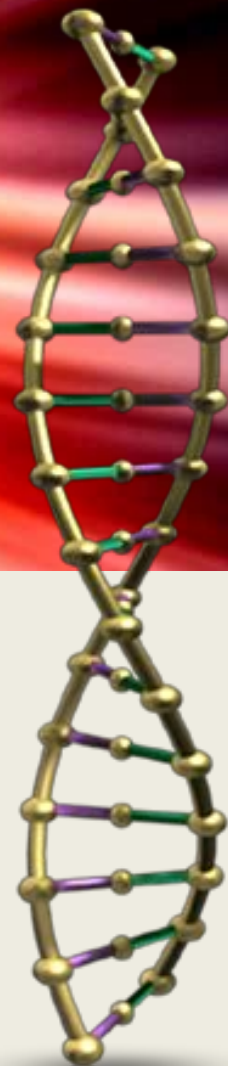


Иммунологические реакции

Лекция № 11





Несколько десятков лет назад было известно, что антитела, образующиеся в ответ на введение данного антигена, не всегда однородны — они могут различаться по своей специфичности, по степени активности в отношении реакции с антигеном и по физико-химическим свойствам, (величине и форме молекулы, ее суммарному заряду и последовательности аминокислот).

Антитела, циркулирующие в крови, связаны с определенной фракцией плазмы — гамма-глобулинами. Гамма-глобулины — белки, очень сходные по своим физическим и химическим свойствам, но различающиеся по специфичности в отношении антигенов. Различия между разными антителами совершенно неуловимы; они даже еще более тонкие, чем различия между разными ферментами. По-видимому, лишь небольшая часть белковой молекулы иммунологически активна.



Различия между разными антителами, по-видимому, сводятся к незначительным различиям в форме молекулы белка, в расположении составляющих ее атомов, обеспечивающем комплементарность геометрических конфигураций антигена и антитела, которые должны подходить друг к другу, как ключ и замок .



Лимфатические ткани обычно синтезируют антитела только к «чужеродным» белкам, т. е. к белкам, которые при нормальных условиях не содержатся в организме. Но иногда некоторые нормальные компоненты тела могут обладать антигенным действием и вызывать образование антител; в результате возникающей при этом реакции антиген—антитело человек может заболеть.



Реакция преципитации

Принцип: При взаимодействии растворимого антигена с антителом в присутствии электролитов (NaCl) образуется **комплекс Аг-Ат в виде нерастворимого преципитата.**

- РП применяют в двух целях: **выявление антигенов** с помощью известной иммунной преципитирующей сыворотки или **антител** с использованием известных антигенов.
- Используется как **качественный**, так и **количественный** анализ (реакция Манчини).
- Очень чувствительная реакция для определения антигенов.



Преципитацией называется выпадение в осадок антигена преципитиногена, находящегося в растворенном состоянии, при взаимодействии его со специфическими иммунными телами сыворотки - преципитинами

Реакция преципитации сходна по механизму с реакцией агглютинации. Они различаются тем, что в реакции агглютинации участвует цельный антиген, а в реакции преципитации – антиген в растворенном состоянии



РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ

Проводят в пробирках, наслаивая растворённый в электролите АГ на иммунную сыворотку. При оптимальном соотношении АГ и АТ на границе двух растворов образуется непрозрачное кольцо – преципитат. Отличие РП от РА - размер частиц антигена.



РП применяют для определения антигена при диагностике инфекций (сибирская язва, менингит); в судебной медицине — для определения видовой принадлежности крови, спермы; в санитарно - гигиенических исследованиях — при установлении фальсификации продуктов; с её помощью определяют филогенетическое родство животных и растений.



РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ

РА — склеивание антителами антигенов (бактерии, эритроциты) в присутствии электролита (изотонического раствора натрия хлорида). При положительной РА образуются хлопья (на предметном стекле) или осадок (в пробирке).

РА используют для серодиагностики брюшного тифа, бруцеллёза (реакция Райта).

Для идентификации кишечных инфекций, коклюша.

Два метода проведения РА: реакция агглютинации на стекле (ориентировочная) и развёрнутая (в пробирках).



Реакция агглютинации на стекле.

На предметном стекле к капле иммунной диагностической сыворотки (взята на второй неделе болезни людей или у выздоровевших, т.к. в ней достаточно АТ или у гипериммунизированных лошадей) добавляют чистую культуру возбудителя, выделенного от больного. Через 1-5 мин в ранее прозрачной капле образуются хлопья, которые состоят из комплексов «АГ-АТ».



Реакция агглютинации в пробирках.

К разведениям сыворотки крови больного в электролите добавляют взвесь убитых м/о. После инкубации, при 37⁰С, отмечают наибольшее разведение (титр) сыворотки, при которой произошла агглютинация (образовался осадок).

Схема реакции агглютинации:

АТ (иммунная диагностическая сыворотка)
+ АГ (м/о или эритроциты) +
изотонический раствор = хлопья



РЕАКЦИЯ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ

К АТ иммунных сывороток присоединяют флюорохромы (люминесцирующие сыворотки). При взаимодействии АТ с АГ образуется светящийся комплекс, видимый с помощью люминесцентного микроскопа.

Метод высокочувствителен, прост, быстр (результат через 30мин), не требует выделения чистой культуры (обнаруживают микроорганизмы в кале при холере, мокроте при коклюше, мозговой ткани).

РИФ применяют для экспресс (ускоренной) диагностики инфекций.



Иммуноферментный анализ

ИФА – метод выявления АГ с помощью АТ, конъюгированных ферментом – меткой (щелочная фосфатаза). ИФА применяют для диагностики ВИЧ, гепатита.

Радиоиммунологический анализ

АГ или АТ помечают радионуклидом. После образования комплекса АГ – АТ радиоактивный комплекс исследуют на радиоактивность, интенсивность излучения прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.



Полимеразная цепная реакция

Метод, который перевернул
современную молекулярную биологию



п В **1983 г.** Kary Mullis предложил метод, обеспечивающий накопление (амплификацию) синтезируемого фрагмента ДНК, получивший название полимеразная цепная реакция (Нобелевская премия по химии 1993 г).



Современный амплификатор Corbett (вид 1)

История открытия ПЦР

➤ 1983 - Kary Mullis («Cetus»)



Lederberg, Joshua



1993 Chemistry Nobel Prize Winner
Kary Mullis

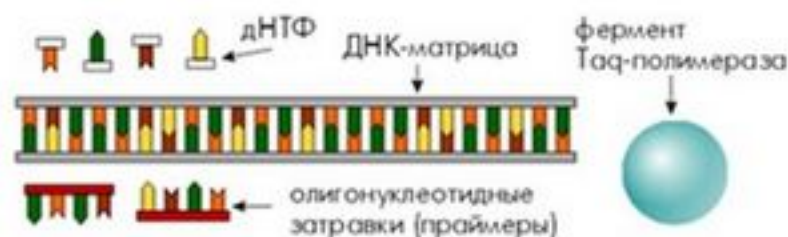


Kornberg, Arthur



Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР - это метод, имитирующий естественную репликацию ДНК и позволяющий обнаружить единственную специфическую молекулу ДНК в присутствии миллионов других молекул.



Исходные компоненты ПЦР



ПЦР – метод амплификации, т.е. получения большого числа копий нужного гена или его фрагмента в условиях *in vitro*. Реакционная смесь для получения нужной ДНК содержит: исследуемую ДНК-матрицу, субстраты реакции – 4 дНТФ, 2 праймера, термостабильную Taq-полимеразу и реакционный буфер (кофактор – Mg^{2+}).



Полимеразная цепная

это эффективный способ получения *in vitro* большого числа копий специфических нуклеотидных последовательностей



Компоненты реакции

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

- ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- Два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.
- Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК.
- Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ).
- Ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы.
- Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора.



Основные достоинства ПЦР

- п Высокая чувствительность
- п Высокая специфичность
- п Проста в исполнении
- п Нет необходимости в выделении или сложной очистке матричной ДНК
- п Возможность работы с практически любым биологическим материалом



Значение для современной науки и медицины

- n Решение самых различных научных задач
- n Генотипирование организмов
- n Диагностика инфекционных заболеваний
- n Диагностика генетических заболеваний и генетической предрасположенности
- n Установление родства, идентификация личности
- n Анализ древних останков, криминалистика
- n Детекция ГМО



Стадии Полимеразной Цепной Реакции

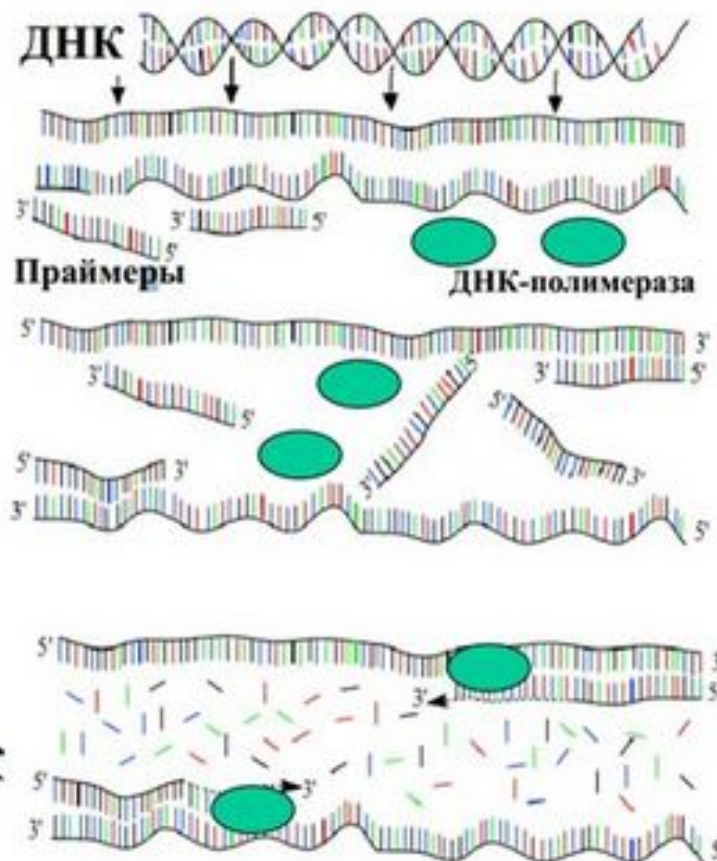
Денатурация ДНК
(95°C)



Отжиг праймеров
(55-65°C)

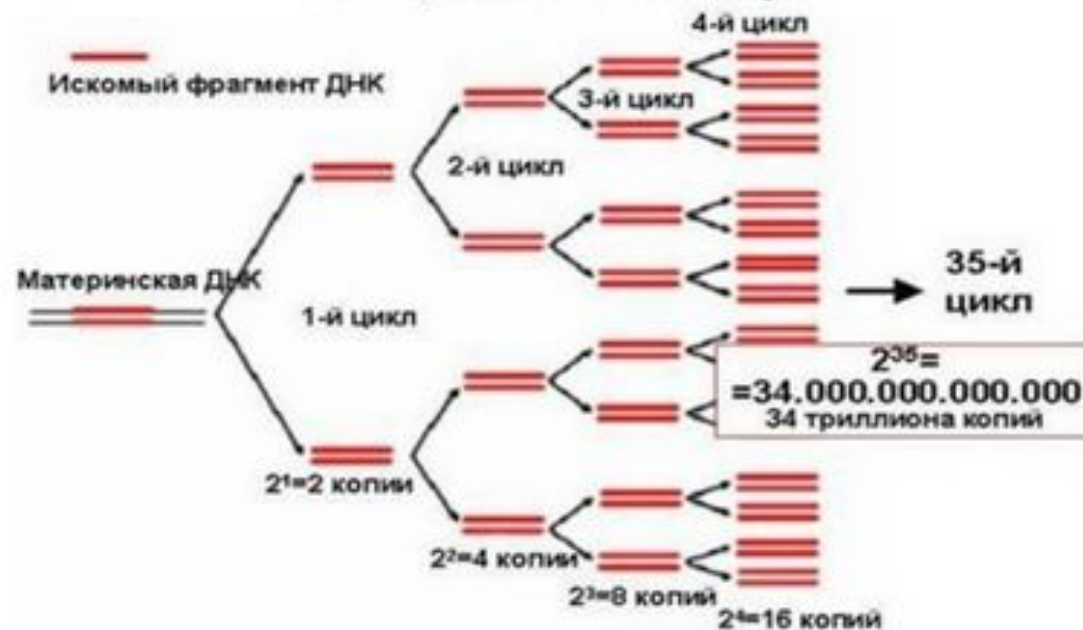


Полимеризация цепей ДНК
(72°C)



Принцип метода заключается в удвоении (амплификации) участка ДНК, ограниченного праймерами, при помощи фермента ДНК-полимеразы.

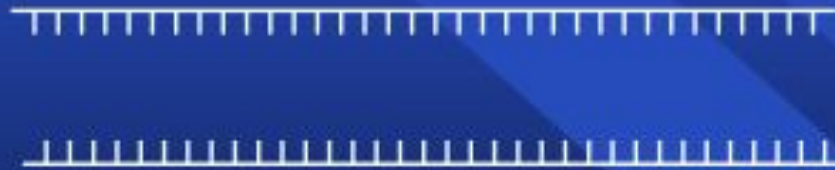
Общая схема ПЦР



За каждый следующий цикл амплификации происходит удвоение как исходного участка ДНК, так и вновь синтезированных фрагментов (амплификатов).



I. Разделение цепей (денатурация)

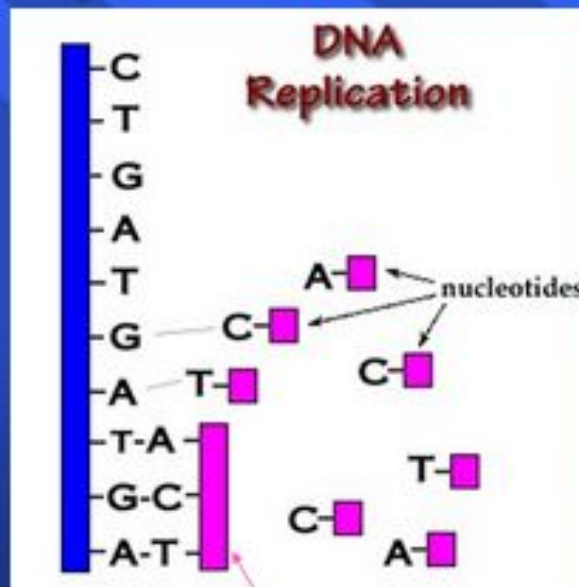


95°C



II. Отжиг праймеров

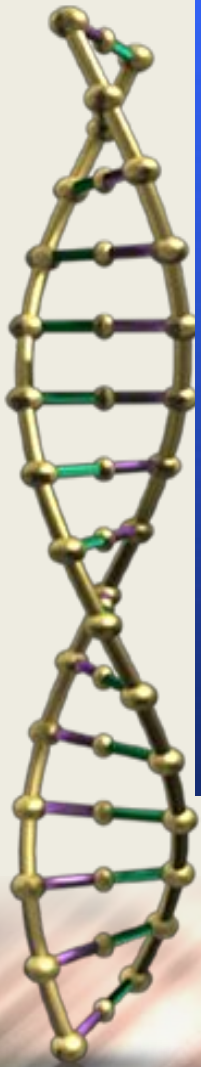
III. Синтез ДНК (удлинение цепи)



Праймер

Стадии ПЦР

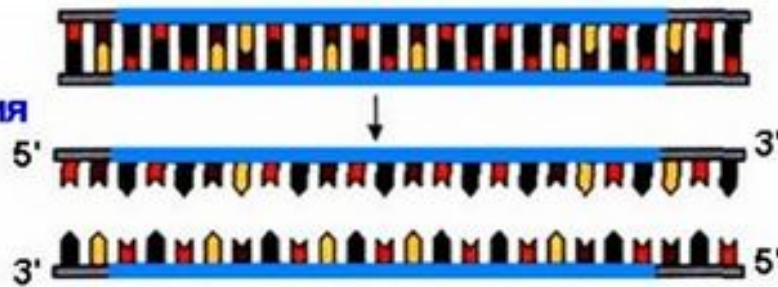
- n Денатурация (94°C)
 - Обеспечивает разделение нитей ДНК
- n Гибридизация (отжиг) праймеров на матрице (45-65°C)
 - Формирует структуры узнаваемые ДНК-полимеразой
- n Синтез (удлинение) цепи (72°C)
 - Происходит синтез комплементарных цепей и удваивает число молекул ДНК мишени



ПЦР – полимеразная цепная реакция

1-й цикл ПЦР

1 этап
Денатурация
93-95 °C



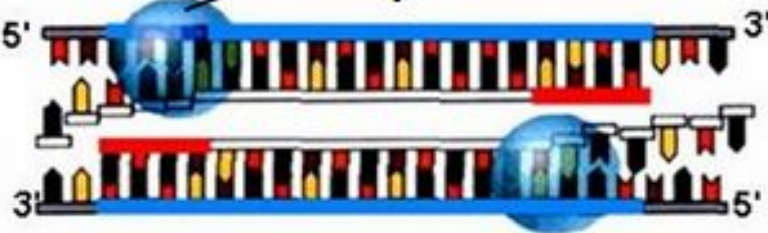
Искомый фрагмент ДНК

2 этап
Гибридизация
праймеров
50-65 °C



Полимераза

3 этап
Синтез
цепи ДНК
72 °C





СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!