

Ремизова И.А.

Проверил: доцент кафедры

фундаментальной медицины и биологии

Морковин Евгений Игоревич

Волгоград, 2019

Содержание

Введение

История и принцип ИФА

Классификация ИФА

Характеристика компонентов в ИФА

Варианты постановки в ИФА

Практическое применение ИФА

Чувствительность метода ИФА

Заключение

Список литературы

Введение

Методы иммунного анализа широко вошли в медицинскую практику. Во всех областях современной медицины используется иммунный анализ, преимущественно, с диагностической и аналитической целями. Особенно важно, что они дают 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 (АГ) и антитела (АТ) с использованием различных вариантов мечения одного из компонентов (фермент, радионуклид, флуоресцентный краситель и другие). Оценка реакции проводится автоматически на специальной аппаратуре, что позволяет стандартизировать эти методы.

В зависимости от типа используемой метки и условий постановки теста иммунный анализ обозначается как иммуноферментный (ИФА), радиоиммунный (РИА), иммунофлуоресцентный и другие. При постановке реакций в один или несколько этапов они 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).

История и принцип ИФА

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 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.

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.

Теоретически ИФА основывается на данных современной иммунохимии и химической энзимологии, знании физико-химических закономерностей реакции антиген-антитело, а также на главных принципах аналитической химии. Чувствительность ИФА и время его проведения определяется несколькими основными факторами: кинетическими, термодинамическими характеристиками реакции антиген-антитело, соотношением реагентов, активностью фермента и разрешающей способностью методов его детекции. В общем виде реакция антиген-антитело может быть описана простой схемой: $[АТ]+[АГ] \leftrightarrow [АТАГ]$.

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.

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) В конкурентном ИФА на первой стадии в системе присутствуют одновременно анализируемое соединение и его аналог, меченный ферментном и конкурирующий за центры специфического связывания с ним.

Б) Для неконкурентных методов характерно присутствие в системе на первой стадии только анализируемого соединения и специфичных к нему центров связывания.

2. 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, то метод относится к группе гомогенных.

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

Для гетерогенных методов 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 иммобилизованным реагентом.

3. 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 центрами связывания. Концентрация определяемого вещества при этом будет возрастать, а регистрируемый сигнал снижаться, следовательно, в данном случае прослеживается обратная зависимость от величины регистрируемого сигнала.

Характеристика компонентов в ИФА.

Ферменты. Ферментные метки обладают чрезвычайно мощным каталитическим действием, одна молекула фермента может реагировать с большим количеством молекул субстрата. Таким образом, фермент, присутствующий в ничтожных количествах, можно выявить и количественно определить по образованию продуктов, катализируемой им реакции. Ферментные маркеры, используемые в ИФА, должны обладать следующими свойствами: высокая активность и стабильность фермента в условиях анализа; наличие чувствительных субстратов и простота метода определения продуктов или субстратов ферментативной реакции; возможность адаптации субстратных систем к дальнейшему усилению; отсутствие фермента и его ингибиторов в исследуемой биологической жидкости.

В ИФА может использоваться не менее 15 различных ферментов. Наибольшее применение, нашли пероксидаза хрена (ПХ), щелочная фосфатаза (ЩФ) и β -D-галактозидаза (табл.1). Все три стабильны и катализируют высокочувствительные реакции.

Субстраты. Выбор субстрата в первую очередь определяется используемым в качестве метки ферментом, так как реакция фермент-субстрат высоко специфична.

Основные требования к субстрату: обеспечение высокой чувствительности метода при выявлении фермента в конъюгате; образование хорошо учитываемых (например, окрашенных) продуктов реакции фермент-субстрат; субстрат должен быть безопасным, дешевым, доступным и удобным для применения.

Антигены и антитела. АГ и АТ, используемые в ИФА, должны быть высокоочищенными и высокоактивными. Кроме того, АГ должны обладать высокой антигенностью, оптимальной плотностью расположения и количеством антигенных детерминант, чужеродностью и гомогенностью.

Одним из наиболее важных реагентов в ИФА являются антитела. Чувствительность ИФА зависит от концентрации, активности и специфичности используемых антител. Используемые антитела могут быть поли- или моноклиональными, различного класса (IgG или IgM) и подкласса (IgG1, IgG2), антиаллотипическими или антиидиотипическими.

Образование конъюгата

Конъюгат – это антиген или антитело, меченные ферментной меткой. Образование конъюгата – один из важных этапов проведения ИФА.

При формировании конъюгата подбирают такой оптимальный метод введения ферментной метки, чтобы оба компонента конъюгата сохраняли свою биологическую активность: фермент - способность взаимодействовать с субстратом, а антиген или антитело - антигенность и антигенсвязывающую активность, соответственно. Наличие меченого, высокоочищенного антигена позволяет использовать конкурентные методы. В этом случае на конечном этапе можно измерять активность конъюгата, не связанного с иммобилизованными антителами, что позволяет избежать процедуры отмывки и делает анализ более удобным.

Надежный конъюгат должен обладать следующими свойствами: высоким антительным титром и высокой афинностью к антигену, чтобы его можно было использовать в большом разведении, и таким образом, уменьшить неспецифическое связывание; достаточной специфичностью в рабочем разведении; оптимальным молярным соотношением между ферментом и антителами (оптимальное соотношение составляет около 1:1); достаточной ферментативной активностью конъюгата. Это свойство определяется главным образом условиями конъюгации и соотношением молекул фермента и антител в конъюгате.

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.

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 прекращения реакции); образцы, используемые для положительного и/или отрицательного контроля; стандартный антиген (для построения калибровочной кривой); одно- и многоканальные пипетки; 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. В качестве контроля используют лунки с адсорбированным положительным контрольным образцом, в котором обязательно содержится искомым 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» – вариант ИФА для выявления антигенов.

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.

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.

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

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.

Заключение

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

Список литературы

1. Галактионов В.Г. Иммунология. Издательство Московского университета, 1998 г.
2. Кишкун А.А. Иммунологические исследования и методы диагностики инфекционных заболеваний в клинической практике. Медицинское информационное агентство, 2009 г.
3. Кондратьева И.А. Практикум по иммунологии. Учебное пособие для ВУЗов. Академия, 2004 г.
4. Ройт А., Бростофф Д., Мейл Д. Иммунология. Мир, 2000 г.
5. Соколов Е.И. Клиническая иммунология. Медицина, 1998 г.
6. Шигина Ю.В. Иммунология: Учебное пособие. Издательство РИОР, 2007 г.
7. Ярилин А.А. Основы иммунологии. Медицина, 2005 г.