

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
“ГОМЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ”
КАФЕДРА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

С.В. Жаворонок,
Д.В. Тапальский

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

*Учебное пособие для студентов
2-5 курсов*

*Утверждено Центральным учебным научно-методическим Советом
в качестве учебного пособия 19.11.2004 г., протокол №9*



Гомель 2004

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГОМЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
КАФЕДРА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

С.В. Жаворонок, Д.В. Тапальский
ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ
Учебное пособие для студентов 2-5 курсов

Гомель 2004

УДК 616-071-097+616-093/-098
ББК 53.4
Ж 13

Авторы:

С.В. Жаворонок

профессор кафедры инфекционных болезней,
ректор Гомельского государственного медицинского университета

Д.В. Тапальский

ассистент кафедры микробиологии Гомельского государственного
медицинского университета, врач-бактериолог Гомельского областного центра
гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья

Рецензенты:

А.Л. Калинин, проректор по НИР Гомельского государственного медицинского
университета

Е.Л. Красавцев, заведующий кафедрой инфекционных болезней Гомельского
государственного медицинского университета

Утверждено на заседании кафедры инфекционных болезней
Протокол № 14 от 18 мая 2004 г.

Иммуноферментный анализ: Учебное пособие / С.В. Жаворонок, Д.В.
Тапальский.- Гомель: Гомельский государственный медицинский университет,
2004. - ____ с.

В учебном пособии рассматриваются вопросы теории и практики наиболее широко применяемого в современной лабораторной диагностике иммунологического метода исследования – твердофазного иммуноферментного анализа (тИФА, ELISA) и дается руководство по работе с мультимедийной программой «Virtual Immunology Lab» (Hovard Hughes Medical Institute, USA).

Пособие написано в соответствии с программой по клинической биохимии, программой по клинической микробиологии и предназначено для студентов 2-5 курсов лечебно-профилактического, медико-диагностического и медико-профилактического факультетов.

© Hovard Hughes Medical Institute, 2001

© Коллектив авторов

© Гомельский государственный медицинский университет, 2004

Введение



Метод иммуноферментного анализа (ИФА) был предложен в начале 70-х годов тремя группами исследователей: Engvall и Perlmann в Швеции, van Weemen и Schuur в Нидерландах и Rubenstein с сотр. в США. Он основывается на двух принципиальных научных открытиях. Первое заключается в способности ферментов и антител, ковалентно или нековалентно связанных с твердой основой, сохранять свою функциональную активность, т.е. расщеплять субстрат (ферменты) и связывать антигены/антитела; второе базируется на создании комплекса антитело-фермент в виде конъюгата, сохраняющего свою биологическую активность в растворе. Конъюгаты характеризуются высочайшей специфичностью и чувствительностью, достигающей 97-99%. К началу XXI века метод ИФА прошел путь от новейшей научной разработки до рутинного метода в клинической диагностике. ИФА нашел самое широкое применение в области иммуногистохимии, иммунологии, медицины и ветеринарии. В настоящее время ИФА-диагностика является наиболее часто используемым иммунологическим методом в городских и районных больницах, поликлиниках, роддомах, учреждениях санэпиднадзора и других медучреждениях.

Этот бурный прогресс стал возможен благодаря разработке большого количества ИФА-методик определения антигенов (бактерий, вирусов, токсинов, гормонов, опухолевых маркеров, антибиотиков и других лекарственных препаратов, наркотиков и т.д.) и антител.

Огромное значение имеет также и серийное производство высококачественных компонентов для иммуноферментного анализа - антител и конъюгатов, а также комплектных тест-систем для ИФА.

Начиная со второй половины семидесятых годов начались интенсивные разработки отечественных диагностических наборов на основе иммуноферментной технологии. В восьмидесятые-девяностые годы были созданы диагностические системы для определения маркеров вирусных гепатитов А, В, С, D, Е, антител к вирусу иммунодефицита человека, а также широкий спектр³ диагностических наборов для определения вирусных, бактериальных, тканевых и

опухольассоциированных антигенов и антител к ним. Абсолютное большинство отечественных разработчиков, а в последующем и производителей иммуноферментных наборов были и остаются ориентированными на наиболее экономичную планшетную технологию иммуноферментного анализа. Параллельно разработке и расширению возможностей иммуноферментного анализа разработаны и производятся отечественные приборы для автоматической регистрации его результатов.

Широкомасштабное производство приборов для учета ИФА позволило оснастить ими практически все медицинские учреждения Республики Беларусь до районного уровня включительно и создать предпосылки для более широкого внедрения иммуноферментного анализа в диагностический процесс. В настоящее время многие институты и фирмы проводят разработку и развертывание производства широкого спектра отечественных иммуноферментных диагностических наборов.

Основы метода



Сущность ИФА заключается в специфическом взаимодействии антитела и антигена с последующим присоединением к полученному комплексу конъюгата (антивидового иммуноглобулина, меченного ферментом). Фермент вызывает разложение

хромогенного субстрата с образованием окрашенного продукта, который выявляется либо визуально, либо фотометрически. Регистрацию результатов реакции проводят на специальных фотометрах с вертикальным лучом при определенной длине волны. Результат выражают в единицах оптической плотности.

Существует множество вариантов постановки ИФА, из которых наибольшее распространение получил гетерогенный вариант иммуноферментного анализа, при котором антиген (определяемое соединение) или антитела фиксируется на твёрдой фазе (лунках полистиролового планшета). Это так называемый твердофазный иммуноферментный анализ (т-ИФА, или ELISA, enzyme linked immunoadsorbent assay, метод определения с помощью иммуносорбентов, связанных с ферментами).

Использование твердой фазы позволяет упростить процесс разделения компонентов реакции за счет иммобилизации одного из компонентов на твердой фазе и удаления субстанций, не участвующих в реакции. Основными требованиями, предъявляемыми к твердой фазе при проведении ИФА, являются устойчивость к растворам, используемым в реакции, и высокая специфическая емкость (т. е. способности сорбировать на своей поверхности антитела или антигены в количествах, необходимых для проведения реакции в сочетании с как можно меньшей неспецифической сорбцией белков из исследуемых образцов и конъюгатов). Наиболее распространенным способом иммобилизации антител или антигенов является адсорбция, процесс, при котором часть молекул за счет ионных и гидрофобных взаимодействий, а также образования водородных связей, присоединяется к поверхности твердой фазы. В качестве твердой фазы в большинстве коммерческих диагностических наборов используют полистироловые 96-ти луночные планшеты или полистироловые шарики.

Для ферментативной метки конъюгата могут быть применены разнообразные ферменты: пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, глюкозооксидаза и др. Во всех коммерческих тест-системах используется пероксидаза хрена, выбор которой определяется ее высокой удельной каталитической активностью, доступностью, стабильностью, простотой обнаружения. В качестве субстратного реагента также применяются разнообразные хромогенные вещества, продукты окисления которых регистрируются фотометрически (волновой диапазон 340-750 нм).

Широкое использование стандартной конфигурации 96-луночного планшета позволило унифицировать оборудование, необходимое для проведения иммуноферментного анализа.

Принципиальная схема твердофазного иммуноферментного анализа

I. Определение антител

На рисунке 1 схематично показана лунка полистиролового планшета, в которой последовательно выполняются все стадии иммуноферментного анализа.

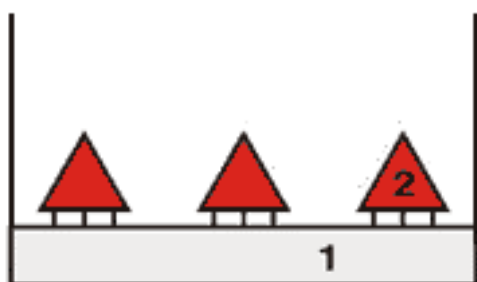


Рис.1. Специфические **антигены** (2) сорбированы на поверхности **лунок** (1) планшета.

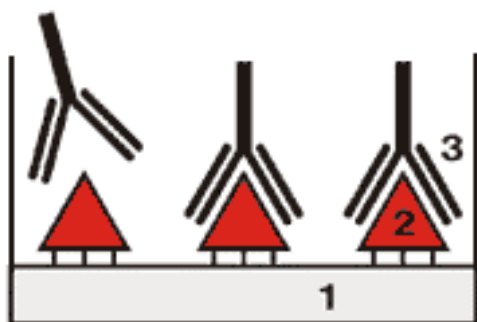


Рис.2. В лунку добавляется исследуемая сыворотка, и, если в ней есть **антитела** (3) к данным антигенам (2), то во время инкубации происходит взаимодействие, в результате которого образуется **комплекс** антиген/антитело (2/3).

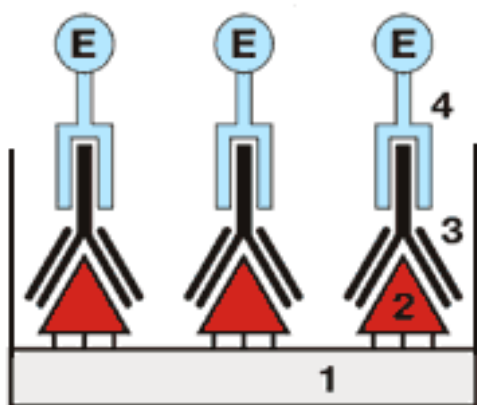


Рис.3. После отмывки лунок от не связавшихся (а значит неспецифичных) субстанций в них добавляют специфические антиглобулиновые антитела (антивидовые, т. е. антитела против человеческих иммуноглобулинов) (4). Они узнают человеческие антитела определенного типа (IgA, IgG, IgM). К этим антителам

химически пришит активный фермент (E). Такое комплексное соединение называется **конъюгат**. Во время инкубации конъюгат фиксируется на связавшихся с антигеном человеческих антителах, в результате чего в лунке образуется структура типа "сэндвич" (2\3\4).

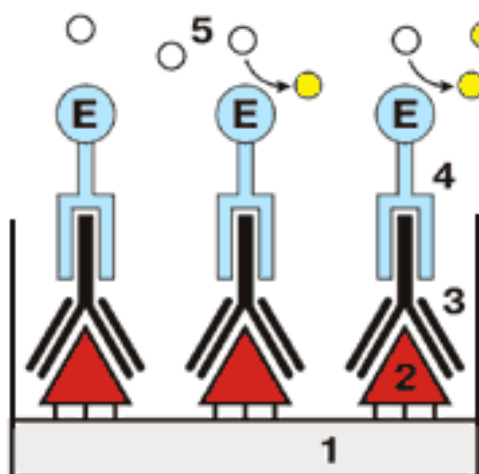


Рис.4. После отмывки не связавшегося конъюгата в лунку добавляется бесцветный **субстрат** (5), на который действует фермент (E), в результате чего субстрат превращается в **окрашенный продукт** (6).



Рис.5. Количество окрашенного продукта измеряется на фотометре при определенной длине волны.

В качестве контроля используют образцы заведомо положительные и заведомо отрицательные.

Таким образом, количество цветного продукта прямо пропорционально количеству фермента в лунке, а значит и количеству конъюгата в "сэндвиче". Количество конъюгата прямо пропорционально тому количеству комплекса антиген/антитело, которое получается на первой стадии ИФА. Следовательно, интенсивность цветной реакции на третьей стадии точно коррелирует с наличием специфических антител в анализируемой сыворотке.

II. Определение антигенов

Для обнаружения антигенов применяется другая модификация метода ИФА, которая представлена на рисунках 6-9. В этом случае на поверхности планшета (твердой фазе) сорбируются антитела к искомому агенту. Образующаяся в ходе анализа цепочка выглядит так: сорбированные антитела – антиген - известные антитела к искомому антигену, меченные ферментом (**конъюгат**). То есть, если в исследуемом образце присутствует искомый антиген, то образуется

иммунный комплекс. В ячейке присутствует фермент, который способен расщеплять вносимый туда хромоген с образованием окрашенного продукта. Это возможно только при наличии полной цепочки. Если в исследуемом образце искомый антиген отсутствует, то цепочка не образуется, и окрашивания не происходит.

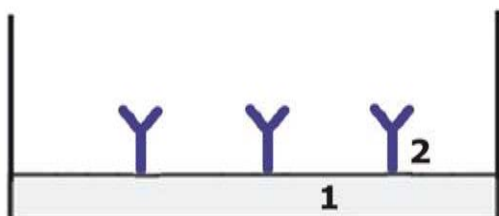


Рис.6. Специфические **антитела** (2) сорбированы на поверхности **лунок** (1) планшета.

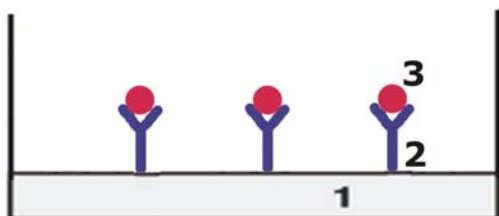


Рис.7. В лунку добавляется исследуемый материал, и, если в нем есть **антигены** (3) соответствующие данным антителам (2), то во время инкубации происходит взаимодействие, в результате которого образуется **комплекс** антиген/антитело (2/3).

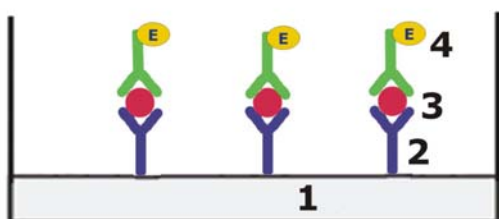


Рис.8. После отмывки лунок в них добавляют специфические для искомого антигена антитела (4), меченые ферментом (конъюгат). Во время инкубации конъюгат фиксируется на связавшихся с фиксированными антителами антигенах.

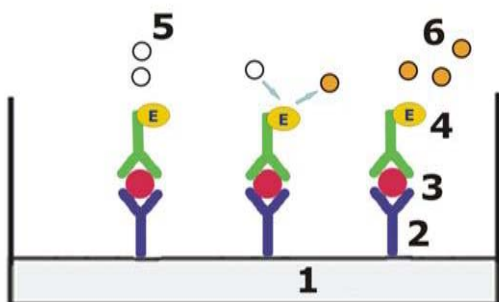


Рис.9. После отмывки не связавшегося конъюгата в лунку добавляется бесцветный **субстрат** (5), на который действует фермент (E), в результате чего субстрат превращается в **окрашенный продукт** (6).

Для проведения ИФА в планшетах необходимо следующее оборудование и расходные материалы:



- дистиллированная вода (для приготовления рабочих растворов)
- мерная химическая посуда
- одно- и многоканальные (8-ми или 12-ти) автоматические пипетки (дозаторы)

с набором наконечников

- термостат
- ридер (спектрофотометр для определения оптической плотности исследуемого раствора в лунках стандартного планшета с набором светофильтров)
- холодильник с морозильной камерой
- центрифуга для получения сыворотки из цельной крови
- коммерческие тест-системы, специально разработанные для той или иной определенной диагностики

Дополнительное оборудование, облегчающее и стандартизирующее проведение иммуноферментных анализов:

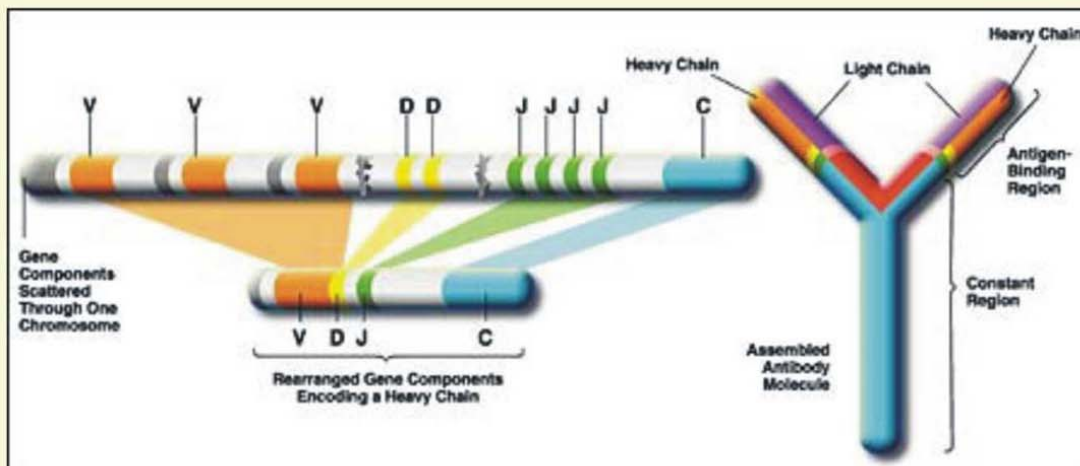
- вошер (автоматический промыватель планшетов)
- шейкер (для равномерного перемешивания реакционной смеси в лунках планшета)
- программное обеспечение для ридеров (для управления процессом измерения и обработки данных)

Время проведения анализа от 1-го до 3-х часов.

Иммуноферментный анализ по сравнению с другими методами выявления антигенов и антител обладает следующими преимуществами:



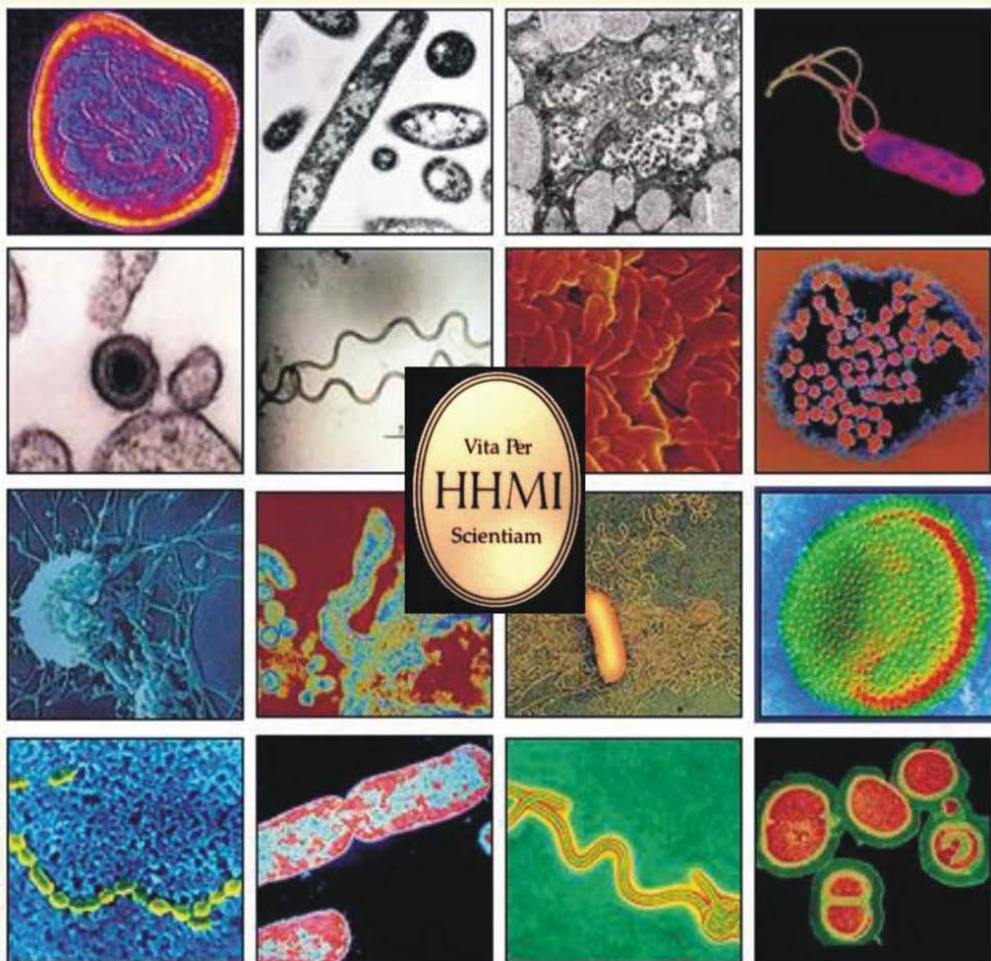
- высокой чувствительностью, позволяющей выявлять концентрации до 0,05 нг/мл. Такая чувствительность метода определяется способностью одной молекулы фермента катализировать превращение большого числа молекул субстрата
- возможностью использовать минимальные объемы исследуемого материала
- стабильностью при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА (до года и более)
- простотой проведения реакции
- наличием как инструментального (в качественном и количественном варианте), так и визуального учета
- возможностью автоматизации всех этапов реакции
- экологической чистотой и безопасностью для мед. персонала (в отличие от РИА)
- относительно низкой стоимостью диагностических наборов



Howard Hughes Medical Institute
Office of Grants and Special Programs

The Virtual Immunology Lab

Виртуальная иммунологическая лаборатория



Мультимедийная компьютерная программа «Виртуальная иммунологическая лаборатория» (Virtual Immunology Lab) из серии «Виртуальная лаборатория», разработанная в Howard Hughes Medical Institute, США, позволяет последовательно воспроизвести все этапы ИФА, начиная от подготовки образцов и заканчивая интерпретацией результатов. Каждый из этапов сопровождается необходимыми теоретическими пояснениями. По завершению исследования обучаемый должен интерпретировать полученный результат и сравнить его с эталонным. Исследование проходит в 11 этапов, каждый из которых сопровождается комментариями (на английском языке), содержащими необходимые теоретические сведения и подсказки по проводимым манипуляциям (в правом нижнем окне программы).

В настоящем учебном пособии даются сведения, необходимые для работы с программой и приводятся схемы процессов, происходящих на каждом из этапов проведения ИФА (ELISA).

Рис. 10. Окно приветствия и постановка задачи исследования. Необходимо исследовать по 10 мл крови пациентов с иммунопатологическими состояниями на наличие антинуклеарного фактора (anti-DNA) – маркера системной красной волчанки.

Рис. 11. Оборудование, расходные материалы и реактивы, необходимые для проведения исследования

1. Перчатки
2. Антинуклеарные антитела (anti-DNA) – позитивный контроль
3. Конъюгат (кроличьи античеловеческие иммуноглобулины, меченные ферментом)
4. Хромоген
5. Центрифуга
6. Планшет
7. Микропипетка
8. Пипетка для больших объемов
9. Термостат
10. Таймер
11. Буферный раствор
12. Штатив с образцами крови

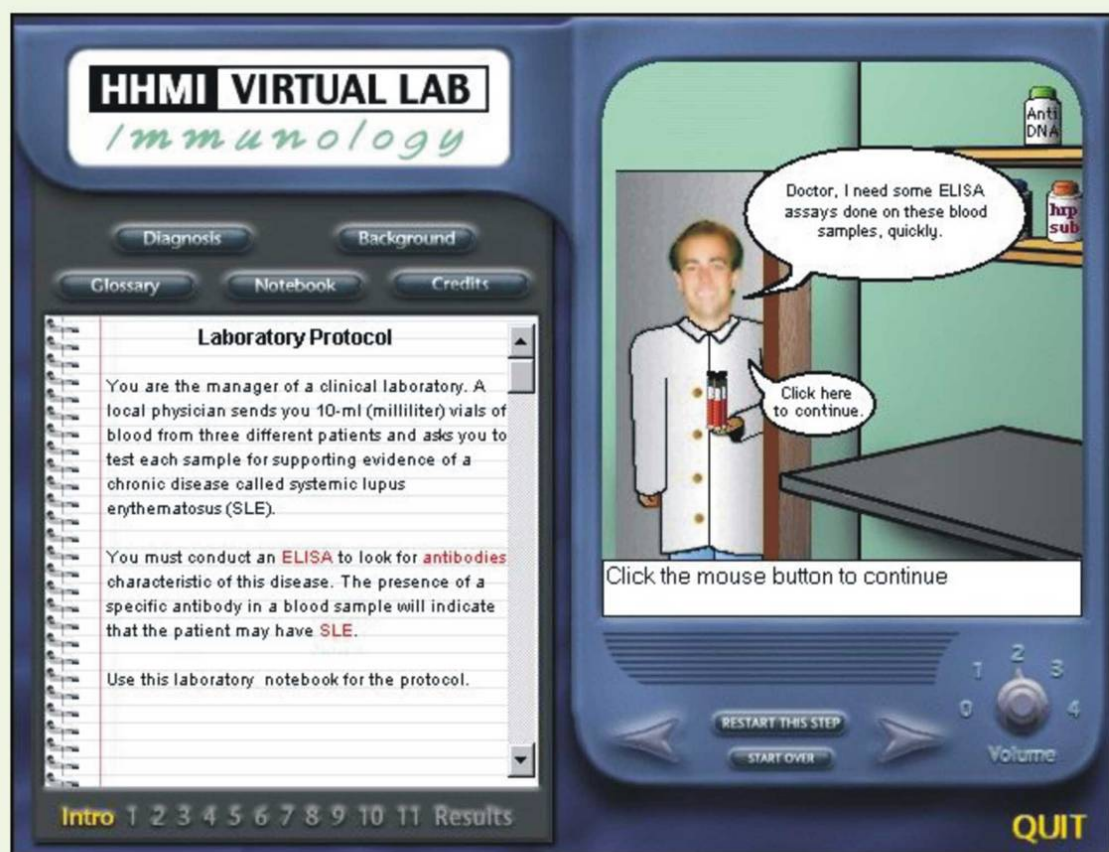


Рис. 10

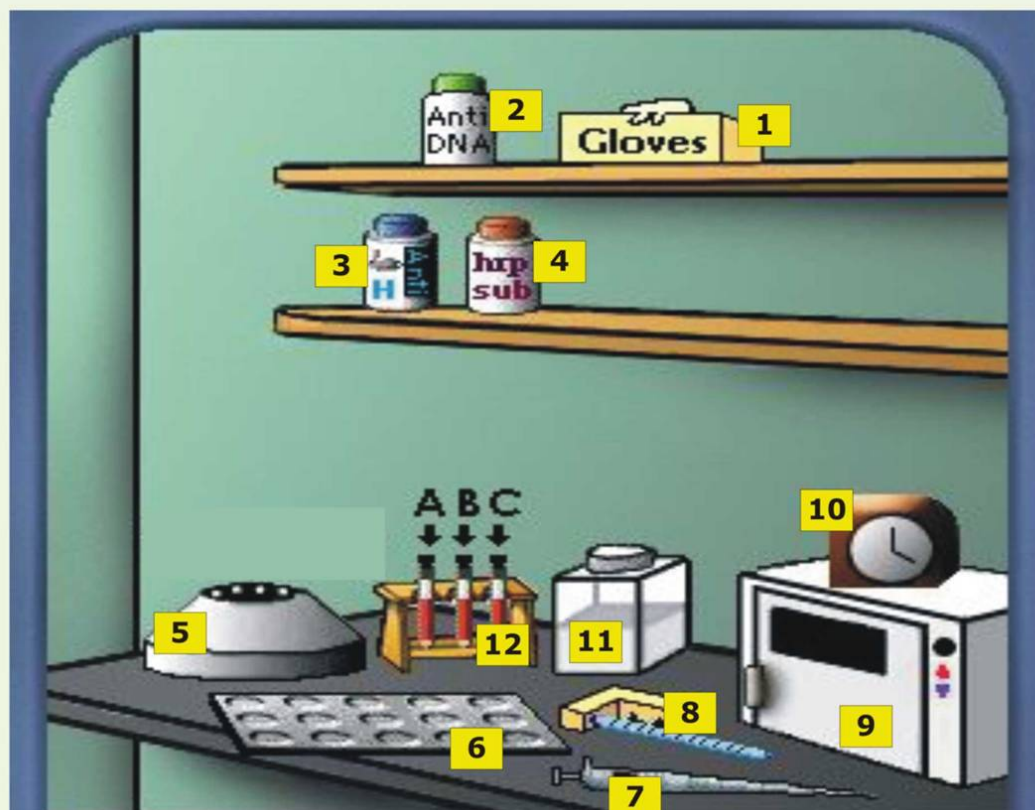


Рис. 11

Рис. 12. Получение сыворотки из образцов крови. Необходимо поместит пробирки в центрифугу.

Рис. 13, 14. Приготовление разведений 1:2, 1:10 и 1:100 из сыворотки А. Необходимые объемы набираются макро- и микропипеткой и вносятся в колбы. Для разведения сыворотки используется буферный раствор. После приготовления разведений нужно перемешать жидкость в каждой из колб.

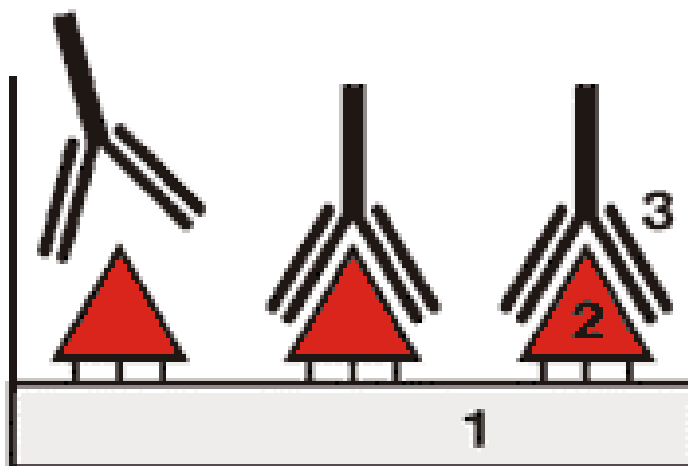
Рис.15-16. По 0,1 мл жидкости из каждой колбы вносится с помощью микропипетки в первый ряд лунок планшета.

Рис.17. Приготовление разведений из сывороток В и С и внесение по 0,1 мл жидкости (микропипеткой) из каждого разведения во второй и третий ряды лунок планшета.

Рис.18. Подготовка позитивного контроля – внесение по 0,1 мл анти-ДНК-антител в четвертый ряд лунок планшета.

Рис.19. Подготовка негативного контроля – внесение по 0,1 мл буферного раствора в пятый ряд лунок планшета.

Рис.20. Инкубация планшета в термостате 15 минут при температуре 37°C. Необходимо установить время и температуру, затем нажать кнопку «Go». На этом этапе происходит связывание антител сыворотки с антигенами, сорбированными на лунках планшета.



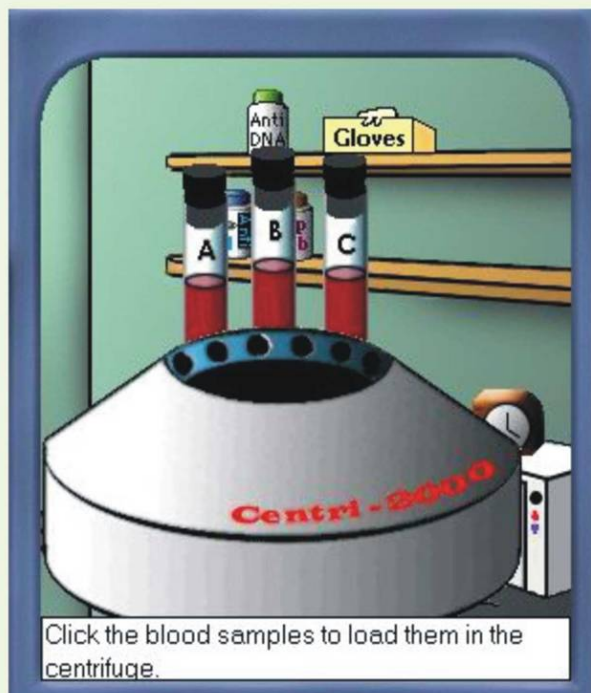


Рис. 12

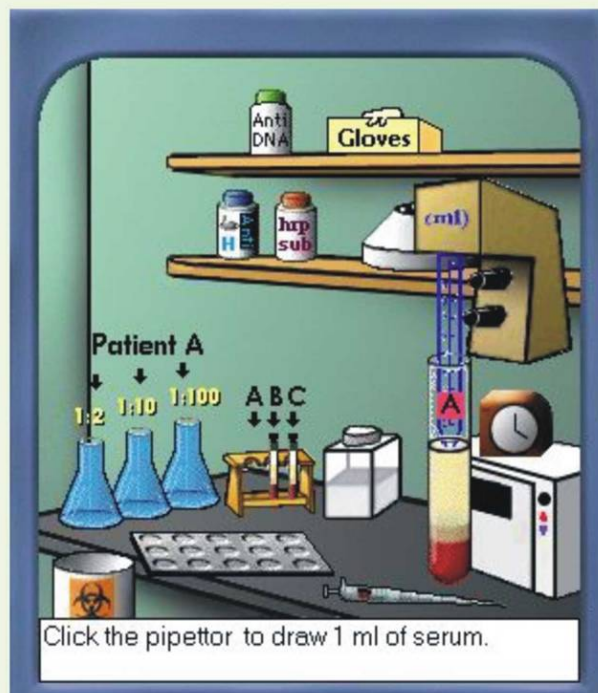


Рис. 13

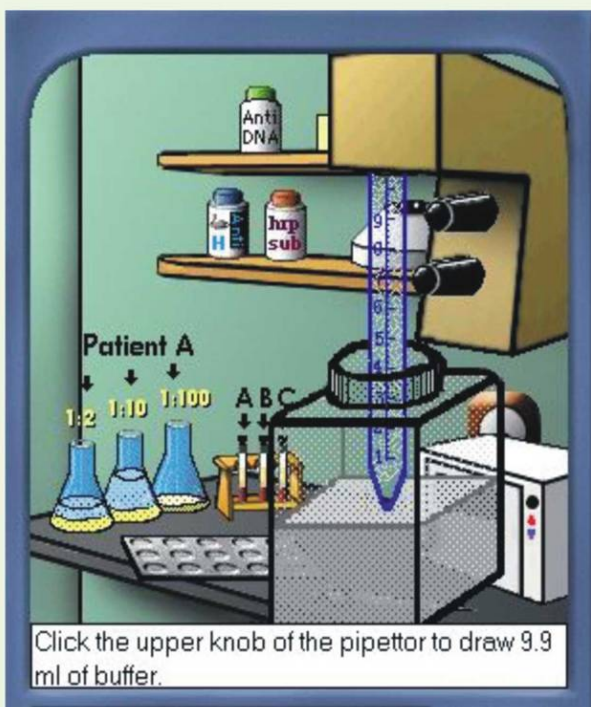


Рис.14

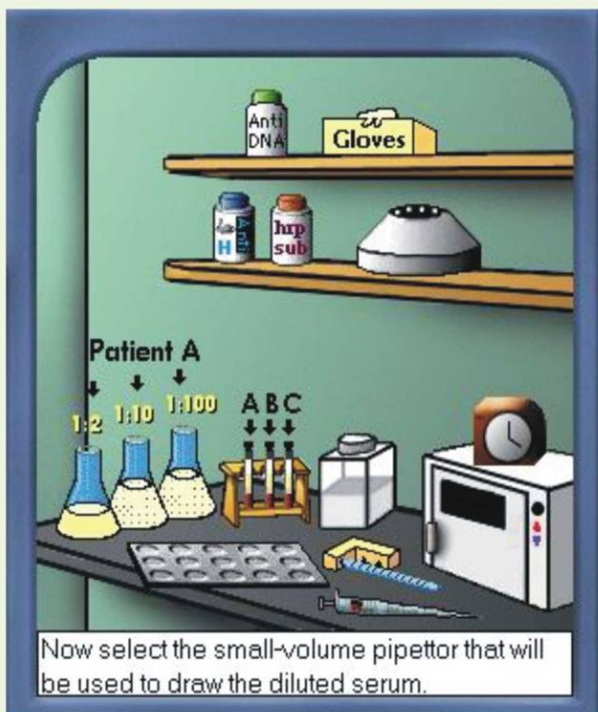


Рис. 15

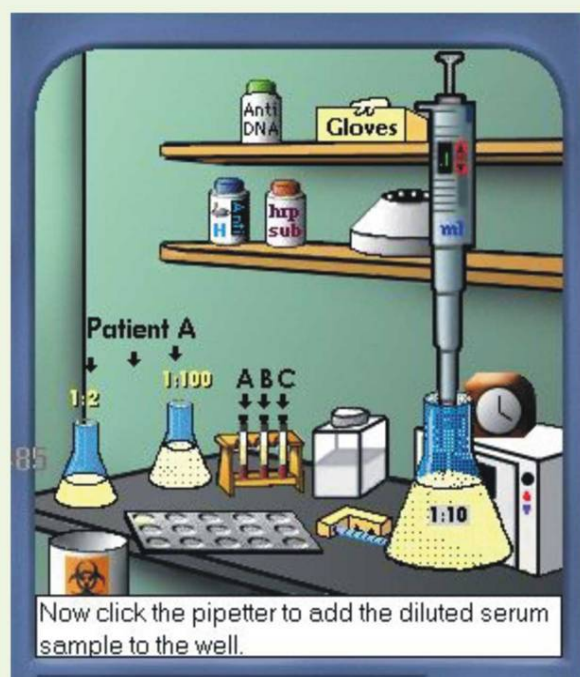


Рис. 16

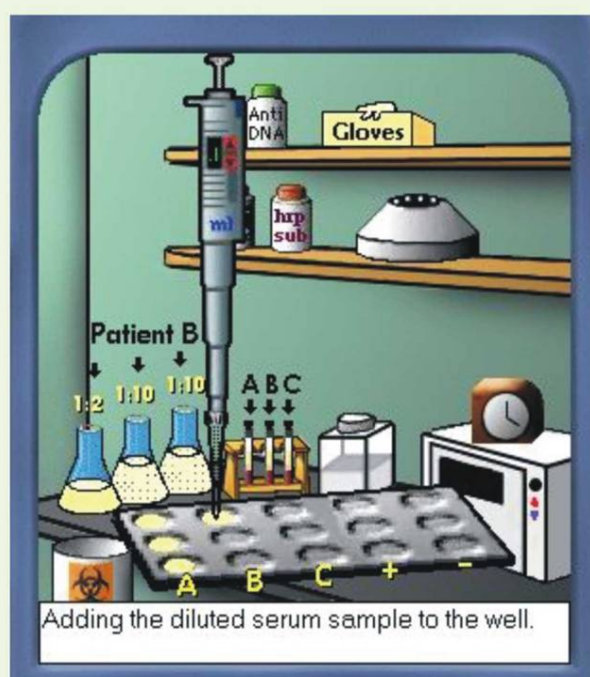


Рис. 17

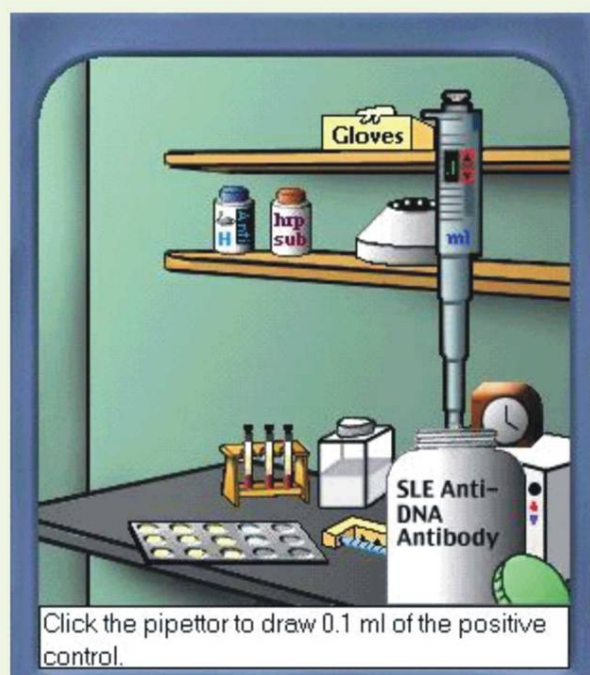


Рис. 18

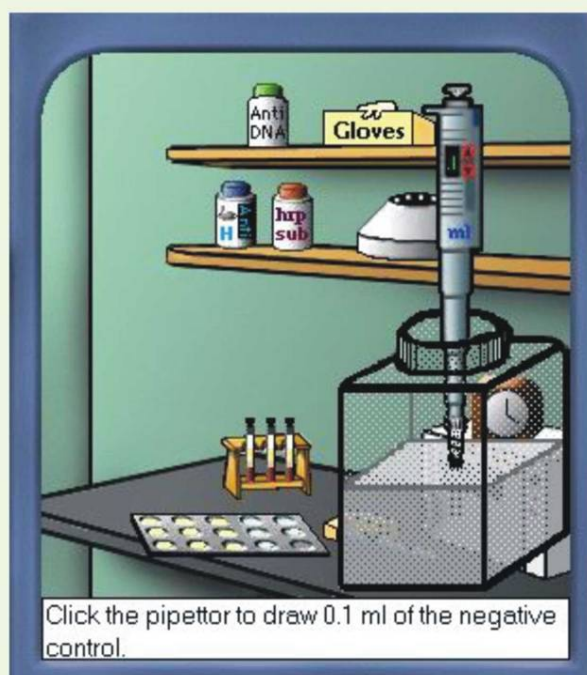


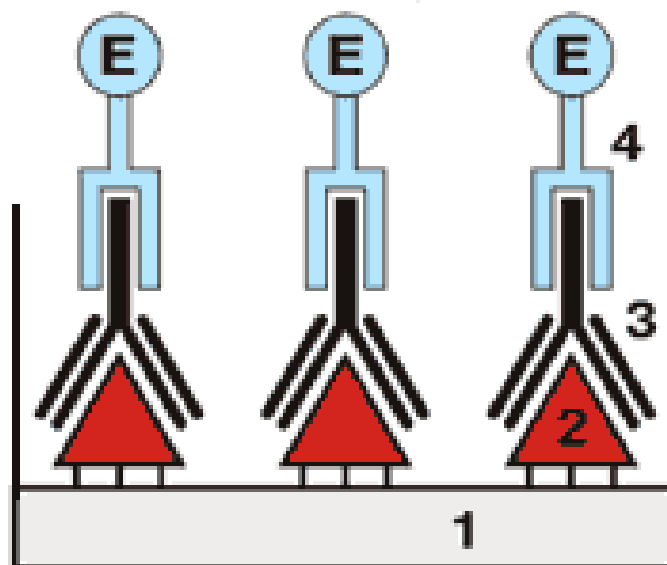
Рис. 19

Рис. 21. Удаление жидкости из лунок планшета с помощью микропипетки.

Рис. 22-24. Промывание планшета. В каждую из лунок вносится микропипеткой 0,1 мл буферного раствора, а затем удаляется с помощью этой же пипетки.

Рис. 25. Внесение конъюгата (иммуноглобулины кролика против человеческих иммуноглобулинов, меченные ферментом). По 0,1 мл конъюгата необходимо внести микропипеткой в каждую лунку планшета.

Рис.26-27. Инкубация планшета в термостате 15 минут при температуре 37°C. Необходимо установить время и температуру, затем нажать кнопку «Go». На этом этапе происходит связывание конъюгата с антителами из исследуемых сывороток, связавшимися с антигенами на предыдущем этапе.



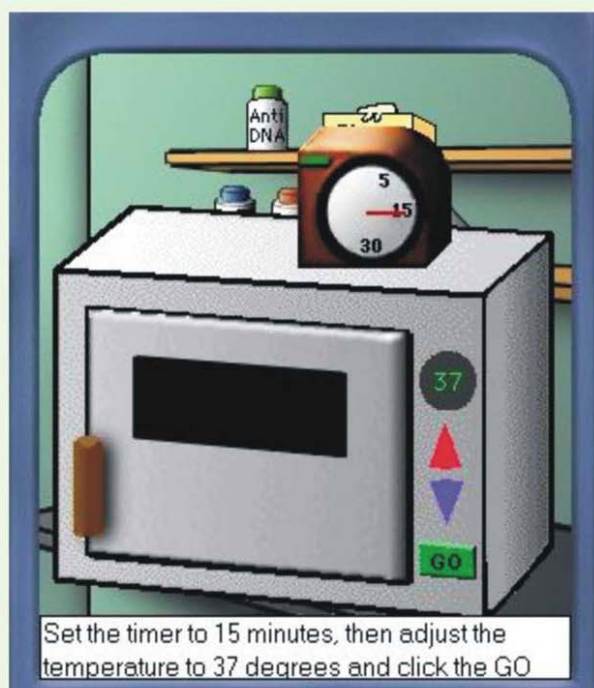


Рис. 20

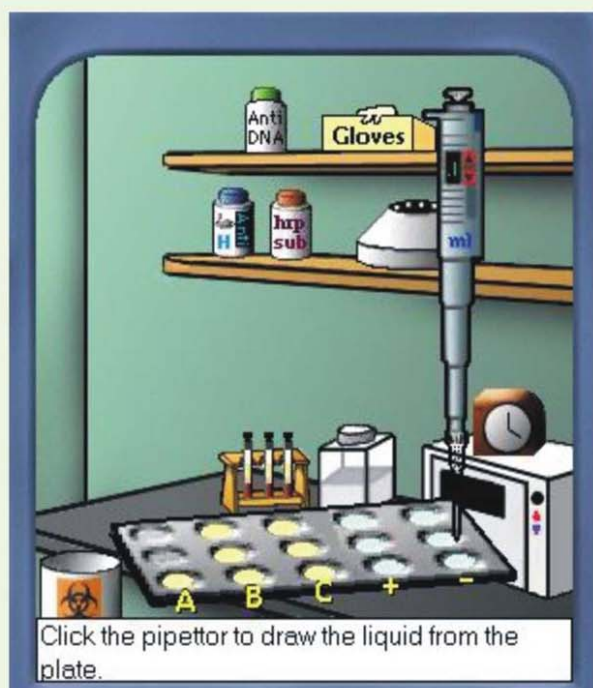


Рис. 21

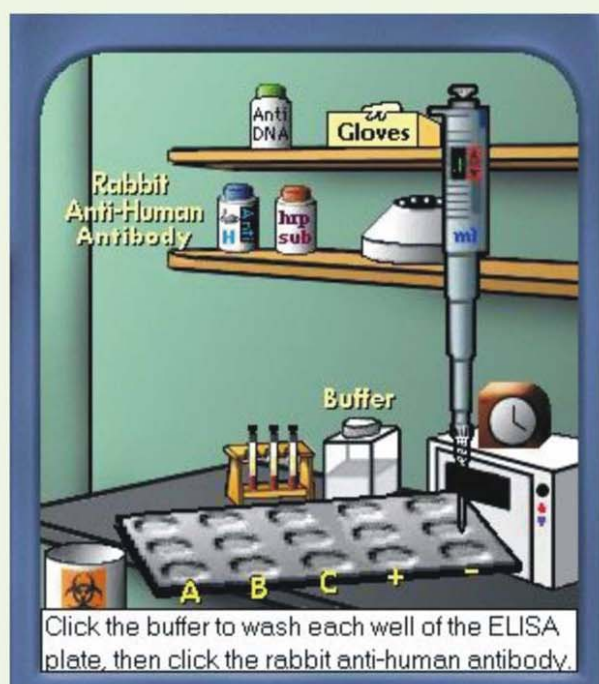


Рис. 22

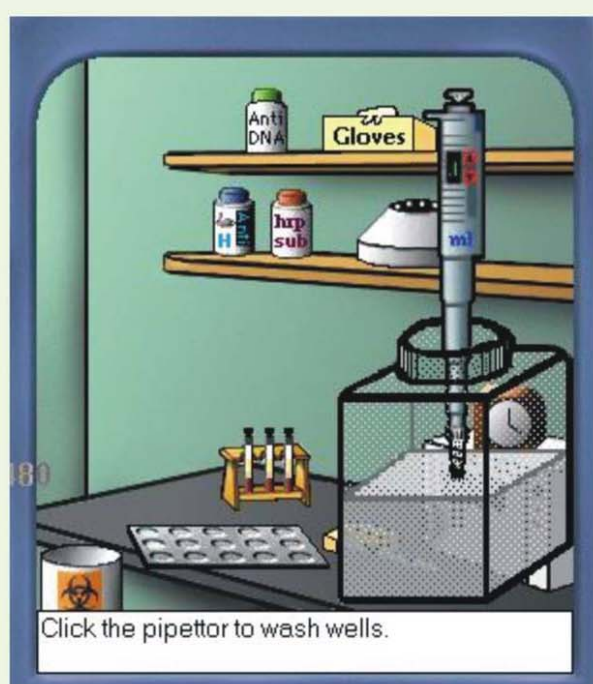


Рис. 23

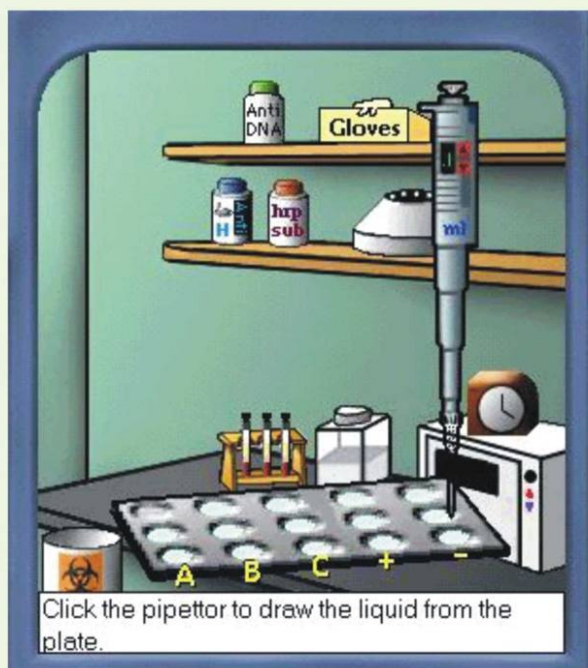


Рис. 24

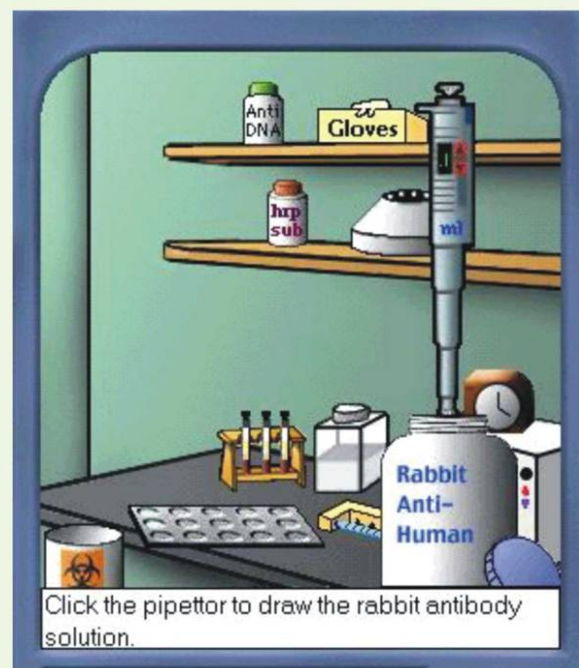


Рис. 25

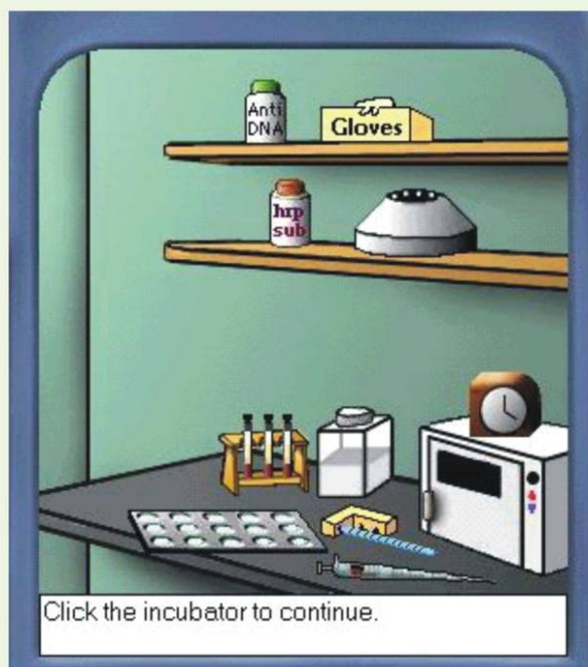


Рис. 26

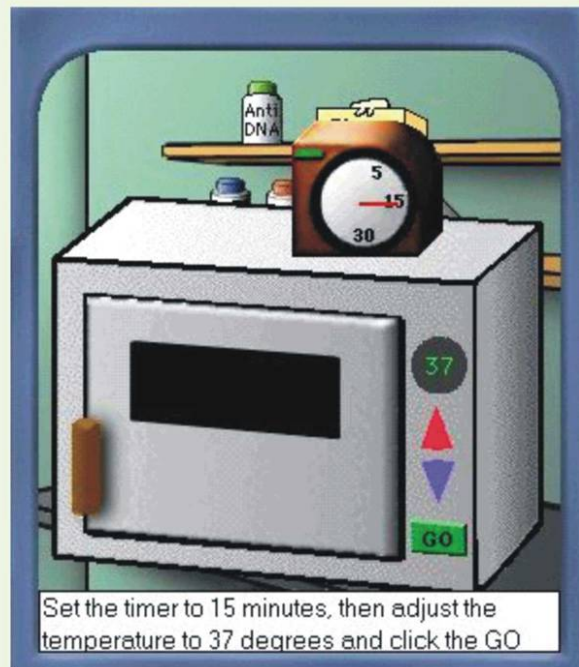


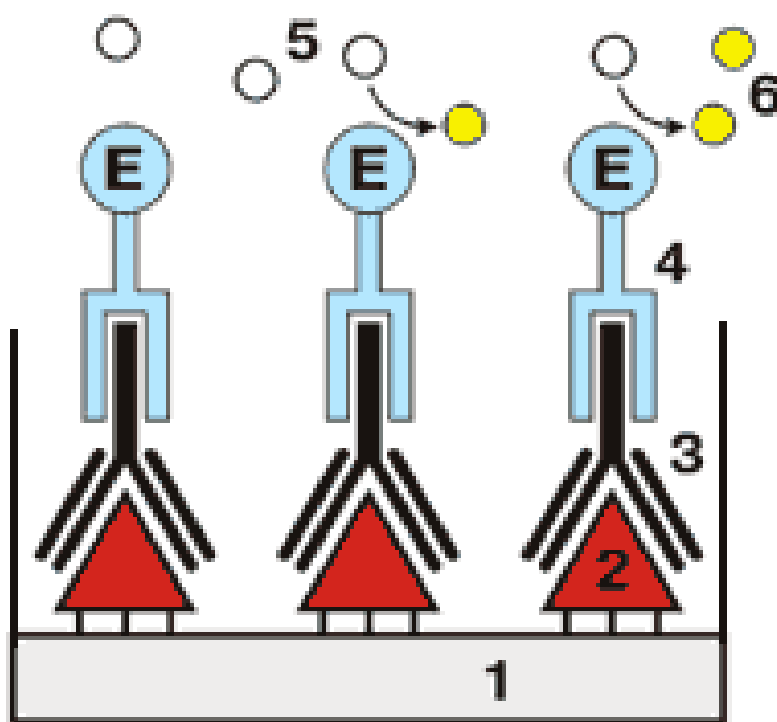
Рис. 27

Рис. 28. Удаление жидкости из лунок планшета с помощью микропипетки.

Рис. 29-30. Промывание планшета. В каждую из лунок вносится микропипеткой 0,1 мл буферного раствора, а затем удаляется с помощью этой же пипетки.

Рис. 31. Внесение раствора хромогена. По 0,1 мл раствора хромогена необходимо внести микропипеткой в каждую лунку планшета.

Рис.32. Инкубация планшета 15 минут при комнатной температуре. Необходимо установить время на таймере. На этом этапе происходит расщепление ферментом бесцветного раствора хромогена с образованием окрашенного в желто-зеленый цвет продукта.



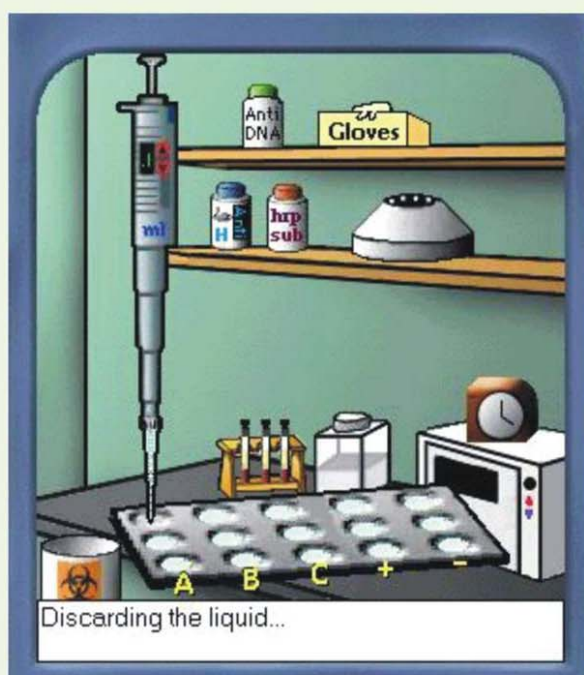


Рис. 28

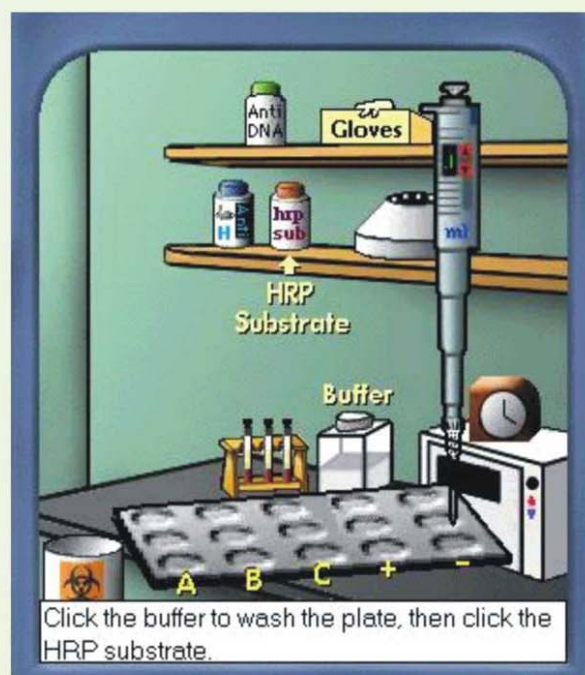


Рис. 29

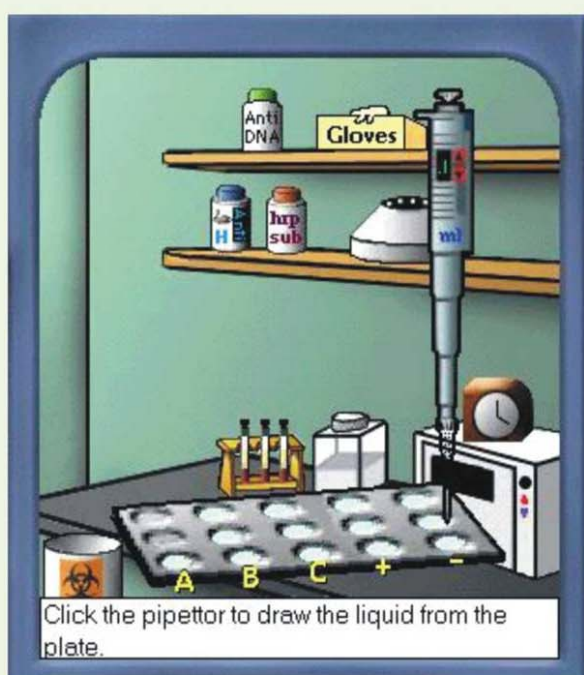


Рис. 30

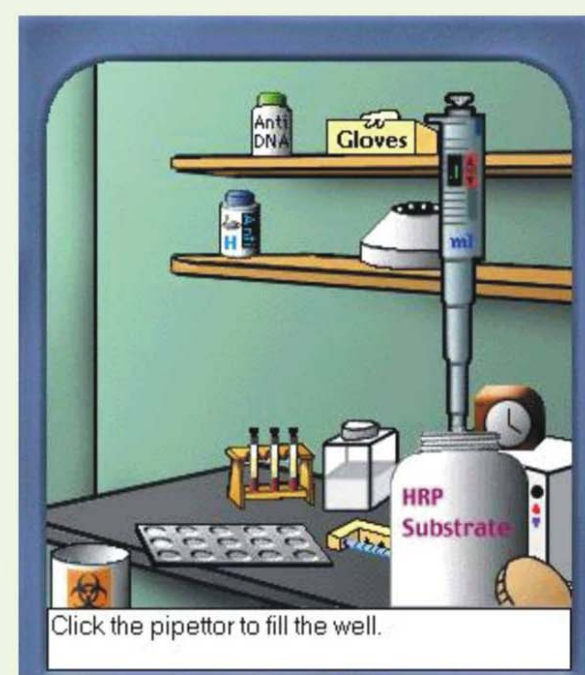


Рис. 31

Рис.33. Оценка результатов и внесение их в протокол исследования (лунки с положительными результатами нужно обозначить крестиками в протоколе, затем нажать кнопку «Enter»).

Lab Notebook

Results:

Record your results here. Check the boxes that are colored in the ELISA plate.

A	B	C	+	-
☒	☒	☐	☒	☐
☒	☒	☐	☒	☐
☒	☐	☐	☒	☐

ENTER CLEAR

Рис.34. Окно интерпретации результатов исследования, сравнения их с эталонными и поиска ошибок. В правом окне отмечен результат каждого из шагов исследования. При необходимости можно вернуться к тому шагу, где была допущена ошибка и заново провести исследование.



Рис. 32

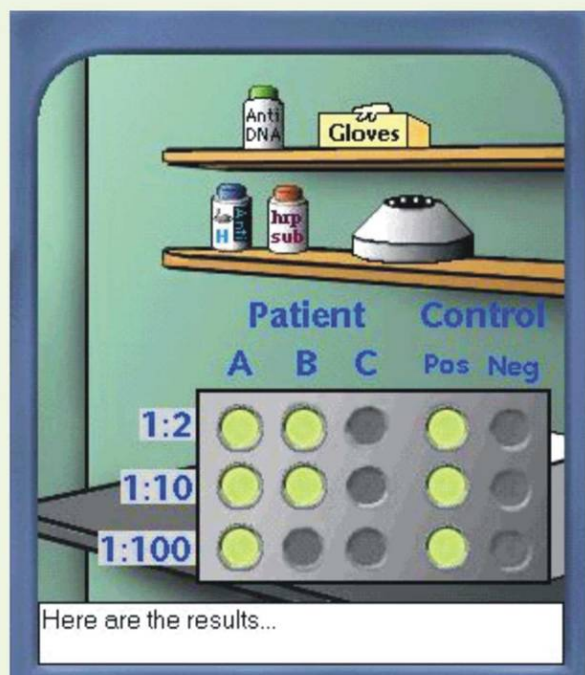


Рис. 33

HHMI VIRTUAL LAB

Immunology

[Diagnosis](#)
[Background](#)

[Glossary](#)
[Notebook](#)
[Credits](#)

Your results yielded a correct reading.

	Patient			Controls	
	A	B	C	Pos	Neg
1:1	Yellow	Yellow	Grey	Yellow	Grey
1:10	Yellow	Yellow	Grey	Yellow	Grey
1:100	Yellow	Grey	Grey	Yellow	Grey

This shows that patient A is likely to have SLE. Patient C probably does not have SLE. Patient B might have it, but further testing is required.

Intro 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 **Results**

- ✓ [Step 1](#): Centrifugation O.K.
- ✓ [Step 2](#): Dilutions prepared correctly
- ✓ [Step 3](#): ELISA plate prepared correctly
- ✓ [Step 4](#): Controls added correctly
- ✓ [Step 5](#): Timer O.K.
- ✓ Temperature O.K.
- ✓ [Step 6](#): Elisa plate washed
- ✓ [Step 7](#): Rabbit anti-human antibody added
- ✓ [Step 8](#): Timer O.K.
- ✓ Temperature O.K.
- ✓ [Step 9](#): ELISA plate washed
- ✓ [Step 10](#): HRP substrate added
- ✓ [Step 11](#): Timer set O.K.
- ✓ [Results](#): Results recorded

Click on the steps above to review the notebook.

RESTART THIS STEP

START OVER

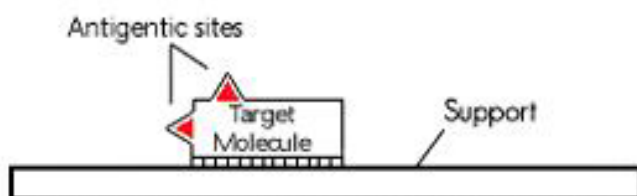
Volume

QUIT

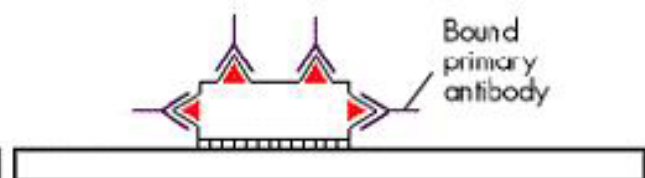
Рис. 34

Figure 1 Generalized ELISA protocol for detecting a target antigen. Enzyme (E) is conjugated to secondary antibody.

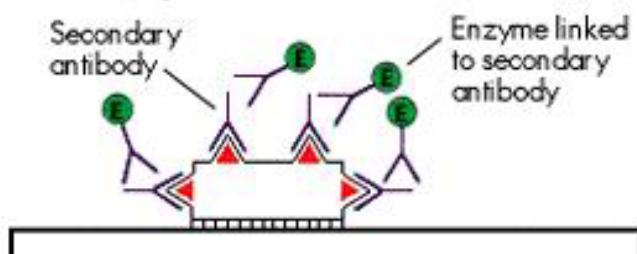
A Bind sample to support



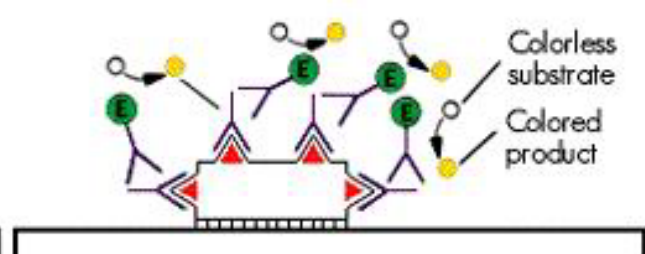
B Add primary antibody; wash



C Add secondary antibody-enzyme conjugate; wash



D Add substrate





Howard Hughes Medical Institute
Office of Grants & Special Programs

Executive Producer: Joseph Perpich, M.D., J.D.

Producer: Jill Conley, Ph.D.

Writers: Jill Conley, Ph.D., Frank Portugal, Ph.D.

Special Thanks: Benjamin de Bivort, Krystyna Isaacs, Ph.D., Tony Tse

TeleFusion

Project Lead & Creative Director: Bill Pietsch

Artwork & Animation: Bob Buffington, Steve Ferguson, Bill Pietsch

Programming & Web Integration: Steve Ferguson, Cathy Sandifer

CD-ROM VERSION

Interface Design: Bob Buffington

Programming: Davey Thomas