ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТІ
БИОФИЗИКА, БИОМЕДИЦИНА ЖӘНЕ НЕЙРОҒЫЛЫМ КАФЕДРАСЫ

ДӘРІС №10
ИММУНОЛОГИЯЛЫҚ ӘДІСТЕР. ELISA ДИАГНОСТИКА.

Дәріскер: б.ғ.к., профессор Аблайханова Н.Т.

Алматы, 2026

ЖОСПАР

I

Кіріспе

- Антиген–антидене әрекеттесуі
- Антиденеңің құрылысы
- Әдістердің жіктелуі

II

Негізгі бөлім

- Иммунофлуоресценция (IF)
- Иммуноферменттік талдау (ELISA)
- Ағынды цитометрия және FACS
- Иммуногистохимия (IHC)
- Радиоиммундық талдау (RIA)
- Multiplex талдау және ELISPOT
- Әдістерді салыстыру

III

Қорытынды

- Негізгі тұжырымдар
- Бақылау сұрақтары
- Әдебиеттер

ДӘРІСТІҢ МАҚСАТЫ МЕН МІНДЕТТЕРІ

МАҚСАТЫ

Антиген–антидене әрекеттесуіне негізделген иммунологиялық әдістердің принциптерін, орындалу кезеңдерін және қолданылу салаларын түсіну.

МІНДЕТТЕРІ

1. Антиген–антидене реакциясының негіздерін түсіндіру
2. Иммунологиялық әдістерді жіктеу
3. Әр әдістің принципі мен кезеңдерін сипаттау
4. Әдістердің артықшылықтары мен шектеулерін бағалау
5. Клиникалық және ғылыми қолданылуын талдау
6. Нақты міндетке сәйкес әдісті таңдай білу

Нәтижесі: әдістің принципін түсіну → дұрыс әдісті таңдау → нәтижені дұрыс талдау

АНТИГЕН–АНТИДЕНЕ ӘРЕКЕТТЕСУІ

Барлық иммунологиялық әдістер антиген мен антиденеңің **спецификалық, қайтымды, коваленттік емес** байланысына негізделген.

АНТИГЕН

Иммундық жүйе тани алатын молекула немесе құрылым. Антиденемен байланысатын бөлігі – **эпитоп** (антигендік детерминанта).

АНТИДЕНЕ

Антигенге спецификалық байланысатын иммуноглобулин. Антигенді танитын бөлігі – **паратоп** (Fab аймағында).

Спецификалық

Антидене тек өзіне сәйкес эпитопты таниды

Аффиндік

Бір паратоп пен бір эпитоп арасындағы байланыс күші

Авидтік

Көп валентті байланыстың жиынтық беріктігі

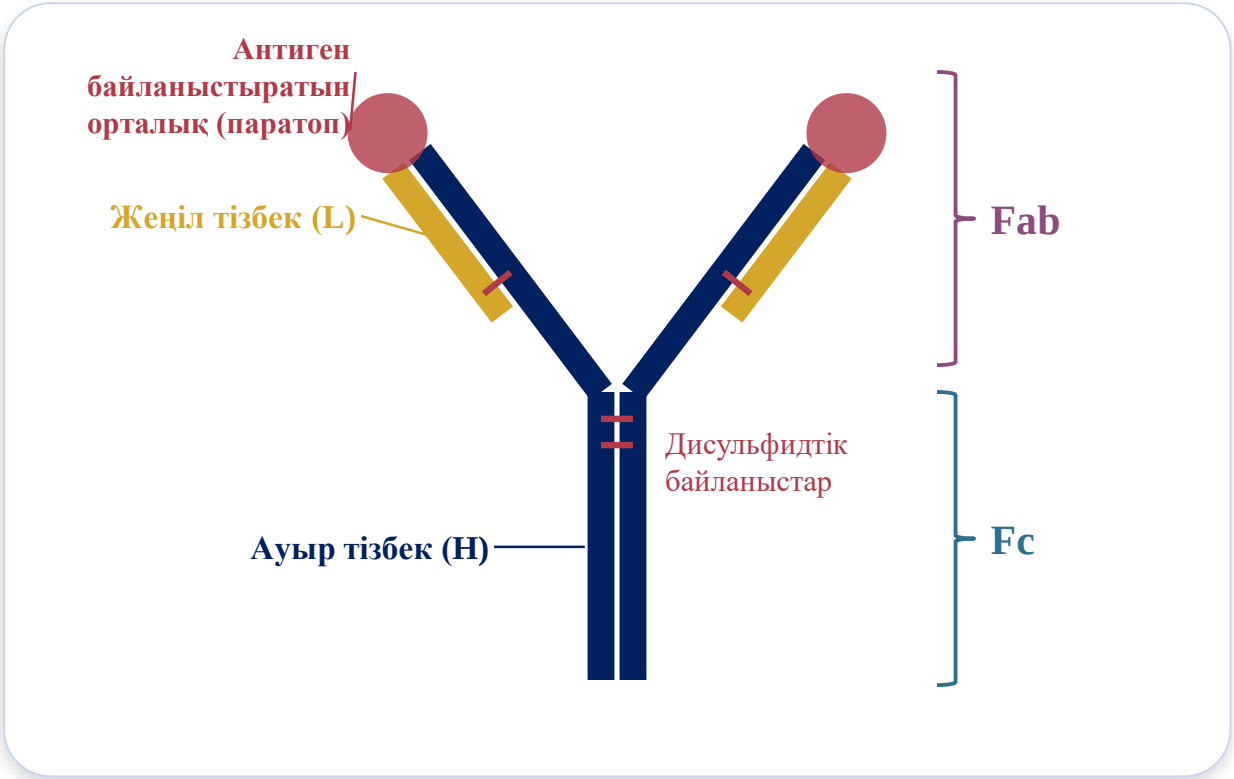
Қайтымдылық

Байланыс коваленттік емес: сутектік, ионды, гидрофобты

Әдістердің дәлдігі антиденеңің **спецификалығы** мен **аффиндігіне** тікелей байланысты. 1975 жылы Кёлер мен Мильштейн ашқан **моноклоналды антиденелер** бұл дәлдікті қамтамасыз етті.

АНТИДЕНЕНІҢ ҚҰРЫЛЫСЫ

Иммуноглобулин G (IgG) – екі ауыр (H) және екі жеңіл (L) полипептидтік тізбектен тұрады.



Fab – антигенді таниды (вариабельді аймақ)

Fc – белгімен таңбалау және екіншілік антидене үшін нысана

АНТИГЕН–АНТИДЕНЕ РЕАКЦИЯЛАРЫНЫҢ ТҮРЛЕРІ

1 Преципитация

Еритін антиген мен антидене иммундық кешен түзіп, ерімейтін тұнба береді. Гельде (Оухтерлони) немесе сұйықта жүреді

2 Агглютинация

Корпускулалық антиген (эритроцит, бактерия) антиденемен біріктіріліп, көзге көрінетін түйіршіктер түзеді

3 Комплементпен лизис

Иммундық кешен комплементті белсендіріп, нысана жасушаның ыдырауына әкеледі

4 Нейтрализация

Антидене вирус немесе токсиннің белсенділігін бейтараптайды

5 Таңбаланған әдістер

Антиденеге флуорофор, фермент, радиоизотоп немесе бөлшек жалғанып, сигнал тіркеледі

6 Қатты фазалы әдістер

Реагент планшет, мембрана немесе микросфера бетіне бекітіледі (ELISA, ELISPOT, Multiplex)

ИММУНОЛОГИЯЛЫҚ ӘДІСТЕРДІҢ ЖІКТЕЛУІ

Әдістерді анықталатын нысана мен алынатын ақпарат түріне қарай жіктеуге болады.

1

Молекулалық

Сұйықтағы еритін молекулаларды сандық өлшеу

ELISA, RIA, Multiplex

2

Жасушалық

Жеке жасушаларды фенотиптеу және қызметін бағалау

FACS, ELISPOT

3

Морфологиялық

Молекуланың жасушадағы немесе тіндегі орнын көрсету

IF, IHC

4

Көппараметрлі

Бір үлгіде көптеген нысананы қатар талдау

Multiplex, көп түсті FACS

Әдісті таңдау критерийлері:

Сезімталдық

Ең аз анықталатын концентрация

Спецификалық

Бөгде молекулалармен шатастырмау

Сандық/сапалық

Мөлшерін өлшей ме, әлде бар-жоғын ғана көрсете ме

Өткізу қабілеті

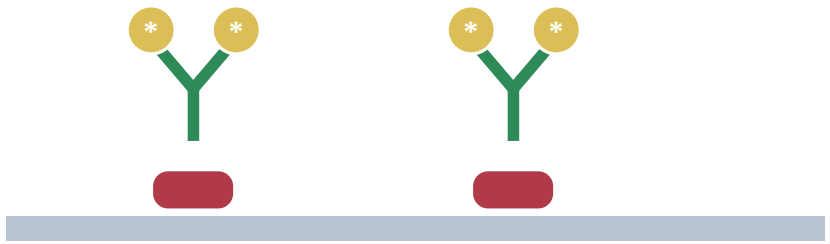
Бір уақытта қанша үлгі талданады

ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ (IF): ПРИНЦИПІ

Иммунофлуоресценция – флуороформен таңбаланған антидене нысаналы антигенмен байланысады; қоздырғыш жарық әсерінен флуоресценция пайда болып, микроскопта тіркеледі. Әдісті 1941 жылы **А. Кунс** ұсынған.

Тікелей IF

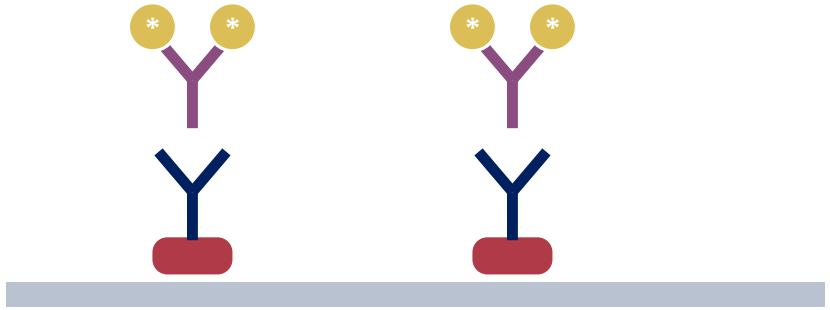
Біріншілік антидененің өзі флуороформен таңбаланған



Үлгі (жасуша немесе тін)

Жанама IF

Таңбаланбаған біріншілік + таңбаланған екіншілік антидене



Үлгі (жасуша немесе тін)

Тікелей: жылдам, фон аз, бірақ сезімталдығы төмен

Жанама: сигнал күшейеді (бірнеше екіншілік антидене), бірақ фон жоғарырақ

Жиі қолданылатын флуорофорлар: FITC (жасыл), TRITC және Cy3 (қызыл), DAPI (ядроны бояйды, көк), Alexa Fluor сериясы

IF: КЕЗЕҢДЕРІ, ҚОЛДАНЫЛУЫ ЖӘНЕ БАҒАЛАУЫ

1. **Үлгіні дайындау және бекіту**
2. **Блоктау (бейспецификалық байланысты азайту)**
3. **Біріншілік антиденемен инкубация**
4. **Таңбаланған екіншілік антидене**
5. **Шаю және ядроны бояу (DAPI)**
6. **Флуоресцентті микроскопия**

Қолданылуы:

- Инфекциялық агенттерді анықтау
- Ақуыздың жасушадағы локализациясы
- Аутоантиденелерді анықтау (ANA)
- Көп түсті талдау: бірнеше нысананы қатар

Артықшылықтары

- Жоғары сезімталдық
- Нысананың нақты орналасуын көрсетеді
- Бірнеше флуорофорды қатар қолдану

Шектеулері

- Қымбат микроскоп қажет
- Флуорофордың ағаруы (фотобличинг)
- Тіндік автофлуоресценция фон береді

IF әдісінің негізгі кезеңдері

01 → Антигенді таңдау

02 → Тиісті антиденені таңдау

03 → Флуорофорды қолдану

04 → Үлгіні бояу және шаю

05 → Флуоресцентті микроскопия

IF: артықшылықтары мен шектеулері

✓ АРТЫҚШЫЛЫҚТАРЫ

- Жоғары сезімталдық
- Жасушадағы нысананың орналасуын көруге болады
- Бір мезгілде бірнеше флуорофорды қолдану

! ШЕКТЕУЛЕРІ

- Қымбат микроскопиялық құралдар
- Флуорофорлардың фототүсуі (ағару)
- Көп арналы сигналдарды түсіндіру күрделі

ИММУНОФЕРМЕНТТІК ТАЛДАУ (ELISA): ПРИНЦИПІ

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) – қатты фазаға бекітілген антиген немесе антиденені ферментпен таңбаланған реагент арқылы анықтайтын сандық әдіс. 1971 жылы **Э. Энгвалл** мен **П. Перлман** ұсынған.

1. **Планшет ұяшығын антигенмен немесе антиденемен жабу**
2. **Блоктау және сынаманы енгізу**
3. **Ферментпен таңбаланған детектор антидене**
4. **Шаю: байланыспаған реагенттерді кетіру**
5. **Субстрат қосу – түс пайда болады**
6. **Оптикалық тығыздықты өлшеу (450 нм)**



Фермент: **HRP** (пероксидаза) немесе **ALP** (сілтілік фосфатаза).
Субстрат: TMB – көк, тоқтатқаннан кейін сары түс

Сигнал қарқындылығы нысана концентрациясына **тура пропорционал** (бәсекелес форматтан басқа)

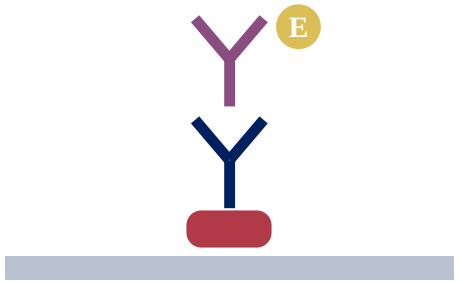
ELISA ФОРМАТТАРЫ

Тікелей (Direct)



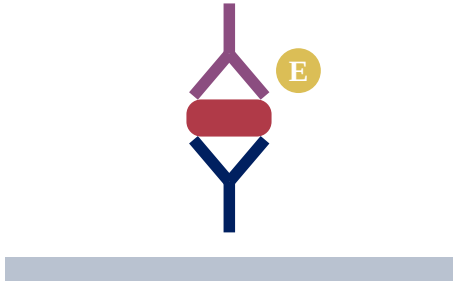
Антиген планшетке бекітіледі, ферментті біріншілік антидене тікелей байланысады

Жанама (Indirect)



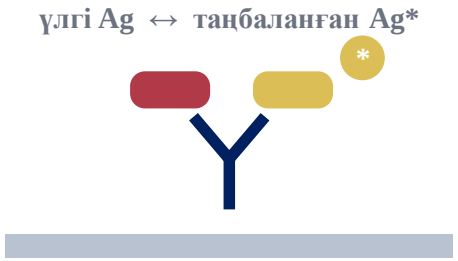
Біріншілік антидене таңбаланбаған; сигналды ферментті екіншілік антидене береді

Сэндвич (Sandwich)



Антиген екі антитененің арасында ұсталады – ең сезімтал формат

Бәсекелес (Competitive)



Үлгідегі антиген таңбаланған антигенмен бәсекелеседі: сигнал кері пропорционал

Сэндвич-ELISA – клиникада ең жиі қолданылатын формат: екі түрлі эпитопты тану есебінен спецификалығы жоғары

Бәсекелес формат шағын молекулалар (гормондар, дәрілер) үшін қолданылады – оларда екі эпитоп сыймайды

ELISA: ҚОЛДАНЫЛУЫ ЖӘНЕ БАҒАЛАУЫ

Қолданылу салалары:

Инфекциялық аурулар	ВИЧ, гепатит В және С, сифилис скринингі
Гормондар	ТТГ, инсулин, кортизол, ХГЧ (жүктілік тесті)
Ісік маркерлері	ПСА, СЕА, АФП, СА-125
Аутоантиденелер	Ревматоидты фактор, анти-ДНҚ, анти-ЦЦП
Цитокиндер	IL-2, IL-6, TNF-α, IFN-γ деңгейін өлшеу
Аллергия	Спецификалық IgE-ні анықтау

Артықшылықтары

- Жоғары сезімталдық (пг/мл деңгейі)
- Сандық нәтиже беретін стандартталған әдіс
- Автоматтандыруға жарамды, өткізу қабілеті жоғары
- Радиоактивті материал қажет емес
- Салыстырмалы түрде арзан

Шектеулері

- Бірнеше инкубация кезеңі уақыт алады (3–5 сағат)
- Тек бір нысананы өлшейді
- Жасушадағы орналасуы туралы ақпарат бермейді
- Шаю сапасы нәтижеге қатты әсер етеді
- Айқас реакция жалған оң нәтиже беруі мүмкін

ELISA: қолданылу салалары

01

Вирустық және бактериялық инфекциялар

Нысаналы молекулаларды анықтау және зерттеу

02

Гормондар мен метаболиттер

Нысаналы молекулаларды анықтау және зерттеу

03

Қан сарысуындағы антиденелер

Нысаналы молекулаларды анықтау және зерттеу

04

Аутоиммундық және ісік маркерлері

Нысаналы молекулаларды анықтау және зерттеу

05

Зерттеулер мен өндірістік бақылау

Нысаналы молекулаларды анықтау және зерттеу

ELISA: тәжірибелік қолдану

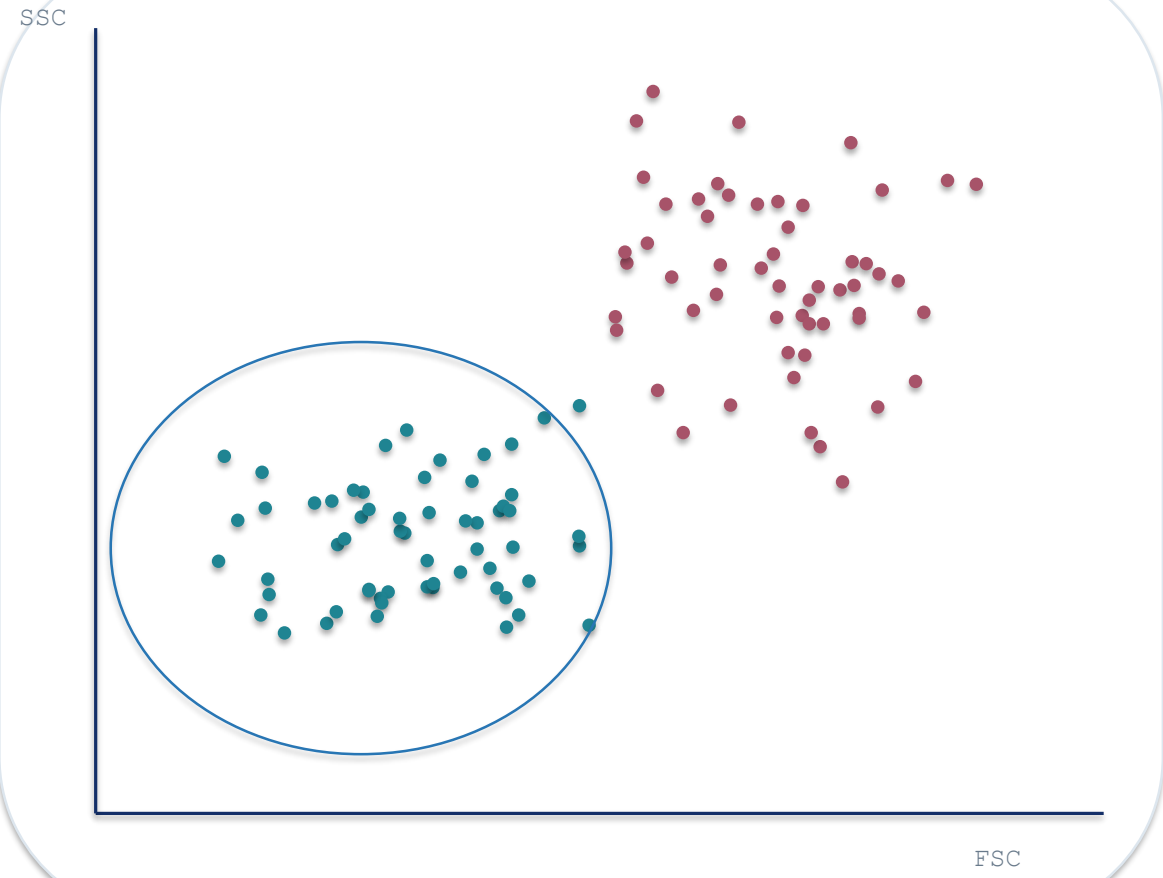
- Қан сарысуындағы арнайы антиденелерді анықтау.
- Инфекциялық антигендерді және кейбір ісік маркерлерін талдау.
- Стандартталған жүйелерде автоматтандыру мүмкіндігі.



FACS — жасушаларды сұрыптау

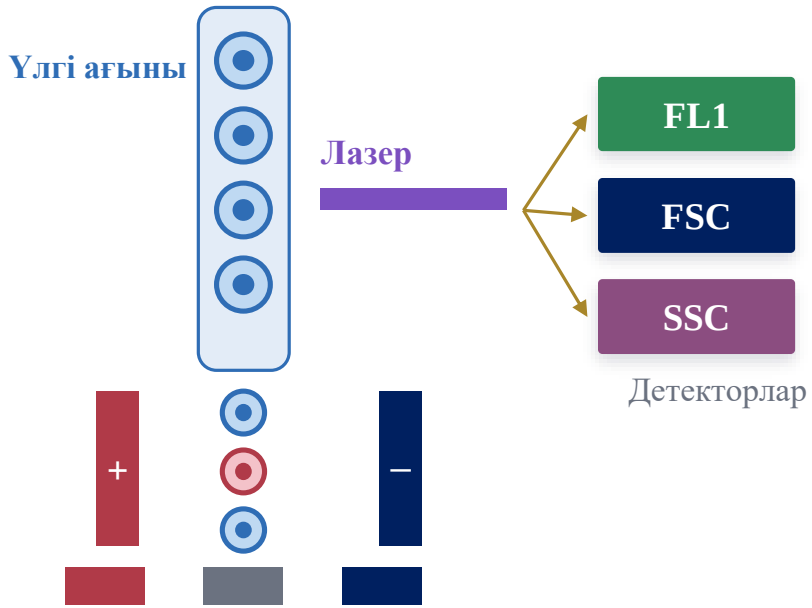
FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL SORTING

- Жасушаларды флуоресцентті маркерлеріне қарай талдап, бөледі.
- Ағын жүйесінде жасуша лазер арқылы жеке-жеке өтеді.
- Оптикалық сигналдарға сүйеніп, жасуша популяциялары сұрыпталады.



АҒЫНДЫ ЦИТОМЕТРИЯ ЖӘНЕ FACS

Ағынды цитометрия – сұйық ағында жеке-жеке өтетін жасушалардың оптикалық сигналдарын тіркейтін әдіс. **FACS** (*fluorescence-activated cell sorting*) оған жасушаларды физикалық сұрыптауды қосады.



FSC (*forward scatter*) – жасушаның **көлемі**
SSC (*side scatter*) – ішкі **түйіршіктілігі**

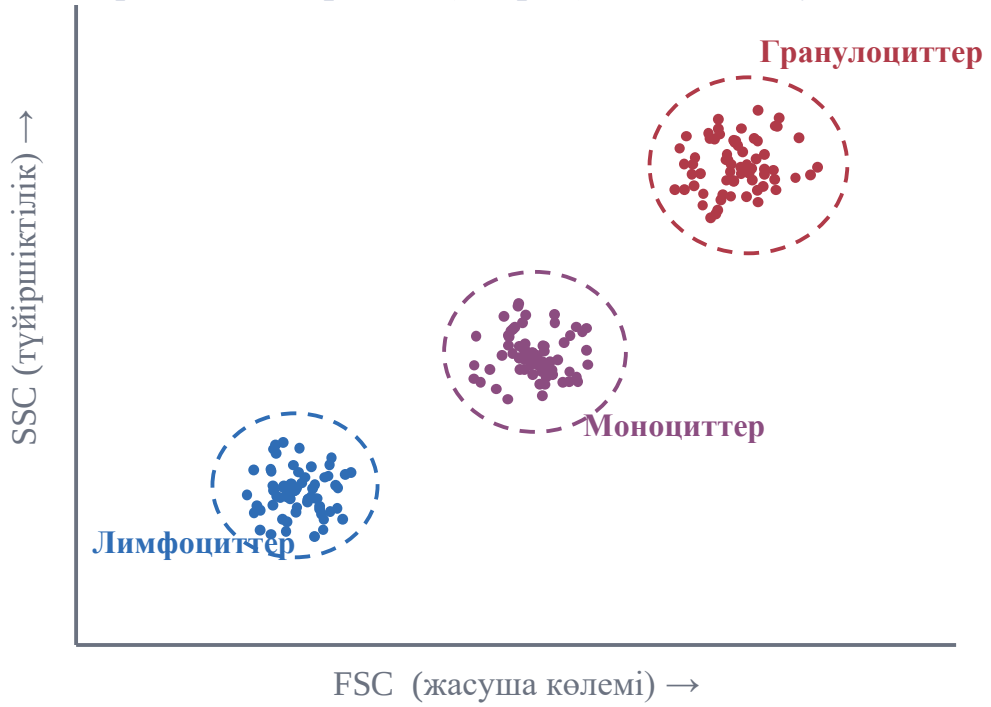
Флуоресценция арналары (**FL1, FL2…**) – беткі және ішкі маркерлердің экспрессиясы

Қазіргі аспаптар бір уақытта **20-дан астам** маркерді тіркей алады; жылдамдығы 10 000–50 000 жасуша/сек

Сұрыптау принципі: тіркелген сигнал бойынша жасуша бар тамшыға заряд беріледі; электр өрісінен өткенде тамшылар әртүрлі түтікшелерге бағытталады.

FACS: ДЕРЕКТЕРДІ ТАЛДАУ ЖӘНЕ ҚОЛДАНЫЛУЫ

Нүктелік диаграмма (dot plot) және гейттеу



Қолданылу салалары:

Иммунофенотиптеу	Т- (CD3, CD4, CD8), В- (CD19), NK- (CD56) жасушаларды санау
Клиникалық диагностика	ВИЧ-те CD4+ санау, лейкоздар мен лимфомаларды типтеу
Жасуша циклі және апоптоз	ДНҚ мөлшерін, Annexin V байланысын өлшеу
Жасушалық терапия	CAR-T, бағаналы жасушаларды (CD34+) сұрыптау
Ғылыми зерттеулер	Цитокиндерді жасуша ішінде бояу, пролиферацияны бағалау

Артықшылықтары: жылдамдық, көп параметр, жеке жасуша деңгейіндегі дәлдік. **Шектеулері:** қымбат жабдық, тәжірибелі маман, үлгіні суспензияға айналдыру қажеттігі.

ИММУНОГИСТОХИМИЯ (IHC)

Иммуногистохимия – тін кесіндісіндегі антигендерді арнайы антиденелермен анықтап, ферменттік немесе флуоресцентті белгі арқылы көрсететін әдіс. Молекуланың **орналасуын тіндік құрылыммен бірге** бағалауға мүмкіндік береді.

1. **Үлгіні бекіту (формалин) және парафинге салу**
2. **Кесінділер дайындау және депарафиндеу**
3. **Антигенді ашу (жоғары температура, цитрат буфері)**
4. **Эндогенді пероксидазаны және фонды блоктау**
5. **Біріншілік және екіншілік антиденелер**
6. **Хромоген (ДАБ) және ядроны контрбояу**

Клиникалық маркерлер:

HER2, ER, PR	Сүт безі обыры: емдеу тактикасын анықтайды
Ki-67	Пролиферация индексі
PD-L1	Иммунотерапияға жауапты болжау
CD3, CD20	Лимфомаларды типтеу

Артықшылықтары

- Морфология мен молекулалық белгіні қатар бағалау
- Архивтік парафин блоктарын пайдалануға болады
- Диагностикада стандартты әдіс

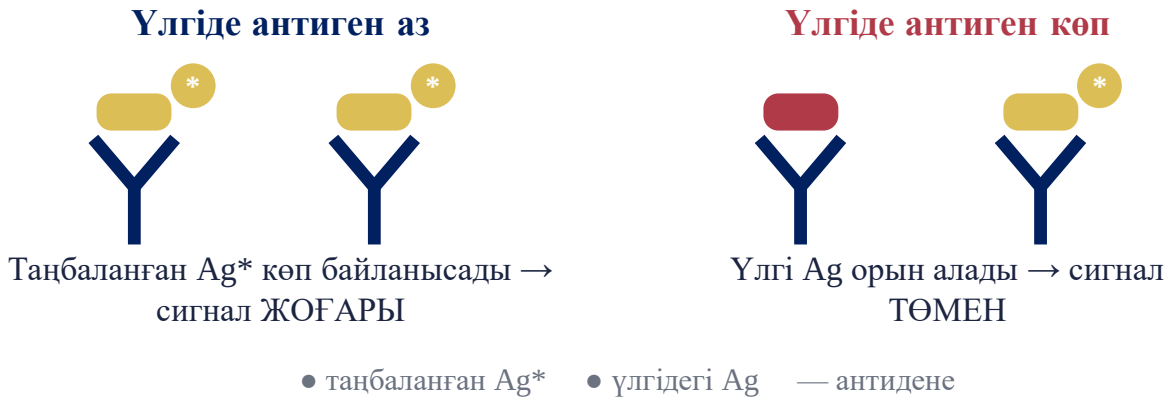
Шектеулері

- Нәтижені бағалау маман тәжірибесіне тәуелді
- Жартылай сандық (баллдық) баға

РАДИОИММУНДЫҚ ТАЛДАУ (RIA)

RIA – радиоактивті изотоппен (^{125}I, ^{3}H) таңбаланған антигеннің үлгідегі таңбаланбаған антигенмен **бәсекелес байланысуына** негізделген әдіс. 1960 жылы **Р. Ялоу** мен **С. Берсон** әзірлеген (Нобель сыйлығы, 1977).

Бәсекелес байланысу принципі



Калибрлеу қисығы: кері тәуелділік

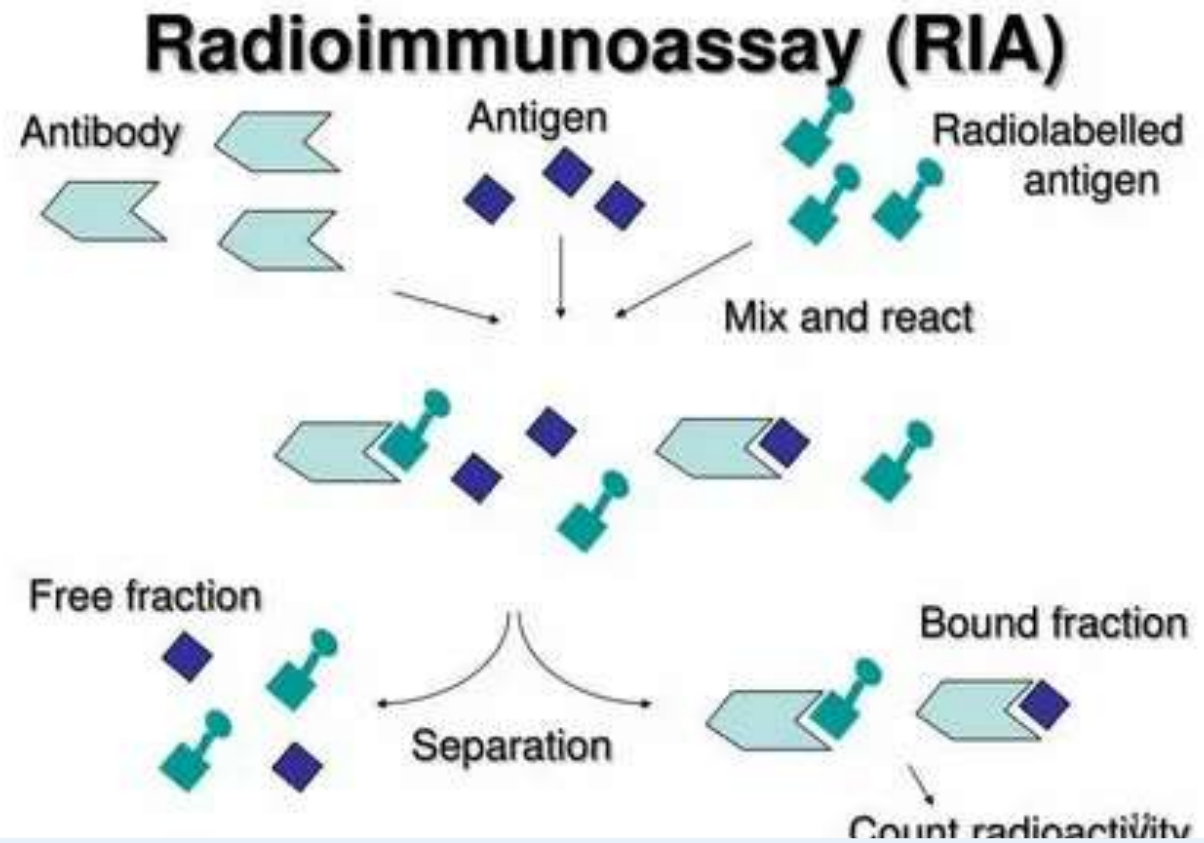


Артықшылықтары: өте жоғары сезімталдық (пг–фг деңгейі), шағын молекулаларды өлшеуге қолайлы

Шектеулері: радиоактивті материал, арнайы рұқсат пен қауіпсіздік, изотоптың сақтау мерзімі шектеулі

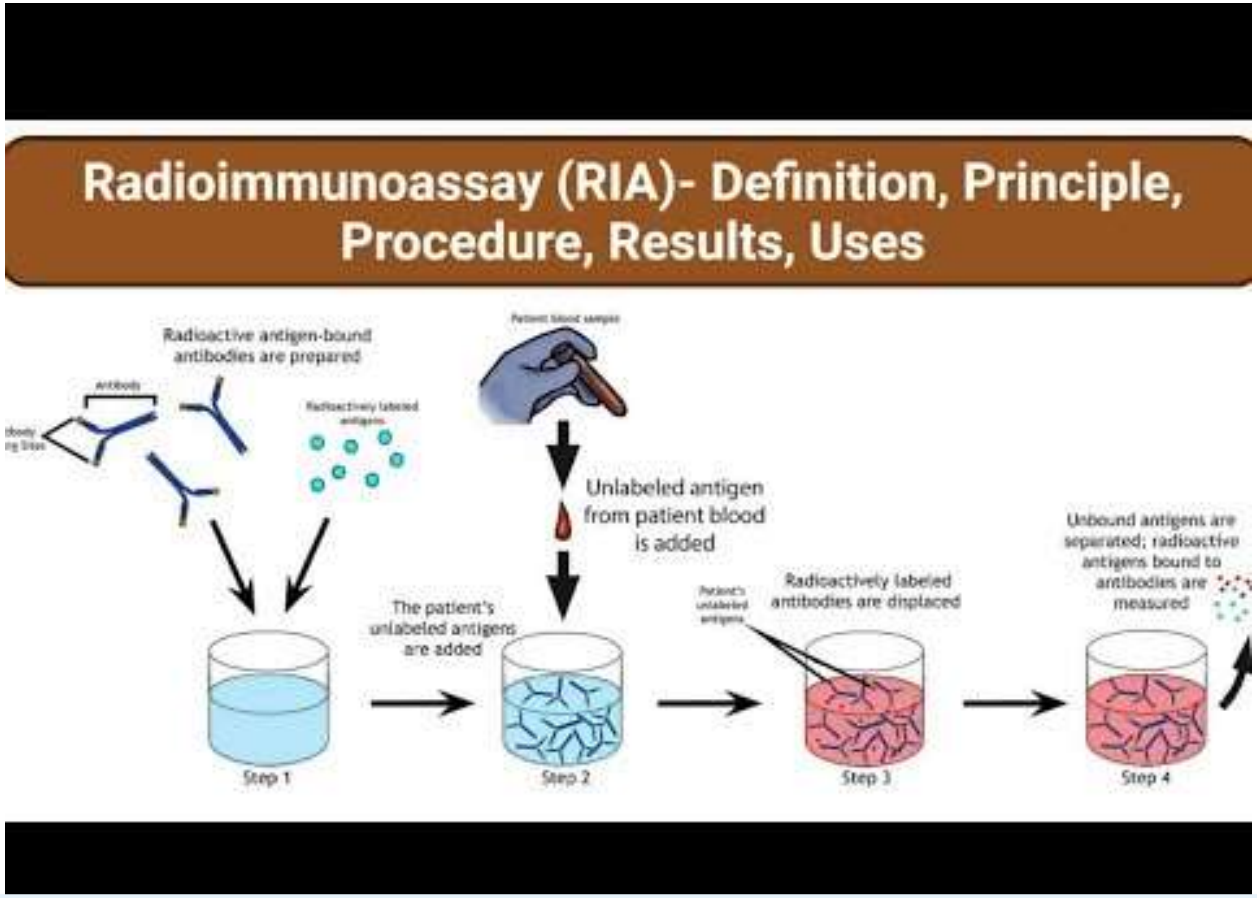
Қолданылуы: гормондар (инсулин, тироксин, кортизол), витаминдер, дәрілік заттардың концентрациясы. Қазір көбіне ELISA және хемилюминесценттік әдістермен алмастырылуда.

RIA: бәсекелес байланысу схемасы



RIA — белгіленген және белгіленбеген антигендердің байланысуы

RIA: детекция принципінің иллюстрациясы



Радиоиммундық сигналды тіркеу схемасы

RIA: қолданылу салалары

01

ГОРМОНДАР

Инсулин, тироксин, кортизол

02

ИНФЕКЦИЯ

Антигендер мен антиденелер

03

ОНКОЛОГИЯ

Ісік маркерлері

04

ЗЕРТТЕУ

Биоактивті молекулалар

05

ФАРМАКОЛОГИЯ

Дәрілік әсерді бақылау

06

ВЕТЕРИНАРИЯ

Гормоналды көрсеткіштер

MULTIPLEX ТАЛДАУ ЖӘНЕ ELISPOT

Multiplex талдау

Бір сынамада **бірнеше нысананы қатар** өлшейді. Әр нысанаға өзіндік оптикалық коды бар микросфера (бид) сәйкес келеді; оқу ағынды цитометрия принципімен жүреді.

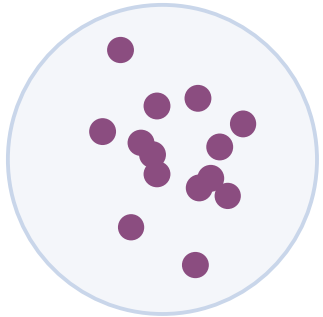


Әр бидтің түсі – нақты нысана; флуоресценция – оның мөлшері

Қолданылуы: цитокин панельдері, ісік маркерлері, инфекциялық антигендер. Бір үлгіден 10–50 көрсеткішті бір мезгілде алуға болады.

ELISPOT

Enzyme-linked immunospot – **жеке жасушаның** цитокин немесе антидене бөлу қабілетін өлшейді. Әр белсенді жасуша мембранада бір **дақ (spot)** қалдырады. 1983 жылы Черкинский әзірлеген.



Мембрана

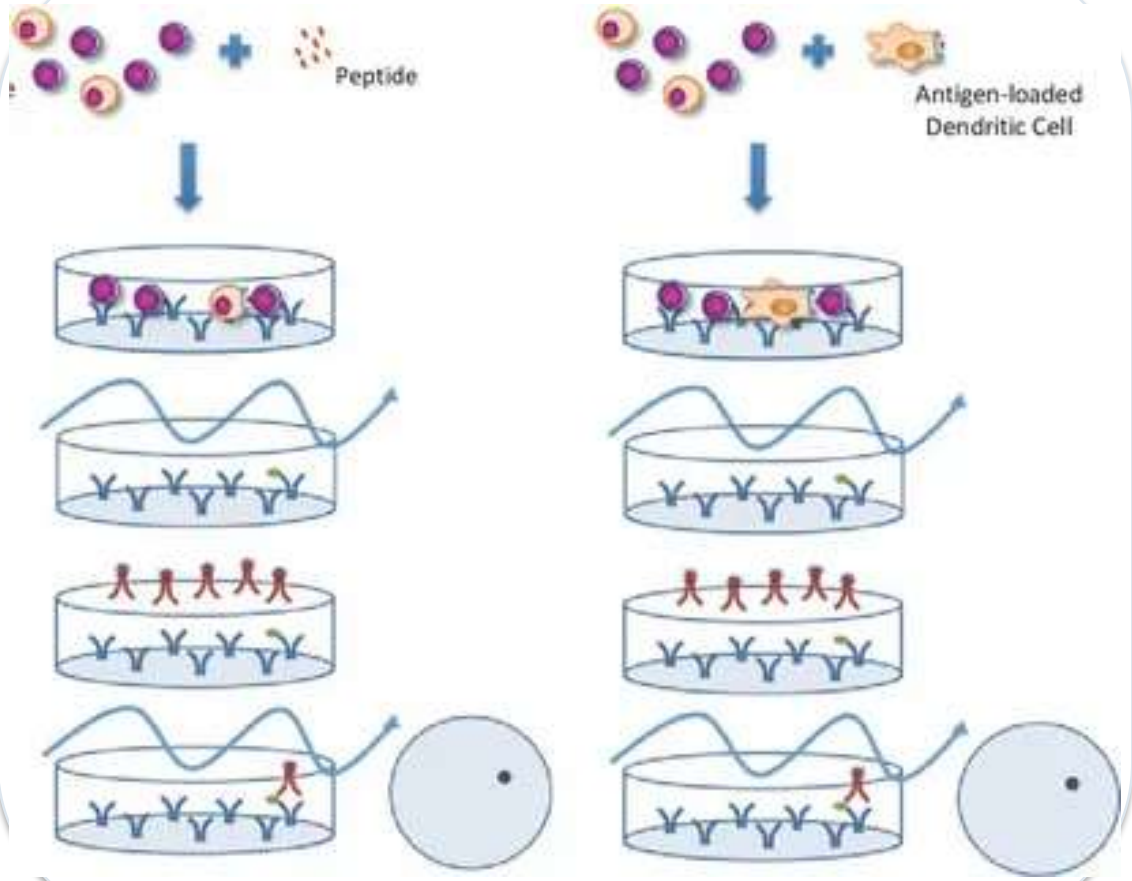
Бір дақ = бір белсенді жасуша.

Антигенге тән Т-жасушалардың жиілігін сандық бағалауға мүмкіндік береді.

Қолданылуы: вакцинаға жауапты бағалау, туберкулез диагностикасы (IFN-γ тестілері), ісікке қарсы Т-жасушалық жауап.

ELISPOT — жасушалық секрецияны бағалау

ENZYME-LINKED IMMUNOSPOT



- Жеке жасушалардың цитокин не антидене бөлу қабілетін анықтайды.
- Әрбір белсенді жасушадан пайда болған сигнал дақ (spot) түрінде көрінеді.
- Антигенге тән жасушалық иммундық жауапты бағалауға мүмкіндік береді.

ELISPOT: жұмыс кезеңдері

МЕМБРАНАДАҒЫ SPOT

01 Антиденемен қапталған мембрана дайындау

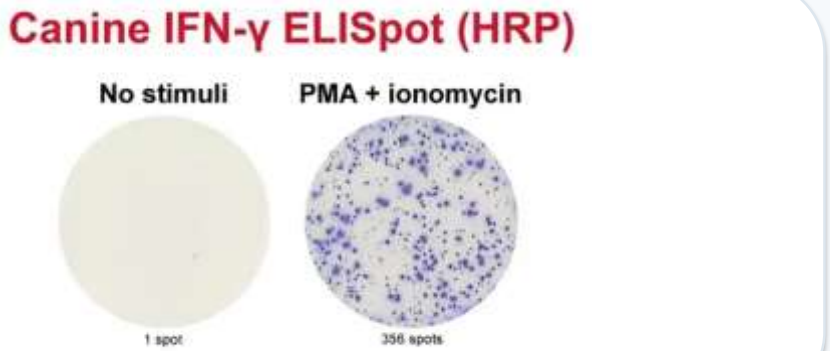
02 Жасуша және стимул енгізу

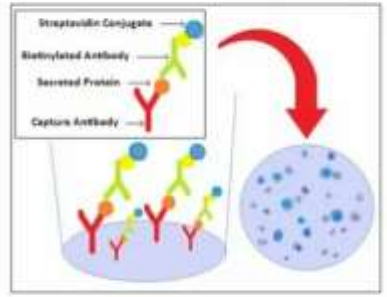
03 Секрецияланған молекуланы ұстау

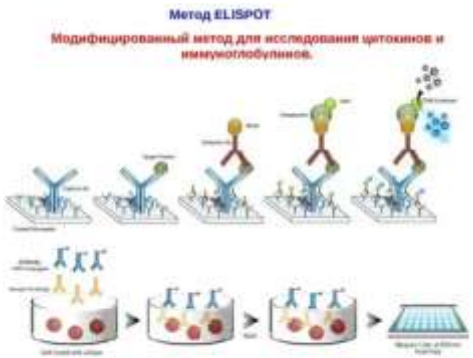
04 Детектор, фермент және субстрат

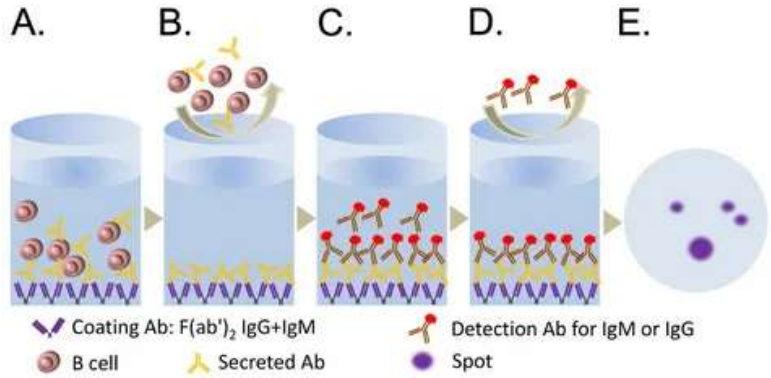
05 Дақтарды санап, нәтижені бағалау

ELISPOT нәтижелерінің көрнекі мысалдары









ELISPOT әдісінің бастапқы лекциядағы иллюстрациялары

ELISPOT: қолданылу салалары

01

Т- / В-ЖАСУША

Антигенге тән функционалдық жауап

02

ВАКЦИНА

Вакцинадан кейінгі жауап

03

ИНФЕКЦИЯ

IFN-γ жауаптары, соның ішінде ТБ

04

ОНКОЛОГИЯ

Ісікке қарсы жасушалық иммунитет

ИММУНОЛОГИЯЛЫҚ ӘДІСТЕРДІ САЛЫСТЫРУ

Әдіс	Нысана	Белгі	Нәтиже	Негізгі қолданылуы
IF	Жасуша/тіндегі антиген	Флуорофор	Көрнекі, жартылай сандық	Локализация, аутоантиденелер
ELISA	Еритін антиген/антидене	Фермент	Сандық	Серология, гормондар, маркерлер
FACS	Жеке жасушалар	Флуорофор	Сандық, көпөлшемді	Фенотиптеу, сұрыптау
IHC	Тіндегі антиген	Фермент (ДАБ)	Жартылай сандық	Онкопатология, диагностика
RIA	Еритін антиген	Радиоизотоп	Сандық	Гормондар, шағын молекулалар
Multiplex	Бірнеше еритін нысана	Кодталған бид	Сандық, көпнысаналы	Цитокин панельдері
ELISPOT	Жасушаның секрециясы	Фермент	Жасуша санын санау	Вакцина, ТБ, Т-жасушалық жауап

Әдістер бірін-бірі алмастырмайды, керісінше толықтырады: молекулалық, жасушалық және морфологиялық деңгейлер

ҚОРЫТЫНДЫ

1

Ортақ негіз

Барлық иммунологиялық әдістер антиген мен антиденеңің спецификалық байланысына негізделген. Нәтиженің дәлдігі антиденеңің спецификалығы мен аффиндігіне тәуелді.

2

Әдістің таңдауы

Әдіс зерттеу міндетіне қарай таңдалады: сандық өлшеу үшін – ELISA мен RIA, локализация үшін – IF пен IHC, жасушаларды талдау үшін – FACS пен ELISPOT.

3

Практикалық маңызы

Бұл әдістер клиникалық диагностиканың, вакцина мен дәрі әзірлеудің және іргелі иммунологиялық зерттеулердің негізгі құралы болып табылады.

БАҚЫЛАУ СҰРАҚТАРЫ

1. Антиген–антидене байланысының қандай қасиеттері иммунологиялық әдістердің негізі болып табылады?
2. Аффиндік пен авидтіктің айырмашылығы неде?
3. Тікелей және жанама иммунофлуоресценцияның айырмашылығы неде? Қайсысы сезімталырақ және неге?
4. ELISA-ның төрт форматын сипаттаңыз. Сэндвич-формат неге ең спецификалық?
5. Бәсекелес форматта сигнал мен концентрация арасындағы байланыс қандай?
6. FACS әдісінде FSC және SSC параметрлері нені білдіреді? Сұрыптау қалай жүзеге асады?
7. IHC мен IF әдістерінің қолданылуы қалай ерекшеленеді? Антигенді ашу неге қажет?
8. RIA, Multiplex және ELISPOT әдістері қандай көрсеткіштерді анықтайды?

ӘДЕБИЕТТЕР

1. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 10th ed. – Philadelphia: Elsevier, 2022. – 587 p.
2. Murphy K., Weaver C., Berg L. Janeway's Immunobiology. 10th ed. – New York: W.W. Norton & Company, 2022. – 912 p.
3. Parham P. The Immune System. 5th ed. – New York: W.W. Norton & Company, 2021.
4. Cossarizza A. et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (third edition) // Eur J Immunol. – 2021. – Vol. 51, № 12. – P. 2708–3145.
5. Fridman W.H. et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome // Nat Rev Cancer. – 2012. – Vol. 12. – P. 298–306.