



Радиоиммунный анализ (РИА) и Иммуноблоттинг (ИБ)

Выполнили студенты 301 группы л/ф
Лопарев В.В.
Распутний С.Д.

Радиоиммунный анализ

- — метод количественного определения биологически активных веществ, (гормонов, ферментов, лекарственных препаратов и др.) в биологических жидкостях, основанный на конкурентном связывании искомым стабильных и аналогичных им меченных радионуклидом веществ со специфическими связывающими системами.

- Данный метод был разработан Розалин Сасмен Ялоу и Соломоном Берсоном в 50-х годах XX века, а широкое признание приобрел в 80-е годы. Радиоиммунному анализу до сих пор нет 100% альтернативы, поскольку исследование обладает очень высокой чувствительностью и специфичностью. Еще одно преимущество метода, о котором говорят специалисты, - это возможность автоматизации и стандартизации, а также получение ответов в цифровом выражении.



Где применяют

Ученые, открывшие радиоиммунный анализ, с его помощью изучали клиренс инсулина у больных диабетом, поэтому первоначально его применяли для измерения концентрации инсулина в плазме крови. Однако чем больше последующие поколения ученых изучали РИА, тем он становился популярнее и востребованнее.

Спектр применения РИА:

- ❑ измерения концентрации самых разных гормонов и негормональных веществ;
- ❑ диагностируют заболевания эндокринной и сердечно-сосудистой систем;
- ❑ определения маркеров опухолей и контроля эффективности лечения при онкологических диагнозах;
- ❑ для установления причин бесплодия у женщин и мужчин;
- ❑ выявляют «невидимые» для других методов нарушения развития плода;
- ❑ определяют концентрацию в крови ферментов, иммуноглобулинов и лекарственных веществ.

Доступность РИА

A close-up photograph of a person wearing a white lab coat and gloves, using a grey pipette to transfer liquid into a multi-well plate. The plate has several wells containing orange and yellow liquid. The background is slightly blurred, showing a laboratory environment with a blue surface.

- Этот вид анализа, проводившийся долгие десятки лет в условиях научно-исследовательских лабораторий, постепенно переходит в обычные клиники и становится обычным методом диагностики.
- А с другой стороны диагностика посредством радиоиммунного анализа предусматривает использование дорогостоящего оборудования, а именно гамма-счетчиков, к тому же радиоактивные материалы, применяемые для анализа имеют относительно короткий срок годности диагностического набора
- И еще такой нюанс: указанный метод – один из современных анализов, но его постепенно вытесняют другие еще более современные методики диагностирования.

В чем суть РИА

Исследование выполняют *in vitro*. Для РИА выпускают стандартные наборы реагентов, каждый из которых определяет концентрацию определенного вещества. Анализ проводится в несколько этапов:

- смешивают биологический материал с реагентом;
- полученную смесь инкубируют несколько часов;
- разделяют свободное и радиоактивное вещество;
- осуществляют радиометрию проб;
- рассчитывают результаты.

Есть ли перспективы у метода?

- Сотрудники Квинслендского института медицинских исследований предложили методику, с помощью которой можно узнать, насколько эффективно проходит лечение рака.
- Специалисты утверждают, что в перспективе еще одной широкой областью применения метода в ближайшее время станет определение вирусов. Активно ведутся исследования в этом направлении, дающие первые обнадеживающие результаты.



Иммуноблотинг

- — современный высокочувствительный аналитический метод, используемый для определения в образце специфичных белков с помощью антител.
- Идентификация исследуемого белка (например, онкобелки и др.) в сложных смесях или экстрактах различных тканей является одной из часто встречающихся задач. Используя такой инструмент как специфические антитела, можно определить исследуемый белок с минимумом временных и финансовых затрат.

Принцип метода

● Реакция проводится в несколько этапов (на примере выявления антител к ВИЧ):

1) Антигены, экстрагированные из исследуемого объекта — ВИЧ (белки-р гликопротеины-др), подвергаются электрофорезу в полиакриламидном геле — разделению антигенов на фракции по молекулярной массе.

2) Гель покрывают нитроцеллюлозной мембраной, и на неё при помощи электрофореза переносятся фракции антигена.

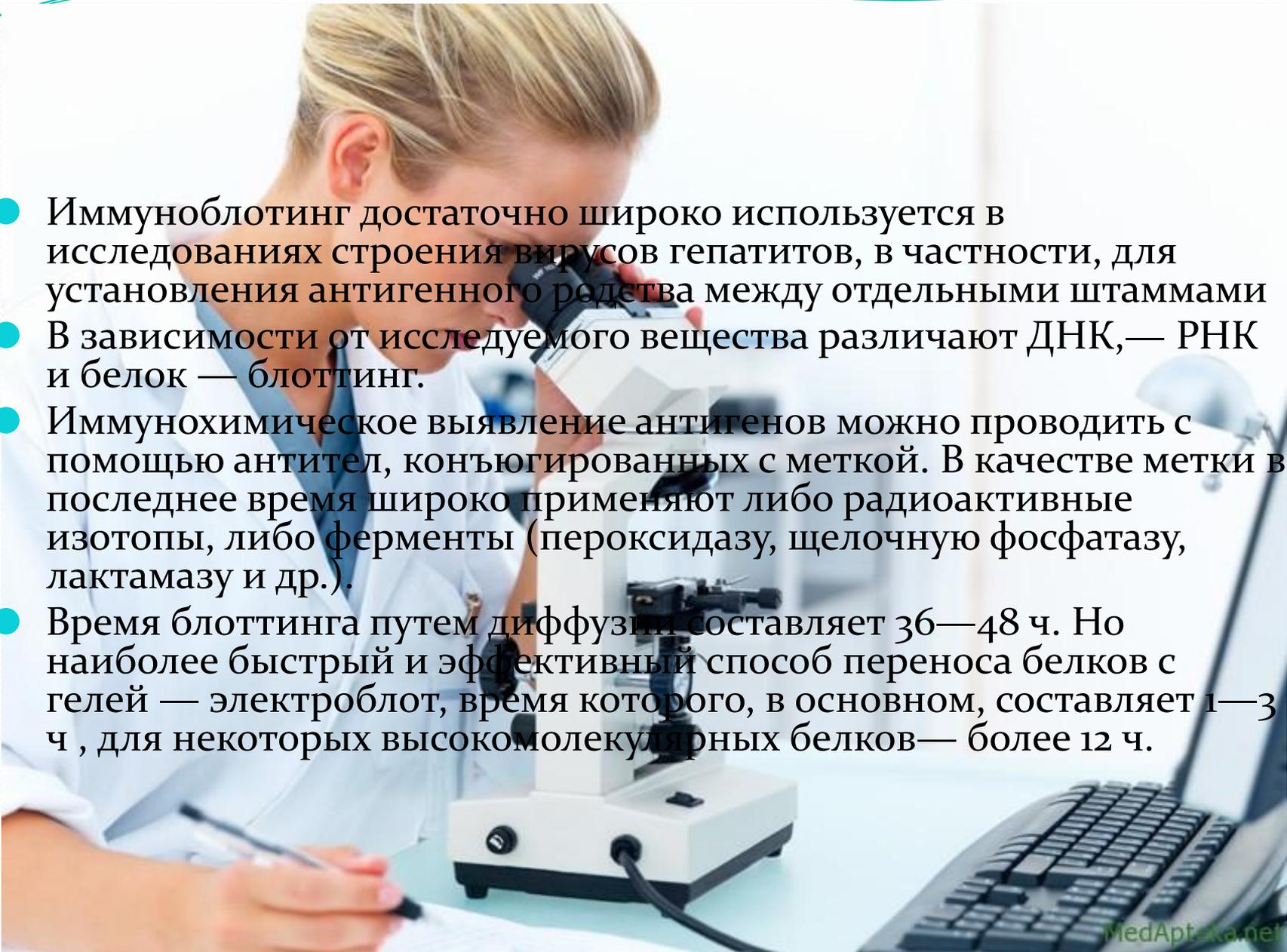
Нитроцеллюлоза ведёт себя подобно промокательной бумаге. Мембрану разрезают на полоски (стрипы).

3) Стрип с нанесёнными на него антигенами ВИЧ погружают в сыворотку обследуемого и затем отмывают от несвязавшегося материала.

4) Стрипы инкубируют антиглобулиновой сывороткой, меченой пероксидазой, отмывают.

5) Добавляют субстрат и отмечают число окрашенных фракций (пятен), которые соответствуют зоне локализации комплекса АГ-АТ.



- 
- Иммуноблоттинг достаточно широко используется в исследованиях строения вирусов гепатитов, в частности, для установления антигенного родства между отдельными штаммами
 - В зависимости от исследуемого вещества различают ДНК,— РНК и белок — блоттинг.
 - Иммунохимическое выявление антигенов можно проводить с помощью антител, конъюгированных с меткой. В качестве метки в последнее время широко применяют либо радиоактивные изотопы, либо ферменты (пероксидазу, щелочную фосфатазу, лактамазу и др.).
 - Время блоттинга путем диффузии составляет 36—48 ч. Но наиболее быстрый и эффективный способ переноса белков с гелей — электроблот, время которого, в основном, составляет 1—3 ч, для некоторых высокомолекулярных белков— более 12 ч.

- Метод ИБ по целому ряду обстоятельств получил наибольшее распространение как метод, пригодный для использования в качестве теста подтверждения.
- Безусловное достоинство метода — возможность тестирования антител к слабо или вовсе нерастворимым антигенам и исключение стадии введения радиоактивной метки в антигены.

Спасибо за внимание!

