

Коломыткин О. В.

**БИОФИЗИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА
(ИФА, ELISA)**

Учебное пособие



Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

О. В. Коломыткин

**БИОФИЗИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА
(ИФА, ELISA)**

Учебное пособие

Электронное издание
локального распространения

Санкт-Петербург
Наукоемкие технологии
2024

© Коломыткин О. В., 2024
ISBN 978-5-907804-47-0

УДК 543:577.3
ББК 52.57
К61

Автор:

О. В. Коломыткин – доктор физико-математических наук,
профессор Научно-образовательного центра Института теоретической и
экспериментальной биофизики Российской академии наук

Рецензенты:

Г. Д. Миронова – доктор биол. наук, Заслуженный деятель наук РФ, профессор, заведующая
лабораторией Митохондриального транспорта Института экспериментальной и теоретической
биофизики РАН;

А. А. Кособрухов – доктор биол. наук, заведующий лабораторией Экологии и физиологии
фототропных организмов Института фундаментальных проблем биологии РАН

К61 Коломыткин О. В. Биофизические принципы иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA) [Электронный ресурс]: учебное пособие. / О. В. Коломыткин. – Электрон, текстовые дан. (4,4 Мб). – СПб.: Научное издание, 2024. – 24 с. – 1 электрон., опт. диск (CD-ROM).

ISBN 978-5-907804-47-0

В учебном пособии представлены современные данные о модификациях иммуноферментного анализа, наиболее часто используемых в научных исследованиях и медицинской практике.

Учебное пособие предназначено для аспирантов и студентов при подготовке для проведения практических лабораторных занятий по иммуноферментному анализу.

Учебное пособие одобрено для публикации на заседании Учёного совета ИТЭБ РАН
21 марта 2024 г., протокол № 2.

Текстовое электронное издание

Минимальные системные требования:

- процессор: Intel x86, x64, AMD x86, x64 не менее 1 ГГц;
- оперативная память RAM ОЗУ: не менее 512 МБайт;
- свободное место на жестком диске (HDD): не менее 120 МБайт;
- операционная система: Windows XP и выше;
- Adobe Acrobat Reader;
- дисковод CD-ROM;
- мышь.

УДК 543:577.3
ББК 52.57

ISBN 978-5-907804-47-0

© Коломыткин О. В., 2024

Учебное издание

Коломыткин Олег Владимирович

Биофизические принципы иммуноферментного анализа
(ИФА, ELISA)

Учебное пособие

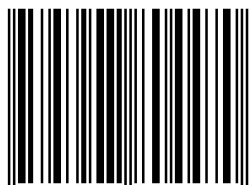
Электронное издание
локального распространения

Знак информационной продукции (в соответствии с законом № 436-ФЗ)
12+

Издательство «Наукоемкие технологии»
ООО «Корпорация «Интел Групп»
<https://publishing.intelgr.com>
E-mail: publishing@intelgr.com
Тел.: +7 (812) 945-50-63

Подписано к использованию 03.05.2024 г.
Объем издания – 4,4 Мб.
Комплектация издания – 1 CD.
Тираж 100 CD.

ISBN 978-5-907804-47-0



9 785907 804470 >

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| Введение..... | 5 |
| Адаптивный гуморальный иммунитет..... | 5 |
| Структура иммуноглобулинов IgM и IgG..... | 6 |
| Антитела класса IgM против вируса SARS-CoV-2..... | 9 |
| Антитела класса IgG против вируса SARS-CoV-2..... | 10 |
| Схемы иммуноферментного анализа | 11 |
| Непрямой неконкурентный ИФА для регистрации специфических антител..... | 12 |
| Непрямой неконкурентный ИФА по схеме «сэндвич» для регистрации антигена | 18 |
| Выводы и перспективы развития метода..... | 20 |
| Контрольные вопросы..... | 22 |
| Список литературы..... | 23 |

ВВЕДЕНИЕ

Иммуноферментный анализ (ИФА) – метод количественной и качественной оценки концентрации макромолекул, вирусов, других соединений при помощи использования их высокоспецифичного связывания с антителами и ферментного усиления окрашивания раствора.

Поскольку в основе иммуноферментного анализа лежит высокоспецифичное связывание антиген-антитело рассмотрим сначала адаптивный гуморальный иммунитет, при помощи которого организм вырабатывает высокоспецифичные антитела.

АДАПТИВНЫЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ

Адаптивный гуморальный иммунитет – форма иммунитета, направленная по большей части на внеклеточные антигены и необходимая для защиты организма от вирусов, а также от бактериальных патогенов, грибков и токсинов.

Адаптивный гуморальный иммунитет осуществляется следующим образом. В ответ на появление в организме чужеродного вещества, называемого антигеном, в организме развиваются сложные иммунные реакции, в результате которых специальные клетки в плазме крови, называемые В-лимфоцитами, синтезируют антитела, специфичные к данному антигену. Антитела имеют белковую природу и называются также иммуноглобулинами. Антитела способны высокоспецифичным образом связываться с антигеном с очень большой константой связывания ($2 \cdot 10^7 - 5 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}$). При этом данные антитела практически не связываются с другими антигенами. Каждая клетка В-лимфоцитов продуцирует только один тип антител. Следовательно, каждый антиген активирует только «свои» В-лимфоциты, которые продуцируют антитела к нему.

Антитела связываются высокоспецифичным образом с патогеном или токсином и при этом нейтрализуют их.

Свойство антител связывать антиген высокоспецифичным образом с весьма большой константой связывания используется в иммуноферментном анализе (ИФА). В английском написании: The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Иммунный ответ является сложным процессом, включающим целый ряд различных молекулярных систем. Мы не будем рассматривать иммунный ответ в деталях. Заметим только, что на начальном этапе иммунного ответа антиген активирует В-лимфоциты, которые продуцируют иммуноглобулины типа IgM. По мере созревания иммунного ответа начинают активироваться В-лимфоциты, продуцирующие иммуноглобулины типа IgG. В-лимфоциты превращаются в бласт-клетки, которые являются «фабриками» по производству специфических IgG. Иммуноглобулины IgM имеют меньшую константу связывания с антигеном, зато имеют 10 одинаковых мест связывания антигена. Иммуноглобулины IgG имеют большую константу связывания с антигеном и два одинаковых места связывания антигена. Структура иммуноглобулинов IgM и IgG показана на рисунках 1, 2.

СТРУКТУРА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ IgM И IgG

Иммуноглобулин IgM имеет сложную структуру и большую молекулярную массу ≈ 990 кДа. Молекула иммуноглобулина IgM является пентамером (рис. 1). То есть молекула IgM состоит из пяти субъединиц – мономеров. Все мономеры состоят из двух тяжёлых μ -цепей и двух лёгких цепей λ - или κ -типов. Мономеры соединены друг с другом цистеин-дисульфидными мостиками и J-цепью. На внешнем конце каждой тяжёлой μ -цепи имеется переменный VH-домен длиной ≈ 110 аминокислотных остатков. На внешнем конце каждой лёгкой цепи также имеется переменный VL-домен примерно такой же длины. Переменные участки формируют на внешней стороне каждого мономера два места высокоспецифичного связывания антигена. Таким образом каждая молекула IgM имеет 10 мест связывания антигена.

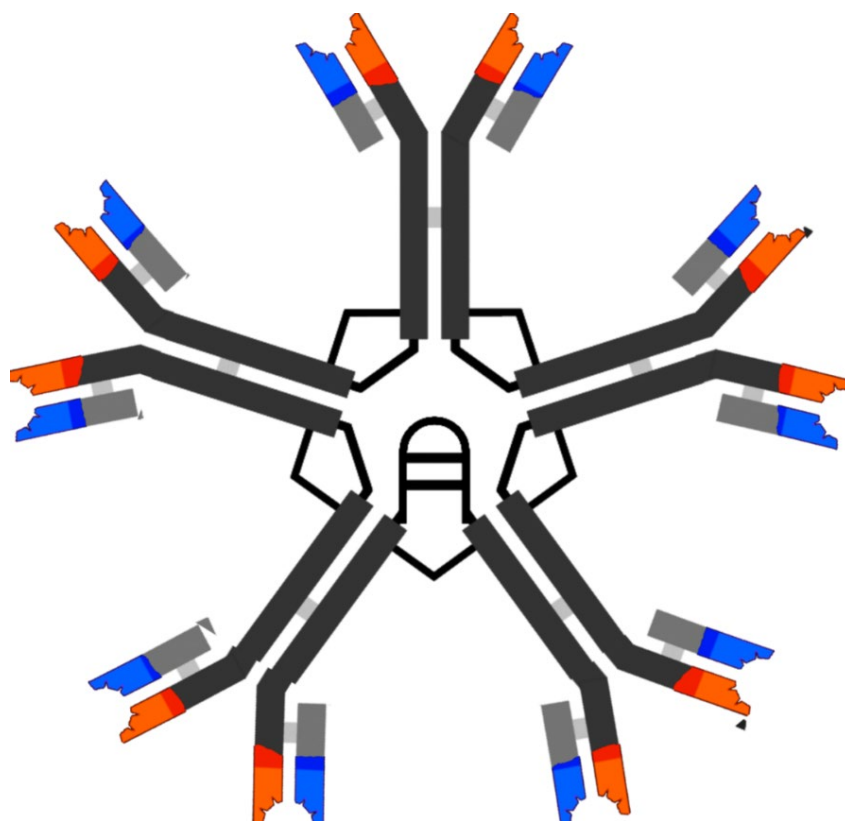


Рис. 1. Структура молекулы иммуноглобулина IgM [4, 10].

Вариабильные домены пептидных цепей показаны красным и синим цветами. Вариабельные домены формируют 10 мест связывания специфического антигена

Самыми распространёнными антителами в плазме крови человека являются иммуноглобулины IgG ($\approx 75\%$). Иммуноглобулин IgG имеет молекулярную массу ≈ 150 кДа. Форма молекулы IgG похожа на форму одного мономера IgM (рис. 1, 2). Молекула IgG состоит из двух одинаковых половин, которые вместе образуют Y-образную форму. Каждая половина молекулы IgG состоит из одной тяжёлой цепи типа γ (масса ≈ 50 кДа) и одной лёгкой цепи (масса ≈ 25 кДа). Обе тяжёлые цепи связаны друг с другом и с лёгкими цепями при помощи цистеин-дисульфидных связей. Два верхних конца Y-образной структуры формируются вариабельными аминокислотными последовательностями. Вариабельные участки участвуют в формировании двух идентичных мест связывания с антигеном.

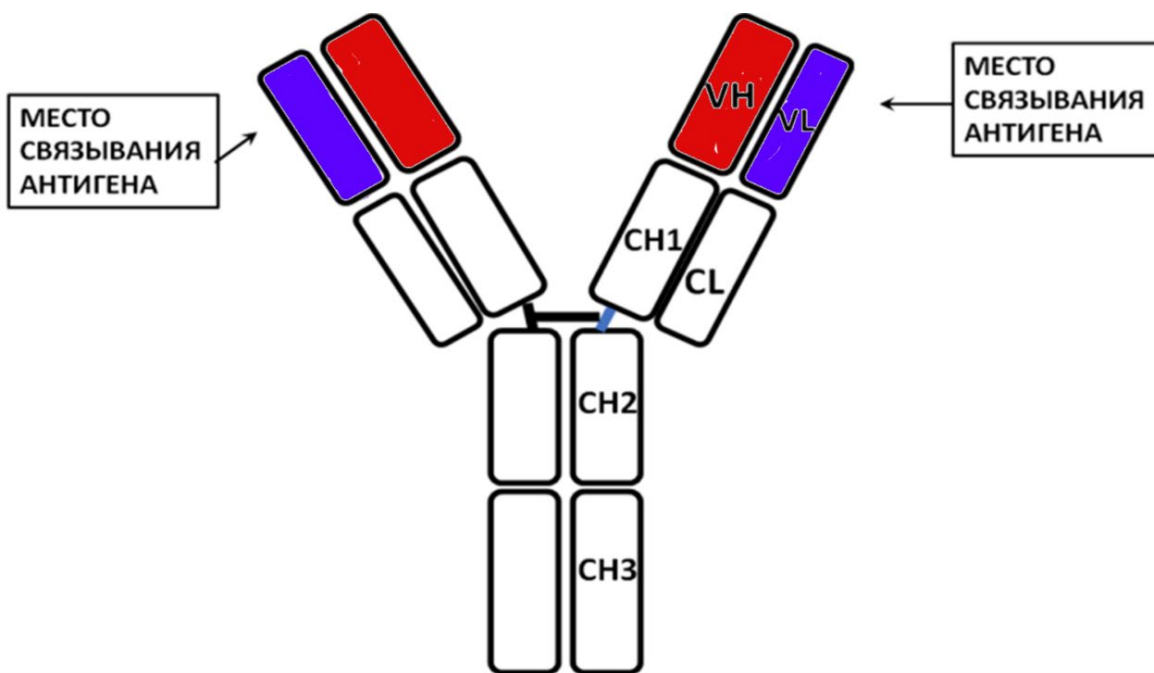


Рис. 2. Структура молекулы иммуноглобулина IgG [4].

Показаны постоянные (CL, CH1, CH2, CH3) и переменные (VH, VL) домены пептидных цепей. Переменные домены показаны красным и синим цветами. Место связывания со специфическим антигеном определяется переменными доменами. Правая и левая части молекулы – симметричны

Считается, что остальная часть молекулы IgG имеет постоянный состав и структуру для каждого подкласса IgG, которые обозначают IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 для человеческого организма. Константная часть молекулы IgG содержит высококонсервативные сайты N-гликозилирования. Присоединённые N-гликаны образуют сложные структуры.

Отметим, что общая фракция иммуноглобулинов легко выделяется из плазмы крови методом высаливания в аммоний сульфате [4, 10]. Этот же метод хорошо работает для выделения специфических иммуноглобулинов в случае получения моноклональных антител.

Рассмотрим применение высокоспецифичных антител в иммуноферментном анализе на примере диагностики короновиральной инфекции, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2 (рис. 3). На рисунке видно, что вирус имеет сферическую форму со множеством выступающих шипиков.

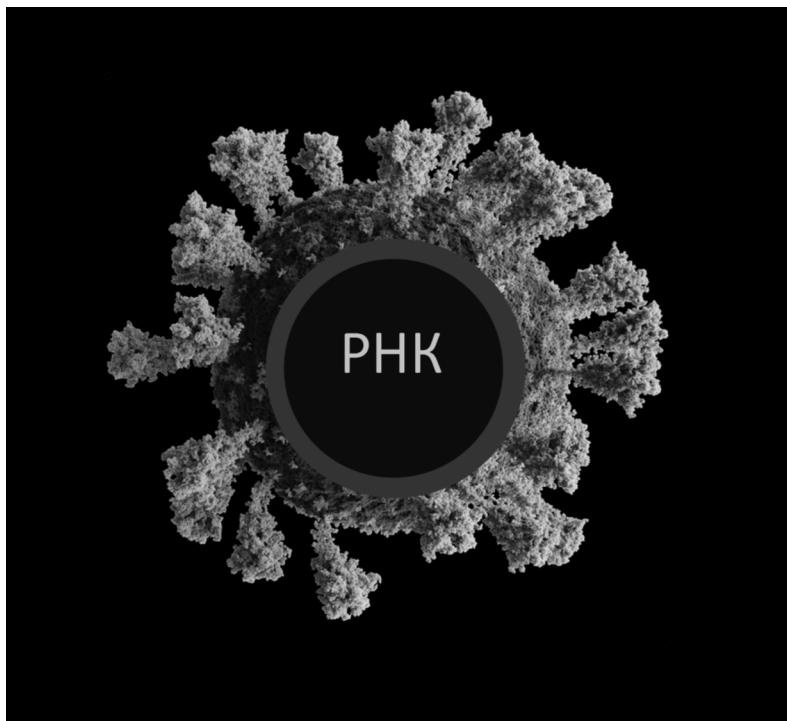


Рис. 3. Атомарная структура коронавируса SARS CoV-2, РНК-вирус [11]

На концах шипиков вируса расположены рецептор-связывающие домены (RBD). При помощи этих доменов вирус связывается с клеткой, которую он затем инфицирует, вводя в неё свою РНК.

АНТИТЕЛА КЛАССА IgM ПРОТИВ ВИРУСА SARS-COV-2

Обычно через 1–2 недели после контакта организма с возбудителем болезни концентрация антител класса IgM в плазме крови становится достаточно большой для их обнаружения. Обычно это происходит за ≈ 5 дней до появления симптомов

заболевания. Как правило время, в течении которого данные антитела класса IgM обнаруживаются в плазме крови, меньше 2–3 месяцев. В течение этого времени антитела класса IgM постепенно полностью заменяются на IgG.

Следовательно, регистрация специфических антител класса IgM указывает на недавнее инфицирование вирусом SARS CoV-2. Необходимо заметить, что положительный результат теста на IgM недостаточен для диагностики заболевания. Более надёжный результат даёт тест на антитела класса IgG.

АНТИТЕЛА КЛАССА IgG ПРОТИВ ВИРУСА SARS-COV-2

Через 21–28 дней от момента заражения специфические IgG начинают регистрироваться в крови. Их концентрация может оставаться достаточно большой в течение длительного времени.

Из концентрации специфических антител IgG в крови можно сделать вывод об инфицировании в прошлом и определить наличие специфического иммунного ответа.

Можно выделить два механизма, при помощи которых антитела нейтрализуют вирус. (1) Антитела к рецептор-связывающему домену (RBD) прочно связываются с ним. Это приводит к тому, что вирус теряет способность связываться с рецепторами на поверхности клеток. Поэтому инфицирование клеток вирусом прекращается. (2) Вследствие того, что молекула антитела IgG имеет два места связывания коронавируса, она приводит к «слипанию» двух вирусов друг с другом. Следовательно, множество молекул антител приводит к преципитации коронавируса (рис. 4). В последующем преципитат утилизируется макрофагами.

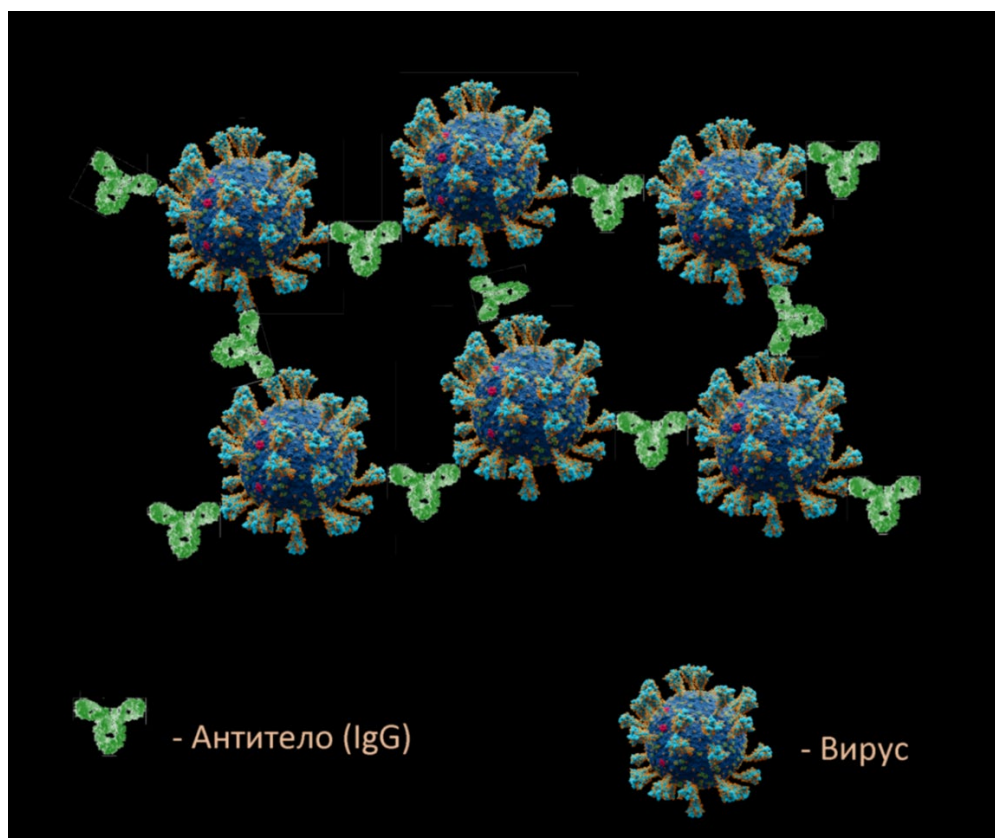


Рис. 4. Преципитация коронавируса антителами IgG

СХЕМЫ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

ИФА позволяет определять наличие или отсутствие специфических антител к коронавирусу или к другим антигенам в крови. Это является преимуществом ИФА по сравнению с методом, основанным на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Метод ПЦР позволяет обнаружить в организме вирус, но не может обнаружить антител к нему. Сначала мы рассмотрим наиболее простую и часто применяемую схему ИФА для обнаружения антител к заданному антигену. Для коронавируса SARS CoV-2 в качестве антигена используют спайковый (S) белок SARS CoV-2. Данный белок находится на концах шипиков коронавируса, которые обеспечивают взаимодействие вируса с цитоплазматической мембраной клетки. Иногда для большей надёжности результата проводят дополнительный ИФА для ещё одного вирусного белка-антигена.

НЕПРЯМОЙ НЕКОНКУРЕНТНЫЙ ИФА ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ

Ключевым элементом современного ИФА является плата (планшет) из полистирола, содержащая 96 лунок. Применение полистирола позволило обеспечить хорошую адсорбцию-иммобилизацию белков на его поверхности. Это свойство позволило разработать ИФА как чрезвычайно удобный и надёжный гетерогенный метод анализа. Конструкция платы позволяет автоматизировать анализ.

Метод осуществляют, используя следующие пять стадий.

1. Сначала в лунки заливают раствор, содержащий антиген (спайковый (S) белок для анализа коронавируса, доступный в коммерческой продаже). Обычно в каждую лунку заливают 50–300 микролитров раствора. Плату выдерживают в течении 0,5–12 часов (4° С) для надёжной иммобилизации антигена на дне и стенках лунок. Раствор содержит также бычий сывороточный альбумин, который адсорбируется на тех местах полистирола, которые остаются не занятыми антигеном. Таким образом альбумин препятствует неспецифическому связыванию антител с поверхностью полистирола в последующих стадиях анализа. Затем раствор, содержащий антиген и альбумин выливают из лунок и промывают лунки несколько раз чистым буферным раствором. На данной стадии стенки лунок полностью покрываются молекулами антигена и альбумина.

2. На следующей стадии в лунки заливают раствор, содержащий антитела. То есть раствор содержит сыворотку крови или слизистые образования из носа или других мест. Используя разбавление исходного раствора антител, в разные лунки заливают растворы с разной концентрации антител. Можно использовать ≈ 10 разных концентраций. Для каждой концентрации используют 3–5 лунок для последующего усреднения результата. После инкубации в течении 0,5–5 часов (37° С) раствор из лунок выливают и промывают их чистым солевым раствором. На этой стадии специфические антитела связываются с антигеном, иммобилизованным на стенках лунок. Это произойдёт, если специфические антитела присутствуют в

плазме крови. Если специфические антитела отсутствуют в плазме крови, то с антигеном никаких антител связано не будет.

3. На следующем этапе в ячейки заливают раствор, содержащий специфические антитела против человеческих иммуноглобулинов. Данные антитела конъюгированы (ковалентно связаны) со специальным ферментом, который на следующей стадии обеспечит окрашивание раствора. Конъюгированные антитела должны быть специфичны к человеческим IgG, или IgM, или к другим классам иммуноглобулинов в зависимости от задачи анализа. В случае, если на предыдущей стадии антиген связал специфичные антитела, то на настоящей стадии конъюгированные антитела свяжутся с человеческими антителами, прикрепленными к антигену. После инкубации в течении 0,5–5 часов (37°C) раствор из лунок выливают и промывают их чистым буферным раствором. На стадиях 2 и 3 в раствор можно добавлять небольшое количество альбумина и детергента для уменьшения неспецифического связывания антител со стенками лунок.

На этой стадии использовали конъюгированные антитела против человеческого иммуноглобулина. Получить такие антитела можно проиммунизировав лабораторного животного человеческими иммуноглобулинами и последующей селекции антител при помощи метода получения моноклональных антител.

4. На предпоследней стадии производят окрашивание раствора. В лунки заливают раствор, содержащий специальный субстрат для конъюгированного фермента. Фермент превращает субстрат в продукт, который окрашивает раствор в голубой (450 нм) или коричневатый цвет. В случае, если плазма крови содержала специфические антитела к антигену, то в лунках будет присутствовать конъюгированный фермент и, следовательно, будет окрашивание раствора. В случае, если в плазме крови отсутствовали специфические антитела к антигену, то в лунках будет отсутствовать конъюгированный фермент и, следовательно, окрашивания раствора происходить не будет.

В качестве фермента конъюгированного со вторичным антителом используют: пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β -D-галактозидазу, рутений или флуоресцеин и другие. В качестве субстрата часто используют тетраметилбензидин (ТМВ). Используют также пары фермент/субстрат производящие флуоресцирующий или люминисцирующий продукт.

5. Специальный прибор фотометр (plate reader) измеряет в автоматическом режиме оптическую плотность раствора в каждой из 96 лунок платы при заданной длине волны света (обычно 450 нм или другой видимый свет). Это можно сделать сразу для всей платы с 96 лунками, заполненными окрашенным раствором, поскольку полистирол прозрачен. Измеренные величины оптической плотности для всех лунок используют для анализа результатов. Измерение оптической плотности для каждой лунки производят 3–5 раз с последующим усреднением результата. Прибор выдаёт значения оптической плотности в цифровом виде для анализа результатов на компьютере.

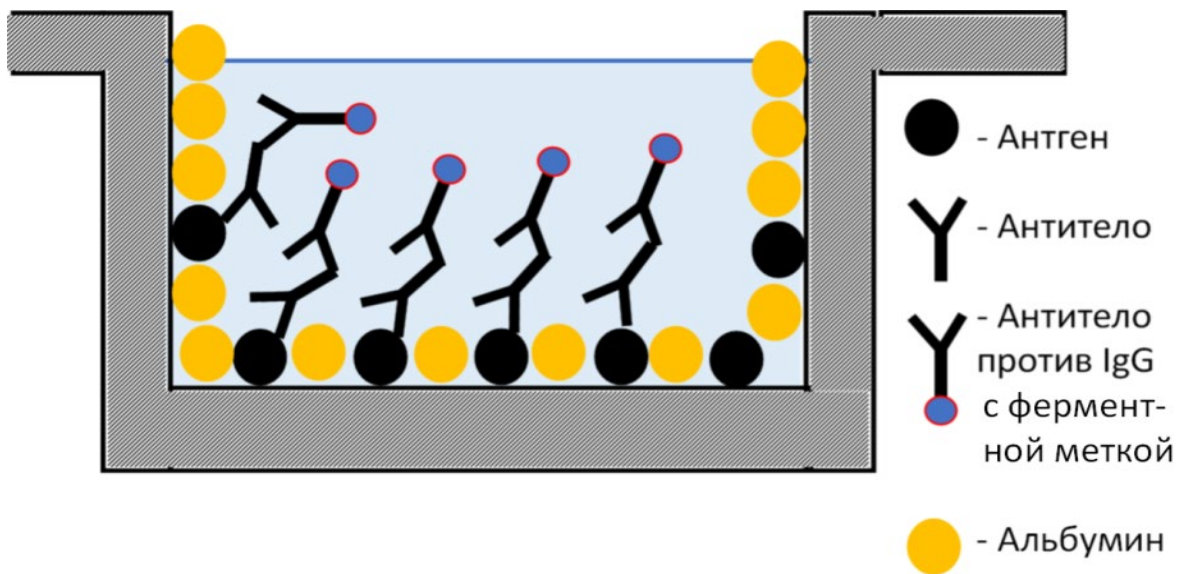


Рис. 5. Схема молекулярных слоёв, адсорбированных на стенках одной лунки в полистирольной плате (планшете), содержащей 96 лунок.

Схема демонстрирует принцип работы непрямого неконкурентного ИФА для регистрации антител, специфических к антигену

Использование вторичных конъюгированных с ферментом антител к человеческим IgG (или IgM) даёт существенное упрощение метода ИФА. Действительно, такие конъюгированные антитела являются универсальной меткой для человеческих антител к любым антигенам в организме человека. Поэтому такие конъюгированные антитела производятся в достаточно большом количестве и доступны в коммерческой продаже.

Для получения правильных значений оптической плотности растворов необходимо из измеренных спектрофотометром величин вычесть значение оптической плотности, которую прибор измерил для отрицательного контроля.

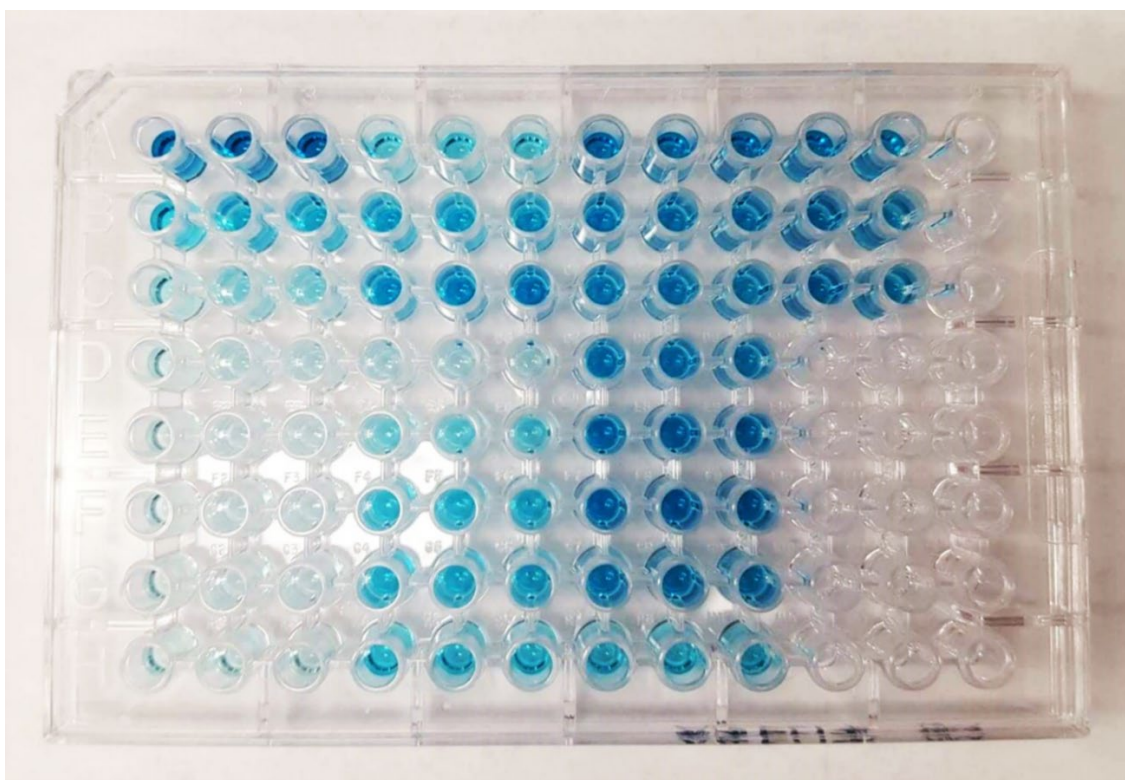
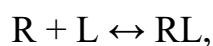


Рис. 6. Плата (планшет) с окрашенными растворами в лунках. Вид сверху

В качестве отрицательного контроля используют лунки, для которых были выполнены все стадии кроме второй. То есть не были добавлены специфические антитела к антигену.

Рассмотрим факторы, от которых зависит интенсивность окрашивания. Согласно методу количество иммобилизованных молекул антигена одинаково во всех лунках. На стадии 2 при добавлении в ячейку антител устанавливается термодинамическое равновесие: часть молекул антигена связаны с антителами, а часть остаются без антител. Данный процесс описывается уравнением равновесия:



где R – иммобилизованный антиген выступает в качестве рецептора,

L – растворённое специфическое антитело выступает в качестве лиганда,

RL – комплекс связанных друг с другом антигена и антитела. Предполагается, что один антиген, адсорбированный на поверхности, может связать только одну молекулу антитела.

Система математических уравнений, описывающая данную реакцию имеет следующий вид в состоянии равновесия:

$$\frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} = K_d, [R] + [RL] = [R]_0,$$

где в квадратных скобках – молярные концентрации соответствующих веществ,

K_d – константа диссоциации, $[R]_0$ – суммарная концентрация антигена на стенках лунки, свободного и связанного с антителом.

Из этих двух уравнений получаем уравнение и график Скэтчарда:

$$\frac{1}{[RL]} = \frac{K_d}{[R_0]} \cdot \frac{1}{[L]} + \frac{1}{[R_0]}$$

Как будет показано ниже, концентрация связанных специфических антител $[RL]$ пропорциональна оптической плотности раствора в лунке, измеренной спектрофотометром. $[L]$ – концентрация несвязанного специфического антитела в растворе в лунке, которую мы хотим оценить.

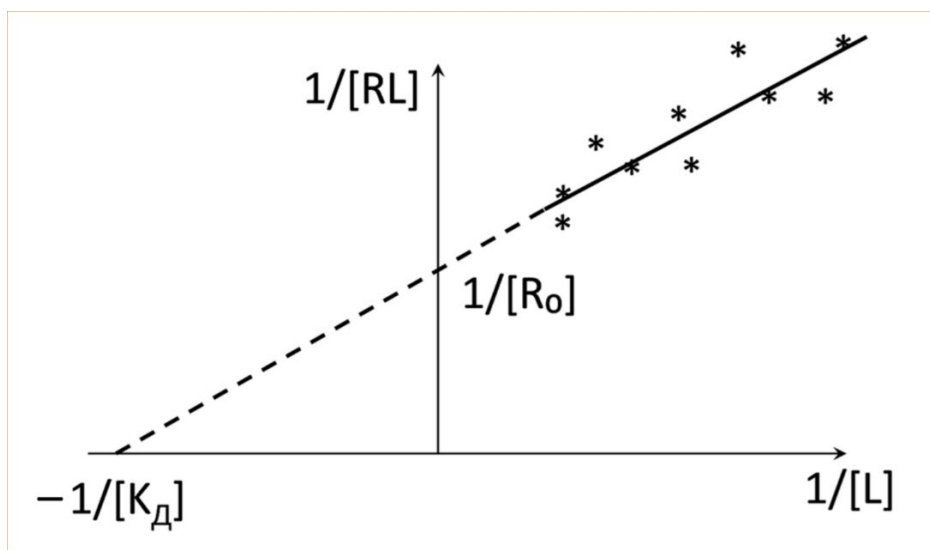


Рис. 7. График Скэтчарда для связывания антитела с антигеном

Уравнение и график Скэтчарда показывают, что для качественной оценки величины $[L]$ можно использовать оптическую плотность окрашенного раствора. Чем сильнее окрашен раствор, тем больше концентрация антител в растворе. Однако, для получения количественных значений $[L]$ следует провести предварительную калибровку, используя коммерческий препарат антител против спайкового (S) белка SARS CoV-2 (в случае анализа антител к коронавирусу). Калибровочный эксперимент позволит установить математическую связь между оптической плотностью и концентрацией специфических антител в растворе.

Из уравнения Скэтчарда и экспериментального графика (рис. 7) видно, что при увеличении концентрации антител всё большая часть молекул антигена будет связана с антителами. При большой концентрации антител возникает насыщение, когда все молекулы антигена связаны с антителами.

Отметим, что на стадии (3) используется избыточная концентрация вторичных конъюгированных антител. Поэтому все антитела, прикрепленные к антигену, будут связаны с конъюгированными антителами. Следовательно, количество молекул фермента в ячейке на стадии 4 будет равно количеству молекул специфических антител, связанных с антигеном.

Поскольку при постоянной концентрации субстрата скорость образования окрашенного продукта пропорциональна количеству молекул фермента в лунке, то данная скорость будет пропорциональна количеству молекул специфических антител, связанных с антигеном. Согласно закону Бугера оптическая плотность раствора пропорциональна количеству окрашенного продукта ферментативной реакции в лунке. Следовательно, оптическая плотность раствора в лунке пропорциональна количеству молекул специфических антител, связанных с антигеном $[RL]$. Поэтому в уравнении Скэтчатда и на графике рис. 7 вместо $[RL]$ можно использовать экспериментально измеренную величину оптической плотности, умноженной на калибровочный коэффициент.

Анализ на антитела класса IgG и IgM к спайковому (S) белку SARS CoV-2 позволяет определить уровень иммунной защиты от вируса. Чем больше концентрация специфических IgG в крови, тем выше уровень защиты от данного вируса.

ИФА позволяет определить наличие не только антител, но и самого антигена-вируса. То есть ИФА может решить ту же задачу, что и метод, основанный на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Такую задачу решает ИФА, сделанный по схеме «сэндвич».

НЕПРЯМОЙ НЕКОНКУРЕНТНЫЙ ИФА ПО СХЕМЕ «СЭНДВИЧ» ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ АНТИГЕНА

Метод использует специфические антитела к антигену. Для высокой специфичности крайне желательно, чтобы данные антитела были моноклональными. Они должны быть заранее куплены или получены.

Метод осуществляют в пять стадий.

1. Сначала в лунки заливают раствор, содержащий моноклональные антитела против антигена – спайкового (S) белка для анализа коронавируса. Плату выдерживают в течении 0,5–12 часов (4° C) для надёжной иммобилизации антител на

дне и стенках лунок. Раствор содержит также бычий сывороточный альбумин, который адсорбируется на тех местах полистирола, которые остаются не занятыми антителами. Затем раствор, содержащий антитела и альбумин выливают из лунок и промывают лунки чистым буферным раствором. На данной стадии стенки лунок полностью покрываются молекулами специфических антител и альбумина.

2. На следующей стадии в лунки заливают раствор, содержащий антиген-коронавирус. То есть раствор содержит сыворотку крови или слизистые образования из пациента, потенциально заражённого коронавирусом. Используя разбавление исходного раствора антигена-вируса, в разные лунки заливают растворы с разной концентрацией антигена. После инкубации в течении 0,5–5 часов (37° C) раствор из лунок выливают и промывают их чистым буферным раствором. На этой стадии антиген связывается со специфическими антителами иммобилизованными на стенках лунок. Это произойдёт, если антиген-вирус присутствует в плазме крови. Если антиген отсутствует в плазме крови, то с иммобилизованными антителами никакого антигена связано не будет.

3. На следующем этапе в ячейки заливают раствор, содержащий специфические антитела против антигена – спайкового (S) белка. Данные антитела конъюгированы с ферментом. В случае, если на предыдущей стадии антиген связался с иммобилизованными специфическими антителами, то на настоящей стадии конъюгированные антитела свяжутся с вирусом прикрепленным к иммобилизованным антителам. Метод требует, чтобы у антигена было по меньшей мере два места связывания антител. Коронавирус удовлетворяет этому требованию, поскольку у него много шипиков, содержащих спайковый (S) белок. После инкубации раствор из лунок выливают и промывают их чистым буферным раствором.

4. Затем производят окрашивание, заливая в лунки раствор, содержащий субстрат для конъюгированного фермента. В случае, если плазма крови содержала антиген – коронавирус, то в лунках будет присутствовать конъюгированный фермент и, следовательно, будет окрашивание раствора. В случае, если в плазме крови

отсутствовал антиген – вирус, то в лунках будет отсутствовать конъюгированный фермент и, следовательно, окрашивания раствора происходить не будет.

5. На последней стадии автоматический фотометр (plate reader) измеряет оптическую плотность раствора в каждой из 96 лунок платы при заданной длине волны света. Измерение оптической плотности для каждой лунки производят 3–5 раз с последующим усреднением результата. Измеренные величины используют для анализа результатов.

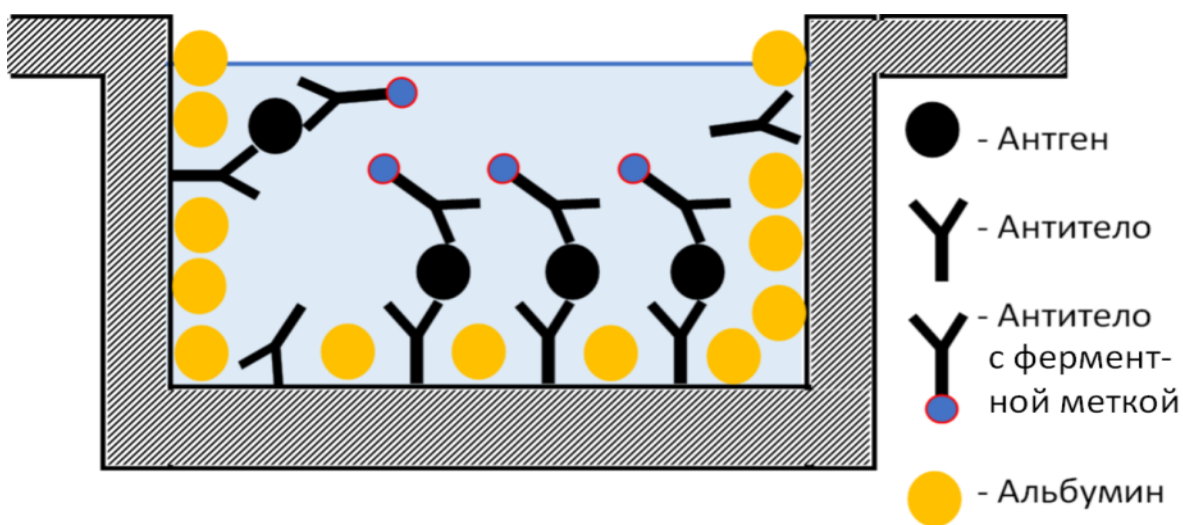


Рис. 8. Схема молекулярных слоёв, адсорбированных на стенках одной лунки в полистирольной плате. Схема демонстрирует принцип работы непрямого неконкурентного ИФА по схеме «сэндвич» для регистрации антигена

ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ МЕТОДА

Из изложенных выше схем следует, что ИФА вполне может определять наличие в организме как определённых антигенов так и антител к ним. При этом ИФА определяет класс антител. Преимуществом ИФА является также его эффективность, относительная простота и удобство выполнения, достаточно малое время анализа, надёжность и объективность получаемых результатов. В силу изложенных

причин ИФА получил широкое распространение не только в научных исследованиях но и в медицинской практике.

Не смотря на большие преимущества, ИФА имеет ряд недостатков. ИФА всецело полагается на высокоспецифическое взаимодействие антиген-антитело с очень высокой константой связывания ($\sim 10^{12} \text{ M}^{-1}$). К сожалению эти требования не всегда удаётся выполнить главным образом из-за сложности иммунной системы и многообразия иммунного ответа, а также из-за патологических отклонений в работе иммунной системы. Это приводит к тому, что ИФА может иногда давать ложные положительные и ложные отрицательные результаты. Поэтому имеет смысл дублировать ИФА с другими методами, например ПЦР.

Метод ИФА находится в состоянии интенсивного развития. Непрерывно разрабатываются новые модификации метода. Одни из них оказываются более успешными, другие менее успешными. В настоящем пособии мы разобрали две основные базовые модификации ИФА. Знание этих модификаций позволит с лёгкостью разобраться и во всех других модификациях ИФА.

В качестве перспективных направлений развития ИФА можно отметить разработку ИФА в проточных системах, что ещё более ускорит анализ и откроет новую возможность его применения в массовых медицинских анализах и производстве. Следует отметить применение рекомбинантных белков для получения аналогов практически любого антигена белковой природы. Отметим также моноклональные антитела, которые уже широко применяются в ИФА. Следует отметить также хорошие результаты, которые даёт следующее развитие метода: покрытие стенок лунок белком стрептавидином и использование биотинилированных моноклональных антител в конфигурации «сэндвич». Отличное связывание стрептавидина с биотином обеспечивает повышенную концентрацию специфичных антител, связанных со стенками, а использование моноклональных антител обеспечивает высокую специфичность связывания антигена.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Каковы основные принципы функционирования адаптивного гуморального иммунитета?
2. Каковы структура и функция антител класса IgG и IgM?
3. Каковы схема и принципы работы непрямого неконкурентного ИФА для регистрации специфических антител?
4. Каковы схема и принципы работы непрямого неконкурентного ИФА по схеме «сэндвич» для регистрации антигена?
5. Каковы преимущества и недостатки метода ИФА?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dhamad A. E.; Abdal Rhida, MA (2020). «COVID-19: molecular and serological detection methods». PeerJ. 8: e10180.
2. Schmidt S. D.; Mazzella M. J.; Nixon R. A.; Mathews P. M. (2012). Aβ measurement by enzyme-linked immunosorbent assay. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 849. pp. 507–27.
3. М. П. Кутырёва, Э. П. Медянцева, Е. П. Халдеева, А. Р. Гатаулина, Н. А. Улахович, Г. К. Будников. Определение констант связывания иммунных комплексов по данным вольтамперометрических измерений. *Учёные записки Казанского университета. Естественные науки*. Том 154, кн. 4, с. 124–134, 2012.
4. Elgert K. D. (2009). *Immunology: Understanding the Immune System*. John Wiley & Sons. pp. 149–50.
5. Lequin R. M. (2005). "Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)". *Clinical Chemistry*. 51 (12): 2415–8.
6. Griffin J. F. T.; Spittle E.; Rodgers C. R.; Liggett S.; Cooper M.; Bakker D.; Bannantine J. P. (2005). "Immunoglobulin G1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Johne's Disease in Red Deer (*Cervus elaphus*)". *Clinical and Vaccine Immunology*. 12 (12): 1401–9.
7. Sblattero D.; Berti I.; Trevisiol C.; Marzari R.; Tommasini A.; Bradbury A.; Fasano A.; Ventura A.; Not T. (2000). "Human recombinant tissue transglutaminase ELISA: an innovative diagnostic assay for celiac disease". *The American Journal of Gastroenterology*. 95 (5): 1253–7.
8. R., Crowther J. (1995). *ELISA: theory and practice*. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 42. Totowa, N. J.: Humana Press. pp. 1–218.
9. А. М. Егоров, А. П. Осипов, Б. Б. Дзантиев, Е. М. Гаврилова. *Теория и практика иммуноферментного анализа*. – М.: Издательство «Высшая школа», 1991. – С. 3–42.

10. Kolomytkin O. V., Mantzyghin J. A., Swyatukhina N. (1988). Antibodies affect the ionic conductance of channels formed by amphotericin B in a lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 945, pp. 335–349.

11. <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=86425232>.