

Реакции иммунного лизиса.

**Реакция связывания
комплемента (РСК).**

**Иммуноферментный анализ
(ИФА).** Иммуноблотинг.

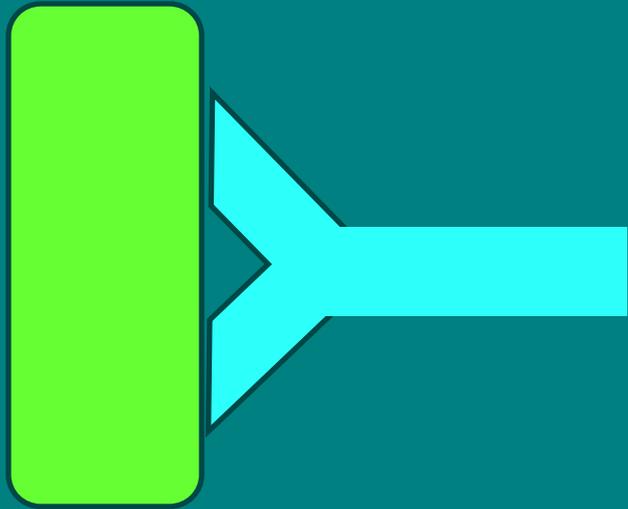
**Полимеразная цепная реакция
(ПЦР).**

Пути активации системы комплемента

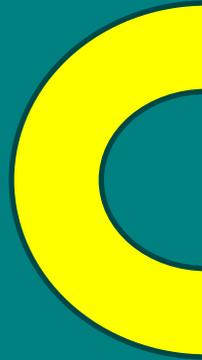


Рис. 1.15. Схема классического, лектинового и альтернативного путей активации комплемента. МСБ — маннозсвязывающий белок крови (черта над комплексом белков означает его ферментативную активность)

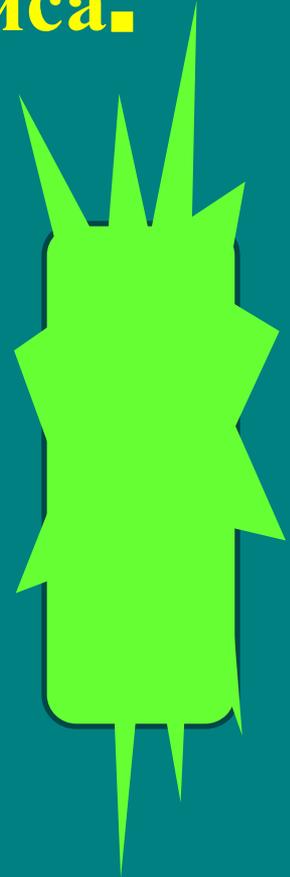
Принцип реакций иммунного лизиса.



+



=

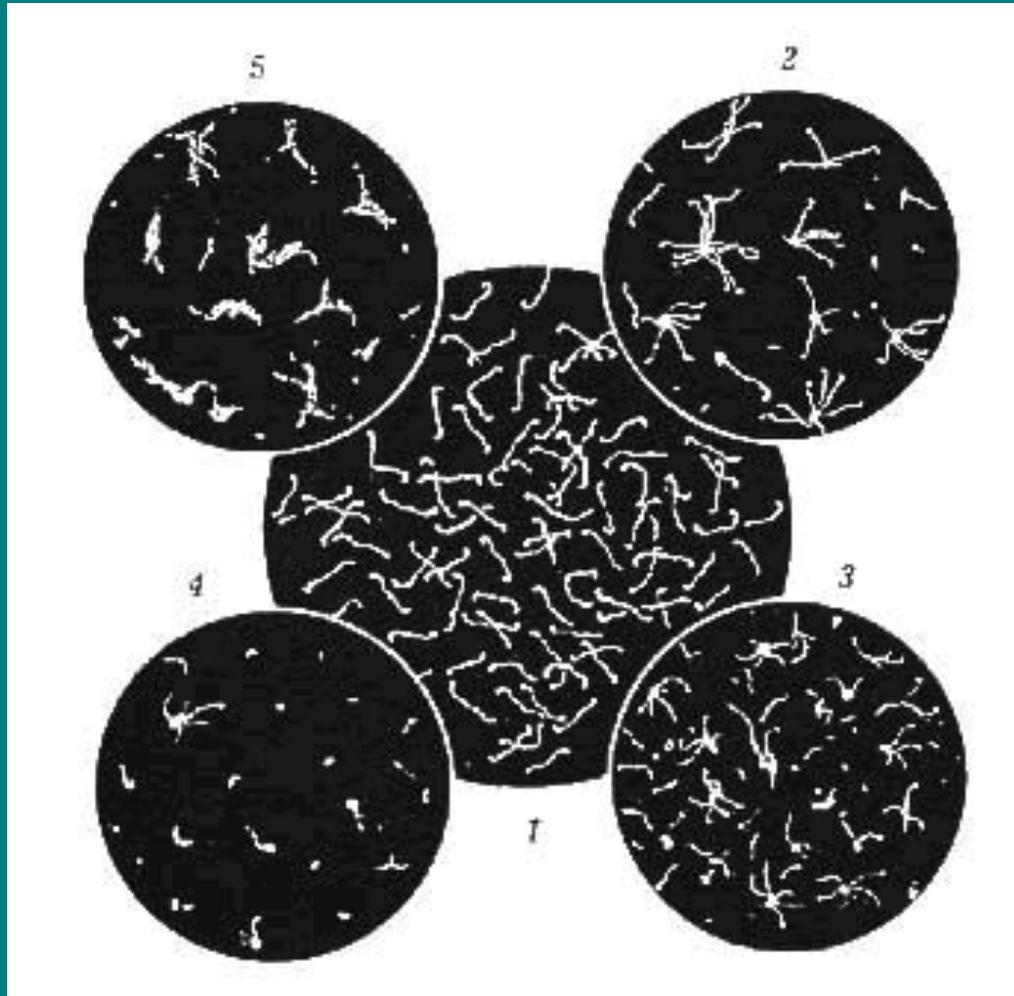


Клетка-мишень,
сенсibilизированная
антителами-лизинами

Комплемент

Лизис
клетки-
мишени

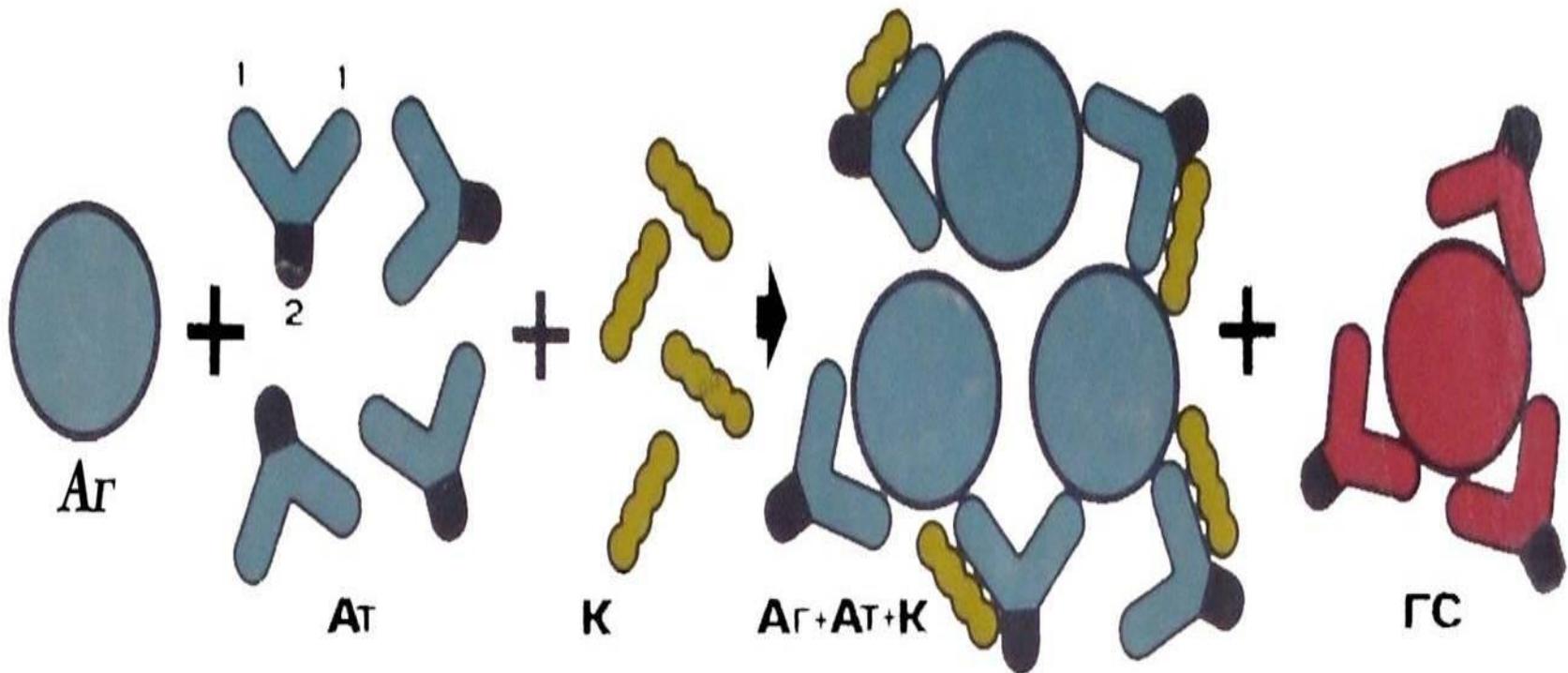
Реакция агглютинации и лизиса лептоспир



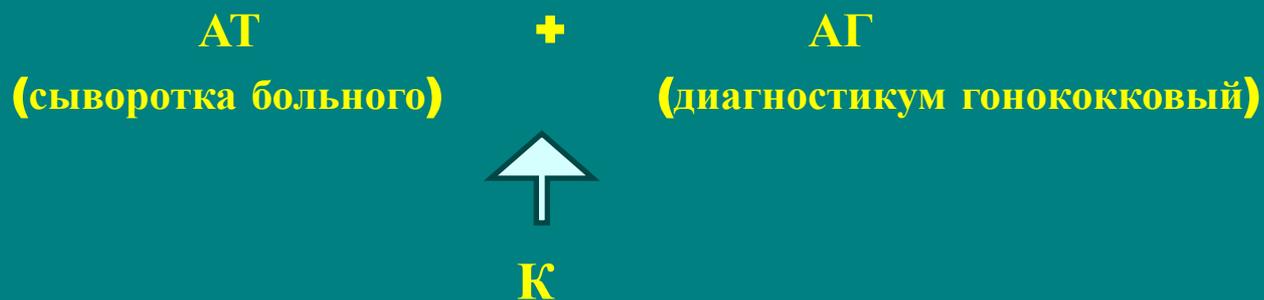
Реакция гемолиза



Реакція зв'язування комплекта (РСК)



1 фаза – диагностическая



2 фаза – индикаторная



Нет гемолиза

Реакция положительная

1 фаза – диагностическая

АГ
(сыворотка больного)



АГ
(диагностикум гонококковый)

К



2 фаза – индикаторная

АГ
(гемолитическая сыворотка кролика)

+

АГ
(эритроциты барана)

Гемолиз

Реакция отрицательная

Протокол. Реакция связывания комплемента

Исследуемый материал	Что сделать	Результат
Сыворотка больного	Поставить и учесть РСК	Заключение

Схема постановки основного опыта РСК

№ пробирок	1	2	3
Ингредиенты	Опыт	Контроль сыворотки	Контроль антигена
Сыворотка больного (разведение 1:5)	0,5 мл	0,5 мл	-
Антиген гонококковый для РСК (в рабочей дозе)	0,5 мл	-	0,5 мл
Комплемент (в рабочей дозе)	0,5 мл	0,5 мл	0,5 мл
Физ. р-р	-	0,5 мл	0,5 мл

37° С - 1 час

Гемолитическая система	1 мл	1 мл	1 мл
<i>37° C - 1 час</i>			
Учет результатов			

Конкурентный радиоиммунный анализ

Меченные изотопом
диагностические
антитела



Антитела
пациента

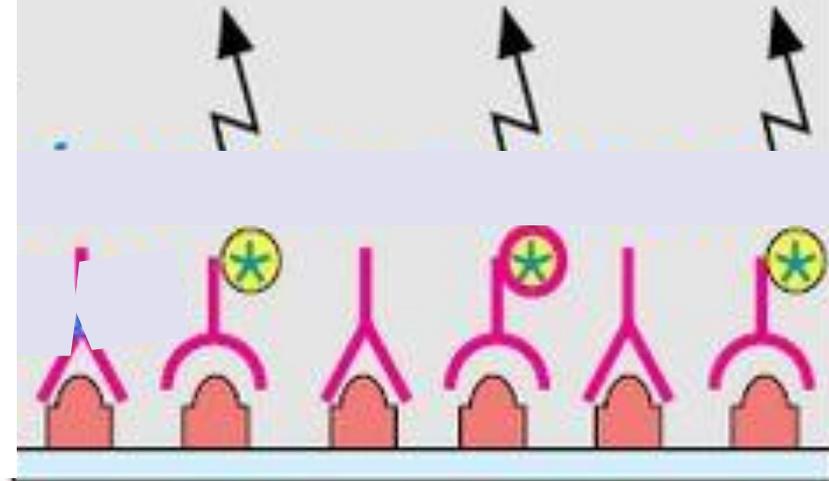


Антиген на твердой фазе

Высокий титр
антител - низкая
радиоактивность

Низкий титр
антител - высокая
радиоактивность

Измерение радиоактивности



Принцип: антитела пациента конкурируют с мечеными антителами за связывание с антигеном на твердой фазе

ИФА

Иммуноферментный анализ

- выявление антигенов или антител с помощью соответствующих им антител (антигенов), конъюгированных с ферментом-меткой (пероксидазой хрена, бета-галактозидазой или щелочной фосфатазой).

После соединения антигена с меченой ферментом иммунной сывороткой в смесь добавляют субстрат-хромоген.

Субстрат расщепляется ферментом, это приводит к изменению цвета продукта реакции: интенсивность окраски пропорциональна количеству иммунных комплексов.

Иммуноферментный анализ

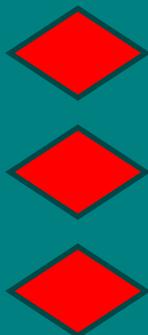
ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИГЕНОВ

ЛУНКА
С НАНЕСЕННЫМИ
ДИАГНОСТИЧЕСКИМИ
АНТИТЕЛАМИ

ИССЛЕДУЕМЫЙ
МАТЕРИАЛ,
СОДЕРЖАЩИЙ
АНТИГЕНЫ

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ
АНТИТЕЛА С ФЕРМЕНТОМ
(ПЕРОКСИДАЗОЙ)

СУБСТРАТ
К ФЕРМЕНТУ
(ТМБ – ТЕТРАМЕТИЛБЕНЗИДИН)



1 фаза

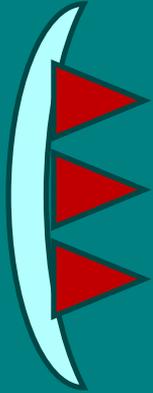
2 фаза

3 фаза

Иммуноферментный анализ

выявление антител

ЛУНКА
С НАНЕСЕННЫМИ
АНТИГЕНАМИ

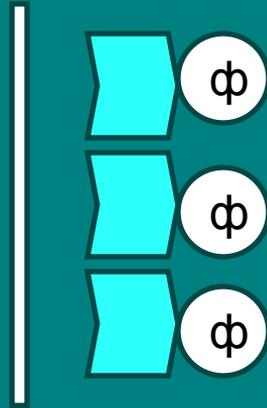


1 фаза

СЫВОРОТКА
БОЛЬНОГО



АНТИГЛОБУЛИНОВАЯ
СЫВОРОТКА
С ФЕРМЕНТОМ
(ПЕРОКСИДАЗОЙ)



2 фаза

СУБСТРАТ
К ФЕРМЕНТУ
(ТМБ –
ТЕТРАМЕТИЛБЕНЗИДИН)



3 фаза

БЛОТ
С НАНЕСЕННЫМИ
АНТИГЕНАМИ
ВПГ-1 И ВПГ-2

ИММУНОБЛОТИНГ (Herpes Simplex Virus Ig)

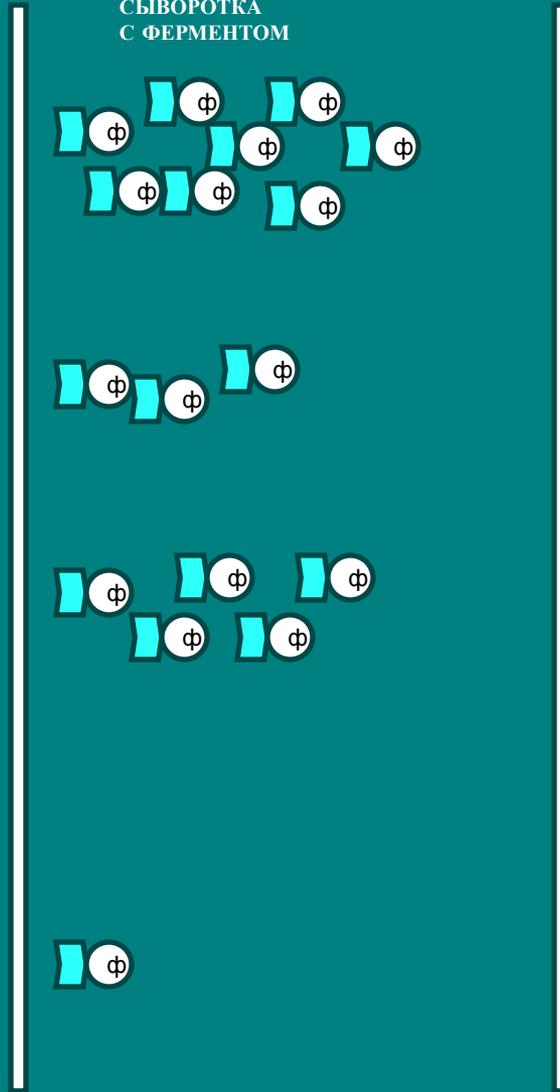
СЫВОРОТКА
БОЛЬНОГО

АНТИГЛОБУЛИНОВАЯ
СЫВОРОТКА
С ФЕРМЕНТОМ

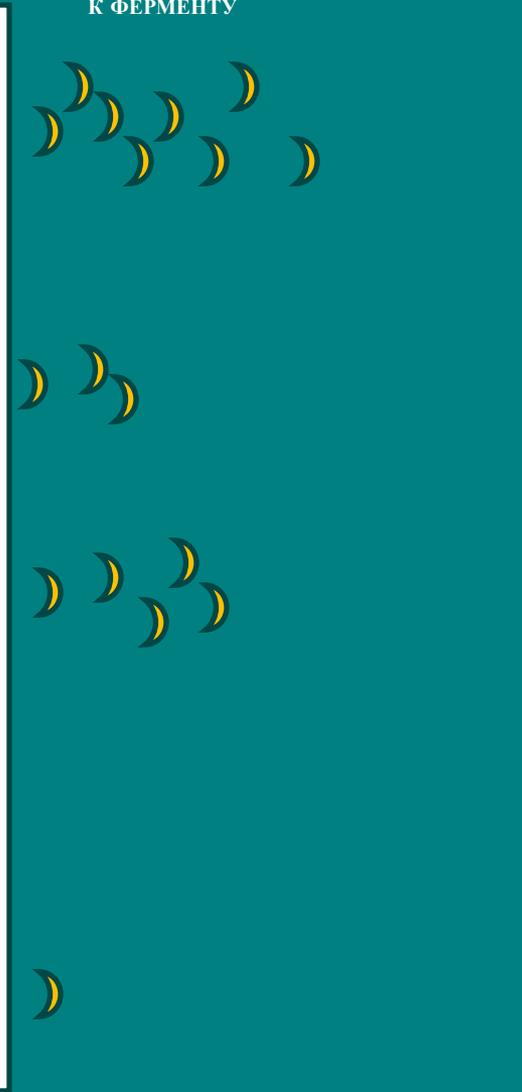
СУБСТРАТ
К ФЕРМЕНТУ



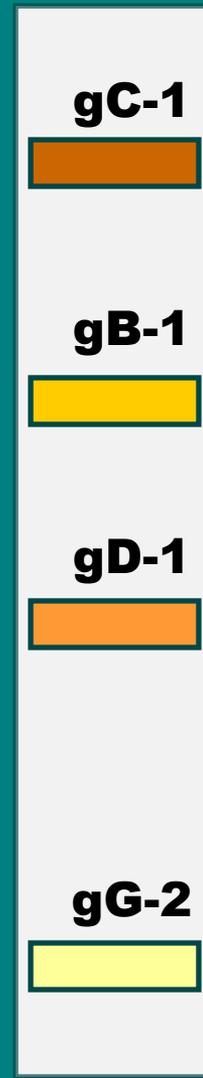
1 фаза

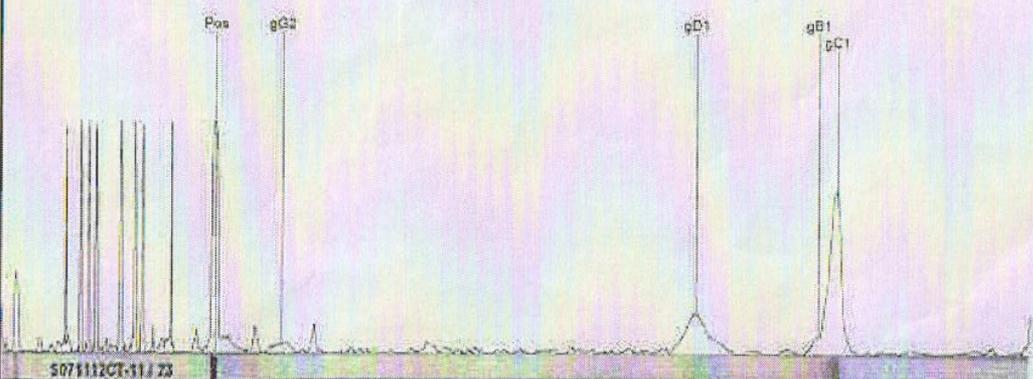


2 фаза



3 фаза





Molecular weight	char	o	(+)	+
gC-1; 130 kDa	+			
gB-1; 120 kDa	(+)			
gD-1; 60 kDa	+			
gG-2	o			
Positioning mark	o			

Class	Explanation
o	no staining
(+)	weak staining
+	strong staining

Test	Result
Herpes Simplex Virus IgG	HSV 1 positive HSV 2 negative

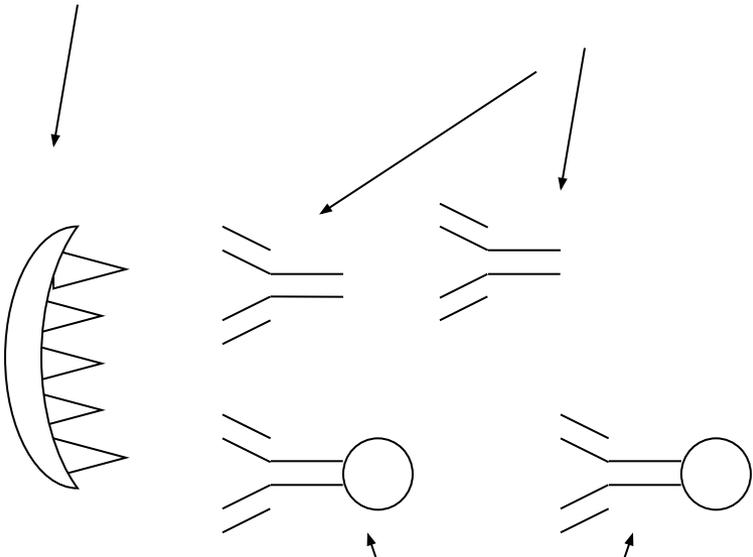
Определение Ig G

Протокол. Иммуноферментный анализ

Исследуемый материал	Что сделать	Результат
Сыворотка крови больного	Определить наличие антител к HBcAg. Учесть результаты ИФА, дать заключение, зарисовать	Рисунок, заключение

Лунка с НВсAg

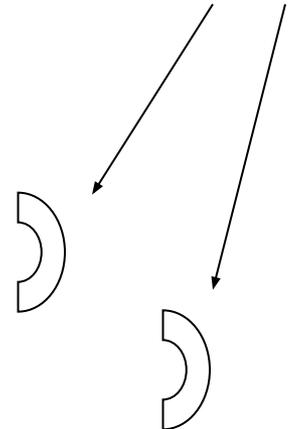
Антитела больного



Антитела к НВсAg конъюгированные с пероксидазой

I фаза

Субстрат к ферменту (тетраметилбензидин)



II фаза

ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТЕЛ к НВсAg вируса гепатита В (Конкурентный ИФА)

1

2

3

4

A							
B							
C							
D							
E							
F							
G							
H							

Получены показатели ОП исследуемых сывороток.

Оранжевый A1=0,963(-)	Бесцветный A2=0,320 (+)
Оранжевый B1=1,023 (-)	Бесцветный B2=0,400 (+)
Бесцветный C1=0,066 (+)	Бесцветный C2=0,221 (+)
Бесцветный D1=0,066 (+)	Оранжевый D2=1,020 (-)
Оранжевый E1=1,102 (-)	Оранжевый E2=0,650 (-)
Бесцветный F1=0,102 (+)	Оранжевый F2=0,854 (-)
Оранжевый G1=1,002 (-)	Оранжевый G2=0,730 (-)
Оранжевый H1=1,320 (-)	Оранжевый H2=0,620 (-)

1

2

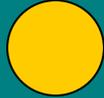
3

4

A



B



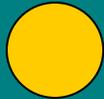
C



D



E



F



G



H



ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ



Полимеразная цепная реакция (ПЦР) —

метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе). ПЦР — гибридный метод, основанный на принципе комплементарности

1953 открытие
двойной спирали
ДНК (Уотсон и Крик)

1983 изобретение ПЦР
(Кэри Маллис)

1993 за изобретение
ПЦР Кэри Маллису
вручена
нобелевская
премия по химии

1993 изобретение
ПЦР в реальном
времени

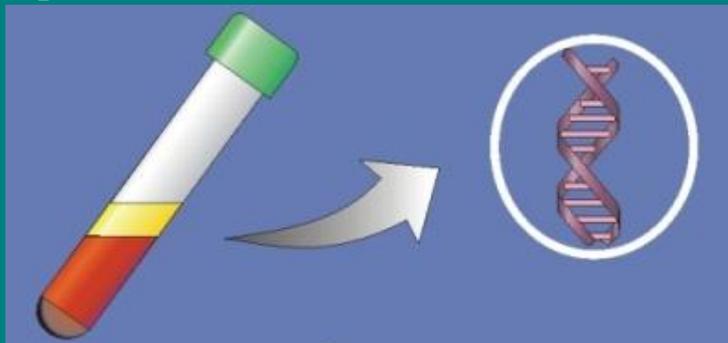
Kary B. Mullis – Autobiography



My father Cecil Banks and mother, formerly Berni Barker grew up in rural Carolina in the foothills of the Ridge Mountains. My dad had a general store, which I saw. My grandparents had already died before I was noticing things. My mother's parents were close to me during my childhood, and my father Albert stopped by in a non-substantial for a way out of this world in California.

Этапы классического ПЦР-анализа

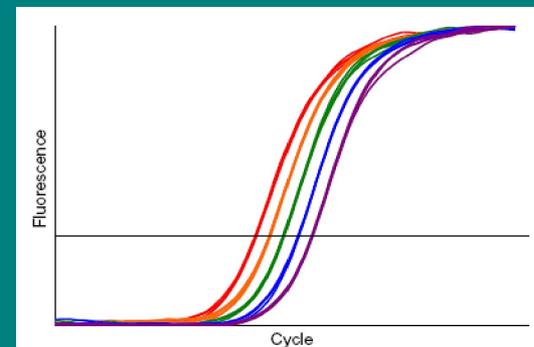
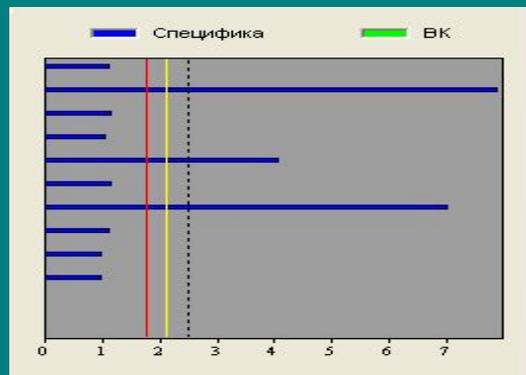
1. Пробоподготовка



2. Амплификация



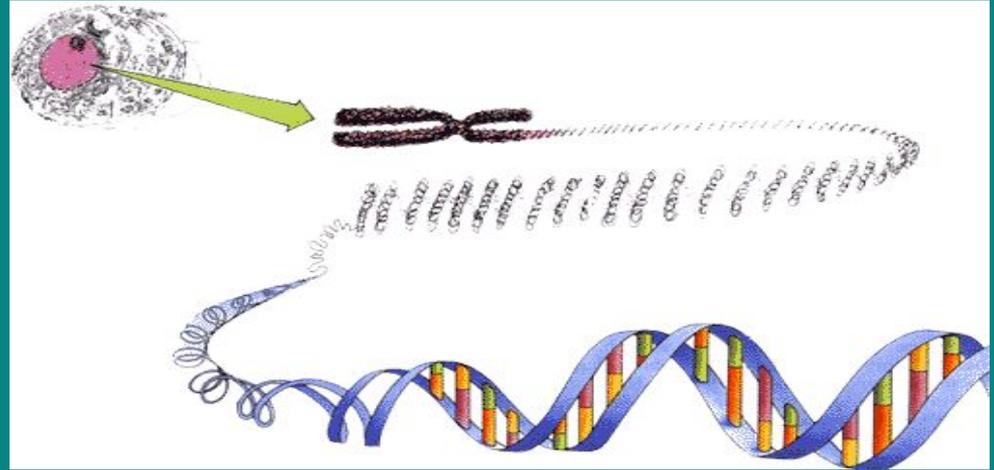
3. Детекция результатов



Пробоподготовка – выделение нуклеиновых кислот

Основные задачи

1. Максимальный выход НК
2. Удаление ингибиторов ПЦР
3. Удаление или ингибирование нуклеаз
4. Очистка НК



ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ:

- лизис
- изоляция НК
- освобождение от ингибиторов
- элюция (переведение НК в раствор)

Минимальный состав смеси для ПЦР

• ДНК-матрица

• олигонуклеотидные праймеры

• смесь dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)

• полимераза

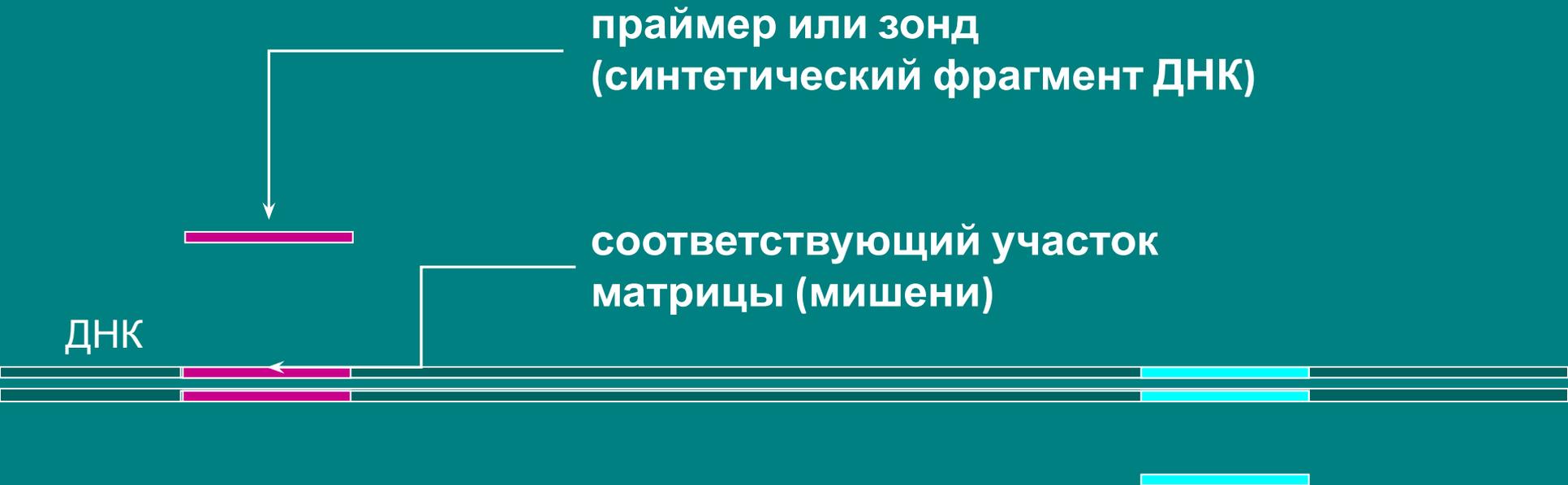
• буферный раствор, содержащий ионы Mg^{2+}

Аmplификация – увеличение количества **ампликонов** в ходе многократно (обычно 30-50 раз) повторяющихся циклов (раундов) денатурации, гибридизации и удлинения цепей

Этапы ПЦР

- Денатурация ДНК ($\sim 95^{\circ}$ C)
- Отжиг (гибридизация) праймеров на ДНК ($\sim 55^{\circ}$ C)
- Синтез фрагмента ДНК (элонгация) с помощью термостабильной ДНК-полимеразы ($\sim 72^{\circ}$ C)

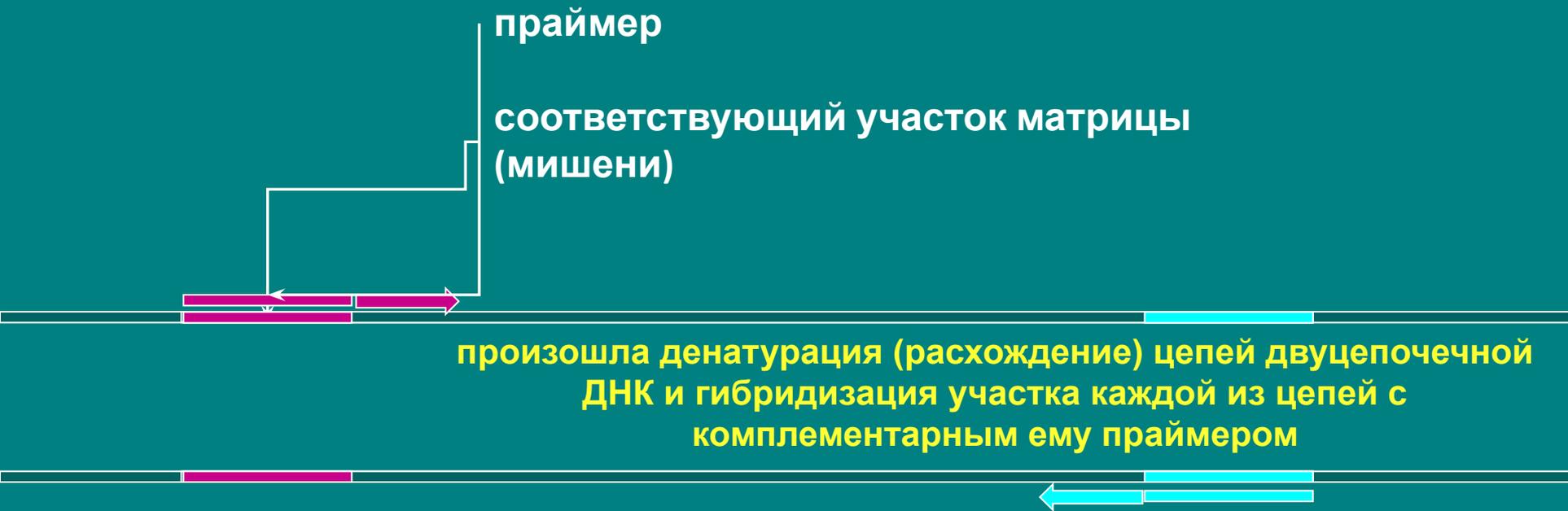
Реакция повторяется 30-50 циклов, количество специфического фрагмента ДНК возрастает в 1-10 млн. раз



праймеры – короткие синтетические молекулы ДНК, ограничивающие синтезируемый фрагмент

гибридизация – образование комплекса праймера и матрицы:

возможна при разделении нитей ДНК

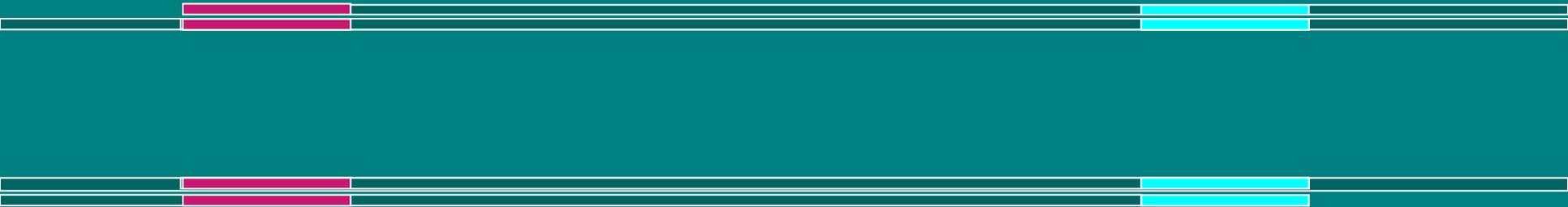


Фермент ПЦР –Taq полимераза (выделена из бактерии *Thermus aquaticus*)

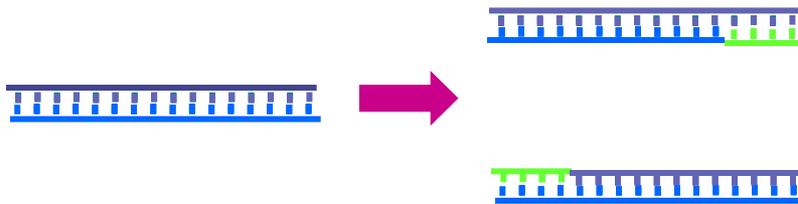
Термостабильна - может выдерживать длительное нагревание при 95⁰С и многократную смену температуры с сохранением активности

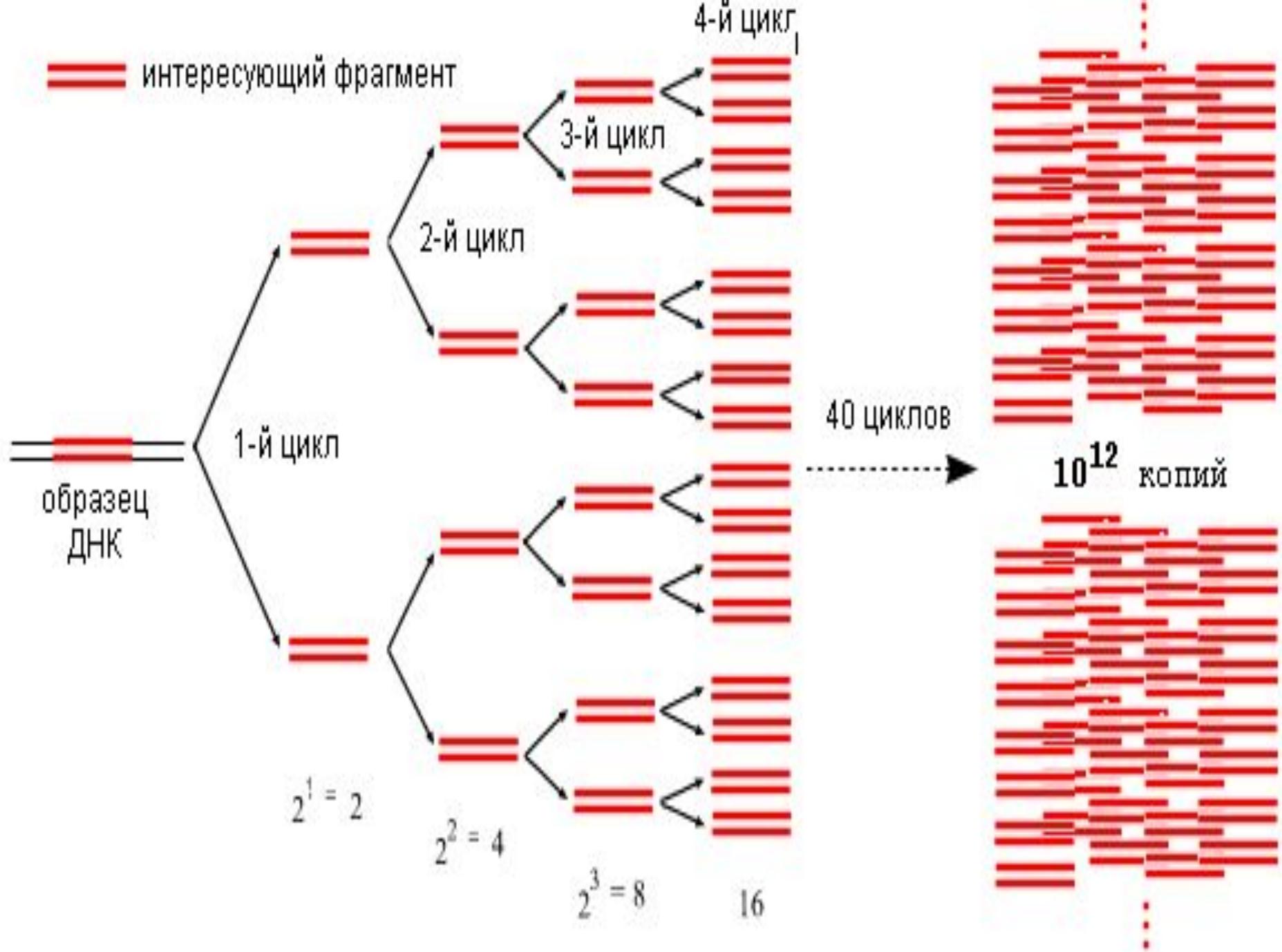
Удлинение цепей ДНК-полимеразой

Продукт ПЦР – двуцепочечный специфический фрагмент ДНК (ампликон)



стандартный температурный режим одного цикла





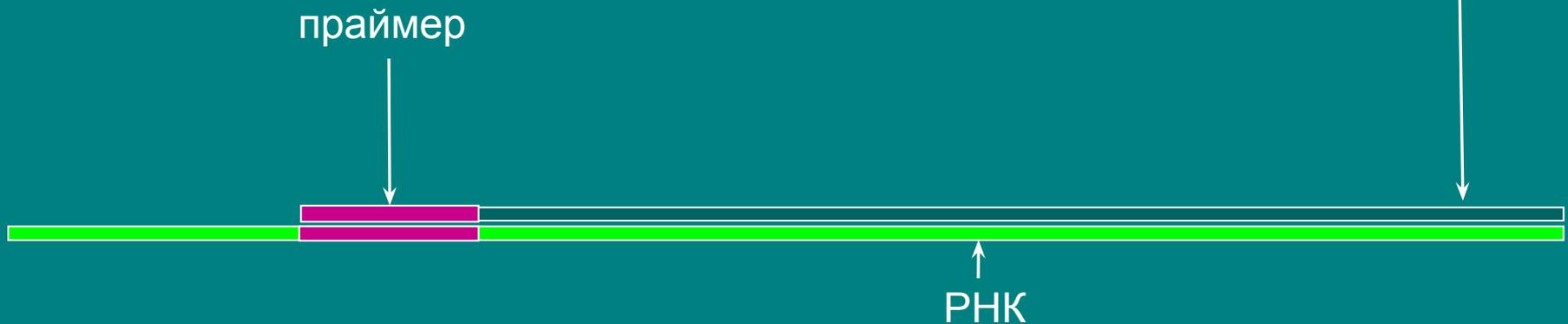
Обратная транскрипция и ПЦР

Дополнительная стадия для РНК-содержащих возбудителей

РНК не может быть матрицей для ПЦР!

← далее ПЦР по описанной выше схеме

Фермент – обратная транскриптаза (ревертаза)



ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с предшествующей ей стадией обратной транскрипции

Детекция результатов

*По конечной точке
(после окончания реакции)*

*В реальном
времени
(после каждого
цикла)*

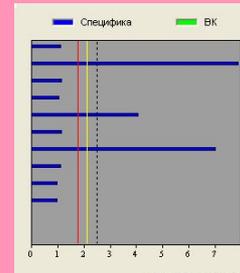
Электрофорез



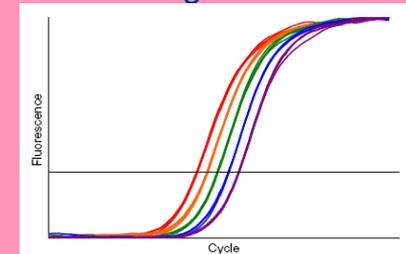
ГИФА



FLASH



Реал-



Детекция

электрофорезом

Разделение фрагментов ДНК (ампликонов) в геле в соответствии с их зарядом и линейными размерами



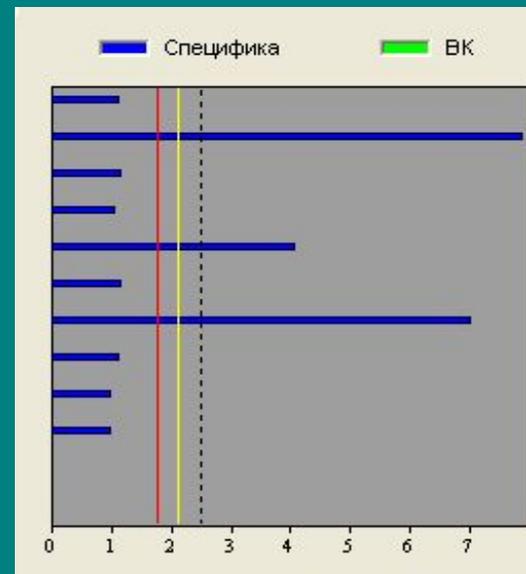
ГИФА – гибридационный иммуоферментный (вариант анализа «по конечной точке»)



Детекция в формате FLASH

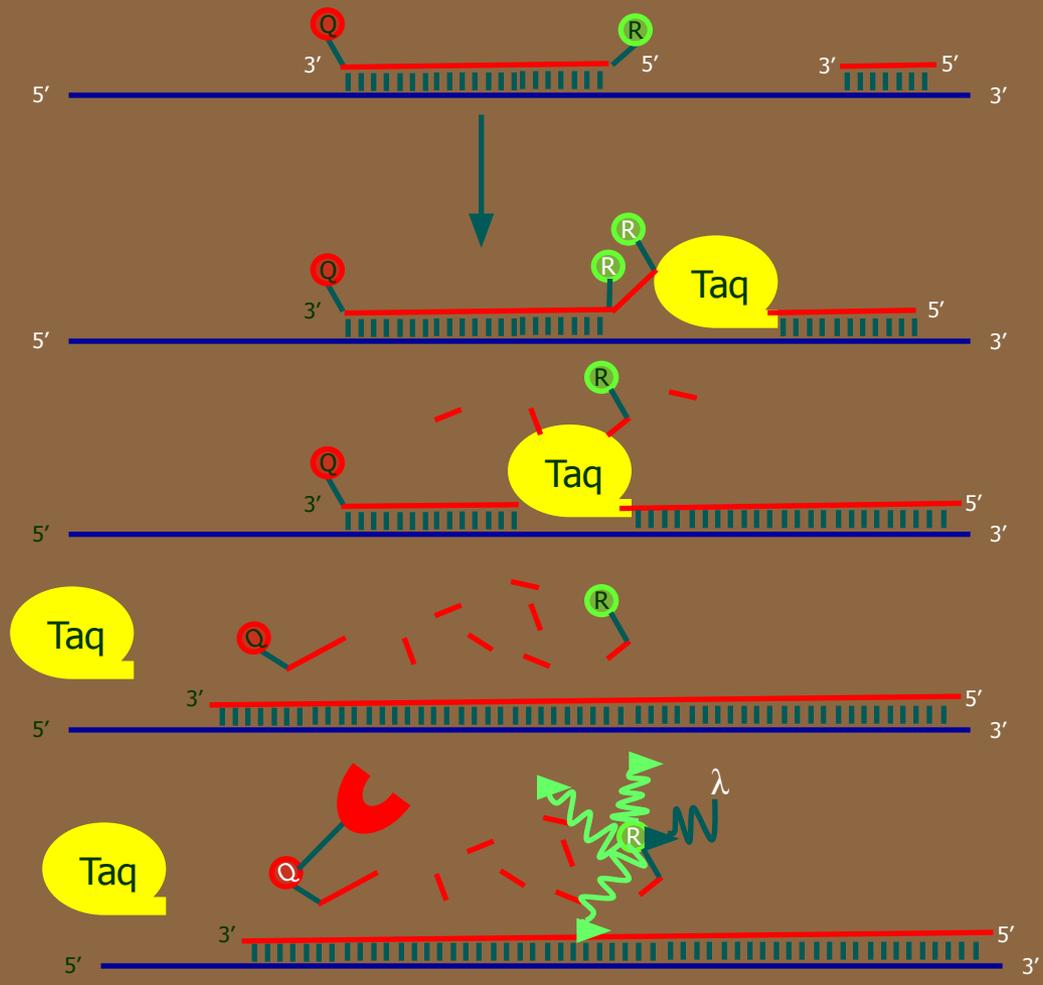
- Вариант детекции «по конечной точке»
- Аналитический сигнал – прирост флуоресценции после окончания реакции

Пробирка	Образец	Результат	Специфика	ВК
1/108		-	1,16	
2/108		+	7,90	
3/108		-	1,17	
4/108		-	1,09	
5/108		+	4,10	
6/108		-	1,19	
7/108		+	7,05	
8/108		-	1,16	
19/фон(ralstonia)	фон	фон	1,00	
20/фон(ralstonia)	фон	фон	1,00	

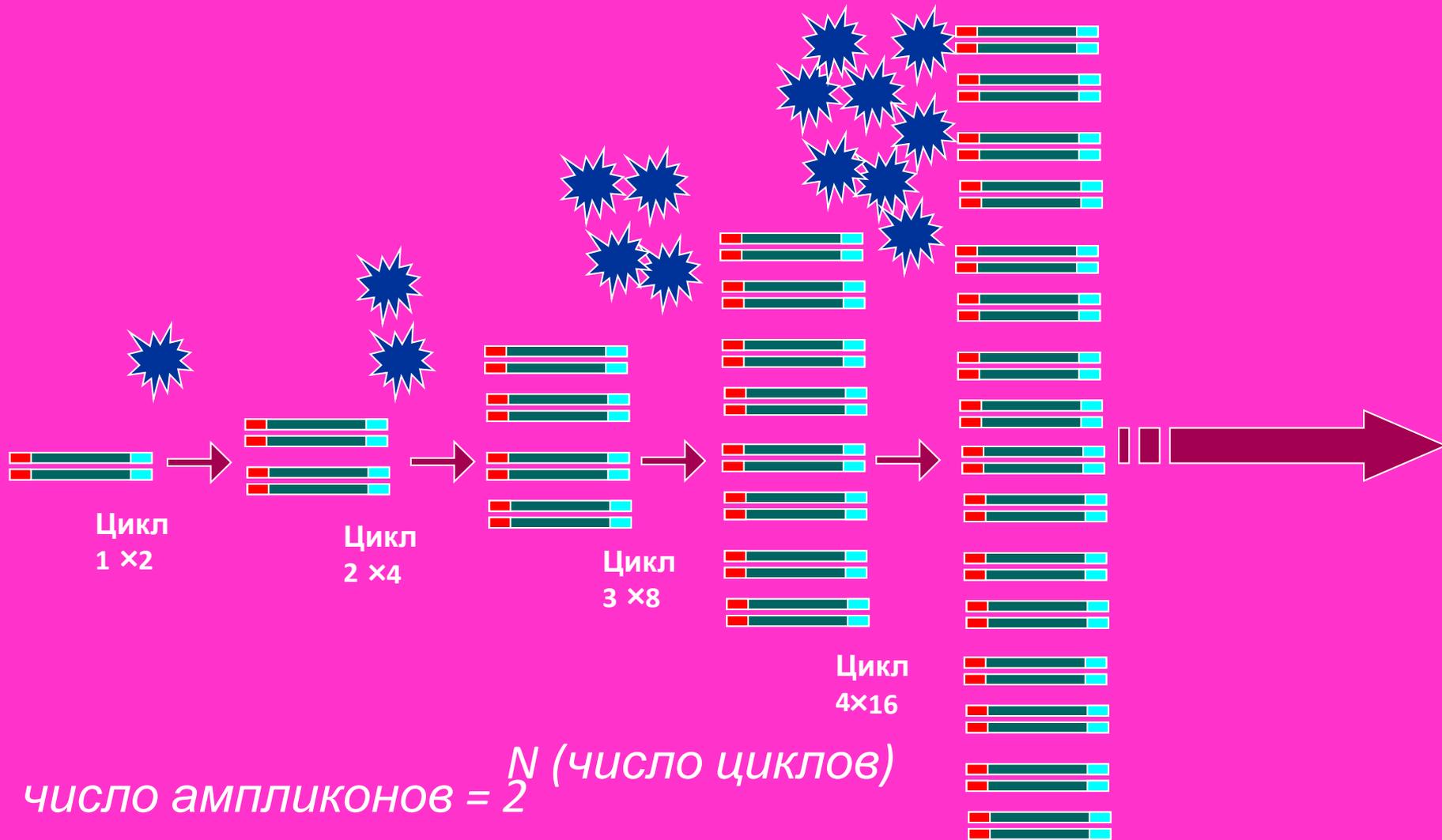


Детекция продуктов ПЦР в режиме реального времени

Технология TaqMan

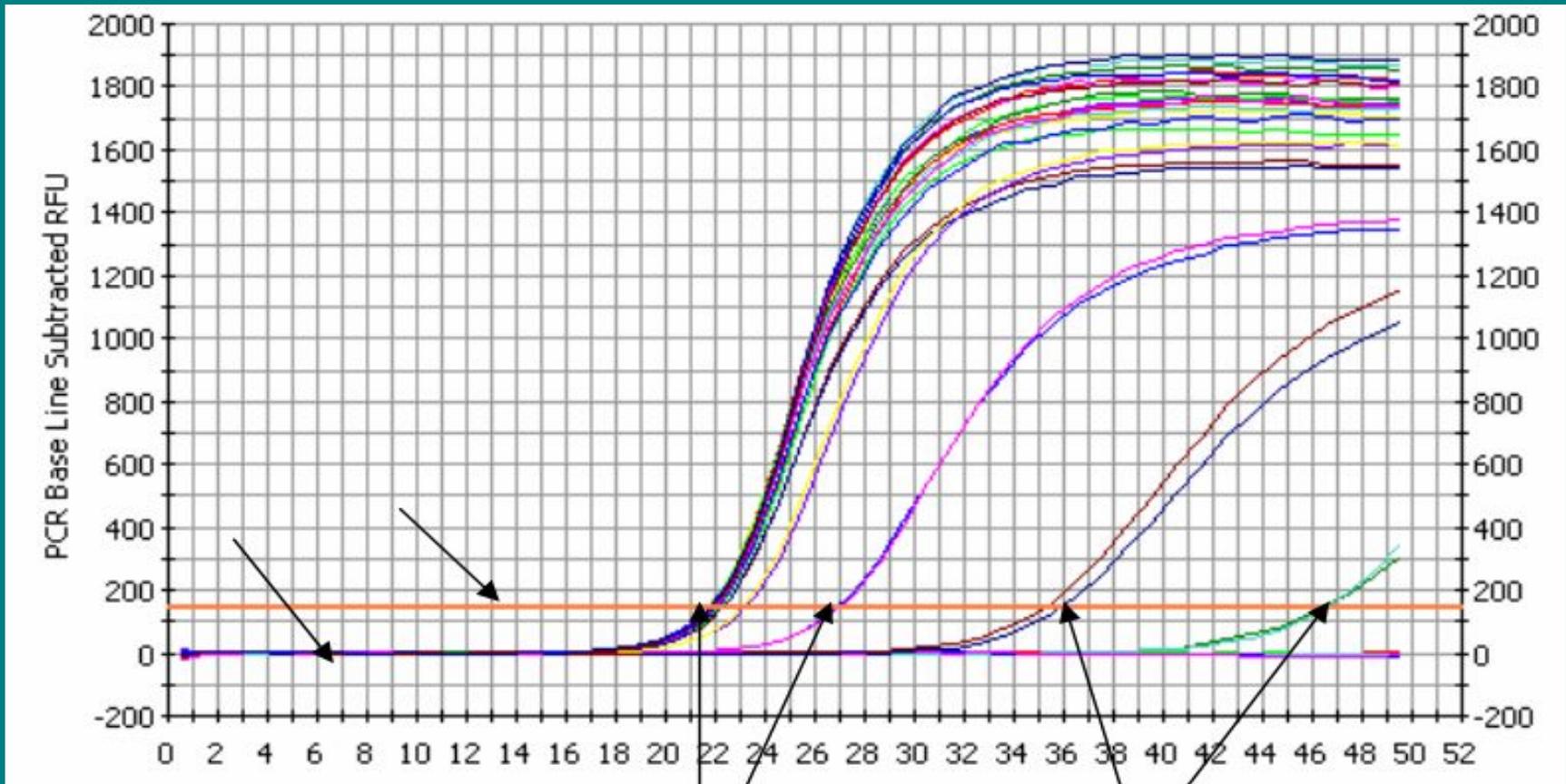


Накопление продукта амплификации



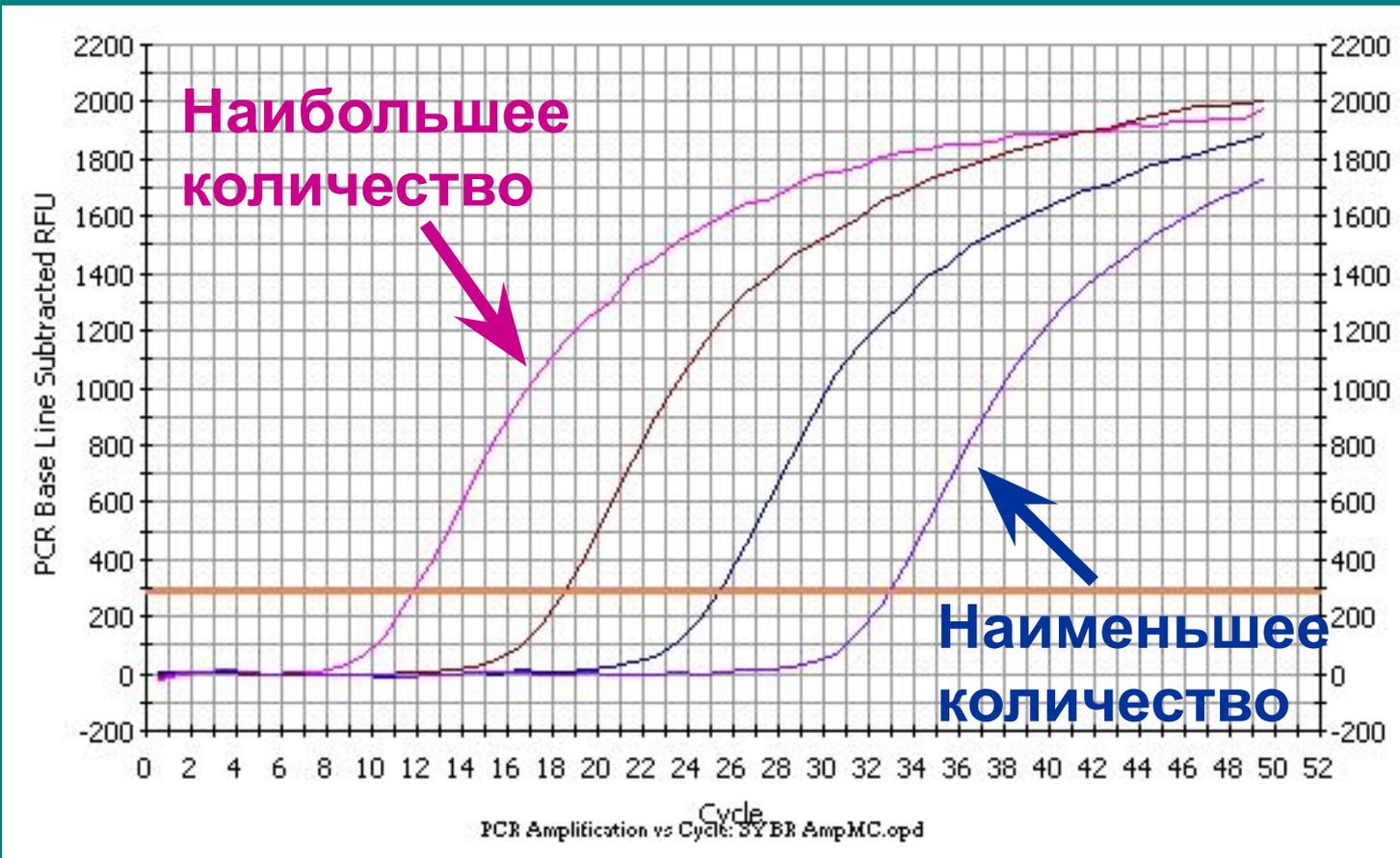
«Пороговый цикл» Ct

Пороговый цикл Ct – значение цикла амплификации, на котором флуоресценция зонда превысила значение фоновой флуоресценции



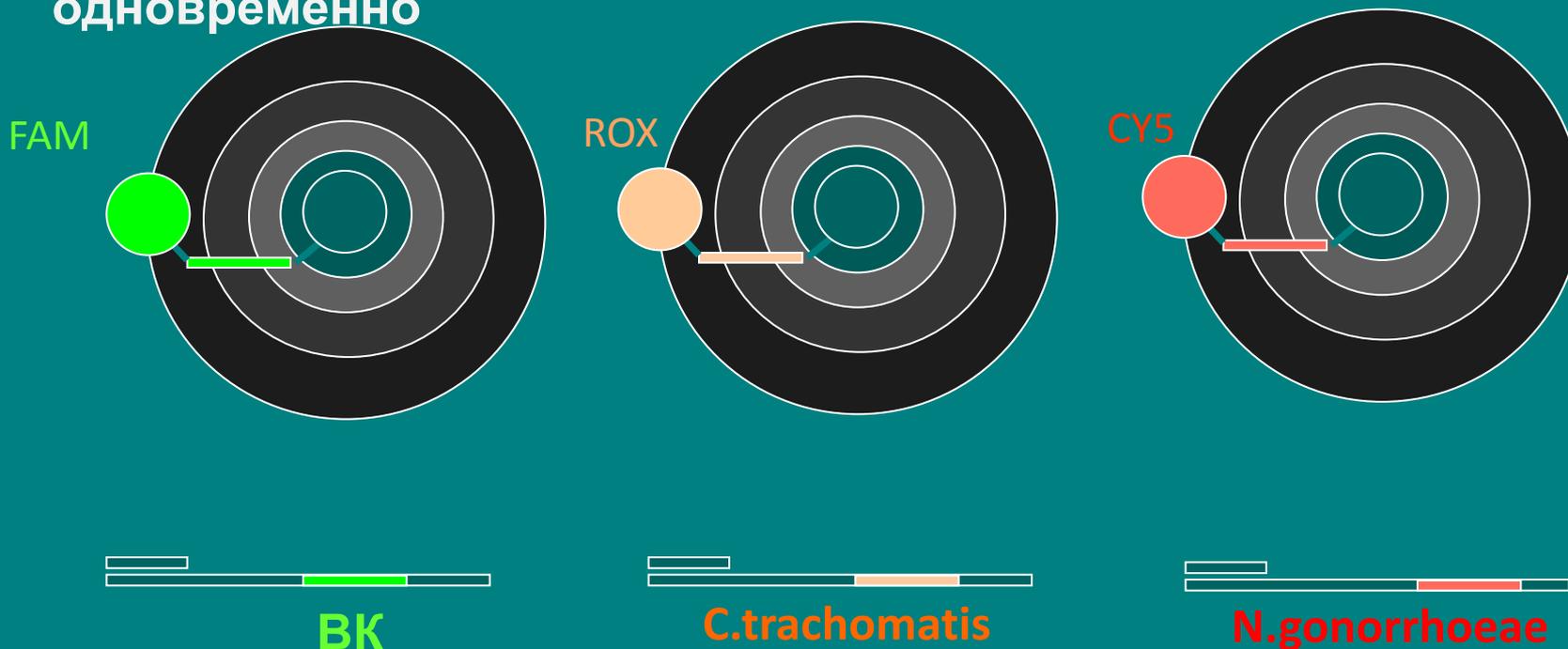
«Пороговый
цикл»

Чем больше значение C_t , тем меньше концентрация исходной НК



Многоканальная детекция и мультиплексный анализ

Мультиплексирование: возможность исследовать несколько маркеров одновременно



Две (или более) разные мишени в одной и той же пробе могут быть одновременно выявлены в одном анализе с помощью зондов с разными красителями !

АМПЛИФИКАТОРЫ



Cobas TaqMan



DT-96



iQ 5



CFX 96



Stratagene Mx3005P



SmartCycler II



Rotorgene 6000



One Step Plus



AHK-32

АВТОМАТИЧЕСКАЯ СТАНЦИЯ Tecan Freedom EVO



TECAN Freedom EVO 150, 8 каналов дозирования