

ВИРУСОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

Тема : Постановка ИФА. Учет результатов
реакций

Нгуен Ван Винь
13BC5-2

- **Иммуноферментный анализ (ИФА)** -это лабораторное исследование, основанное на реакции «антиген-антитело». Суть этого лабораторного метода - выявление специфических антител с помощью специальных биохимических реакций, которые помогают определить присутствие или отсутствие антител и их количество.

Основной принцип ИФА

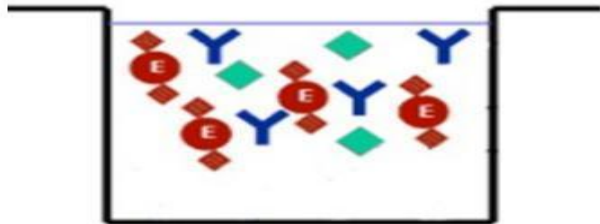


Вариант ИФА

Гомогенный

Все стадии в растворе.
Нет разделения ИК от непрореагировавших компонентов

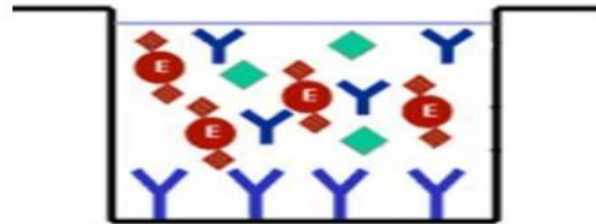
↓
Определение
низкомолекулярных
субстанций



Гетерогенный

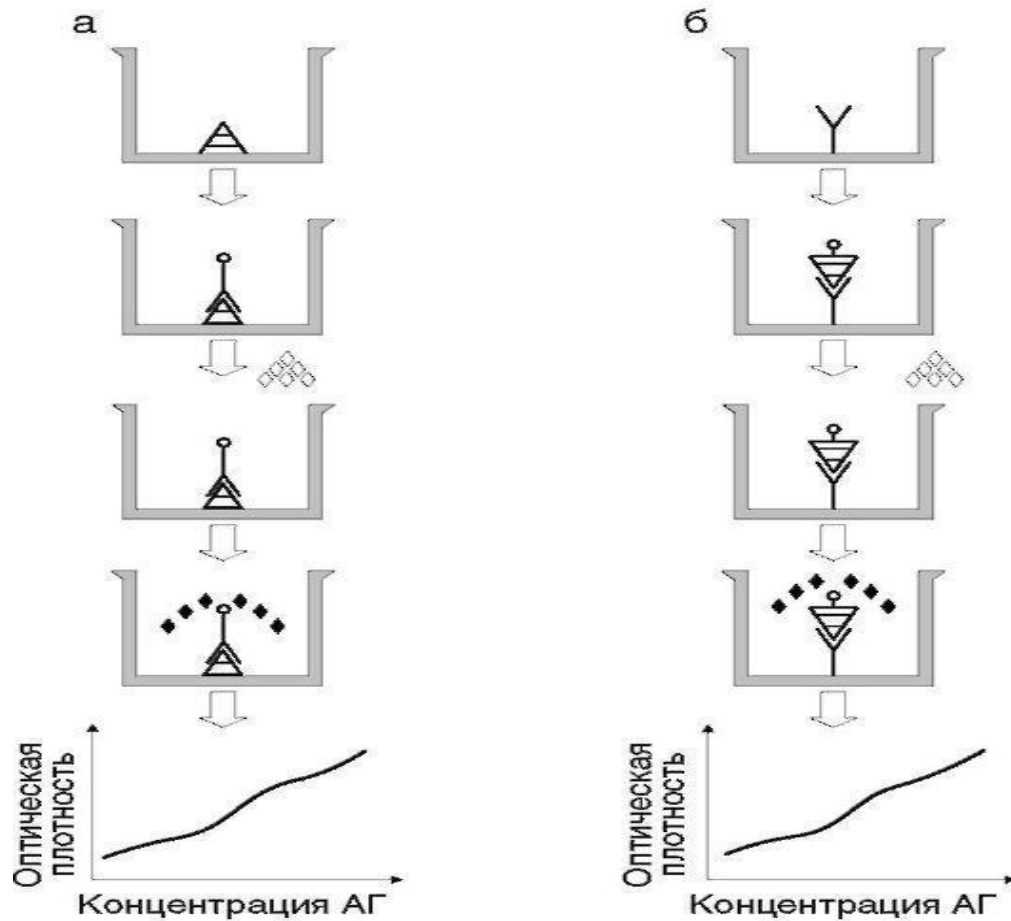
Анализ в двухфазной системе.
Обязательная стадия отмывки ИК от непрореагировавших компонентов

↓
Твердофазный



- **Прямой ИФА**

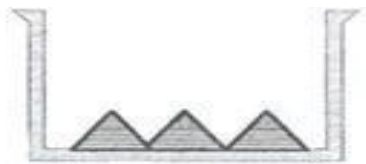
- 1. В лунках панелей адсорбируют антигены или антитела (исследуемый материал). Выше отмечалось, что антигены существенно различаются по способности адсорбироваться на разных видах пластика в зависимости от того, к какому классу веществ (белкам, углеводам или липопротеинам) они принадлежат.
- Контроль. В качестве контроля используют лунки с адсорбированным положительным контрольным образцом, в котором обязательно содержится искомым антиген, и отрицательным контрольным образцом заведомо не содержащим исследуемого антигена. При наличии очищенного стандартного антигена реакцию проводят в нескольких разведениях, так чтобы можно было построить калибровочную кривую.
- 2. «Блокируют свободные места связывания, оставшиеся на твердой фазе, с помощью БСА казеина и др. (для предотвращения неспецифической сорбции конъюгата на твердой фазе).
- 3. В лунки вносят меченные ферментом антитела или антигены (конъюгат), инкубируют. Связывание конъюгата с твердой фазой будет происходить лишь в случае комплементарности обоих компонентов системы. После инкубации с конъюгатом лунки отмывают, удаляя, таким образом, не связавшуюся часть конъюгата.
- 4. Затем в лунки вносят субстрат, специфичный для используемого фермента, и инкубируют. По достижении оптимального уровня окрашивания в лунках с положительным контролем, ферментативную реакцию останавливают.
- 5. Учет реакции . Сначала результаты реакции учитывают визуально (Рис: 3)



- Рисунок 3
- а) для выявления антигена; б) для выявления антител.

• **Непрямой ИФА**

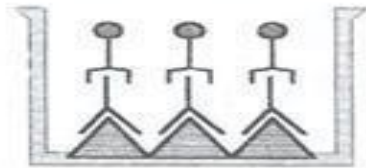
- 1. Антиген адсорбируют на твердой фазе, затем отмывают от несвязавшихся компонентов.
- 2. Блокируют свободные места связывания. Отмывают.
- 3. В лунки вносят исследуемый материал, инкубируют и затем проводят процедуру отмывки. Параллельно ставят пробы с положительным и отрицательным контролем.
- 4. Добавляют антиглобулиновый конъюгат в рабочем разведении, инкубируют, отмывают от несвязавшихся компонентов.
- 5. Вносят субстрат, инкубируют. По достижении оптимального уровня окрашивания в лунках с положительным контролем реакцию останавливают, добавляя стоп-раствор.
- 6. Измеряют количество продукта реакции на ИФА-ридере (рис.4).



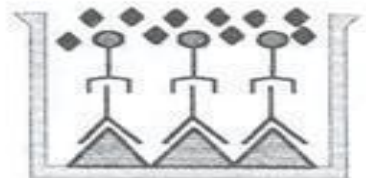
адсорбция антигена на
твердой фазе



внесение исследуемого материала с
содержащимися специфическими
антителами



внесение антиглобулинового
конъюгата



внесение субстрата

образовавшийся продукт реакции
выявляют на ИФА -ридере

- Рисунок 4. Непрямой ИФА для выявления антител.

- **«Сэндвич» – вариант ИФА**

1. На твердой фазе иммобилизуют моноклональные антитела или аффинно-очищенные поликлональные антитела.

2. В лунки панелей вносят исследуемый образец, параллельно ставят положительный контрольный образец и отрицательный контрольный образец в различных разведениях. Инкубируют и отмывают.

3. В лунки вносят меченные ферментом моноклональные или поликлональные антитела – конъюгат. После инкубации проводят отмывку.

4. Вносят субстрат, инкубируют. Реакцию останавливают при достижении оптимального окрашивания в лунках с положительным контролем.

5. Учет результатов на ИФА-ридере.

Основным достоинством метода является высокая чувствительность, превосходящая возможности других схем ИФА (рис.5).

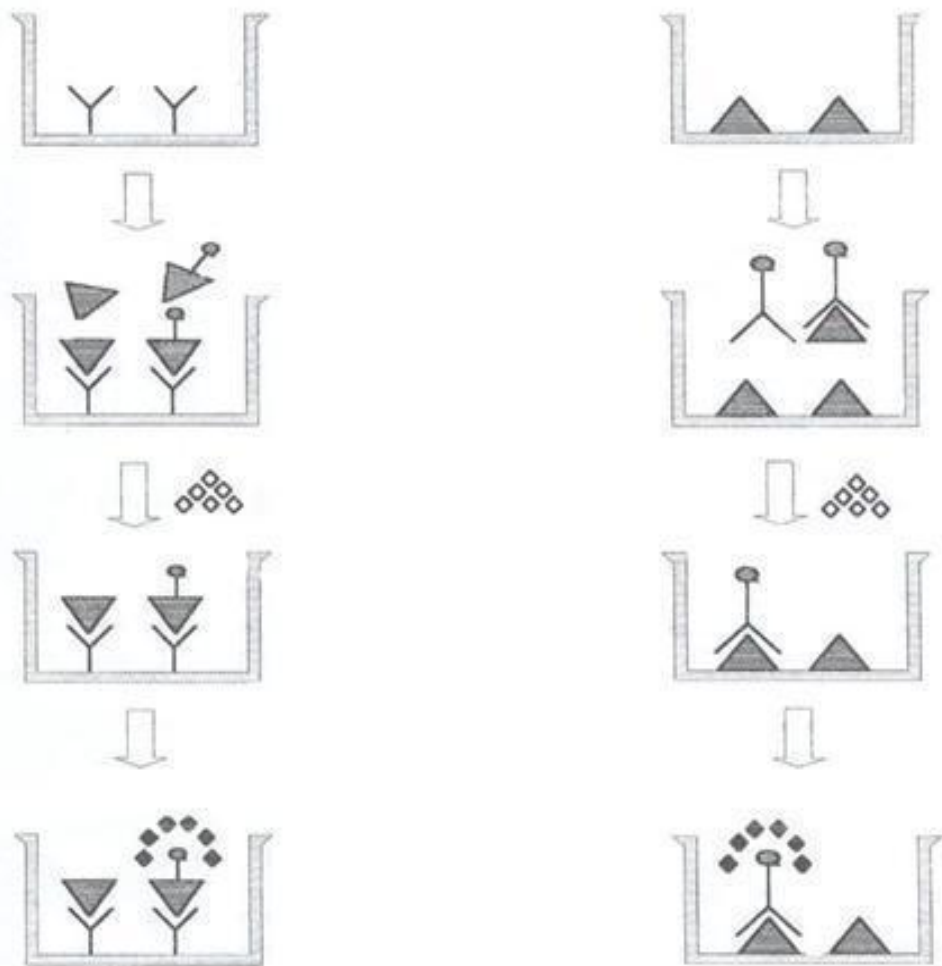


- Рисунок 5. «Сэндвич»- вариант ИФА.

- **Конкурентный ИФА**

1. На твердой фазе иммобилизуют специфические для выявляемого антигена моноклональные антитела.
2. В лунки панелей вносят в известной концентрации антиген, меченный ферментом, и исследуемый образец. Проводят инкубацию и отмывку. Параллельно в соседних лунках ставят положительный и отрицательный контроли. Для построения калибровки используют стандартный немеченый антиген в различных разведениях.
3. Добавляют субстрат, инкубируют, останавливают реакцию при развитии оптимального окрашивания в лунках с положительным контролем.
4. Учет реакции на ИФА-ридере. (Рисунок 6)

- **Ингибиторный ИФА.**
- 1. В лунках панелей адсорбируют стандартный антиген. Подбирают рабочее разведение меченых антител с помощью титрования.
- 2. Проводят предварительную инкубацию конъюгата в разведении, предшествующем рабочему, с разведениями исследуемого образца, стандартного антигена и положительных контрольных проб.
- 3. Смесь переносят в лунки панелей. Для контроля 100%-ного связывания в несколько лунок вносят только меченые антитела, без ингибирующего антигена. Панели инкубируют, затем проводят отмывку.
- 4. Добавляют субстрат.
- 5. Проводят учет результатов. (Рисунок 7)



- Рисунок 6. Конкурентный ИФА Рисунок 7. Ингибиторный ИФА