

A detailed 3D illustration of a cell's surface. The cell membrane is shown in a reddish-brown hue, covered with numerous small, dark red spherical molecules. Several larger, blue, Y-shaped structures, likely receptors or antibodies, are embedded in the membrane. A prominent feature is a large, glowing yellow and orange circular structure, possibly a vesicle or a specialized organelle, with a dark, textured interior. The background is a dark, blue, textured surface, suggesting the cytoplasm or another part of the cell.

**Иммуноферментный анализ
(ИФА). Иммуноблотинг.
Иммунохроматографический метод.
Полимеразная цепная реакция
(ПЦР)**

Контрольные вопросы:

1. Иммуноферментный анализ: назначение (области применения, выявляемые вещества), механизм реакции, способы постановки ИФА; необходимые принадлежности и оборудование.
2. Необходимые ингредиенты, особенности и схема постановки неконкурентного ИФА методом «сэндвича».
3. Иммуноблоттинг: сущность метода, особенности проведения и диагностические возможности реакции.
4. Иммунохроматографический анализ (ИХА): назначение (определяемые вещества); принцип, лежащий в основе метода. Структура тест-полоски (тест-кассеты).
5. Принцип проведения ИХА: исследуемые материалы, их подготовка, выполнение исследования, интерпретация результатов. Диагностические возможности ИХА.
6. Полимеразная цепная реакция: принцип, сущность, диагностические возможности ПЦР. Оборудование ПЦР-лаборатории.
7. Этапы ПЦР. Содержание каждого этапа. Процессы, происходящие на каждом этапе ПЦР.
8. Методы детекции результатов ПЦР, их сущность.
9. ПЦР в режиме реального времени: особенность данного варианта ПЦР. Флуоресцентный метод детекции результатов (понятие «порогового цикла», принцип учета и интерпретации результата).

ВНИМАНИЕ! Для подготовки к занятию использовать:

1. Презентацию к занятию
2. Методическую разработку «ПЦР» (на сайте в папке с презентациями).
3. Видеоролики по изучаемым реакциям (на сайте в СДО по теме данного занятия)

**На занятие принести
перчатки**

**Метод
иммуноферментного
анализа (ИФА)**

Метод ИФА –

высококочувствительный и
высокоспецифичный
иммунодиагностический метод, с
помощью которого проводят
качественное и количественное
определение различных веществ,
обладающих свойствами антигена,
гаптена (неполноценного антигена)
или антитела.

Метод ИФА используется:

- для диагностики инфекционных заболеваний
- для диагностики неинфекционных заболеваний человека и животных
- подтверждения качества иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП)

Метод ИФА

Гомогенный ИФА

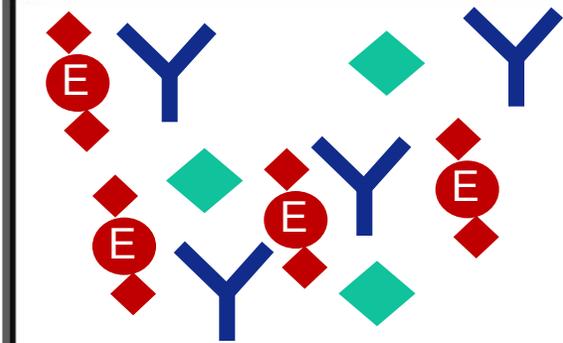
Все компоненты
находятся в жидкости.
В настоящее время
практически не
используется

Гетерогенный ИФА
– **ТВЕРДОФАЗНЫЙ**

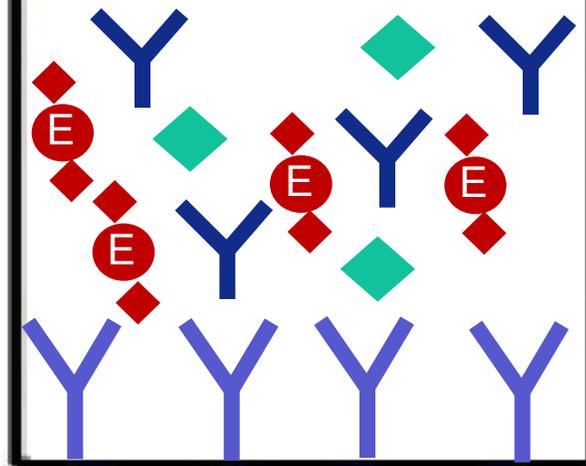
Антиген или антитело
сорбировано
в полистироловом планшете

ИФА

Гомогенный



Твердофазный



Твердофазный ИФА

```
graph TD; A[Твердофазный ИФА] --> B[неконкурентный ИФА]; A --> C[конкурентный ИФА]; B --> D[Вариант непрямого неконкурентного ИФА – метод «сэндвича»];
```

неконкурентный
ИФА

конкурентный
ИФА

Вариант непрямого неконкурентного ИФА –
метод «сэндвича»

Иммуноферментный анализ

– выявление антигенов или антител с помощью соответствующих им антител (антигенов), конъюгированных с ферментом-меткой (пероксидазой хрена, бета-галактозидазой или щелочной фосфатазой).

После соединения антигена с меченой ферментом иммунной сывороткой в смесь добавляют субстрат-хромоген.

Субстрат расщепляется ферментом, это приводит к изменению цвета продукта реакции: интенсивность окраски пропорциональна количеству иммунных комплексов (детекция результатов осуществляется с

Оборудование и принадлежности для проведения метода ИФА



Для проведения твердофазного ИФА используются разборные и неразборные 96-луночные планшеты



Дозатор многоканальный

Оборудование для иммуноферментного анализа



Инкубатор - шейкер



Мойка для ИФА-
иммунопланшетов

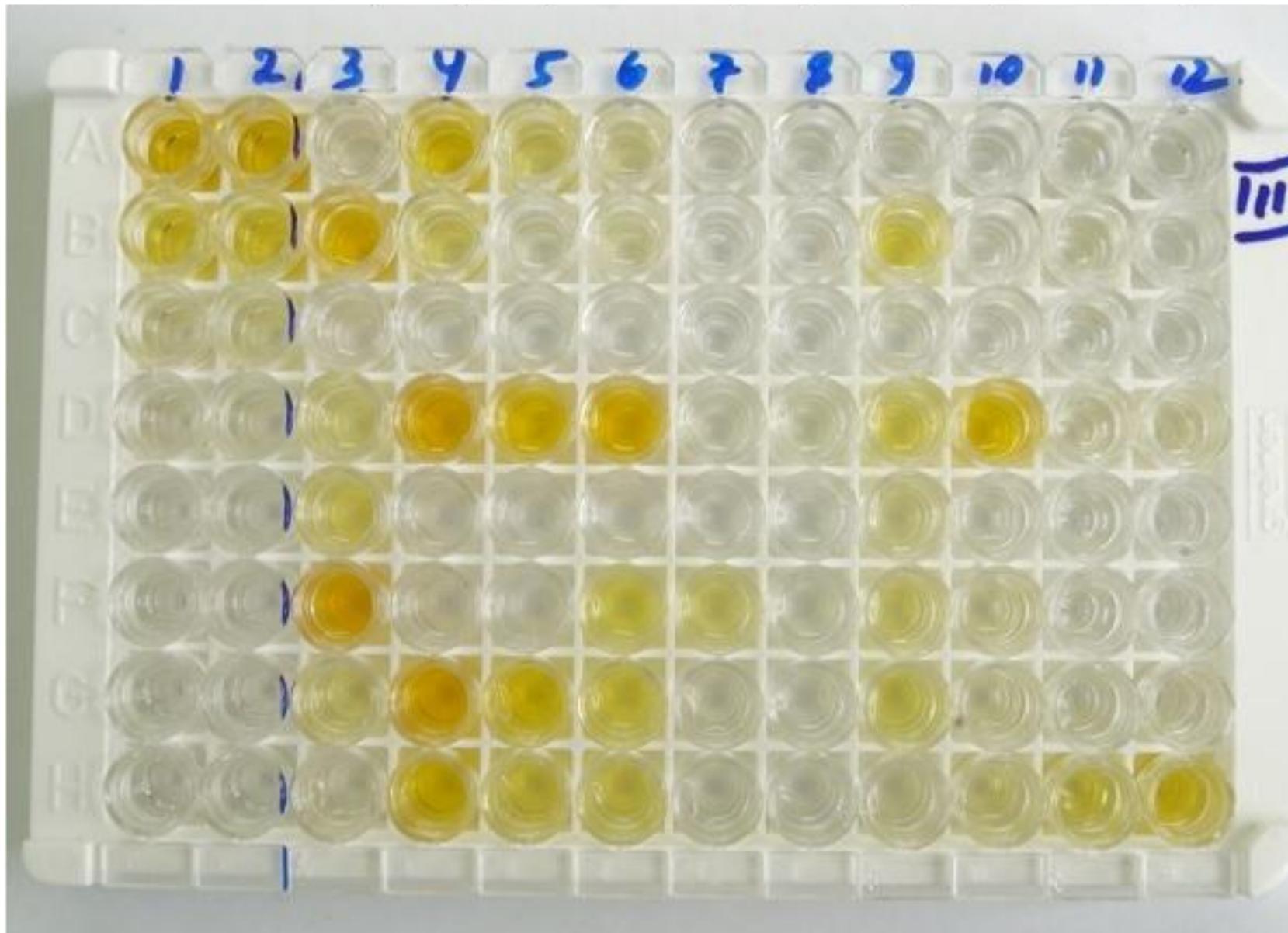


Микропланшетный
автоматический
фотометр Stat Fax

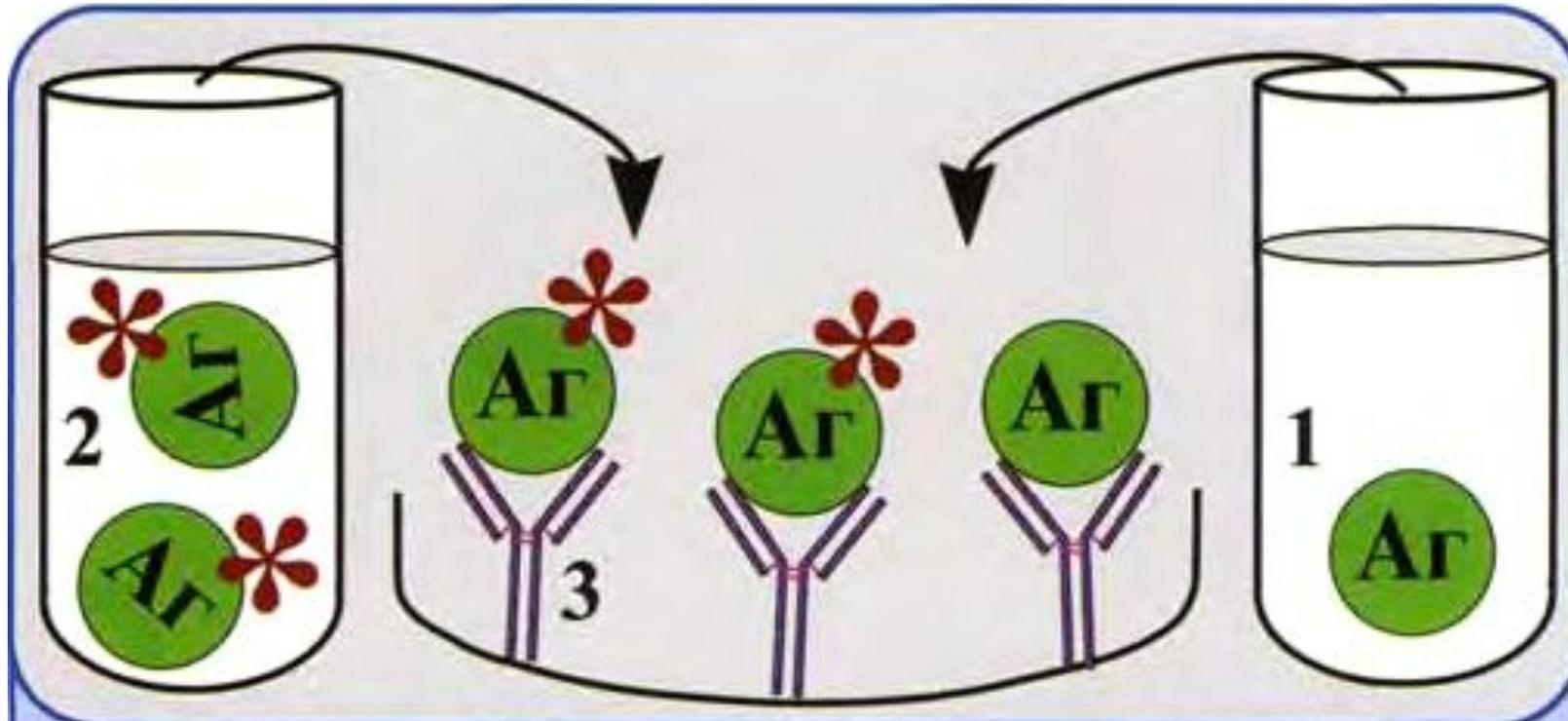
Иммуноферментный планшетный фотометр



Детекция результатов метода ИФА



Конкурентный метод ИФА



2- известный
меченный
антиген

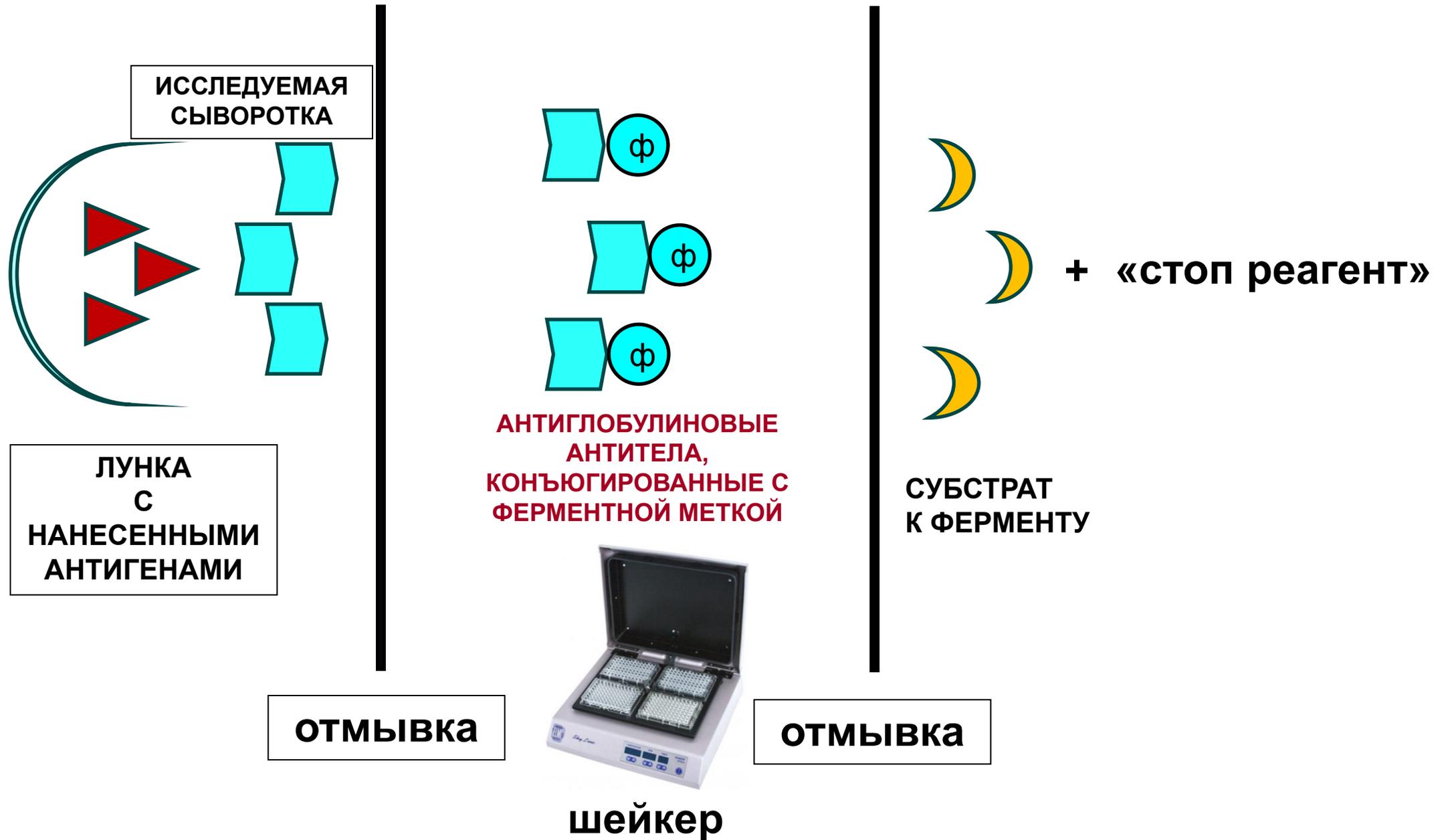
3- антитело
известное

1- исследуемый
антиген

Этапы конкурентного ИФА

- На твердой фазе иммобилизируют специфические для выявляемого антигена моноклональные антитела
- В лунки вносят в известной концентрации антиген, меченный ферментом, и исследуемый образец. Искомый антиген и меченный ферментом антиген конкурируют друг с другом за связывание иммобилизованных антител. Проводят инкубацию и отмывку.
- Далее в лунку добавляется субстрат-хромоген реагент, который превращается в окрашенный продукт под влиянием ферментного компонента конъюгата, после чего происходит детекция и интерпретация результатов
- Интенсивность окраски обратно пропорциональна количеству связавшихся молекул искомого антигена с антителами

Неконкурентный метод ИФА



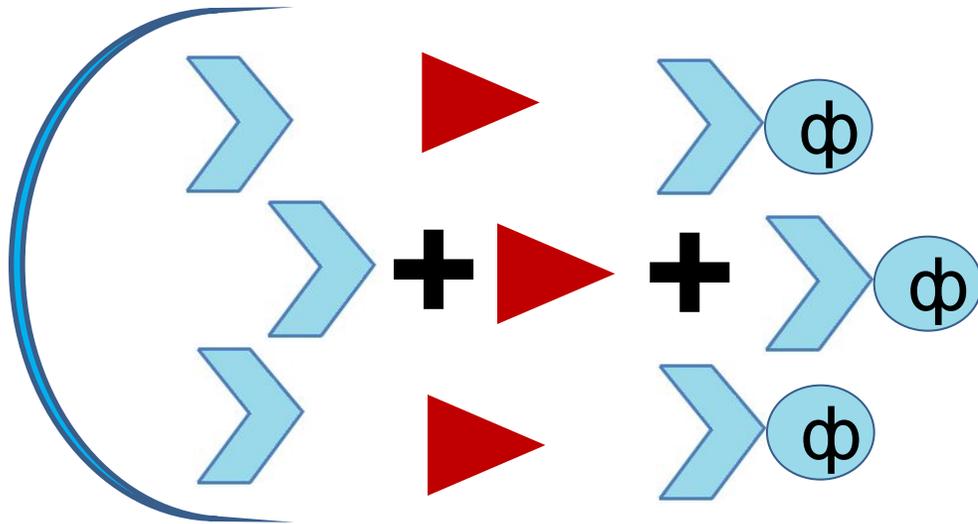
Этапы неконкурентного ИФА

- К иммобилизованным на поверхность лунки антигенам добавляют исследуемый материал – сыворотку крови, инкубируют. Исследуемые антитела из сыворотки связываются с антигеном и таким образом иммобилизируются на поверхности лунки. Несвязавшиеся антитела удаляют отмыванием.
- В лунку вносят конъюгат, то есть антиглобулиновое антитело, меченное ферментом, инкубируют. Если в ячейке имеются образовавшиеся на первой стадии иммунные комплексы, то конъюгат соединяется с ними во время второй инкубации, а несвязавшийся конъюгат удаляется последующим отмыванием.
- Далее в лунку добавляется субстрат-хромоген реагент, который превращается в окрашенный продукт под влиянием ферментного компонента конъюгата, после чего происходит детекция и интерпретация результатов

Неконкурентный ИФА. Метод

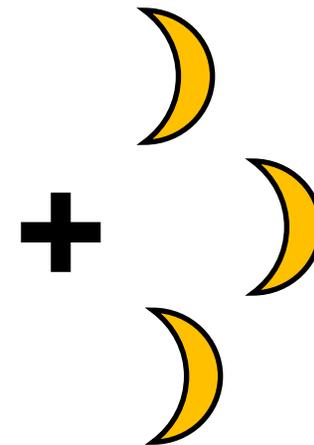
«Сэндвича»

ИССЛЕДУЕМАЯ
СЫВОРОТКА



ЛУНКА С
ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ
АНТИТЕЛАМИ

КОНЪЮГАТ:
ПОЛИКЛОНАЛЬНЫЕ
АНТИТЕЛА,
МЕЧЕННЫЕ
ФЕРМЕНТОМ



СУБСТРАТ К
ФЕРМЕНТУ

+ СТОП-
РЕАГЕНТ

ИНКУБАЦИЯ,
ОТМЫВКА

ИНКУБАЦИЯ В
ТЕМНОТЕ

Инструкция для постановки ИФА, метод «сэндвича», для определения HBs-антигена вируса гепатита В

Набор «Вектогеп В – HBs-антиген» предназначен для иммуноферментного выявления поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) в сыворотке (плазме) крови.

Принцип действия

Принцип метода заключается во взаимодействии HBsAg с моноклональными антителами, иммобилизованными на поверхности лунок полистиролового планшета. Комплекс «антиген-антитело» выявляют с помощью конъюгата поликлональных антител с пероксидазой хрена.

Состав набора:

- планшет с иммобилизованными моноклональными антителами к HBsAg
- положительный контрольный образец (K+), инактивированный, содержит $(4,0 \pm 2,0)$ МЕ/мл HBsAg
- отрицательный контрольный образец (K-), инактивированный
- конъюгат – поликлональные антитела к HBsAg, меченые пероксидазой хрена
- субстрат-хромоген – тетраметилбензидин (ТМБ)
- буферный раствор (БР)
- стоп-реагент

Проведение анализа

1. Внести в лунку А1 50 мкл К–
2. Внести в лунку В1 50 мкл К+
3. В остальные лунки (С1-Н1) внести по 50 мкл исследуемых образцов, меняя наконечники для каждой лунки.
4. Во все лунки (А1-Н1) внести по 50 мкл раствора конъюгата, не меняя наконечник.
5. Планшет инкубировать 37°С 20 мин.
6. По окончании инкубации содержимое лунок собрать пипеткой в сосуд с дезинфицирующим раствором, меняя наконечники для каждой лунки.
7. Промыть лунки 1 раз буферным раствором пипеткой объемом 50 мкл, меняя наконечники для каждой лунки.
8. Внести во все лунки по 50 мкл раствора субстрата-хромогена (ТМБ), не меняя наконечник.
9. Планшет поместить в защищённое от прямого солнечного света место при температуре (18–25)°С на 20 минут.
10. Остановить реакцию добавлением во все лунки по 50 мкл стоп-реагента, не меняя наконечник, и через 2–3 минуты измерить оптическую плотность (ОП).

Регистрация результатов

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра.

Учет результатов реакции

Значения ОП К⁻ ≤ 0,10 ед.опт.пл

Значение ОП К⁺ ≥ 1,0 ед. опт. пл

Вычислить критический уровень ОП (ОП_{крит}) по формуле: ОП_{крит} = ОП К⁻ + 0,04

Интерпретация результатов

Результат анализа считать положительным, если ОП_{обр} ≥ ОП_{крит}

Результат анализа считать отрицательным, если ОП_{обр} < ОП_{крит}, где ОП_{обр} – ОП в лунке с анализируемым образцом.

Положительный результат означает, что тестируемый образец содержит HBsAg

Отрицательными считать образцы, имеющие ОП меньше ОП_{крит}.

Отрицательный результат указывает, что тестируемый образец не содержит HBsAg или содержит HBsAg в концентрации ниже определяемого набором реагентов уровня.

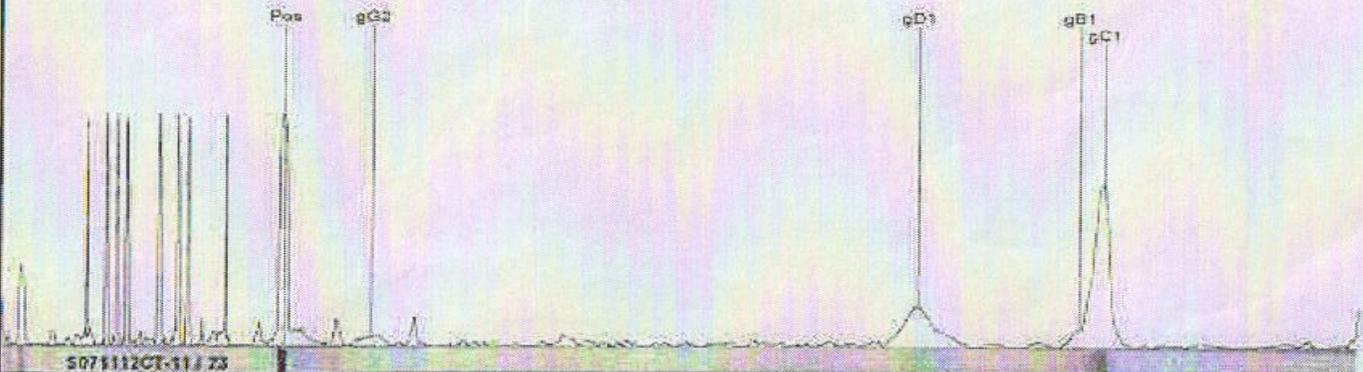
Иммуноблоттинг -

Иммуноблоттинг (вестерн-блот, белковый иммуноблот, англ. *Western blot*) – аналитический метод, используемый **для определения** в образце **специфичных белков**. На первом этапе используют **электрофорез** в полиакриламидном геле **для разделения** денатурированных полипептидов по длине или по трехмерной структуре белка. Далее **белки переносят** на нитроцеллюлозную или фторопластовую мембрану, затем **детектируют** с использованием антител, специфичных к искомому белку.

Механизм иммуноблоттинга



(СМЕСЬ БЕЛКОВ)



Molecular weight	char	o	(+)	+
gC-1; 130 kDa	+			
gB-1; 120 kDa	(+)			
gD-1; 60 kDa	+			
gG-2	o			
Positioning mark	o			

Class	Explanation
o	no staining
(+)	weak staining
+	strong staining

Test	Result
Herpes Simplex Virus IgG	HSV 1 positive HSV 2 negative

Иммуноблоттинг. Определение Ig G к вирусам герпеса 1 и 2 типов

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Иммунохроматографический анализ (ИХА) – это иммунохимический метод, основанный на принципе тонкослойной хроматографии и включающий реакцию между **антигеном** и соответствующим ему **антителом**, для определения наличия низких концентраций веществ в биологических материалах (моча, цельная кровь, сыворотка или плазма крови, слюна, фекалии и т. д.). Метод отличается высокой степенью чувствительности и специфичности.

Метод позволяет визуально в течение нескольких минут определить и оценить содержание антигенов, антител, гормонов и других диагностически важных веществ в организме человека.

Данный вид анализа осуществляется при помощи тест-полосок, палочек, панелей или тест-кассет, которые обеспечивают быстроту проведения тестирования. Принцип их работы основан на движении биологической жидкости вдоль мембран иммунохроматографической тест-полоски под действием капиллярных сил, что приводит к последовательному взаимодействию реагентов на разных участках мембран. В результате такого взаимодействия появляется окрашивание определенных участков тест-полоски.

Тест-полоска (рис. 1) представляет собой мультимембранный композит («сэндвич»), который состоит из:

1. Подложки, адсорбирующей образец, на которую наносится анализируемая проба (кровь, сыворотка крови, смыв из носа и др.);

2. Подложки под конъюгат – на нее нанесены «первые» антитела (моноклональные) к выявляемому антигену, которые конъюгированы с маркером (коллоидным золотом, окрашенными шариками латекса и др.);

3. Рабочей мембраны с двумя участками – в ее тестовой зоне (Т-зона) нанесены «вторые» антитела (поликлональные) к выявляемому антигену, в контрольной зоне (С-зона) нанесены антивидовые антитела к «первым» антителам.

4. Конечной адсорбирующей подложки, впитывающей жидкость, протекающую через рабочую мембрану.

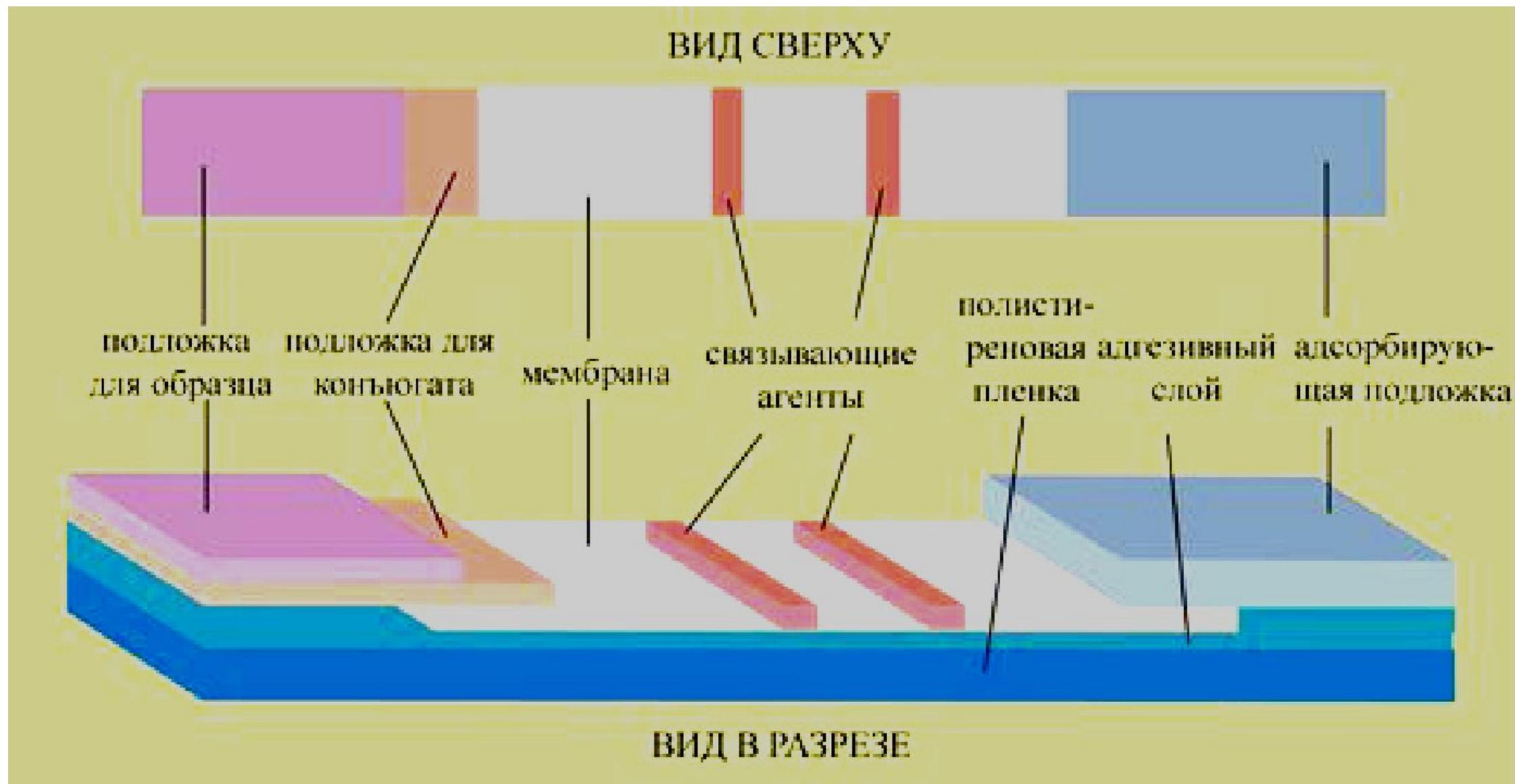
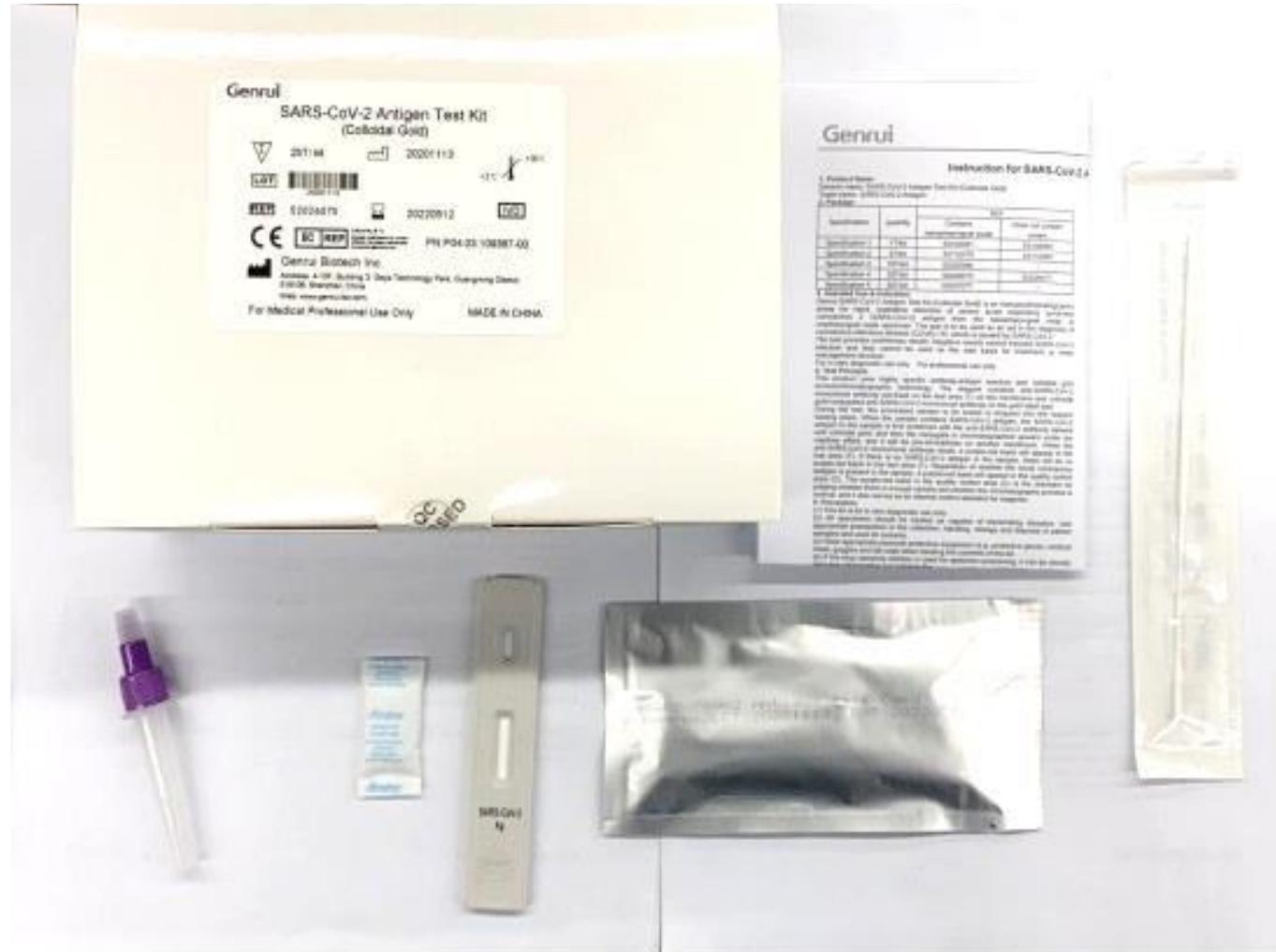


Рисунок 1. Структура тест-полоски

Выявление антигена SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки и ротоглотки человека иммунохроматографическим методом

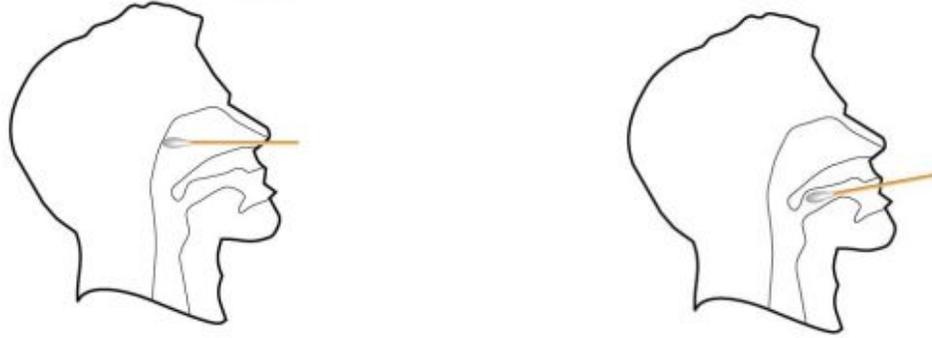
Пример состава набора для проведения ИХА



ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА:

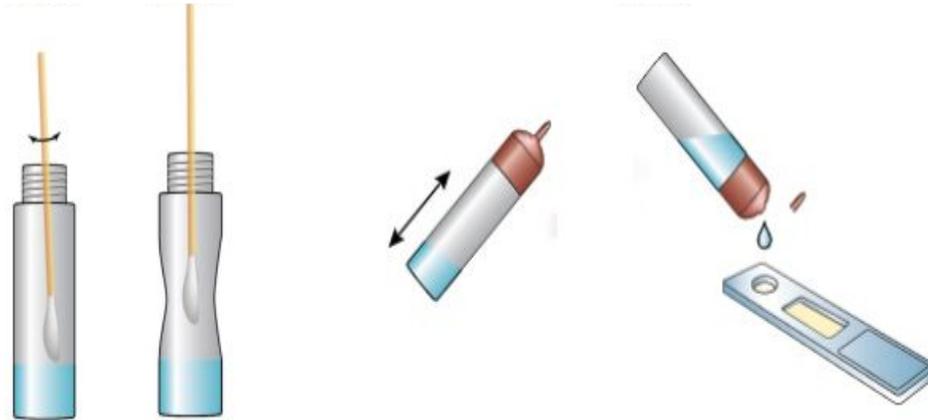
1. Подготовка образцов

- Взять мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки палочками-тампонами.



- Поместить палочку-тампон с образцом во флакон-капельницу с буферным раствором. Смыть образец с палочки-тампона в раствор.

- Внести 3 капли в круглое окошко кассеты.



2. Ход реакции (Рис. 2):

Если в анализируемой пробе есть антиген вируса SARS-CoV-2, попав на тест-полоску, он вступает в реакцию со специфическими антителами против SARS-CoV-2, конъюгированными с окрашенным маркером. Образуется комплекс, который под действием капиллярных сил перемещается дальше вдоль тест-полоски (а).

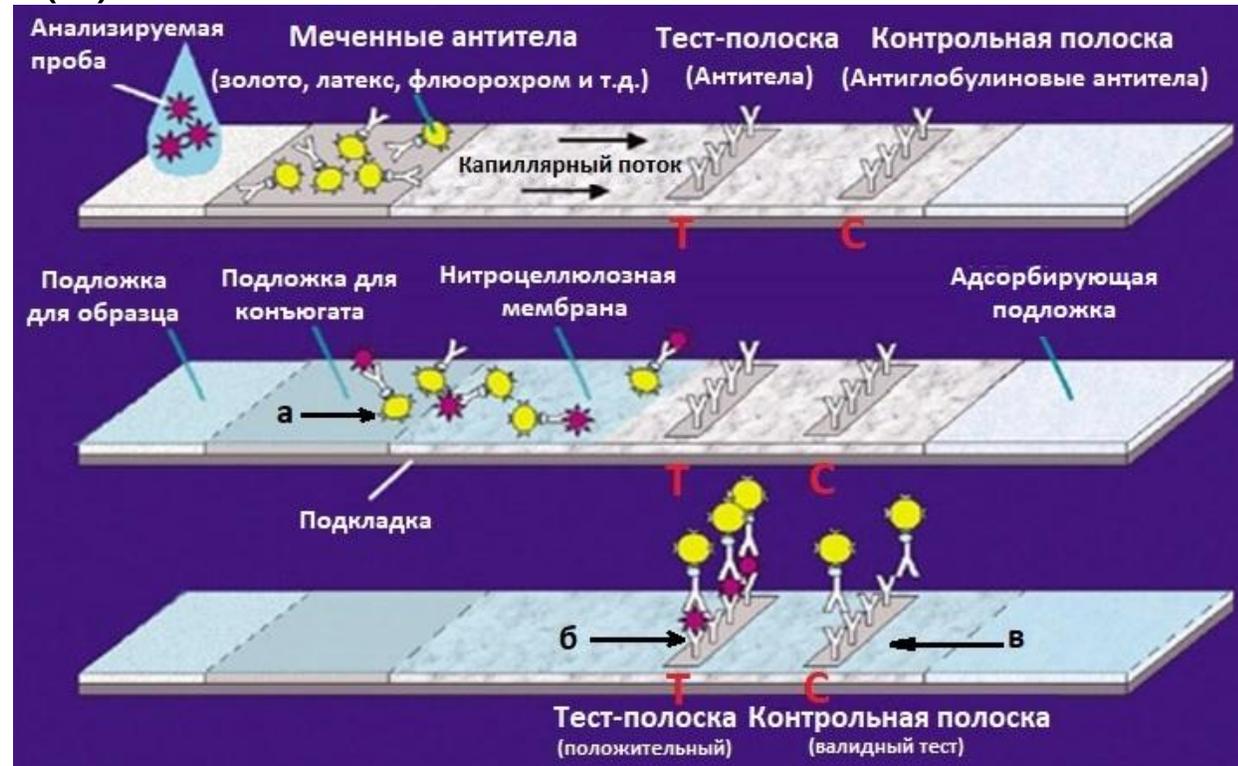


Рисунок 2. Механизм ИХА

Дойдя до аналитической зоны Т, он связывается с иммобилизованными специфическими антителами против SARS-CoV-2, происходит формирование окрашенного сэндвич-комплекса (б): иммобилизованные антитела–нуклеокапсидный антиген образца–конъюгат антител с маркером и образование видимой глазом окрашенной полосы в аналитической зоне тест-полоски. Следуя далее по мембране теста, не связавшийся в Т-зоне конъюгат антител с маркером доходит до контрольной С-зоны, где обязательно связывается с антиглобулиновыми антителами независимо от наличия или отсутствия антигена вируса в пробе (в). Эта реакция приводит к образованию контрольной окрашенной линии.

3. Интерпретация результатов

Выявление в тестовом окошке кассеты одной красной контрольной линии (С) свидетельствует об отрицательном результате анализа, т.е. указывает на отсутствие в анализируемом образце мазка со слизистой из носоглотки и/или ротоглотки нуклеокапсидного антигена вируса SARS-CoV-2 (рис.3.1).

Выявление в тестовом окошке кассеты двух параллельных линий (Т и С) свидетельствует о положительном результате анализа, т.е. указывает на наличие в анализируемом образце антигена вируса SARS-CoV-2 (рис.3.2). В тех случаях, когда в тестовом окне тест-кассеты не образуется контрольной линии С или линия только в зоне Т, результат анализа признается недостоверным (рис. 3.3). В этом случае анализ следует повторить с использованием другой тест-кассеты.



Рисунок 3. Интерпретация результатов ИХА

Иммунохроматографический анализ



Ссылка на видео-файл «Проведение ИХА»

https://www.youtube.com/watch?v=A00tl8SwES4&t=84s&ab_channel=SHOPRASEIA



**ПОЛИМЕРАЗНАЯ
ЦЕПНАЯ
РЕАКЦИЯ**

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

ПЦР – гибридизационный метод, основанный на принципе комплементарности

1953 открытие двойной
спирали ДНК (Уотсон и
Крик)

1983 изобретение ПЦР
(Кэри Маллис)

1993 за изобретение ПЦР
Кэри Маллису вручена
нобелевская премия по
химии

1993 изобретение ПЦР в
реальном времени

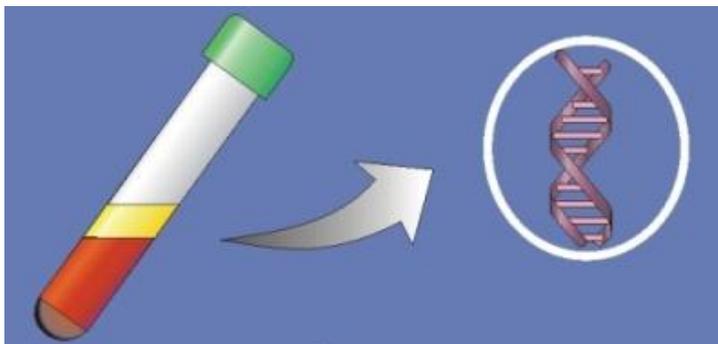
Kary B. Mullis – Autobiography



My father Cecil Banks and
mother, formerly Berni
Barker grew up in rural
Carolina in the foothills
Ridge Mountains. My da
had a general store, wh
saw. My grandparents
had already died before
noticing things. My mot
parents were close to n
during my childhood, a
father Albert stopped b
in a non-substantial for
way out of this world in
was living in California.

Этапы классического ПЦР-анализа

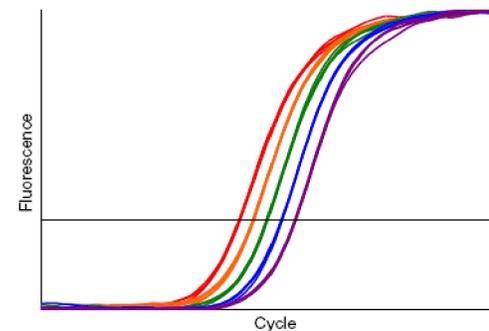
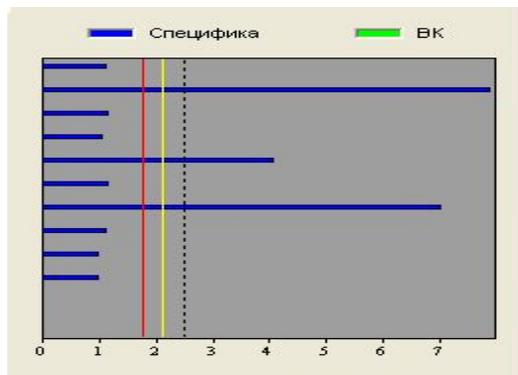
1. Пробоподготовка



2. Амплификация



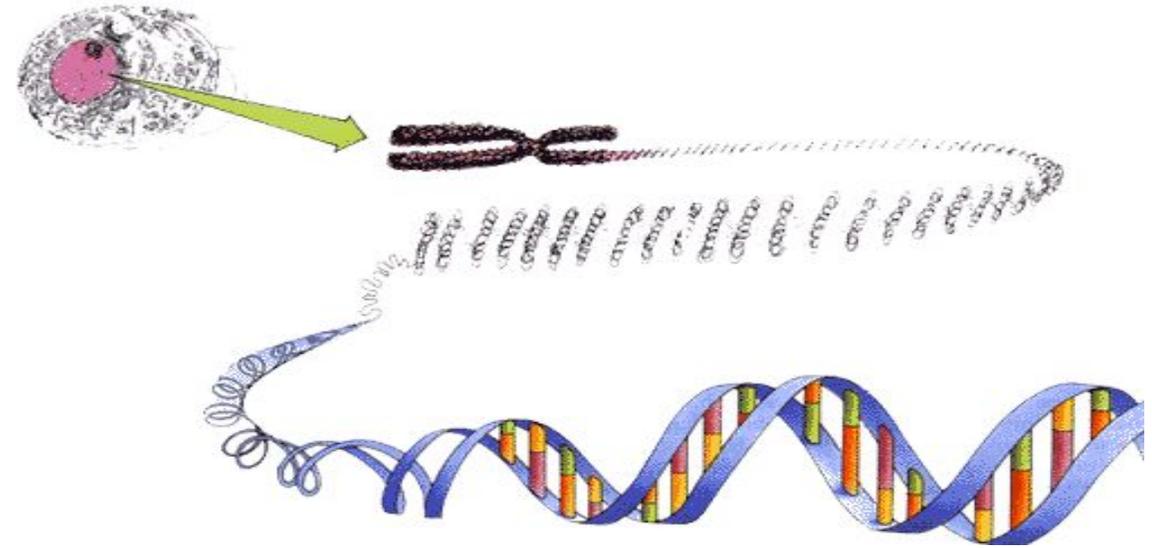
3. Детекция результатов



Пробоподготовка – выделение нуклеиновых кислот

Основные задачи

1. Максимальный выход НК
2. Удаление ингибиторов ПЦР
3. Удаление или ингибирование нуклеаз
4. Очистка НК



ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ:

- лизис
- изоляция НК
- освобождение от ингибиторов
- элюция (переведение НК в раствор)

Минимальный состав смеси для ПЦР

- ДНК-матрица
- олигонуклеотидные праймеры
- смесь dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- полимераза
- буферный раствор, содержащий ионы Mg^{2+}



ДНК



ПРАЙМЕРЫ



НУКЛЕОТИДЫ



ДНК-ПОЛИМЕРАЗА



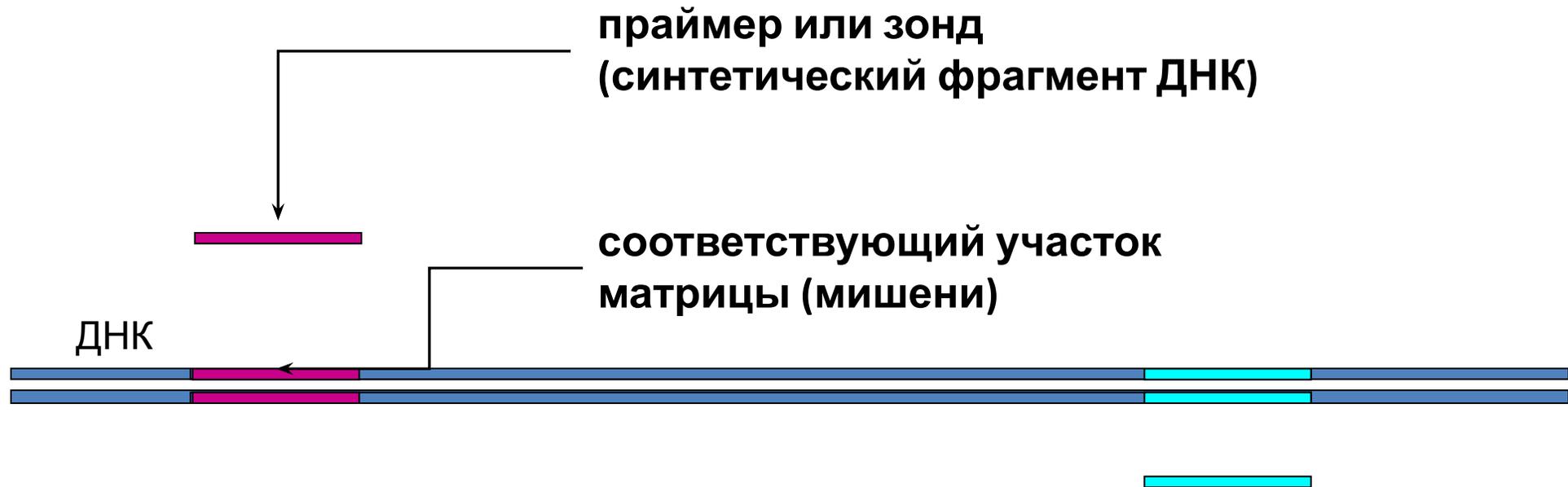
РАСТВОР

Амплификация – увеличение количества **ампликонов** в ходе многократно (обычно 30-50 раз) повторяющихся циклов (раундов) денатурации, гибридизации и удлинения цепей

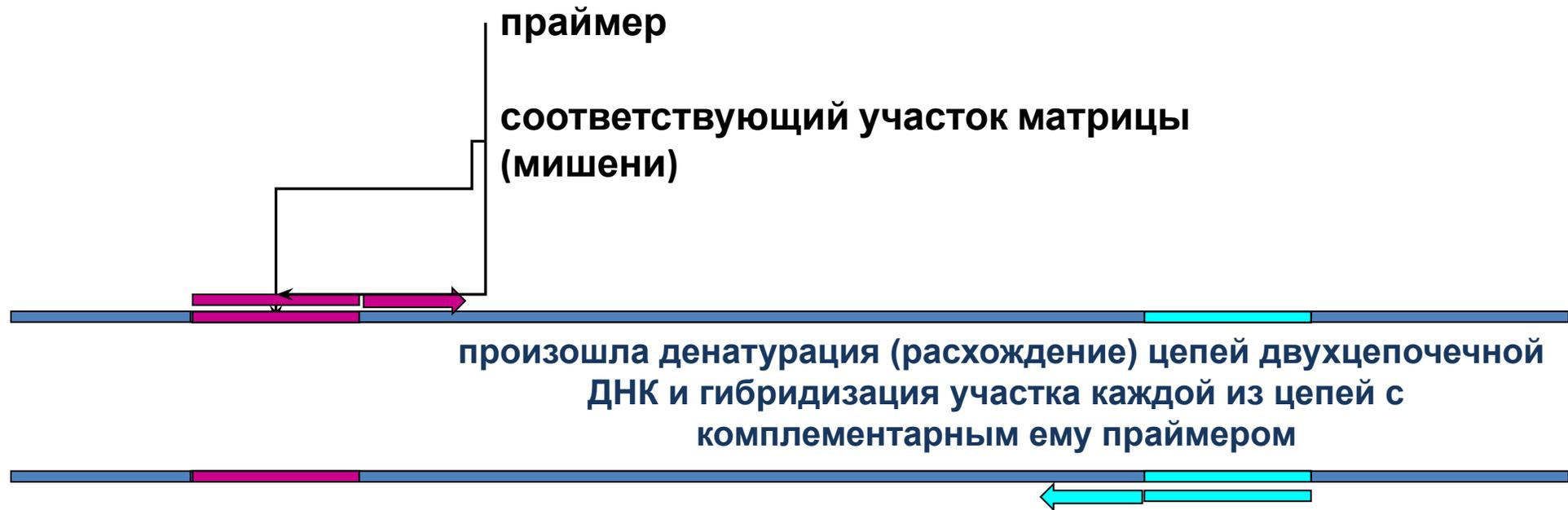
Этапы ПЦР

- Денатурация ДНК (~ 95° С)
- Отжиг (гибридизация) праймеров на ДНК (~ 55° С)
- Синтез фрагмента ДНК (элонгация) с помощью термостабильной ДНК-полимеразы (~ 72° С)

Реакция повторяется 30-50 циклов, количество специфического фрагмента ДНК возрастает в 1-10 млн. раз

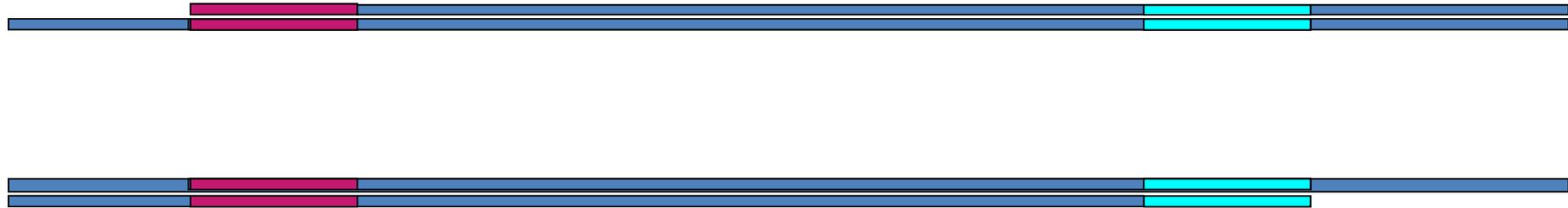


праймеры – короткие синтетические молекулы ДНК, ограничивающие синтезируемый фрагмент;
гибридизация – образование комплекса праймера и матрицы:
возможна при разделении нитей ДНК



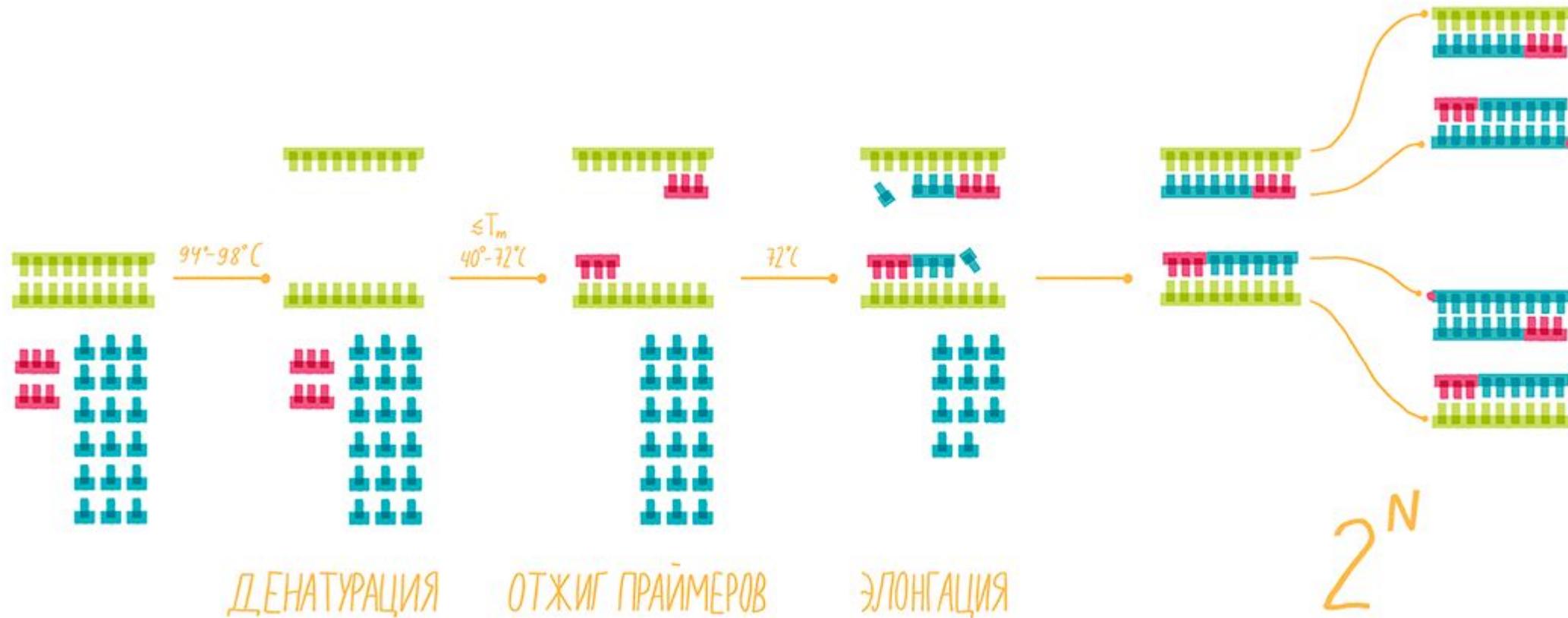
Фермент ПЦР –Taq полимераза (выделена из бактерии *Thermus aquaticus*) термостабильна - может выдерживать длительное нагревание при 95⁰С и многократную смену температуры с сохранением активности

Удлинение цепей ДНК-полимеразой



**Продукт ПЦР – двухцепочечный специфический
фрагмент ДНК (ампликон)**

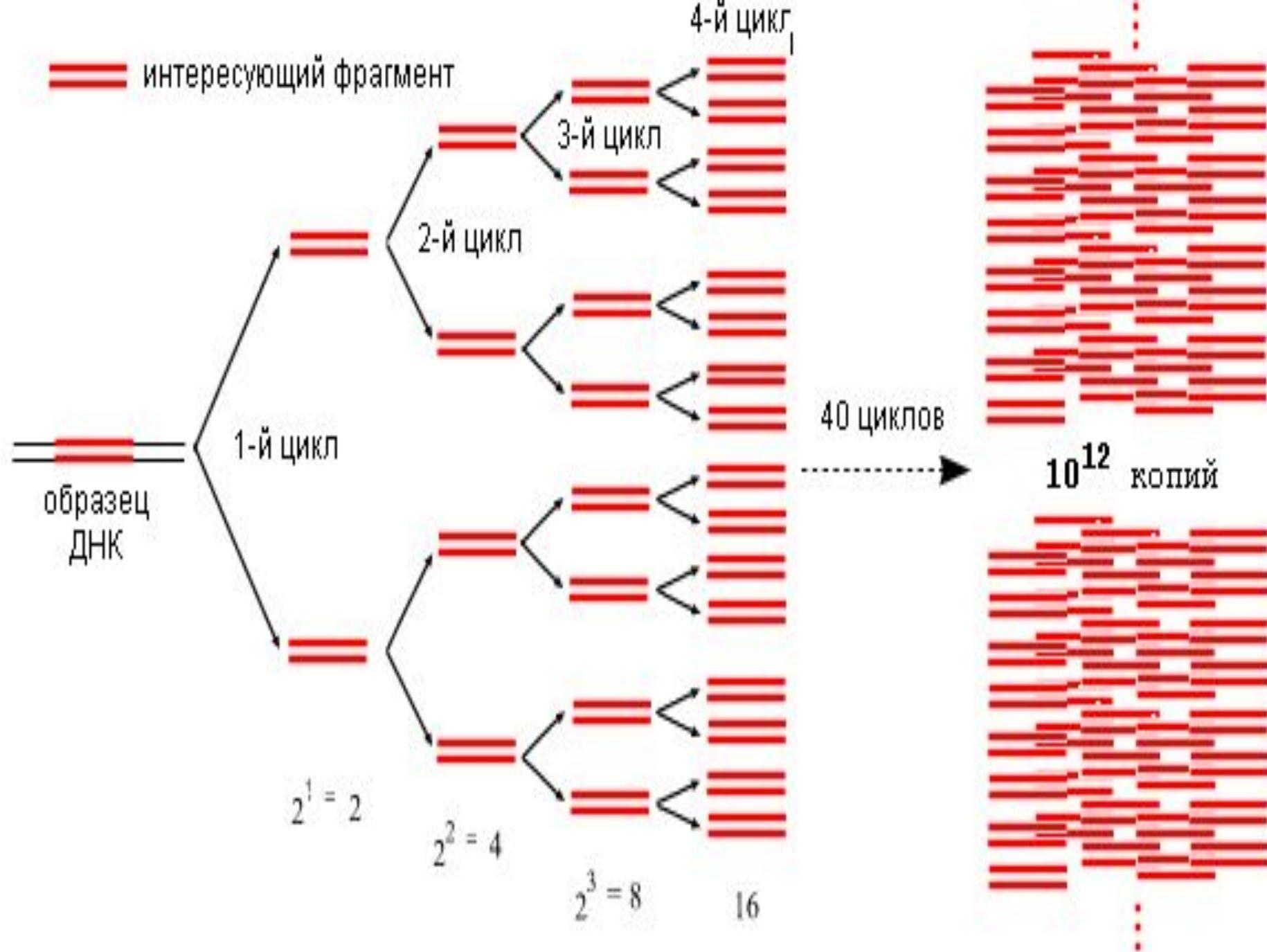
Стандартный температурный режим одного



денатурация
(плавление
двухцепочечной
ДНК-
матрицы)
10 сек – 2 мин

**отжиг (гибридизация
праймера и
одноцепочечной
матрицы)**
10-40 сек

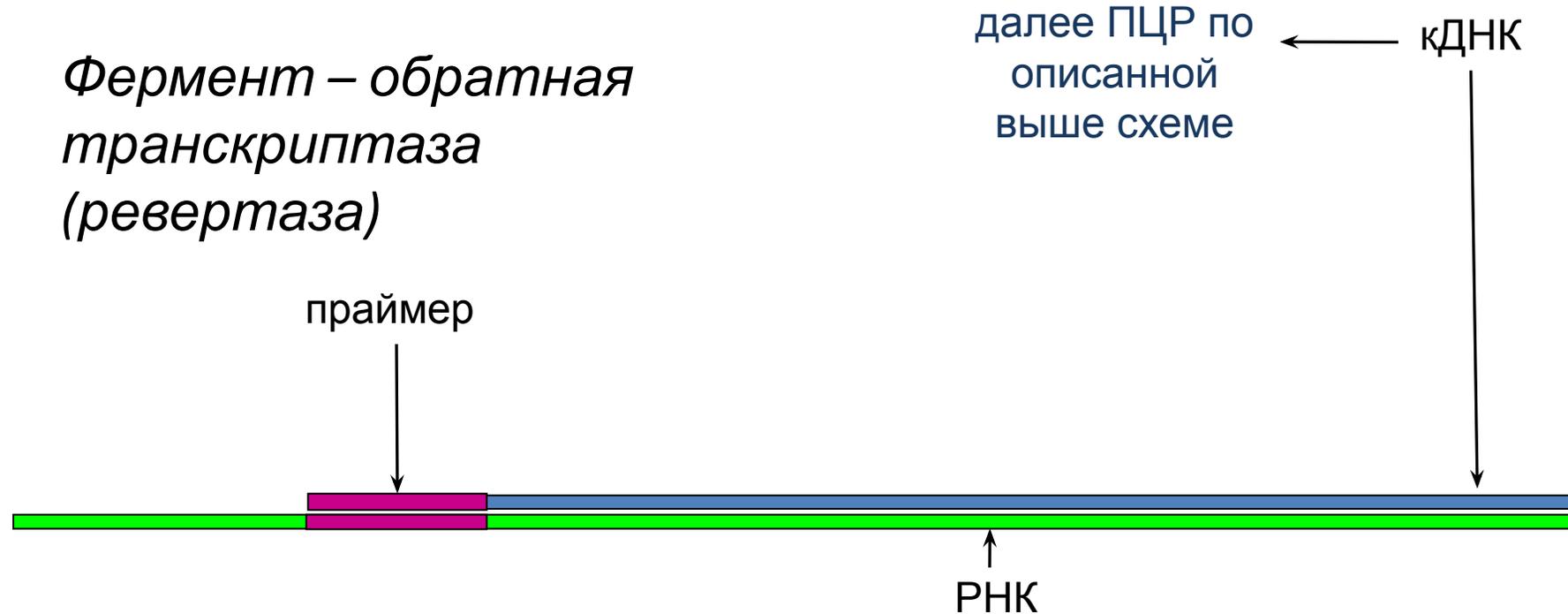
элонгация (удлинение праймера
на матрице полимеразой и
образование новой копии
двухцепочечной ДНК)
15 сек – 2 мин



Обратная транскрипция и ПЦР

РНК не может быть матрицей для ПЦР!

Дополнительная стадия для РНК-содержащих возбудителей



ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с предшествующей ей стадией обратной транскрипции

Детекция результатов

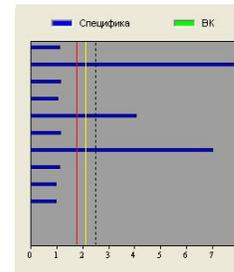
*По конечной точке
(после окончания реакции)*

*В реальном
времени
(после каждого
цикла)*

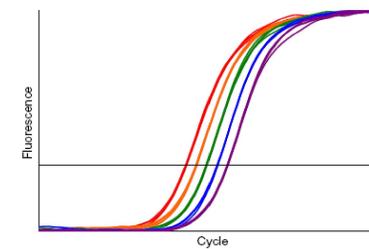
Электрофорез



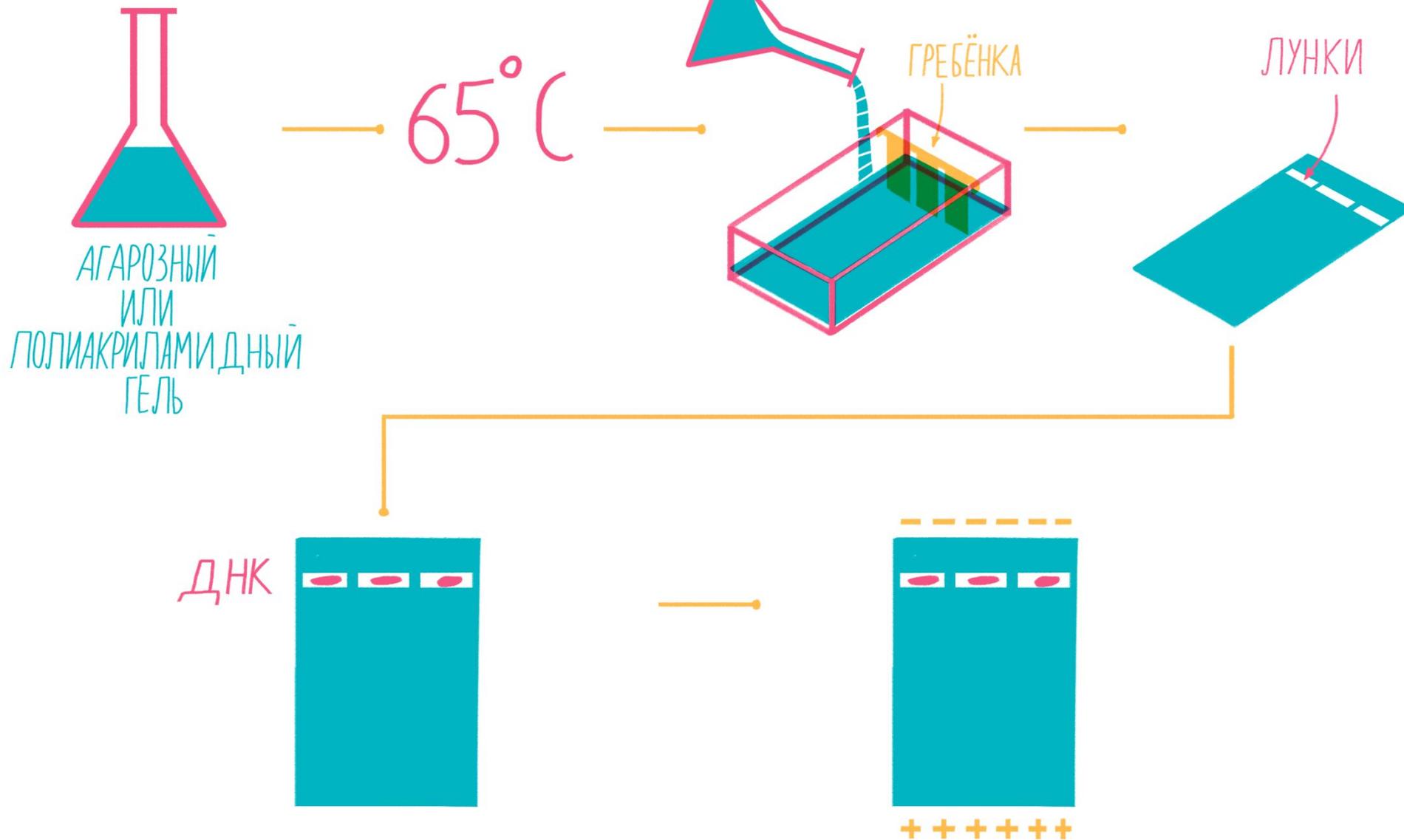
FLASH



Реал-



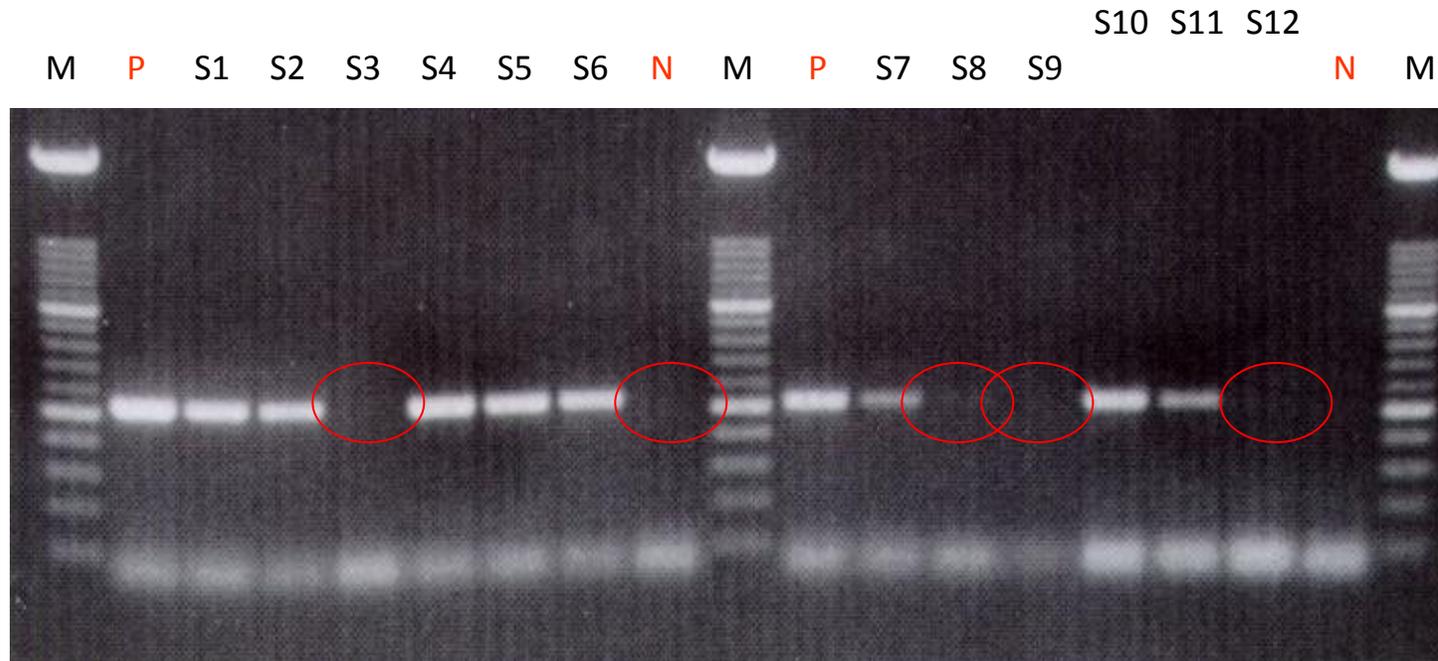
Детекция электрофорезом



Детекция

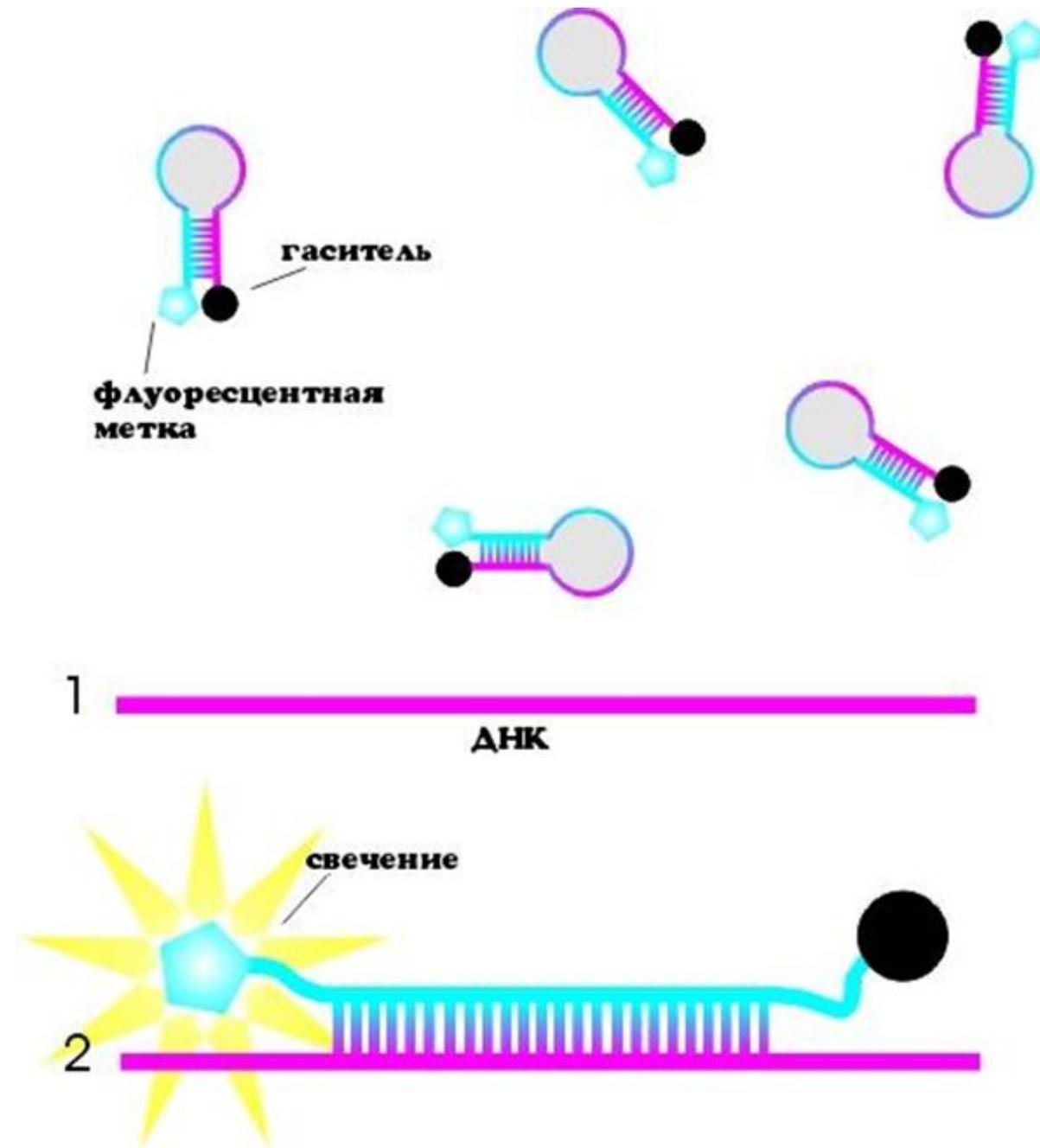
электрофорезом

Разделение фрагментов ДНК (ампликонов) в геле в соответствии с их зарядом и линейными размерами



В **флуоресцентных методах детекции** используют **интеркалирующие красители** либо **флуорофоры** в составе **ДНК-зондов**. Интеркалирующие красители – молекулы, способные **обратно встраиваться** между двумя **комплементарными парами нуклеотидов** в **двухспиральной ДНК**.

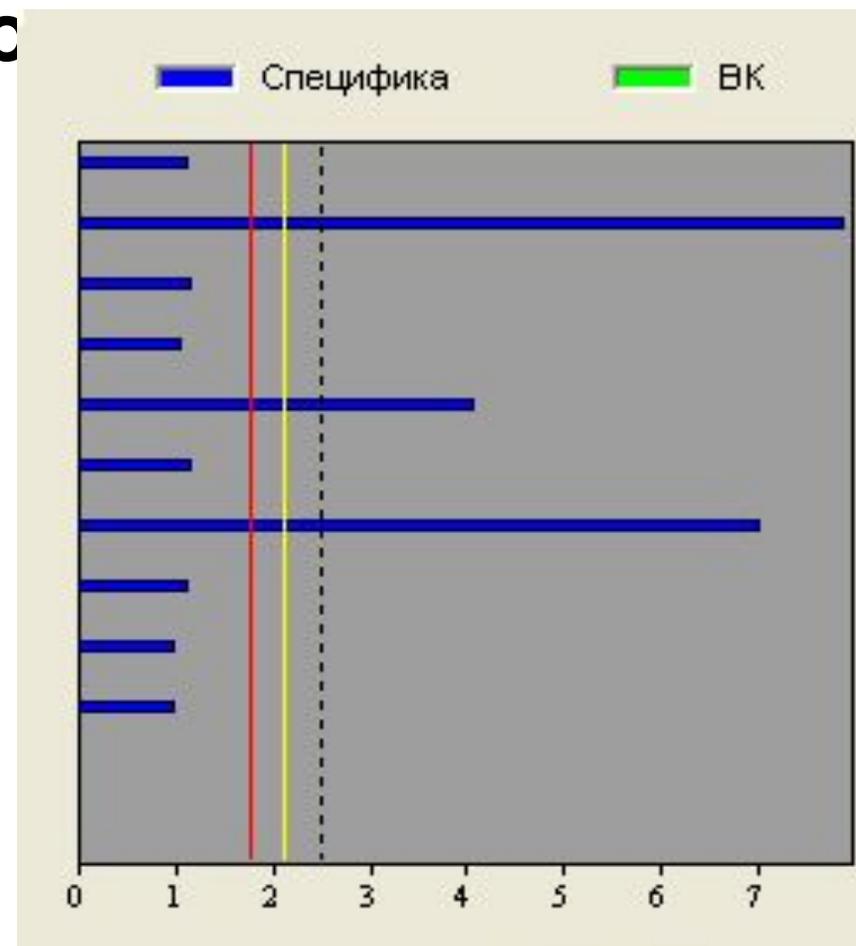
Детекция осуществляется специальными приборами после амплификации (ПЦР с анализом результатов **по конечной точке**) либо в процессе амплификации (ПЦР в **режиме реального времени**).



Детекция в формате FLASH

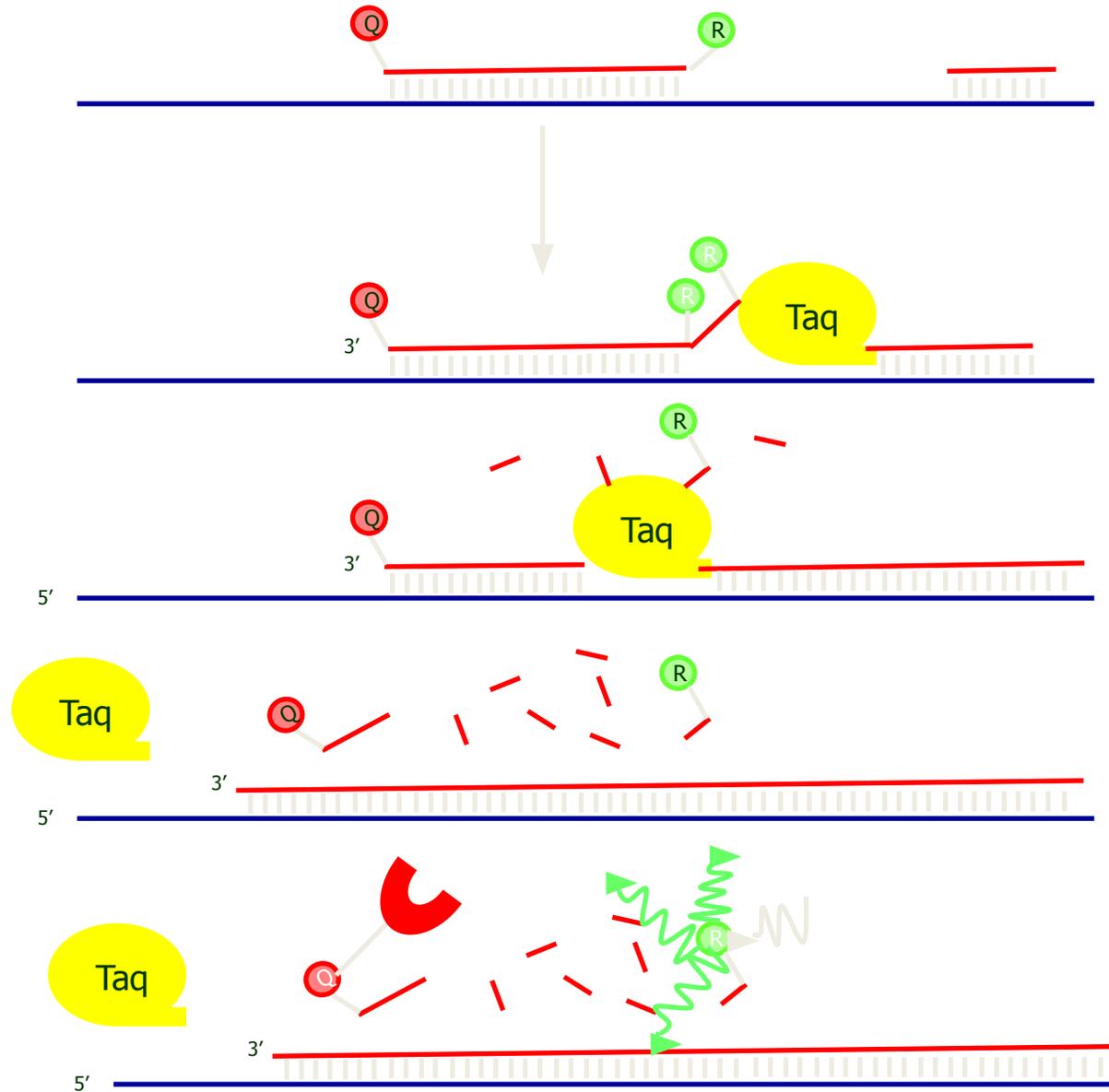
- Вариант детекции «по конечной точке»
- Аналитический сигнал – прирост флуоресценции после окс

Пробирка	Образец	Результат	Специфика	ВК
1/108		-	1,16	
2/108		+	7,90	
3/108		-	1,17	
4/108		-	1,09	
5/108		+	4,10	
6/108		-	1,19	
7/108		+	7,05	
8/108		-	1,16	
19/фон(ralstonia)	фон	фон	1,00	
20/фон(ralstonia)	фон	фон	1,00	



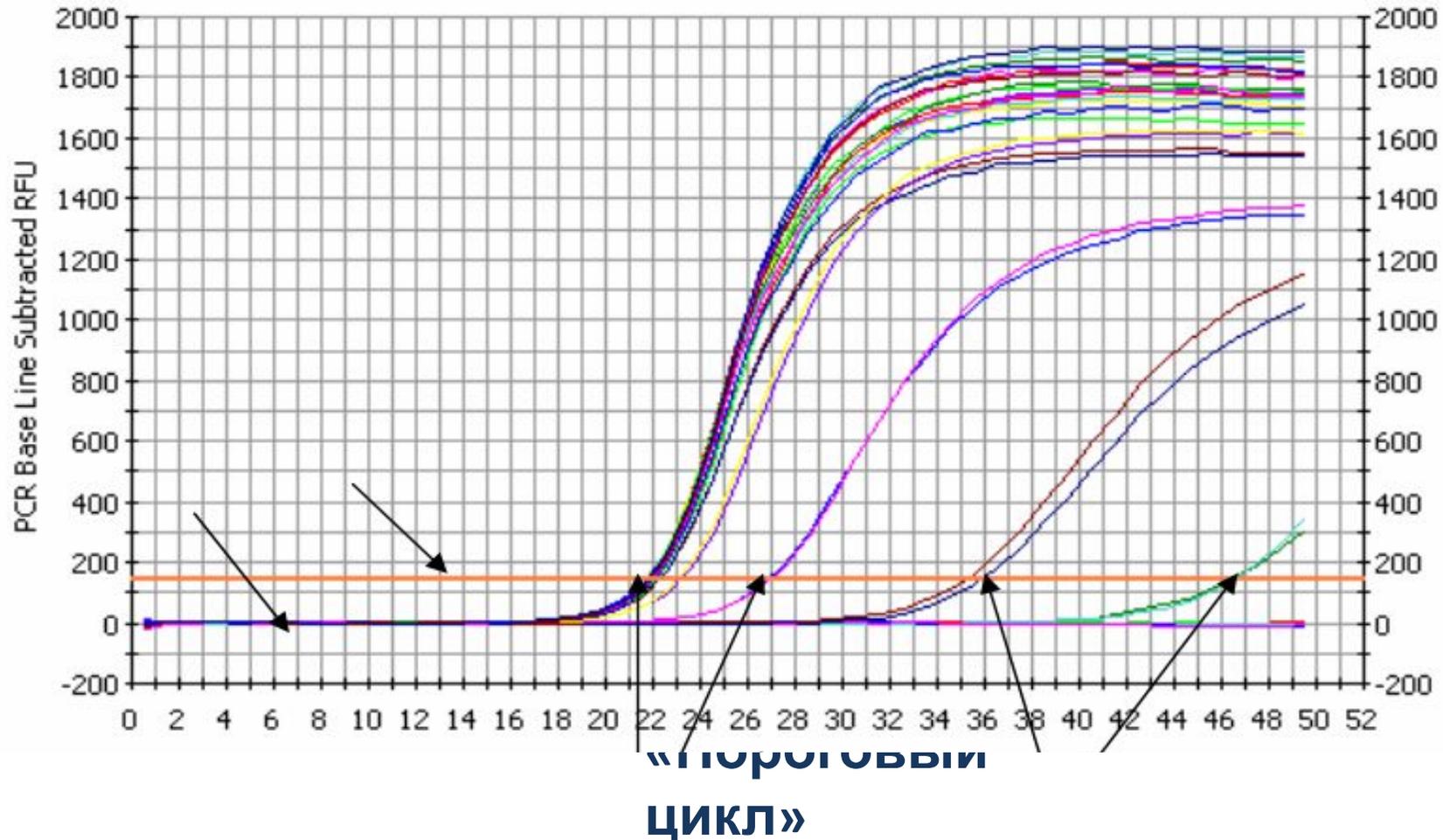
Детекция продуктов ПЦР в режиме реального времени

Технология TaqMan

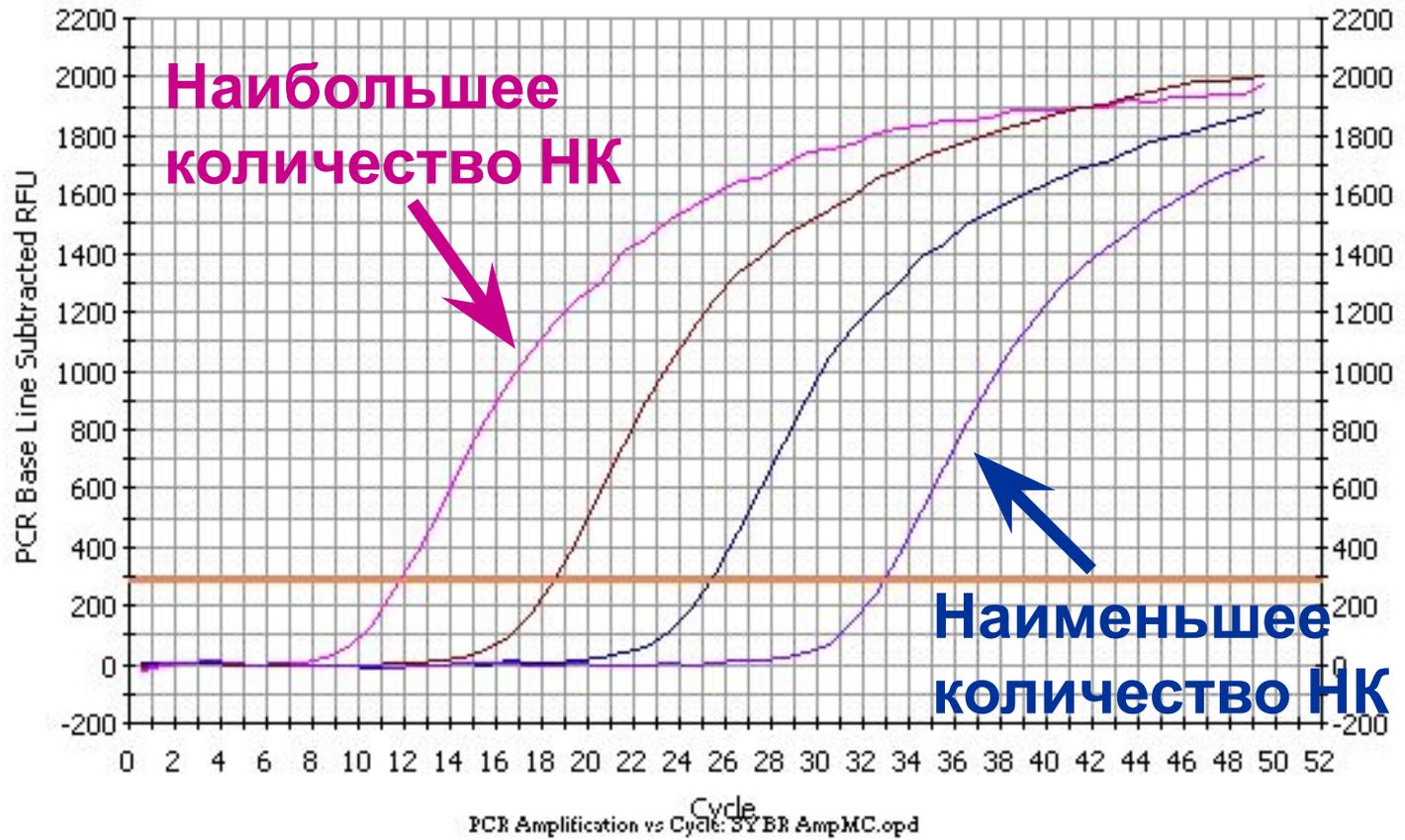


«Пороговый цикл» Ct

Результаты анализа интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) **пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией**, что определяет наличие (или отсутствие) значения **порогового цикла Ct**, на котором происходит это пересечение.



Чем больше значение C_t , тем меньше концентрация исходной НК



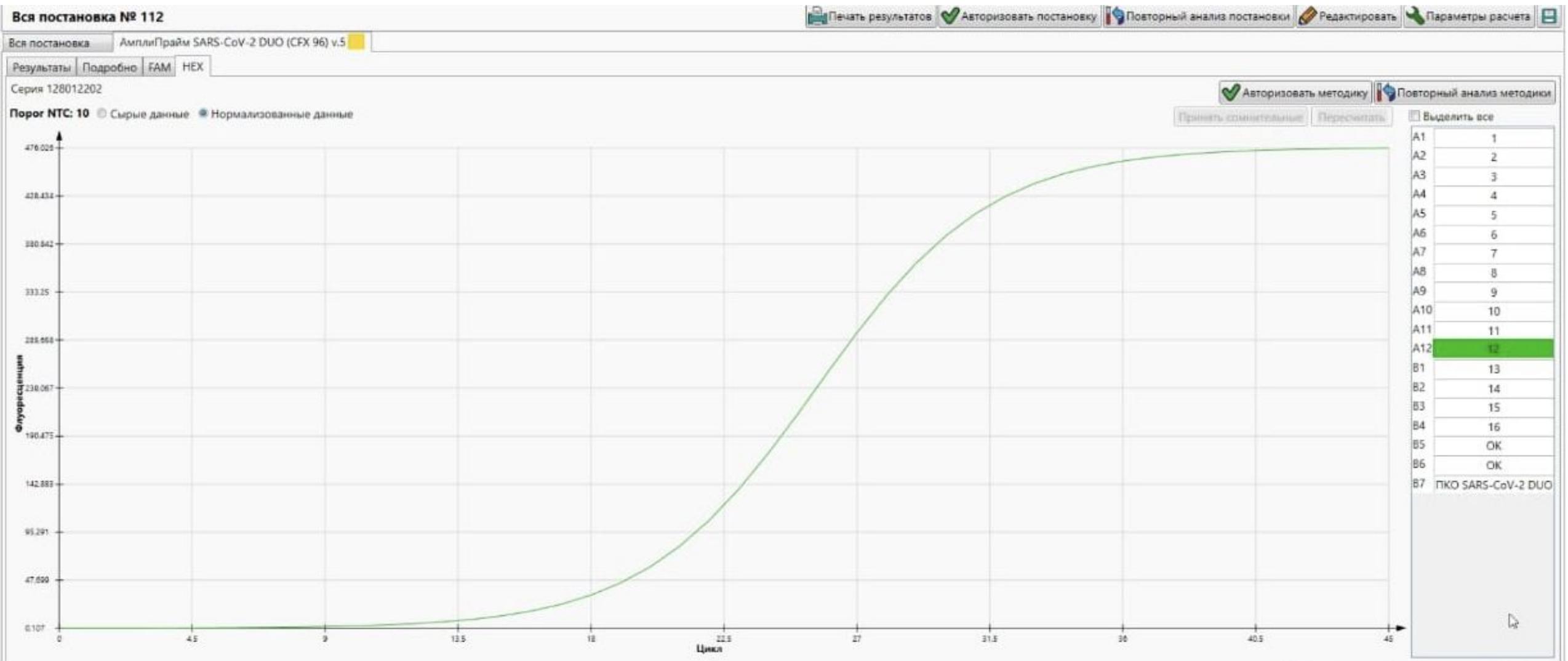
Анализируемый образец считается **положительным** т.е. содержащим, например, РНК SARS-Cov-2, если для этого образца значение порогового цикла меньше или равно 40.

Анализируемый образец считается **отрицательным** т.е. не содержащим, например, РНК SARS-Cov-2, если для этого образца значение порогового цикла больше 40 или не определяется.

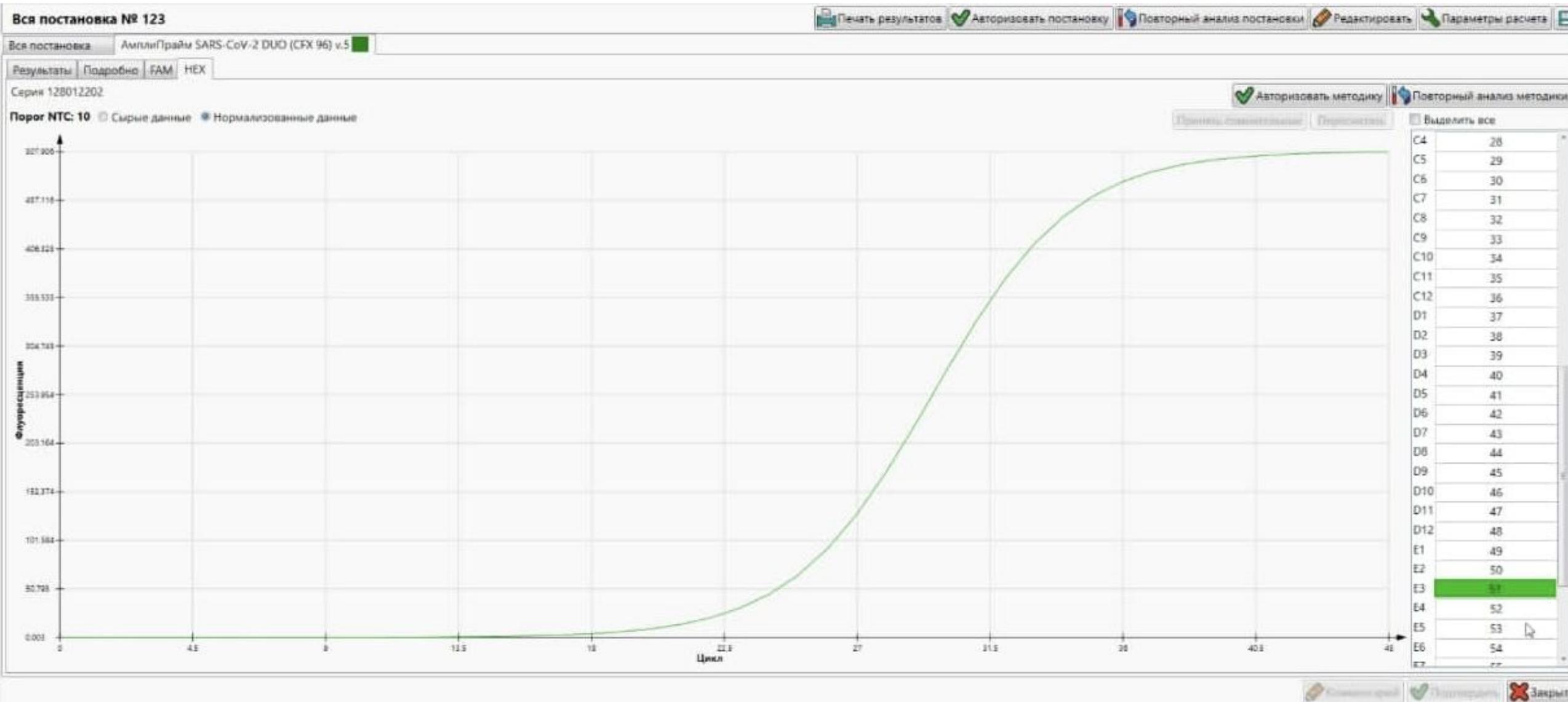
Низкое значение порогового цикла указывает на высокий уровень вируса, которому сопутствует более высокая инфекционность.

Высокое значение порогового цикла указывает на низкий уровень вируса в исследуемом материале, что может свидетельствовать о следующем:

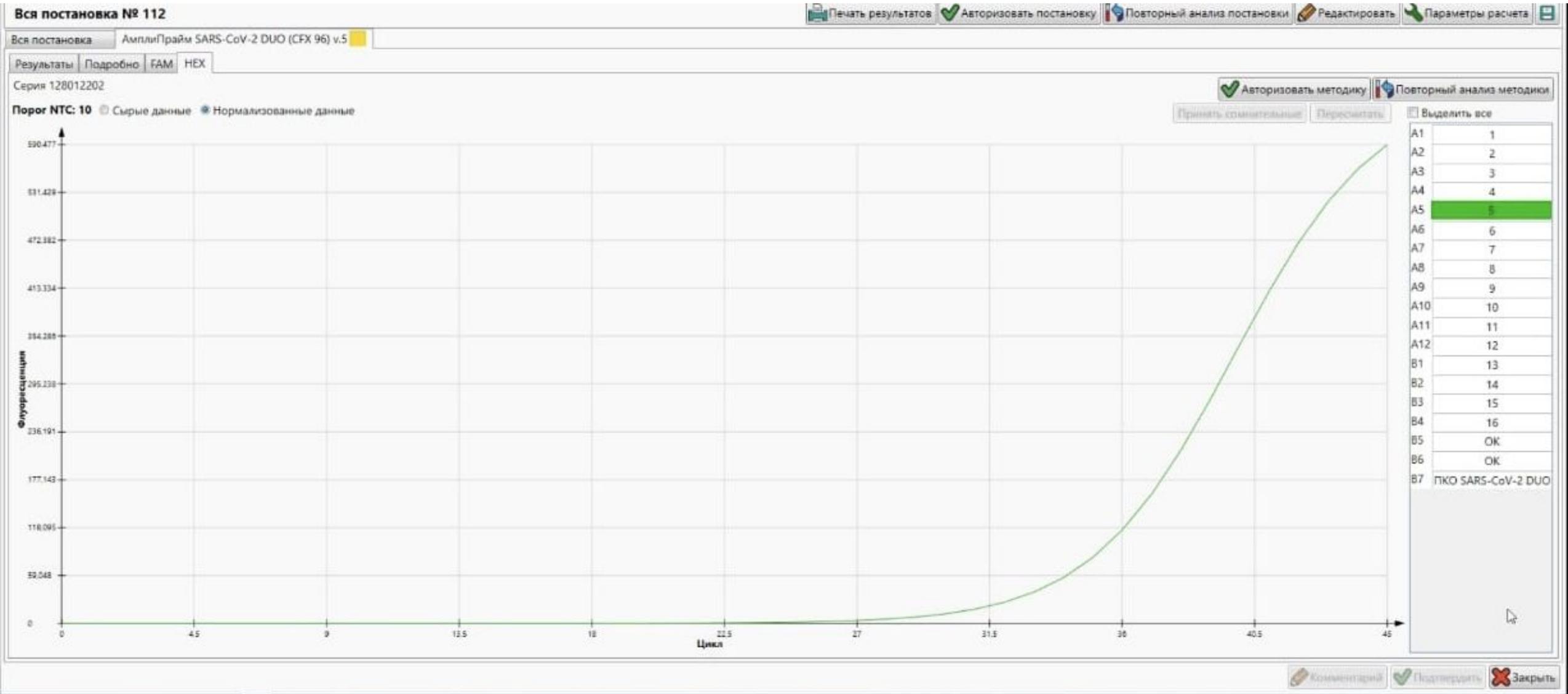
- начало инфекционной фазы, когда количество вируса ещё чётко не определяется и человек потенциально уже может заразить окружающих;
- фаза выздоровления (завершения инфекции), если человек до недавнего времени был инфицирован, но на текущий момент риск заражения окружающих уже может быть сниженным.



Полимеразная цепная реакция. Определение РНК SARS-CoV-2



Полимеразная цепная реакция. Определение РНК SARS-CoV-2



Полимеразная цепная реакция. Определение РНК SARS-CoV-2

АМПЛИФИКАТОРЫ



Cobas TaqMan



ДТ-96



iQ 5



CFX 96



Stratagene Mx3005P



SmartCycler II



Rotorgene 6000



One Step Plus



АHK-3
2

АВТОМАТИЧЕСКАЯ СТАНЦИЯ Tecan Freedom EVO



TECAN Freedom EVO 150, 8 каналов дозирования

Протокол. Метод иммуноферментного анализа

Дата	Исследуемый материал	Что сделать	Результат
	Исследуемые сыворотки С1-Н1	Поставить ИФА для определения HBs-антигена вируса гепатита В, учесть и интерпретировать результаты реакции	Заключение: _____ _____ _____ _____

Результат ИФА

Лунка	Цвет	Результат ОП	Интерпретация
A1	○		
B1	○		
C1	○		
D1	○		
E1	○		
F1	○		
G1	○		
H1	○		

ОПкрит = ОП К⁻ + 0,04

ОПкрит =

**Результат
положительный: ОПобр
≥ ОПкрит**

**Результат
отрицательный:
ОПобр < ОПкрит**

Протокол (продолжение). Иммунохроматографический анализ. Полимеразная цепная реакция

Дата	Исследуемый материал	Что сделать	Результат
	Мазок со слизистой ротоглотки	Оценить результат ИХА для выявления специфического антигена стрептококков группы А	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>« »</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>« »</p> </div> </div> <p>Заключение: _____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>
	Мазок из носа, мазок со слизистой ротоглотки	Оценить результат ПЦР для выявления РНК вируса SARS-CoV-2, определить пороговый цикл (Ct), зарисовать, дать заключение	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> <p>ОЕФ</p>  </div> <div style="margin-right: 20px;"> <p>Ct =</p> </div> <div>  </div> </div> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>