



Основные методы оценки иммунной системы

Чибулаева В.В. 340гр

Методы

- ИФА
- Метод моноклональных антител
- ПЦР
- Проточная лазерная цитометрия

ИФА

Это выявление антигенов с помощью соответствующих им антител, конъюгированных с ферментом-меткой (пероксидазой хрена, бета-галактозидазой и или щелочной фосфатазой). После соединения антигена с меченой ферментом иммунной сывороткой в смесь добавляют субстрат/хромоген. Субстрат расщепляется ферментом и изменяется цвет продукта реакции - интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.

Твердофазный ИФА - вариант теста, когда один из компонентов иммунной - реакции (антиген или антитело) сорбирован на твердом носителе. Компоненты выявляют добавлением меченых антител или антигенов. При положительном результате изменяется цвет хромогена. Каждый раз после добавления очередного компонента из лунок удаляют не связавшиеся реагенты путем промывания.



НЕПРЯМАЯ РЕАКЦИЯ

ПРЯМАЯ РЕАКЦИЯ

ПРЯМАЯ РЕАКЦИЯ

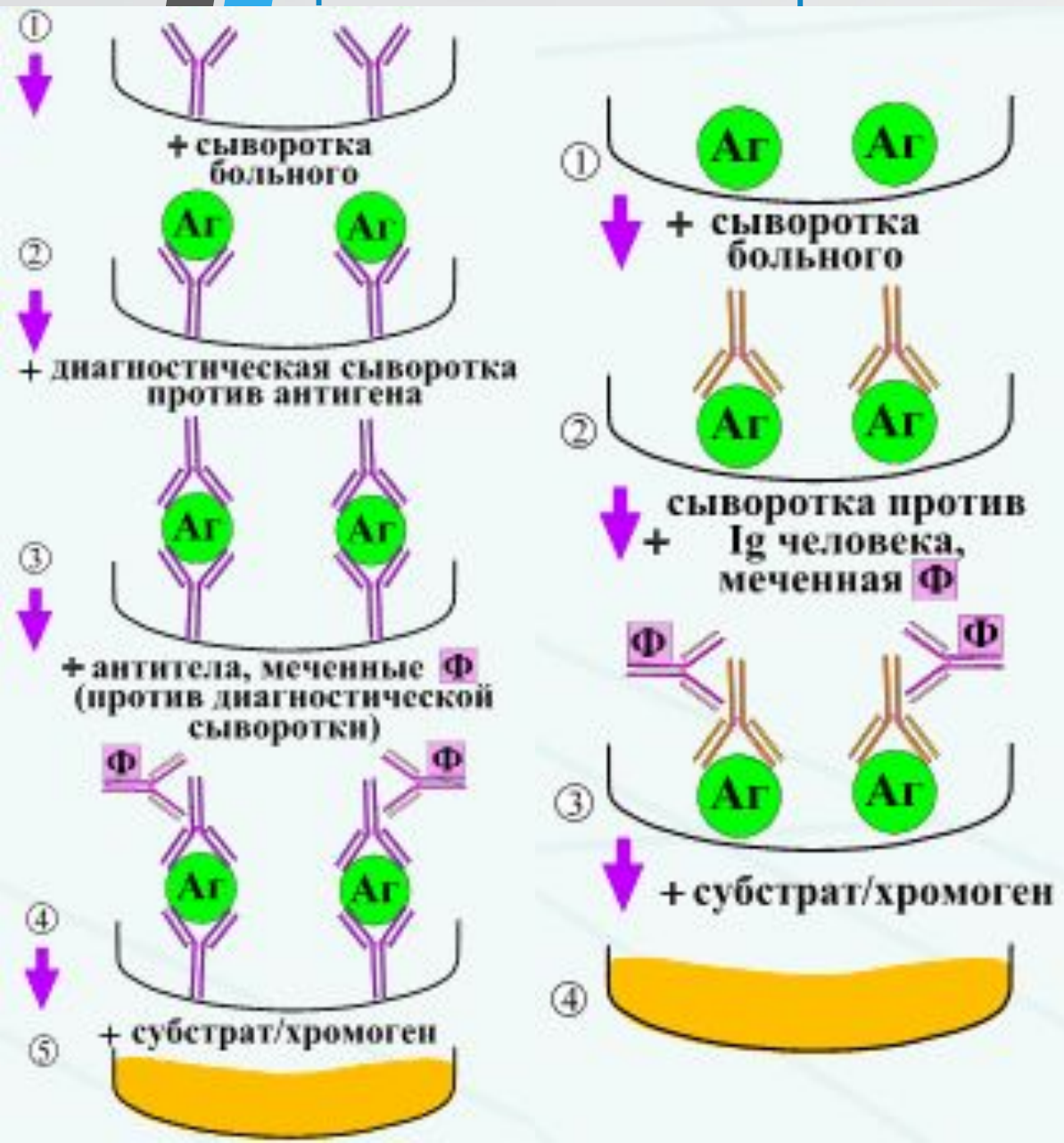
Ингредиенты:

1. Антиген-чистая культура
2. Антитело1 – диагностическая сыворотка на твердом носителе
3. Антитело2 – диагностическая специфическая сыворотка меченная пероксидазой хрена
4. Субстрат для фермента

НЕПРЯМАЯ РЕАКЦИЯ

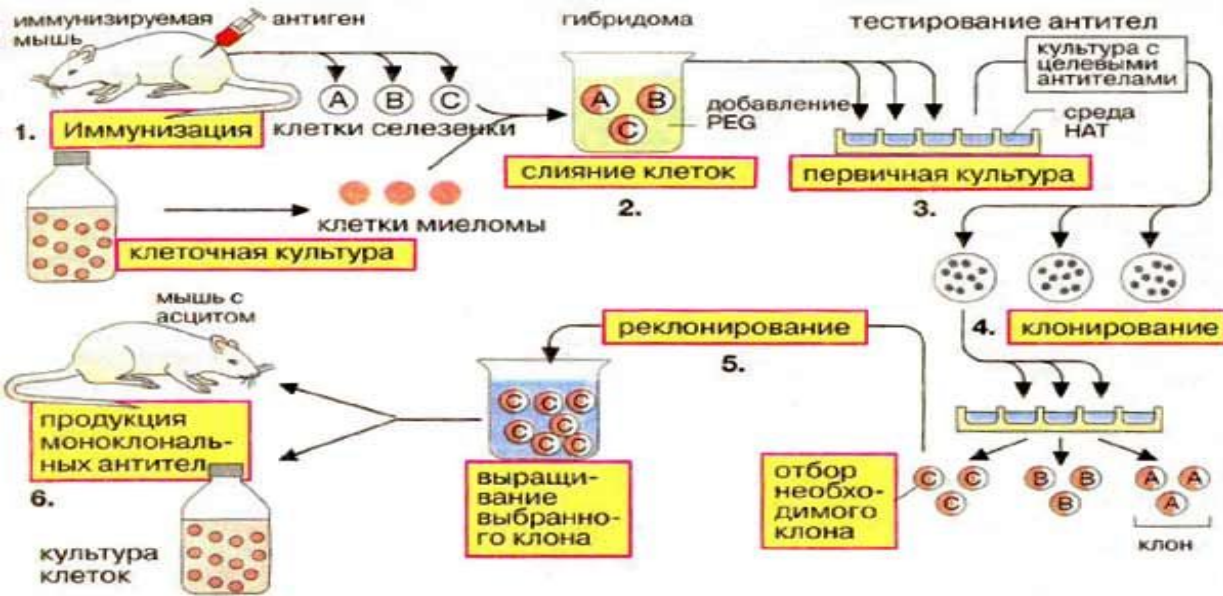
Ингредиенты:

1. Антиген – диагностикум на твердом носителе
2. Антитело1 – парные сыворотки
3. Антитело2 – антиглобулиновая сыворотка
4. Субстрат для фермента

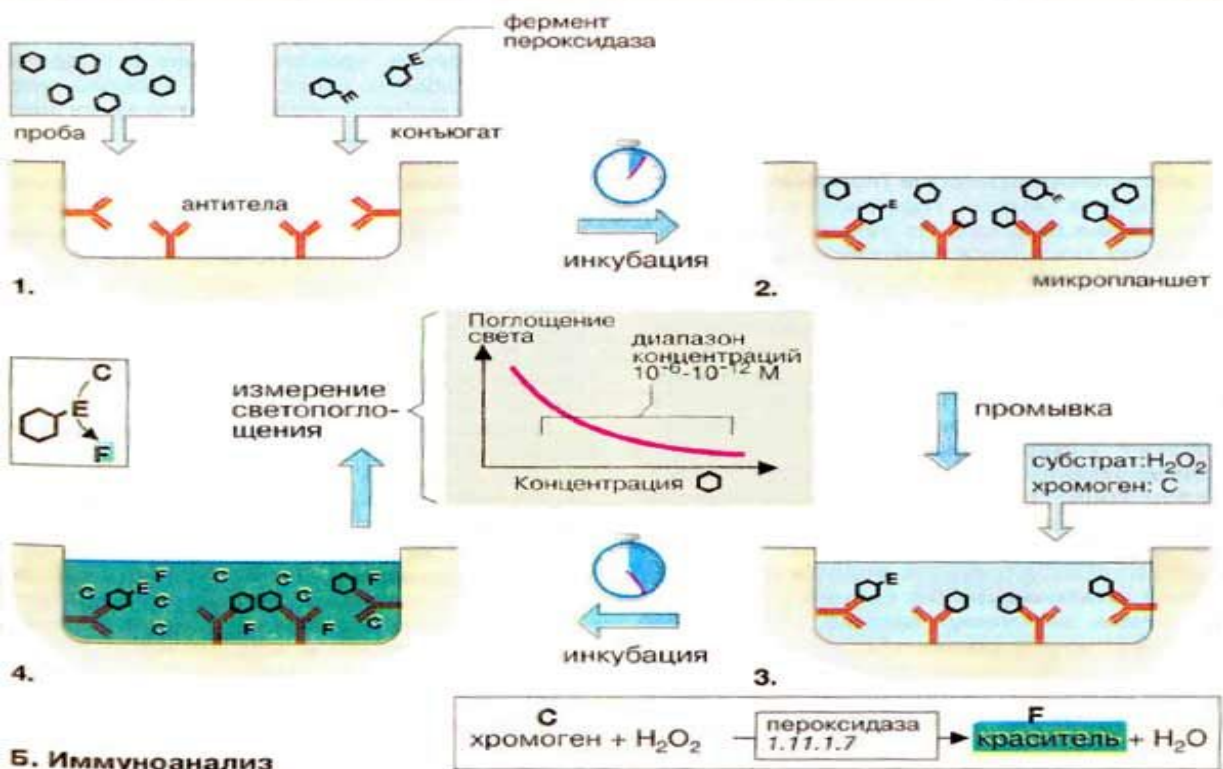


Моноклональные антитела

Моноклональные антитела (МАТ) секретируются иммунными клетками, происходящими от единственной антителообразующей клетки. Поэтому МАТ направлены только против определенного эпитопа иммуногенного вещества, так называемой "антигенной детерминанты". Для получения МАТ:



A. Моноклональные антитела



B. Иммуноанализ

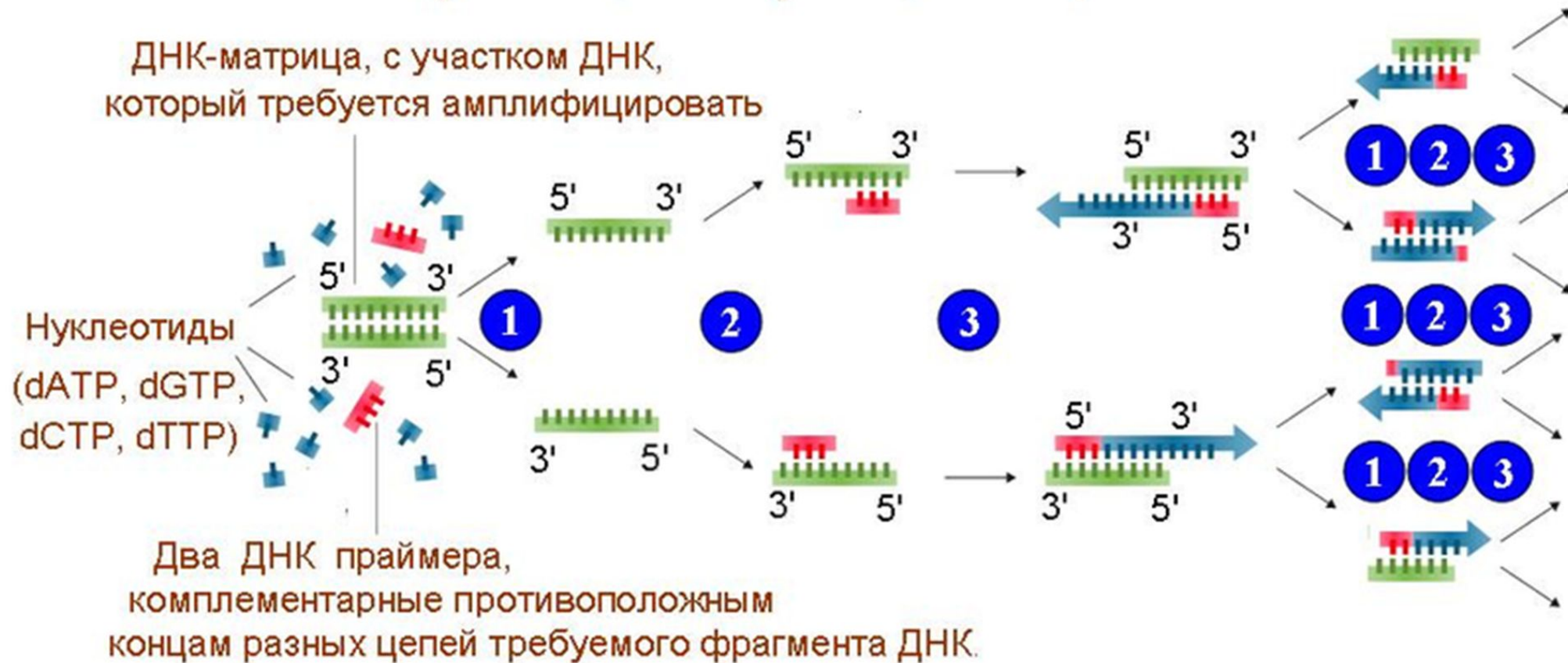
1. изолируют лимфоциты из селезенки иммунизированной мыши.

2. производят их слияние с опухолевыми клетками мыши (клетками миеломы).

Это необходимо, так как жизнеспособность антителопродуцирующих лимфоцитов в культуре ограничена лишь несколькими неделями. При слиянии с опухолевой клеткой возникают гибридные клетки, так называемые гибридомы, которые являются потенциально бессмертными.

Это метод получения множества копий определенных фрагментов ДНК (генов) в биологическом образце. Сущность метода заключается в многократном избирательном копировании определённого гена при помощи специальных ферментов в условиях *in vitro*. Получение копий конкретного участка ДНК.

Полимеразная цепная реакция - ПЦР



ПЦР

1 Денатурация при 94 - 96°C

2 Отжиг при ~ 68°C

3 Элонгация при 72°C

Образование нуклеотидной цепи осуществляется ферментом ДНК-полимеразой. Для начала работы ферменту необходима стартовая площадка - "праймеры" (затравки) - синтетические олигонуклеотиды длиной 15-20 нуклеотидов. Праймеров должно быть два:

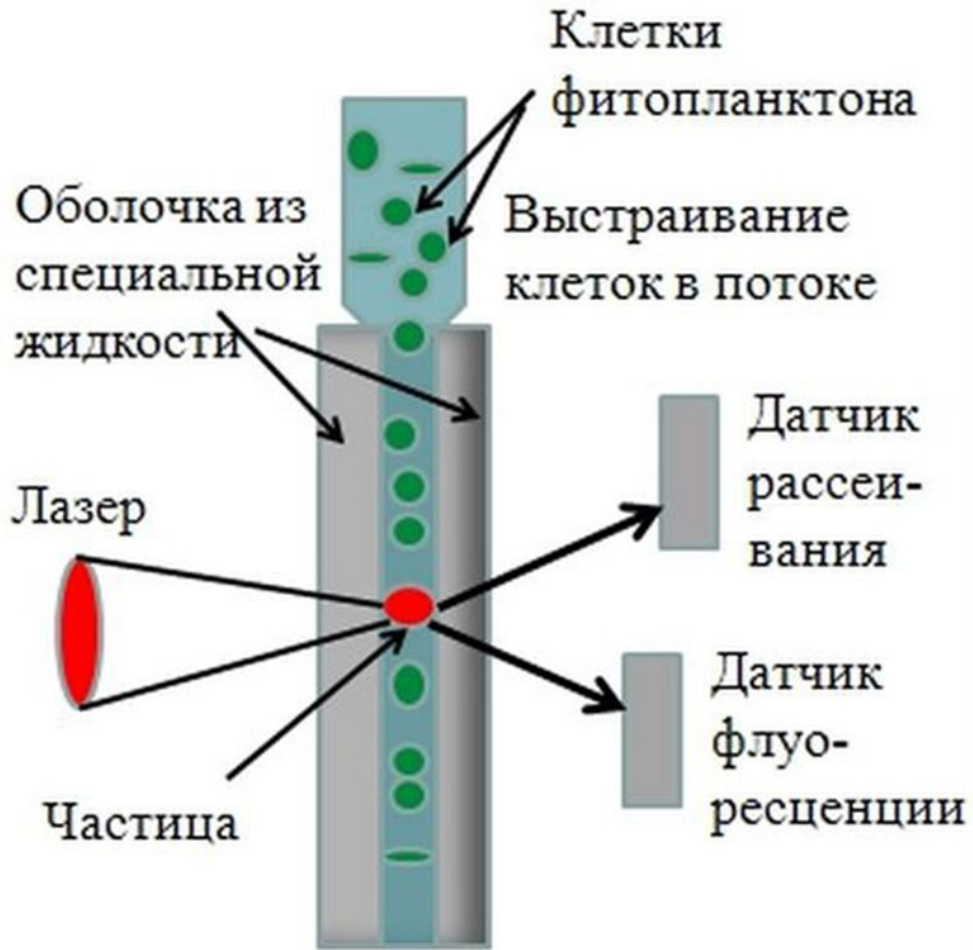
- прямой
- обратный

Они комплементарны участкам ДНК-матрицы и именно фрагмент ДНК, ограниченный праймерами, будет многократно копироваться ДНК-полимеразой. Работа полимеразы заключается в последовательном добавлении нуклеотидов, комплементарных последовательности ДНК-матрицы. Тем самым в одном температурном цикле вновь синтезируется два новых фрагмента ДНК. Таким образом, за 25-35 циклов в пробирке накапливаются миллиарды копий участка ДНК, определенного праймерами.

Диагностика

- диагностика инфекционных заболеваний
- диагностика наследственных заболеваний
- выявление мутаций
- генотипирование
- клеточные технологии
- создание генетических паспортов

Проточная лазерная цитометрия



Упрощенная схема принципа работы проточного цитометра

Метод оптического измерения параметров клетки, клеточных органелл и процессов, происходящих в клетке. Методика заключается в выявлении рассеяния света лазерного луча при прохождении через него клетки в потоке жидкости. При этом степень световой дисперсии позволяет получить представление о размерах и структуре клетки, кроме того учитывается уровень флуоресценции химических соединений, входящих в состав клетки (аутофлуоресценция) или внесенных в образец перед проведением проточной цитометрии.

Пропорциональная лазерная цитометрия

В ходе анализа можно измерять 10 различных параметров клетки:

- размер
- содержание ДНК, белков и липидов
- антигенные свойства и активность ферментов
- ВОЗМОЖНЫ ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА
- МОНИТОРИНГ СОСТОЯНИЯ ВИРУСНОГО ПРОЦЕССА
- КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ
- КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ ПУТЕМ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИНТЕНСИВНОСТИ РАССЕЯНИЯ/ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ

Литература

1. Борисов А.Г. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАРУШЕНИЯ ФУНКЦИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ 2013г.
2. Хаитов, Ярилин, Пинегин, Руководство по клинической иммунологии