

ФГБОУ ВО
«Воронежский государственный технический университет»

Кафедра системного анализа и управления
в медицинских системах

99-2016

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

к выполнению лабораторной работы №1
по дисциплине «Технические методы диагностических
исследований и лечебных воздействий»
для студентов направления 12.03.04
«Биотехнические системы и технологии»
(профили «Биотехнические и медицинские аппараты и системы»,
«Менеджмент и управление качеством в здравоохранении»)
очной формы обучения



Воронеж 2016

Составитель ассистент Ю.С. Данилова

УДК 681.3

Методические указания к выполнению лабораторной работы №1 по дисциплине «Технические методы диагностических исследований и лечебных воздействий» для студентов направления 12.03.04 «Биотехнические системы и технологии» (профили «Биотехнические и медицинские аппараты и системы», «Менеджмент и управление качеством в здравоохранении») очной формы обучения / ФГБОУ ВО «Воронежский государственный технический университет»; сост. Ю.С. Данилова. Воронеж, 2016. 16 с.

Методические указания предназначены для проведения лабораторных работ по курсу «Технические методы диагностических исследований и лечебных воздействий».

Предназначены для студентов 3 курса.

Ил.12. Библиогр.: 2 назв.

Рецензент д-р техн. наук, проф. Е.Н. Коровин

Ответственный за выпуск зав. кафедрой

д-р техн. наук, проф. О.В. Родионов

Печатается по решению редакционно-издательского совета Воронежского государственного технического университета

© ФГБОУ ВО «Воронежский государственный
технический университет», 2016

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1

Работа в виртуальной иммунологической лаборатории на базе «THE VIRTUAL IMMUNOLOGY LABORATORY»

1. Цель работы

Цель лабораторной работы – определение наличия антител системной красной волчанки в образце крови пациента посредством выполнения иммуноферментного анализа на базе виртуальной лаборатории «THE VIRTUAL IMMUNOLOGY LABORATORY».

2. Теоретическое введение

Системная красная волчанка (СКВ/SLE) – аутоиммунное заболевание, которое приводит к развитию воспаления в суставах, сухожилиях и других органах, где имеется соединительная ткань. При аутоиммунных заболеваниях организм, вырабатывая чужеродные белки к собственным клеткам и их компонентам, наносит ущерб своим здоровым клеткам и тканям. Аутоиммунное заболевание – это состояние, при котором иммунная система начинает воспринимать «свои» ткани как чужеродные и атакует их. Это ведет к воспалению и повреждению различных тканей организма.

Общие симптомы СКВ:

- Болезненность и припухание суставов, мышечная боль
- Необъяснимая лихорадка
- Синдром хронической усталости
- Высыпания на коже лица красного цвета или смена окраски кожных покровов
- Боли в грудной клетке при глубоком дыхании
- Усиленное выпадение волос
- Побеление или посинение кожи пальцев кистей или стоп на холоде или при стрессе (синдром Рейно)

- Повышенная чувствительность к солнцу
- Припухание (отеки) ног и/или вокруг глаз
- Увеличение лимфатических узлов

Иммуноферментный анализ (ИФА/ELISA) – это лабораторное исследование, основанное на реакции «антиген-антитело». Суть этого лабораторного метода – выявление специфических антител с помощью специальных биохимических реакций, которые помогают определить присутствие или отсутствие антител и их количество.

Прямой иммуноферментный анализ – этапы проведения

В прямом иммуноферментном анализе используют антитела к выявляемому антигену, соединенные со специфической меткой. Эта специфическая метка и есть субстрат ферментативной реакции.

1 Прикрепление антигенов к поверхности лунки и соединение антигена с антителом

Как проходит прямой иммуноферментный анализ? Берется биологический материал (кровь, соскобы со слизистых, мазки) и помещается в специальные лунки. Биологический материал оставляют в лунках на 15-30 минут, чтобы антигены могли приклеиться к поверхности лунок. Далее в эти лунки добавляют антитела к выявляемому антигену. Это значит, что выявляя антигены, например, сифилиса, добавляются антитела против антигенов сифилиса. Эти антитела получают промышленным способом, а лаборатории покупают уже готовые наборы. Данную смесь исследуемого материала и антител оставляют на некоторое время (от 30 минут до 4-5 часов), чтобы антитела смогли найти и связаться со «своим» антигеном. Чем больше в биологической пробе антигенов, тем больше антител свяжется с ними.

2 Удаление «лишних» антител

Как было указано, антитела к тому же связаны со специфической меткой. Поскольку антитела добавляются в избытке,

то не все они свяжутся с антигенами, а если антигена вообще нет в пробе, то, соответственно, ни одно антитело не свяжется с искомым антигеном. Для того чтобы убрать «лишние» антитела, содержащее из лунок просто выливают. В результате этого все «лишние» антитела убираются, а остаются те, которые связались с антигенами, поскольку антигены «приклеены» к поверхности лунок. Лунки несколько раз ополаскивают специальным раствором, который позволяет вымыть все «лишние» антитела.

3 Ферментативная реакция – образование окрашенного соединения

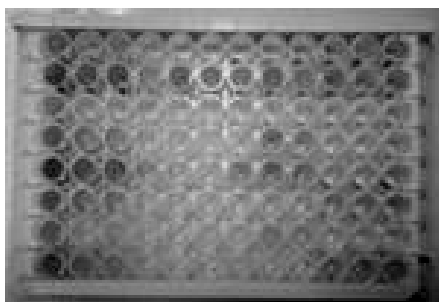


Рис. 1. Образование окрашенного вещества

Далее начинается второй этап – ферментативная реакция. В промытые лунки добавляют раствор с ферментом и оставляют на 30-60 минут. Данный фермент имеет сродство к веществу (специфической метке), с которым связаны антитела. Фермент проводит реакцию, в результате которой эта специфическая метка (субстрат) превращается в окрашенное вещество (продукт) (рис. 1). Затем методом колориметрии находят концентрацию этого окрашенного вещества. Поскольку данная специфическая метка связана с антителами, значит, концентрация окрашенного продукта реакции равна концентрации антител. А концентрация антител равна концентрации антигенов. Таким образом, в результате проведенного анализа мы получаем ответ, какова концентрация выявляемого микроба или гормона.

3. Выполнение работы

Вы сотрудник клинической лаборатории. Местный врач направил вам 40 мл крови в пробирках от трех разных пациентов и просит вас проверить каждый образец на наличие хронического заболевания под названием системная красная волчанка (СКВ/SLE).

Вы должны провести иммуноферментный анализ (ИФА/ELISA), чтобы обнаружить антитела, характерные для этого заболевания. Наличие специфических антител в образце крови укажет на то, что пациент может быть болен СКВ (рис. 2).

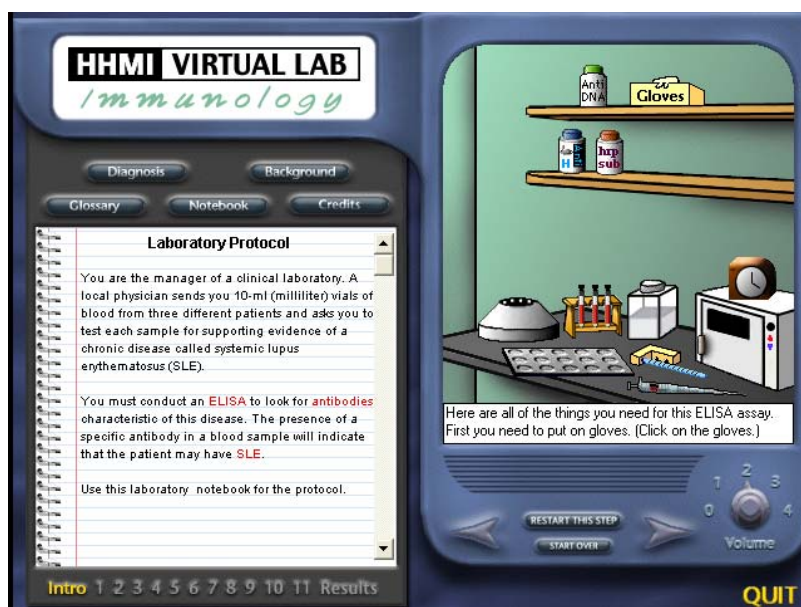


Рис. 2. Начало работы

***Примечание.** Перед началом работы кликните мышкой на изображение коробки с медицинскими перчатками (Gloves).

Шаг 1

Чтобы получить сыворотку, отцентрифугируйте образцы цельной крови пациентов А, В и С в течение 15 минут при комнатной температуре (рис. 3).

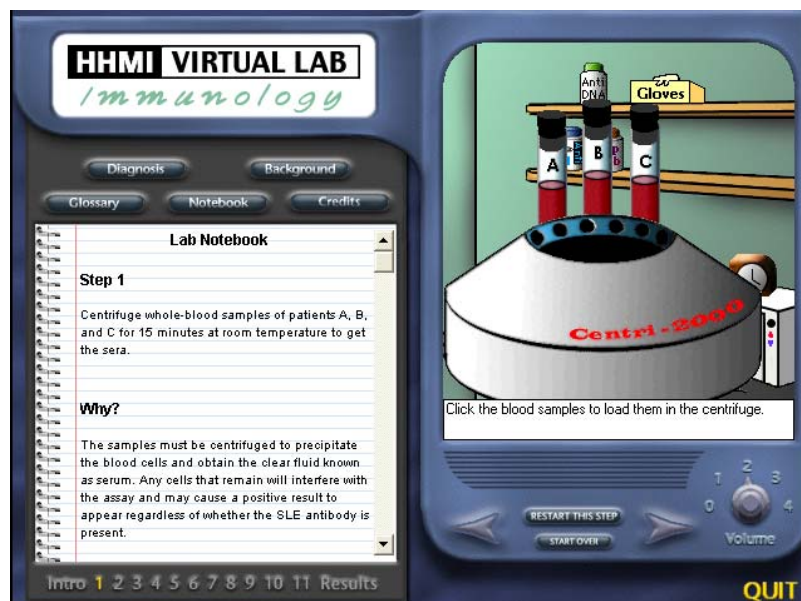


Рис. 3. Шаг 1

Шаг 1 - Пояснение

Центрифугирование образцов проводят для осаждения клеток крови, чтобы получить прозрачную жидкость, называемую *сывороткой*. Любые клетки, которые остаются, будут влиять на анализ и могут привести к ложноположительным результатам, появляющимся независимо от того, присутствует ли СКВ-антитело или нет. Результаты такого анализа будут недостоверными.

Шаг 2 (Пациент А)

Воспользуйтесь сывороткой от пациента А, чтобы подготовить три разведения следующим образом:

Взять 1 мл сыворотки от больного А и добавить 1 мл физиологического раствора с фосфатным буфером (PBS). Это разведение 1:2.

Взять 1 мл сыворотки от пациента А и добавить 9 мл PBS. Это разведение 1:10.

Взять 0,1 мл сыворотки от больного А и добавить 9,9 мл PBS. Это разведение 1: 100 (рис. 4).

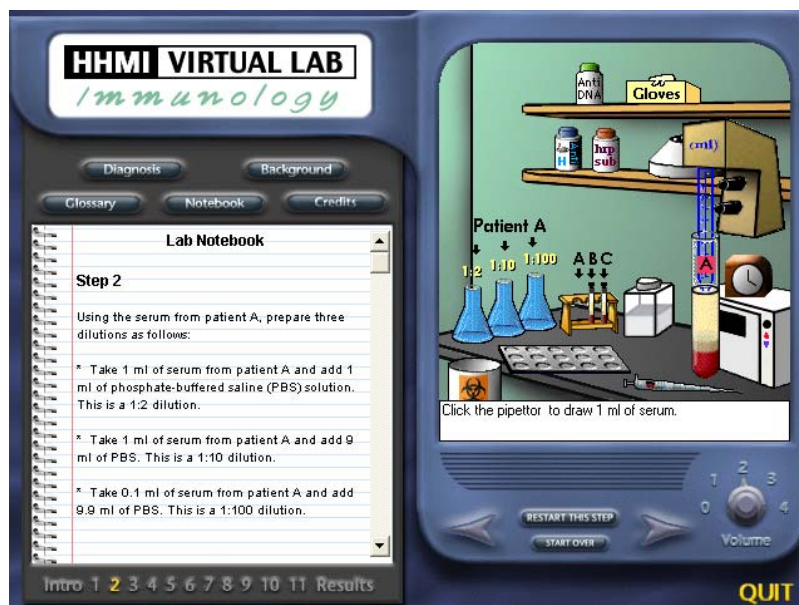


Рис. 4. Шаг 2

Шаг 2 - Пояснение

Серийные разведения проводятся для того, чтобы определить уровень антител в образце. Сильно разбавленные образцы не дадут положительного результата, если есть низкий титр антител в сыворотке.

PBS является стандартным лабораторным раствором, который содержит поваренную соль. Концентрация соли в буфере примерно такая же, как в крови человека. Фосфатный буфер способствует тому, что среда раствора остается не слишком кислой и не слишком основной.

Шаг 3

Подготовьте ИФА-пластины с 0,1 мл различных разведений сыворотки пациента, используя пипетку Eppendorf® (рис. 5).

*Примечание: каждая лунка ИФА-пластины была предварительно связана с СКВ-антигенами.

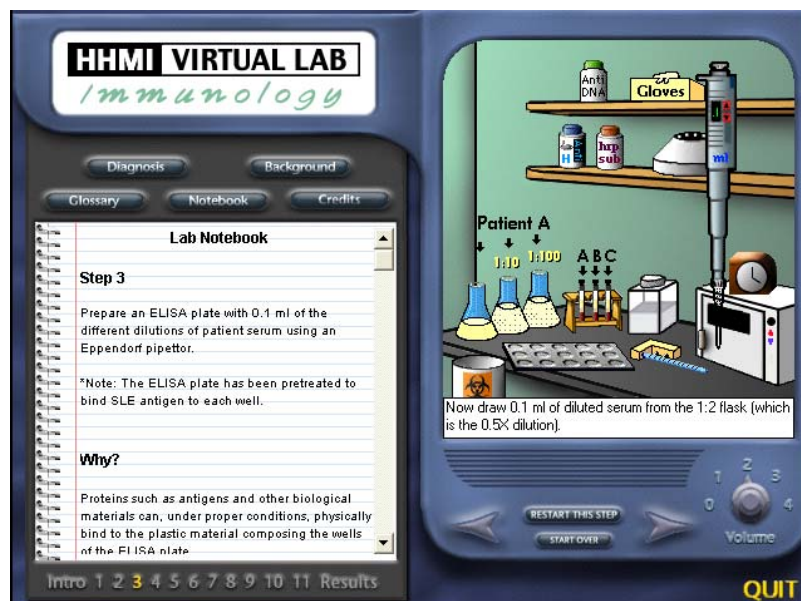


Рис. 5. Шаг 3

Шаг 3 - Пояснение

Белки, такие как антигены и другие биологические материалы, могут в надлежащих условиях физически связываться с пластиковым материалом, из которого изготовлены ИФА-пластины.

Процедура покрытия должна быть произведена аккуратно. Если используется слишком мало антигенов, то антитело или другой белок может «прилипнуть» к пустым промежуткам, что приводит к ложноположительной реакции. Если используется слишком много антигенов, то их избыток может связаться с СКВ-антителами из сыворотки пациента. Но тогда они будут смыты, также создавая ложноотрицательные реакции.

Добавление антигена является первым решающим шагом в цепи событий распознавания между антигеном и антителом, которое завершится окрашиванием от фермента, связанного со вторым антителом.

Шаг 4

Добавьте в ИФА-пластины 0,1 мл разведений для каждого титра первичного антитела анти-ДНК (положительный контроль) и буфер (отрицательный контроль) (рис. 6).

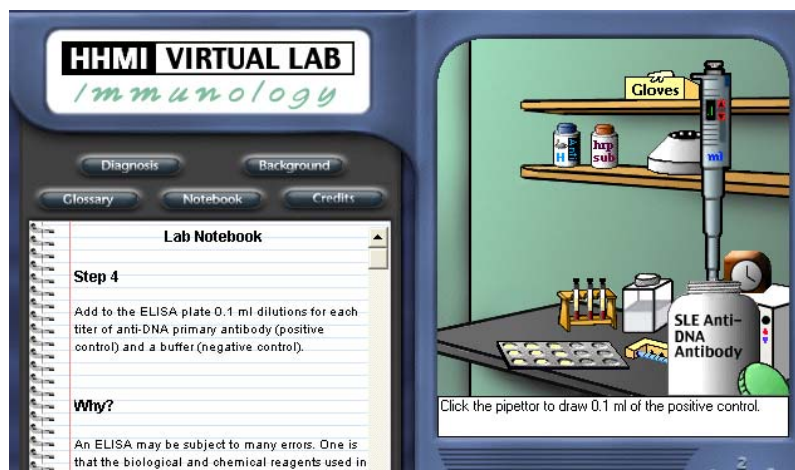


Рис. 6. Шаг 4

Шаг 4 - Пояснение

В процессе проведения ИФА может возникнуть ряд ошибок. Одной из них является то, что биологические и химические реагенты, используемые в ИФА, могут меняться со временем. Другой является то, что ИФА не всегда проводят при соответствующих условиях. Чтобы исключить такие проблемы, используются два элемента контроля. Один контроль должен всегда давать положительный ответ, если реагенты и условия являются правильными. Вторым контролем никогда не должен давать положительный ответ. Если какой-либо контрольный образец не реагирует, как ожидалось, то результаты будут недостоверными, и анализ должен быть повторен.

Любое антитело СКВ, которое содержится в сыворотке от больного, распознает антиген в лунке и связывается с ним. Каждый образец сыворотки содержит много различных типов антител, но так как они слишком специфичны в том, как они реагируют, как правило, антитела распознают антиген СКВ, исключая антитела СКВ.

Шаг 5

Инкубируйте пластины ИФА при 37° С в течение 15 минут (рис. 7).

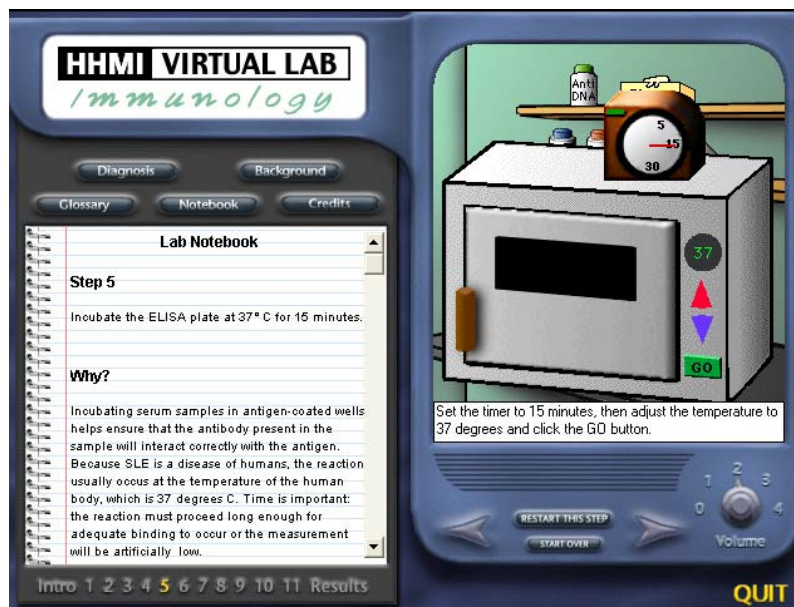


Рис. 7. Шаг 5

Шаг 5 - Пояснение

Инкубация образцов сыворотки в покрытых антигеном лунках гарантирует, что антитела, присутствующие в пробе, правильно прореагируют с антигеном. Так как СКВ является заболеванием человека, реакцию обычно проводят при температуре человеческого тела – 37° С. Имеет значение время реакции: реакция должна происходить достаточно долго для адекватного связывания или измерение будет неточным.

Проблема: Если таймер установлен менее чем на 15 минут, требуемая реакция не получится, и в конце анализа окрашивания не произойдет. Наблюдатель запишет результаты неправильно, как ложноотрицательные.

Проблема: Если температура слишком низкая, реакция не будет завершена в допустимое время. Если температура будет слишком высокой, то произойдет *денатурация* белка, что снижает его

способность к взаимодействию. Результаты вновь будут записаны как ложноотрицательные.

Шаг 6

Удалите жидкость из каждой лунки с помощью пипетки и промойте 0,1 мл PBS (рис. 8).

Часто в реальной лаборатории эти промывания повторяются 3-6 раз перед добавлением следующего вещества. Для того чтобы ускорить этот процесс, мы проведем только одно полоскание за шаг.

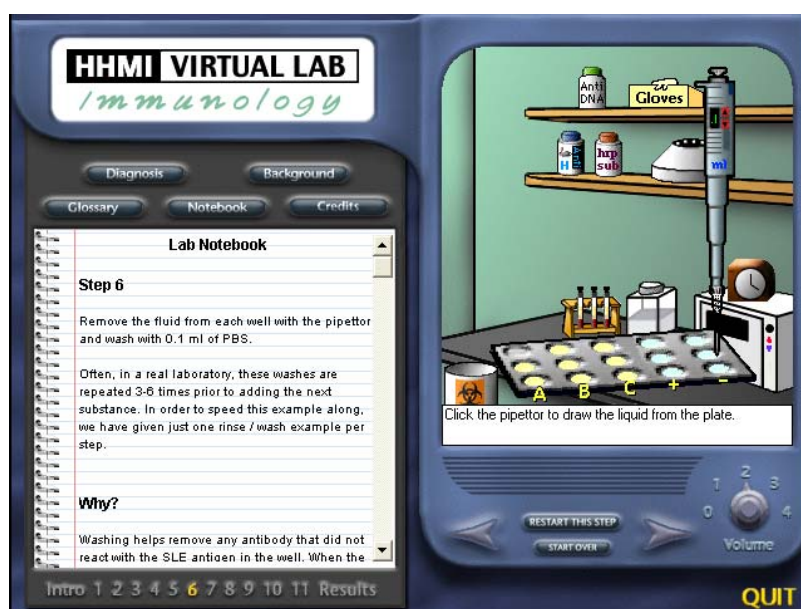


Рис. 8. Шаг 6

Шаг 6 - Пояснение

Промывание помогает удалить любое антитело, которое не вступило в реакцию с антигеном СКВ в лунке. Когда жидкость удаляется из лунки, антитело, которое реагирует с антигеном, остается на поверхности лунки. Непрореагировавшее (несвязанное) антитело может также остаться в небольшом количестве жидкости на дне лунки. Эти несвязанные антитела должны быть удалены, поскольку добавленные в следующем шаге анти-человеческие антитела будут распознавать и реагировать с любым антителом,

оставшемся в лунке, независимо от того, специфично оно для СКВ-антигена или нет. Реакция с не СКВ-антителами даст ложноположительный результат.

Шаг 7

Добавьте 0,1 мл буферного раствора, содержащего вторичное антитело, которое распознает антитела, продуцированные в организме человека. Обратите внимание, данное вторичное антитело получено в организме кролика и имеет прикрепленный фермент (HRP), который будет взаимодействовать с субстратом на следующем этапе (рис. 9).

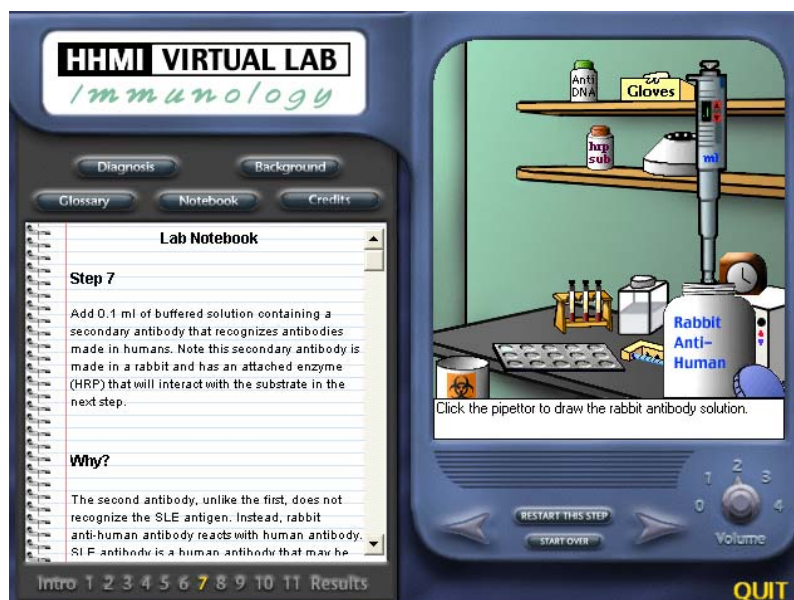


Рис. 9. Шаг 7

Шаг 7 - Пояснение

Второе антитело, в отличие от первого, не признает антиген СКВ. Вместо этого античеловеческое антитело кролика взаимодействует с человеческим антителом. СКВ антитело представляет собой человеческое антитело, которое может присутствовать в лунке, поскольку удерживается антигеном. Таким образом, второе антитело (от кролика) распознает это антитело и

связется с ним. Если лунка не была тщательно промыта, другие антитела человека могут по-прежнему оставаться там, и будут также реагировать со вторым антителом. Реакция не СКВ-антитела человека со вторым антителом даст ложноположительный результат.

Шаг 8

Инкубируйте пластины ИФА при 37° С в течение 15 минут (аналогично шагу 5, см. рис. 7).

Шаг 8 - Пояснение

Инкубация образцов сыворотки в покрытых антигеном лунках позволяет гарантировать, что антитела, присутствующие в пробе, будут правильно взаимодействовать с антигеном. Так как СКВ является заболеванием человека, реакцию обычно проводят при температуре человеческого тела, которая составляет 37° С. Важно время: реакция должна происходить достаточно долго для адекватного связывания или измерение будет не достаточно точным.

Проблема: Если таймер установлен менее чем на 15 минут, то требуемая реакция не получится, и в конце анализа окрашивания не произойдет. Наблюдатель запишет результат неправильно, как ложноотрицательный.

Проблема: Если температура слишком низкая, реакция не будет завершена в отведенное время. Если температура слишком высока, белок (антиген и антитело) будет оказывать неблагоприятное воздействие посредством такого процесса, как денатурация, что снижает его способность к взаимодействию. Результаты вновь будут записаны как ложноотрицательные.

Шаг 9

Удалите жидкость из каждой лунки с помощью пипетки и промойте 0,1 мл PBS (аналогично шагу 6, см. рис. 8).

Шаг 9 - Пояснение

Промывание помогает удалить все антитела, которые не вступили в реакцию с антигеном СКВ в лунке. Когда жидкость удаляется из лунки, антитело, которое реагирует с антигеном остается прикрепленным к поверхности лунки. Непрореагировавшее (несвязанное) антитело может также остаться в лунке в небольшом количестве жидкости, находящейся на дне. Эти несвязанные антитела должны быть удалены, поскольку античеловеческое антитело, которое будет добавлено в следующем шаге, будет распознано и прореагирует с любым антителом в лунке, независимо от того, специфично антитело для СКВ-антигена, или нет. Реакция с не СКВ-антителом даст ложноположительный результат.

Шаг 10

Добавьте 0,1 мл буферного раствора, содержащего химический субстрат (HRP-субстрат). Если в образце присутствуют человеческие антитела, то прозрачный субстрат пожелтеет (рис. 10).

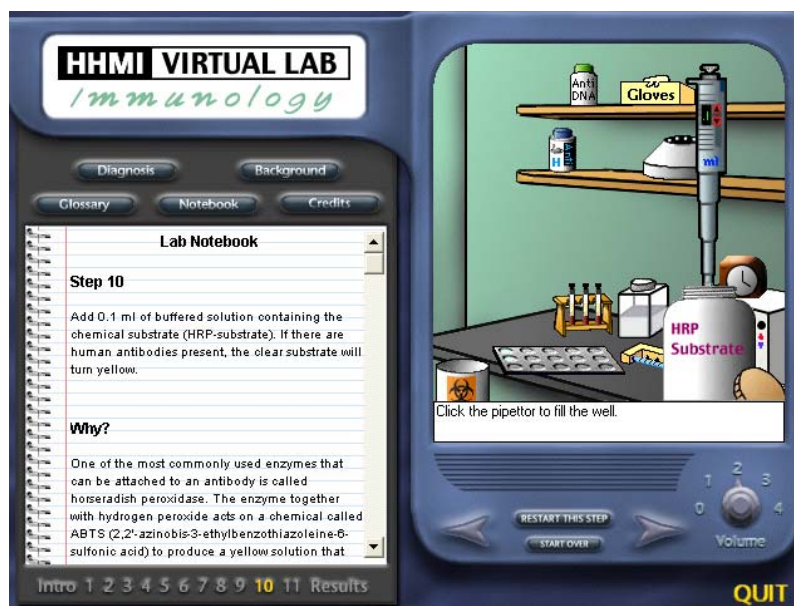


Рис. 10. Шаг 10

Шаг 10 – Пояснение

Одним из наиболее часто используемых ферментов, которые могут прикрепиться к антителу, является пероксидаза хрена (HRP). Фермент совместно с перекисью водорода действует на вещества, называемые ABTS, чтобы получить раствор желтого цвета, который можно оценить невооруженным глазом или измерить количественно в спектрометре при длине волны 414 нм.

Шаг 11

Установите таймер на 15 минут (рис. 11).

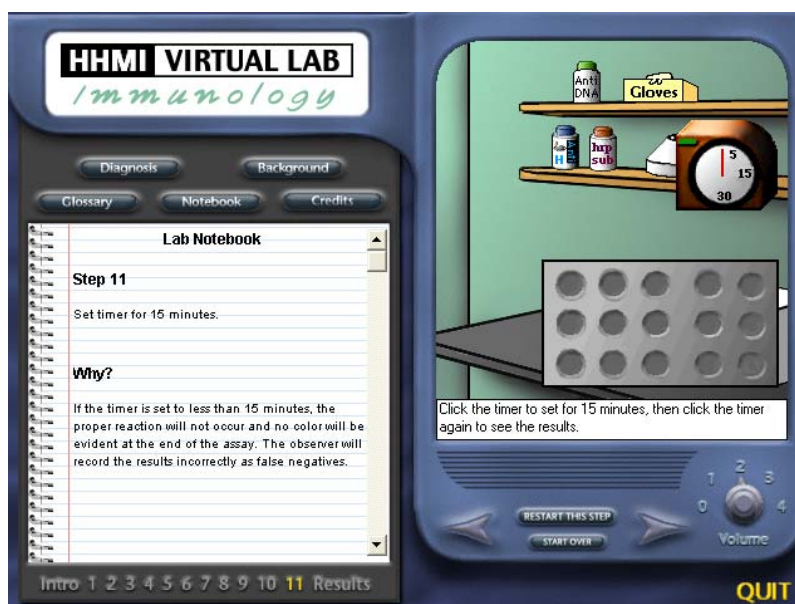


Рис. 11. Шаг 11

Шаг 11 – Пояснение

Если таймер установлен менее чем на 15 минут, требуемая реакция не произойдет, и в конце анализа цвет не проявится. Наблюдатель запишет результат неправильно, как ложноотрицательный.

Оценка результата

Отметьте окрашенные лунки в таблице отчета на экране слева и оцените полученные результаты (рис. 12).

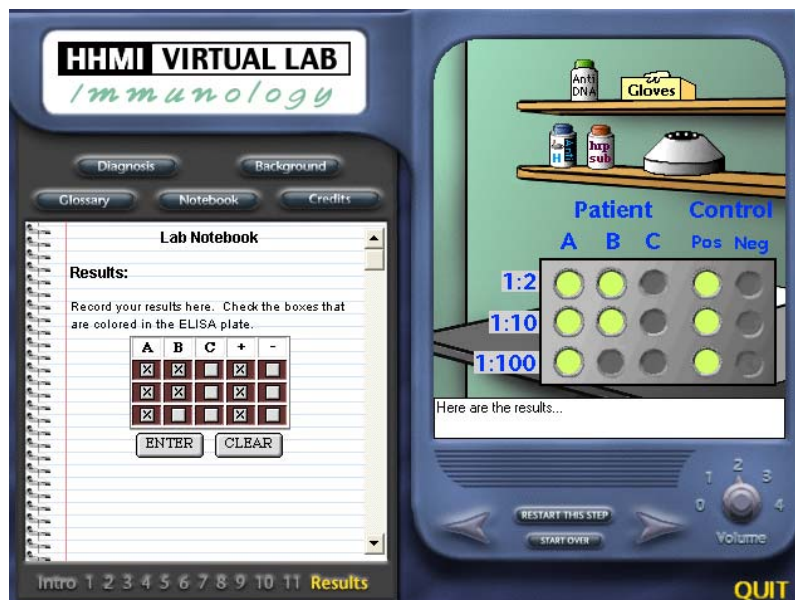


Рис. 12. Результаты

4. Контрольные вопросы

- 1) Для чего предназначен ИФА-тест?
- 2) Какие факторы могут повлиять на результат?
- 3) Дайте определение:
 - a) Сыворотка – ... ;
 - b) Антитело – ... ;
 - c) Антиген – ... ;
 - d) Субстрат –
- 4) Что такое системная красная волчанка?
- 5) Что такое первичное антитело?
- 6) Для чего проводят одновременно положительный и отрицательный контроль?
- 7) Дайте определение:
 - a) Положительный контроль – ... ;
 - b) Отрицательный контроль –

- 8) С какой целью проводят инкубирование планшета для ИФА?
- 9) Для чего проводят ополаскивание планшета для ИФА?
- 10) Что такое вторичное антитело?
- 11) О чем говорят полученные в ходе лабораторной работы результаты?

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Стрюк Р.И. Внутренние болезни [Текст] : учебник. – 2-е изд., испр. и доп. / Р.И. Стрюк, И.В. Маев. – М. : ГЭОТАР – Медиа, 2013. – 544 с. : ил.
2. Теория и практика иммуноферментного анализа [Текст] / А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. – М.: Высш. Шк., 1991. – 288 с.: ил.

СОДЕРЖАНИЕ

1. Цель работы	1
2. Теоретическое введение	1
3. Выполнение работы	4
4. Контрольные вопросы	15
Библиографический список	16

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

к выполнению лабораторной работы №1
по дисциплине «Технические методы диагностических
исследований и лечебных воздействий»
для студентов направления 12.03.04
«Биотехнические системы и технологии»
(профили «Биотехнические и медицинские аппараты и системы»,
«Менеджмент и управление качеством в здравоохранении»)
очной формы обучения

Составитель Данилова Юлия Сергеевна

В авторской редакции

Подписано в печать 11.05.2016.

Формат 60×84/16. Бумага для множительных аппаратов.

Усл. печ. л. 1,2. Уч.-изд. л. 1,0. Тираж экз. «С» .

Зак. №

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный технический
университет»

394026 Воронеж, Московский просп., 14