

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Метод ИФА включает 3 основных этапа: 1) образование иммунного комплекса «антиген (исследуемое вещество) – специфическое к нему антитело» или наоборот; 2) формирование связи конъюгата с образовавшимся на предыдущем этапе иммунным комплексом или со свободными местами связывания (детерминантами); 3) преобразование субстрата под действием ферментной метки в регистрируемый сигнал в результате биохимической реакции.

Все методики выполнения иммуноферментного анализа классифицируются как гомогенные или гетерогенные.

Методики, в которых все 3 стадии ИФА проходят в растворе, и между основными стадиями нет дополнительных этапов разделения образовавшихся иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов, относятся к группе гомогенных методов ИФА. В основе гомогенного ИФА, применяемого, как правило, для определения низкомолекулярных субстанций, лежит процесс ингибирования активности фермента при его соединении с антигеном или антителом. В результате реакции антиген–антитело активность фермента восстанавливается. При образовании иммунного комплекса антиген–антитело, содержащего ферментную метку, происходит ингибирование активности фермента на 95 % по отношению к высокомолекулярному субстрату, что обусловлено стерическим исключением субстрата из активного центра фермента. По мере увеличения концентрации антигена происходит связывание все больше антител, и сохраняется все больше свободных конъюгатов «антиген–фермент», способных гидролизовать высокомолекулярный субстрат. Гомогенный метод ИФА проводится очень быстро. На анализ одного определения требуется 1 мин. Чувствительность метода достаточно высока. С его помощью можно определить вещество на уровне пикомолей.

Для гетерогенных методов характерно проведение анализа в двухфазной системе с участием твердой фазы – носителя и обязательна