

**ВЗАЄМОДІЯ АНТИГЕН-  
АНТИТІЛО.  
МЕТОДИ ЇЇ ВИЗНАЧЕННЯ.**

# Будова активного центру антитіл

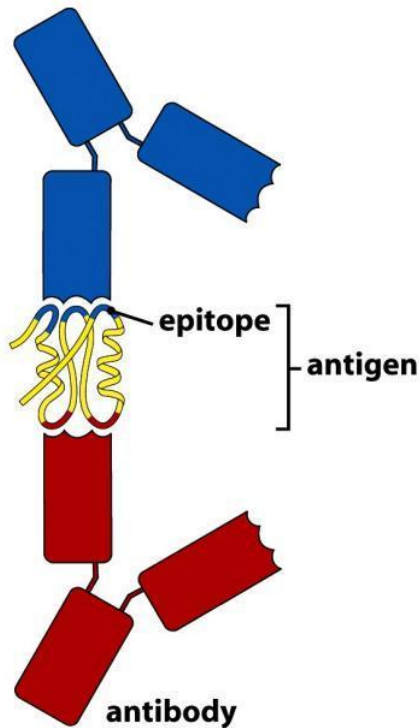


Figure 1-15 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

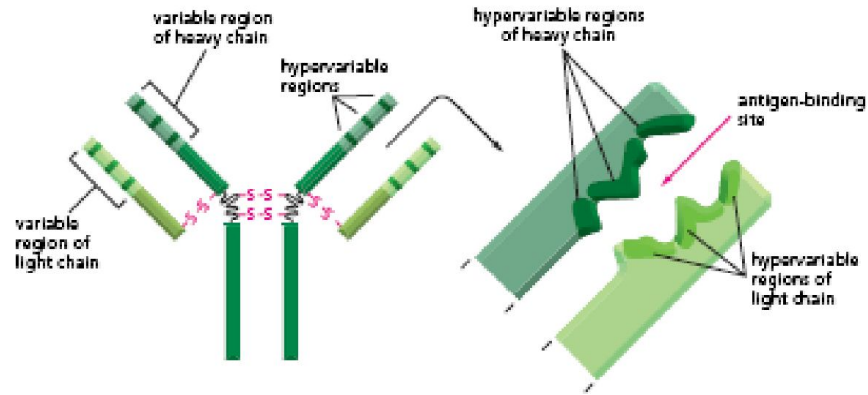


Figure 25-31 Antibody hypervariable regions. Highly schematized drawing of how the three hypervariable regions in each light and heavy chain together form the antigen-binding site of an antibody molecule.

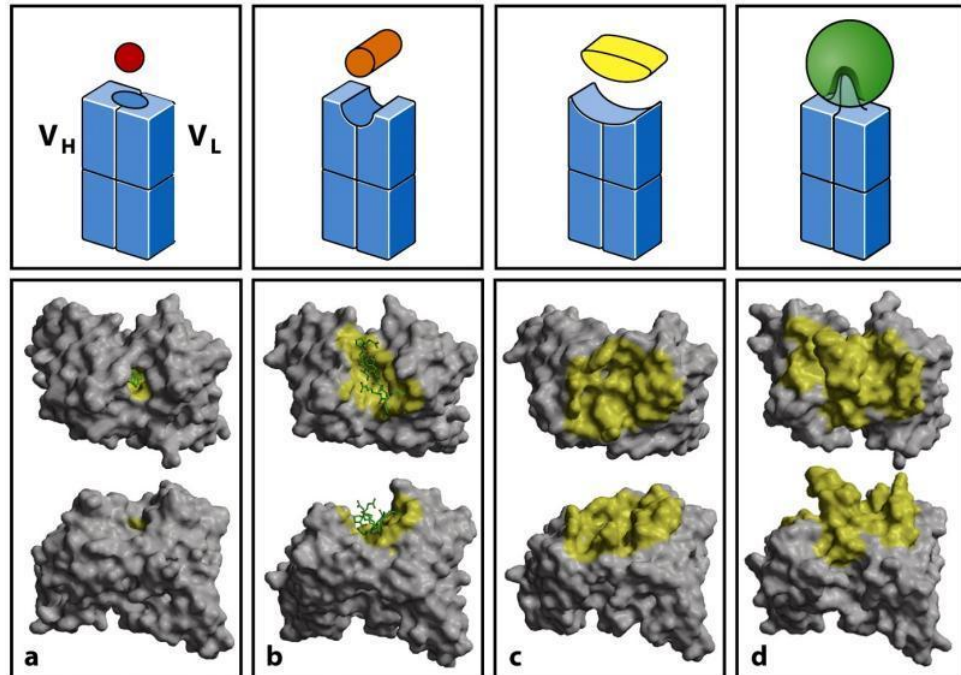
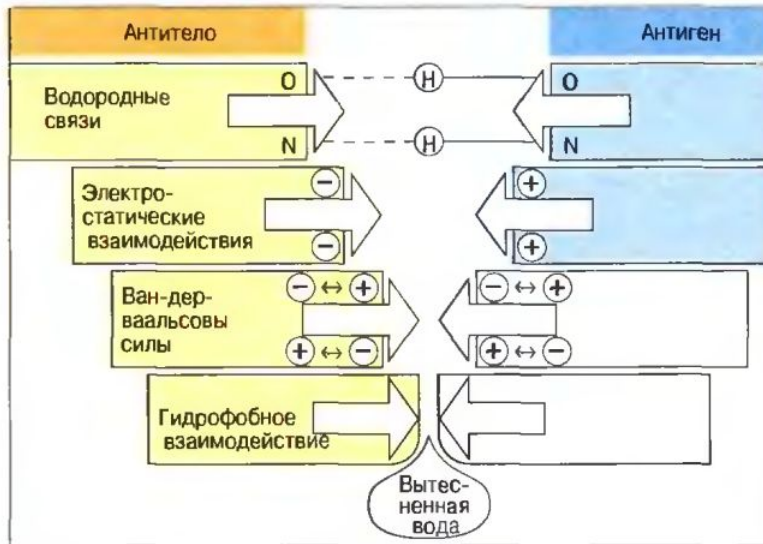


Figure 3-8 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

## Силы межмолекулярного притяжения



**Рис. 9.2**

Для возникновения сил связывания (между антителом и антигеном) требуется тесное сближение взаимодействующих атомных групп. Водородные связи образуются за счет водородных мостиков между такими группами. Электростатическое взаимодействие возникает вследствие притяжения противоположно заряженных атомных групп, расположенных на боковых цепях связывающихся белков. Ван-дер-ваальсовы связи обусловлены взаимодействием между электронными оболочками молекул (в данном случае между индуцированными колебательными диполями). Гидрофобное взаимодействие, способное обеспечить до 1/2 общей энергии связи между антигеном и антителом, – это сильное притяжение в воде между неполярными (гидрофобными) группами, которое почти полностью устраняет их контакт с водой. В зависимости от типа связи различаются величины оптимального для связывания расстояния между взаимодействующими группами.

## Нековалентні зв'язки між антитілом та антигеном

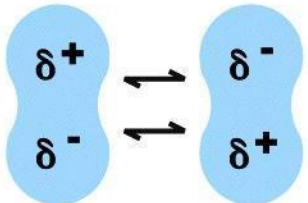
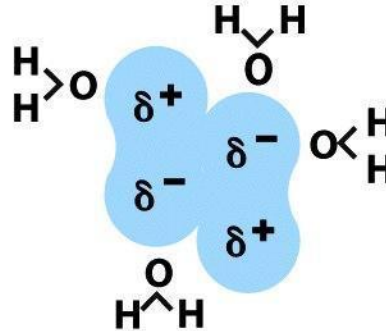
Noncovalent forces	Origin	
Electrostatic forces	Attraction between opposite charges	$-\overset{\oplus}{\text{NH}}_3 \quad \overset{\ominus}{\text{OOC}}-$
Hydrogen bonds	Hydrogen shared between electronegative atoms (N,O)	$\begin{array}{c} \diagup \text{N} - \text{H} - \text{O} = \text{C} \diagdown \\ \delta^- \quad \delta^+ \quad \delta^- \end{array}$
Van der Waals forces	Fluctuations in electron clouds around molecules oppositely polarize neighboring atoms	
Hydrophobic forces	Hydrophobic groups interact unfavorably with water and tend to pack together to exclude water molecules. The attraction also involves van der Waals forces	

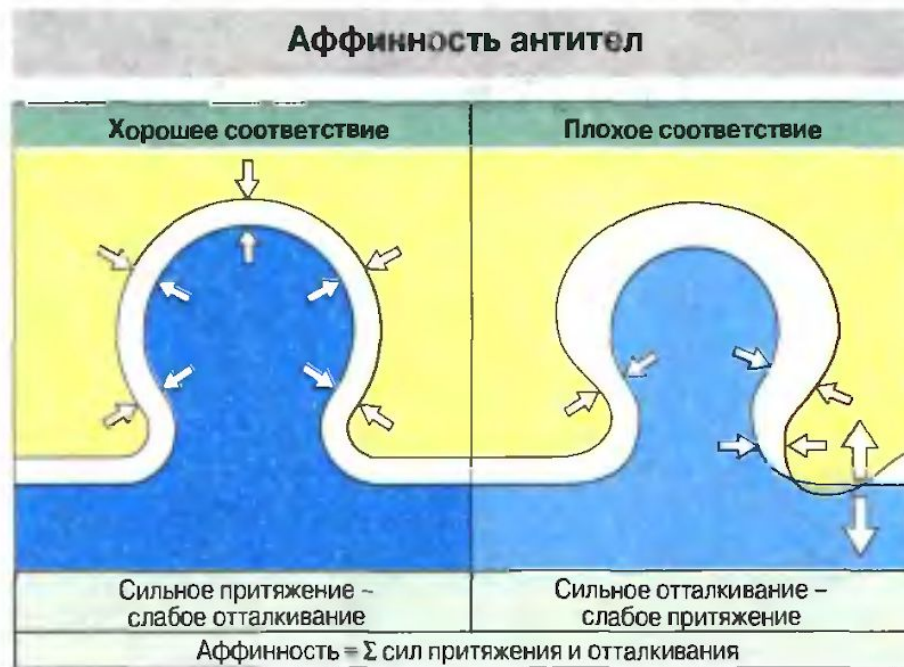
Figure 3-9 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)



# АФІННІСТЬ АНТИТІЛ

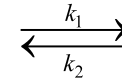
Афінністю або спорідненістю антитіл до антигену називають результуючу силу їх взаємодій, яка є сумою сил притягання та відштовхування, що діють між активним центром АТ і епітопом АГ. Афінність відображає здатність антитіл формувати стабільні імунні

комплекси.



**Рис. 9.5**

Аффинность антитела к антигену – это результирующая возникающих между ними сил притяжения и отталкивания. Высокоаффинные антитела точно комплементарны по конформации антигену, а низкоаффинные, напротив, неточно.



(1) хімічна реакція першого порядку  $[AG] + [AT] \rightleftharpoons [AGAT]$

$AG$  – вільний антиген;

$AT$  – вільне антитіло;

$AGAT$  – комплекс антиген-антитіло;

$k_1$  - константа швидкості асоціації;

$k_2$  - константа швидкості дисоціації комплексу антиген-антитіло ( $AGAT$ )

$$V_1 = k_1 \cdot [AG] \cdot [AT]$$

$$V_2 = k_2 \cdot [AGAT]$$

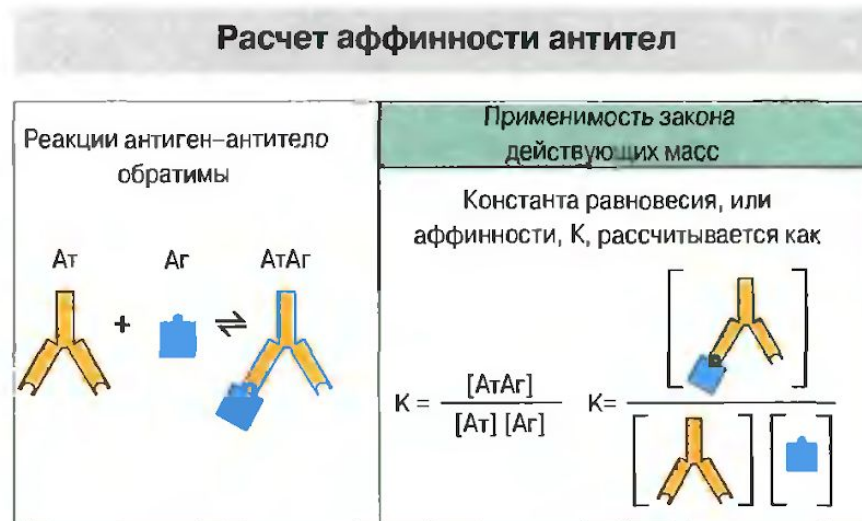
За умов рівноваги, коли  $V_1 = V_2$ , можна записати:

$$k_1 \cdot [AG][AT] = k_2 \cdot [AGAT]$$

$$k_a = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[AGAT]}{[AG] \times [AT]}, \text{ М}^{-1} \text{ або л/моль}$$

Константа афінності (2)

# Розрахунок афінності антитіл



**Рис. 9.6**

Все реакции антиген-антитело обратимы. Поэтому они описываются законом действующих масс, что позволяет рассчитать аффинность антител как константу равновесия, K. (Квадратные скобки означают концентрацию реагентов.)

$K_d = 1 / K_a$  - константа дисоціації;

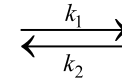
$K_a > 10^5 \text{M}^{-1}$  - специфічне зв'язування;

$K_a > 10^8 \text{M}^{-1}$  - високоспецифічне зв'язування;

$K_a < 10^5 \text{M}^{-1}$  - низькоспецифічне (антитіла проти вуглеводів)

**$K_a$  - термодинамічний параметр:**

$\Delta F = - R T \ln K_a$ , де R- газова постійна; T- абсолютна температура (Кельвін);  $\Delta F$  - зміна вільної енергії взаємодії АГ-АТ.



**(1)** хімічна реакція першого порядку  $[AG] + [AT] \rightleftharpoons [AGAT]$

**AG** – вільний антиген;

**AT** – вільне антитіло;

**AGAT** – комплекс антиген-антитіло;

$k_1$  - константа швидкості асоціації;

$k_2$  - константа швидкості дисоціації комплексу антиген-антитіло (AGAT)

$$V_1 = k_1 \cdot [AG] \cdot [AT]$$

$$V_2 = k_2 \cdot [AGAT]$$

За умов рівноваги, коли  $V_1 = V_2$ , можна записати:

$$k_1 \cdot [AG][AT] = k_2 \cdot [AGAT]$$

$$k_a = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[AGAT]}{[AG] \times [AT]}, \text{ M}^{-1} \text{ або л/моль}$$

**(2)**



# Кінетичні розрахунки

Згідно з (1) та (2) і системою рівнянь матеріального балансу

$$\begin{cases} [AT]_3 = [AT] + [AG \cdot AT] \\ [AG]_3 = [AG] + [AG \cdot AT] \end{cases} \quad (3),$$

де  $[AT]_3$  і  $[AG]_3$  - загальна концентрація AT і AG,

$[AG \cdot AT]$  - концентрація зв'язаних AT чи AG,  
 $[AT]$  і  $[AG]$  - концентрація вільних AT чи AG,  
одержуємо (4)

$$[AG \cdot AT] = \kappa_a [AT]_3 [AG] / 1 + \kappa_a [AG]$$

За умови -  $[AG]_3 \gg [AT]_3$ , отримуємо (5)

$$[AG \cdot AT] =$$

$\kappa_a [AT]_3 [AG]_3 / 1 + \kappa_a [AG]_3$  - аналог рівняння Міхаеліса-Ментен;

при високих концентраціях  $[AG]_3$   
 $[AG \cdot AT] = [AT]_3$  - концентрація комплексу спрямована до загальної концентрації антитіл (графік).

При розрахунку  $K_a$  визначають таку концентрацію антигену  $[АГ]'_3$ , при якій половина антитіл знаходиться у вигляді комплексу з антигеном  $[АГ \cdot АТ] = [АТ]_3 / 2$ . Враховуючи (3) і (4), отримуємо (6):

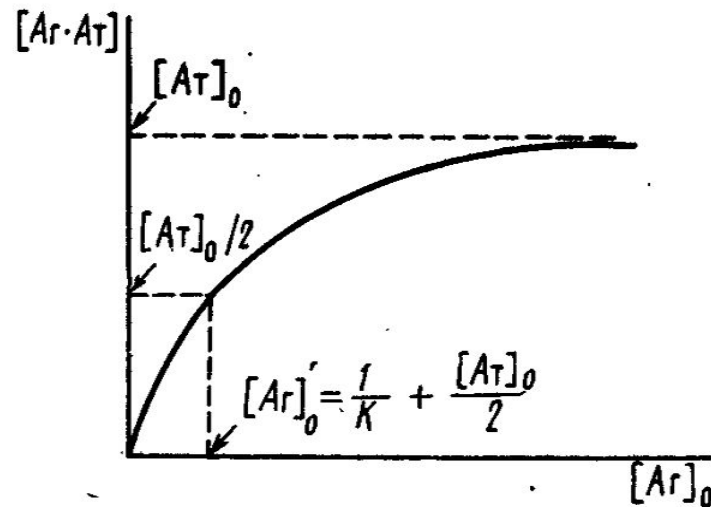
$$[АГ]'_3 = 1/ K_a + [АТ]_3 / 2$$


Рис. 9. Зависимость концентрации образующегося комплекса  $[АГ \cdot АТ]$  от общей концентрации антигена в растворе  $[АГ]_0$

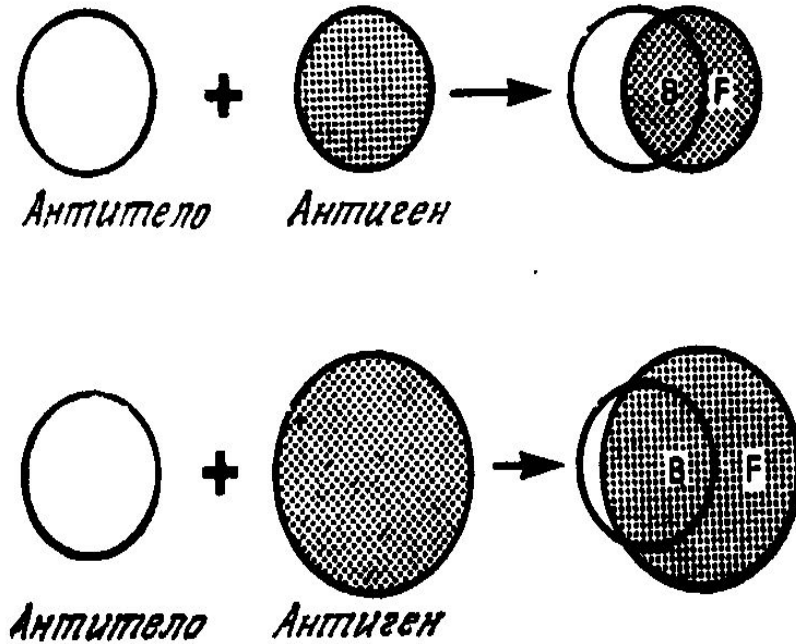


Рис. 1.1. Основной принцип метода связывания, рассмотренный на примере радиоиммунологического анализа. Допустим, что антиген и антитело в определенных количествах (*вверху*) взаимодействуют друг с другом, образуя комплекс антиген — антитело; в состоянии равновесия в системе будет содержаться комплекс антиген — антитело (перекрывающиеся зоны B) и некоторое количество свободного антитела и свободного антигена (зоны F). Допустим теперь, что количество антитела остается прежним, а количество антигена увеличивается (*внизу*). Тогда в состоянии равновесия количество комплексов антиген — антитело (зоны B) тоже увеличится, но количество свободного антигена (зона F) увеличится в еще большей степени, и отношение связанного антигена к свободному таким образом уменьшится.

## Рівняння Скетчарда:

**B** - концентрація зв'язаного антигену;

**F** - концентрація вільного антигену;

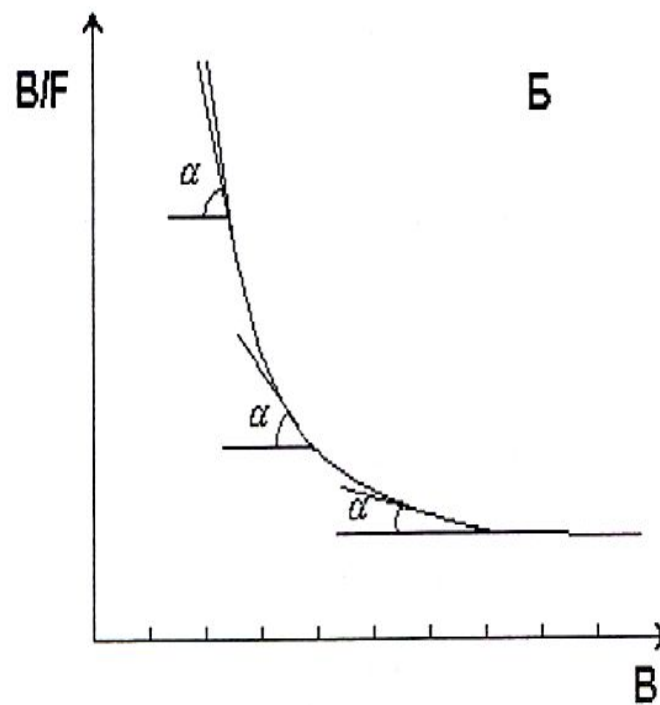
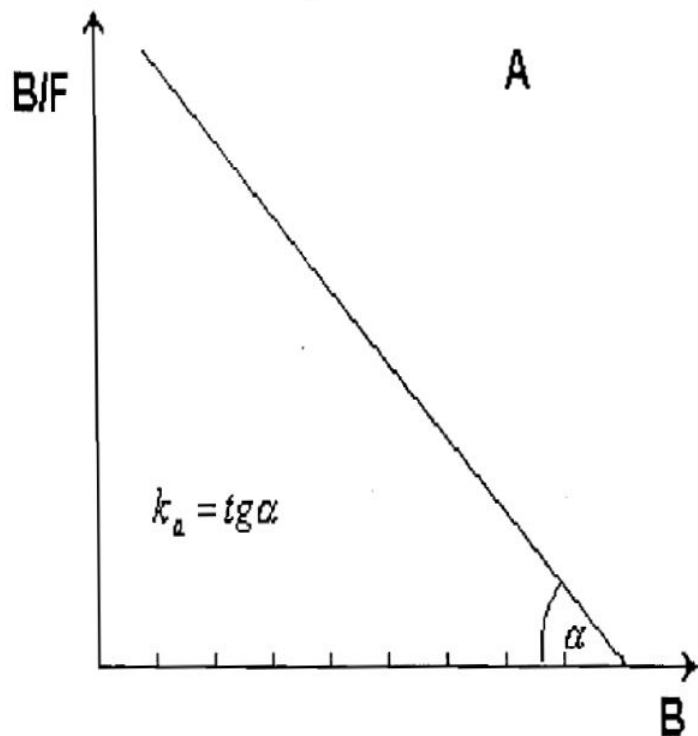
**n** - кількість центрів зв'язування антитіл

$$\begin{aligned} [AG \cdot AT] / [AG] &= k_a [AT]_3 - k_a [AG \cdot AT] = \\ &= k_a ([AT]_3 - [AG \cdot AT]) \end{aligned} \text{ - згідно з рівняннями 1, 2, 5}$$

$$\frac{B}{F} = k_a (n - B)$$

# Графік Скетчарда для моноклональних (А) і поліклональних (Б) антитіл

$$\frac{B}{F} = k_a (n - B)$$





# Графік Скетчарда для моноклональних і поліклональних антитіл

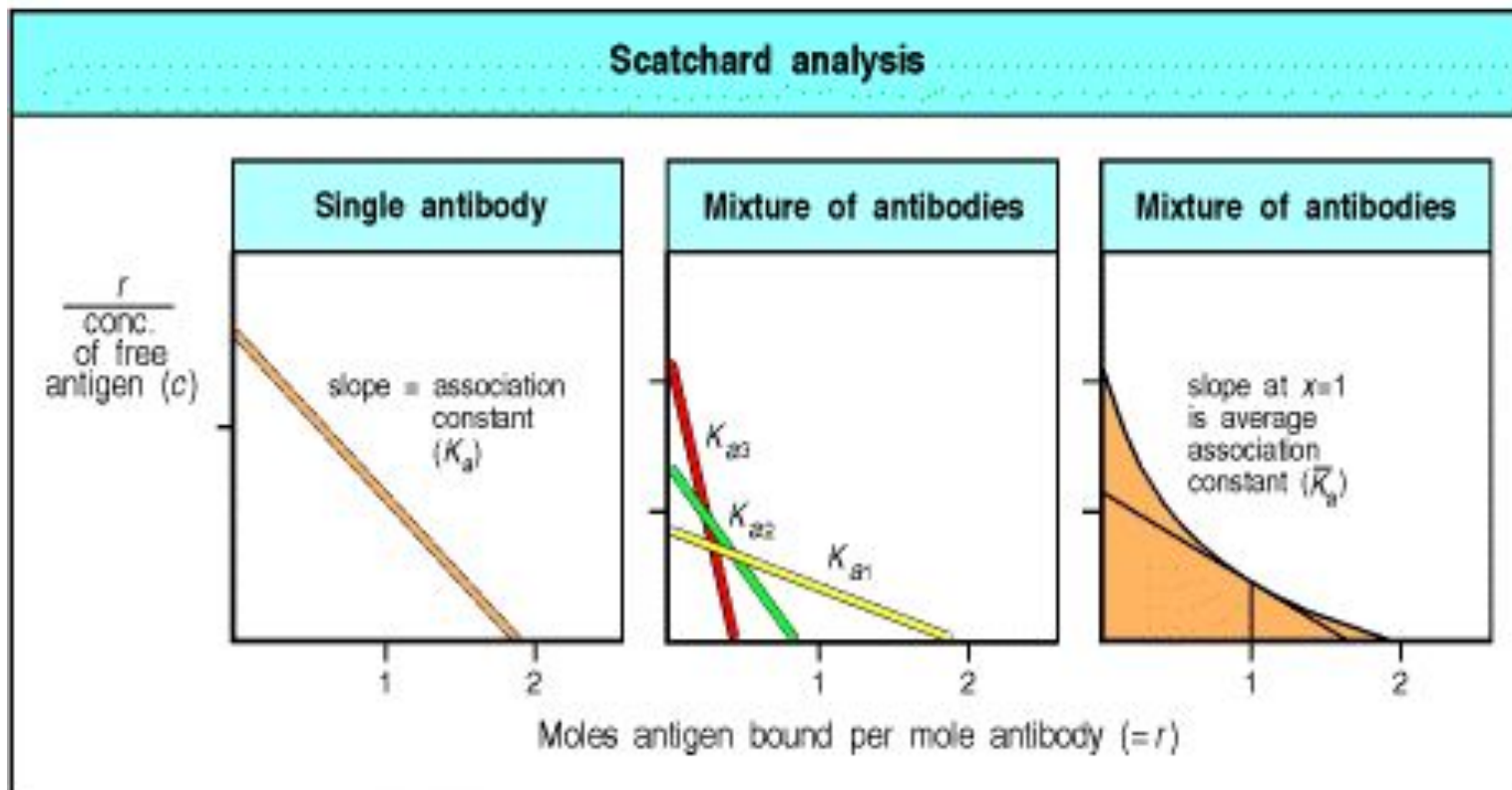




Рис. 16. Применение графика Скэтчарда для определения величины  $K$ . Для системы, характеризующейся одной константой равновесия ( $K$ ), получают прямую линию, наклон которой численно равен величине  $K$ , а точка пересечения с осью абсцисс отсекает от нее отрезок, равный общей концентрации связывающего агента.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ  
АНТИГЕН-АНТИТІЛО.  
ІМУНОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ.**

# Методи імунохімічного аналізу

- Прямі (безпосередні) методи визначення реакції антиген-антитіло. Комплекси, що при цьому утворюються, ідентифікують візуально або за допомогою простих оптичних приладів. До таких методів належать преципітація в розчині, гелі, аглютинація бактерій, аглютинація еритроцитів вірусами, антитілами (пряма гемаглютинація).
- Реакції пасивної аглютинації (тобто аглютинації частинок, з поверхнею яких зв'язані АТ чи АГ). Це - методи пасивної (непрямої) гемаглютинації, латексаглютинації, коаглютинації.
- Індикаторні методи, засновані на використанні різних міток (ізотопних, флуоресцентних, парамагнітних, ферментних), для виявлення реакції антиген-антитіло. Це - імуноферментний, імунофлуоресцентний, радіоімунологічний аналіз, імунохроматографічний аналіз і т.д.
- Метод імуносенсорів та метод генного зондування (Fish method).

# Чутливість різних імунохімічних методів досліджень

**TABLE 6-3** Sensitivity of various immunoassays

Assay	Sensitivity* ( $\mu\text{g}$ antibody/ml)
Precipitation reaction in fluids	20–200
Precipitation reactions in gels	
Mancini radial immunodiffusion	10–50
Ouchterlony double immunodiffusion	20–200
Immunoelectrophoresis	20–200
Rocket electrophoresis	2
Agglutination reactions	
Direct	0.3
Passive agglutination	0.006–0.06
Agglutination inhibition	0.006–0.06
Radioimmunoassay	0.0006–0.006
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	<0.0001–0.01
ELISA using chemiluminescence	<0.0001–0.01†
Immunofluorescence	1.0
Flow cytometry	0.06–0.006

\*The sensitivity depends upon the affinity of the antibody as well as the epitope density and distribution.

†Note that the sensitivity of chemiluminescence-based ELISA assays can be made to match that of RIA.

SOURCE: Adapted from N. R. Rose et al., eds., 1997, *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 5th ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.



# Експериментальні підходи, які використовуються в імунохімічних методах

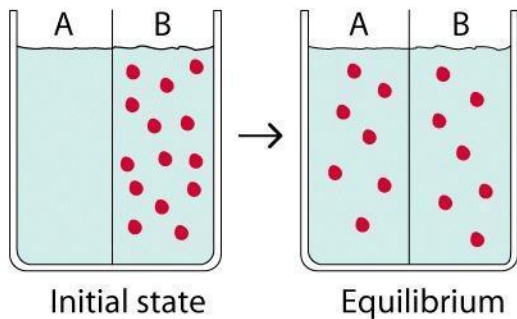
- Методичні підходи, що засновані на зміні фізико-хімічних властивостей антигенів (антитіл) під час утворення комплексу: зміна флуоресценції, зміна ступеня поляризації флуоресценції і т.д.
- Розділення вільного і зв'язаного антигену, яке відбувається з залученням методів фракційного осадження (центрифугування), рівноважного діалізу, гель-фільтрації.

# Рівноважний діаліз. Визначення афінності антитіл методом рівноважного діалізу

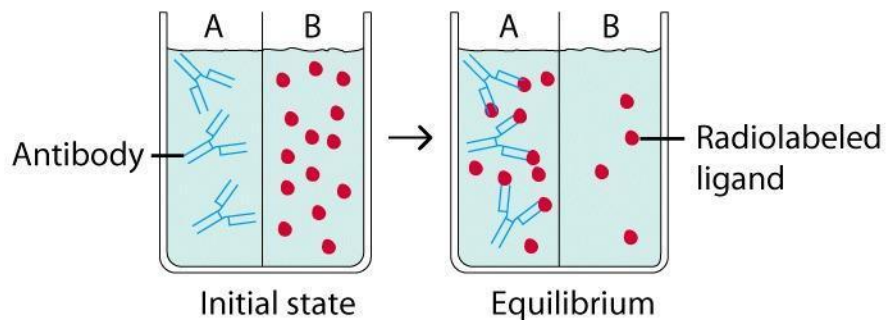
$$\kappa_a = \frac{B}{F \cdot (n - B)}$$

(a)

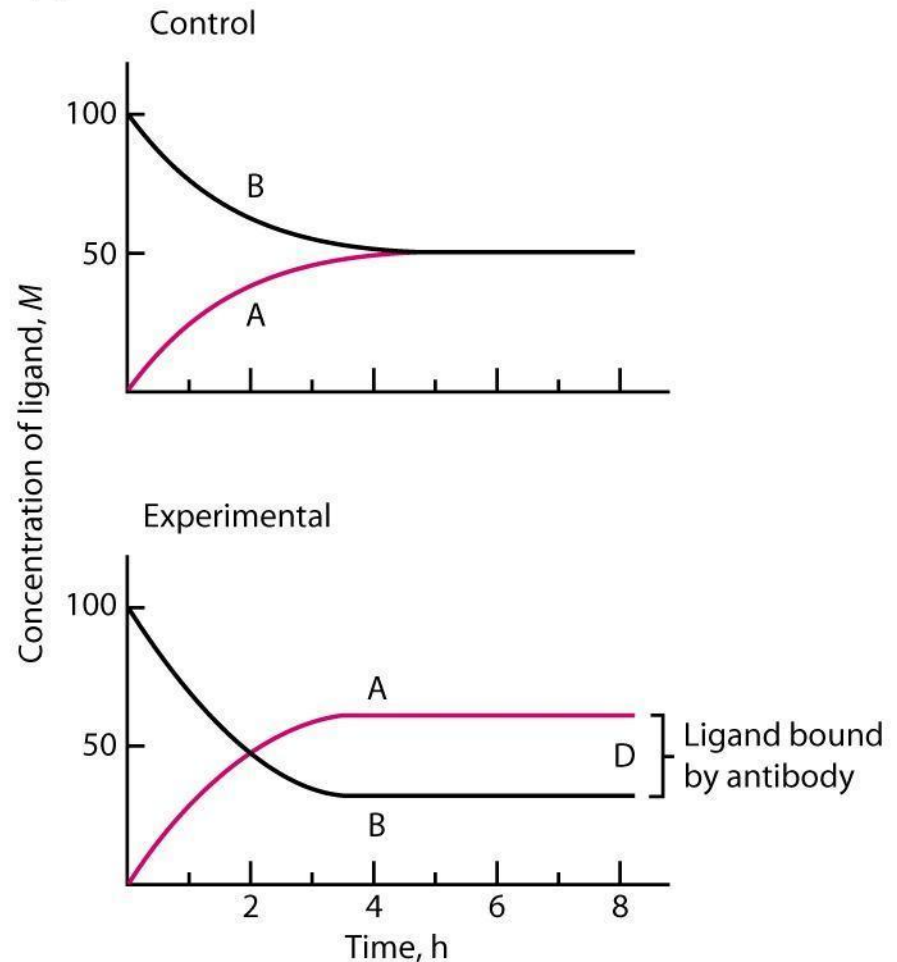
Control: No antibody present  
(ligand equilibrates on both sides equally)



Experimental: Antibody in A  
(at equilibrium more ligand in A due to Ab binding)

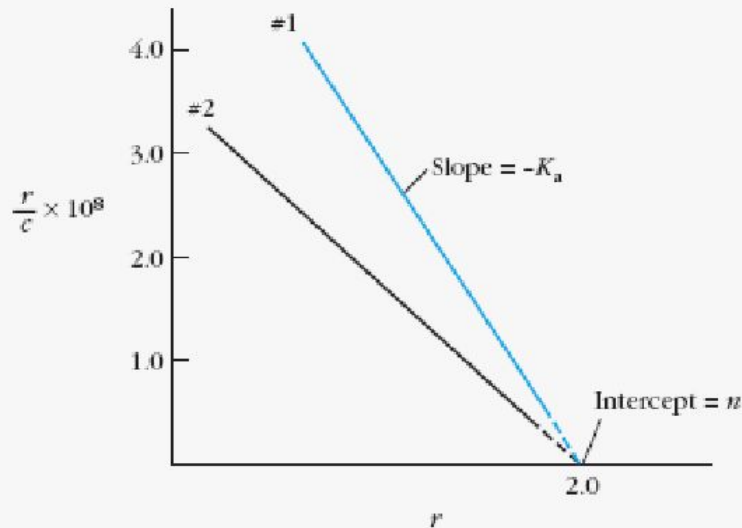


(b)

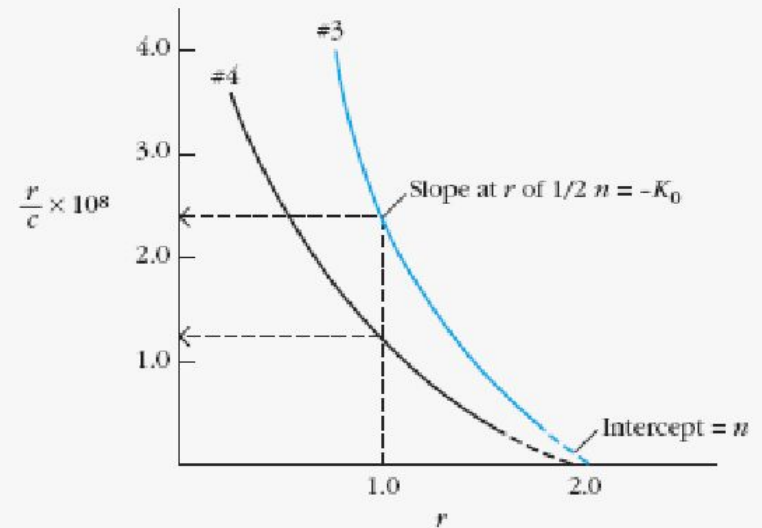


# Рівноважний діаліз

(a) Homogeneous antibody



(b) Heterogeneous antibody



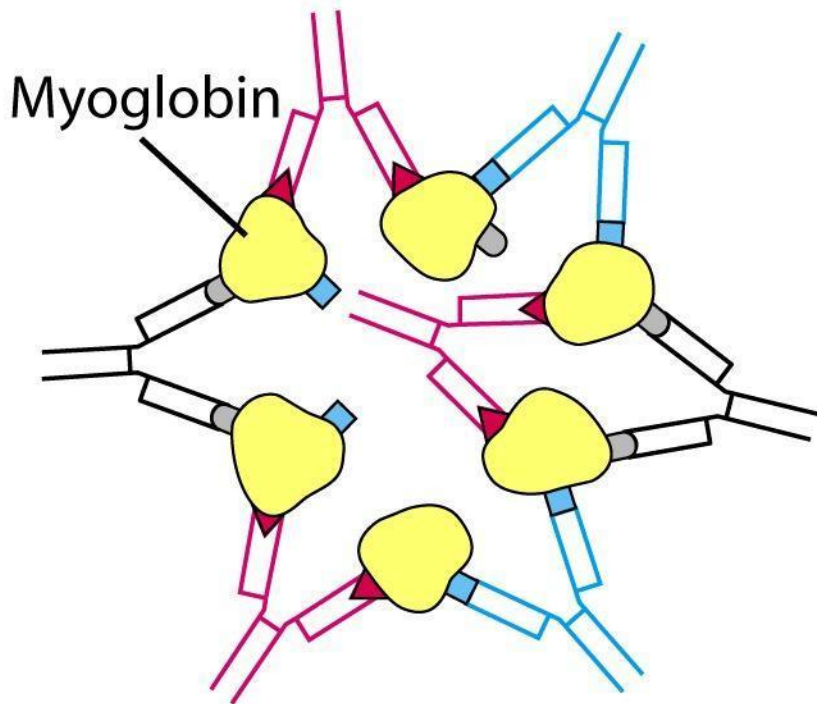
**FIGURE 6-3** Scatchard plots are based on repeated equilibrium dialyses with a constant concentration of antibody and varying concentration of ligand. In these plots,  $r$  equals moles of bound ligand/mole antibody and  $c$  is the concentration of free ligand. From a Scatchard plot, both the equilibrium constant ( $K_a$ ) and the number of binding sites per antibody molecule ( $n$ ), or its valency, can be obtained. (a) If all antibodies have the same affinity, then a Scatchard plot yields a straight line with a slope of  $-K_a$ . The x intercept is  $n$ , the valency of the antibody, which is 2 for IgG and other divalent Igs. For IgM, which is pentameric,  $n = 10$ , and for dimeric IgA,  $n = 4$ . In this

graph, antibody #1 has a higher affinity than antibody #2. (b) If the antibody preparation is polyclonal and has a range of affinities, a Scatchard plot yields a curved line whose slope is constantly changing. The average affinity constant  $K_0$  can be calculated by determining the value of  $K_a$  when half of the binding sites are occupied (i.e., when  $r = 1$  in this example). In this graph, antiserum #3 has a higher affinity ( $K_0 = 2.4 \times 10^8$ ) than antiserum #4 ( $K_0 = 1.25 \times 10^8$ ). Note that the curves shown in (a) and (b) are for divalent antibodies such as IgG.

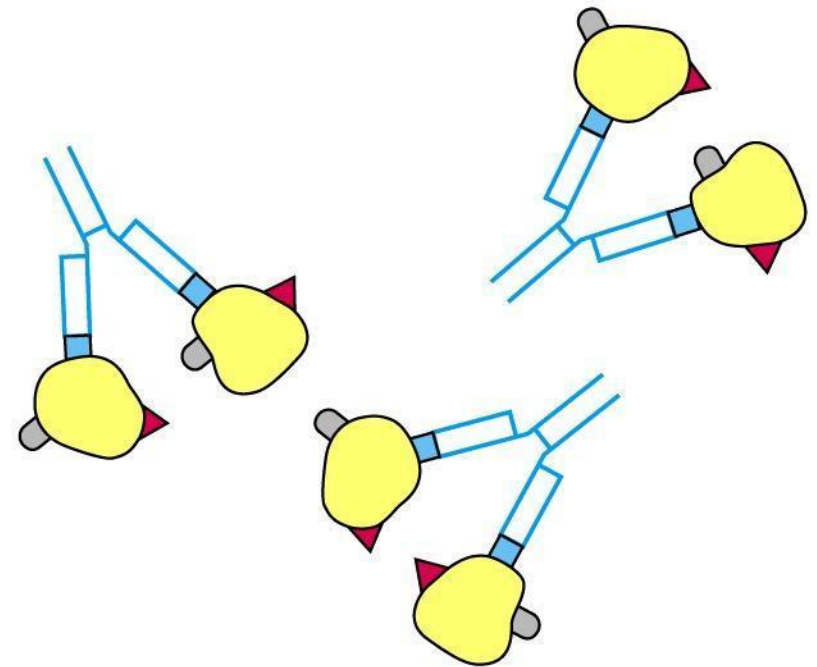
# РЕАКЦІЇ ПРЕЦИПІТАЦІЇ

# Характеристика антигенів і антитіл в реакціях преципітації і аглютинації

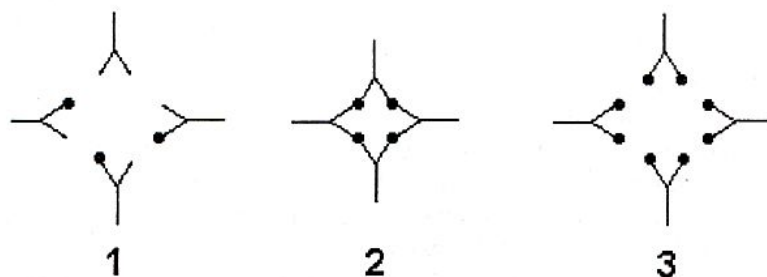
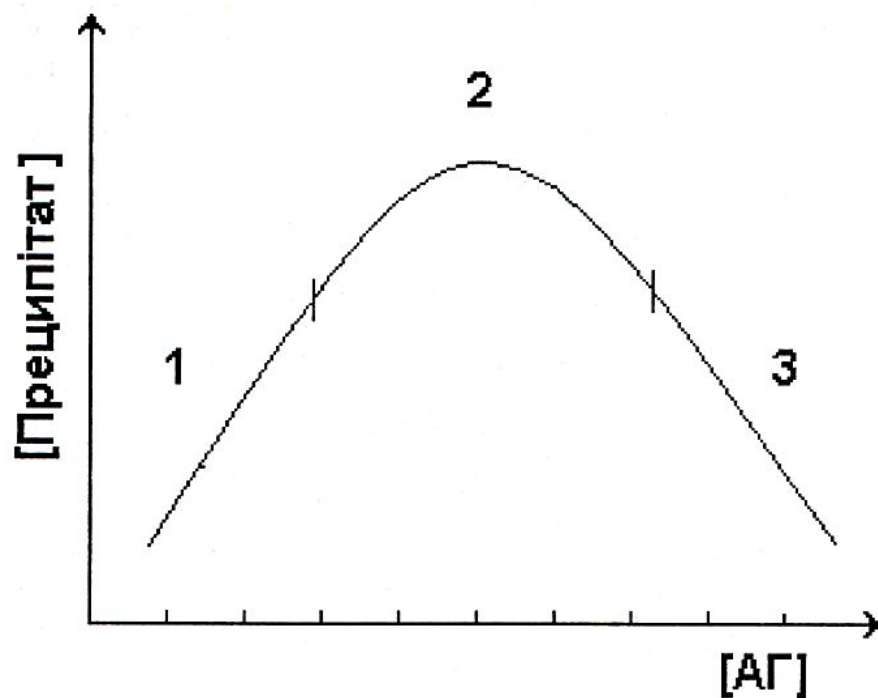
POLYCLONAL ANTISERUM



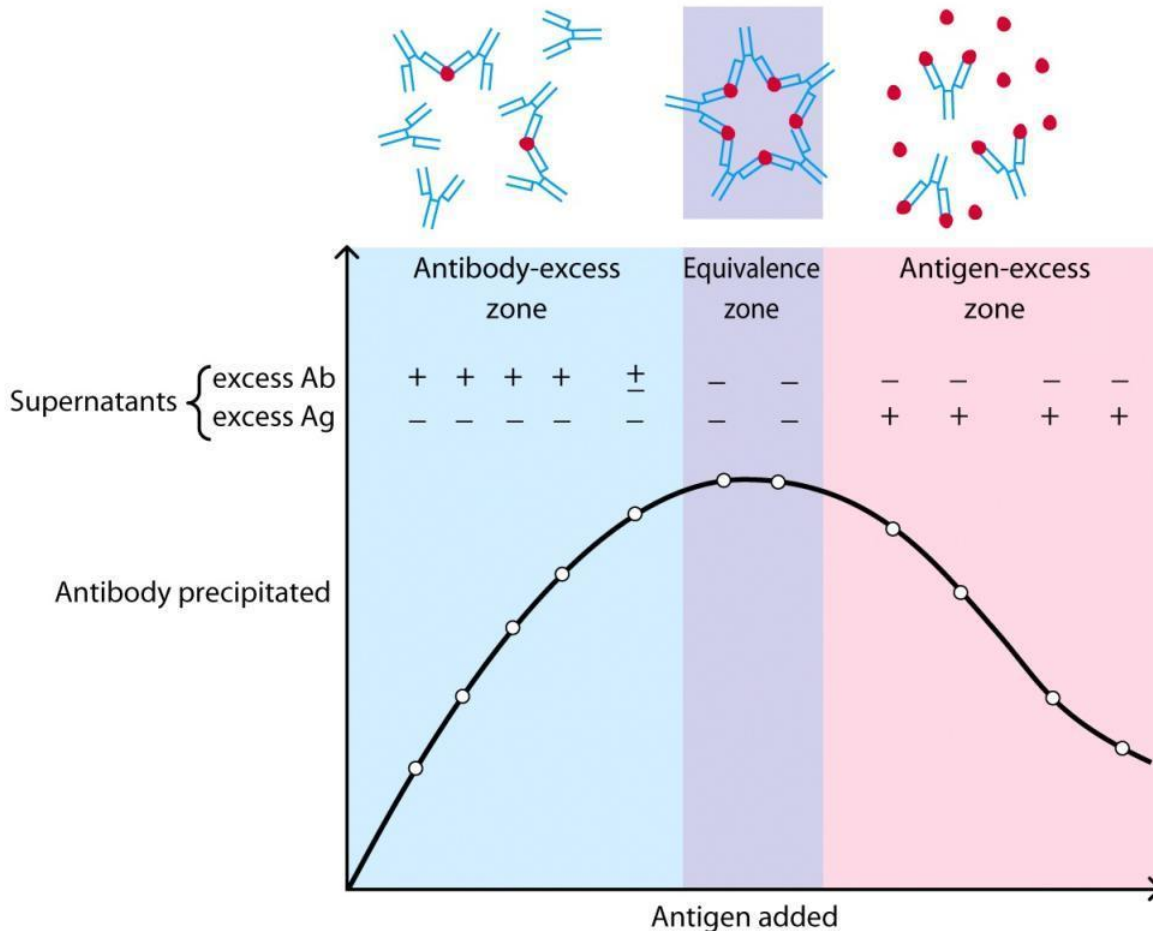
MONOCLONAL ANTIBODY



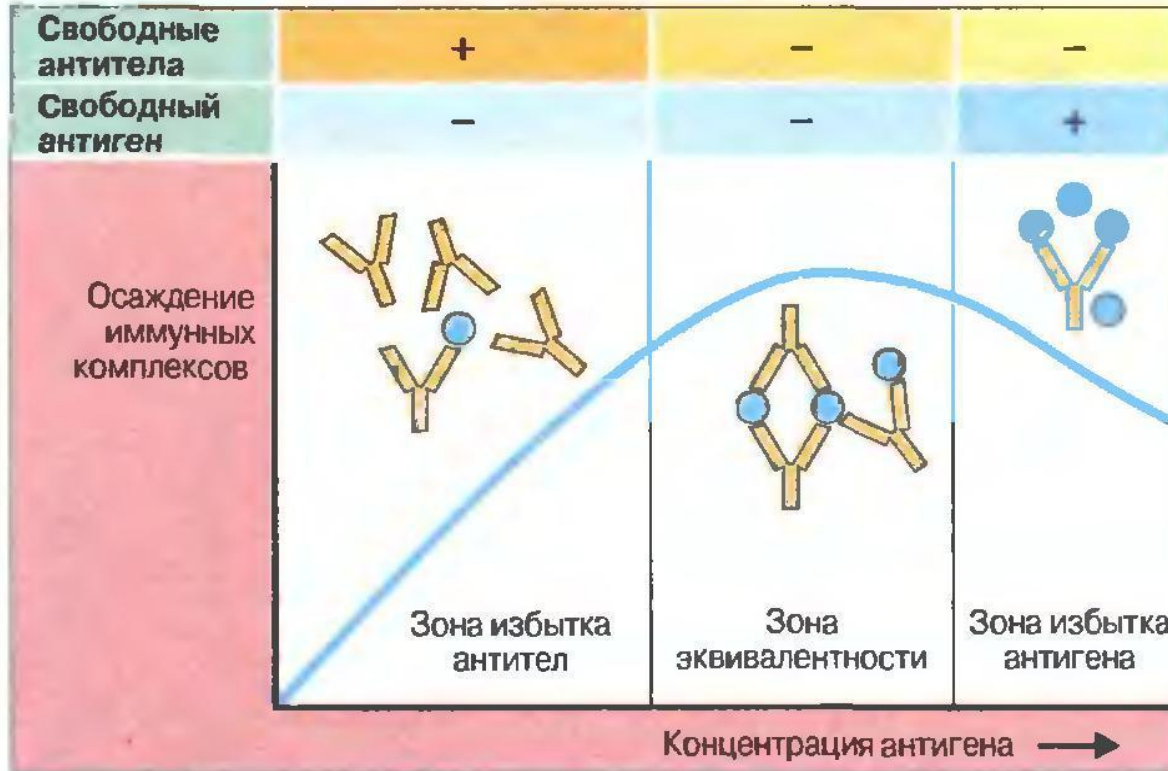
# Крива преципітації Гейдельберга і типи утворених імунних комплексів при різних співвідношеннях вмісту антигену і антитіл



Співвідношення концентрацій антигенів і антитіл, коли спостерігається утворення максимального осаду (преципітату), називається точкою еквівалентності реакції. Мінімальні і максимальні значення співвідношень АГ/АТ, в межах яких ще спостерігаються доступні оку осаді, визначають як зону еквівалентності.

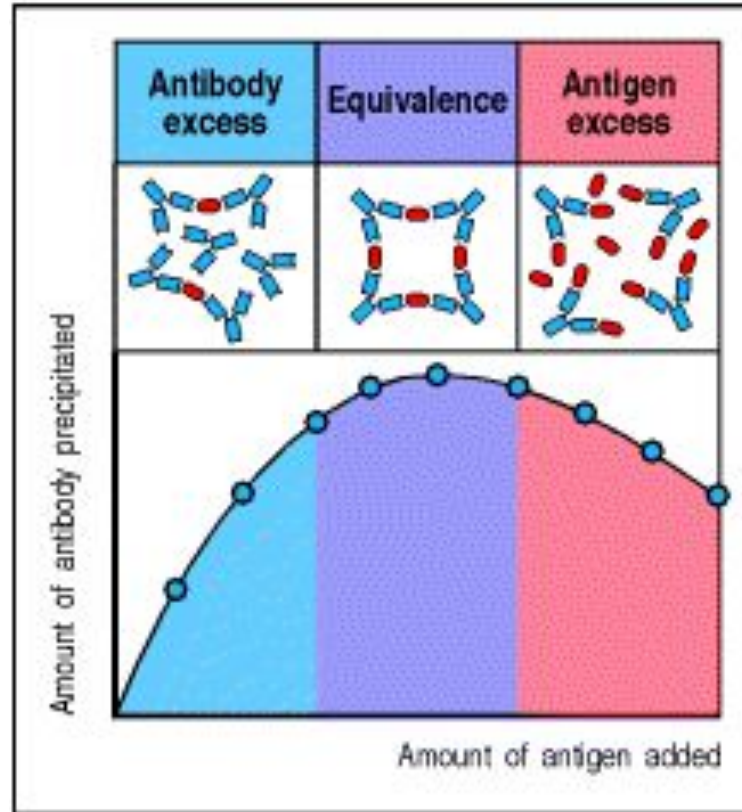


## Реакция преципитации

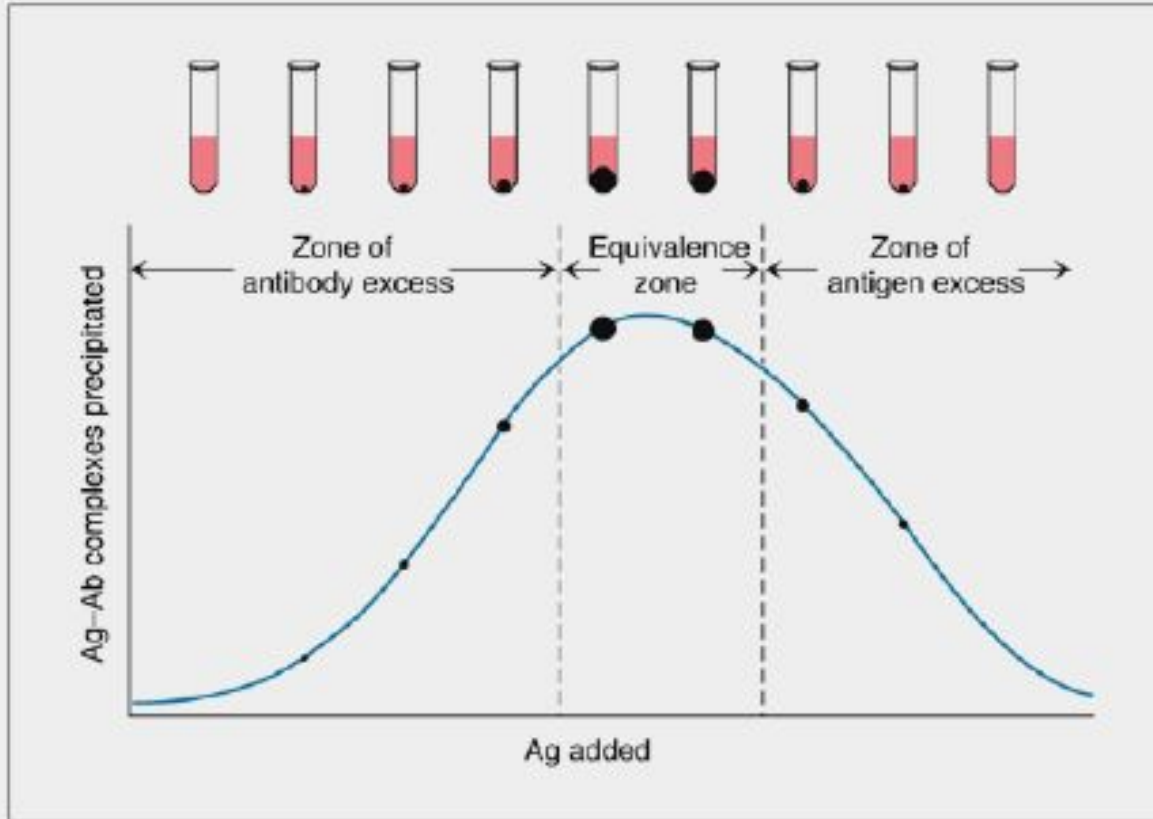




# Антитіла преципітують розчинний антиген. Крива Гейдельберга.



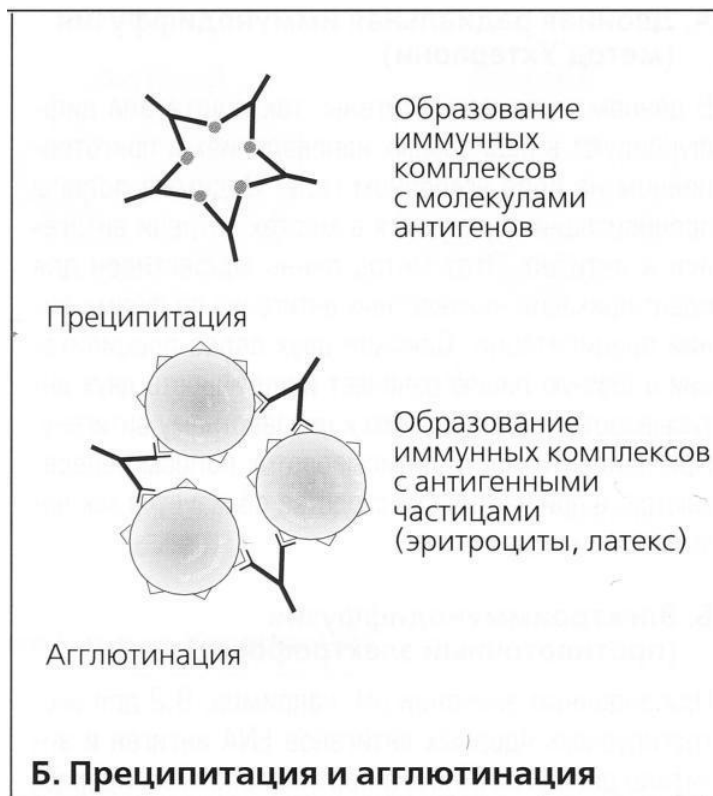
## Representation of Precipitin Reaction



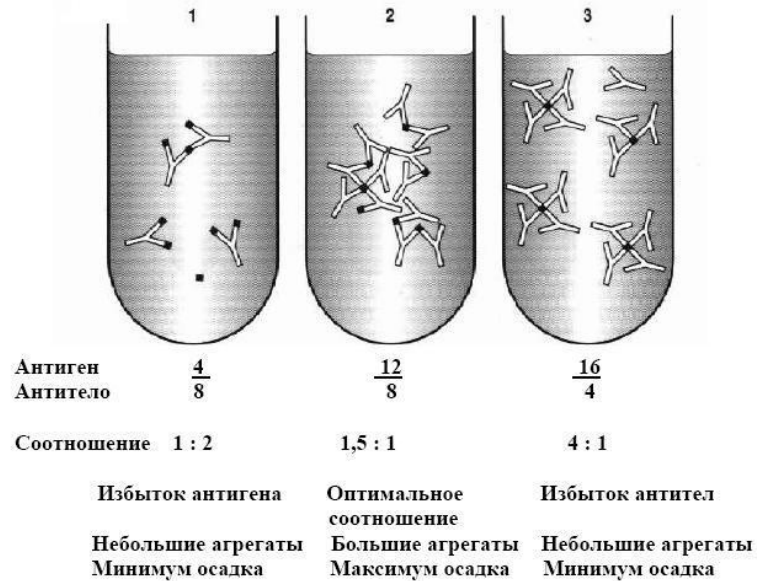
**Реакції аглютинації** – осадження антитілами корпускулярних антигенів (клітин, вірусних часточок і т.д), реакції преципітації- осадження молекул, що мають антигенні властивості.

**Реакції преципітації** використовують для високодисперсних антигенів, які визначаються окремими молекулами. На відміну від реакцій аглютинації - реакція утворення осаду в реакції преципітації йде досить повільно, сам

преципітат має нижчу щільність і може з часом дисоціювати.

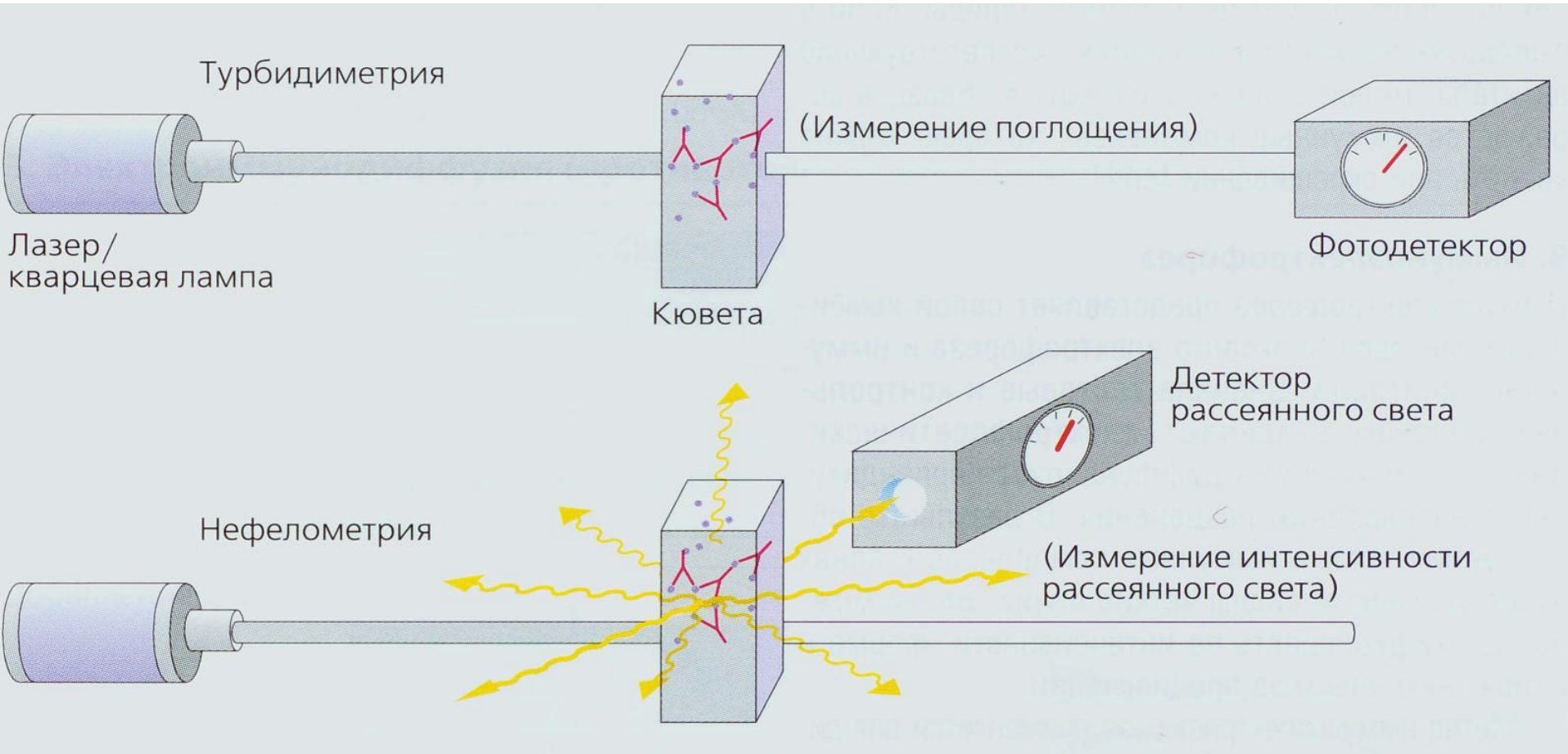


## КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ОТНОШЕНИЯ АНТИГЕН-АНТИТЕЛО ПРИ АГГЛЮТИНАЦИИ И ПРЕЦИПИТАЦИИ



Антиген 4-валентный, т. е. способен реагировать с 4-мя антителами  
 Антитело имеет 2 антигенсвязывающих участка

# Реакція преципітації в рідкій фазі

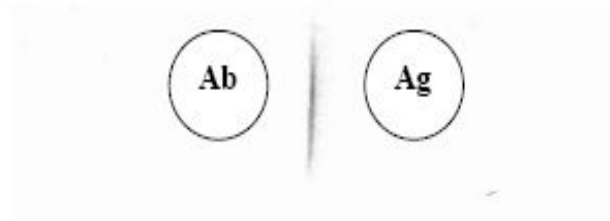


# Реакції преципітації в гелі

# Подвійна імунодифузія-метод Ухтерлоні

1. В отдельные лунки вносят раствор, содержащий антиген и суспензию антител.
2. Оставляют систему в условиях, обеспечивающих диффузию обоих компонентов.
3. Через положенное время фиксируют образование осадка в геле между лунками.  
При необходимости гель отмывают от не вошедших в комплексы белков и окрашивают красителем, связывающимся с белками (например, Кумасси синим)

## **A. В исследуемом образце присутствует один антиген**

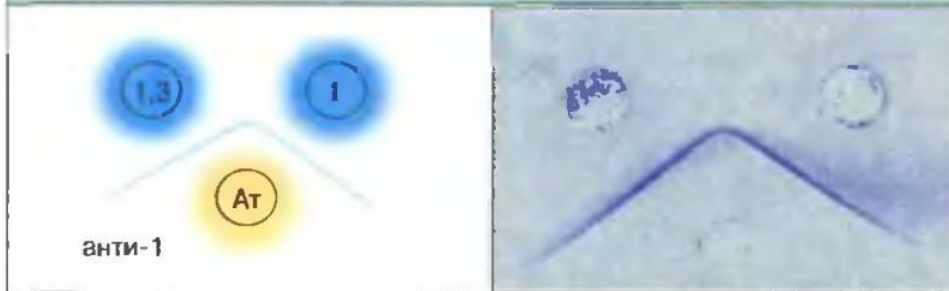


## **B. В исследуемом образце присутствует два антигена, способных взаимодействовать с данными антителами**



## Реакция преципитации в геле: двойная иммунодиффузия

### 1. Идентичные эпитопы



### 2. Неидентичные антигены



### 3. Частично идентичные эпитопы



## Подвійна імунодифузія- метод Ухтерлоні

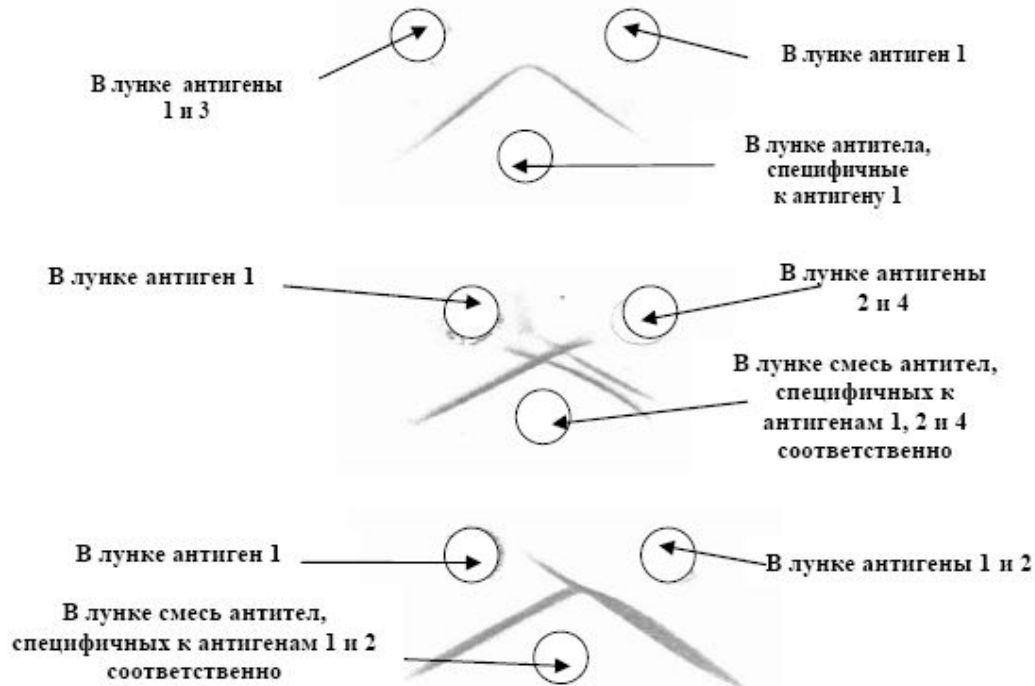
Використовується одна  
антисироватка і два  
зразка, які аналізують  
на присутність данного  
антигена



# Подвійна імунодифузія - метод Ухтерлоні

Використовується одна антисироватка і два зразка, які аналізують на присутність даного антигена

С. Использована одна антисыворотка и два образца, анализируемых на присутствие данного антигена

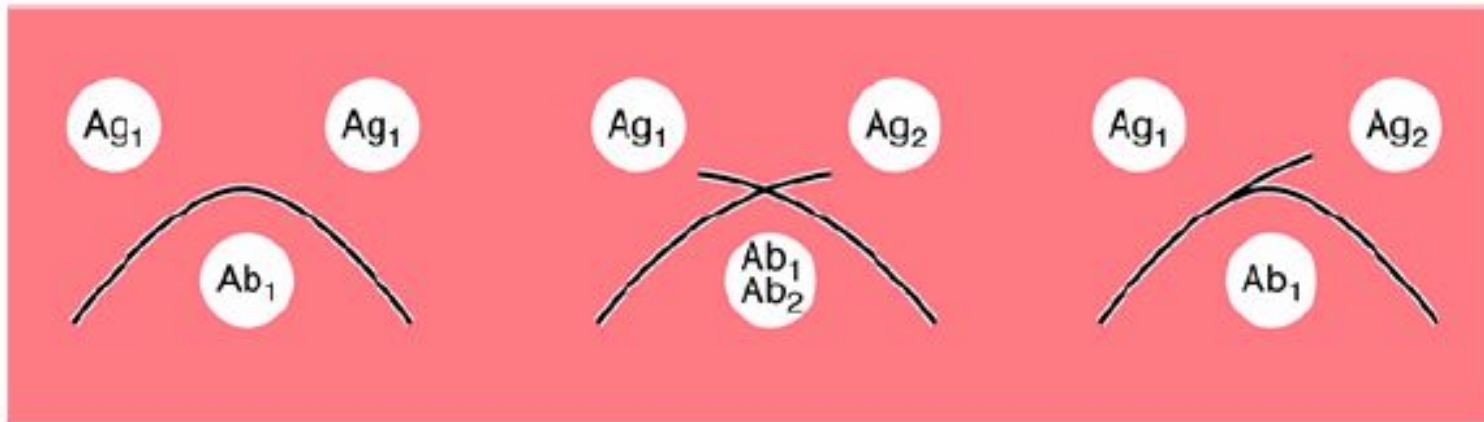


# Подвійна імунодифузія - метод Ухтерлоні

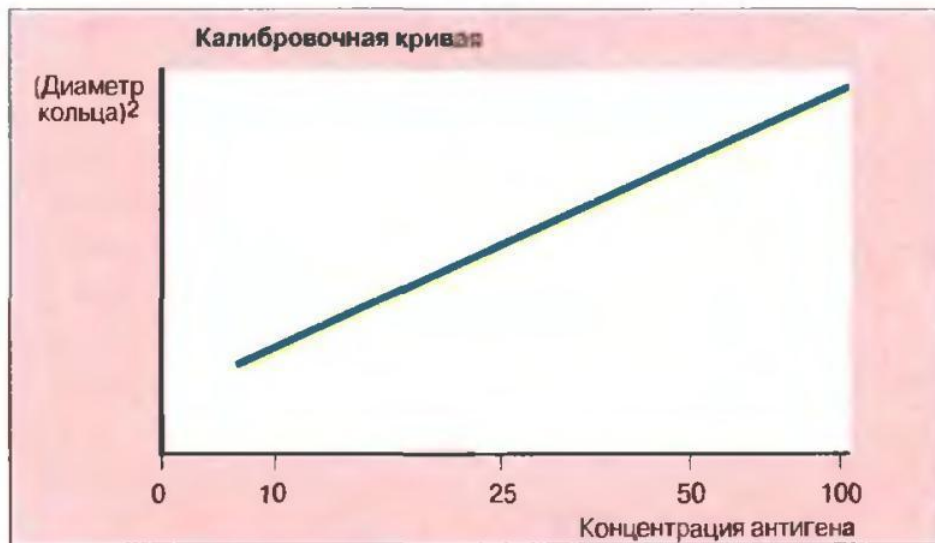
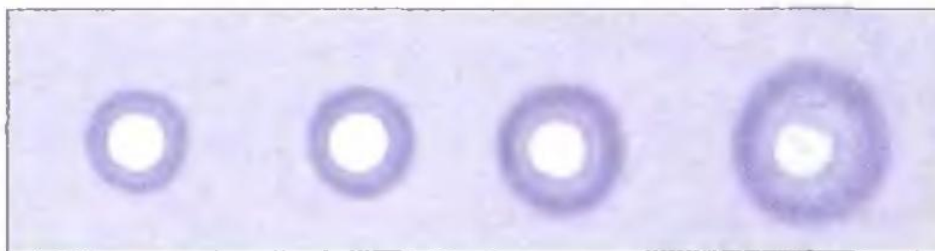
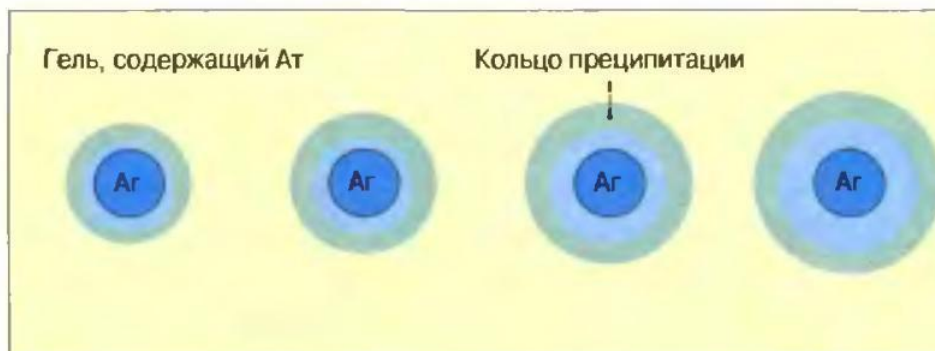
## Double Diffusion (Ouchterlony)

When both Ab and Ag diffuse towards each other and give different patterns

1. Patterns of Identity (identical ag in the wells)
2. Patterns of Non-identity (non identical ab and ag in the wells)
3. Patterns of Partial Identity (Ag<sub>2</sub> has some epitopes of Ag<sub>1</sub>)



## Простая радиальная иммунодиффузия

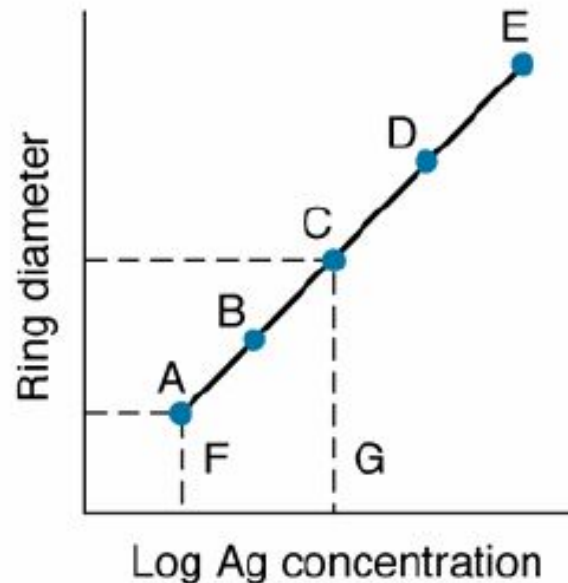
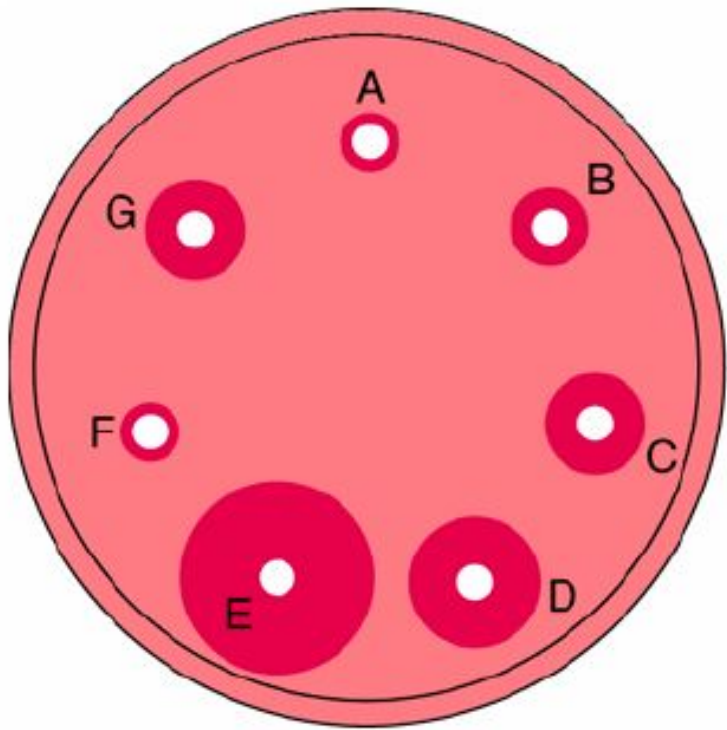


Проста радіальна  
імунодифузія.  
Метод Манчіні.

# Проста радіальна імунодифузія. Метод Манчіні.

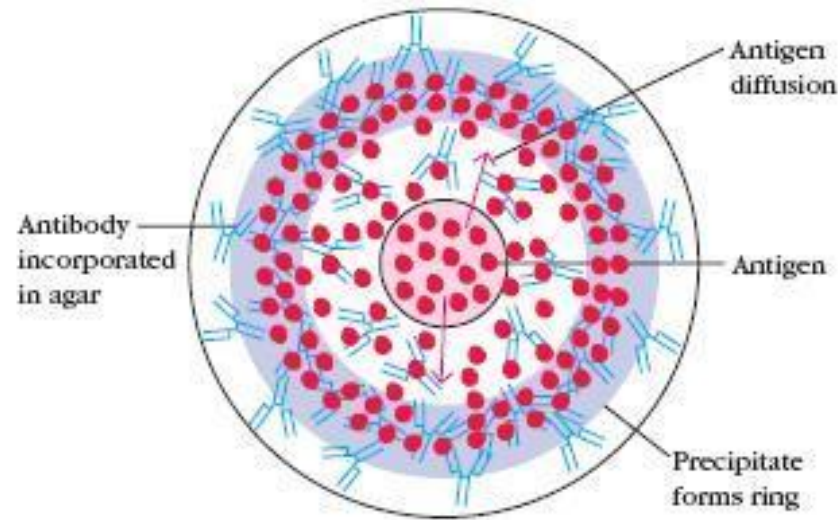
## Radial Immunodiffusion

The wells contain ag at different concentration while the ab is distributed uniformly in the agar. Thus the precipitin line is replaced by the diffusion ring. The distance the precipitin ring migrates from the center of the ag well is directly proportional to the concentration of the ag. Concentration of the unknown can be calculated by plotting the graph comparing the diameter of the rings of the known concentration.

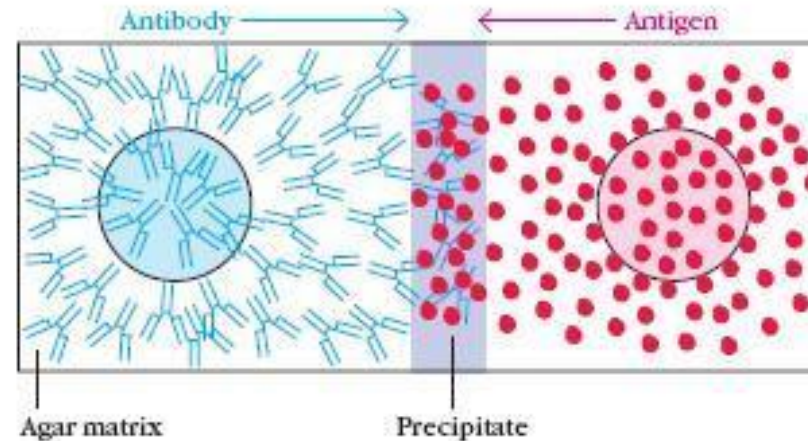


# Проста радіальна імунодифузія. Подвійна імунодифузія.

RADIAL IMMUNODIFFUSION



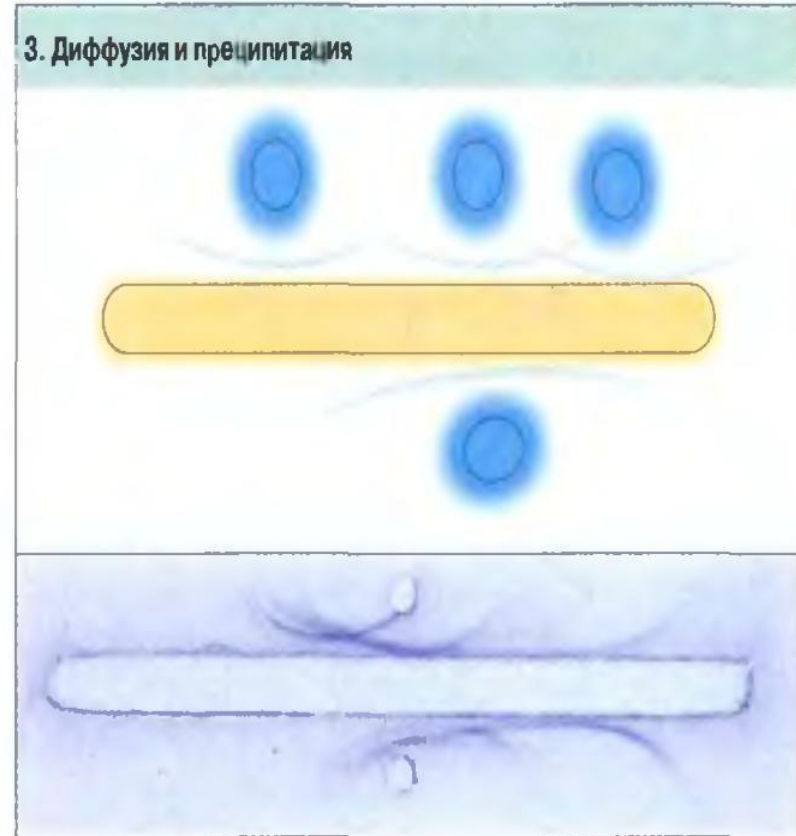
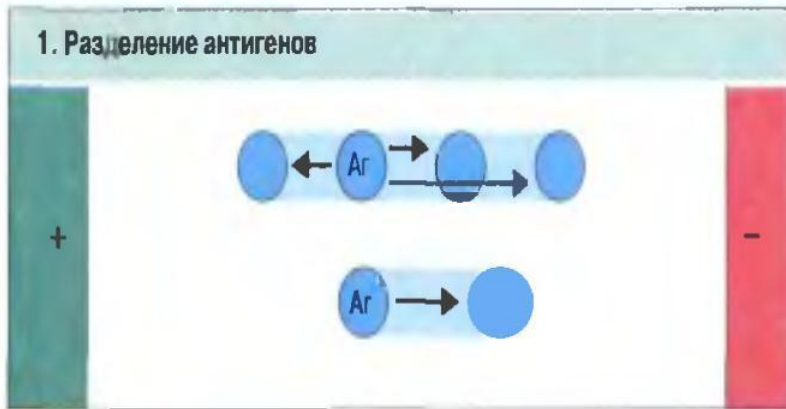
DOUBLE IMMUNODIFFUSION



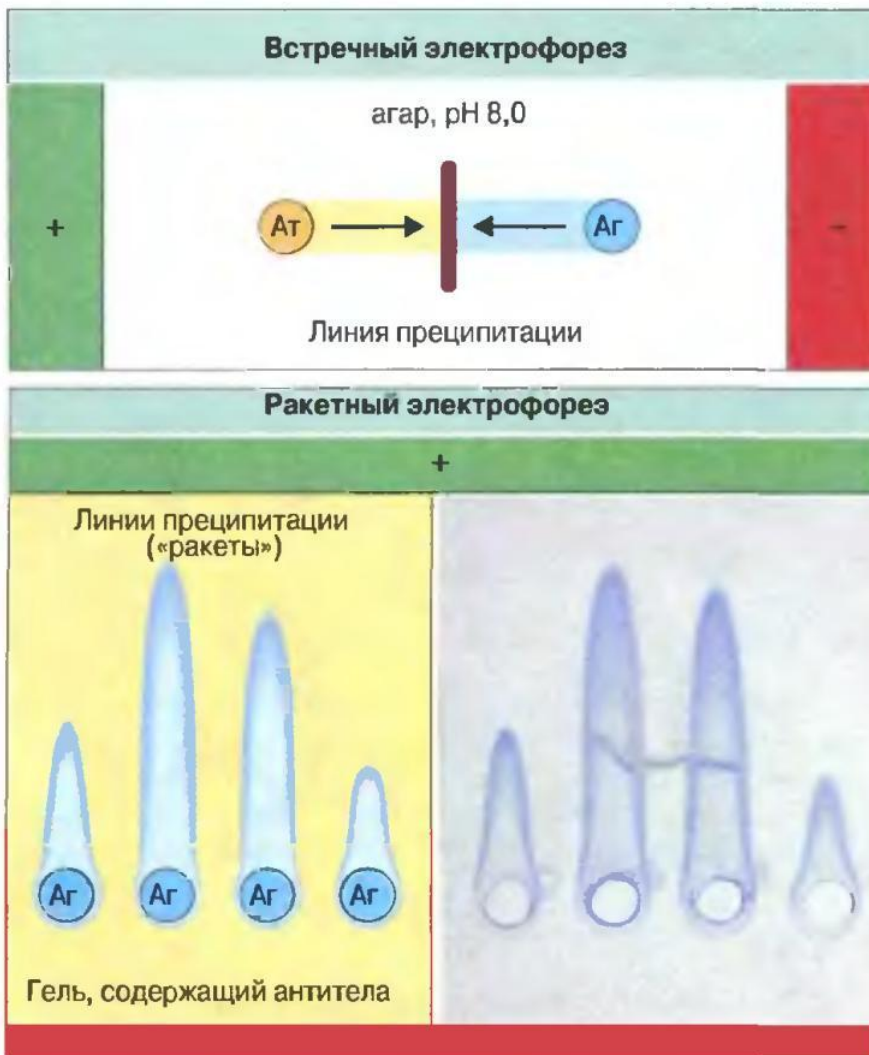


# Імуноелектрофорез

## Иммуноэлектрофорез

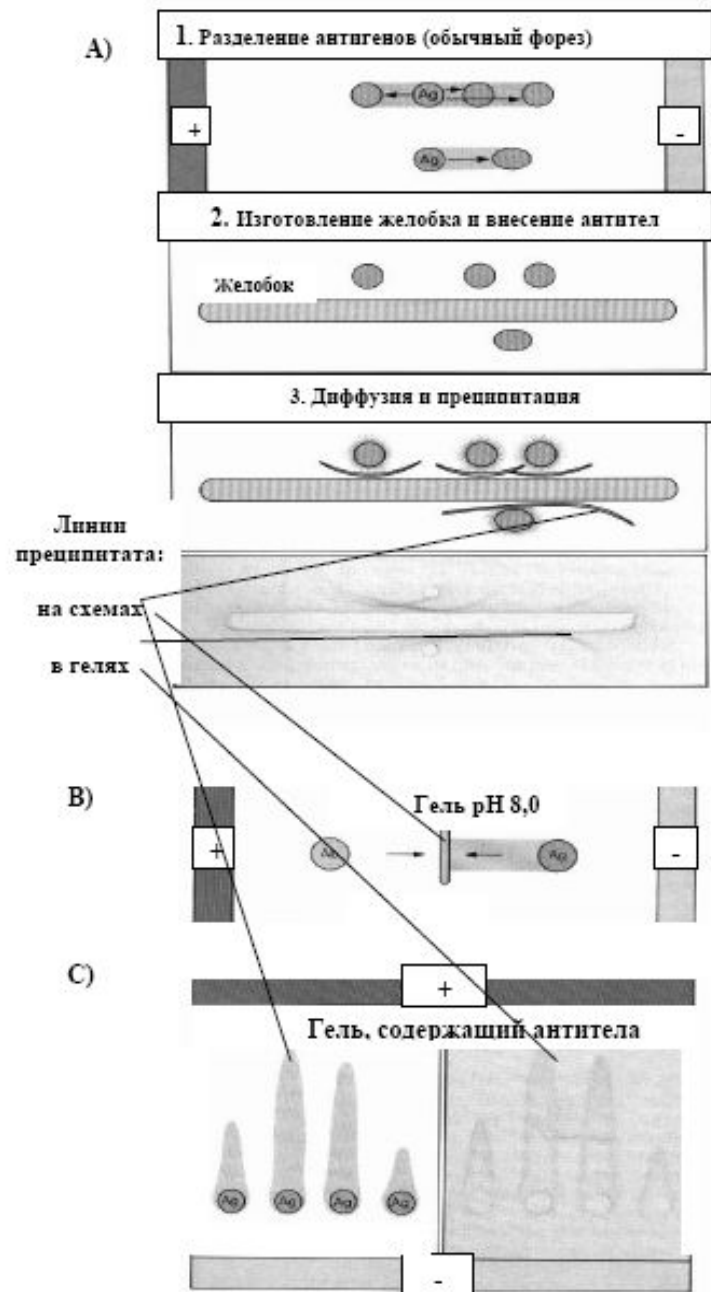


## Встречный электрофорез и ракетный электрофорез



# ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ

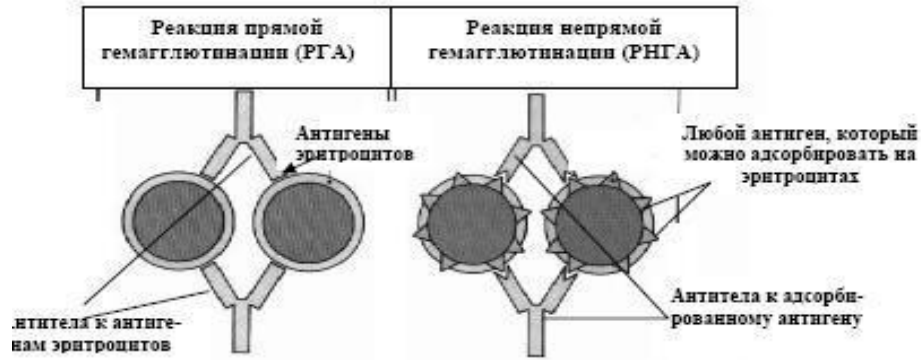
А) – обычный, В) – встречный, С) – ракетный



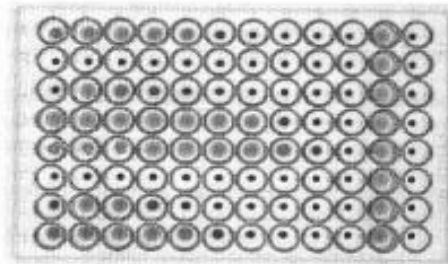


# Реакції гемаглютинації та аглютинації

## РЕАКЦИИ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

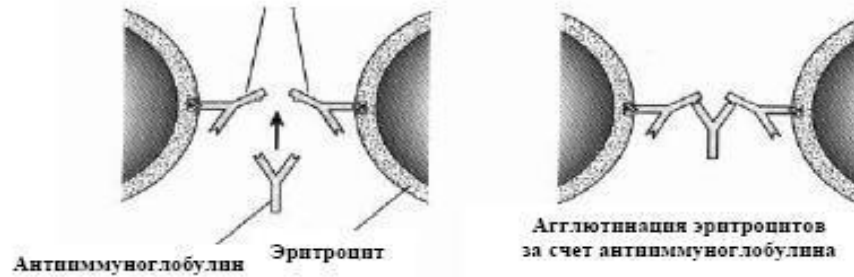


Разведения анализируемых сывороток    Контроли  
 2   4   8   16   32   64   128   256   512   1024 ПН



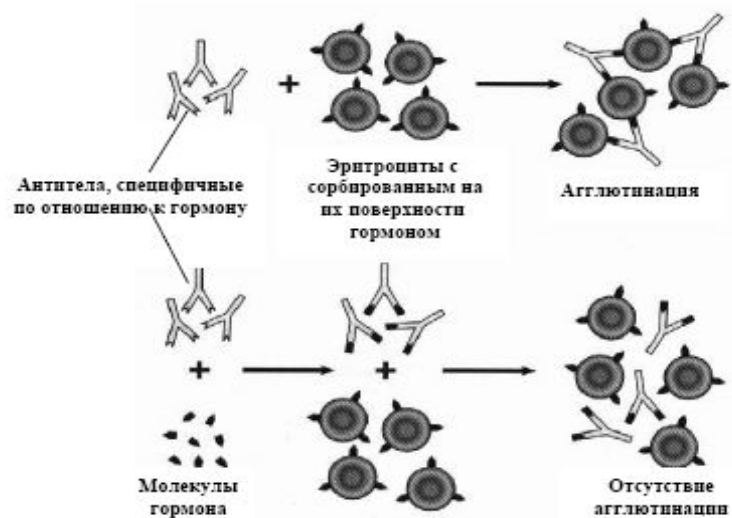
Реакция Кумбса

Неполные антитела

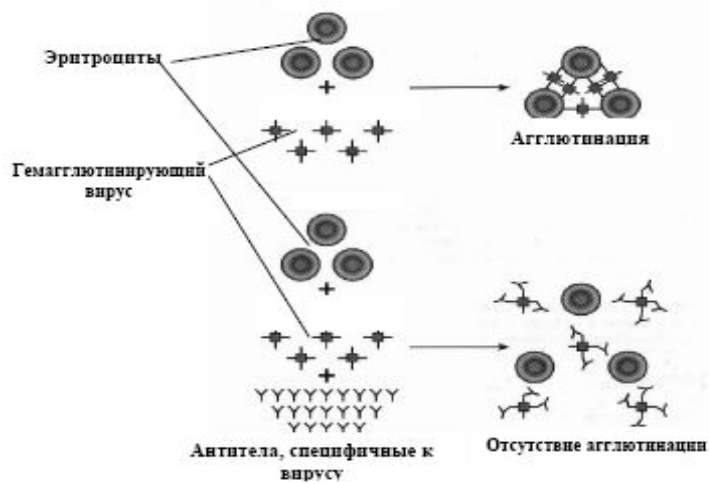


## ИНГИБИРОВАНИЕ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

### А. Определение гормонов

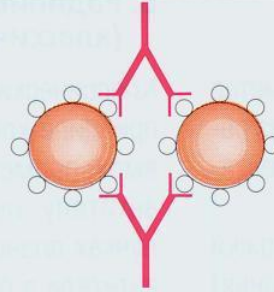


### В. Тест на выявление антител против гемагглютинирующих вирусов (грипп, эпидемический паротит)



# Методи аглютинації

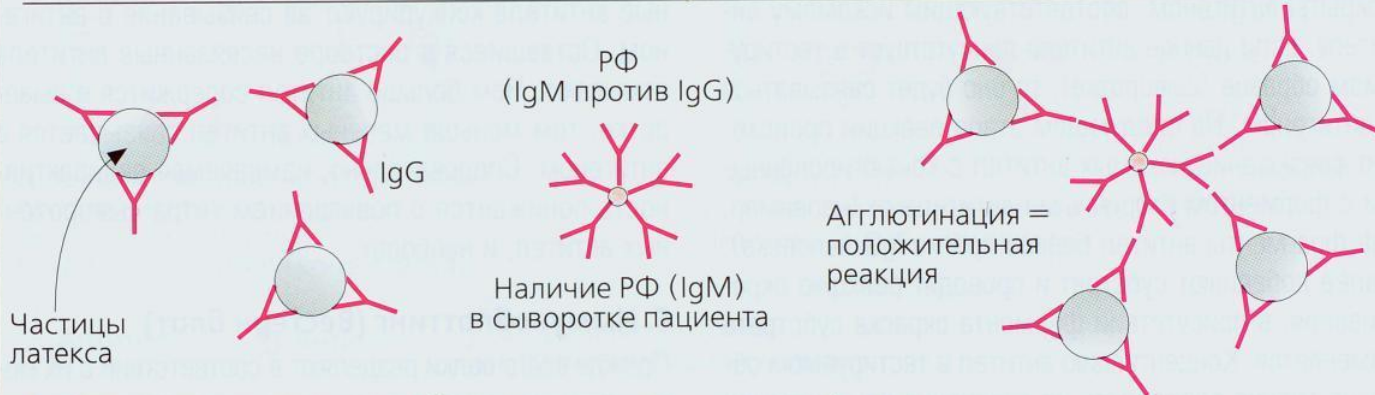
Агглютинація  
несущих антигены  
тестовых эритроцитов  
при наличии  
в сыворотке пациента  
специфических антител



До проведения реакции:  
химическое связывание



## 1. Гемагглютинация



## 2. Латексная агглютинация: обнаружение ревматоидного фактора

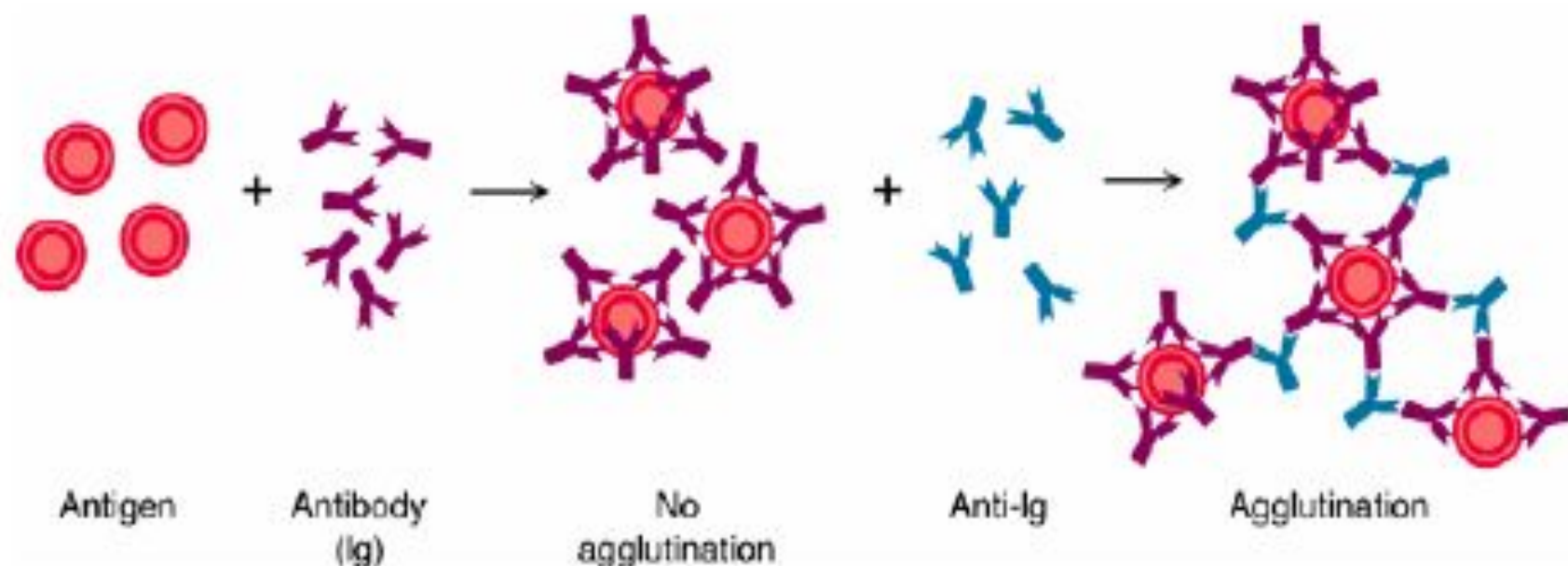
### А. Методы агглютинации

## The Coombs Test

Antibodies against Immunoglobulins also called anti-immunoglobulin test.

Assumptions:

1. Ig from one species are immunogenic when injected to another species
2. many of anti-immunoglobulin bind with antigenic determinants present on the Fc portion of the antibody and leave the Fab portion free to react with antigen



# RIA

## радіоімунний аналіз



Roger Guillemin



Andrew V. Schally

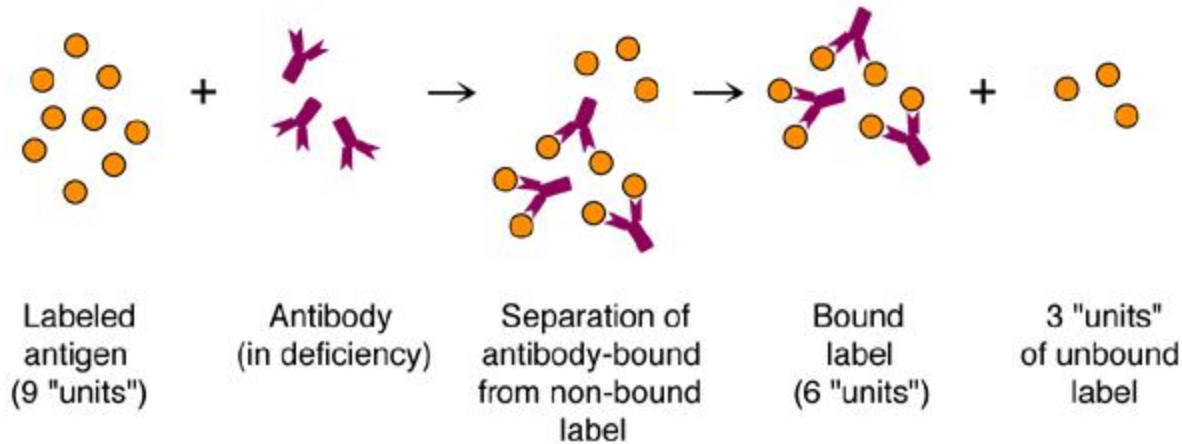


Rosalyn Yalow

**The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1977 was divided, one half jointly to Roger Guillemin and Andrew V. Schally *"for their discoveries concerning the peptide hormone production of the brain"* and the other half to Rosalyn Yalow *"for the development of radioimmunoassays of peptide hormones"*.**

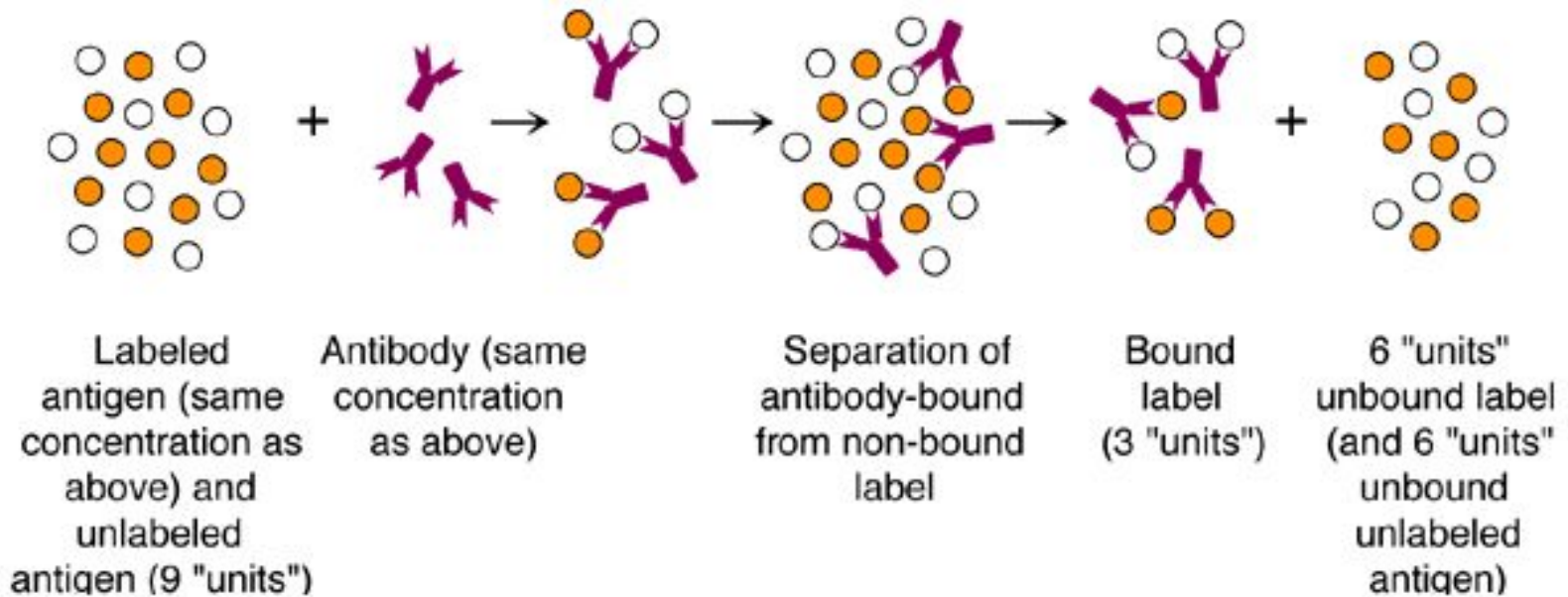
# Конкурентні імунохімічні методи

Amount of label bound to antibody after incubation of constant amounts of antibody and labeled antigen



# RIA

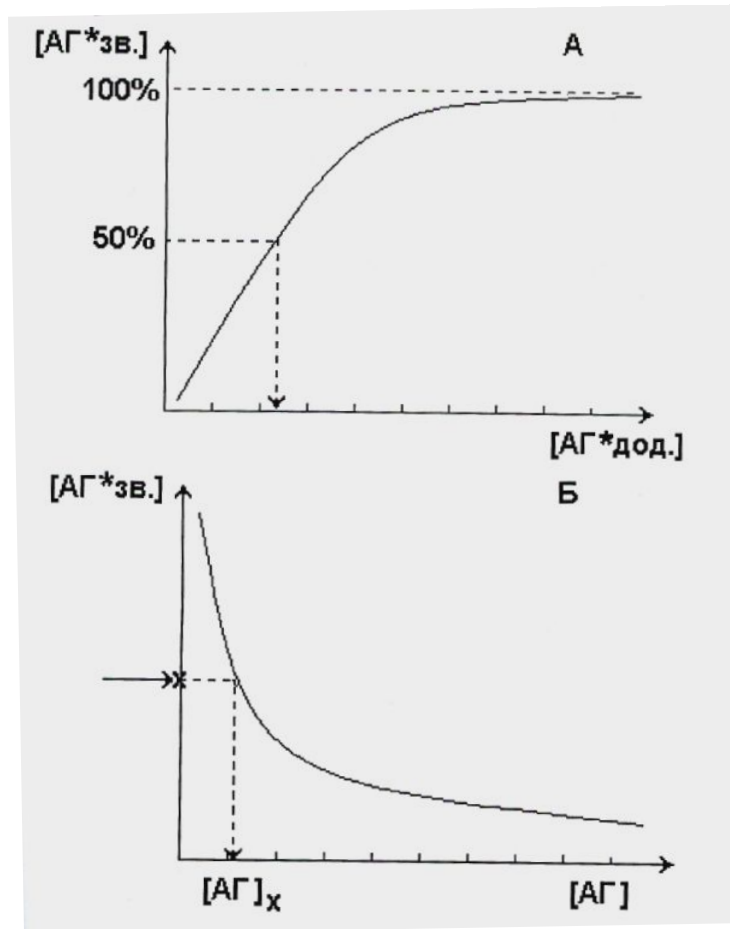
## радіоімунний аналіз



В основі RIA – конкуренція міченого і неміченого антигену за зв'язування зі специфічними антитілами



*Аналіз зв'язування антигену з антитілом. Для РІА: А — крива насичення зв'язування міченого (\*) антигену з постійною кількістю антитіл. В — крива конкуренції зв'язування міченого антигену неміченим і визначення концентрації антигену X*



# Різні методи побудови калібрувальних кривих

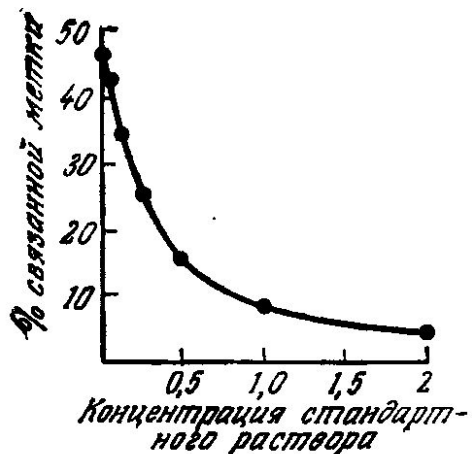


Рис. 1.8

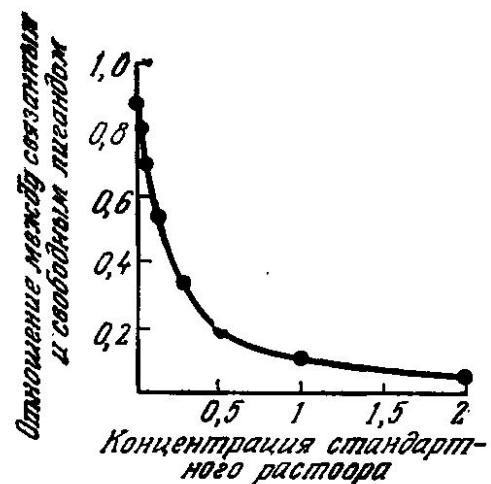


Рис. 1.9

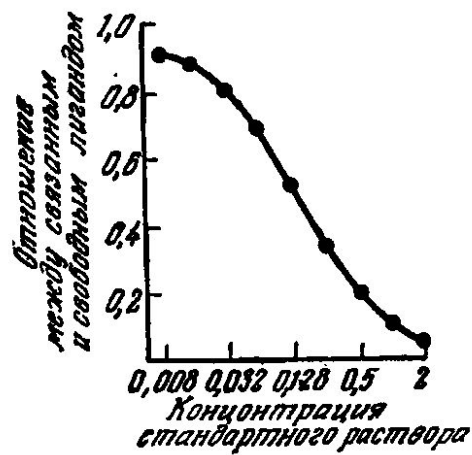


Рис. 1.10

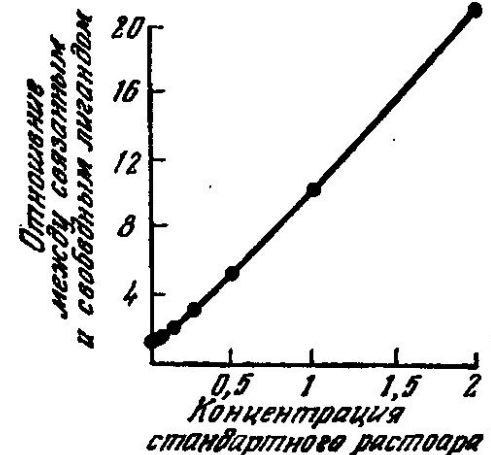


Рис. 1.11

# Різні методи побудови калібрувальних кривих

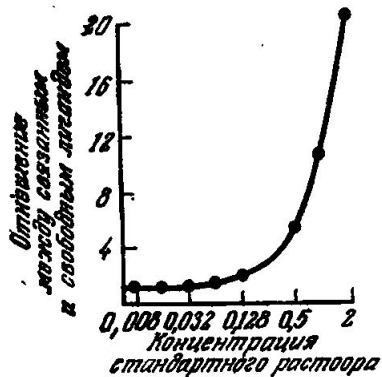


Рис. 1.12.

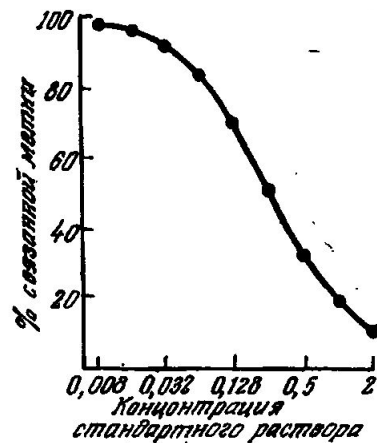


Рис. 1.13.

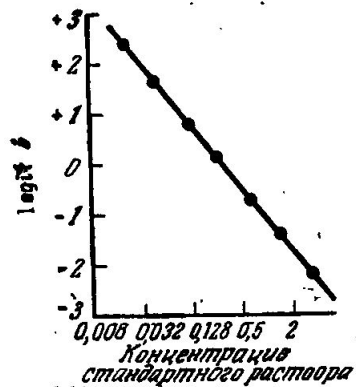


Рис. 1.14.

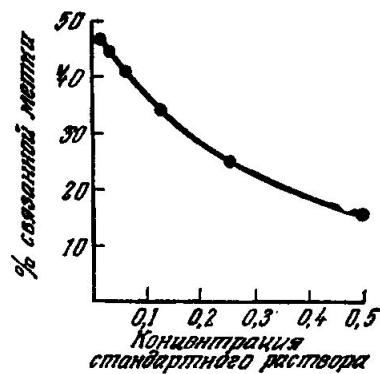
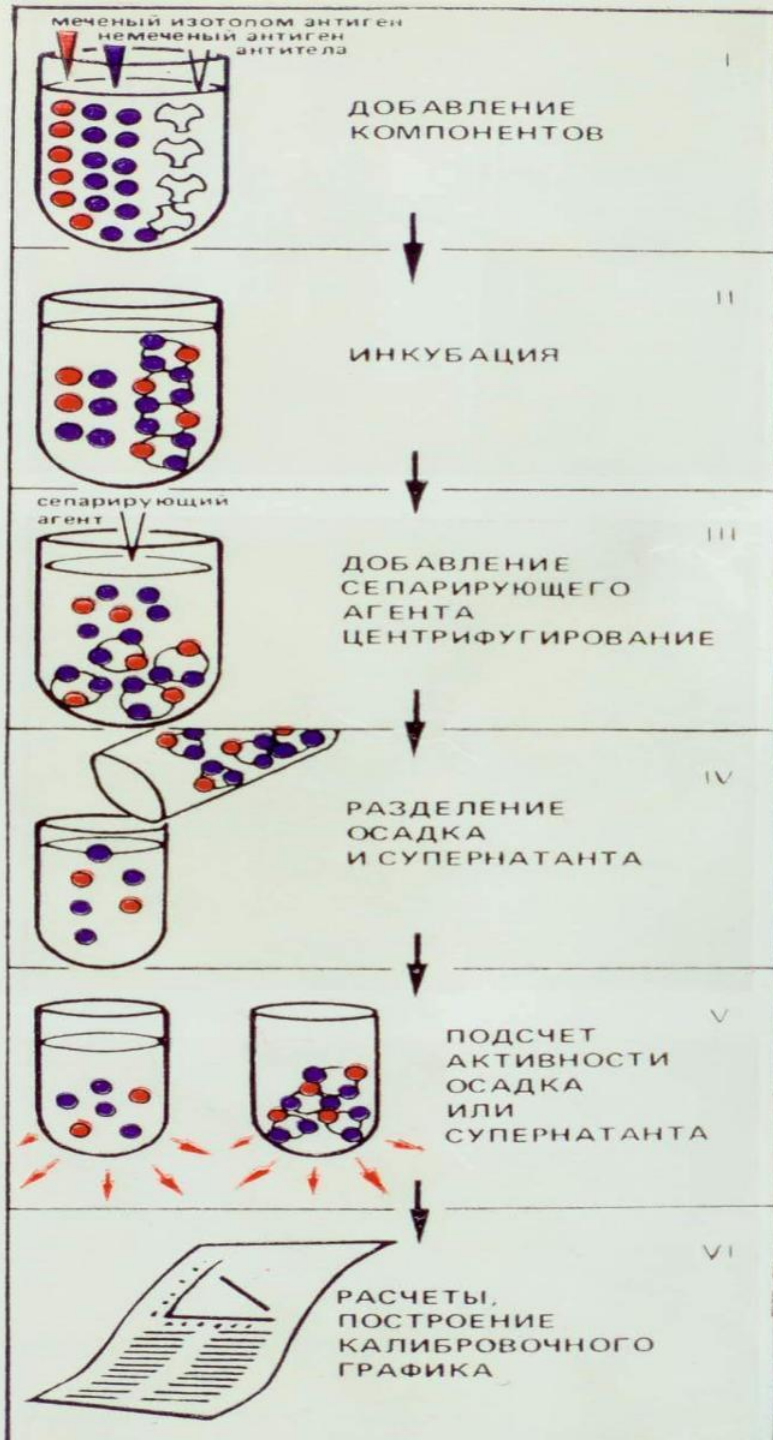


Рис. 1.15.

Рис. 1.8.—1.15. Различные способы построения калибровочной кривой, приведенной на рис. 1.3. Внешний вид кривых сильно различается, хотя все они построены на основании одних и тех же данных.



# РІА

## радіоіму- ний аналіз

Набор реактивов СТЕРОН-Е<sub>3</sub>-<sup>125</sup>I предназначен для прямого (без-экстракционного) определения эстриола в сыворотке крови человека методом радиоиммунологического анализа.

Количественное определение эстриола в сыворотке крови человека может представлять диагностическую ценность при оценке состояния фетоплацентарной системы.

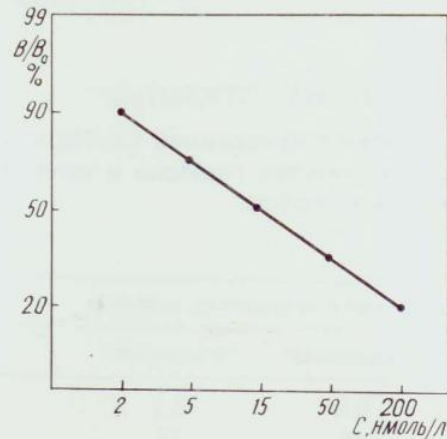
#### СОСТАВ НАБОРА

- 1 флакон <sup>125</sup>I – эстриол (90–180 кБк)
  - 6 флаконов калибровочные пробы сыворотки крови, содержащие 0, 2, 5, 15, 50, 200 нмоль/л эстриола
  - 1 флакон антисыворотка к эстриолу
  - 1 флакон преципитирующий реагент.
- Набор рассчитан на 100 определений.

#### СТАДИИ АНАЛИЗА

1. Добавление в инкубационные пробирки следующих компонентов:
  - калибровочных и определяемых проб;
  - <sup>125</sup>I–эстриола;
  - смеси антисыворотки с преципитирующим реагентом.
2. Инкубация 2,0 часа при 18–25°С.
3. Центрифугирование и удаление надосадочной жидкости.
4. Измерение активности осадка на гамма-счетчике.
5. Расчеты, построение калибровочного графика, определение концентрации Е<sub>3</sub> в сыворотке крови.

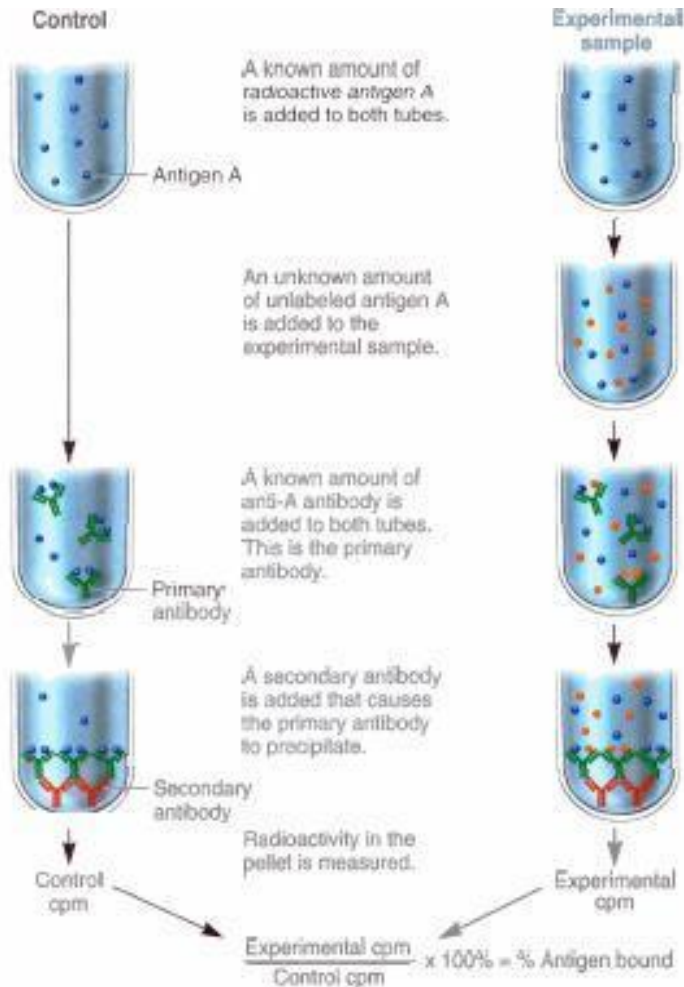
Типичный калибровочный график



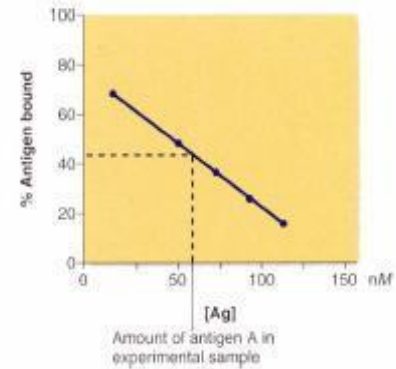
**B** - рівень зв'язаного в результаті реакції АГ-АТ міченого <sup>125</sup>I-АГ;

**B<sub>0</sub>** - загальний рівень радіоактивно-міченого <sup>125</sup>I-АГ, внесений в пробірку  
**Естриол** – стероїдний гормон, різкі зміни рівня якого при вагітності можуть свідчити про порушення у розвитку плоду

# RIA метод



(a) A radioimmunoassay



(b) Standard curve

The method of radioimmunoassay (a) and the construction of a standard curve (b)  
Figure A.9



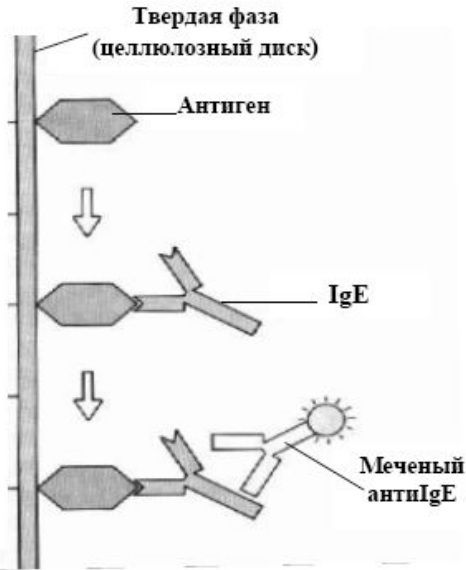
# РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ (РИА)

A) – Radioallergosorbent test (RAST)

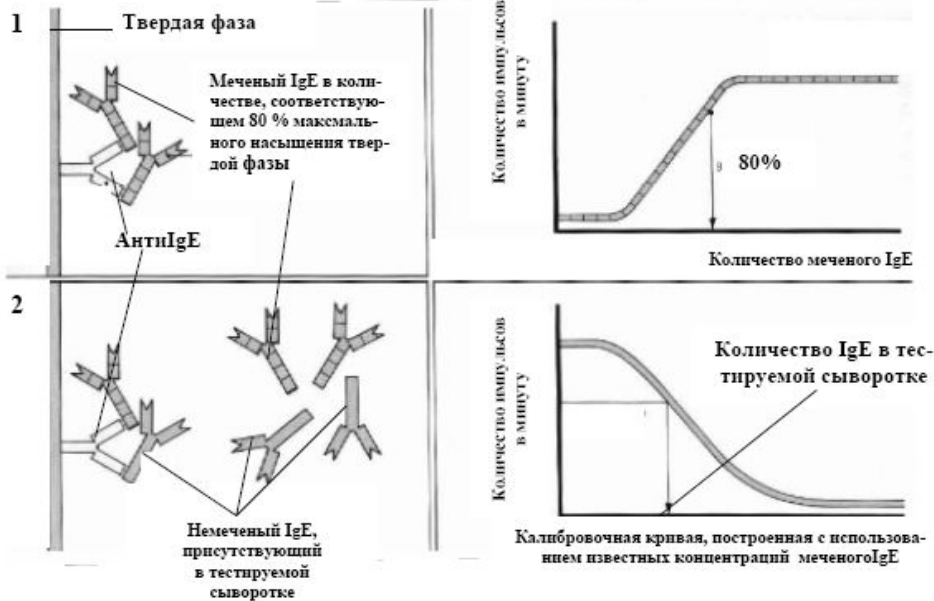
B) – Radioimmunosorbent test (RIST)

A)

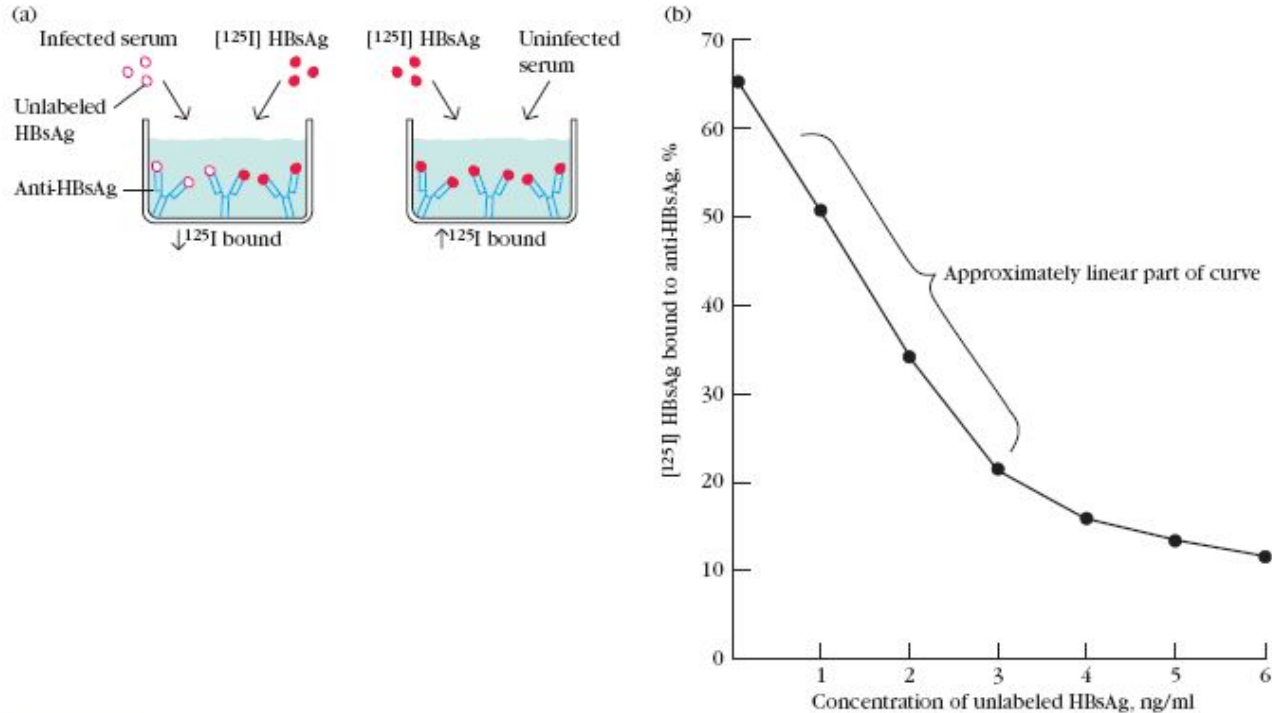
1. Сорбировать антиген (аллерген) на твердой фазе (например, на целлюлозном диске)
2. Блокировать диск в отношении неспецифического связывания антител
3. Добавить сыворотку, проверяемую на присутствие IgE, комплементарного данному антигену
4. Отмыть диск от несвязавшихся антител
5. Добавить лиганд (антиIgE-антитела, меченые радиоактивным изотопом)
6. Отмыть диск от несвязавшегося лиганда
7. Измерить радиоактивность диска



B)



# Скринінг донорської крові на присутність вірусу гепатиту В методом твердофазного РІА



**FIGURE 6-9** A solid-phase radioimmunoassay (RIA) to detect hepatitis B virus in blood samples. (a) Microtiter wells are coated with a constant amount of antibody specific for HBsAg, the surface antigen on hepatitis B virions. A serum sample and [<sup>125</sup>I]HBsAg are then added. After incubation, the supernatant is removed and the radioactivity of the antigen-antibody complexes is measured. If the sample is infected, the amount of label bound will be less than

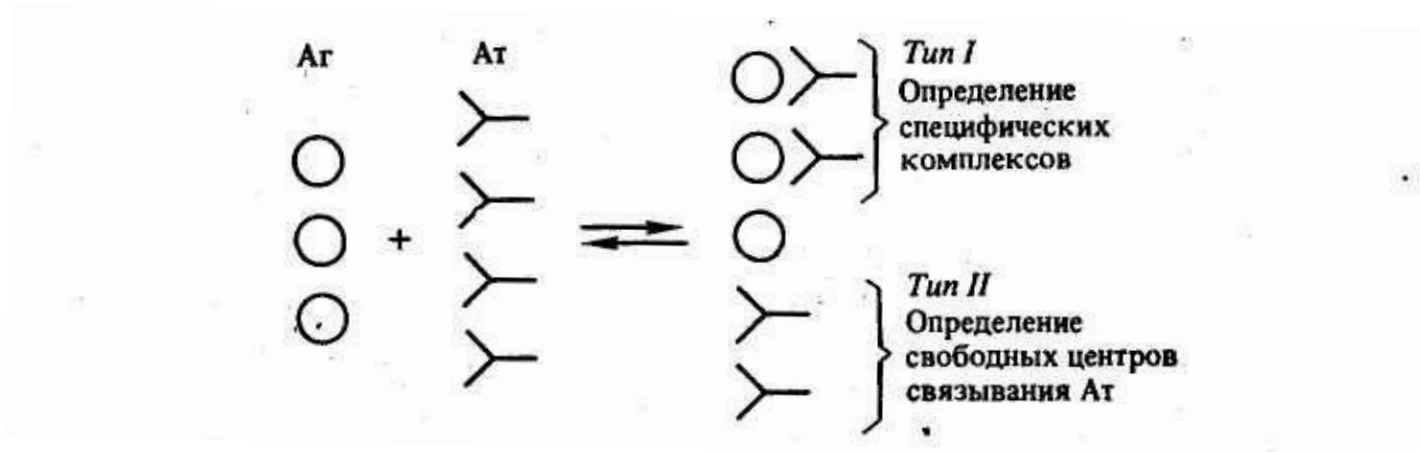
in controls with uninfected serum. (b) A standard curve is obtained by adding increasing concentrations of unlabeled HBsAg to a fixed quantity of [<sup>125</sup>I]HBsAg and specific antibody. From the plot of the percentage of labeled antigen bound versus the concentration of unlabeled antigen, the concentration of HBsAg in unknown serum samples can be determined by using the linear part of the curve.



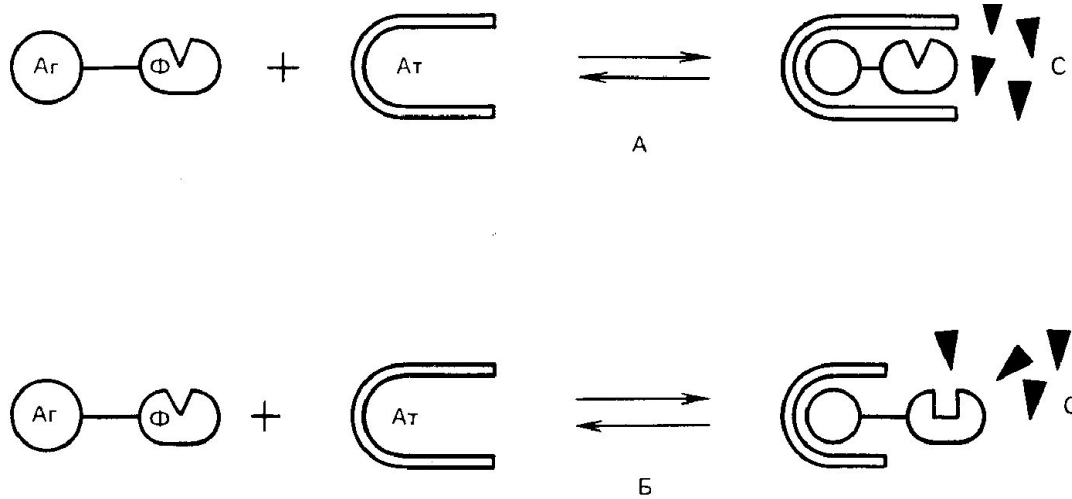
# **Імуноферментний аналіз**



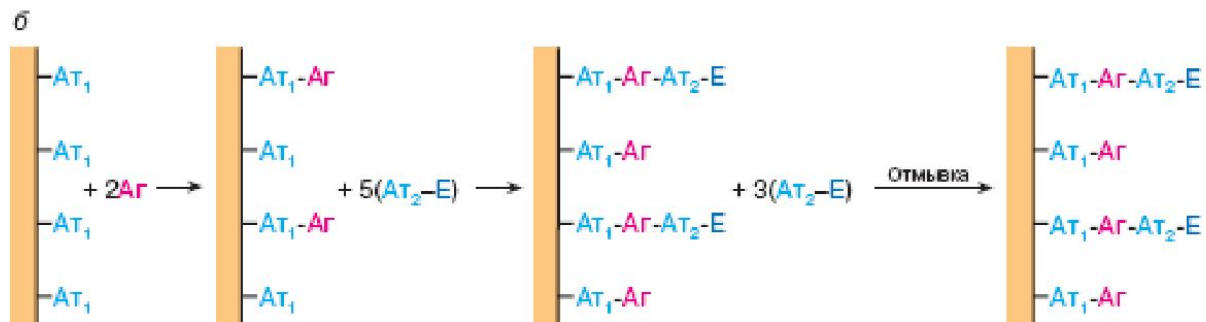
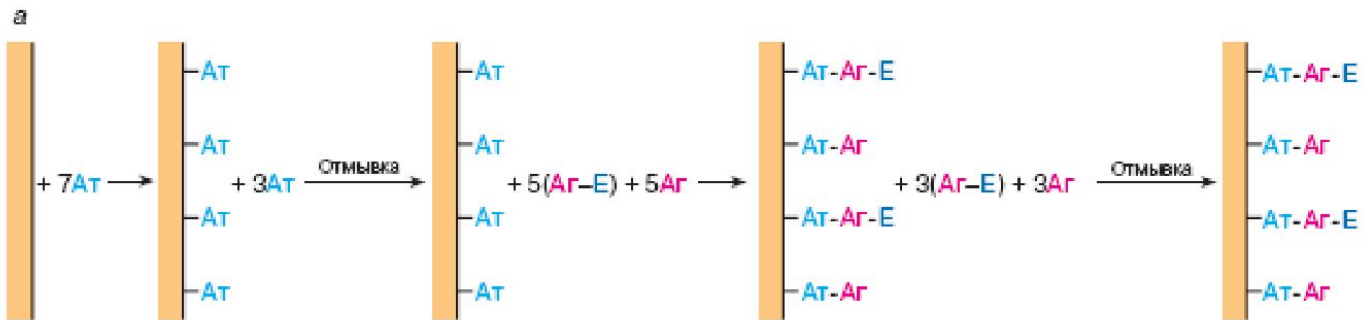
# Групи методів в імуноферментному аналізі



**Варианты гомогенного иммуноферментного анализа** А- эффект разобщения фермента (Ф) и субстрата (С) за счет стерических препятствий при взаимодействии антигена (Аг) и антитела (Ат); Б- эффект изменения конформации фермента при формировании комплекса антиген- антитело



## КОНКУРЕНТНИЙ (а) ТА НЕКОНКУРЕНТНИЙ (б) ГЕТЕРОГЕННИЙ ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ



# ОСОБЛИВОСТІ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

1. Імуносорбенти
2. Твердофазні носії
3. Імобілізація антигенів чи антитіл на твердій фазі
4. Ферменти і субстрати
5. Кон'югати та їх створення

# ОСОБЛИВОСТІ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

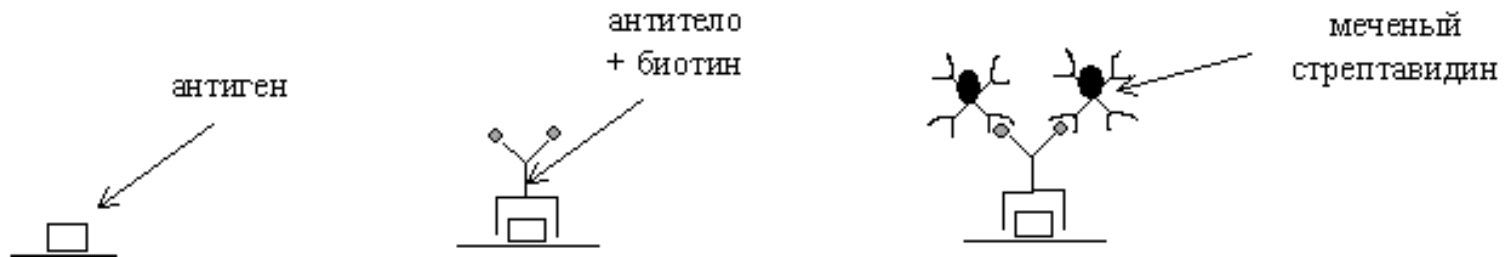
## Ферменти і субстрати

**Пероксидаза хрону** (ПХ)-Horse radish peroxidase (HRP)-  
субстрат при фотометрії -тетраметилбензидин  
( англ.ТМВ)

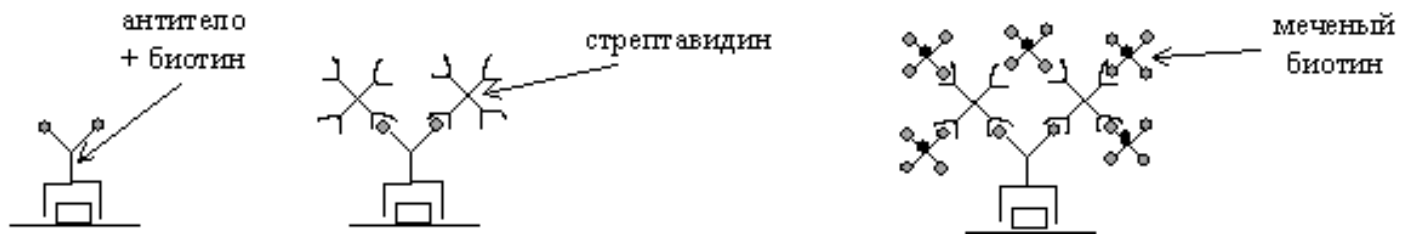
**Лужна фосфатаза** – субстрат при фотометрії –  
паранітрофенілфосфат

**Галактозидаза**-субстрат при фотометрії –  
нітрофенілгалактозид

# Кон'югат з використанням пари біотин- стрепт(авідин)

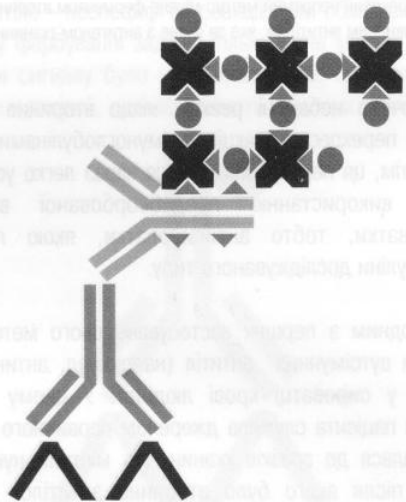


Система “антиген + антитіло-біотин + мічений стрептавідин”

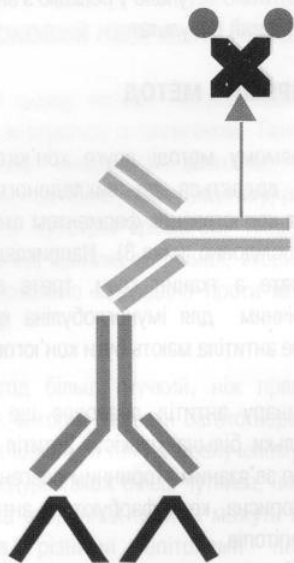


Система “антитіло - біотин + (стрепт)авідин + мічений біотин”










Мал.10 В технології ABC, авідин або стрептавідин-біотин-ферментний комплекс реагує з біотинізованими антитілами



Мал.11 В технології LAB та LSAB, мічений ферментом (стрепт)авідин реагує з біотинільованими вторинними антитілами

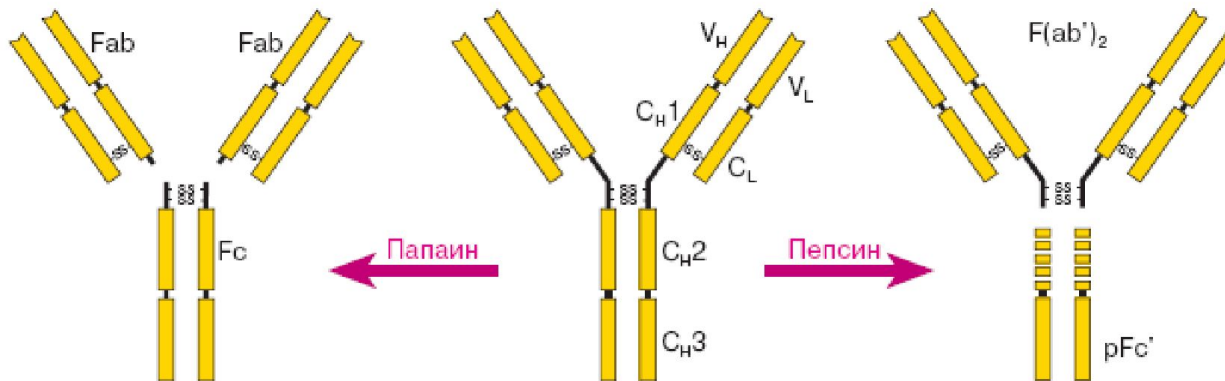
-  Перше первинне антитіло (моноклональне)
-  Друге первинне антитіло (моноклональне)
-  вторинне антитіло (анті - кроляче)
-  вторинне антитіло (анті - мишаче)
-  Перший антиген тканини

-  Другий антиген тканини
-  Фермент HRP
-  Фермент AP
-  Блок подвійного фарбування
-  DAB
-  FAST Red
-  Полімер (Голкова молекула)

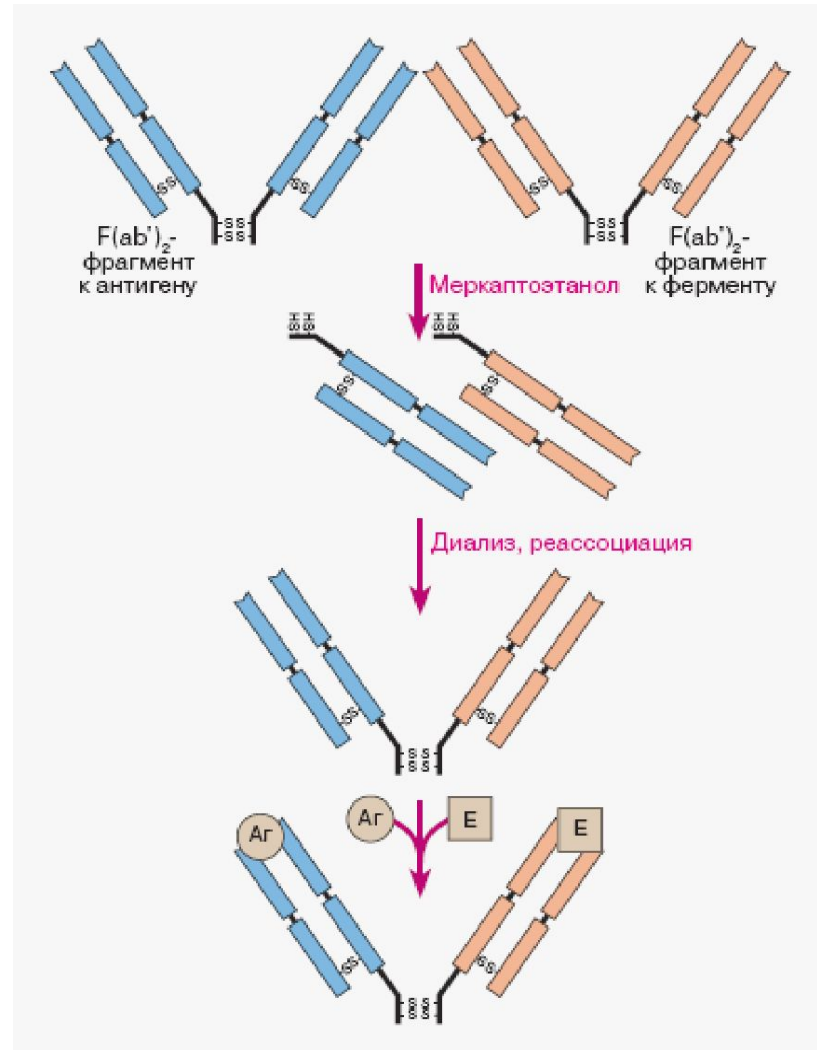
# ОСОБЛИВОСТІ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

## Отримання кон'югату - комплексу антигена і фермента методом гібридних антитіл.

1 етап - накопичення протеолітичних фрагментів. Антитіло класу G:  
дія папаїну і пепсину.

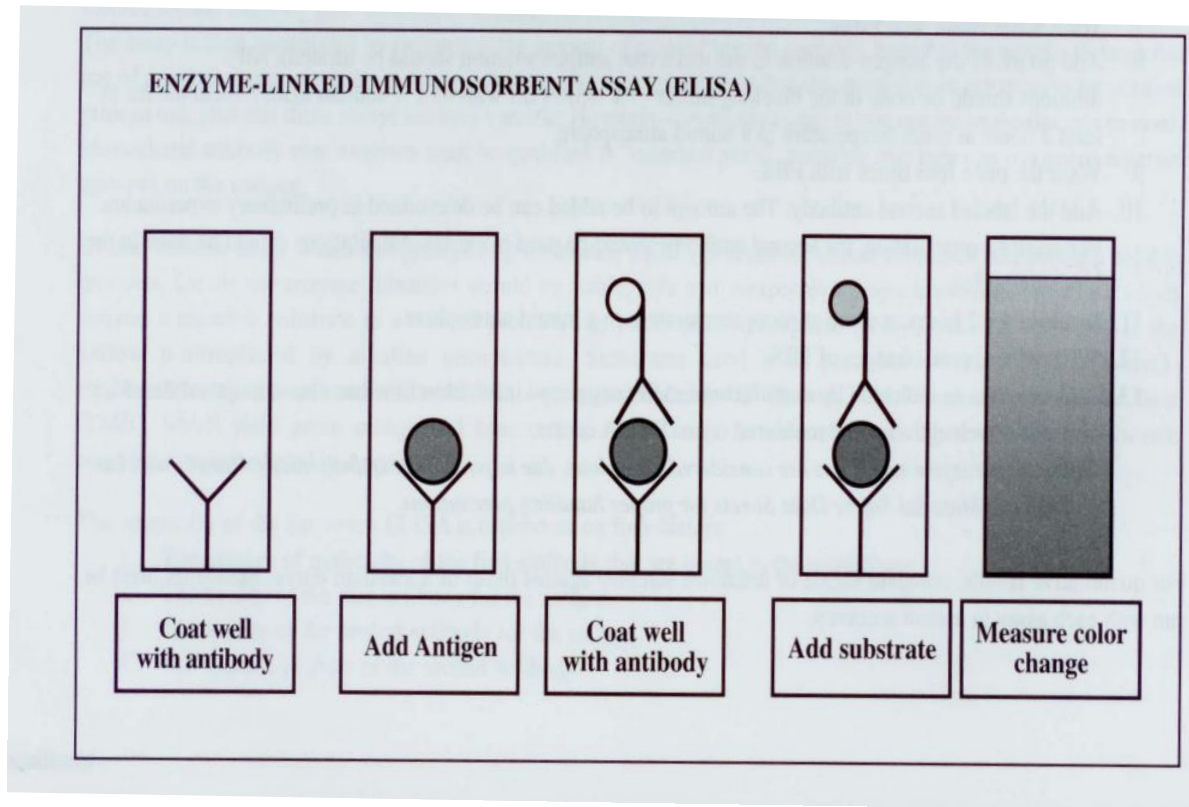


# Отримання комплексу антигена і фермента методом гібридних антитіл. 2 етап- власне створення гібридних антитіл.

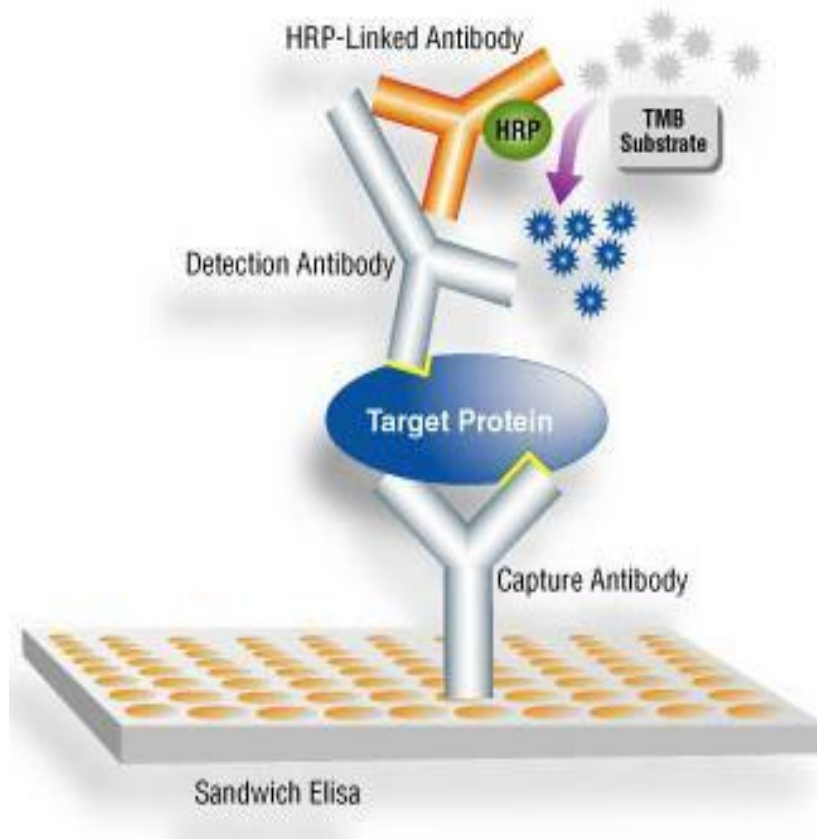


# *ELISA- Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

## *Сорбційний імуоферментний аналіз*



*ELISA- Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*  
*Сорбційний імуоферментний аналіз*

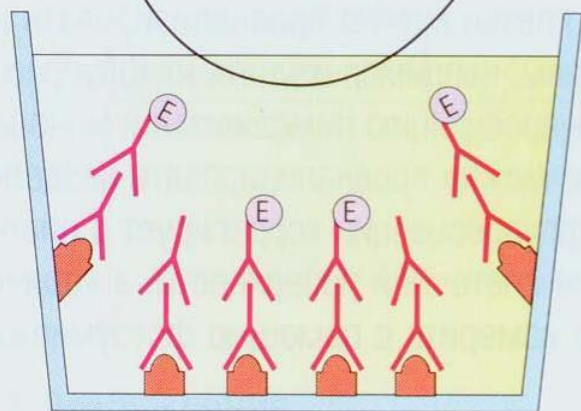


**ELISA**

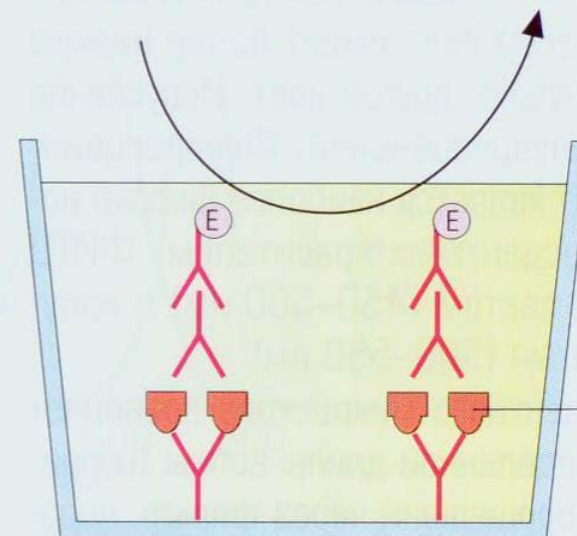
Индикатор  
(бесцветный) +  
субстрат  
( $H_2O_2$ )

Индикатор-Н  
(окрашен) +  
 $H_2O$

Цветная реакция



Детекция специфических антител  
против антигена с помощью  
меченых ферментом  
вторичных антител (конъюгатов)



Сэндвич-ELISA  
для чувствительной детекции  
антигена (напр., цитокинов)

Антимыши-  
ные Ab

Монокло-  
нальный Ig

Антиген

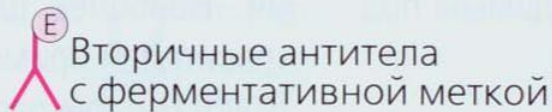
Поликло-  
нальный Ig  
(напр., кролика  
против ху)



Антитело



Антиген



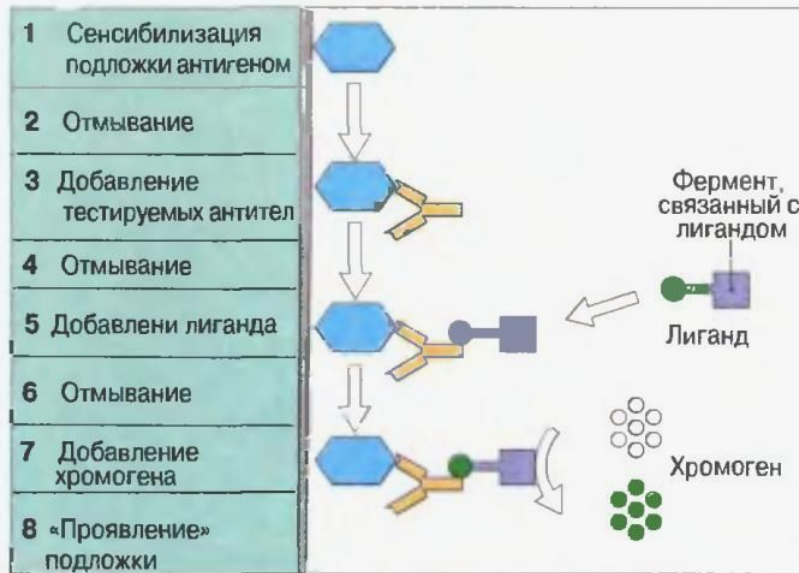
Вторичные антитела  
с ферментативной меткой

\*

## А. Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA)



## Ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA)

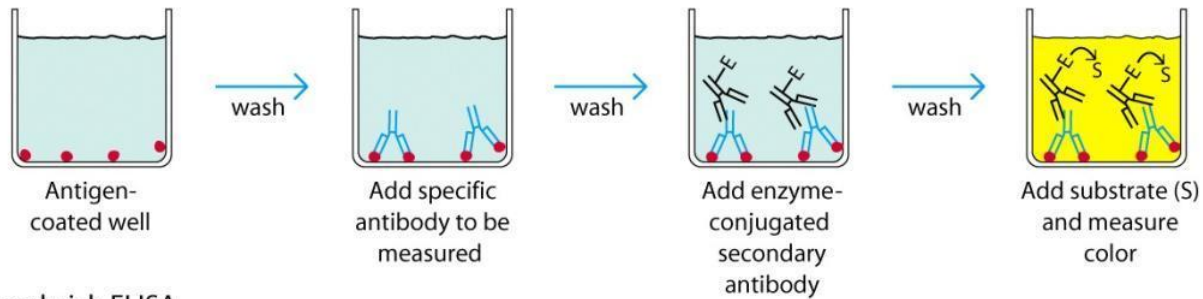


**ПРЯМА**  
**ELISA**

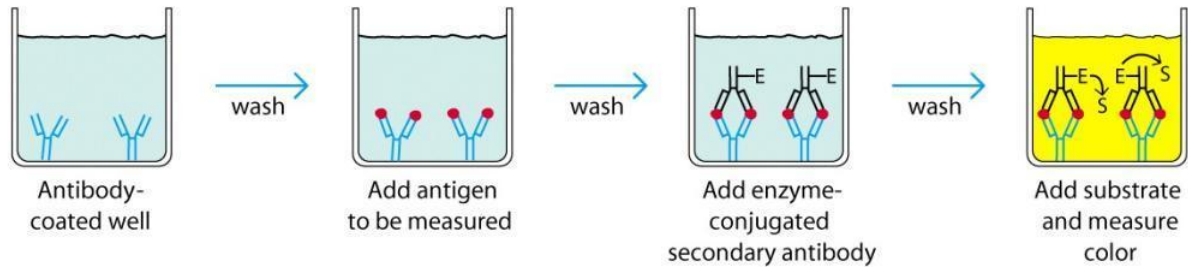


# Різновиди методу ELISA

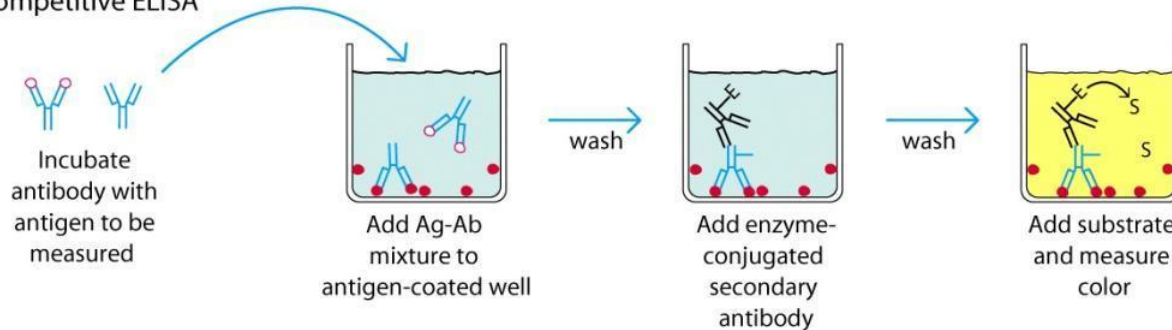
(a) Indirect ELISA



(b) Sandwich ELISA



(c) Competitive ELISA





# *ELISA-Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

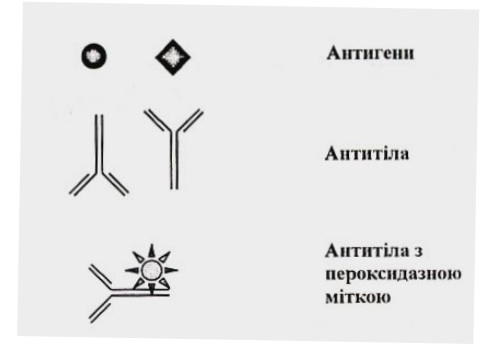
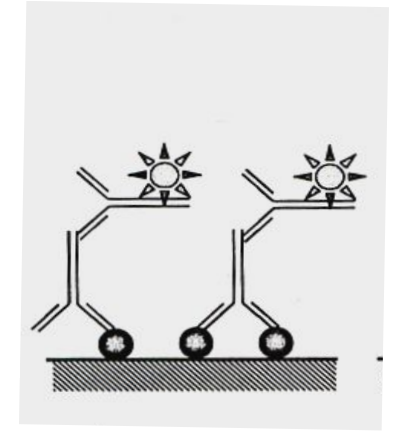
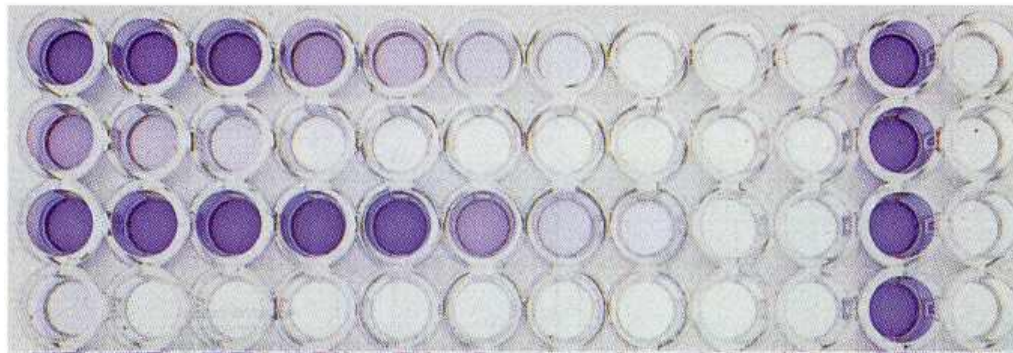
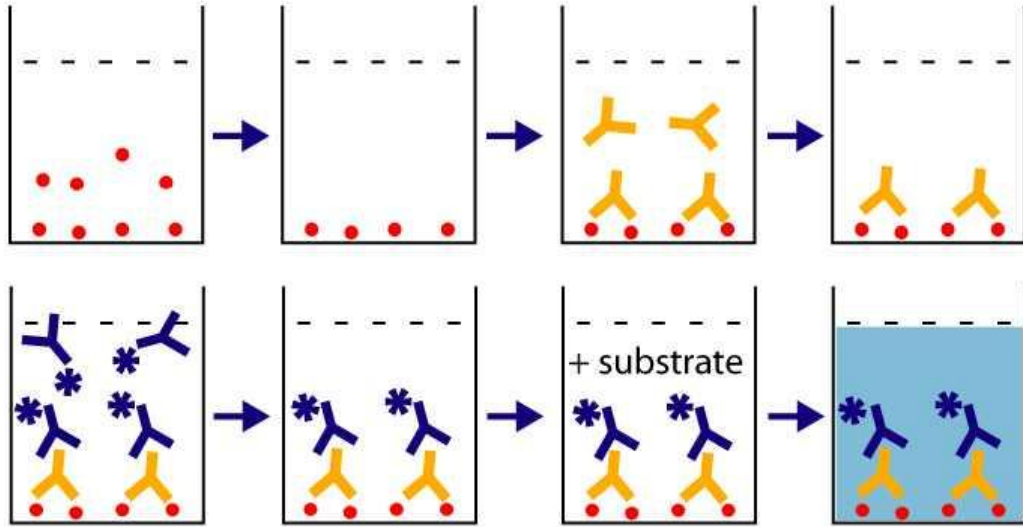
## *Сорбційний імуноферментний аналіз (1) непрямий метод*



### *What you need to do the assay*

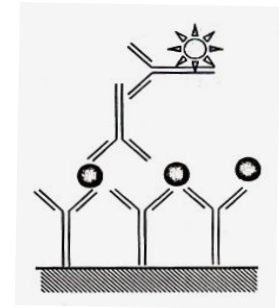
- Purified antigen (if you want to detect or quantify antibody).
- Purified antibody (if you want to detect or quantify antigen).
- Standard solutions (positive and negative controls).
- Sample to be tested.
- Microtiter dishes: plastic trays with small wells in which the assay is done.
- Wash fluid (buffer).
- Enzyme-labeled antibody and enzyme substrate.
- ELISA reader (spectrophotometer) for quantitative measurements.

# Метод визначення антитіл (непряма ELISA)

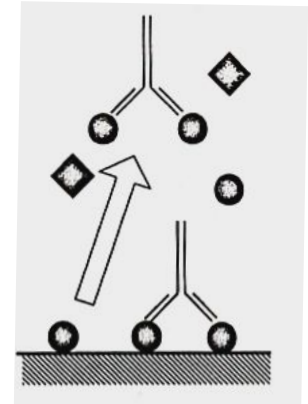
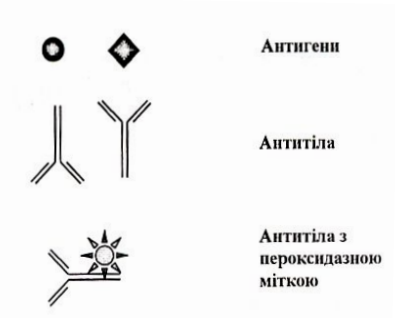
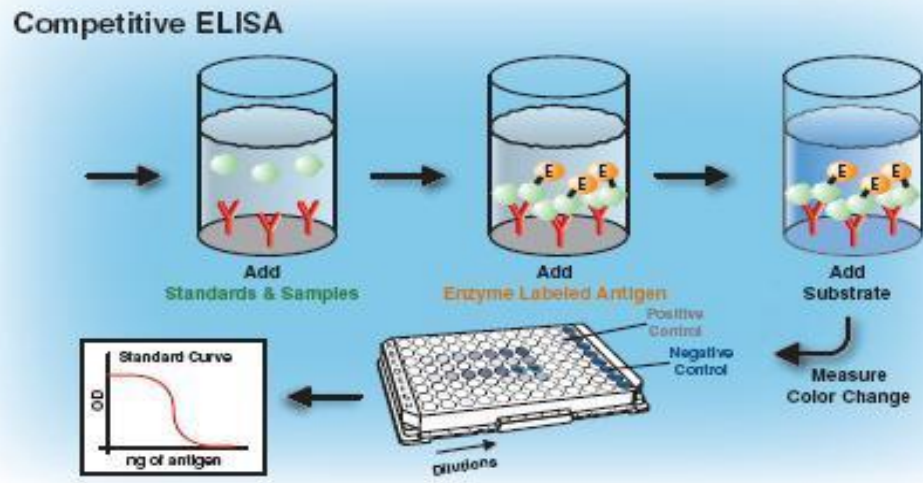


# ELISA :1- сандвіч-метод визначення антигену ; 2-конкурентний метод визначення антигену

1



2

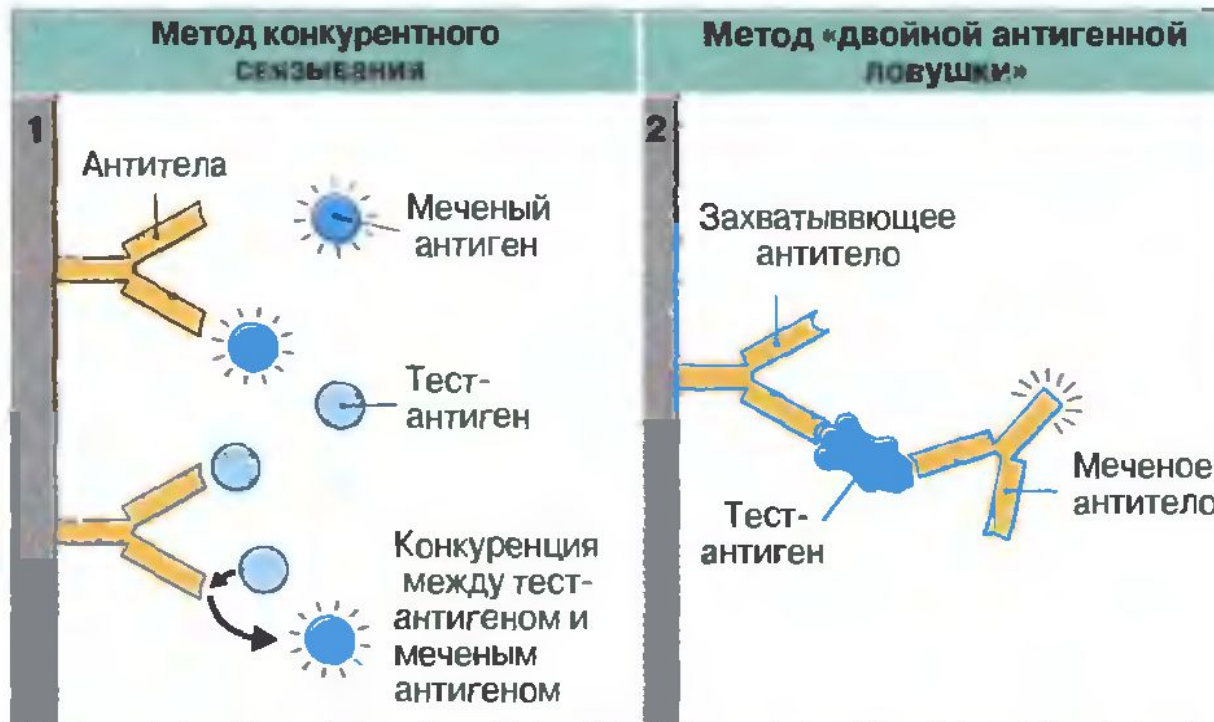


1 варіант конкурентної ELISA

2 варіант цього ж методу

# Метод визначення антигенів

## Иммуноанализ антигенов



# ELISA Activity

An HIV ELISA, sometimes called an HIV enzyme immunoassay (EIA) is the first and most basic test to determine if an individual is positive for a selected pathogen, such as HIV. The test is performed in a 8 cm x 12 cm plastic plate which contains an 8 x 12 matrix of 96 wells, each of which are about 1 cm high and 0.7 cm in diameter. The next page illustrates how an HIV ELISA is performed.

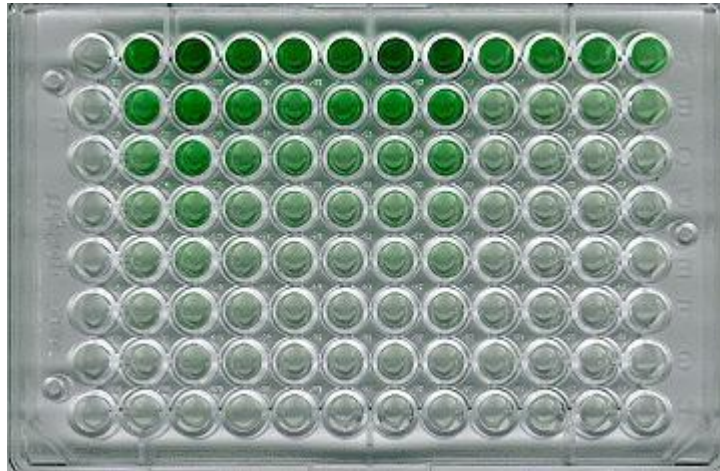


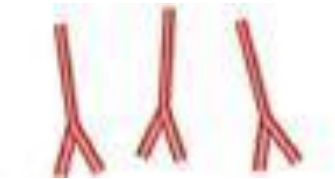
Plate ELISA



# The ELISA Method



Partially purified, inactivated HIV antigens pre-coated onto an ELISA plate



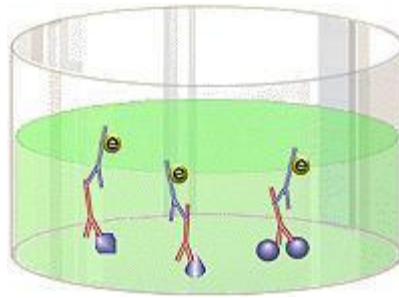
Patient serum which contains antibodies. If the patient is HIV+, then this serum will contain antibodies to HIV, and those antibodies will bind to the HIV antigens on the plate.



Anti-human immunoglobulin coupled to an enzyme. This is the second antibody, and it binds to human antibodies.



Chromogen or substrate which changes color when cleaved by the enzyme attached to the second antibody.



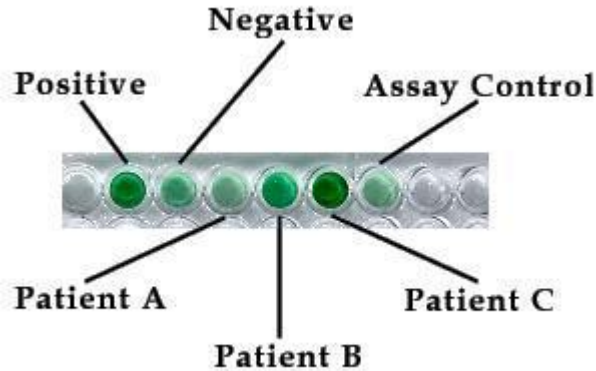
**Positive ELISA Test**



**Negative ELISA Test**

# ELISA Activity

## ELISA data from three patients

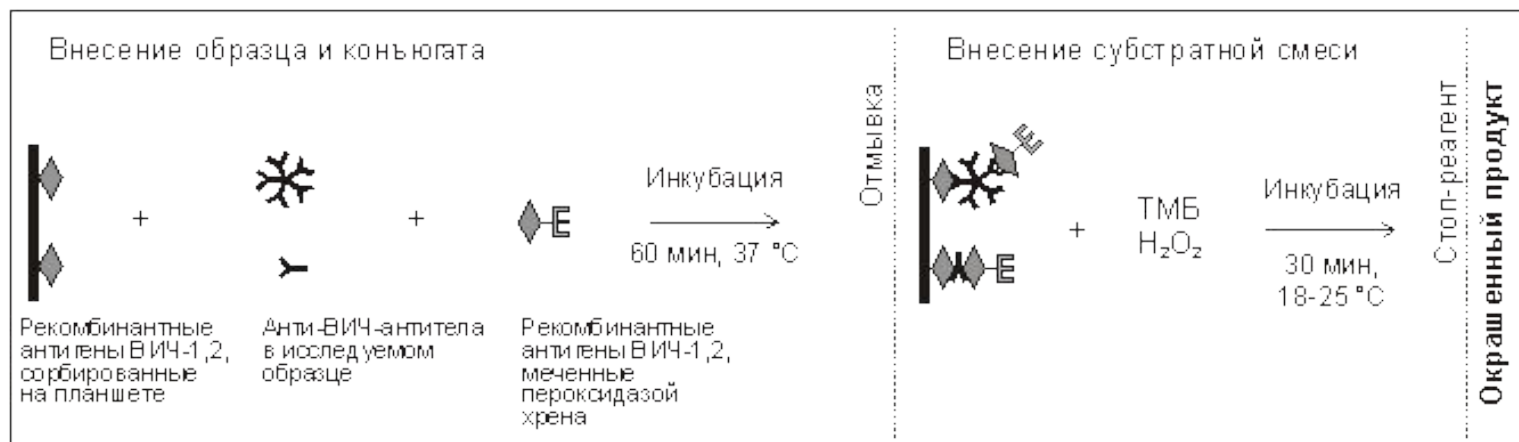


Positive Control	Negative Control	Patient A	Patient B	Patient C	Assay Control
1.689	0.153	0.055	0.412	1.999	0.123

Above is ELISA data from three patients. Numbers are expressed as optical density at 450 nm. The cutoff value indicating a positive result is 0.500. Optical densities of 0.300 to 0.499 are indeterminate and need to be retested. Values below 0.300 are considered to be negative. In most cases, a patient will be retested if the serum gives a positive result. If the ELISA retests are positive, the patient will then be retested by western blotting analysis



# Перша російська тест-система для виявлення сумарних антитіл до ВІЛ-1,2

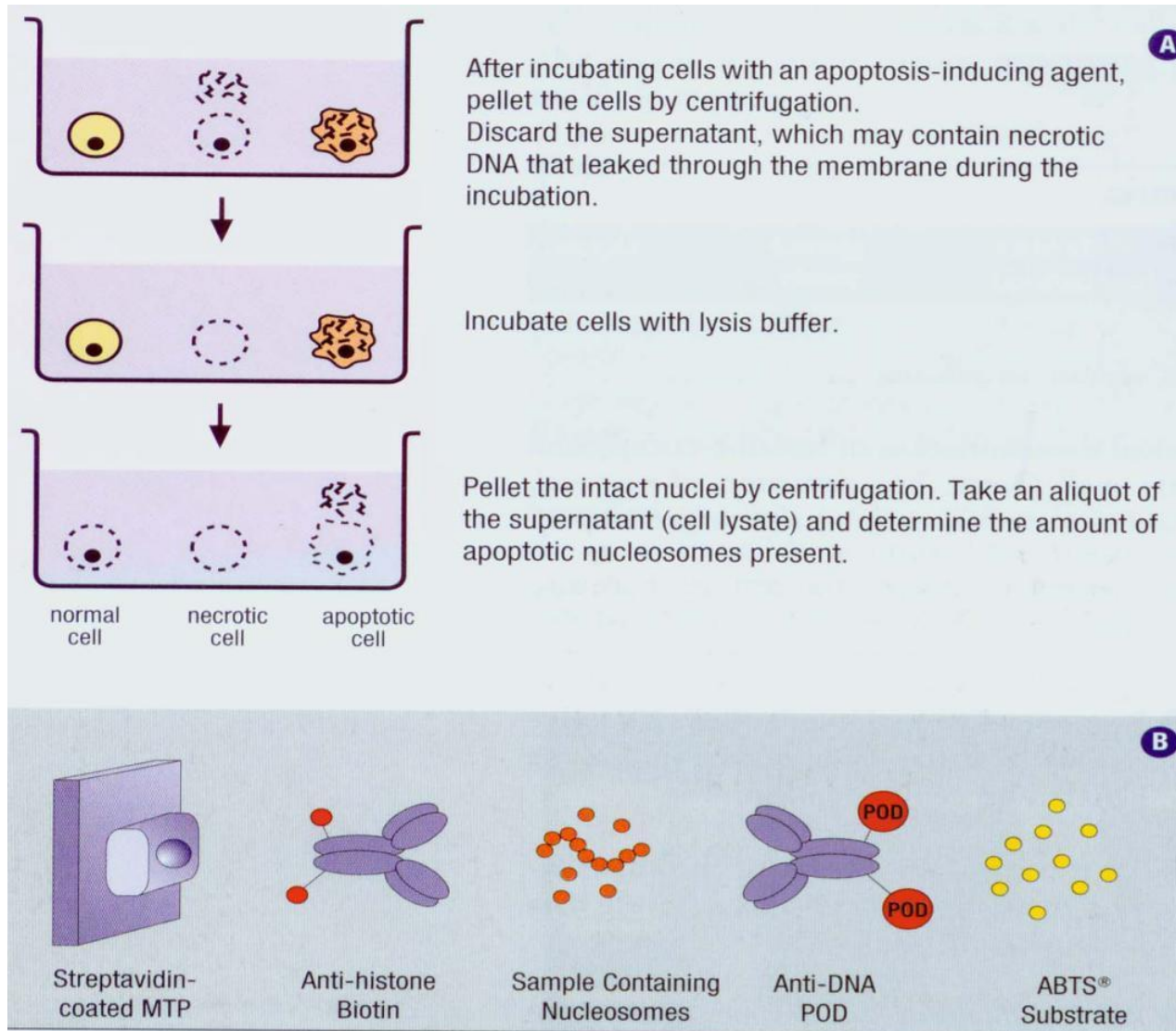


# Використання методу ELISA для детекції рівня клітинної загибелі-

## Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> Kit

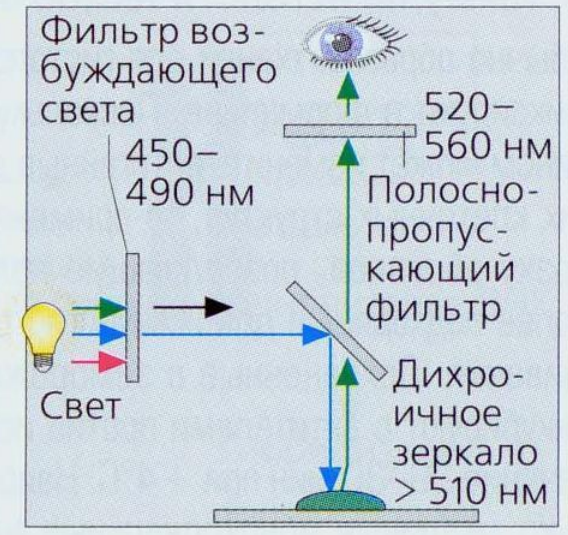
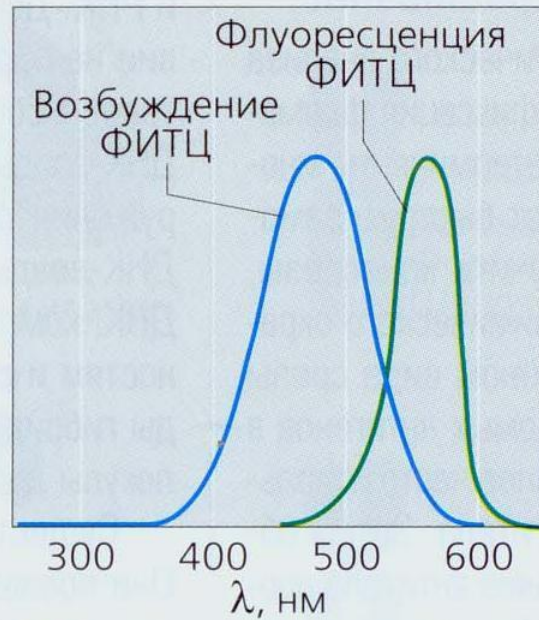
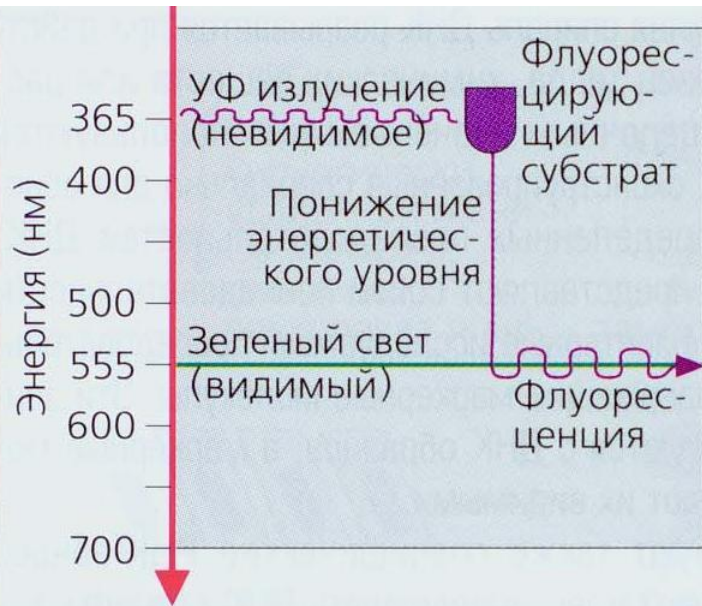
панель А-приготування проб;

панель В- власне ELISA



# Метод імунофлуоресценції

ФІТЦ- флуоресцеїн-ізотіоціанат- довжина хвилі збудження- 450-500 нм, випромінення (емісії)-500-550 нм



1. Возбуждение

2. Спектр поглощения/испускания ФИТЦ

3. Флуоресцентный микроскоп

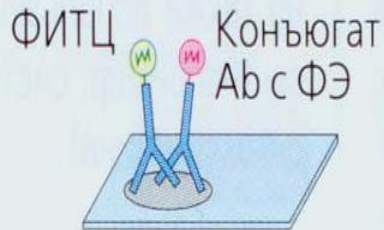
## А. Флуоресценция



# Метод імунофлуоресценції



1. Прямая иммунофлуоресценция



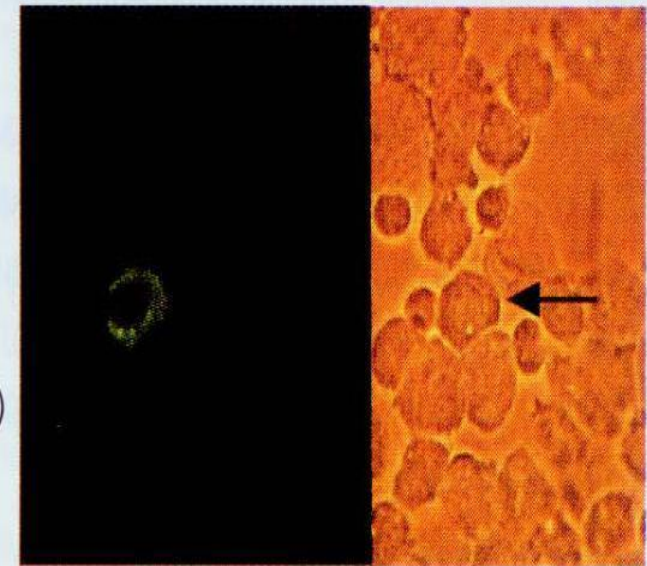
2. Двойная флуоресценция



3. Непрямая иммунофлуоресценция

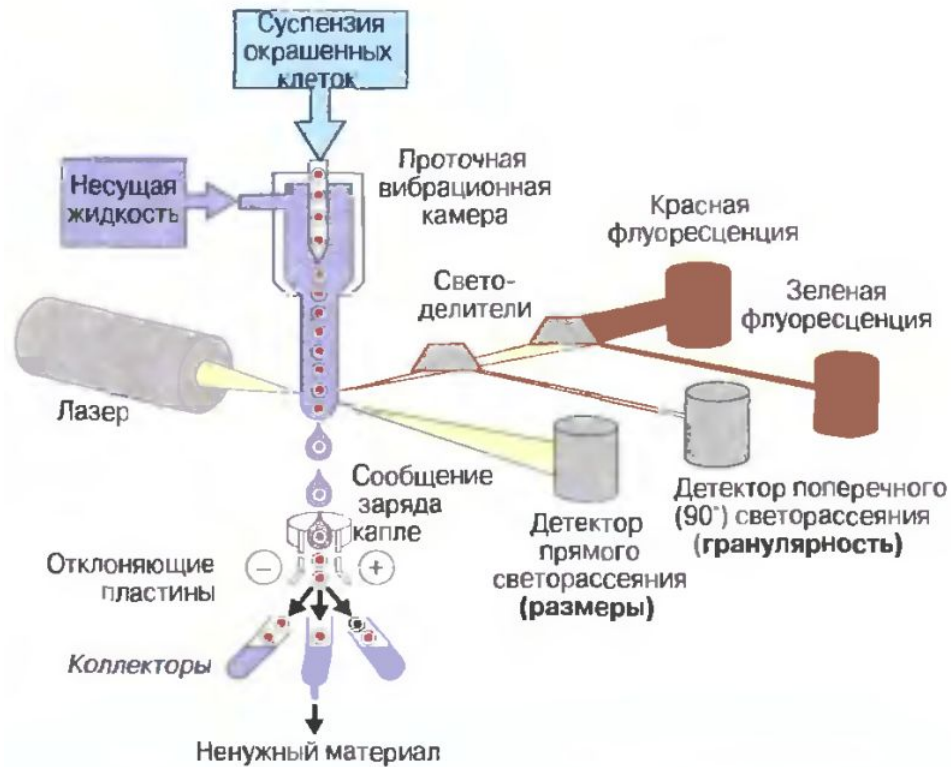


## Б. Иммунофлуоресценция

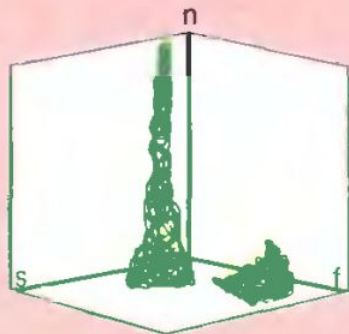


4. Флуоресценция в цитоплазме

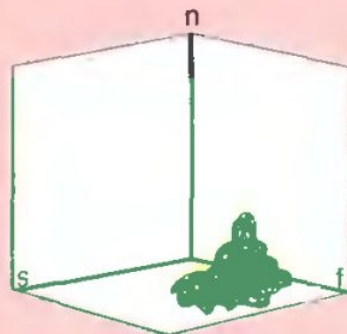
# Проточный цитофлуориметр (клетинный сортер)



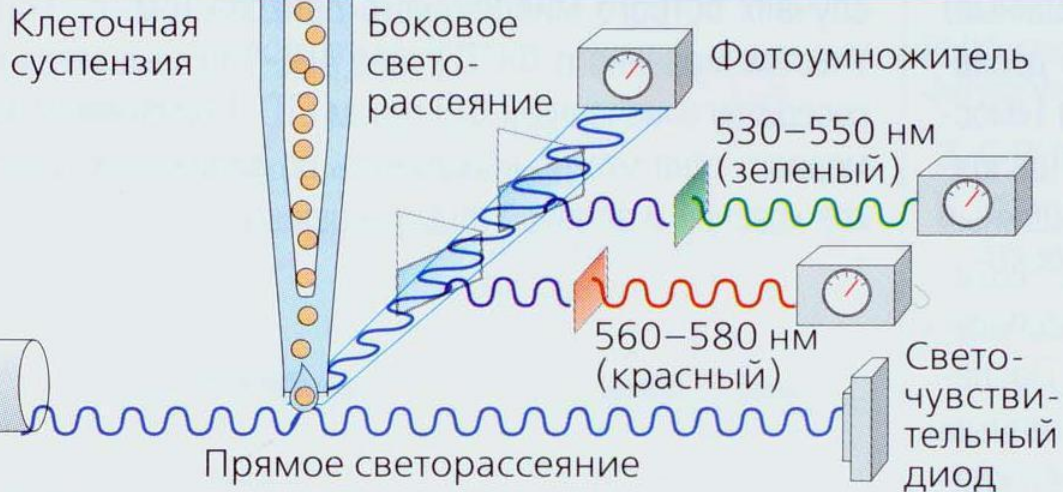
Совокупная популяция лимфоцитов



Популяция CD8<sup>+</sup>

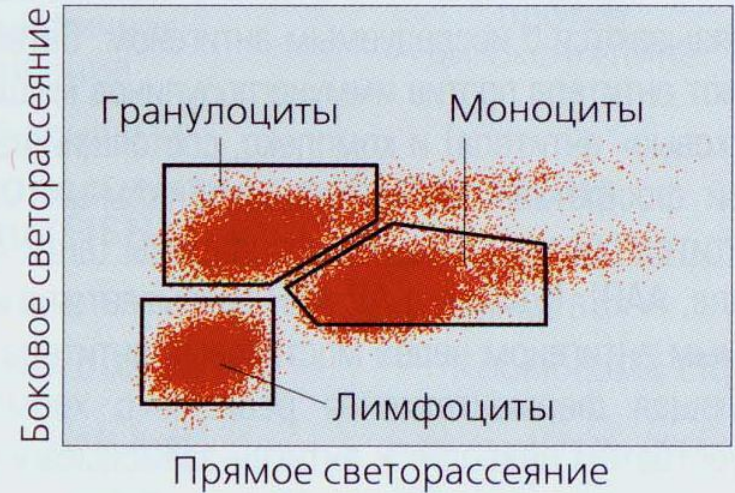


# Проточна цитометрія



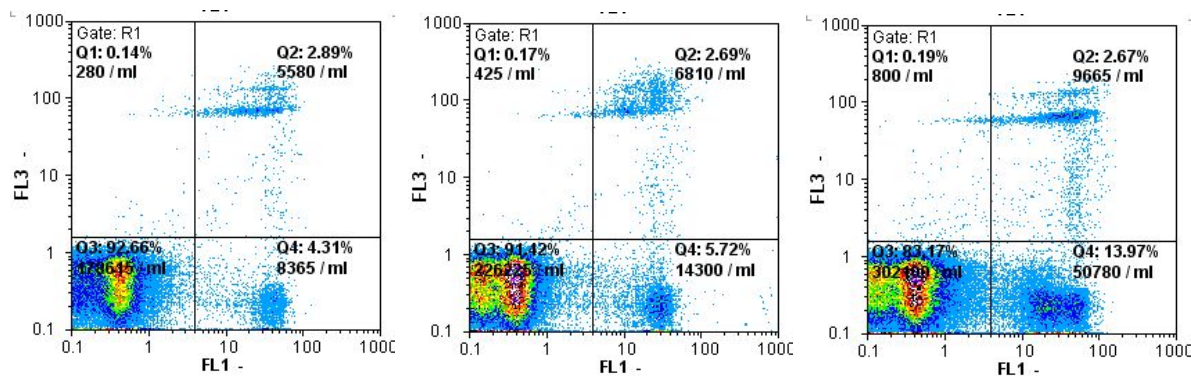
1. Принцип

## В. Проточная цитометрия



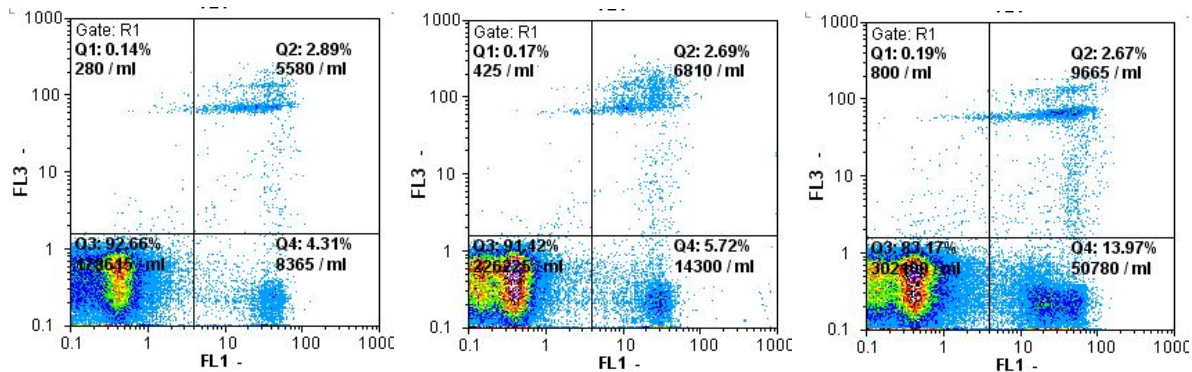
2. Разделение клеточных фракций

# Проточно-цитофлуориметричний аналіз лімфоцитів

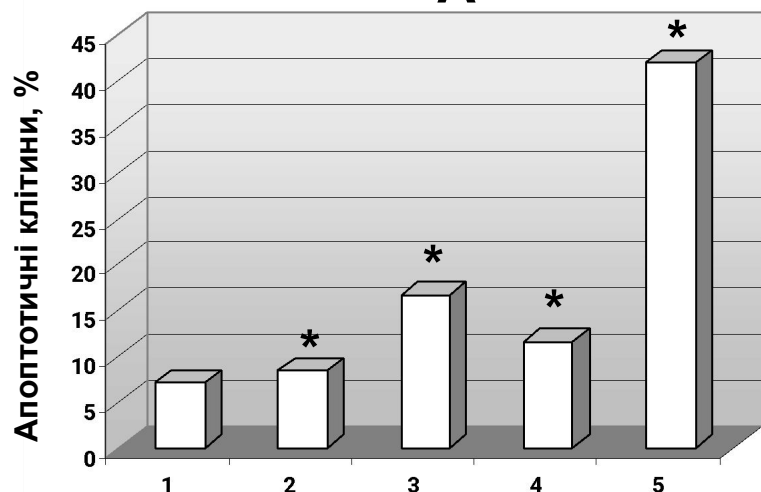


	Анексин V <sup>ФІТЦ</sup> (-) / пропідій йодид (-), %	Анексин V <sup>ФІТЦ</sup> (+) / пропідій йодид (-), %	Анексин V <sup>ФІТЦ</sup> (+) / пропідій йодид (+), %	Мертві клітин и, %
Контроль (А)	92,66	4,31	2,89	0,14
30 хв після опромінення (Б)	91,43	5,72	2,69	0,17
3 год після опромінення (Б)	83,17	13,97	2,67	0,19

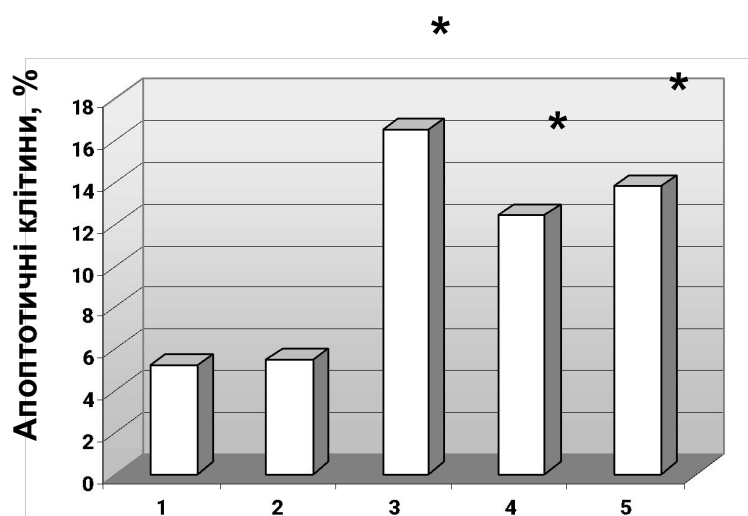




**A**



**Б**



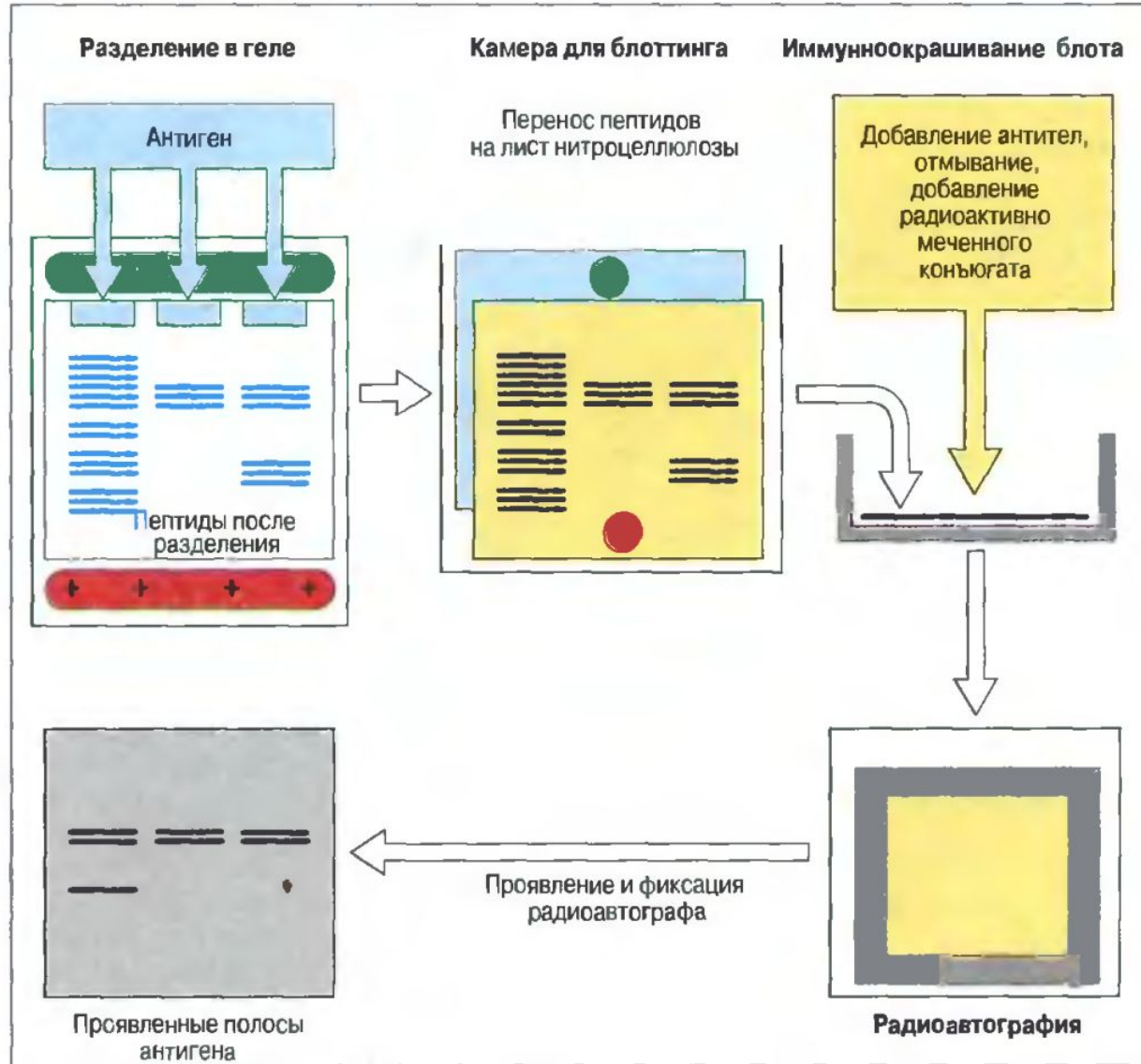
**Рис. Проточно-цитофлуориметричний аналіз лімфоцитів тимусу (А) та селезінки (Б) щурів за дії іонізуючої радіації:**

**1 - контроль; 2 - 1,0 Гр (30 хв після опромінення); 3 – 1,0 Гр (3 год після опромінення); 4 – 7,78 Гр (30 хв після опромінення); 5 – 7,78 Гр (3 год після опромінення)**

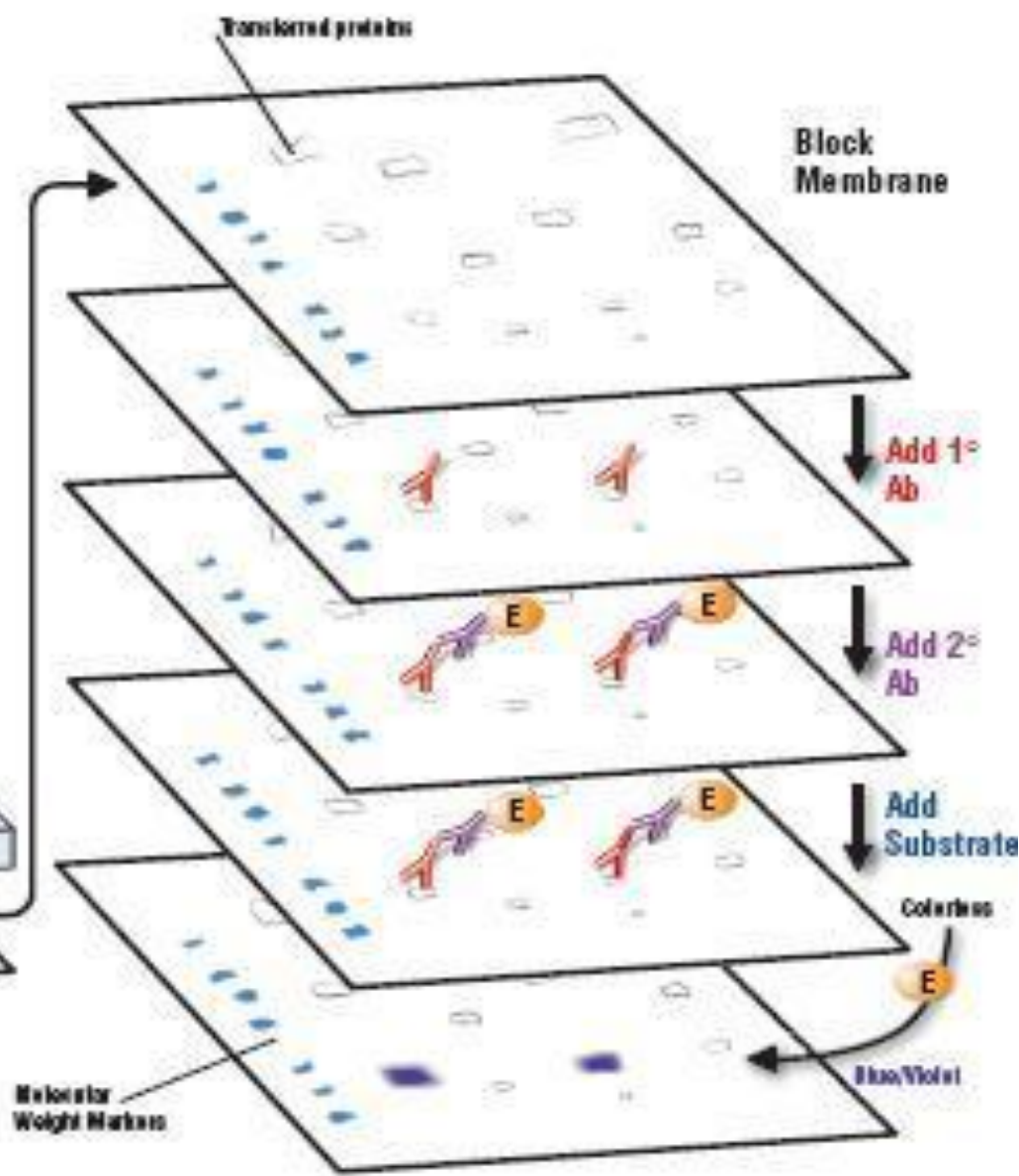
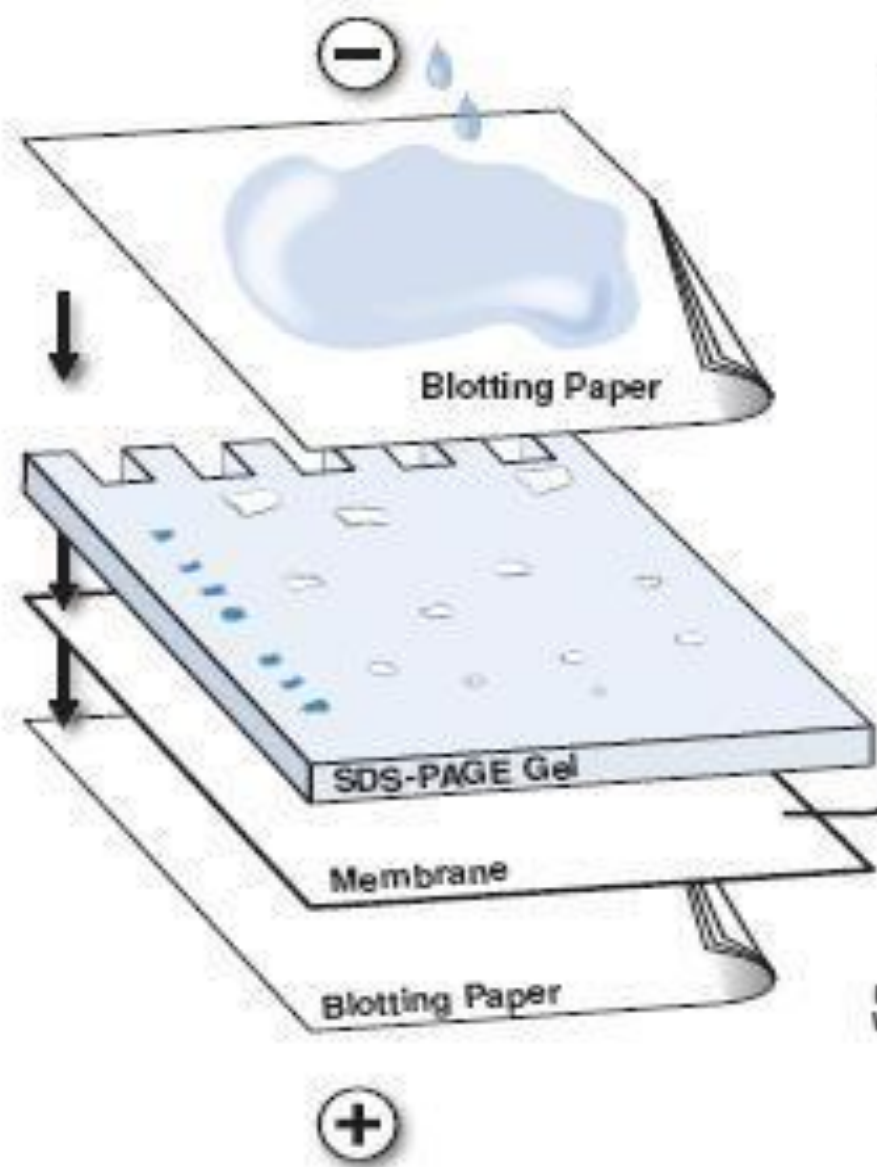
\*- достовірно у відношенні до контролю,  $P \leq 0,05$



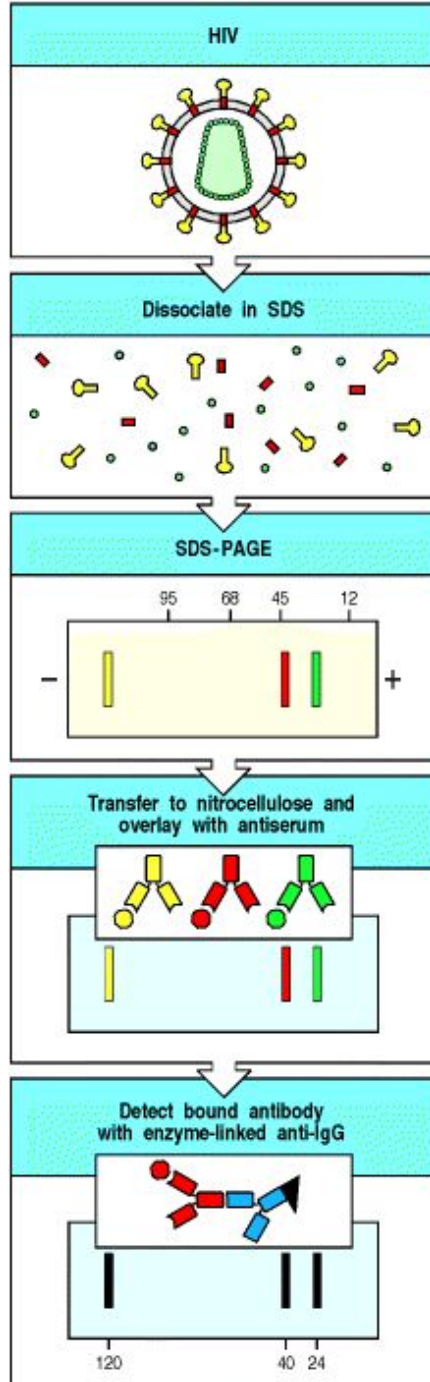
# ІМУНОБЛОТИНГ (Western blotting)



# Western Blotting

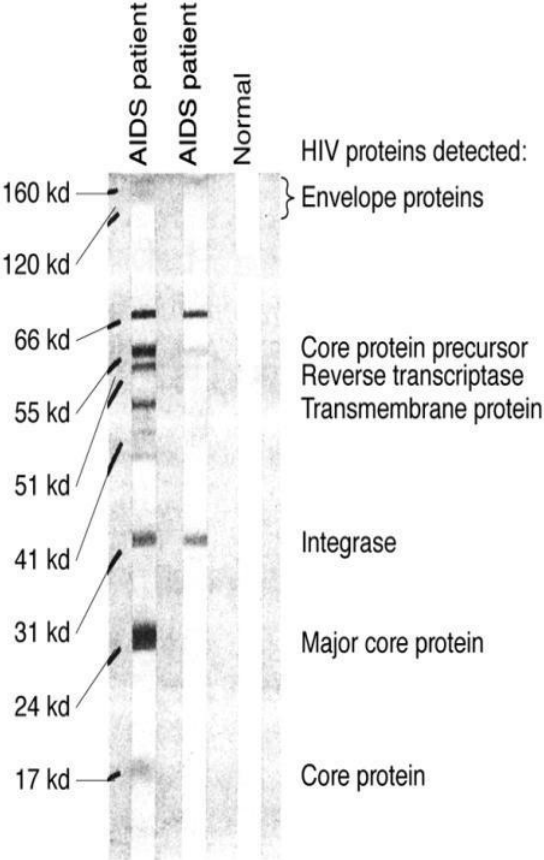


# ВІЗУАЛІЗАЦІЯ

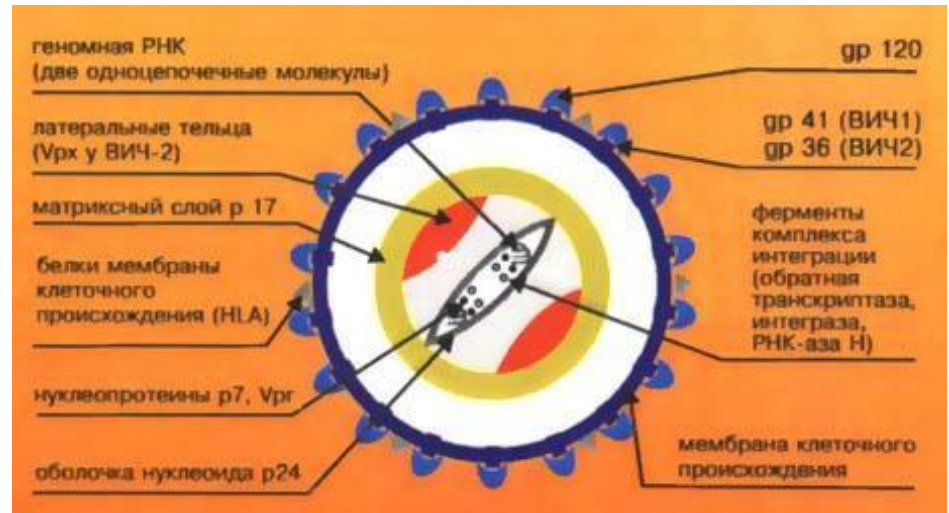
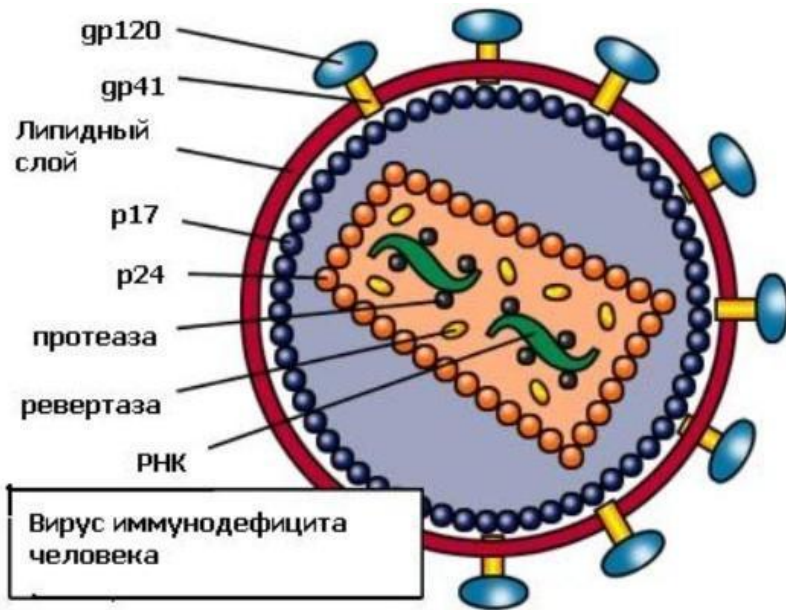


**Western blotting** is used to identify antibodies to the human immunodeficiency virus (HIV) in serum from infected individuals

**Western blots of serum samples from two HIV-infected individuals and one control subject**

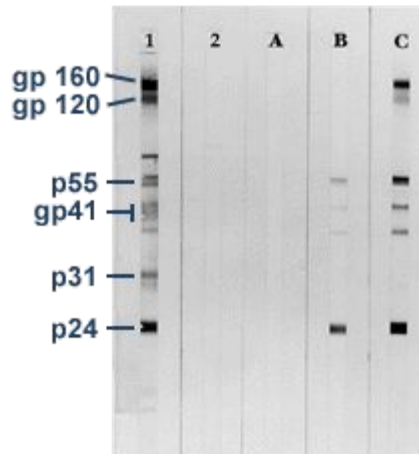


# Будова вірусу імунодефіциту ЛЮДИНИ



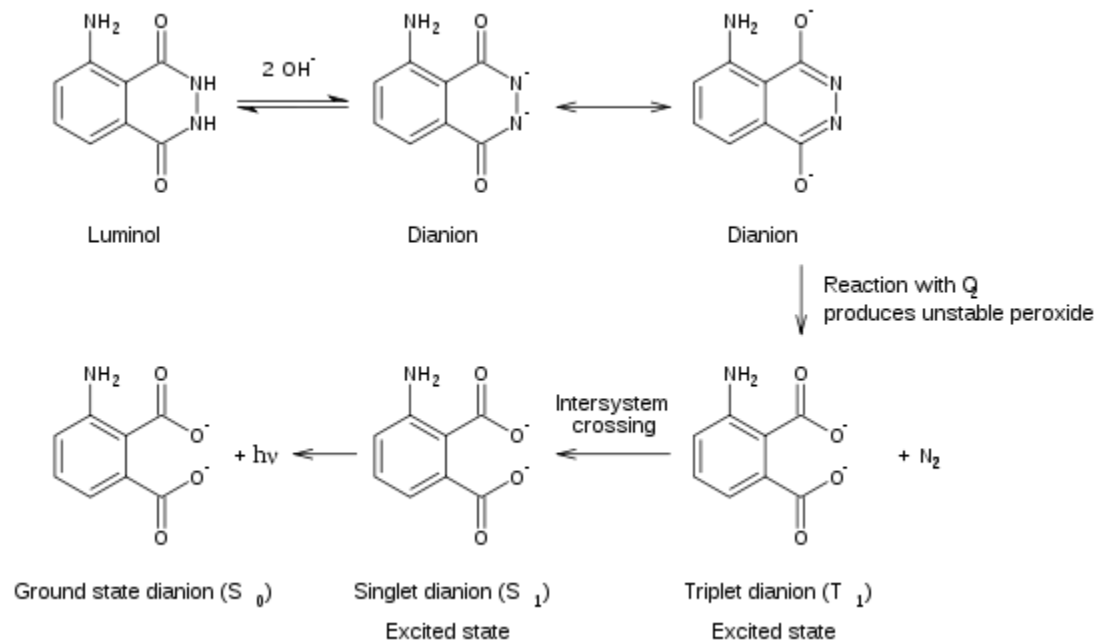
No bands present Negative Bands at either p31 OR p24 AND  
bands present at either gp160 OR gp120 Positive Bands  
present, but pattern does not meet criteria for  
positivity Indeterminate

- Band pattern Interpretation
- Lane 1, HIV+ serum (positive control)
- Lane 2, HIV- serum (negative control)
- Lane A, Patient A
- Lane B, Patient B
- Lane C, Patient C



Люмінесценцією називають природне світіння, що супроводжує ряд біохімічних реакцій, і виникає при переході збуджених молекул в основний електронний стан. Підсилення процесу за рахунок окиснення перекисом водню люмінолу і деяких його похідних з

залученням пероксидази чи каталази - **хемілюмінісценція**



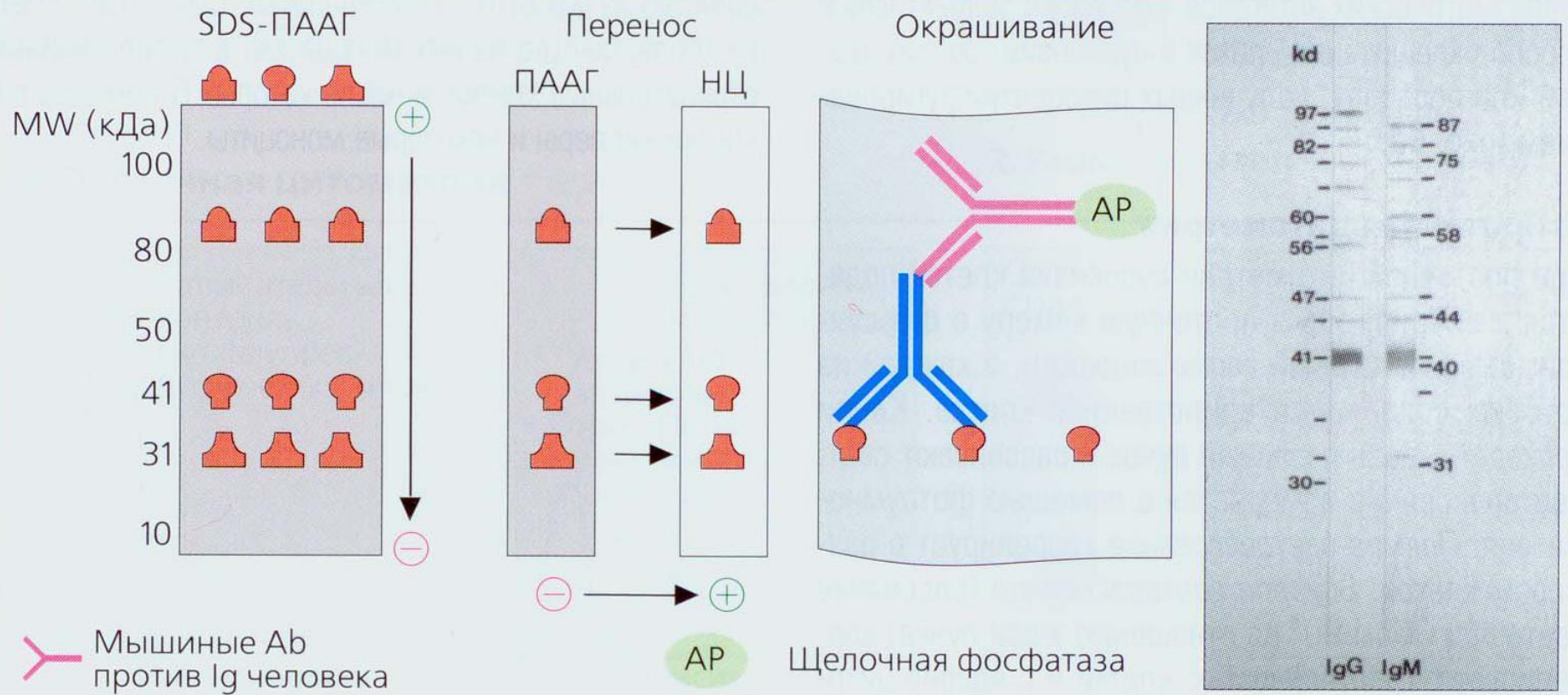




# Використання хемілюмінесцентних підходів в імуно - блот аналізі



Можливі 2 варіанти

- при аналізі по прямій схемі перексид водню окислює люмінол (+ пероксидаза);
- по непрямій схемі- антиген мітиться хемілюмінесціуючою групою (люмінолом чи його похідними). Така мітка у вільному стані окислюється з виділенням світла. У разі утворення комплексу з антитілом, вона втрачає можливість окислюватись, отже світіння буде відсутнє. В цьому випадку інтенсивність сигналу пропорційна тій кількості мітки, якій антиген не дав зв'язатись з антитілом.

Насьогодні широко використовується метод посиленої хемілюмінесценції **ECL-метод (Enhanced Chemiluminescence)**. В реакції пероксидаза хрому, кон'югована з вторинними антитілами, каталізує окиснення люмінолу до діаніону при додаванні перексиду водню, що пов'язано з емісією квантів світла. Чутливість реакції посилюється при додаванні фенольної похідної – **кумарової кислоти**. Візуалізація результатів відбувається з використанням рентгенівської плівки, з подальшим її проявленням.



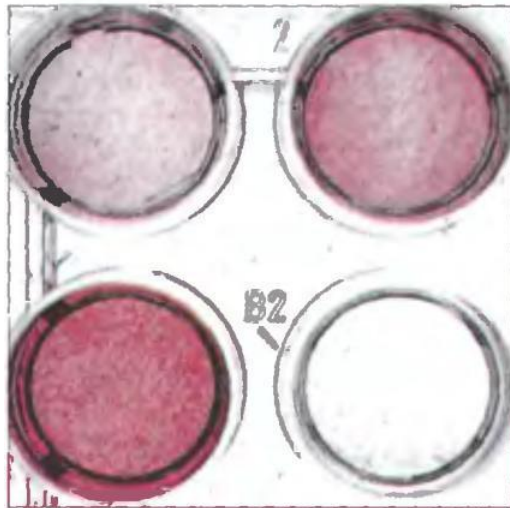
 Мышиные Ab против Ig человека  
 Человеческие Ab против *B. burgdorferi*

 AP Щелочная фосфатаза  
 Белки *B. burgdorferi*

**Г. Иммуноблоттинг (Вестерн блоттинг)**

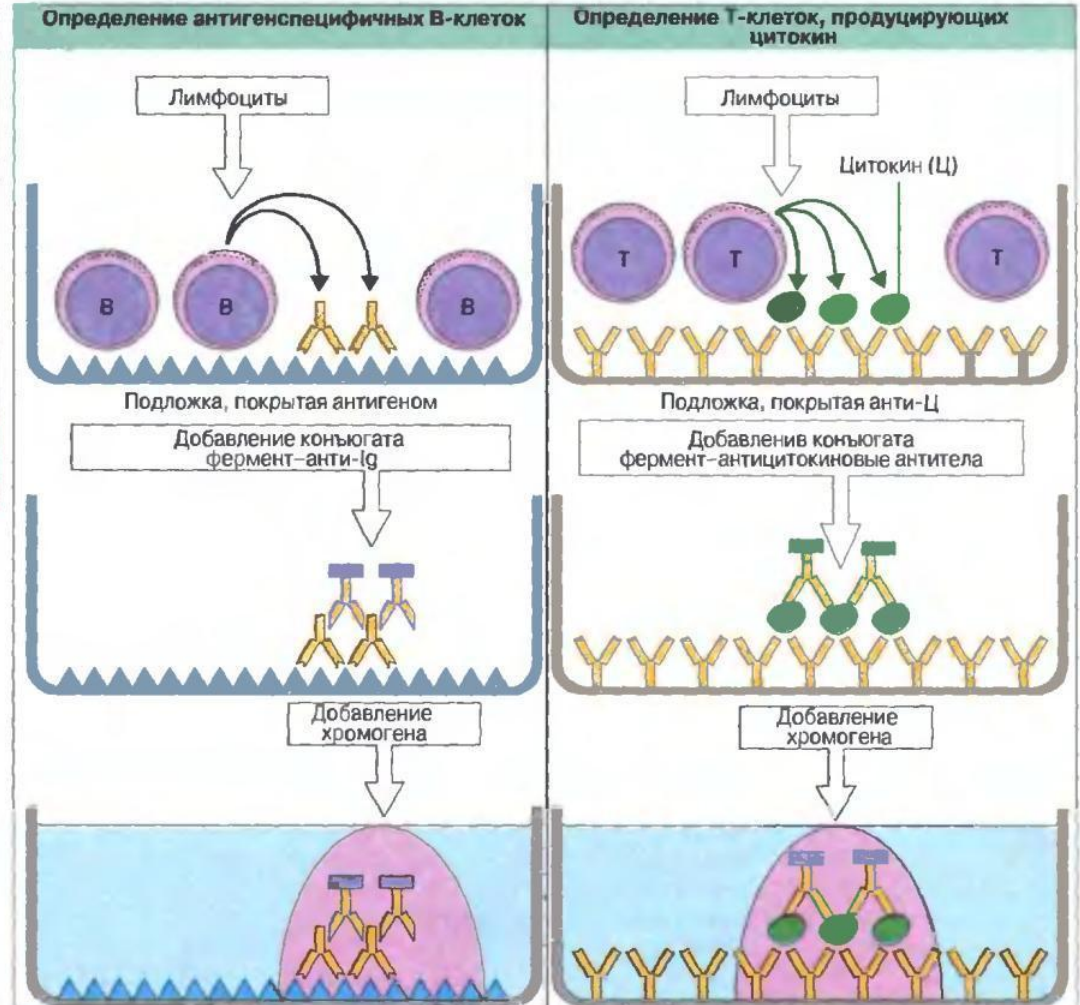
Иммуноблот

## Метод ELISPOT



**Рис. 29.24**

Для определения отдельных В-клеток, продуцирующих специфические антитела, или индивидуальных Т-клеток, секретирующих те или иные цитокины, применяют метод ELISPOT – иммуноферментный тест с локальным связыванием. Чтобы выявить антителообразующие клетки, лимфоциты наносят на сенсibilизированную антигеном подложку. Секретируемые специфические антитела связываются с антигеном в непосредственной близости к продуцирующей их клетке. Места связывания (пятнышки – англ. spots) выявляют хроматографически с использованием конъюгированных с фермен-



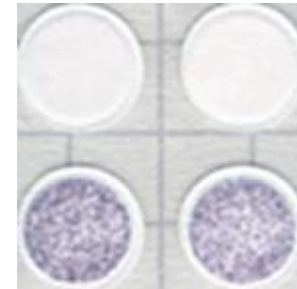
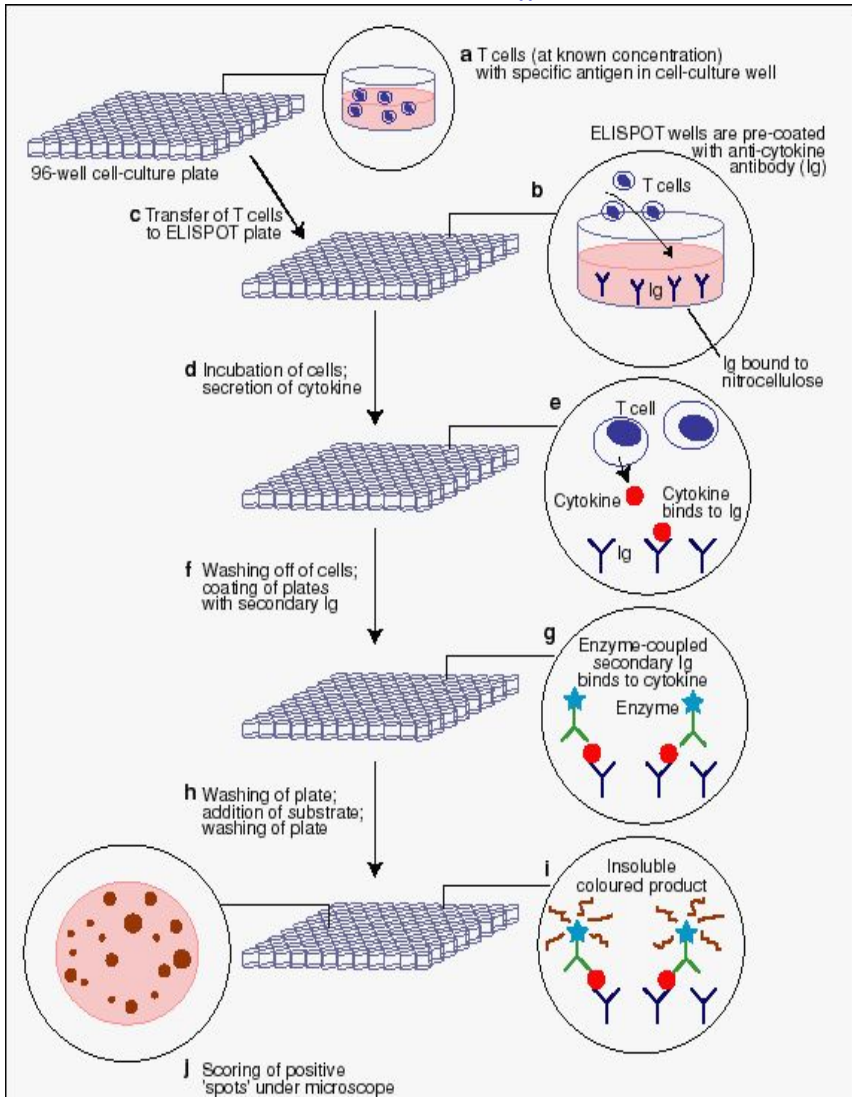
том антител анти-Ig и хромогена. Если нужно идентифицировать клетки, продуцирующие цитокины, на подложке иммобилизуют антицитокиновые антитела и определяют связывание их с цитокином при помощи конъюгированных с фер-

ментом антител к другому эпитопу цитокина. Вид обработанной таким образом подложки показан сверху слева. (Фотография любезно предоставлена P. Hutchings и издательством Blackwell Scientific Publications.)



# Метод ELISPOT

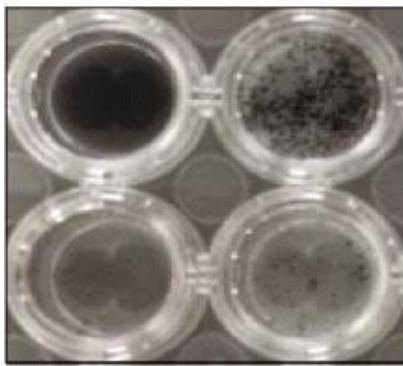
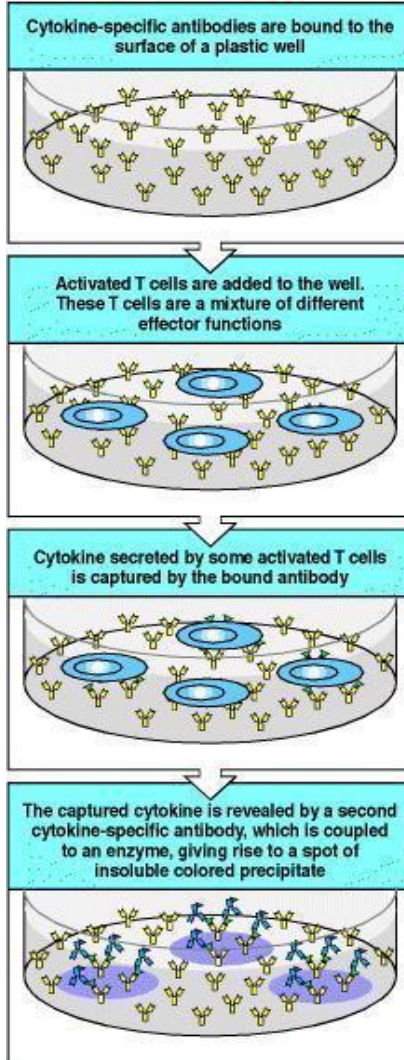
а) методичний підхід, б) візуалізація результатів, в) лунка планшета текції відразу двох різних цитокінів



ELISPOT assay to quantify secretion of cytokines by T lymphocytes (T cells)

Expert Reviews in Molecular Medicine

# Метод ELISPOT



**The frequency of cytokine-secreting T cells can be determined by the ELISPOT assay.** The ELISPOT assay is a variant of the ELISA assay in which antibodies bound to a plastic surface are used to capture cytokines secreted by individual T cells. Usually, cytokine specific antibodies are bound to the surface of a plastic tissue-culture well and the unbound antibodies are removed (top panel). Activated T cells are then added to the well and settle onto the antibody-coated surface (second panel). If a T cell is secreting the appropriate cytokine, this will then be captured by the antibody molecules on the plate surrounding the T cell (third panel). After a period of time the T cells are removed, and the presence of the specific cytokine is detected using an enzyme-labeled second antibody specific for the same cytokine. Where this binds, a colored reaction product can be formed (fourth panel). Each T cell that originally secreted cytokine gives rise to a single spot of color, hence the name of the assay. The results of such an ELISPOT assay for T cells secreting IFN- $\gamma$  in response to different stimuli are shown in the last panel. In this example, T cells from a patient with melanoma were stimulated with the mitogen PHA (top left), a peptide from cytomegalovirus (top right), a peptide from a melanoma tumor associated antigen (lower left), and with no peptide (lower right). You can see the greater response to the cytomegalovirus peptide compared to the melanA peptide by the greater number of spots..

## Получение моноклональных антител

