ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

В. Д. САМУИЛОВ

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

ENZYME IMMUNOASSAY

V. D. SAMUILOV

Any substance possessing the properties of antigens – immunogenic or non-immunogenic (haptens) – can be quantitatively measured with the help of enzyme immunoassay (EIA). The EIA requires purified antigen, the specific antibody, an enzyme which serves as a label for the antigen or for the antibody and a tool for enzyme activity determination. High sensitivity, rapidity and reliability are characteristic of the EIA.

Любое вещество, обладающее свойствами антигена, полноценного или неполноценного (гаптена), можно количественно определить с применением иммуноферментного анализа (ИФА). Для проведения ИФА необходимо иметь очищенный антиген, специфическое антитело, фермент в качестве метки для антигена или антитела и средство для регистрации активности фермента. ИФА – это высокая чувствительность, быстрота и надежность.

ВВЕДЕНИЕ

Возможно ли количественное определение того или иного компонента в сыворотке крови, растительном соке, культуральной жидкости от микроорганизмов, клеточном гомогенате, вытяжке из образца почвы, содержащих сотни и тысячи различных компонентов? Возможно, но при одном условии: анализируемый компонент должен обладать свойствами антигена, то есть способностью вызывать в организме человека или животных синтез особых белков – антител, с высокой специфичностью связывающих антиген. Решение таких задач – сфера иммуноферментного анализа (ИФА). Однако предварительно необходимо получить очищенный антиген, соответствующее антитело и подобрать фермент в качестве метки для антитела или антигена.

И тогда можно провести иммунохимические реакции:

$$aAг + bAт^* \longrightarrow a(Ag–Ат^*) + (b – a)Ат^* \qquad (1)$$

или

$$aAг^* + bAт + cAг \longrightarrow \qquad (2)$$

$$\longrightarrow d(Ag^*–Ат) + e(Ag–Ат) + (a – d)Ag^* + (c – e)Ag$$

В первом варианте (уравнение (1)) из антигена Аг, находящегося в тестируемом образце, и меченого антитела Ат*, добавленного в концентрации, превышающей концентрацию Аг, образуется комплекс Аг–Ат*. Количественный анализ реакции (1) может быть проведен по образованию комплекса Аг–Ат*, детектируемого с помощью ферментной метки, или по Ат*, оставшемуся в свободном состоянии. Это неконкурентный вариант ИФА. Во втором варианте (уравнение (2)) лимитирующим субстратом является антитело Ат. Меченый антиген Аг*, будучи добавленным в анализируемый образец в известной концентрации, связывается с антителом, образуя комплекс Аг*–Ат. В этой реакции Аг* будет конкурировать с немеченым антигеном Аг, содержащимся в образце. Концентрация Аг*–Ат будет обратно пропорциональна концентрации Аг. Таким способом по заранее известной концентрации Аг* можно определить неизвестную концентрацию Аг. Это конкурентный вариант ИФА. В обоих вариантах ИФА надо решить важную задачу – разделить связанную фракцию меченого реагента (Аг–Ат* или Аг*–Ат) от несвязавшегося, свободного реагента

© Самуилов В.Д., 1999

(Ат* или Аг*), чтобы определить долю специфического связывания.

Наборы иммунохимических реагентов для определения антигенов называются диагностикумами. Для их создания необходимо решить задачи получения антигена, антитела, комплекса антигена или антитела с ферментом, наладить регистрацию иммунохимической реакции по активности фермента, использованного в качестве метки. Наряду с ферментами в качестве меток для антигенов используют радиоактивные и флуоресцирующие соединения: соответственно радиоиммунный и флуоресцентно-иммунный анализ (РИА и ФИА). Предпочтением пользуется ИФА, поскольку он не требует сложной измерительной аппаратуры и применения радиоактивных соединений, а поэтому безопасен, пригоден в полевых условиях.

Иммунохимический анализ не ограничивается ИФА, РИА и ФИА, основанными на прямом взаимодействии антигена с антителом. Имеются методы обнаружения и количественного определения антигенов по изменению их физического состояния при взаимодействии с антителами. Так, если антиген расположен на поверхности бактериальных клеток, антитела вызывают их слипание (агглютинацию). На таком принципе основано определение групп крови: склеивание эритроцитов при взаимодействии поверхностных антигенов с добавленными антителами (гемагглютинация). Антитела, добавленные в определенном соотношении к раствору макромолекулярных антигенов, вызывают их преципитацию – образование крупных, визуально обнаруживаемых агрегатов из молекул антигена, связанных антителами. Существуют методы, основанные на реакции преципитации в гелях: при образовании иммунных комплексов Аг–Ат в геле возникают линии преципитации, по форме этих линий можно судить о числе и иммунологическом родстве антигенов. Для идентификации белков широко применяется иммуноблоттинг: вначале смесь белков разделяют с помощью электрофореза в геле, затем на гель накладывают нитроцеллюлозную мембрану и на нее электрофоретически переносят (подвергают электроблоттингу) разделенные белки, которые идентифицируют посредством меченых антител. Меченые антитела широко используют в исследовании локализации компонентов клеток и тканей – это методы иммуноцито- и иммуногистохимии. Клетки, меченные флуоресцирующими антителами, можно отделить от немеченых клеток – метод проточной цитофлуориметрии. Хроматографические колонки с сорбентом, с которым ковалентно связан антиген (или антитело), используются в аффинной хроматографии – отделении соответствующего антитела (или антигена) из смесей в результате образования иммунных комплексов (см. раздел “Антитело”). Еще одно применение иммунохимического анализа – иммуносенсоры: пьезокристалл, покрытый антигеном (антителом), в результате связывания антител (антигена) увеличивает свою массу и меняет частоту резонансных колебаний в переменном электрическом поле, что позволяет регистрировать изменение массы пьезоэлектрика порядка 10^{-12} г.

Таким образом, ИФА – это лишь один из способов определения антигенов, получивший широкое практическое распространение благодаря возможности количественных определений, высокой чувствительности и коммерческой доступности. В научно-исследовательской работе эти возможности иммунохимических методов всегда используются вместе с ИФА и даже с применением одних и тех же реагентов. Рассмотрение всей совокупности этих методов физически невозможно в рамках одной статьи. Поэтому настоящая работа ограничивается ИФА.

АНТИГЕН

В качестве антигена могут быть клетки микроорганизмов, вирусы, белки и полисахариды. Это полноценные антигены. Антитела образуются не против всей молекулы белка или бактериальной клетки, а только к небольшим участкам на их поверхности – антигенным детерминантам (эпитопам). Такие участки у белков включают не менее пяти аминокислотных остатков. Антигенные детерминанты разветвленных молекул полисахаридов представлены цепочками из четырех–шести остатков.

Существуют также неполноценные антигены – гаптены. Антитела к гаптенам образуются лишь при их посадке на полимерную матрицу, в качестве которой используются белки, полимеры клеточных стенок бактерий, синтетические полиэлектролиты. Таким способом можно получить антитела к антибиотикам и другим лекарственным соединениям, стероидным и пептидным гормонам, витаминам, пестицидам и даже к такому простому соединению, как 2,4-динитрофенол. Гаптены представлены не только низкомолекулярными соединениями. Так, нуклеиновые кислоты сами по себе неиммуногенны. Однако антитела к нуклеиновым кислотам синтезируются, если они находятся в комплексе с белками. Антигенные детерминанты нуклеиновых кислот – три- и тетрануклеотиды.

Зачастую выделить и очистить антиген, например вирусный белок, бывает затруднительно. Ведь его надо иметь в ощутимых количествах, если речь идет о создании диагностикума. В таких случаях для синтеза антигена используют генноинженерные (трансгенные) бактерии или дрожжи.

АНТИТЕЛО

Антитела получают путем иммунизации животных соответствующим антигеном: в лабораторных условиях это мыши, морские свинки, кролики, на производстве овцы, козы, лошади. Пригодны куры: антитела после иммунизации выделяют из желтков яиц.

Иммунный ответ (см. [1, 2]) на введение одного антигена сопровождается синтезом антител, различающихся по структуре и функциональному предназначению (иммунная система организма эшелонирована: существует несколько линий защиты от внедрения антигена). Это иммуноглобулины (Ig) классов G, D, E, A, M, из которых первые три могут связать по две молекулы антигена, то есть двухвалентны, IgA четырех- или восьмивалентны, IgM десятивалентны. С учетом того, что антиген, используемый для иммунизации животного, содержит не одну, а несколько антигенных детерминант, можно представить, какое множество антител вырабатывается в организме на введение одного антигена. Такие антитела называются поликлональными. Они гетерогенны по сродству к антигенам. Их состав непостоянен и зависит от вида животного, его генетических особенностей и физиологического состояния.

Для очистки и стандартизации поликлональных антител используется аффинная хроматография. Сыворотка крови от иммунизированного животного пропускается через колонку с полисахаридными шариками, к которым ковалентно пришит антиген. Специфические антитела связываются антигеном, все другие белки, и в том числе антитела с низким сродством к антигену, проваливаются через колонку, вслед за этим специфически связанные антитела смывают с колонки кислым или щелочным раствором: связь антигена с антителом нековалентна. Один цикл аффинной хроматографии позволяет очистить белки в 1000 раз и более.

Однако даже такой способ очистки не позволяет полностью избавиться от гетерогенности препарата антител. Выход из этого затруднения – в получении антител с одной специфичностью, реагирующих с единственной антигенной детерминантой. Такие антитела называются моноклональными (см. [3]). Их получают методами клеточной инженерии путем гибридизации иммунокомпетентных В-лимфоцитов и клеток миеломных опухолей, способных к быстрому размножению, неограниченному числом делений (в отличие от большинства неопухолевых клеток, у которых число делений ограничено). Препараты моноклональных антител характеризуются постоянством состава и физико-химических свойств, низкой вероятностью перекрестной реакции с “чужими” антигенами. Это высокотехнологичный продукт. Его недостаток – зачастую сравнительно низкое сродство к субстрату, низкая аффинность.

ФЕРМЕНТЫ КАК МЕТКИ В ИФА

Необходимо подобрать такой фермент, который длительно сохраняет свою активность, не теряет ее при операции связывания с антигеном или антителом, обладает высокой специфичностью к субстрату. Широко используются пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и β-галактозидаза *Escherichia coli*. Перспективны люциферазы светлячков и светящихся бактерий. Активность ферментов детектируют по изменению оптической плотности, флуориметрически и электрохимически. Люциферазные реакции сопровождаются высвечиванием фотонов, поэтому их регистрируют по биолюминесценции. Несколько примеров.

Пероксидаза катализирует реакцию

$$AH_2 + H_2O_2 \longrightarrow A + 2H_2O$$

В качестве AH_2 могут быть разные соединения. Так, восстановленный бесцветный *о*-фенилендиамин в пероксидазной реакции превращается в окисленную окрашенную форму с максимумом оптического поглощения при 435 нм, регистрируемую фотометрически.

Щелочная фосфатаза катализирует гидролиз фосфорных эфиров: 4-нитрофенилфосфат превращается в 4-нитрофенол, регистрируемый по оптической плотности при 405 нм; 4-метилумбеллиферилфосфат превращается в 4-метилумбеллиферон, флуоресцирующий с высоким квантовым выходом при 450 нм (флуоресценцию возбуждают при 365 нм).

β-Галактозидаза катализирует гидролиз лактозы с образованием глюкозы и галактозы. Если вместо природного субстрата взять 4-метилумбеллиферил-β-D-галактозид, при гидролизе образуются галактоза и 4-метилумбеллиферон, регистрируемый флуориметрически.

В люциферазных реакциях детектируют биолюминесценцию:

$$\text{АТФ} + \text{люциферин} + O_2 \xrightarrow{\text{Люцифераза светлячков}} \longrightarrow \text{АМФ} + \Phi_н + \text{оксилюциферин} + h\nu_{560\ нм},$$

$$\text{ФМНН}_2 + O_2 + \text{R–CHO} \xrightarrow{\text{Бактериальная люцифераза}} \longrightarrow \text{ФМН} + \text{R–COOH} + H_2O + h\nu_{490\ нм},$$

где АТФ – аденозинтрифосфат, АМФ – аденозинмонофосфат, $\Phi_н$ – ортофосфат, ФМН и ФМНН_2 – окисленный и восстановленный флавинмононуклеотид, R–CHO и R–COOH – жирный альдегид и соответствующая кислота.

СВЯЗЫВАНИЕ ФЕРМЕНТНОЙ МЕТКИ

Как связать фермент с антителом или антигеном без потери активности фермента и нарушения свойств антитела и антигена? Для этого существуют три группы методов: биохимические, иммунологические и генноинженерные.

В биохимических методах используется сшивка фермента Е с антителом или антигеном при участии свободных реакционноспособных групп: $-NH_2$, $-COOH$, $-SH$, $-OH$. Например,

$$E–NH_2 + HOOC–Ar \longrightarrow E–NH–CO–Ar + H_2O$$

Если прямое взаимодействие реализовать не удается, в ход идут бифункциональные сшивающие агенты: глутаровый диальдегид, *n*-бензохинон. Функциональные группы реагентов могут быть активированы. Так, гидроксигруппы в углеводном компоненте пероксидазы хрена можно окислить с помощью периодата натрия до альдегидных, через которые затем пришиваются антиген или антитело при участии аминогрупп с образованием основания Шиффа:

$$E{-}CHO + H_2N{-}Ar \xrightarrow{-H_2O} E{-}CH{=}N{-}Ar \xrightarrow{+H^+}$$

$$\longrightarrow E{-}CH{=}N^+H{-}Ar$$

Витамин биотин исключительно прочно связывается с яичным белком авидином – ингибитором биотинсодержащих ферментов: константа связывания в реакции авидин (А) + биотин (Б) ⟶ комплекс АБ, определяемая из уравнения $K_f = [АБ]/[А] \cdot [Б]$, составляет ~10^{15} M^{-1}. Если приготовить комплексы Аг-биотин и авидин-Е и затем смешать их, то образуется комплекс Аг-биотин-авидин-Е.

Иммунологические методы получения антигенов или антител, меченных ферментами, основаны на применении антител или их составляющих в качестве сшивающих звеньев. Антитела всех пяти классов построены по единому плану. На рис. 1 показаны иммуноглобулины класса G. Антитело построено из четырех полипептидных цепей: двух тяжелых (H от англ. heavy – тяжелый) и двух легких (L от light – легкий) с молекулярными массами соответственно 50 и 25 кДа. Тяжелые цепи связаны друг с другом двумя дисульфидными связями через остатки цистеина. Легкие цепи образуют с тяжелыми по одной дисульфидной связи. Обе цепи состоят из доменов, по ~110 аминокислотных остатков в каждом: в тяжелой цепи – четыре, в легкой – два домена. N-концевые домены H- и L-цепей, обозначаемые V_H и V_L (V от variable – вариабельный), определяют специфичность антител, их первичная структура вариабельна. Остальные домены характеризуются постоянством структуры и обозначаются C_H1, C_H2, C_H3 и C_L (C от constant – константный). По форме молекула антитела напоминает букву Y, ножка которой связана с отростками шарнирным участком.

В исследовании структуры антител применяются протеолитические ферменты. Папаин расщепляет молекулу на три фрагмента. Два из них идентичны, одновалентны в реакции связывания антигена и названы Fab-фрагментами (Fab от Fragment antigen binding – фрагмент, связывающий антиген). Третий фрагмент не связывает антиген, легко кристаллизуется и поэтому назван Fc-фрагментом (Fc от Fragment crystallizable – кристаллизуемый фрагмент). Пепсин расщепляет молекулу антитела по-другому. При этом образуются двухвалентный $F(ab')_2$-фрагмент и несколько осколков Fc-фрагмента, из которых наиболее крупный назван pFc'-фрагментом.

Метод гибридных антител для сшивки антигена с ферментом включает несколько этапов (рис. 2): получение $F(ab')_2$-фрагментов к антигену и ферменту путем обработки соответствующих антител пепсином, их разъединение путем восстановления дисульфидных связей меркаптоэтанолом, смешивание полученных Fab-фрагментов, удаление меркаптоэтанола диализом, ведущее к реассоциации с образованием гибридных $F(ab')_2$-фрагментов, связывающих антиген и фермент в единый комплекс.

Fc-фрагменты антител образуют прочный комплекс с белком А стафилококка. При наличии антител к ферменту и конъюгата белок А-антиген можно получить комплекс Е-Ат–белок А-Аг.

Генноинженерный метод получения меченого антигена основан на синтезе гибридных белков с помощью микроорганизмов. Таким методом, используя трансгенную *E. coli*, в лаборатории Е.С. Северина получены гибридные белки, содержащие полную аминокислотную последовательность бактериальной β-галактозидазы и специфическую последовательность белка от вируса иммунодефицита человека или вируса гепатита В.

Сохранение нативной структуры и функции сшиваемых реагентов зависит от их индивидуальных особенностей, поэтому здесь не может быть применен какой-либо стандартный прием. Конкретный метод сшивки подбирается в индивидуальном порядке.

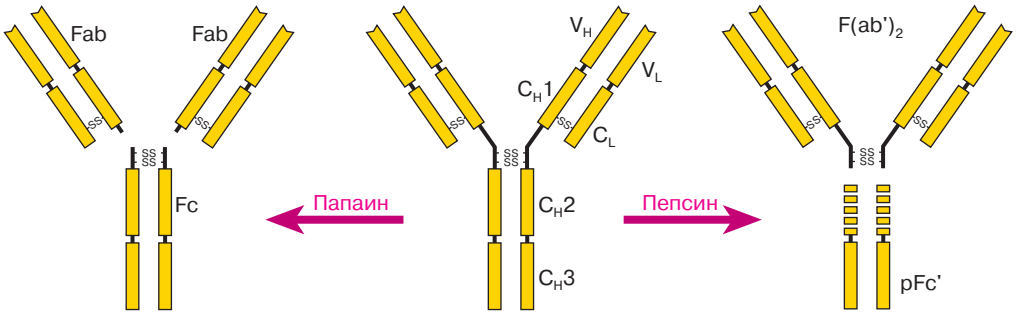

Рис. 1. Антитело класса G: действие папаина и пепсина

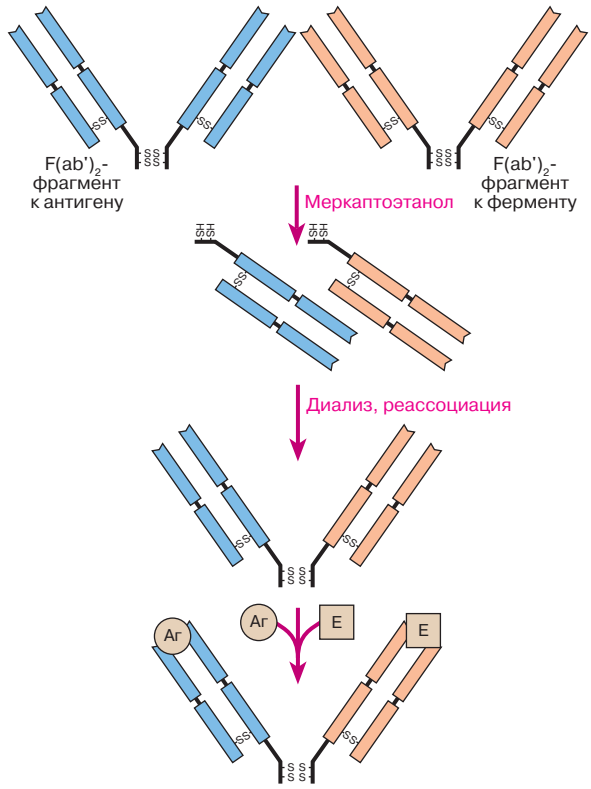

Рис. 2. Получение комплекса антигена Аг и фермента Е методом гибридных антител

РАЗДЕЛЕНИЕ СВОБОДНОГО И СВЯЗАННОГО РЕАГЕНТА, МЕЧЕННОГО ФЕРМЕНТОМ

Количественный анализ иммунохимических реакций (см. уравнения (1) и (2)) может быть проведен по продуктам (Аг–Ат* и Аг*–Ат) или по субстратам реакций, оставшимся в свободном состоянии (Ат* и Аг*). Для этого используют два основных подхода.

Первый подход – направленное воздействие на ферментативную активность комплекса Аг–Е посредством связанного Ат, ведущее к торможению или, напротив, к возрастанию скорости ферментативной реакции (см. раздел "Гомогенный ИФА"). Такой ИФА может быть реализован в однофазной системе – в растворе и поэтому называется гомогенным или жидкофазным. Это ИФА без предварительного физического разделения меченых лигандов (Ат* или Аг*) от их иммунохимических комплексов – продуктов реакций (1) и (2).

Второй подход – физическое разделение с помощью твердой фазы, связывающей меченый реагент. Это гетерогенный или твердофазный ИФА. В качестве твердой фазы используются стенки сосудов, в которых проводится анализ. Эти сосуды изготавливаются в виде специальных планшетов из непористых прозрачных полимерных материалов: полистирола, поливинилхлорида, полиметакрилата. Белки (антигены или антитела) адсорбируются на поверхности пластика – и в этом основа твердофазного ИФА. Для увеличения прочности связывания белков пластик подвергается модификации (проводится обработка глутаровым альдегидом, поли-L-лизином, толуол-2,4-диизоцианатом; способ модификации – ноу-хау фирмы-производителя) таким образом, что активированная поверхность приобретает способность к ковалентному связыванию белков. К режиму модификации предъявляются жесткие требования: однородность связывающих свойств поверхности пластика, его оптическая прозрачность (результаты ИФА регистрируются фотометрически). По окончании процедуры связывания с поверхностью пластика несвязанный меченый реагент просто смывается с поверхности планшета. В англоязычной литературе твердофазный ИФА именуется ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – определение фермента, связанного с иммуносорбентом.

В рамках обоих подходов имеется множество вариантов. Рассмотрим несколько примеров.

ГОМОГЕННЫЙ ИФА

Антитело, образуя комплекс с антигеном, подавляет активность связанного фермента: комплекс Аг–Е, подобно свободному Е, катализирует превращение субстрата S в продукт реакции P

$$S \xrightarrow{Ag-E} P,$$

тогда как комплекс Ат–Аг–Е теряет активность

$$S \xrightarrow{Ат-Аг-E} P$$

Потеря активности может быть вызвана изменением конформации молекулы фермента, ведущим к нарушению структуры его активного центра. Другая причина – фермент не может проявить активность, поскольку антитело закрыло доступ субстрата к активному центру фермента.

Если добавить свободный антиген, то он, конкурируя за Ат, вызывает регенерацию Аг–Е, появляется активность фермента:

$$a(Ат–Аг–E) + bAg \longrightarrow$$

$$\longrightarrow c(Ат–Аг–E) + d(Ат–Аг) + e(Аг–E) + fAg$$

При наличии калибровочной кривой, построенной с применением известных концентраций меченого и немеченого антигена (график будет представлять собой линейную зависимость между концентрацией Аг и ферментативной активностью Аг–Е), таким методом (конкурентного, гомогенного ИФА) можно определить концентрацию антигена в исследуемом образце.

Наряду с ферментами в гомогенном ИФА в качестве метки могут быть использованы модуляторы (М) ферментов – вещества, способные подавлять или стимулировать активность ферментов:

$$Ат + (Аг–М–Е) \longrightarrow (Ат–Аг–М–Е),$$

$$Ат + Аг \longrightarrow (Ат–Аг),$$

$$S \xrightarrow{Аг–М–Е} P,$$

$$S \xrightarrow{Ат–Аг–М–Е} P$$

Комплекс Аг–М–Е каталитически активен, а будучи связанным с Ат, неспособен катализировать реакцию. Свободный Аг, находящийся в тестируемом образце, конкурируя с Аг–М–Е за связывание с Ат, добавленным в лимитированном количестве, ведет к увеличению концентрации Аг–М–Е и тем самым способствует протеканию ферментативной реакции. Это вариант с положительным модулятором фермента. Напротив, с отрицательным модулятором активность фермента будет снижаться по мере возрастания свободного Аг в тестируемом образце.

Существует много других модификаций гомогенного ИФА. Назовем еще три из них: применение в качестве метки простетической группы ферментов, ковалентно связанной с Аг; комплексов флуорогенных субстратов (S) фермента с Аг (в отличие от Аг–S комплекс Ат–Аг–S не может служить субстратом фермента, в результате ферментативной реакции образуется интенсивно флуоресцирующий продукт); применение антител, которые, связываясь с активным центром фермента, ингибируют его активность. Время, за которое проводится гомогенный ИФА, не превышает 5 мин. Хотя гомогенному ИФА присущи быстрота и малая трудоемкость, он характеризуется более низкой чувствительностью в сравнении с гетерогенным ИФА.

ГЕТЕРОГЕННЫЙ ИФА

Антитела Ат связываются со стенками лунки на полистироловом планшете (рис. 3, *а*). Избыток Ат смывают буферным раствором. Оставшиеся незанятыми участки связывания на поверхности полистирола блокируют добавлением постороннего белка, например бычьим сывороточным альбумином; поверхность вновь отмывают (на рис. 3, *а* не показано). Образец, содержащий антиген Аг в неизвестной концентрации, смешивают с определенным количеством меченого антигена и добавляют к антителам, фиксированным на полистироловой подложке. Аг и Аг–Е конкурентно связываются с Ат. Поверхность полистирола опять отмывают для удаления несвязанных Аг и Аг–Е. После этого определяют активность фермента в лунке полистиролового планшета, которая будет обратно пропорциональна концентрации антигена в исследуемом образце. Это конкурентный гетерогенный ИФА.

На рис. 3, *б* показан другой вариант гетерогенного ИФА – неконкурентный, так называемый метод сандвича. На поверхности полистирола сорбируют антитела $Ат_1$, связывающие Аг (он должен обладать не менее чем двумя валентностями) из тестируемого образца. Затем добавляют вторые антитела $Ат_2$, сшитые с ферментом Е. После удаления избытка $Ат_2$–Е в лунку полистиролового планшета добавляют субстрат реакции и определяют активность фермента, которая будет линейно зависеть от концентрации Аг в образце.

С помощью специального спектрального прибора результаты ферментативной реакции в полистироловых планшетах можно измерить за одну минуту в 96 лунках. Однако в целом гетерогенный

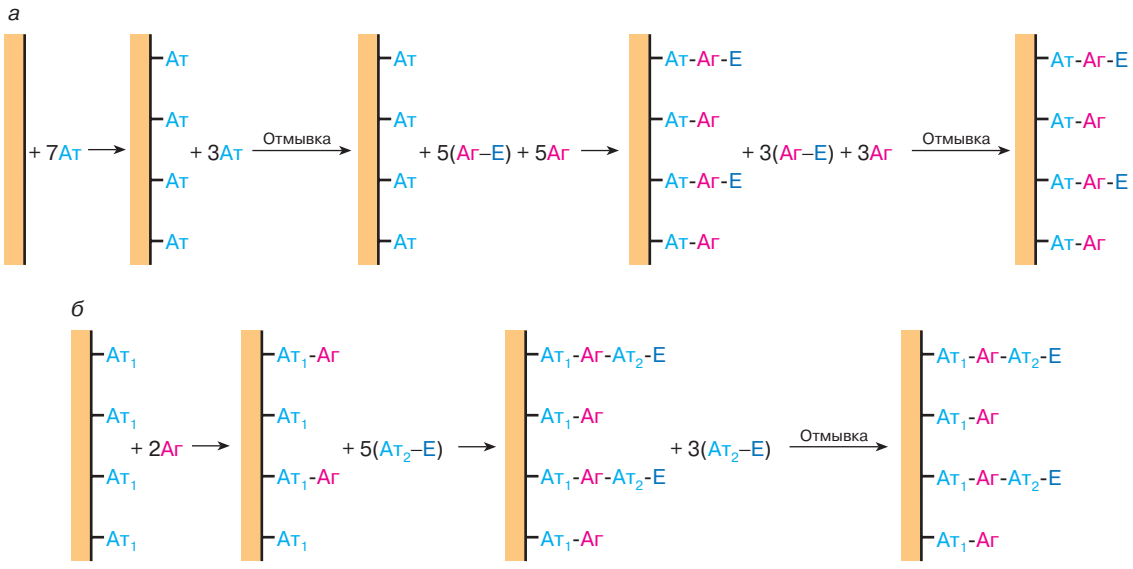

Рис. 3. Конкурентный (*а*) и неконкурентный (*б*) гетерогенный иммуноферментный анализ

ИФА продолжительнее гомогенного. Его проведение требует до 3–4 часов, поскольку на каждом этапе операции должно установиться равновесие, и лишь после этого можно провести отмывку иммуносорбента, которая тоже занимает время.

ПРИМЕНЕНИЕ ИФА

Чувствительность ИФА такова, что определение веществ в концентрациях 10^{-9}–10^{-12} М, белка в микрограммах-нанограммах в 1 мл – это обыденное дело. Подобно тому как глаз человека регистрирует одиночный световой квант, ИФА можно усовершенствовать так, что он с помощью каскадных систем усиления позволит обнаруживать одиночные молекулы анализируемого вещества.

Возможности увеличения чувствительности ограничиваются фоном анализируемого соединения (то есть его наличием не только в анализируемом образце, но и в используемых реактивах и растворителях), субстратной специфичностью фермента и аффинностью антител. К ограничениям ИФА относится также наличие в тестируемых образцах кофакторов, ингибиторов и стимуляторов активности ферментов. Еще один недостаток – ИФА не позволяет различать нативные белки и их биологически неактивные фрагменты, сохранившие антигенные детерминанты. Помехой для ИФА может быть изменение каталитической активности фермента при его конъюгировании с антигеном. Ограничением ИФА является его применимость лишь к хорошо изученным системам, где есть очищенные антигены и высокоспецифические антитела.

Высокая чувствительность в сочетании с быстротой анализа (от нескольких минут до нескольких часов), возможностью одновременного тестирования большого количества образцов и отсутствием особой необходимости предварительных операций по очистке и концентрированию анализируемого соединения в образце придают ИФА неоспоримые преимущества перед другими аналитическими методами. Поэтому сегодня ИФА находит широкое применение в здравоохранении, различных областях сельского хозяйства, промышленной биотехнологии, природоохранной деятельности и научно-исследовательской работе.

Любое заболевание человека и животных можно быстро и точно диагносцировать путем идентификации возбудителя, его отдельных антигенных компонентов, антител к этим компонентам или веществ, не свойственных здоровому организму и синтезируемых при его патологических состояниях (рак, сердечно-сосудистые и эндокринные заболевания). Диспансеризация населения, эпидемиологические обследования, выявление отравлений, наличия наркотиков в крови, определение содержания лекарственных соединений в тканях, вирусные заболевания растений, определение антибиотиков, витаминов и других биологически активных соединений при отборе активных штаммов-продуцентов в промышленной биотехнологии, контроль за качеством медицинских препаратов из донорской крови на отсутствие вирусов-возбудителей СПИДа и гепатита В – это лишь небольшой перечень практического применения ИФА. Современные фундаментальные исследования в биохимии, клеточной физиологии и иммунологии, микробиологии, вирусологии, онкологии трудно представить без ИФА. Реагенты для проведения ИФА сегодня стали коммерческими продуктами и могут быть приобретены по каталогам известных фирм.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абелев Г.И.* Основы иммунитета // Соросовский Образовательный Журнал. 1996. № 5. С. 4–10.

2. *Галактионов В.Г.* Как работает иммунная система // Там же. 1997. № 12. С. 2–9.

3. *Абелев Г.И.* Моноклональные антитела // Там же. 1998. № 1. С. 16–20.

4. *Березин И.В. и др.* Биотехнология / Ред. Н.С. Егоров, В.Д. Самуилов. М.: Высш. шк., 1987. Кн. 8: Инженерная энзимология.

5. *Егоров А.М. и др.* Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высш. шк., 1991.

6. Иммуноферментный анализ / Ред. Т.Т. Нго, Г. Ленхофф. М.: Мир, 1988.

* * *

Виталий Дмитриевич Самуилов, доктор биологических наук, профессор кафедры клеточной физиологии и иммунологии МГУ. Область научных интересов – биоэнергетика, микробиология, биотехнология, иммунология. Автор более 200 статей, монографии и трех учебных пособий.