

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ, ИММУНОЛОГИИ

Д. А. Черношей, Т. А. Канашкова

МЕТОДЫ ИММУНОАНАЛИЗА, ОСНОВАННЫЕ НА ПРИМЕНЕНИИ МЕЧЕНЫХ КОМПОНЕНТОВ

Учебно-методическое пособие



Минск 2007

УДК 576.8.07 (075.8)
ББК 28.4 я 73
Ч-49

Утверждено Научно-методическим советом университета в качестве
учебно-методического пособия 31.01.2007 г., протокол № 5

Р е ц е н з е н т ы: дир. ГУ «Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии», д-р мед. наук, проф. М. П. Потапнев; зав. каф. общей химии Белорусского государственного медицинского университета, д-р биол. наук, проф. Е. В. Барковский

Черношей, Д. А.

Ч-49 Методы иммуноанализа, основанные на применении меченых компонентов : учеб.-метод. пособие / Д. А. Черношей, Т. А. Канашкова. – Минск: БГМУ, 2007. – 28 с.

ISBN 978–985–462–669–7.

Отражены вопросы классификации, характеристики, схем постановки, применения существующих методов иммуноанализа.

Предназначается студентам 2-го курса всех факультетов.

УДК 576.8.07 (075.8)
ББК 28.4 я 73

Учебное издание

Черношей Дмитрий Александрович
Канашкова Татьяна Александровна

МЕТОДЫ ИММУНОАНАЛИЗА, ОСНОВАННЫЕ НА ПРИМЕНЕНИИ МЕЧЕНЫХ КОМПОНЕНТОВ

Учебно-методическое пособие

Ответственный за выпуск Д. А. Черношей
Редактор Н. А. Лебедко
Корректор Ю. В. Киселёва
Компьютерная верстка Н. М. Федорцовой

Подписано в печать 01.02.07. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Снегурочка».

Печать офсетная. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. 1,63. Уч.-изд. л. 1,44. Тираж 500 экз. Заказ 138.

Издатель и полиграфическое исполнение –

Белорусский государственный медицинский университет.

ЛИ № 02330/0133420 от 14.10.2004; ЛП № 02330/0131503 от 27.08.2004.

220030, г. Минск, Ленинградская, 6.

ISBN 978–985–462–669–7

© Оформление. Белорусский государственный
медицинский университет, 2007

Список сокращений

ИА	– иммуноанализ
РИА	– радиоиммунный анализ
РАСТ	– радиоаллергосорбентный тест
ИФА	– иммуноферментный анализ
ТИФА	– твердофазный иммуноферментный анализ
ELISA	– <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ЭС, ELIspot	– элиспот, <i>enzyme linked immunospot</i>
ИБ	– иммуноблот (вестернблот)
SDS	– <i>sodium dodecyl sulfate</i> , додецил сульфат натрия
ИГХ	– иммуногистохимия
ЕМИТ	– иммуноанализ с измерением активности фермента (<i>enzyme monitored immunoassay technique</i>)
ФИА	– флуоресцентный иммуноанализ
РИФ	– реакция иммунофлуоресценции
ФИТЦ	– флуоресцеина изотиоцианат
ФЭ	– фикоэритрин
ИКК	– иммунокомпетентные клетки
CD	– <i>cluster of definition</i>
Th_{1, 2, 3}	– Т-хелперы 1, 2 и 3-го типов
ФИА ВР	– флуоресцентный иммуноанализ с временным разрешением
ЛИА	– люминесцентный иммуноанализ
ЛИКА	– люминесцентный иммунокофакторный анализ
ЛИФА	– люминесцентный иммуноферментный анализ
ХИА	– хемолюминесцентный иммуноанализ
ХИФА	– хемолюминесцентный иммуноферментный анализ
ХИСА	– хемолюминесцентный иммуносубстратный анализ
АТФ	– аденозин-3-фосфат
NAD	– никотинамид-адениндинуклеотид
ЭХИА	– электрохемолюминесцентный анализ
ИС	– иммуносенсор
МЭ	– микроэррей
IgE	– иммуноглобулин класса E
ИХА	– иммунохроматографический анализ

Введение

Настоящий материал посвящен современным методам иммуноанализа, основанным на применении выс — активной и специфичной метки — маркера, позволяющего непосредственно обнаружить продукт иммунной реакции. Такие методы обладают высокой чувствительностью, специфичностью, требуют минимального количества биоматериала; позволяют получить количественные, объективные результаты, а также осуществлять скрининг или диагностику на ранних стадиях заболевания при минимальных изменениях в организме или объекте исследования. Эти методы явились результатом эволюции ранних методов иммуноанализа, в которых иммунная реакция обнаруживалась по визуальному изменению состояния реагентов (агглютинация, преципитация, пассивная агглютинация), либо по характерному изменению биообъектов, добавляемых к реакционной смеси для выявления протекания реакции (РСК).

Ситуация изменилась в 50-х гг. прошлого столетия (рис. 1) после разработки и публикации метода определения инсулина (S. A. Berson, R. S. Yalow), основанного на конкурентном радиоиммунном анализе (РИА).

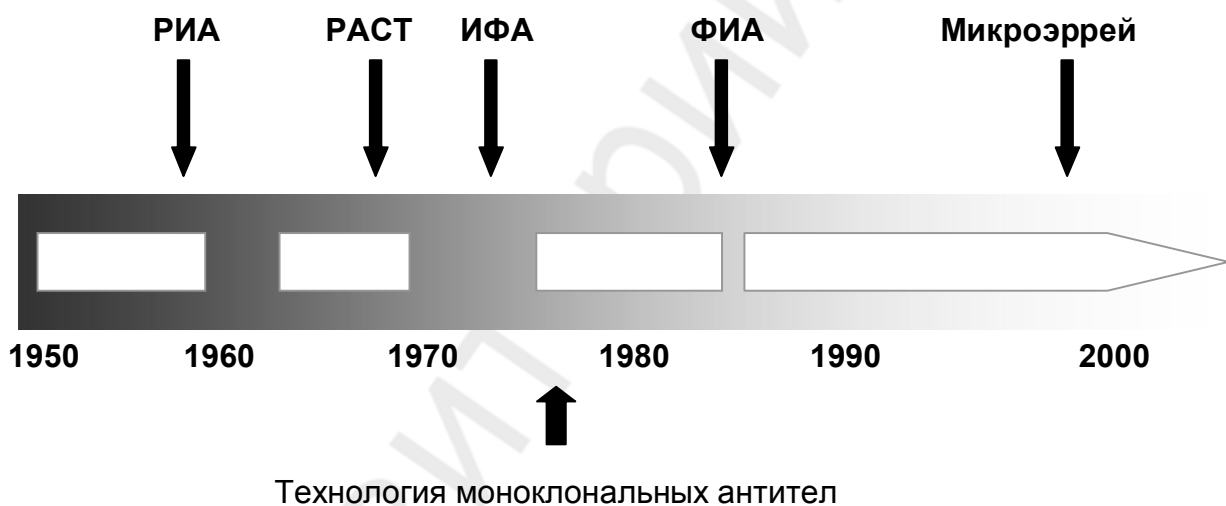


Рис. 1. Развитие методов иммуноанализа

Вскоре (в 60-х гг.) были разработаны принципы применения меченых изотопами антител для иммуноанализа, «сэндвич»- и твердофазный радиоиммуноанализ (радиоаллергосорбентный тест (РАСТ, L. Wide); иммунорадиометрический анализ (ИРМА, L. Mile, C. N. Hales)). Немного позже был предложен иммуноферментный анализ (ИФА, E. Engvall, P. Perlmann, K. Rubinstein и др.).

Мощный импульс к развитию иммуноанализа дала разработка технологии получения моноклональных антител (C. Milstein), после чего стало возможным полномасштабное развитие методов с применением ферментных, флуоресцентных и других меток (флуоресцентный иммуноанализ (ФИА,

К. Etkins, O. Wallac), хемолюминисцентный иммуноанализ (ХИА), гибридизация, технологии иммуносенсоров (ИС) и микроэррея (МЭ) (табл. 1)).

Таблица 1

Классификация современных методов иммуноанализа

Группа	Метод иммуноанализа (ИА)	Характеристика определяемого вещества
I. Конкурентные методы, основанные на применении меченого антигена	ХИА ИФА РИА ФИА	Любые антигены, антитела
II. Конкурентные методы, основанные на применении меченых антител	ХИА тИФА (ELISA) ФИА	Любые антигены, антитела
III. Методы, основанные на агрегации и осаждении, подсчете частиц	Нефелометрический ИА Турбидиметрический ИА Латекс-агглютинация	Поливалентные антигены и частицы значительных размеров, поливалентные антитела
IV. Методы, основанные на применении избытка антигена или антител	ИРМА тИФА (ELISA) ФИА ХИА	Поливалентные антигены достаточных размеров (не гаптены)
V. Методы для определения специфических антител (антиген в избытке, фиксированный на твердой фазе)	тИФА РАСТ	Специфические антитела, IgE
VI. Методы, основанные на модификации активности ферментной метки при связывании	ИА с измерением активности фермента (ЕМIT) Поляризационный ФИА ИА с гашением флуоресценции и др.	Гаптены, лекарственные препараты

В целом, эволюция иммуноанализа последние 50 лет идет в следующих направлениях:

- повышение чувствительности и специфичности:
- применение моноклональных антител;
- применение рекомбинантных антител;
- применение рекомбинантных и синтетических антигенов;
- применение *fusion*-белков (рекомбинантные белки, продукты слияния различных генов для придания молекулам желаемых свойств: специфичности, структуры, биохимической или рецепторной активности);
- применение аптомеров (одноцепочечный олигонуклеотид, проектируемый для специфического связывания с белками или другими нуклеиновыми кислотами);
- разработка методов с повышенным соотношением сигнал/шум:
- твердофазный ИФА в «сэндвич»-модификации, ФИА с временным разрешением, электрохемолуминесцентный иммуноанализ (ЭХИА);

упрощение и ускорение анализа;
отказ от конкурентного анализа в пользу неконкурентного;
отказ от радиоизотопных меток в пользу ферментных или флуоресцентных (хемолюминесцентных);
создание ускоренных методов иммуноанализа, не требующих специального оборудования и навыков (иммунохроматография (ИХА), дот-ИФА, и др.);
создание наборов для одновременного исследования нескольких параметров;
миниатюризация анализа:
уменьшение размеров устройств;
сокращение количества образца, необходимого для анализа;
сокращение количества реагентов, необходимых для анализа.

1. Методы иммуноанализа с применением радиоактивной метки

1.1. Радиоиммунный анализ (РИА)

РИА был разработан в 50-х гг. прошлого века R. S. Yalow и S. A. Berenson (определение инсулина). РИА (схема 1) основан на конкуренции определяемого антигена из клинического материала с определенным количеством идентичного, меченного изотопом, антигена с ограниченным количеством антител.

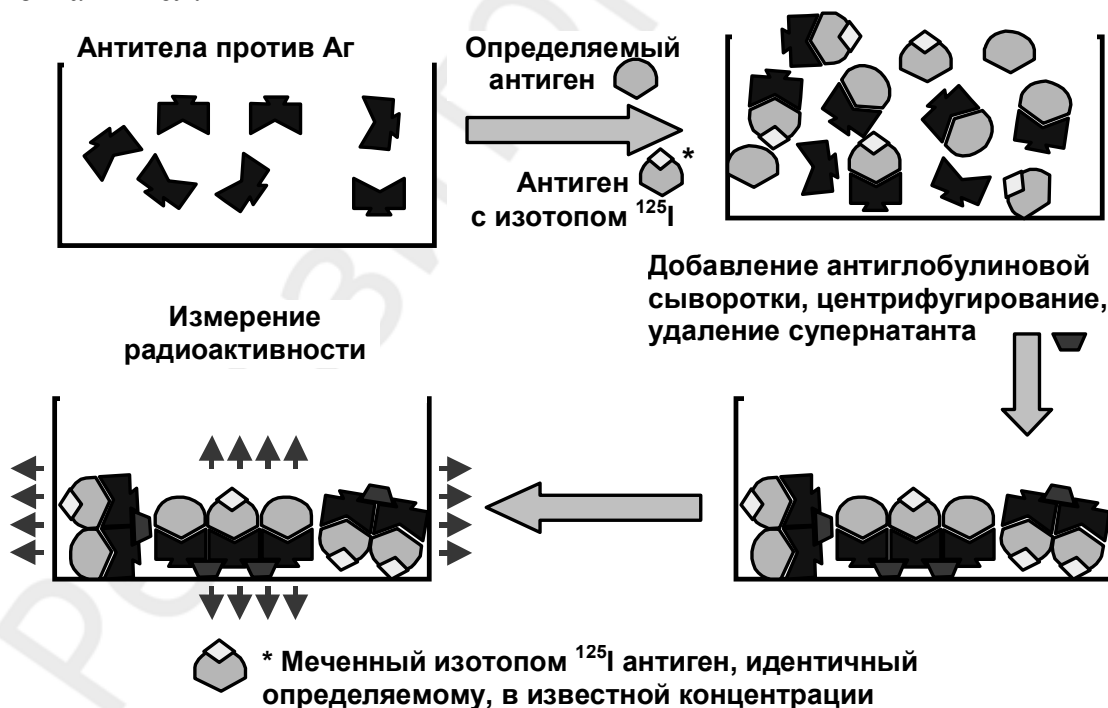


Схема 1. Радиоиммунный анализ (схемы РИА, ИРМА и тИФА созданы по мотивам рисунков, опубликованных на сайте Томского медицинского университета <http://biotech.city.tomsk.net>)

Связанные антигены отделяются от свободных добавлением антиглобулиновой сыворотки, белка А стафилококков или микробус, меченных антителами к иммуноглобулинам, и центрифугированием. Супернатанты отбрасываются, а остаточная радиоактивность измеряется на гамма-счетчике. При указанной схеме постановки радиоактивность обратно пропорциональна содержанию антигена в образце.

Таким образом, РИА является конкурентным гетерогенным методом исследования. Основные его преимущества — высокая чувствительность и специфичность. Применение изотопной метки и мечение антигена обеспечивают высокий уровень соотношения сигнал/шум и низкое неспецифическое связывание метки.

Разработан также твердофазный РИА (разделение связавшихся и свободных антигенов достигается простой промывкой флаконов/планшетов).

1.2. Иммунорадиометрический анализ (ИРМА)

Определение антител с помощью изотопной метки получило название иммунорадиометрического анализа. В качестве примера ИРМА рассмотрим радиоаллергосорбентный тест (РАСТ).

РАСТ (схема 2) был разработан в начале 1970-х (L. Wide) для определения аллерген-специфических IgE в сыворотке крови. Аллерген сорбировали на пористом носителе (бумага, полимерные мембраны, гранулы, губки). Далее добавляли сыворотку пациента, инкубировали 3 ч, отмывали и добавляли антиглобулиновую сыворотку (против IgE), меченную радиоактивным изотопом. После отмывки несвязавшихся реагентов, радиоактивность учитывали на счетчике.

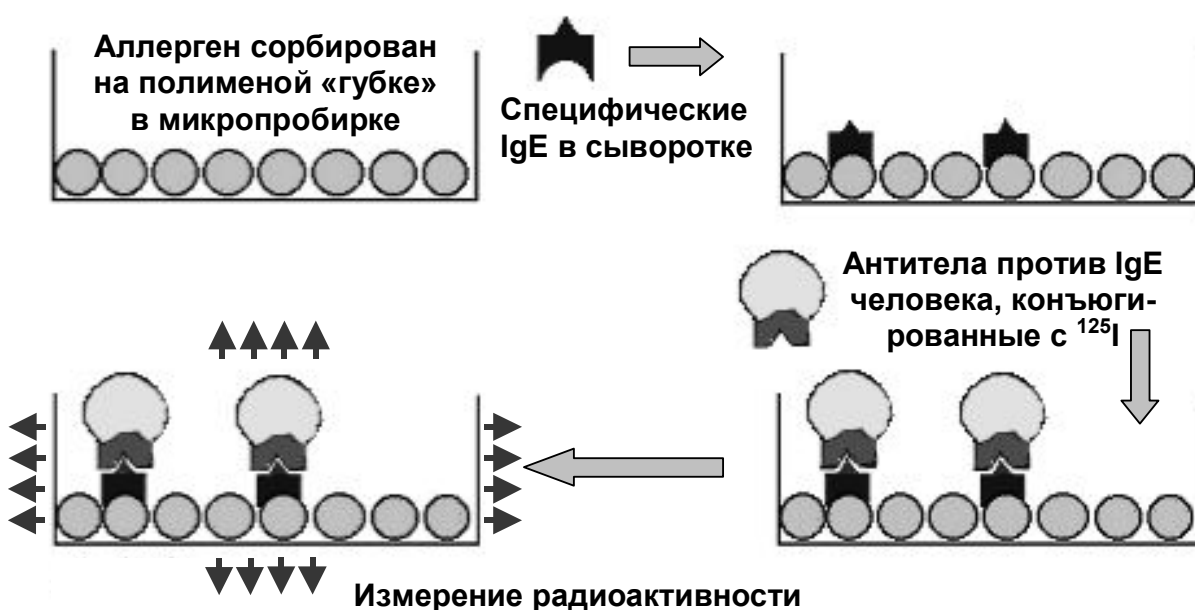


Схема 2. Радиоаллергосорбентный тест

Первые тесты характеризовались низкой чувствительностью, плохо коррелировали с клиникой и другими аллергологическими тестами (прик-тесты) и не нашли широкого применения. В конце 70-х были предложены РАСТ второго поколения (большая чувствительность за счет меньшей специфичности и большей продолжительности теста; тесты по-прежнему носили качественный характер). Наконец, в 80–90-х гг. распространились РАСТ третьего поколения (большая чувствительность и специфичность за счет применения моноклональных антител против IgE, автоматизации, использования флуорохромных, ферментных меток или электрохемолюминисценции; применение IgE стандартов ВОЗ позволило получать количественные результаты).

В целом, применение изотопных меток (РИА, ИРМА) сыграло важную роль в становлении иммуноанализа. Именно эти методы впервые раскрыли потенциал иммуноанализа и дали толчок к его разработке и коммерческому применению. Тем не менее, недостатки данного подхода (в первую очередь, небезопасность, трудности разработки, транспортировки, хранения, утилизации отходов, необходимость применения дорогостоящего оборудования и др.) привели к вытеснению методов, основанных на радиоактивной метке, альтернативными.

2. Методы иммуноанализа с применением флуоресцентной метки

2.1. РЕАКЦИЯ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ (РИФ)

Впервые предложена Coombs в 1942 г. РИФ основана на выявлении антигенов в клиническом материале, препаратах клеток крови и др. с помощью моноклональных антител или сывороток, меченных флуорохромом (прямая РИФ). Первые (диагностические) антитела можно выявлять антииммуноглобулиновой сывороткой, меченной флуорохромами (непрямая РИФ). Существуют модификации РИФ для выявления антител к инфекционным агентам в сыворотке крови или антител в сыворотке крови.

Популярность РИФ объясняется экономичностью, наличием широкого спектра диагностических наборов, быстротой получения ответа. Сегодня в этой реакции используются как поликлональные сыворотки, так и моноклональные антитела, меченные флуоресцеина изотиоцианатом (ФИТЦ). Для уменьшения неспецифического свечения фона применяют обработку препаратов бычьим сывороточным альбумином, меченным родамином или синькой Эванса.

Чаще всего РИФ используют для быстрого обнаружения возбудителя в патологическом материале. В этом случае из исследуемого материала готовят мазок на предметном стекле, как для обычной микроскопии. Препара-

рат фиксируют метиловым спиртом, ацетоном или другим химическим фиксатором. На поверхность фиксированного мазка наносят меченные ФИТЦ сыворотки или моноклональные антитела (в случае непрямой РИФ препарат сначала обрабатывают сывороткой против искомого антигена, а затем мечеными антителами к иммуноглобулинам, использованным на первом этапе). Поскольку РИФ является разновидностью гетерогенного анализа, один этап отделяется от другого промывкой.

Учет результатов реакции осуществляется с помощью люминесцентного микроскопа, в оптическую систему которого устанавливается набор светофильтров, обеспечивающих освещение препарата ультрафиолетовым или сине-фиолетовым светом с заданной длиной волны. Исследователь оценивает характер свечения, форму, размер объектов и их взаимное расположение.

При постановке РИФ для обнаружения антител готовят мазки из эталонного штамма возбудителя. Исследуемую сыворотку наносят на мазок. Если в ней присутствуют искомые антитела, то они связываются с антигенами микробных клеток. Промывка препарата буферным раствором позволяет удалить несвязавшиеся антитела. Затем препарат обрабатывают меченой сывороткой против иммуноглобулинов человека. В случае положительного результата реакции при микроскопии мазка в люминесцентном микроскопе наблюдают специфическое свечение эталонной культуры.

Основным недостатком РИФ является ее субъективность.

Классическими критериями специфичности этой реакции являются:
характерная морфология, размеры и расположение возбудителя в мазке;
периферический характер свечения объекта;
цвет флюоресценции;
интенсивность флюоресценции.

При исследовании крупных объектов (трихомонады, клетки человека, клетки, пораженные бактериями или вирусами) эти критерии позволяют получить достоверный результат. В то же время, элементарные тельца хламидий и микоплазмы имеют размеры, лежащие на пределе разрешающей способности люминесцентного микроскопа. При этом оценка морфологии микроорганизмов затруднена, а свечение теряет периферический характер. Остающихся критериев явно недостаточно для уверенной идентификации наблюдаемого микроорганизма. В связи с вышесказанным, субъективный характер учета реакции предъявляет особые требования к квалификации персонала, проводящего исследования.

2.2. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ С ВРЕМЕННЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ (ФИА ВР, R. ETKINS, O. WALLAC, 1984)

Эта разновидность ФИА основана на принципах сорбции одного из реагентов на твердой фазе и применении технологии «сэндвича», т. е. двойного распознавания, подобно тИФА. Однако важным отличием метода является применение в качестве метки хелатов лантаноидов (редкоземельных элементов европия, самария, тербия и диспрозия). Преимущества ФИА ВР — это высокая чувствительность, технология постановки, подобная ИФА, и потенциальная возможность значительного усиления полезного сигнала вследствие весьма высокого отношения сигнал/шум. Специфическая флуоресцентная метка флуоресцирует неизмеримо сильнее и дольше, чем фоновая флуоресценция. Кроме того, метка может восстанавливать способность к свечению (для учета применяют импульсное возбуждающее излучение с периодом в 1 с — более 1000 импульсов), что приводит к накоплению (усилению) полезного сигнала. Описываемая система реализована фирмой PerkinElmer, США, под названием Delfia и обладает чувствительностью более 10^{-17} М при определении антигенов.

2.3. ПРОТОЧНАЯ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЯ

Проточная цитофлуориметрия — это метод, основанный на измерении светорассеивания и специфической флуоресценции клеток (частиц) при освещении их лазером (ртутной лампой).

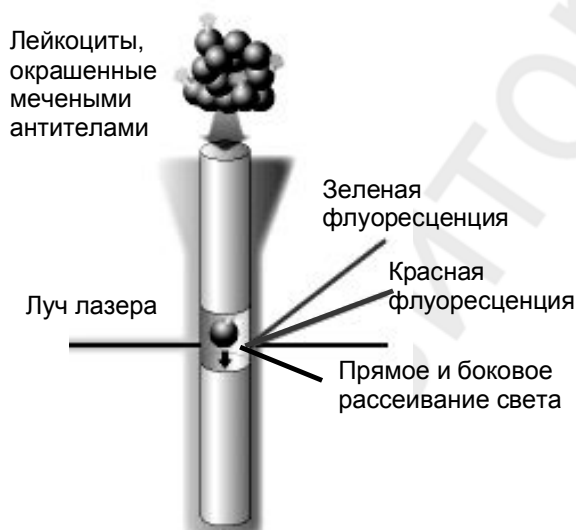


Схема 3. Цитофлуориметрия

Светорассеивание определяется размерами клеток, наличием гранул и других внутриклеточных органелл. Специфическая флуоресценция обусловлена окраской клеток моноклональными антителами против CD-антигенов, меченных флуорохромами (схема 3).

При измерении указанных свойств происходит анализ и распределение клеток по соответствующим признакам.

Важнейшие области применения цитофлуориметрии: онкогематология (определение происхождения и степени дифференцировки опухолей крови);

трансплантация (аутотрансплантация) красного костного мозга и стволовых клеток;

клиническая иммунология (морфофункциональный анализ состояния иммунокомпетентных клеток (ИКК) организма человека);

научные исследования;
другие задачи, требующие анализа частиц в суспензии (микробиология, цитология и др.).

Проведение анализа ИКК на проточном цитофлуориметре.

Для исследования ИКК крови их следует отделить от эритроцитов (методом градиентного центрифугирования или лизиса эритроцитов) и окрасить антителами против нужных CD-антигенов.

Анализ клеток по показателям прямого и бокового светорассеивания дает следующее нормальное распределение (рис. 2):

Каждая точка соответствует измеренному объекту (клетке). Обычное количество объектов/анализ — 3000–5000. Время анализа — 20–60 сек.

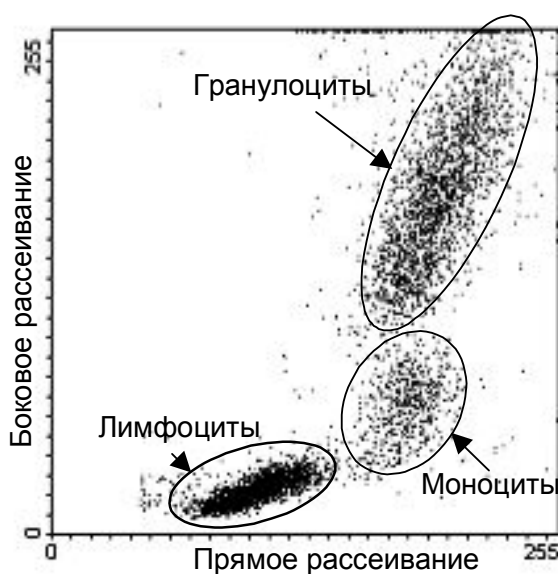


Рис. 2. Распределение объектов в зависимости от размеров и внутренней структуры

Возможности метода в полном объеме раскрываются при окрашивании клеток мечеными моноклональными антителами против соответствующих CD-антигенов (рис. 3, 4):

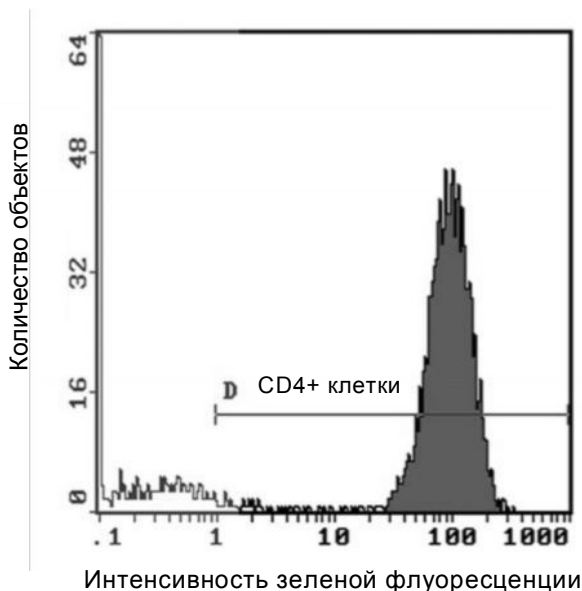


Рис. 3. Диаграмма флуоресценции мононуклеаров периферической крови, окрашенных антителами против CD₄-антигена, меченными ФИТЦ

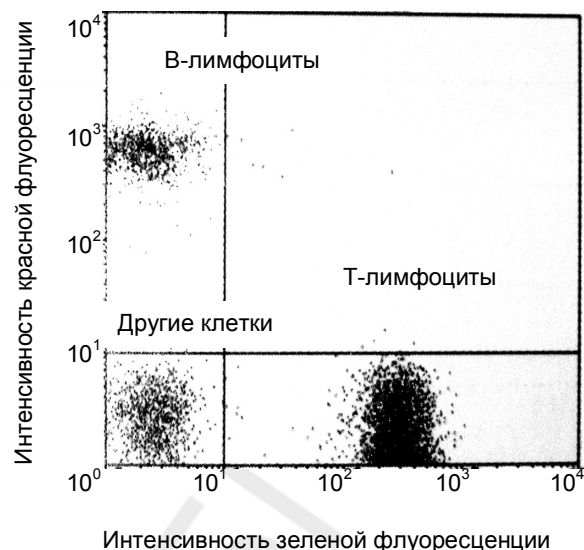


Рис. 4. Распределение клеток, окрашенных антителами против CD₃-ФИТЦ (зеленое свечение) и против CD₁₉-ФЭ (фикоэритрин, красное свечение).

3. Методы иммуноанализа с применением ферментной метки

3.1. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИФА)

ИФА, как и другие системы иммуноанализа, основан на специфическом распознавании и взаимодействии антигенов и антител. Процесс образования иммунных комплексов носит равновесный характер и зависит от аффинности компонентов, их концентрации и других условий реакции. Для оценки их количества возможно прямое определение концентрации образующихся иммунокомплексов либо измерение оставшихся свободными мест специфического связывания. Второй общей стадией любого метода ИФА является формирование связи меченого ферментом соединения со специфическим комплексом или свободными центрами связывания. И, наконец, заключительным обязательным процессом в ИФА является трансформация ферментной метки в соответствующий сигнал, измеряемый каким-либо физико-химическим методом (спектрофотометрическим, флуориметрическим и т. д.), что достигается путем измерения скорости превращения субстрата или количества продукта, образующегося за фиксированный промежуток времени.

Основные **достоинства ИФА**, обеспечившие широкую распространенность метода:

высокая чувствительность, позволяющая выявлять концентрации антигена до 10 пг/мл;

высокая стандартность и воспроизводимость;

возможность использовать минимальные объемы исследуемого материала;

стабильность при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА (до года и более);

простота проведения реакции;

наличие как инструментального (в качественном и количественном варианте), так и визуального учета;

возможность автоматизации всех этапов реакции;

относительно низкая стоимость диагностических наборов и оборудования.

Применение ИФА:

диагностика инфекционных заболеваний:

обнаружение антигенов возбудителя;

обнаружение антител к антигенам возбудителя;

мониторинг заболевания, определение ответа на терапию, прогноза развития заболевания и его исхода;

контроль поствакцинального иммунитета;

диагностика аутоиммунных заболеваний:

определение аутоантител;

диагностика аллергических заболеваний:

определение общего и специфического IgE;

определение продуктов активированных эозинофилов, базофилов и тучных клеток;

диагностика злокачественных опухолей:

определение в сыворотке маркеров опухолевого роста;

фенотипирование опухолевых клеток (тканей) для уточнения происхождения и дифференцировки опухоли;

определение концентрации гормонов, параметров менструально-овуляторного цикла;

диагностика беременности;

определение концентрации лекарственных препаратов;

определение допинга;

определение загрязнения окружающей среды и мн. др.

В зависимости от подхода к измерению результата реакции выделяют **неконкурентный** и **конкурентный** ИФА.

Если на первой стадии в системе присутствует только определяемый реагент — антиген или антитела — то метод является **неконкурентным**.

Если на первой стадии анализа в системе одновременно присутствуют анализируемое соединение и его аналог (меченное ферментом анализируемое соединение или анализируемое соединение, иммобилизованное на твердой фазе), конкурирующие за имеющиеся центры специфического связывания, то метод является **конкурентным**.

Выделяют также **гомогенный** и **гетерогенный** ИФА.

3.1.1. Гетерогенные методы иммуферментного анализа

Гетерогенный ИФА объединяет методы, в которых анализ проводится в двухфазной системе, при этом разделение на фазы может происходить на любой стадии определения (однако первый этап имеет решающее значение). Если на первой стадии антиген или антитело используют в иммобилизованном состоянии и формирование специфического иммунокомплекса проходит на твердой фазе, то метод относится к *твердофазным*.

Гетерогенный твердофазный ИФА (ELISA = *enzyme linked immunosorbent assay*) получил наибольшее распространение в медицинской и лабораторной практике. Для его осуществления обычно применяют 96-луночные полистирольные планшеты, т. к. на полистироле можно легко адсорбировать антитела, а с помощью специальной обработки и различные антигены.

В случае применения ИФА для поиска антигена (схема 4) диагностическую систему строят по принципу «сэндвича» (двухцентровый ИФА). Это означает, что для захвата искомого антигена и его детекции используют различные антитела к разным неинтерферирующим детерминантам.

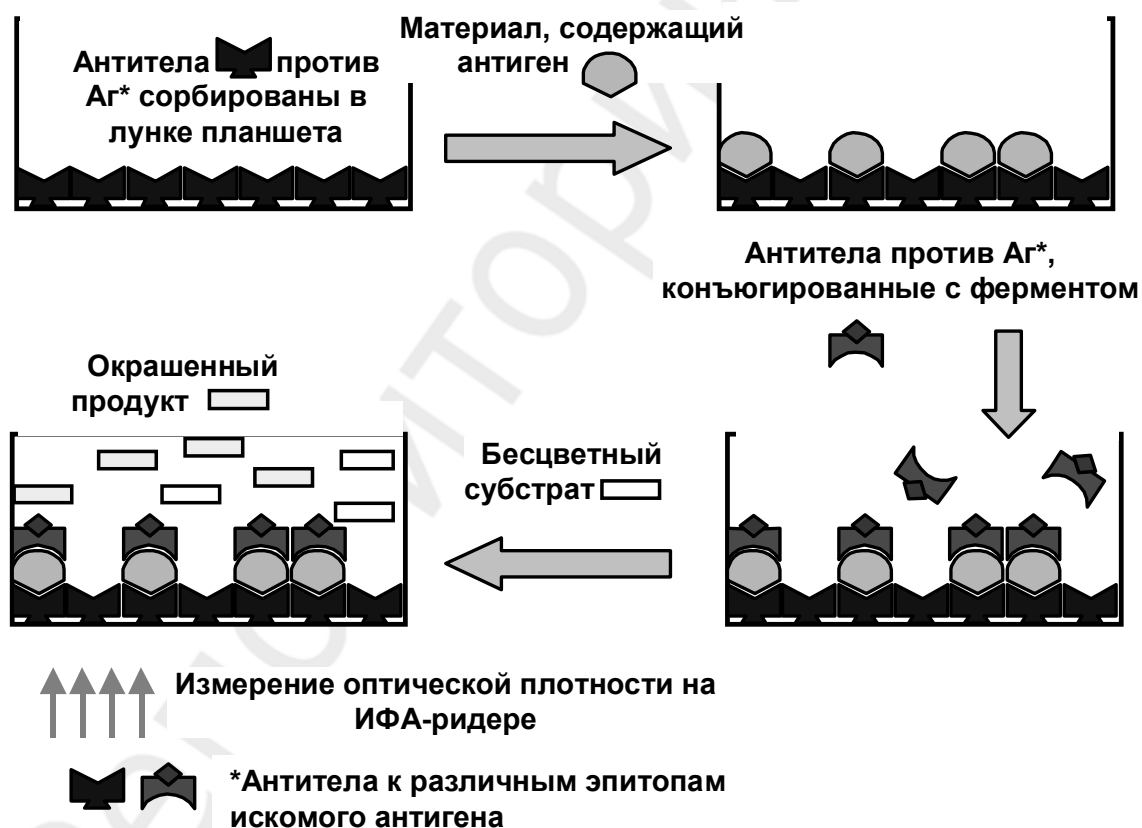


Схема 4. Твердофазный ИФА для определения антигена

Первые (захватывающие) антитела сорбируют на стенках лунок. Исследуемый материал вносят в лунку, при этом антиген, взаимодействуя с антителами, фиксируется в ней. Лунки тщательно промывают буферным

раствором, чтобы удалить неадсорбировавшиеся вещества. Затем вносят вторые (детектирующие) антитела против искомого антигена, меченные ферментом. В качестве фермента-метки обычно используют пероксидазу хрена. После инкубации лунку снова промывают, чтобы удалить несвязавшиеся меченые антитела. На заключительном этапе в лунки вносят хромогенный субстрат (например, ортофенилендиамин или тетраметилбензидин). Ферментативное расщепление субстрата приводит к образованию окрашенных продуктов реакции.

Таким образом, изменение окраски содержимого лунки будет свидетельствовать о положительном результате реакции. Более того, интенсивность окрашивания характеризует количество антигена (антител) в образце. Измерение окрашивания раствора обычно проводят на ИФА-ридере (планшетном фотометре).

При серодиагностике (схема 5) используют полистирольные планшеты, на стенках которых заранее с помощью тех или иных методов адсорбируется («нагружается») антиген. Для предотвращения неспецифического связывания антител с полистиролом оставшаяся свободной поверхность полистирола блокируется (белки молока, бычий сывороточный альбумин).

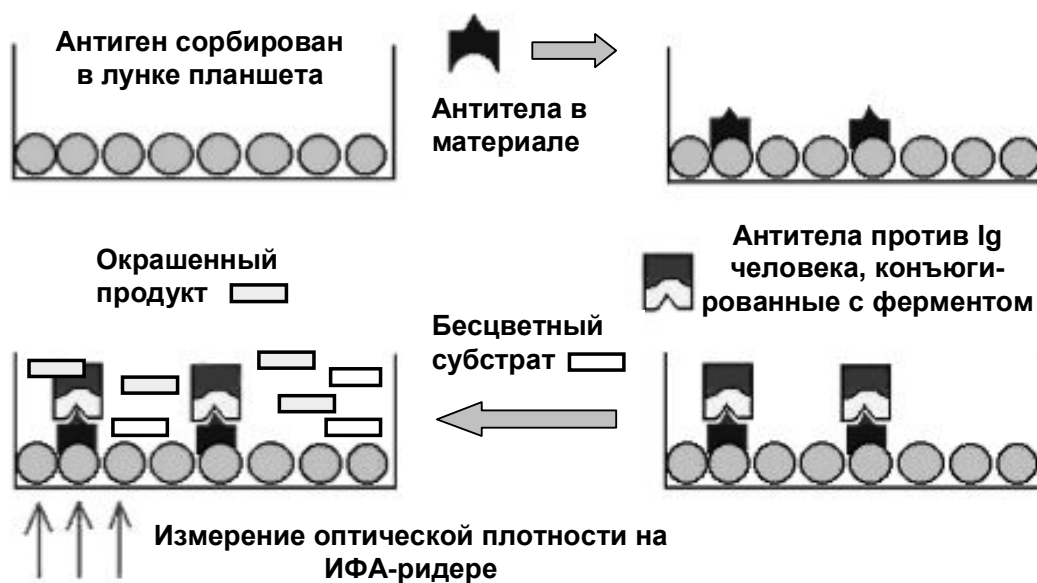


Схема 5. Твердофазный ИФА для определения антител

Исследуемая сыворотка вносится в лунку планшета. При этом гомологичные антигену антитела прикрепляются к сорбированному антигену. Не прикрепившиеся антитела удаляют промыванием. Затем в лунки вносят антитела против иммуноглобулинов (антител) человека, меченные ферментом (используя антитела против иммуноглобулинов различных классов, можно получить ценную информацию о характере иммунного ответа). Если в исследуемой сыворотке присутствовали искомые антитела, то они на данном этапе выступят в роли антигенов, с которыми прореагируют меченые антитела. Добавление после промывки хромогенного субстрата позволит учесть реакцию по развивающемуся окрашиванию в лунках.

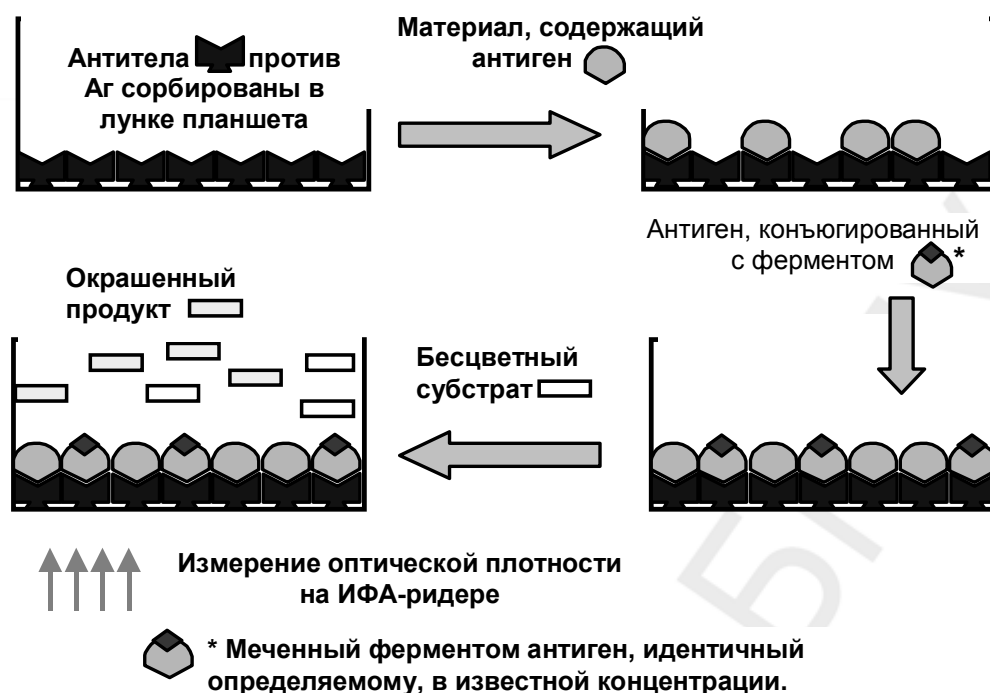


Схема 6. Конкурентный твердофазный ИФА для определения антигена

Конкурентный твердофазный ИФА низкомолекулярных антигенов может быть реализован следующим образом (схема 6): к иммобилизованым на носителе антителам добавляют материал, содержащий анализируемый антиген и определенное количество антигена, меченного ферментом. После проведения инкубации носитель отмывают от несвязавшихся свободного и меченого антигена и регистрируют ферментативную активность на носителе, которая обратно пропорциональна концентрации определяемого антигена.

Элиспот (ELIspot), ЭС

ЭС — метод определения клеток, секретирующих определенные продукты: цитокины, антитела, медиаторы и др. ЭС основан на тИФА по принципу «сэндвича», однако специфический продукт, секретируемый клетками, захватывается и определяется в месте секреции. Таким образом удается избежать его разведения в культуральной жидкости, ферментации клеточными протеазами, потребления клетками культуры, связывания с клеточными или растворимыми рецепторами.

Таблица 2

Отличия тИФА и Элиспот

Признак	Элиспот	тИФА
Результат	Количество (процент) клеток, секретирующих определенный продукт (например, цитокин)	Концентрация продукта (например, цитокина) на мл супернатанта
Принцип определения продукта	тИФА, «сэндвич»	тИФА, «сэндвич»
Первые антитела	Культуральный планшет покрыт антителами до начала культивирования	Определение проводят после культивирования

Вторые антитела	Добавляются после окончания культивирования	То же
Метод выявления	Изменение субстрата с образованием цветного продукта непосредственно в культуральной планшете	Изменение субстрата с образованием цветного продукта в планшете для тИФА
Учет	После высушивания	Фотометрия окрашенной жидкости
Аппарат для учета	Элиспот ридер/визуальный подсчет пятен	ИФА-ридер (возможен визуальный учет)
Количественный результат	1 пятно = 1 положительная клетка	Измерение оптической плотности, построение калибровочной кривой, расчет количества продукта
Возможность хранения планшета для последующего анализа	Да (месяцы)	Нет (часы)

После удаления культуры захваченный продукт визуализируется вторыми моноклональными антителами, мечеными ферментом, к другому эпитопу продукта. После добавления субстрата в местах секреции продукта появляется окрашивание (в виде пятен/точек по принципу: одна специфическая клетка-продуцент — одно пятно). Результат выражается в количестве (проценте) клеток-продуцентов. Несмотря на то, что оба метода основаны на тИФА, они имеют существенные отличия (см. табл. 2).

ЭС применяется для определения секреции цитокинов, антител, биоактивных веществ и медиаторов с целью определения функционального состояния иммунных клеток (цитокиновый профиль, поляризация иммунного ответа Th₁-Th₂-Th₃, функция клеток-регуляторов), секреции специфических и общих IgE и др. для диагностики, мониторинга и контроля терапии аллергии, аутоиммунных заболеваний, трансплантационного иммунного ответа, противоопухолевого иммунитета и т. д. Следует отметить, что ЭС к настоящему времени не нашел широкого применения из-за относительной сложности и дороговизны соответствующих тест-систем.

Иммуоблот ИБ (вестернблот)

ИБ — метод, позволяющий одновременно выявлять специфические антитела к спектру антигенов (к каждому из них) в сыворотке или другом материале. ИБ основан на тИФА; в отличие от тИФА в планшетах обладает большей специфичностью (но меньшей чувствительностью).

Этапы постановки ИБ (схема 7):

Подготовка антигенов:

лизис/дезинтеграция вирусов, бактерий;

обработка додецил сульфатом натрия (SDS) для придания всем компонентам схожего соотношения — отрицательный заряд/молекулярная масса.

Получение блотов:

разгонка антигенов в электрофорезе (пропорционально размеру);
 перенос антигенов на мембрану;
 разрезание мембраны на блоты (полоски, содержащие спектр антигенов).

Проведение реакции:

обработка блота сывороткой больного (специфические антитела больного связываются с соответствующими антигенами);

выявление связавшихся антител антивидовыми антителами к иммуноглобулинам человека, меченым ферментом;

внесение субстрата и проявление блотов (при связывании специфических антител в месте связывания образуется пятно);

учет реакции (сравнение результата с положительным и отрицательным контролями) и выдача заключения.

ИБ применяют:

для подтверждения результатов других серологических реакций;

идентификации бактериальных или вирусных белков;

идентификации микробов;

для научных целей.

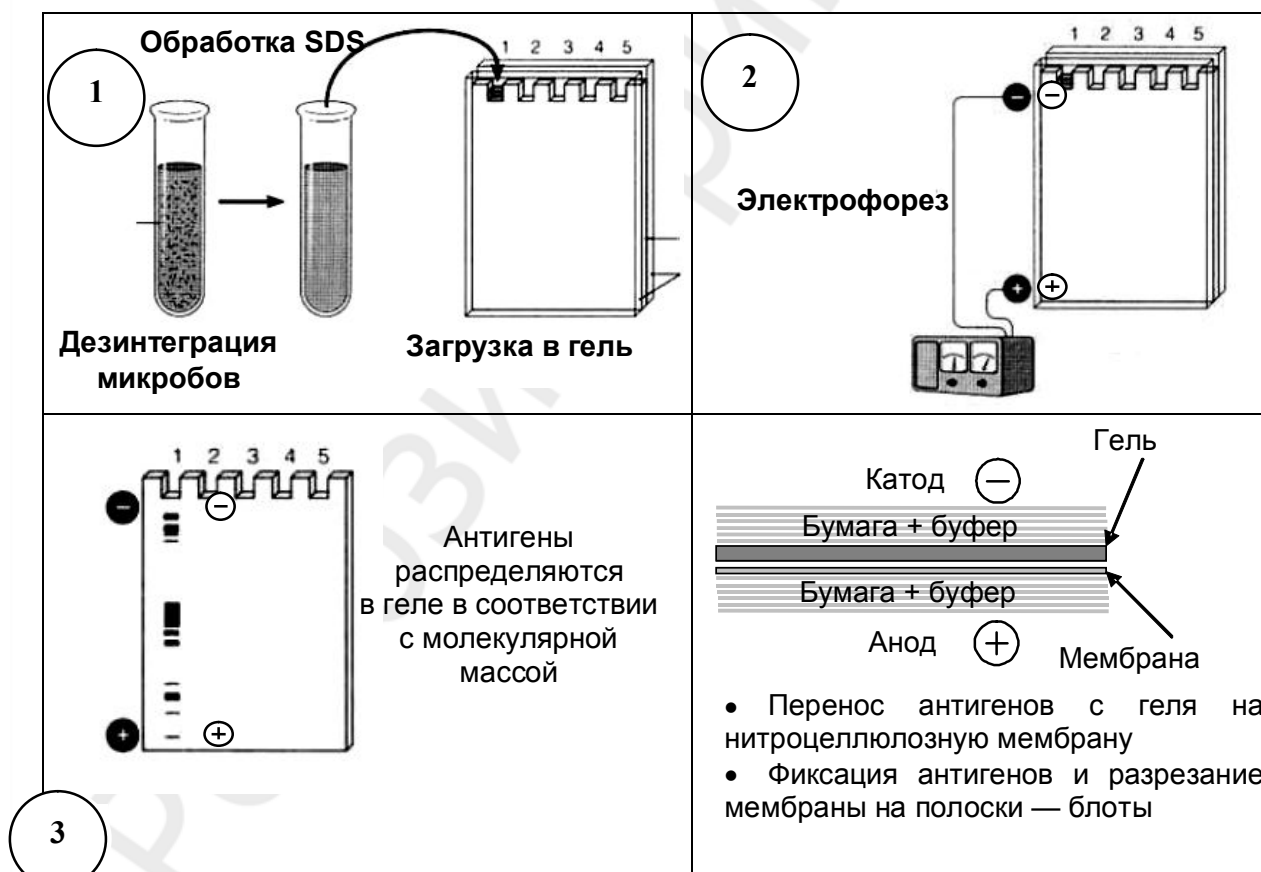




Схема 7. Проведение иммуноблоттинга

Иммуногистохимия, иммуноцитохимия (ИГХ)

ИГХ — комплекс методов, позволяющих выявлять (визуализировать) определенные антигены в составе естественного клеточного или тканевого микроокружения в норме и при патологии. ИГХ основана на тИФА, который проводится *in situ*, т. е. на гистологических срезах (иммуногистохимия) или мазках, цитопрепаратах (иммуноцитохимия). Образующийся нерастворимый окрашенный продукт локализуется в месте экспрессии антигена и учитывается с помощью световой микроскопии.

Постановка ИГХ предусматривает следующие этапы:

забор материала;

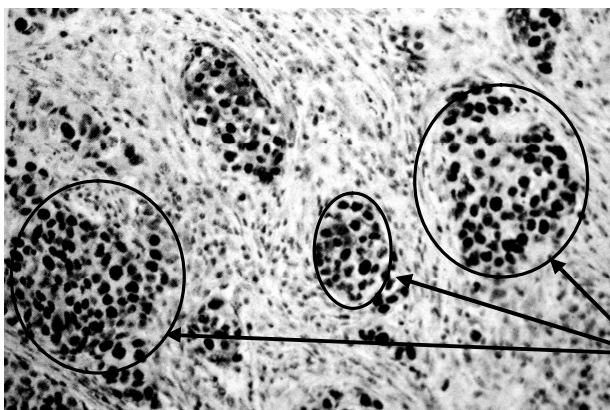
приготовление гистологических (цитологических) препаратов;

фиксацию, подготовку антигенов (зависит от природы антигена и антител);

собственно окрашивание (тИФА: прямой, непрямой, непрямой с усилением сигнала);

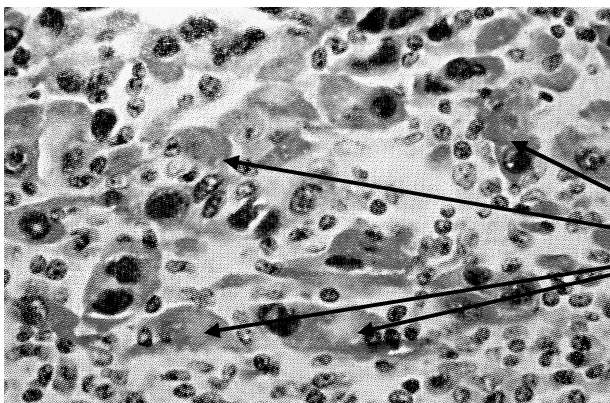
учет: микроскопия, фотографирование, выдача заключения.

ИГХ позволяет существенно улучшить специфичность и чувствительность патоморфологического метода исследования, что весьма актуально для диагностики опухолей (метастазов), их тканевого происхождения, степени дифференцировки и т. д. (рис. 5).



Гистологический срез опухолевой ткани молочной железы, окрашенный антителами к PCNA — антигену, ассоциированному с клеточной пролиферацией. Антиген локализуется в ядрах клеток.

Клетки, экспрессирующие антиген.



Гистологический срез метастаза меланомы в лимфоузле, окрашенный антителами против антигена S-100. Антиген локализуется в цитоплазме.

Клетки, экспрессирующие антиген

Cell Analysis 1998 Catalogue// Coulter Corporation 1994–1998.

Рис. 5. Примеры применения иммуногистохимии для диагностики злокачественных опухолей

Помимо онкологии, ИГХ находит применение для диагностики аутоиммунной патологии, некоторых инфекционных заболеваний, фенотипирования клеток крови и костного мозга и научных целей.

3.1.2. Гомогенные методы иммуноферментного анализа

К *гомогенным* относятся методы, осуществляемые в однофазной системе, и не требующие стадии механического разделения образовавшихся комплексов. Все *гомогенные* методы относятся к *конкурентным* и основаны на одновременном взаимодействии с антителами анализируемого и меченого антигенов. После образования в растворе соответствующего иммунохимического комплекса проводят измерение ферментативной активности, которая пропорциональна концентрации свободного или связанного меченого лиганда.

Одним из распространенных методов является *ЕМИТ-анализ* (*enzyme monitored immunoassay technique*), основанный на изменении активности ферментной метки в конъюгате «фермент-антиген» при образовании комплекса с антителами. Обычно взаимодействие приводит к снижению активности вследствие конформационных перестроек в молекуле фермента

или стерическом исключении доступа молекулы субстрата к активному центру фермента. Достоинствами гомогенных методов является значительное сокращение времени проведения анализа (несколько минут), недостатками — меньшая чувствительность и возможность влияния состава анализируемого образца на результаты анализа.

4. Люминесцентный иммуноанализ (лиа)

ЛИА развивается с 70-х гг., когда была показана возможность использования люминесценции для определения антигенов и антител. В настоящее время к ЛИА относят методы, основанные на применении явления люминесценции для обнаружения продуктов реакции антиген-антитело. При этом меткой может быть какой-либо из компонентов био- или хемолюминесцентной реакции (кофакторы, катализаторы, ферменты, субстраты и т. д.).

Реакции люминесценции относят к окислительно-восстановительным процессам, в ходе которых образуются нестабильные короткоживущие вещества, пребывающие в электронно-возбужденном состоянии. При переходе в основное (стабильное) состояние происходит излучение света в определенном диапазоне, который легко зарегистрировать с помощью фотомножителей, фотоприемников и других устройств.

Общая схема реакции:



К преимуществам ЛИА относят:

автономность (нет необходимости во внешних источниках возбуждения свечения, что значительно упрощает проведение анализа);

широкий динамический диапазон;

возможность получения количественных достоверных результатов;

высокое отношение полезного/фонового сигналов;

высокую чувствительность.

Методы ЛИА делят на биолюминесценцию и хемолюминесценцию.

4.1. Биолюминесцентный иммуноанализ

В реакционную систему входят кофакторы (АТФ или NAD), субстрат (люциферин) и фермент (люциферазы светляков или бактерий). Таким образом, возможны следующие разновидности ИА:

люминесцентный иммунокофакторный анализ (ЛИКА). В качестве метки используются кофакторы (АТФ, NAD);

люминесцентный иммуноферментный анализ (ЛИФА). В качестве метки применяют ферменты: люциферазы или генераторы кофакторов (пируваткиназу или глюкозо-6-фосфат дегидрогеназу).

В целом, методы билюминесцентного анализа характеризуются высокой чувствительностью (до 0,5 нМ антигена) и весьма перспективны для разработки высокоэффективных гомогенных методов ИА (хотя существуют и гетерогенные, в т. ч. твердофазные модификации). Среди недостатков можно выделить следующие: высокую стоимость препаратов ферментов, необходимость устранения кофакторов и примесей из биологических материалов.

4.2. ХЕМОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ

В реакционную систему входят субстрат, окислитель, фермент-катализатор. Таким образом, различают:

хемолюминесцентный иммуноферментный анализ (ХИФА). В качестве метки используют фермент-катализатор (пероксидаза, микропероксидаза (фрагмент цитохрома С)). В настоящее время наибольшее распространение получил ХИФА с двумя субстратами (люминол + люциферин) и пероксидазой в качестве метки. Чувствительность метода оценивается в 10^{-13} М антигена; время анализа — 30 мин;

хемолюминесцентный субстратный анализ (ХИСА). В качестве метки применяют молекулы субстрата (изолуминол, эфиры акридина). Метод обладает высокой чувствительностью (10^{-12} М или до 0,2 пг антигена для изолуминола, до 10^{-18} М антигена для эфиров акридина);

хемолюминесцентный иммуноанализ с использованием переноса энергии рассмотрим на примере *электрохемолюминесцентного анализа (ЭХИА)*.

Метод ЭХИА основан на принципах твердофазного иммуноанализа (технология «сэндвича») с применением электрохемолюминесцентной метки. Одна из коммерчески доступных систем — «ORIGEN», США, — основана на применении магнитных микробус, покрытых моноклональными антителами к искомому антигену, и детектирующих антител, конъюгированных с хелатом рутения. Подобные метки обладают малым молекулярным размером, легко присоединяются к белковым реагентам и не нарушают их иммунных, биохимических и агрегатных свойств.

Типичный анализ проводится по следующей схеме: материал, содержащий искомый антиген, смешивается с магнитными микробусами, покрытыми антителами против антигена, и детектирующими антителами, конъюгированными с меткой. После короткой инкубации анализатор перемещает реакционную смесь в специальную камеру, где происходит захват микробус с помощью магнита, их промывка от несвязавшихся реагентов и измерение люминесценции.

Измерительное устройство включает фотометр и электрод с магнитом. Магнит захватывает микробусы, связавшие антиген и специфическую метку, после чего на электрод подается потенциал (1,5 В), который обеспечивает быстрый обмен электронами между субстратом (трипропиламин) и атомами рутения. Это приводит к люминесценции метки, которая измеря-

ется фотометрически. Измерение можно проводить многократно, поскольку испускание фотона регенерирует метку. Кроме того, реакция происходит в турбулентном потоке микробус в камере, что обеспечивает равномерное смешивание реагирующих компонентов и быстрое протекание реакции (в отличие от ИФА или РИФ, где захват антигена происходит на плоскости и имеет пространственные ограничения).

Заявленная чувствительность при определении антигена составляет до $0,2 \times 10^{-12}$ М/л, а динамический диапазон линейной области реакции — шесть порядков.

Системы на основе ЭХИА выпускают также фирмы Roche Diagnostics (Elecsys), Organon Teknika (NucliSens), PerkinElmer (QPCR System 5000).

5. Некоторые перспективные технологии иммуноанализа

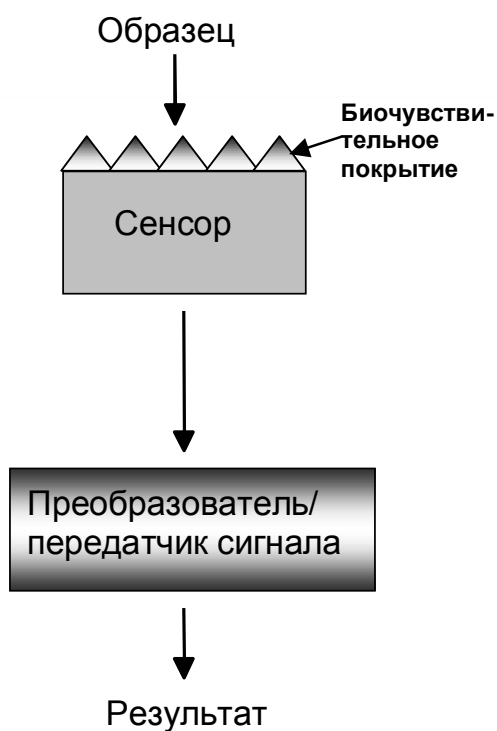
5.1. ИММУНОСЕНСОРЫ (ИС)

ИС — это устройства, состоящие из специфического антигена/анти-тела (датчик), связанного с преобразователем и передатчиком сигнала о связывании соответствующего лиганда (рис. 6).

Непрямые ИС основаны на использовании меченых компонентов для обнаружения связывания (флуоресценция, хемолюминесценция).

Прямые ИС обнаруживают связывание по переносу электронов, выделению или поглощению газов, разности потенциалов, сопротивления, массы, температуры или изменению оптических свойств и т. д. Прямые ИС можно применять для отслеживания реакции антиген–антитело в режиме реального времени.

Потенциально данный подход позволяет определять широкий спектр веществ в концентрации от 10^{-9} – 10^{-13} М/л и выше.



Широкий спектр веществ

Специфические (рекомбинантные) антигены/моноклональные антитела

Выделяют четыре типа передатчиков:
 измерители электрохимических процессов (потенциометрия, амперометрия);
 измерители массы (пьезоэффект);
 измерители тепла (колориметрия);
 измерители оптических свойств

Количественный результат может быть получен в режиме реального времени

Рис. 6. Блок-схема работы иммуносенсоров

Основные преимущества ИС:

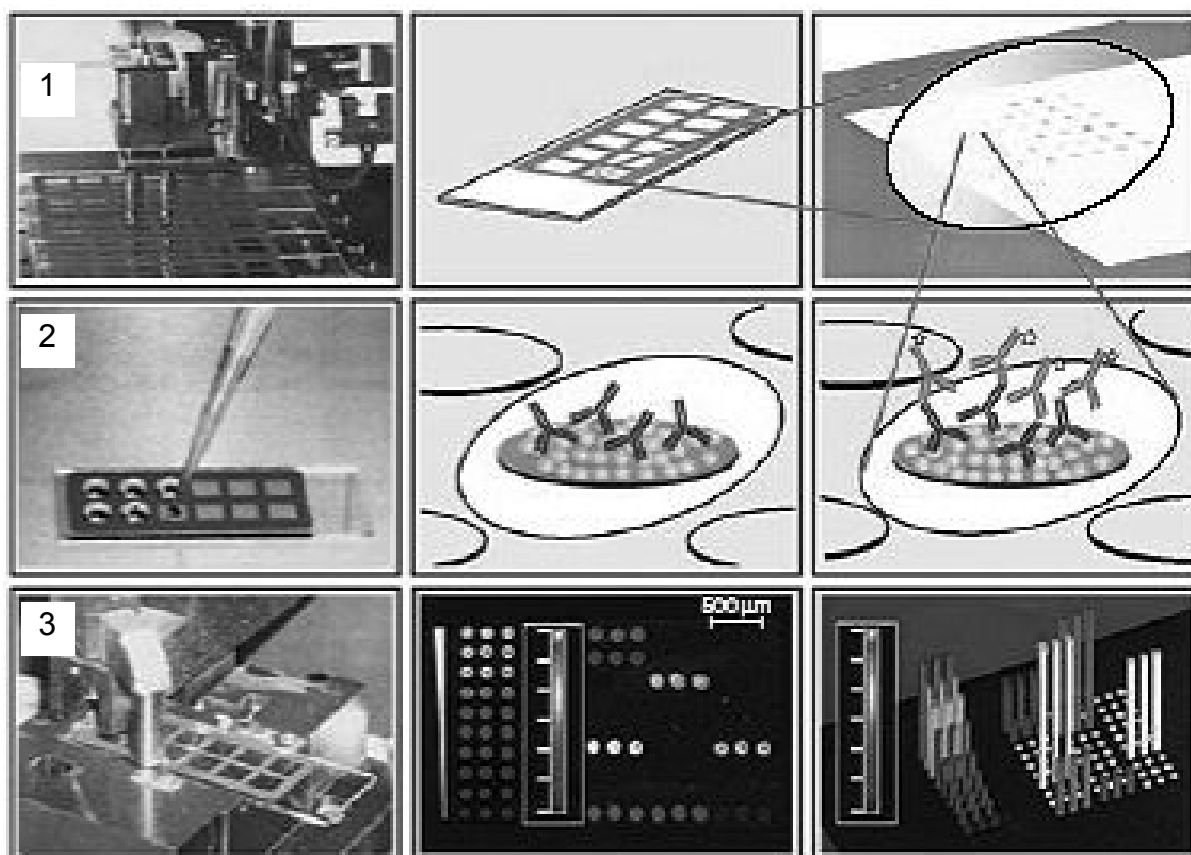
- отсутствие необходимости в применении меченых лигандов;
- возможность многократного использования;
- возможность мониторингования (получение результатов в реальном времени);
- высокая чувствительность и специфичность;
- технологичность и возможность массового производства.

В настоящее время ИС считаются перспективным направлением иммуноанализа, однако на практике существует весьма ограниченное количество коммерческих тест-систем.

5.2. МИКРОЭРРЕЙ (МЭ)

МЭ (*microarray*) — сравнительно новое (разработан в 1990-х гг.) и весьма перспективное направление в прикладной молекулярной биологии. В настоящее время наибольшее распространение получила технология микроэррея, основанная на ДНК-олигонуклеотидах, однако развивается и микроэррей с применением моноклональных антител и рекомбинантных антигенов. В частности, подобная технология применяется для диагностики и оптимизации лечения аллергий (рис. 7).

Аналогичные микроэрреи применяются для обнаружения и исследования аутоантител против различных компонентов (антигенов) соединительной ткани при системных аутоиммунных заболеваниях (ревматоидный артрит, системная красная волчанка и др.).



Harwanegg C. et al., Clin. Exp. Allergy 2003, 33: 7- 13.

Рис. 7. Проведение микроэрея для диагностики аллергии:

1 — приготовление микрочипа: раскапывание рекомбинантных аллергенов на поверхность активированного предметного стекла (объем капли — нанолитры, количество антигена — десятки пикограмм). Одно стекло содержит 12 ячеек. Каждая ячейка содержит десятки (сотни) различных аллергенов и калибровочную кривую (возрастающие количества IgE) в триплетах. Таким образом, одновременно можно обследовать до 12 пациентов;

2–3 — ход теста:

раскапывание сывороток пациентов (15 мкл);

инкубация (IgE пациента соединяются с аллергенами);

добавление моноклональных антител против IgE, меченных флуорохромом;

сканирование микрочипа;

типичная сканограмма микрочипа:

а) первые три ряда = калибровочная кривая (интенсивность свечения пропорциональна количеству фиксированных IgE);

б) далее профиль сенсibilизации пациента (специфичность и количество IgE в сыворотке пациента).

Обратная техника (фиксация набора моноклональных антител на стекле) используется для анализа белков, полисахаридов, биологически активных соединений, медикаментов, токсинов и др. в составе клинических образцов, причем можно анализировать не только растворы, но и суспензии клеток (точная диагностика (фенотипирование) лейкозов).

5.3. ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ (ИХА)

ИХА (предложен в начале 1980-х гг.) можно отнести к группе реакций с мечеными антителами. В качестве метки используют окрашенный латекс или частицы коллоидного золота.

Типичный тест представляет собой пластиковую пластинку и содержит окно для внесения материала, окно для учета результата и одно или несколько окон для внутреннего контроля/контролей (рис. 8).

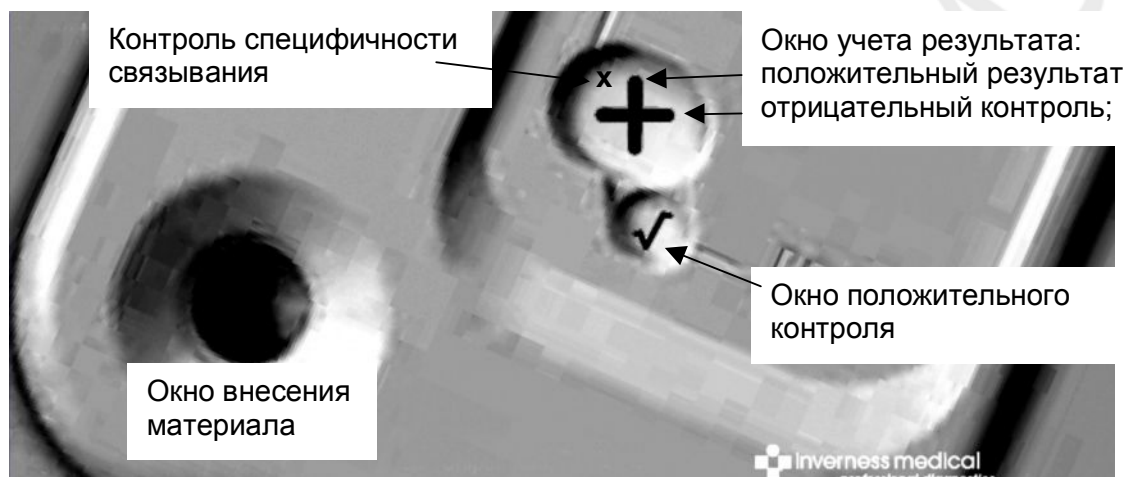


Рис. 8. ИХА-система для диагностики беременности

В реакции используют:

первые антитела к искомому антигену, иммобилизованные в виде полосы на хроматографическом носителе в окне для учета результата (выше окна для внесения материала);

вторые антитела к тому же антигену, адсорбированные на микрочастицах золота или латекса (размещаются в окне для внесения материала).

Внутренний контроль/контроли включают:

выявляемый антиген, нанесенный после окна для учета результата (положительный контроль, контроль протекания всех этапов основной реакции);

антивидовые антитела против вторых (меченых) антител, закрепленные в виде полосы на носителе (отрицательный контроль, контроль переноса ингредиентов по носителю, адекватность внесения материала);

неспецифические первые антитела (того же происхождения) (контроль специфичности связывания вторых антител).

Постановка теста на примере системы для диагностики инфекционного мононуклеоза (рис. 9):

Подготовленный исследуемый материал в небольшом количестве (5–7 капель) вносится в стартовое окно тест-системы. Здесь происходит взаимодействие антигена с антителами, адсорбированными на частицах, и начинается движение образовавшихся комплексов за счет капиллярности носителя. Дойдя до антител, расположенных на носителе в окне учета ре-

зультата, эти комплексы связываются, при этом частицы латекса или коллоидного золота проявляются в виде линии голубого (латекс) или (коричневого) цвета. Поскольку частицы, нагруженные антителами, берутся в избытке, часть их движется дальше и связывается в окне (окнах) внутреннего контроля реакции. Полоса в этом окне свидетельствует о правильной работе тест-системы.



Рис. 9. ИХА-система для диагностики инфекционного мононуклеоза

В настоящее время разработаны тест-системы для установления овуляции и беременности, выявления стрептококков груп

пы А в мазках из зева, вирусов гриппа А и В и РС-вируса в соскобах и смывах из носоглотки, возбудителей туберкулеза в мокроте, хламидий в соскобах из уретры и шейки матки, токсина *C. difficile* в испражнениях, вируса Эпштейна–Барр в крови, определения маркеров повреждения миокарда (инфаркт миокарда), патологического свертывания крови (тромбоз), нарушения обмена кальция (остеопороз) и др.

ИХА может использоваться как для экспресс-индикации антигенов в пробе, так и для идентификации выделенных культур. Например, ИХА позволяет проводить обнаружение листерий в исследуемом материале непосредственно в среде обогащения, без выделения чистой культуры. Это позволяет сократить время исследования до 48 ч.

Таким образом, ИХА-тест-системы обладают несомненными достоинствами:

- высокой специфичностью;
- скоростью получения результата;
- доступны, легко интерпретируются;
- не требуют медицинской или лабораторной квалификации;
- могут применяться пациентами самостоятельно в любых условиях.

Однако по чувствительности ИХА-системы уступают другим методам иммуноанализа, что позволяет применять их лишь в качестве ориентировочного теста. Существует также проблема документирования результатов и ряд этических проблем, связанных с самостоятельным применением тестов пациентами.

Литература

- Антитела. Методы.* В 2-х кн. Кн. 2 / пер. с англ. ; под ред. Д. Кэтти. М.: Мир. 1991. 384 с.
- Иммуноферментный анализ* / пер. с англ. ; под ред. Т. Нго, Г. Ленхоффа. М.: Мир. 1988. 446 с.
- Манолов, А.* Твердофазные радиоиммунные методы для количественного экспресс-анализа в микробиологии / А. Манолов // ЖМЭИ. 1985. № 4. С. 100–107.
- Теория и практика иммуноферментного анализа* / А. М. Егоров [и др.]. М.: Высш. шк. 1991. 288 с.
- Новые методы иммуноанализа* / М. Тертон [и др.] ; пер с англ. М.: Мир. 1991. 280 с.
- Chinoy, B.* Skin testing versus radioallergosorbent testing for indoor allergens / B. Chinoy, E. Yee, S. L. Bahna // *Clinical and Molecular Allergy*. 2005. 3:4.
- Harwanegg, C.* Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: State-of-the-art and future development / C. Harwanegg, R. Hiller // *J. Lab. Med.* 2005. № 29(4). P. 272–277.
- Morgan, C. L.* Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine / C. L. Morgan, D. J. Newman, C. P. Price // *Clinical Chemistry*. 1996. Vol. 42. № 2. P. 193–209.
- Clinical chemistry*. 1990. № 36/8. P. 1408–1427.
- Andreotti, P. E.* Immunoassay of infectious agents / P. E. Andreotti, G. V. Ludwig, A. H. Peruski // *BioTechniques*. 2003. № 35. P. 850–859.
- Gosling, J. P.* A decade of development in immunoassay methodology / J. P. Gosling // *Clinical Chemistry*. 1990. Vol. 36. № 8. P. 1408.
- Kricka, L. J.* Miniaturization of analytical systems / L. J. Kricka // *Clinical Chemistry*. 1998. Vol. 44. № 9. P. 2008–2014.
- Kricka, L. J.* Selected strategies for improving sensitivity and reliability of immunoassays / L. J. Kricka // *Clinical chemistry*. 1994. Vol. 40. № 3. P. 347–357.
- Immunochemical staining methods* / S. J. Naish [et al.] // DAKO Corporation, Carpinteria, California. 1989. P. 41.
- Methods of Biomaterials Testing* // <http://www.manfred.maitz-online.de>.
- Microarrayed recombinant allergens for diagnostics of allergy* / C. Harwanegg [et al.] // *Clin. Exp. Allergy*. 2003. Vol. 33. № 7. P. 13.
- Spiewak, R.* ELISpot: Principles of the technique / R. Spiewak // www.ELISpot.biz.
- Ekins, R. P.* Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays / R. P. Ekins // *Clinical Chemistry*. 1998. Vol. 44. P. 2015–2030.
- Radioallergosorbent Test (RAST) Methods for Allergen-Specific Immunoglobulin E (IgE) 510(k)s; Final Guidance for Industry and FDA* / U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration; Center for Devices and Radiological Health. August 22. 2001.
- Radioimmunoassay for a Monoclonal Antibody-Defined Tumor Marker, CA 19-9* / B. C. Villano [et al.] // *Clinical Chemistry*. 1983. Vol. 29. № 3. P. 549–552.
- <http://biotech.city.tomsk.net/assay/assay.htm> — сайт Томского медицинского университета.

Оглавление

Список сокращений.....	3
Введение	4
1. Методы иммуноанализа с применением радиоактивной метки	6
1.1. Радиоиммунный анализ (РИА) <i>(Т. А. Канашкова, Д. А. Черношей)</i>	6
1.2. Иммунорадиометрический анализ (ИРМА) <i>(Д. А. Черношей)</i>	7
2. Методы иммуноанализа с применением флуоресцентной метки	8
2.1. Реакция иммунофлуоресценции (РИФ) <i>(Т. А. Канашкова)</i>	8
2.2. Флуоресцентный иммуноанализ с временным разрешением (ФИА ВР) <i>(Т. А. Канашкова)</i>	9
2.3. Проточная цитофлуориметрия <i>(Д. А. Черношей)</i>	10
3. Методы иммуноанализа с применением ферментной метки	12
3.1. Иммуноферментный анализ (ИФА) <i>(Т. А. Канашкова, Д. А. Черношей)</i>	12
3.1.1. Гетерогенные методы иммуноферментного анализа	13
3.1.2. Гомогенные методы иммуноферментного анализа	20
4. Люминесцентный иммуноанализ (ЛИА) <i>(Д. А. Черношей)</i>	20
4.1. Биолюминесцентный иммуноанализ	21
4.2. Хемолюминесцентный иммуноанализ	21
5. Некоторые перспективные технологии иммуноанализа	22
5.1. Иммуносенсоры (ИС) <i>(Д. А. Черношей)</i>	22
5.2. Микроэррей (МЭ) <i>(Д. А. Черношей)</i>	23
5.3. Иммунохроматографический анализ (ИХА) <i>(Т. А. Канашкова)</i>	25
Литература	27