

контрольные пробы в равных количествах. Наиболее часто в качестве «стоп реагента» применяют серную кислоту.

Прямой неконкурентный метод ИФА

Методика прямого ИФА имеет лишь небольшие отличия от методики непрямого неконкурентного ИФА. Так, I и II стадии одинаковы в обоих типах анализа. Отличие заключается в том, что в прямом варианте ИФА на стадии III используют специфические исследуемому антигену антитела, конъюгированные с ферментной меткой, и они прямо взаимодействуют с исследуемым веществом. При необходимости также можно проводить титрование конъюгатов аналогично принципу, описанному ранее для неконъюгированных антител. Стадия IV в рамках прямого неконкурентного ИФА не проводится.

«Сэндвич» метод ИФА

В данном варианте ИФА используется пара антител (первичные и вторичные), специфичных к пространственно удаленным эпитомам исследуемого антигена.

I. Сорбция антител на твердой фазе. Методика сорбции антигена аналогична методике сорбции антител в разделе «Косвенный неконкурентный метод ИФА».

II. Блокировка. Методика блокировки мест неспецифического связывания на подложке (твердой фазе) аналогична методике блокировки, описанной в разделе «Косвенный неконкурентный метод ИФА».

III. Инкубация с антигеном. В лунки планшета с преадсорбированными антителами вносят по 50 мкл исследуемого вещества и стандартных разведений антигена, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Разведения антигена должны быть приготовлены на основе фосфатно-солевого буферного раствора (рН 9,0), содержащего 0,1 % твин-20, поскольку твин-20 снижает неспецифическое связывание белковых молекул друг с другом и с поверхностью планшета. И