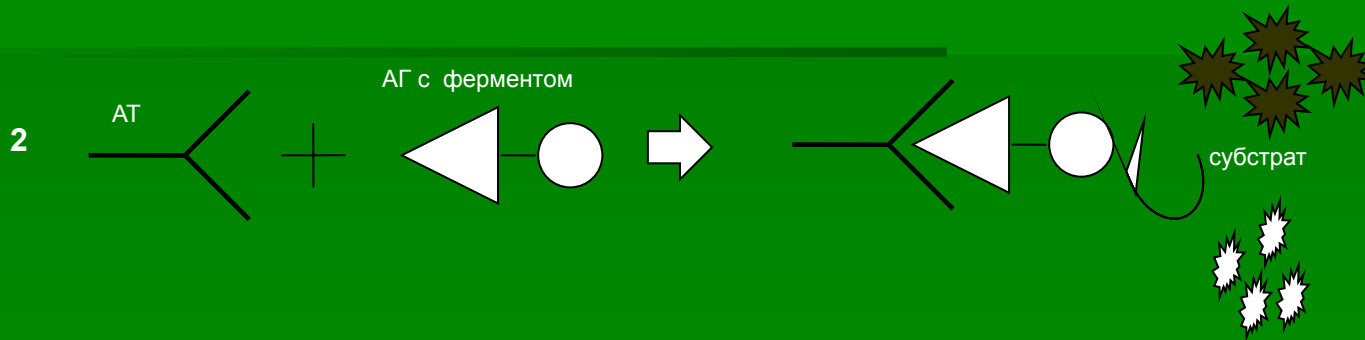
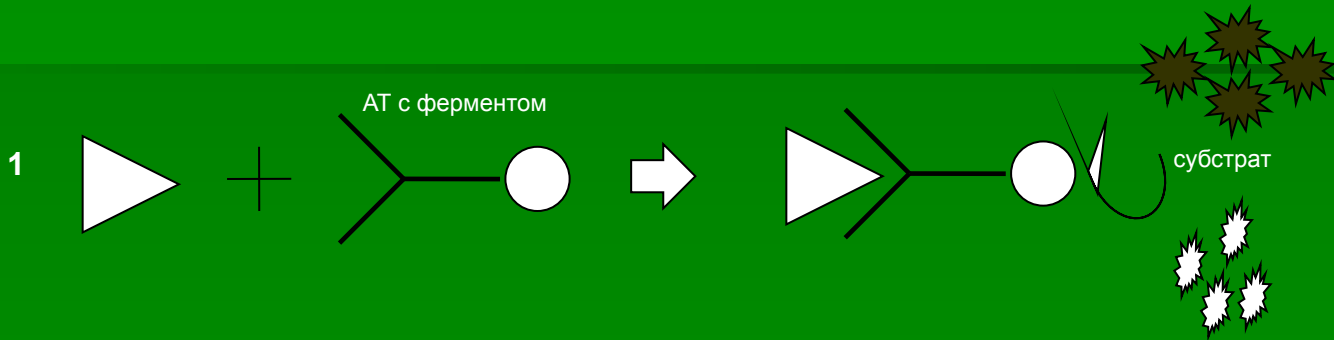


Иммуноферментный анализ



Практическое применение ИФА

- • 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.

Стадии ИФА

- 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

- 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 ферментом 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.

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.
- Для гетерогенных методом характерно проведение анализа в двухфазной системе с участием твердой фазы – носителя

По принципу определения тестируемого вещества

- Прямое определение концентрации вещества (антигена или антитела) по числу провзаимодействующих 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
- 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

Компоненты в ИФА

- *Ферменты.* Ферментные метки обладают чрезвычайно мощным каталитическим действием, одна молекула фермента может реагировать с большим количеством молекул *субстрата*.

Ферменты и их субстраты наиболее широко используемые в ИФА

Фермент	Источник получения	М.М. (кДа)	Субстрат (рекомендуемая длина волны при фотометрии, нм)	Конъюгирующий реагент
Пероксидаза хрена	Хрен (<i>Armoracia rusticana</i>)	40	О-фенилендиаминдигидрохлорид (ОФД, 492 нм) 5-аминосалициловая кислота (450 нм), диаминобензидин, о-дианизидин.	Глутаральдегид Мета-периодат натрия N-сукцинимидил-3 (2-пиридилдитио) пропионат
β -D-галактозидаза	<i>E. Coli</i>	540	О-нитрофенил- β -D-галактозид (420 нм)	Мета-малеимидобензол-N-гидроксисукцинимидный эфир
Щелочная фосфатаза	<i>E. Coli</i> , слизистая кишечника теленка	84-150	P-нитрофенилфосфат (405 нм), 5-Бром-4-хлоро-3-индолил фосфат	Глутаральдегид

Антигены и антитела.

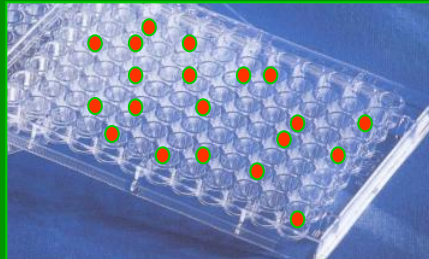
- АГ и АТ, используемые в ИФА, должны быть высокоочищенными и высокоактивными.

Конъюгат

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

Твердая фаза

- . В качестве твердой фазы для проведения ИФА можно применять различные материалы: полистирол, поливинилхлорид, полипропилен и другие вещества. Твердой фазой могут служить стенки пробирки, 96-луночные и др. планшеты, шарики, бусины, а также нитроцеллюлозные и другие мембраны, активно сорбирующие белки



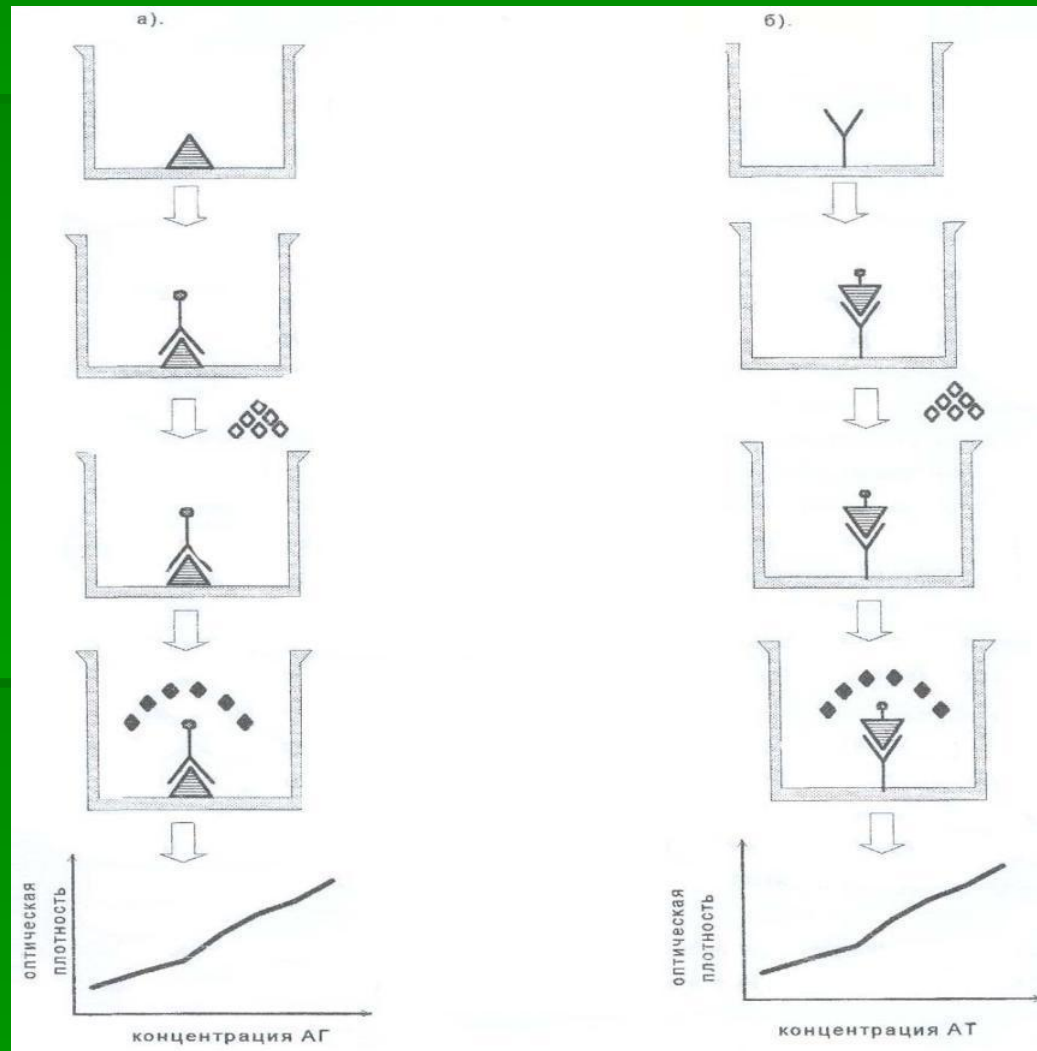
Варианты постановки ИФА

- *Общий принцип твердофазного ИФА.*
- 1. На 1 этапе реакции адсорбируют антигены или антитела на твердой фазе. При этом не связавшиеся с твердой фазой реагенты легко удаляются отмыванием.

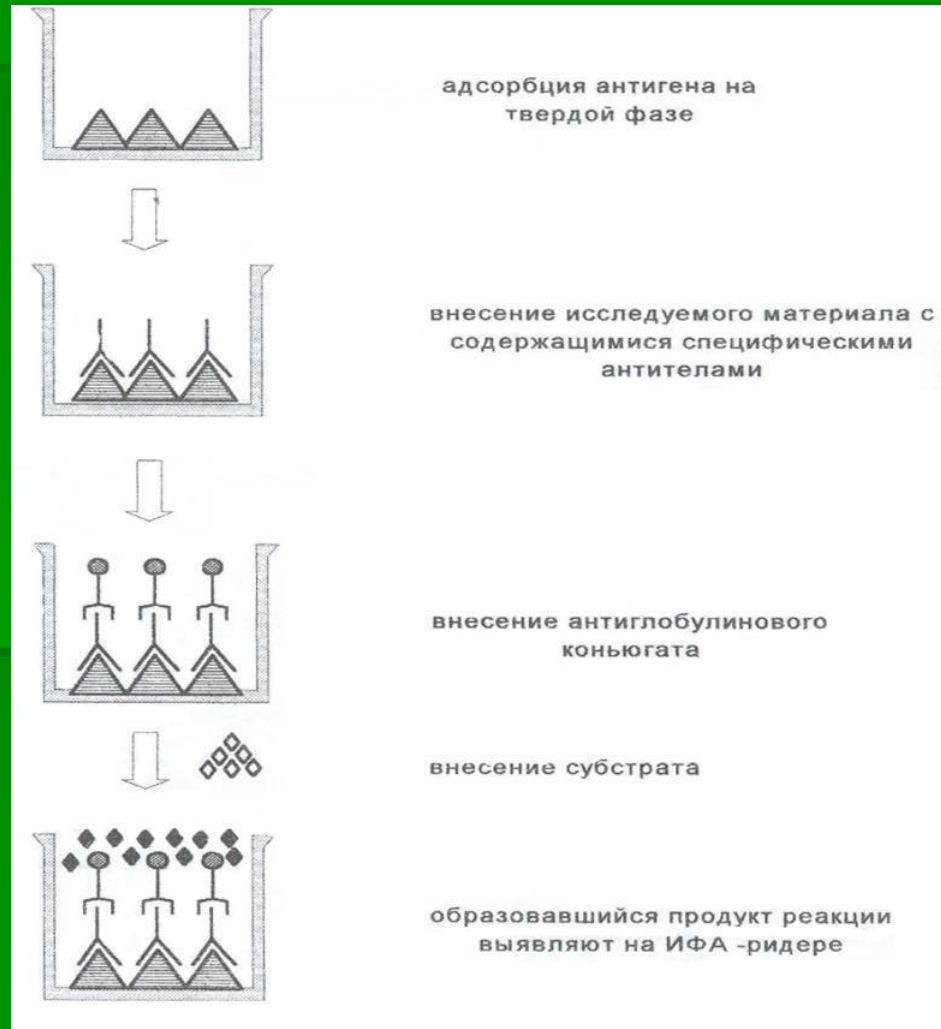
- 2. В сенсibiliзированных лунках инкубируют исследуемый образец. В лунках с положительным контролем – стандартные реагенты. При этом на поверхности твердой фазы формируются иммунные комплексы. Несвязавшиеся компоненты удаляют отмыванием.

- 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.

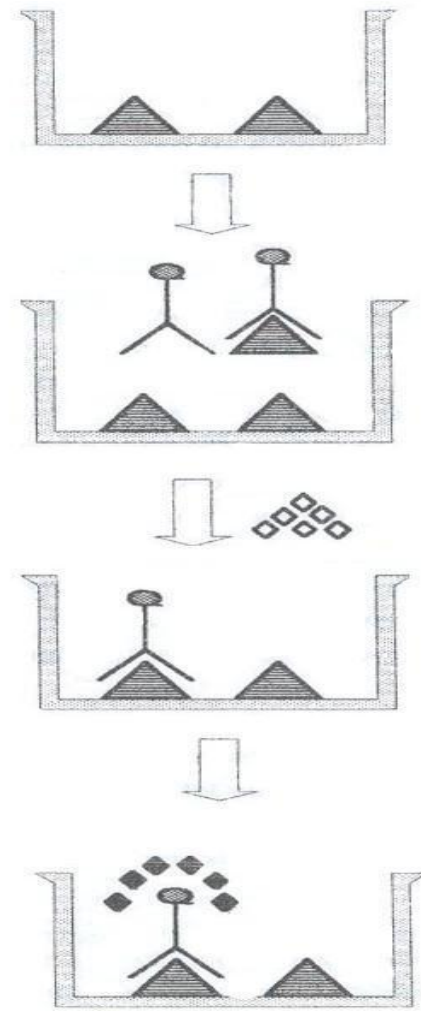
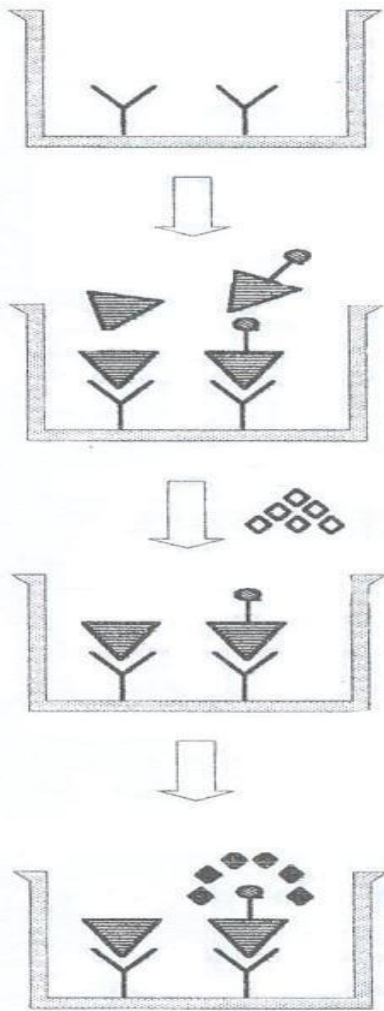
Прямой ИФА



Непрямой ИФА (сендвичевый)



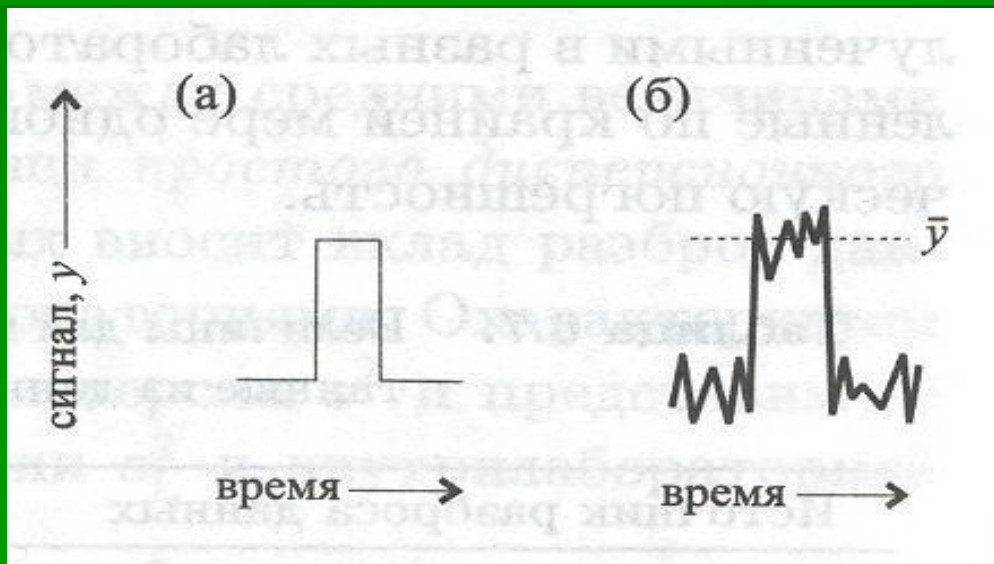
Конкурентный ИФА



Чувствительность метода

- Средняя чувствительность ИФА
- 10^{-9} – 10^{-12} моль.

Обработка сигналов: цифровая фильтрация



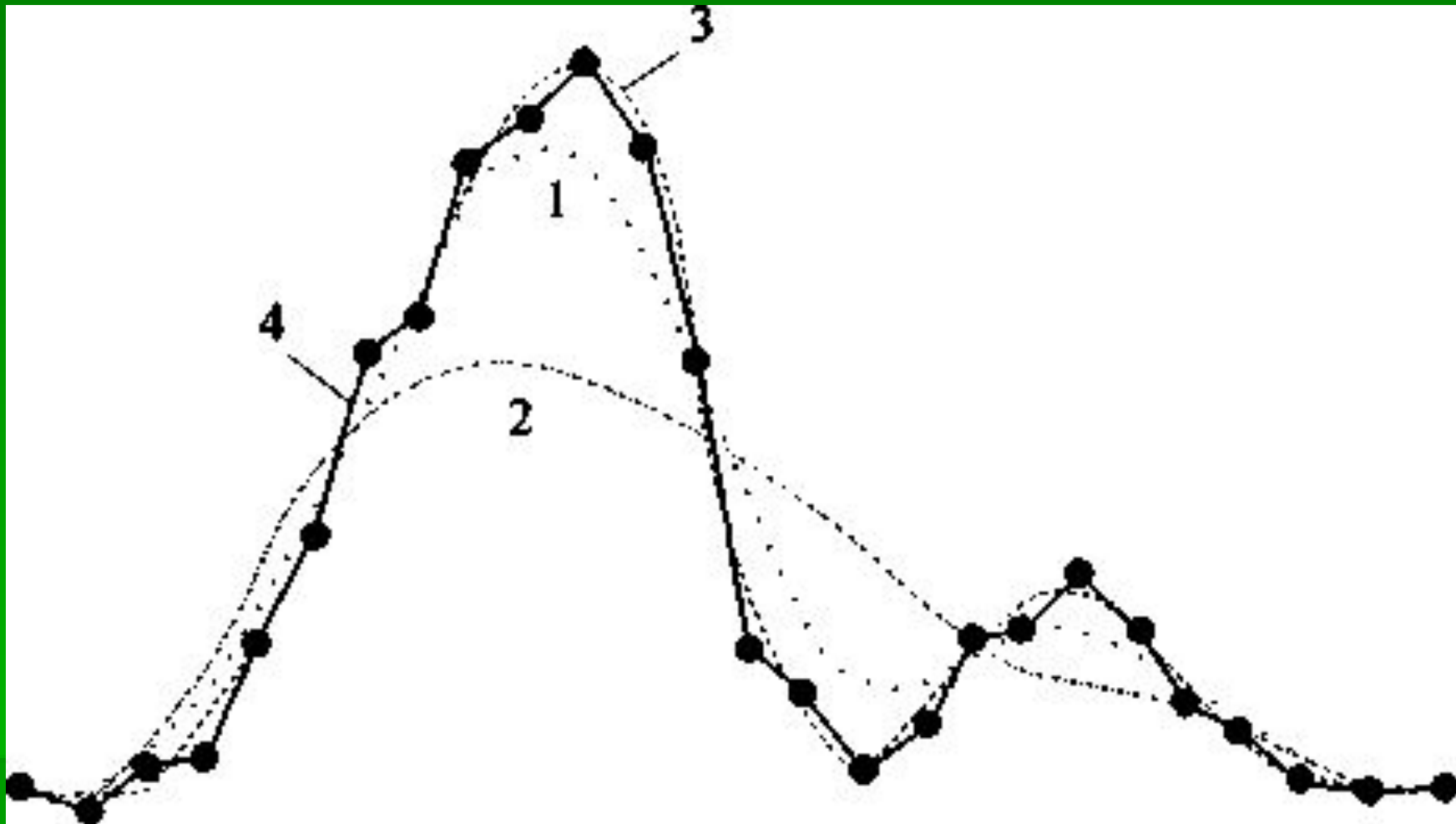
- Теоретическая форма сигнала прямоугольной формы (а) и экспериментальный зашумленный сигнал (б).

Аналоговые и цифровые фильтры

- При обработке аналитических данных, представленных в виде некоторой непрерывной зависимости — спектров, хроматограмм и т.д. — возникают следующие основные задачи.
- •Увеличение интенсивности полезного сигнала по сравнению с
- шумами.
- •Дифференцирование данных с целью подавления сигнала фона
- и улучшения разрешения пиков.
- •Интегрирование данных для нахождения площади пиков.

Фильтр скользящего среднего

- При ширине фильтра $2m + 1$ точек исходные данные u_k заменяются средними
 - $$u_{k'} = \frac{1}{2m+1} \sum_{j=-m}^{j=m} u_{k+j}$$
- где k — индекс обрабатываемого значения, $2m + 1$ — число данных, используемых для усреднения (ширина фильтра)



Сглаживание данных при помощи различных цифровых фильтров. 1 — скользящее среднее, 5 точек; 2 — скользящее среднее, 11 точек; 3 — фильтр Савицкого-Голя, 5 точек; 4 — интерполяционный фильтр.

Фильтр Савицкого-Голея

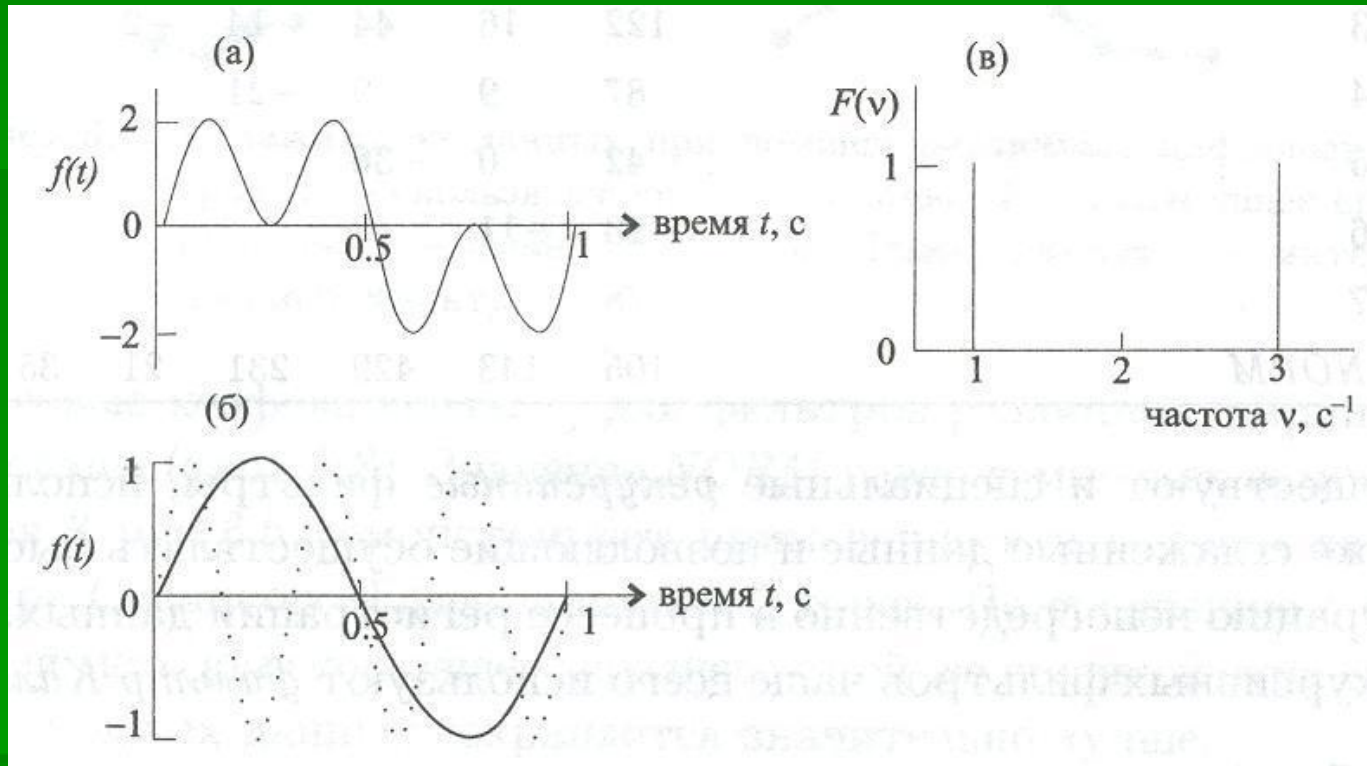
- При ширине фильтра $2m+1$ точек средние значения равны
- $j=-m$
- $y_k' = 1/NORM \sum c_j y_{k+j} \quad (11)$
- $j=-m$
- Весовые коэффициенты c_j для фильтров различной ширины табулированы

Ширина фильтра (число точек)	15	13	11	9	7	5
-7	-78					
-6	-13	-11				
-5	42	0	-36			
-4	87	9	9	-21		
-3	122	16	44	14	-2	
-2	147	21	69	39	3	-3
-1	162	24	84	54	6	12
0	167	25	89	59	7	17
1	162	24	84	54	6	12
2	147	21	69	39	3	-3
3	122	16	44	14	-2	
4	87	9	9	-21		
5	42	0	-36			
6	-13	-11				
7	-78					
NORM	105	143	429	231	21	35

Дифференцирование и интегрирование данных

- Фильтр Савицкого-Голея может быть использован и для дифференцирования или интегрирования данных. Для этого следует лишь соответствующим образом выбрать весовые коэффициенты. Численные методы дифференцирования и интегрирования сигналов широко применяются в стандартном математическом обеспечении аналитических приборов.
- Дифференцирование позволяет устранить *постоянный сигнал фона* и улучшить *разрешение пиков*. Интегрирование пиков необходимо для нахождения их площади в количественном анализе.

Фурье-преобразование



- Принцип фурье-преобразования. Суммарный сигнал (а) состоит (б) из двух синусоид с периодами $t_1 = 1$ с и $t_2 = 1/3$ с, (в) — этот же спектр, представленный в виде зависимости интенсивности от частоты.

Фильтрация данных при помощи фурье-преобразования

- $G(v) = F(v)H(v)$

