

**Реакции иммунного лизиса.**

**Реакция связывания  
комплемента (РСК).**

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

**Полимеразная цепная реакция  
(ПЦР).**



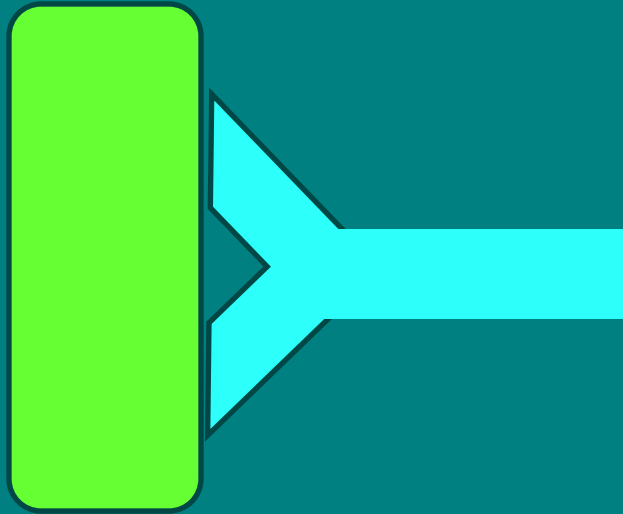
# Пути активации системы комплемента



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.



+



=

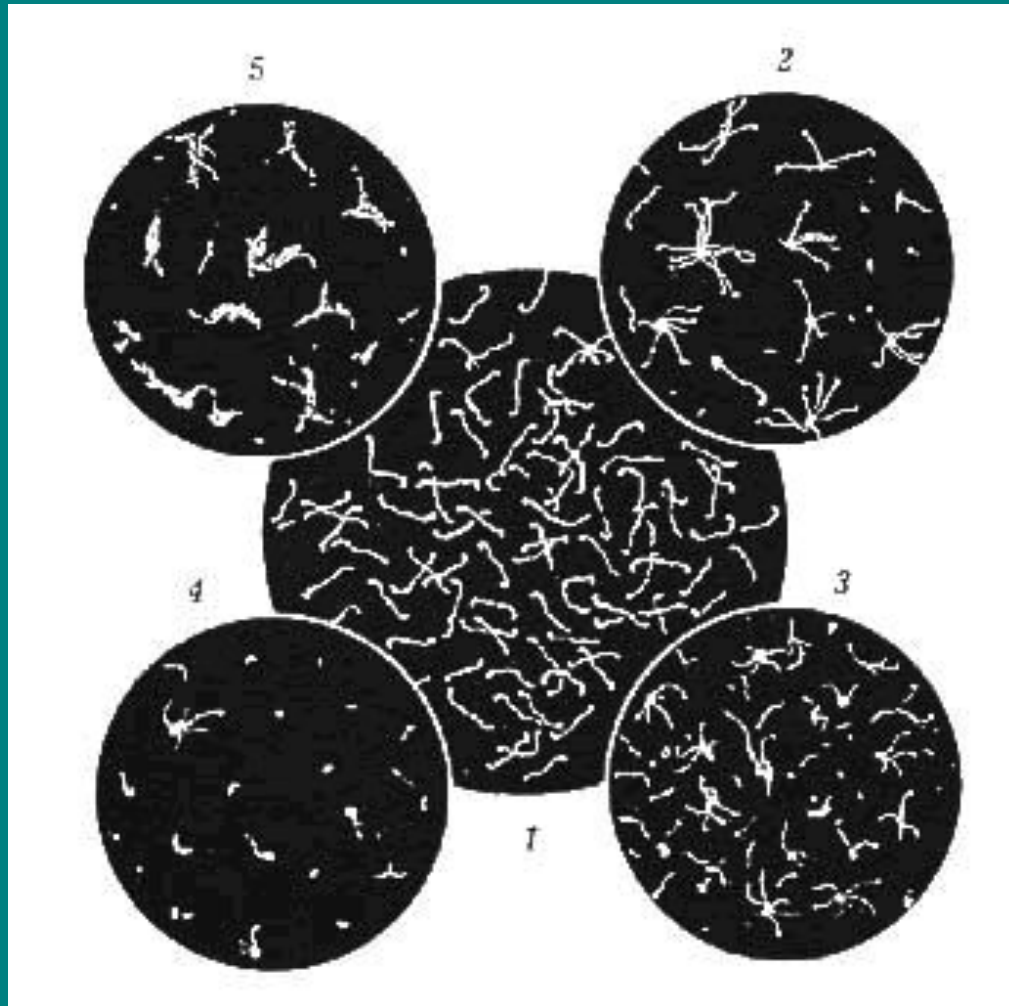


Клетка-мишень,  
сенсibilизированная  
антителами-лизинами

Комплемент

Лизис  
клетки-  
мишени

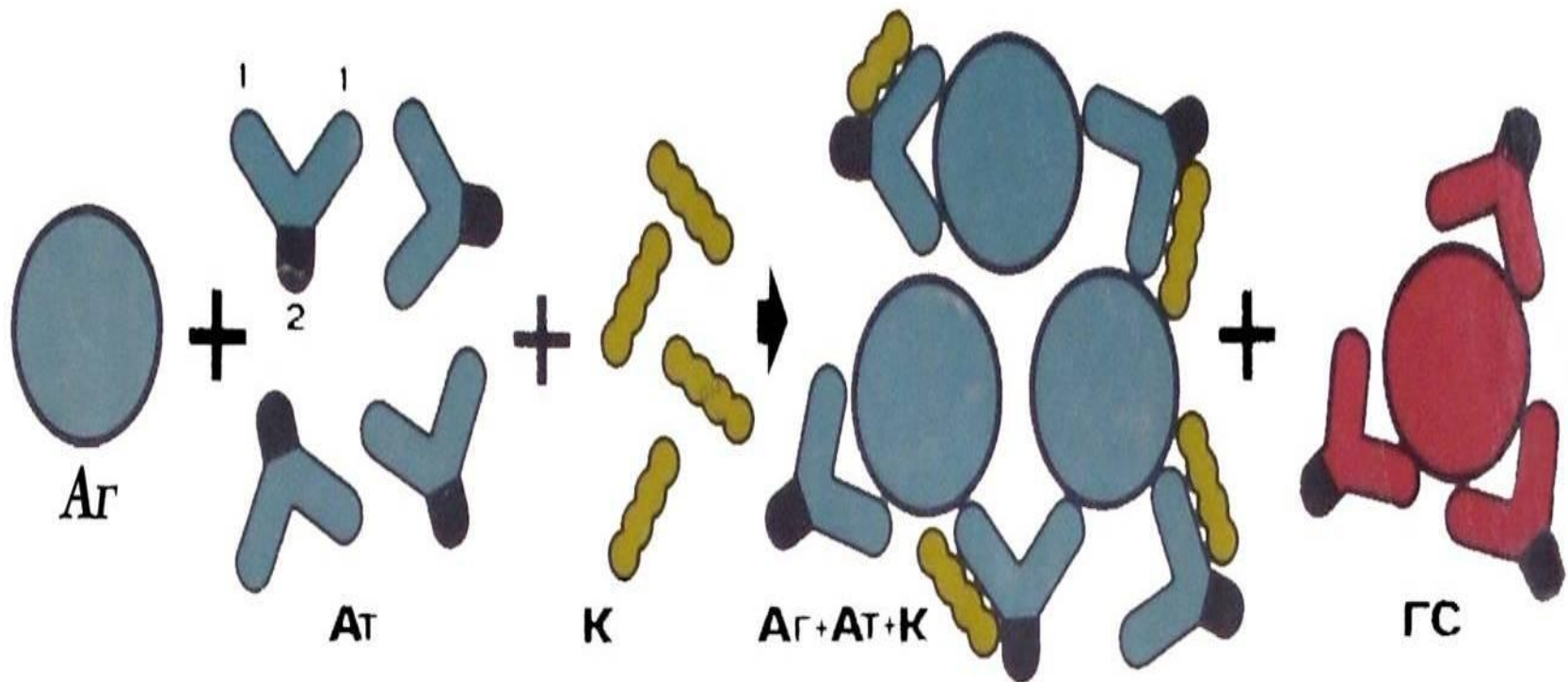
## Реакция агглютинации и лизиса лептоспир



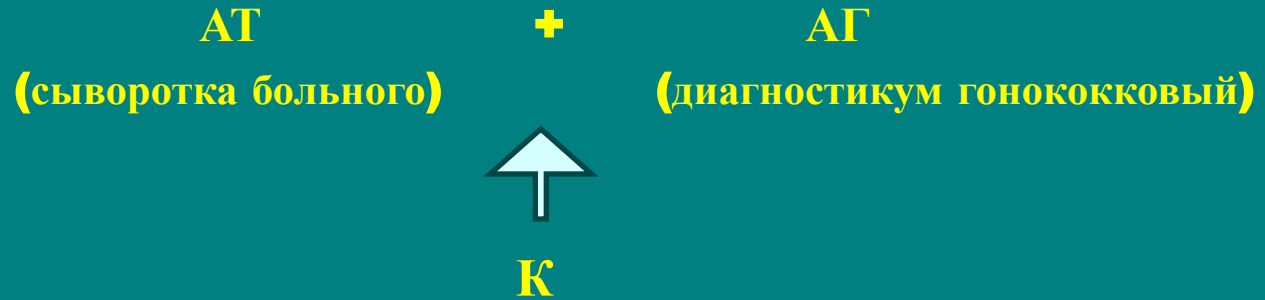
## Реакция гемолиза



# 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
<b>Сыворотка больного</b>	<b>Поставить и учесть РСК</b>	<b>Заключение</b>



# 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*

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

# Конкурентный радиоиммунный анализ

Меченные изотопом  
диагностические  
антитела



Антитела  
пациента

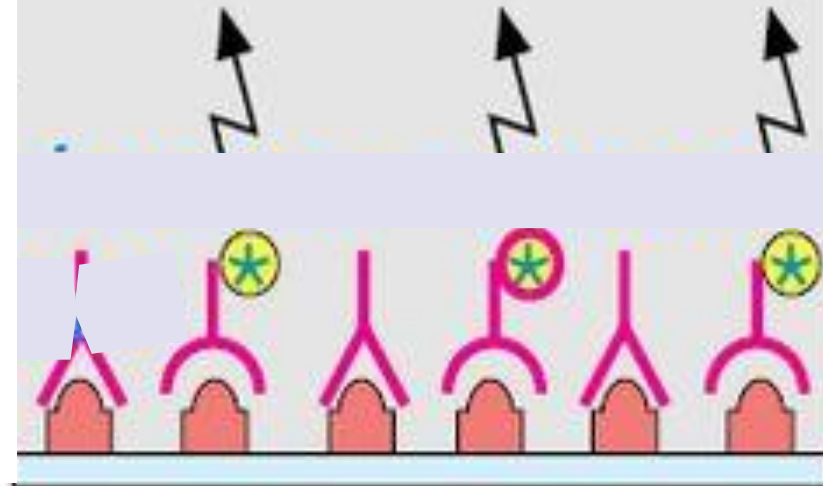


Антиген на твердой фазе

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

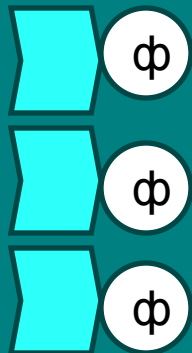
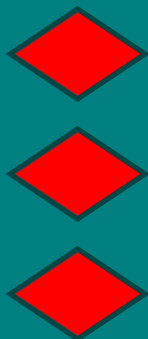
## ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИГЕНОВ

ЛУНКА  
С НАНЕСЕННЫМИ  
ДИАГНОСТИЧЕСКИМИ  
АНТИТЕЛАМИ

ИССЛЕДУЕМЫЙ  
МАТЕРИАЛ,  
СОДЕРЖАЩИЙ  
АНТИГЕНЫ

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ  
АНТИТЕЛА С ФЕРМЕНТОМ  
(ПЕРОКСИДАЗОЙ)

СУБСТРАТ  
К ФЕРМЕНТУ  
(ТМБ – ТЕТРАМЕТИЛБЕНЗИДИН)



**1 фаза**

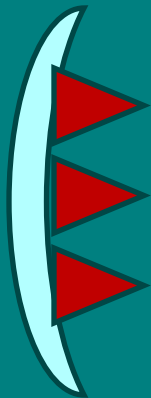
**2 фаза**

**3 фаза**

# Иммуноферментный анализ

## ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТЕЛ

ЛУНКА  
С НАНЕСЕННЫМИ  
АНТИГЕНАМИ

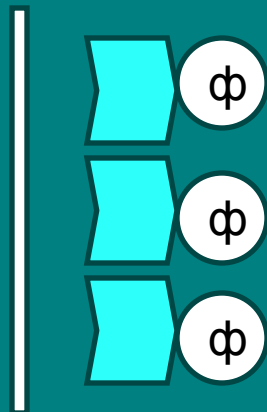


**1** фаза

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)

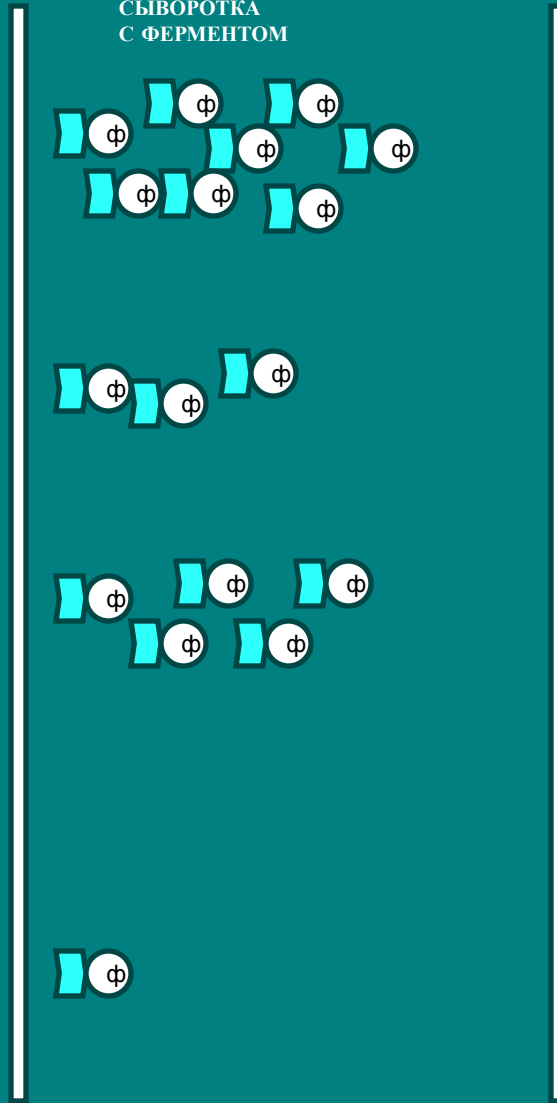
СЫВОРОТКА  
БОЛЬНОГО

АНТИГЛОБУЛИНОВАЯ  
СЫВОРОТКА  
С ФЕРМЕНТОМ

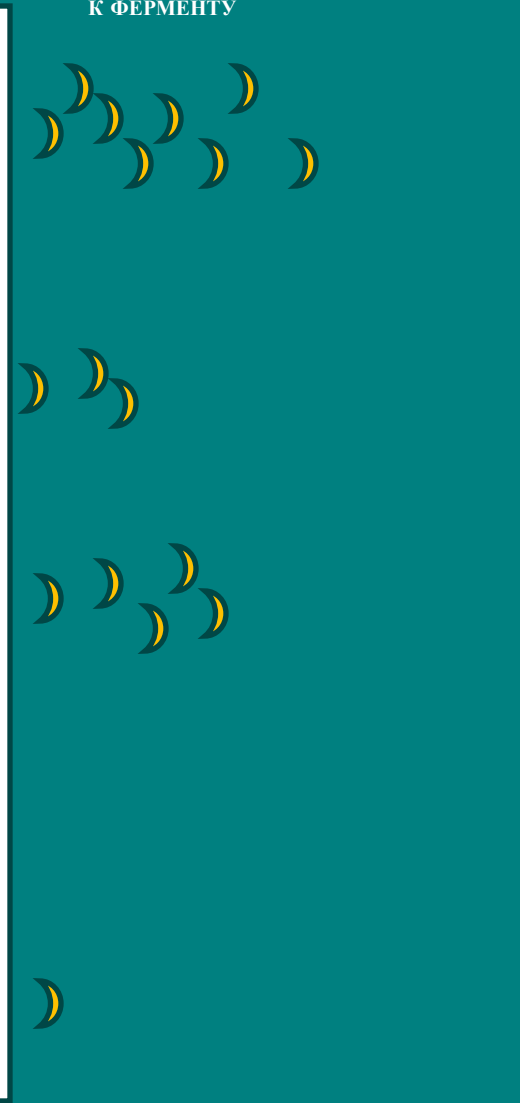
СУБСТРАТ  
К ФЕРМЕНТУ



1 фаза

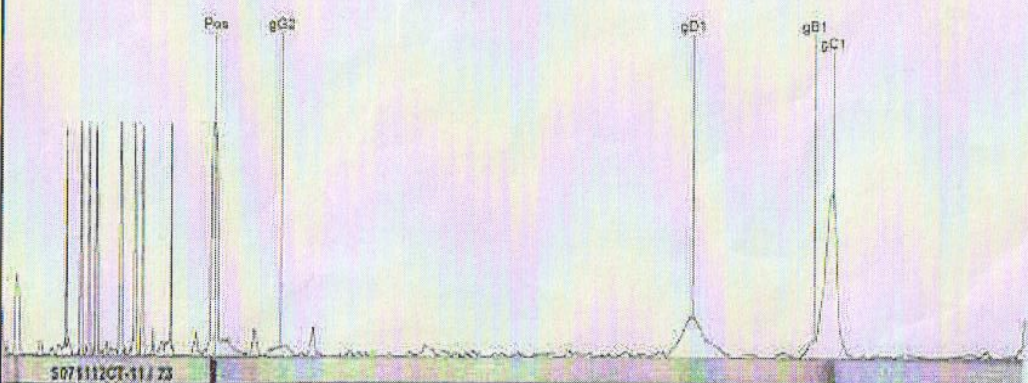


2 фаза



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

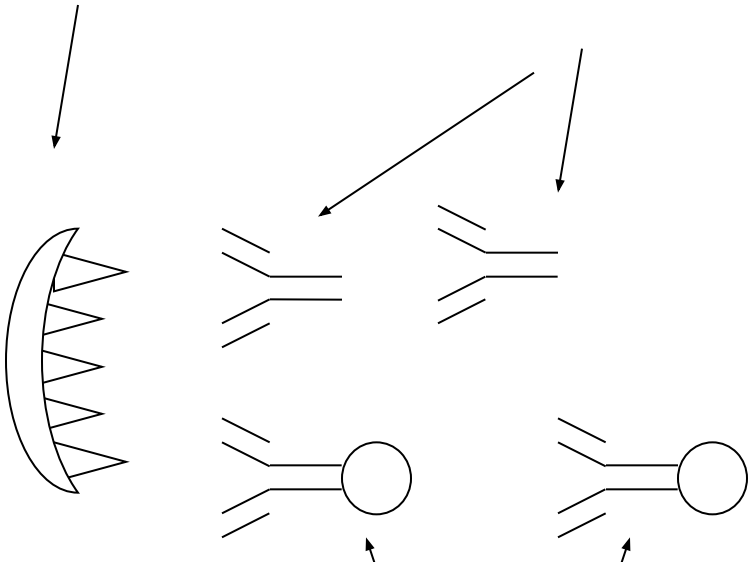
# Протокол. Иммуноферментный анализ

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



**Лунка с НВсAg**

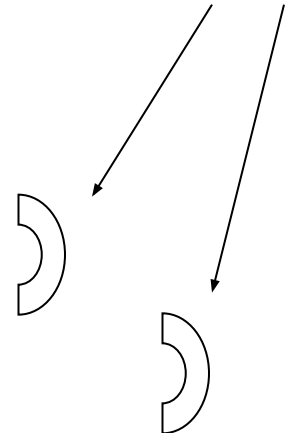
**Антитела больного**



**Антитела к НВсAg конъюгированные с пероксидазой**

**I фаза**









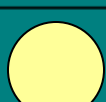
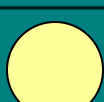
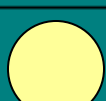
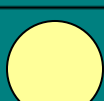
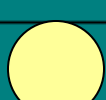
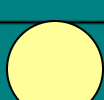


**Субстрат к ферменту  
(тетраметилбензидин)**



**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 being in a non-substantial for a way out of this world in California.

# Этапы классического ПЦР-анализа

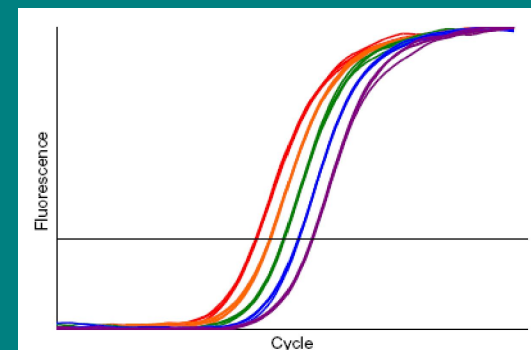
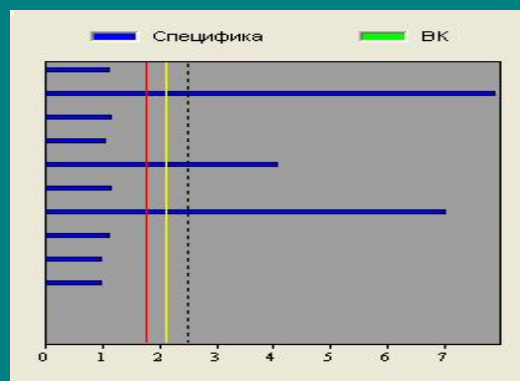
## 1. Пробоподготовка



## 2. Амплификация



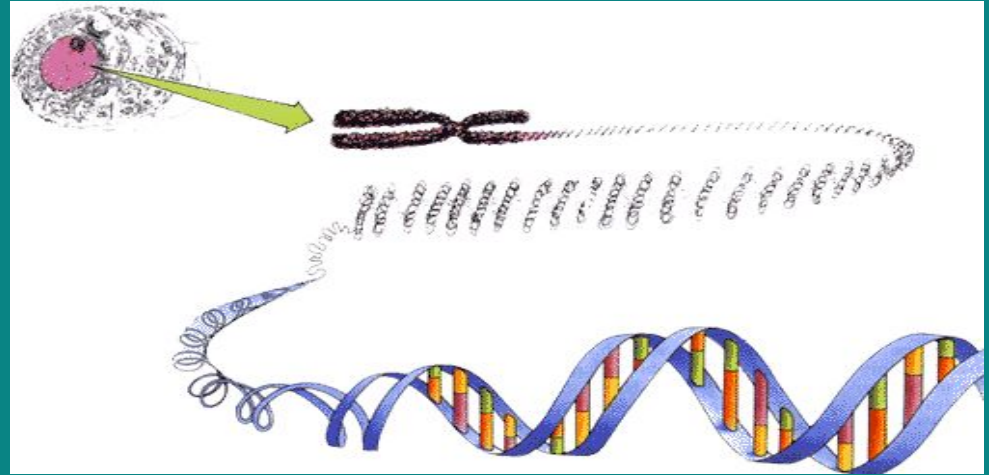
## 3. Детекция результатов



# 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  $Mg^{2+}$

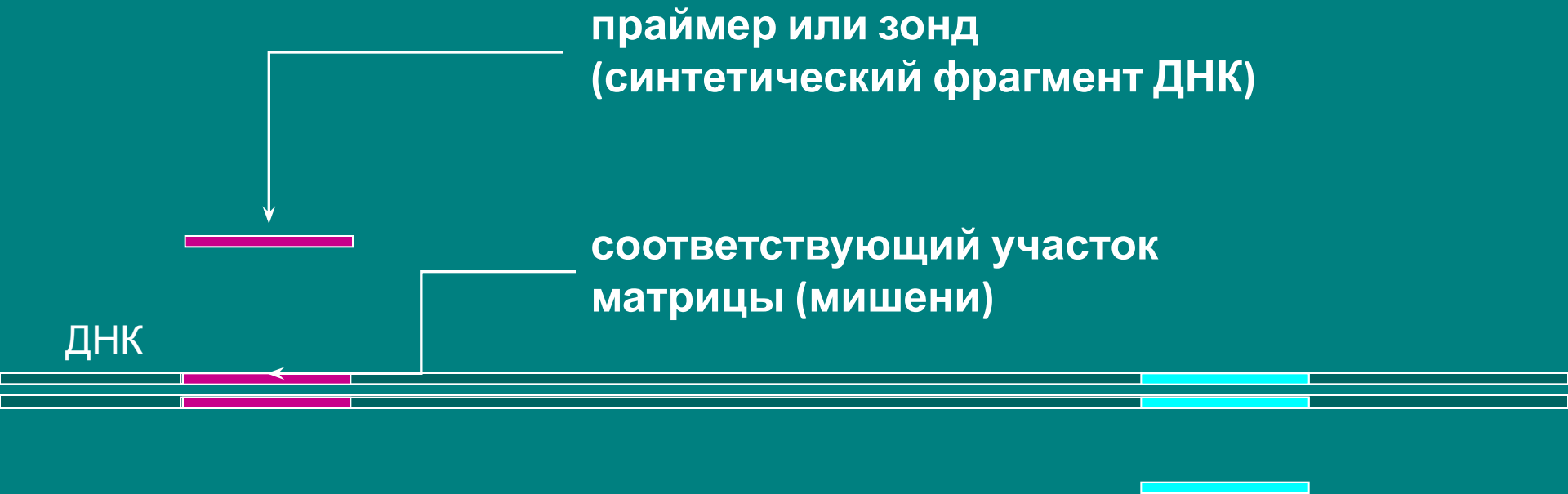


**Аmplификация** – увеличение количества **ампликонов** в ходе многократно (обычно 30-50 раз) повторяющихся циклов (раундов) денатурации, гибридизации и удлинения цепей

## **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)

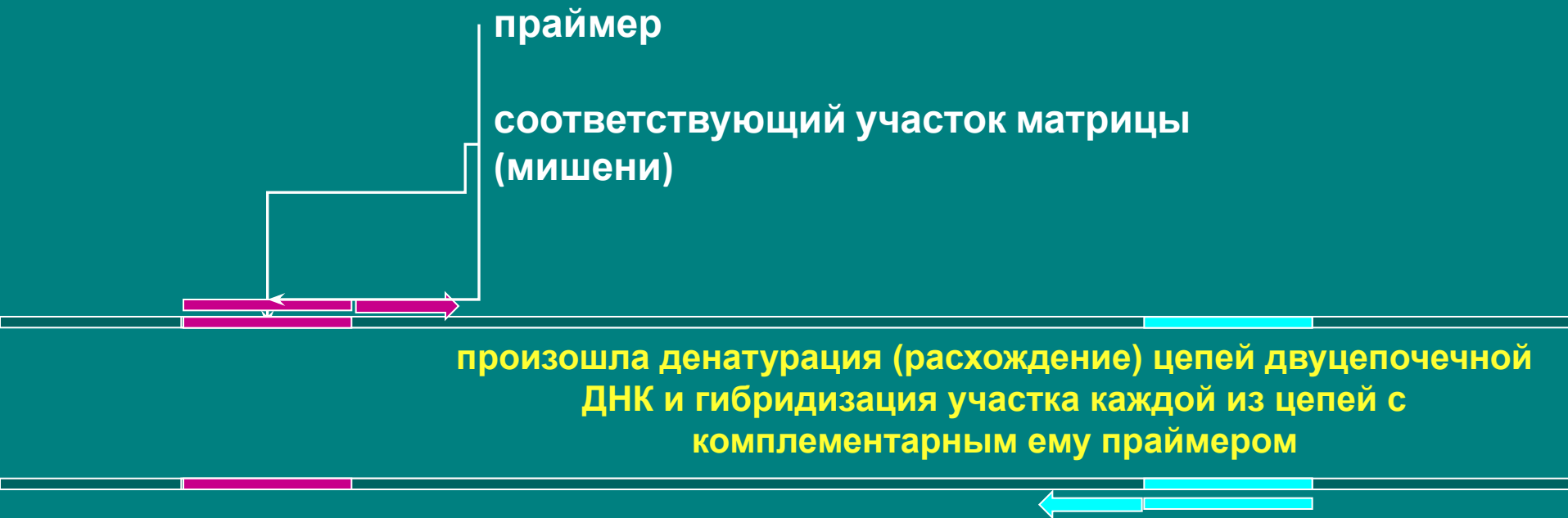
**Реакция повторяется 30-50 циклов, количество специфического фрагмента ДНК возрастает в 1-10 млн. раз**



**праймеры – короткие синтетические молекулы ДНК, ограничивающие синтезируемый фрагмент**

**гибридизация – образование комплекса праймера и матрицы:**

**возможна при разделении нитей ДНК**

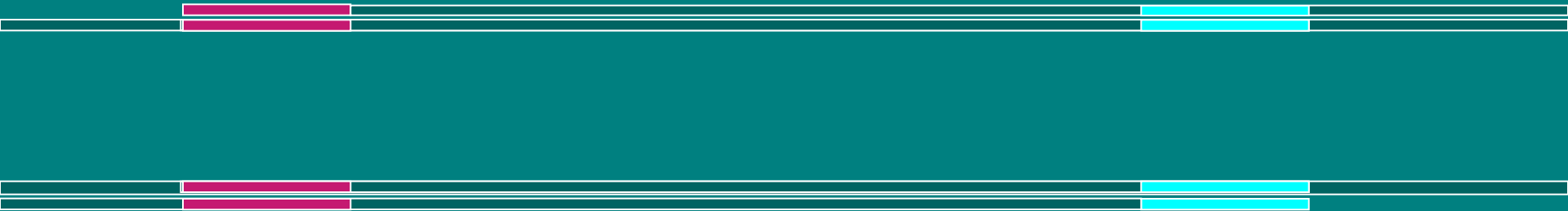


**Фермент ПЦР –Taq полимераза (выделена из бактерии *Thermus aquaticus*)**

**Термостабильна - может выдерживать длительное нагревание при 95<sup>0</sup>С и многократную смену температуры с сохранением активности**

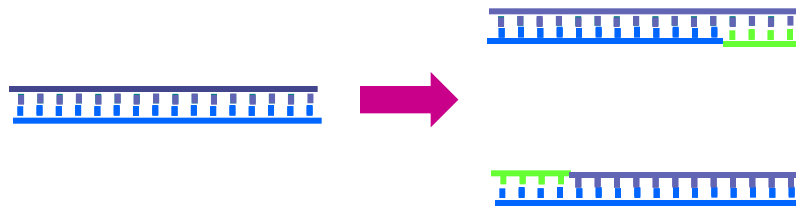
# Удлинение цепей ДНК-полимеразой

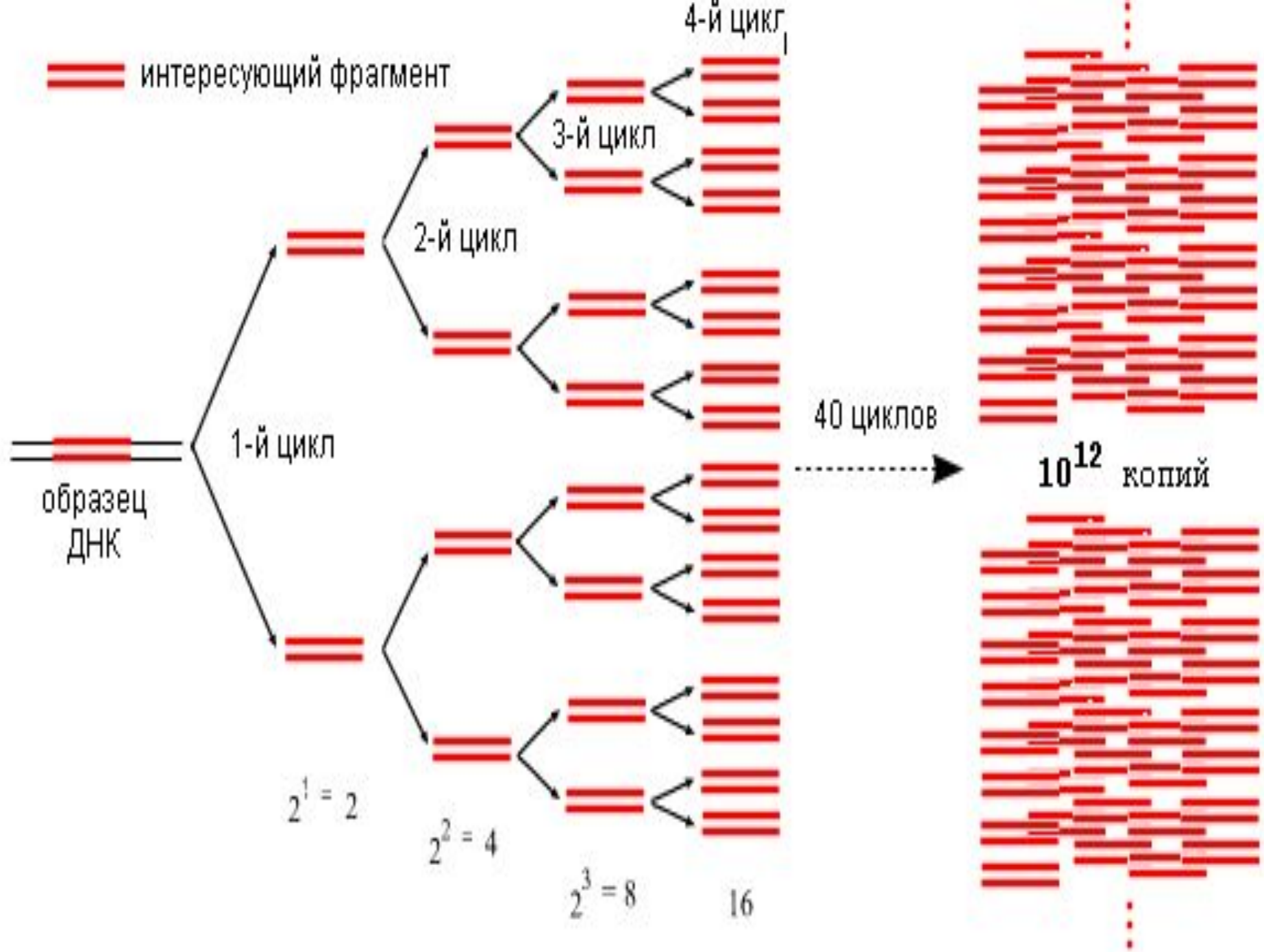
Продукт ПЦР – двуцепочечный специфический фрагмент ДНК (ампликон)





# стандартный температурный режим одного цикла





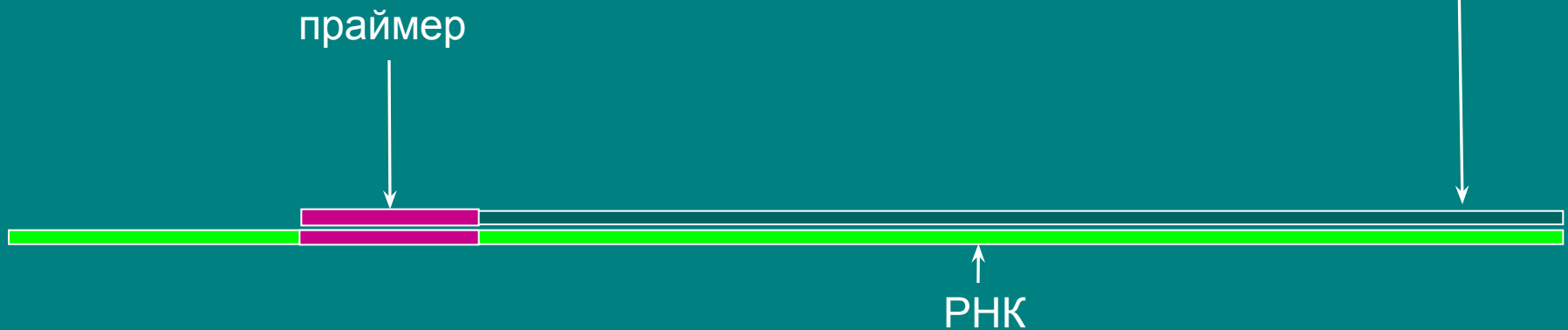
# Обратная транскрипция и ПЦР

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

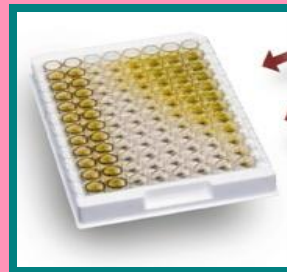
*По конечной точке  
(после окончания реакции)*

*В реальном  
времени  
(после каждого  
цикла)*

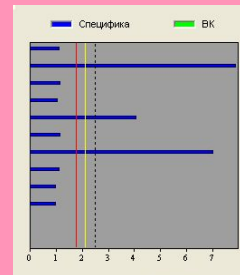
Электрофорез



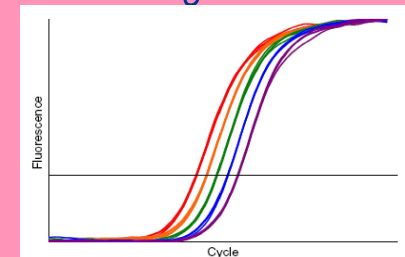
ГИФА



FLASH



Реал-





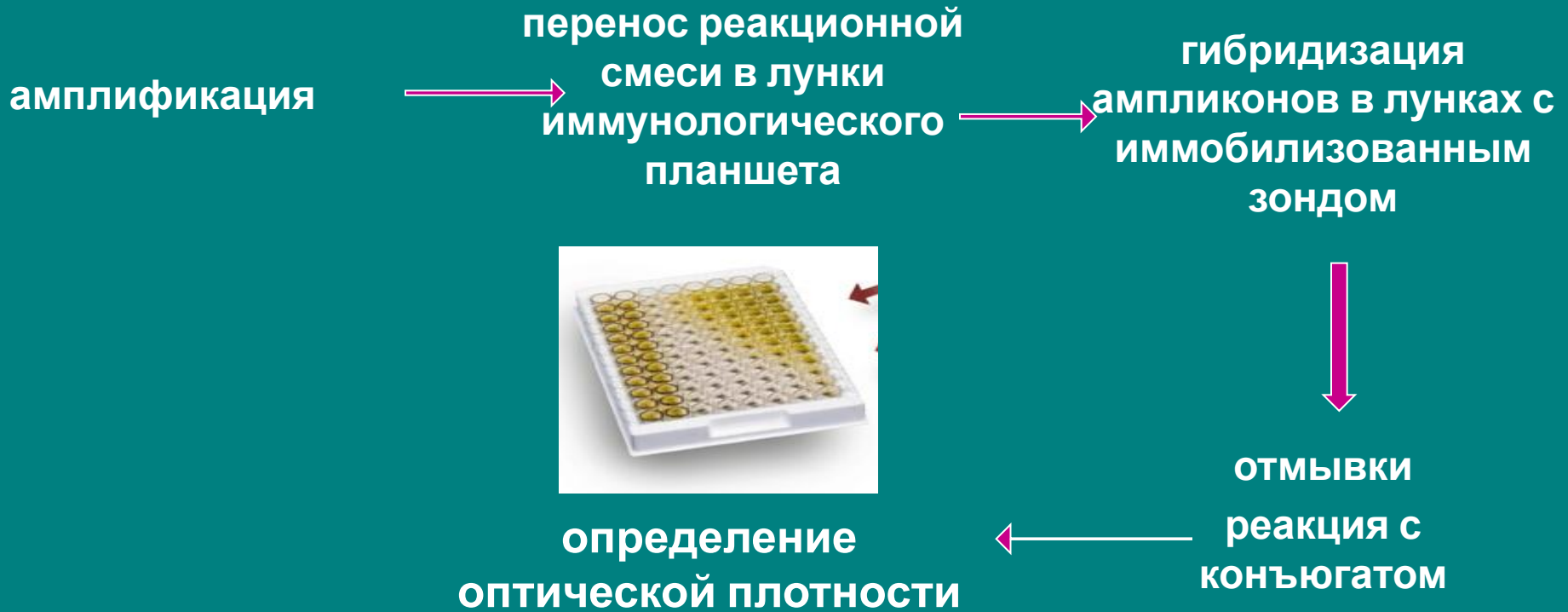
# Детекция

## электрофорезом

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



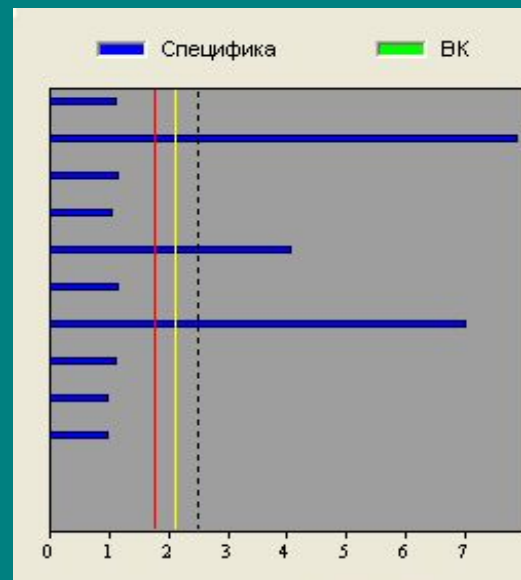
# ГИФА – гибридационный иммуоферментный (вариант анализа «по конечной точке»)



# Детекция в формате FLASH

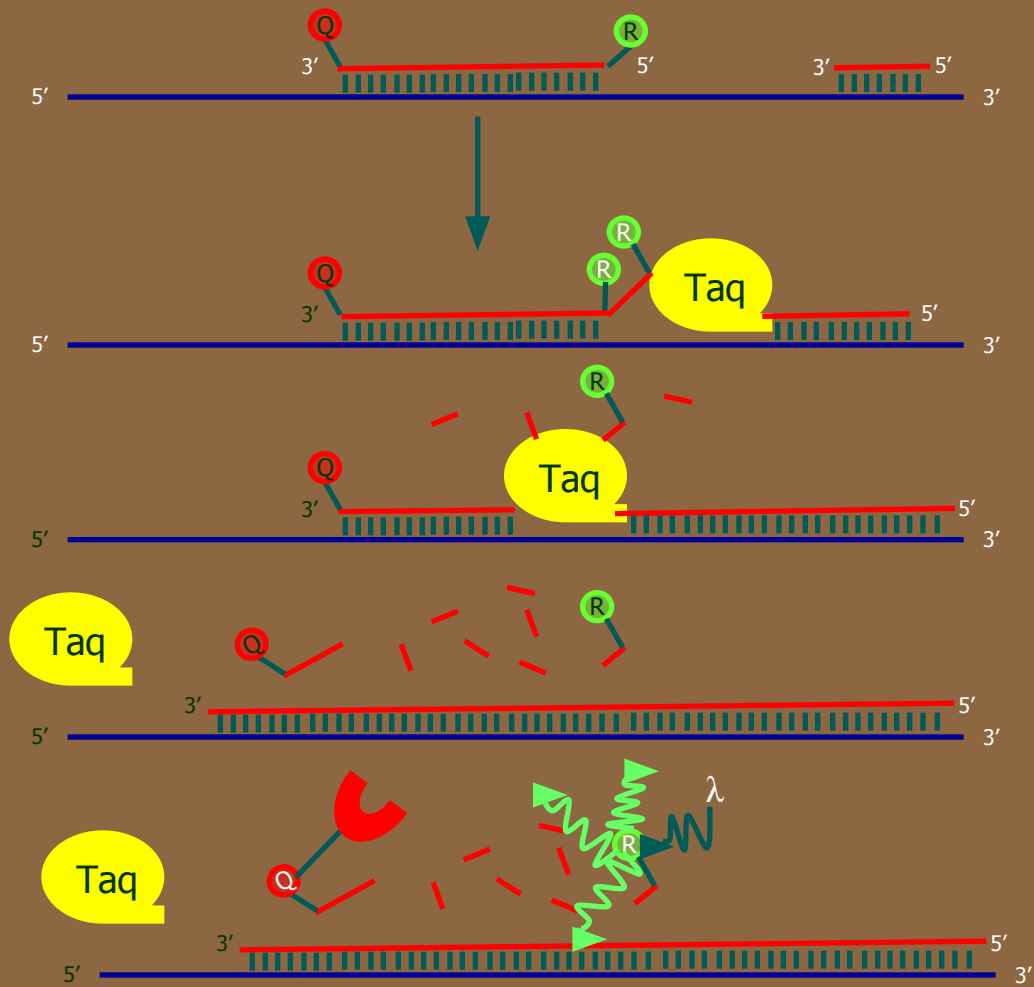
- Вариант детекции «по конечной точке»
- Аналитический сигнал – прирост флуоресценции после окончания реакции

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	

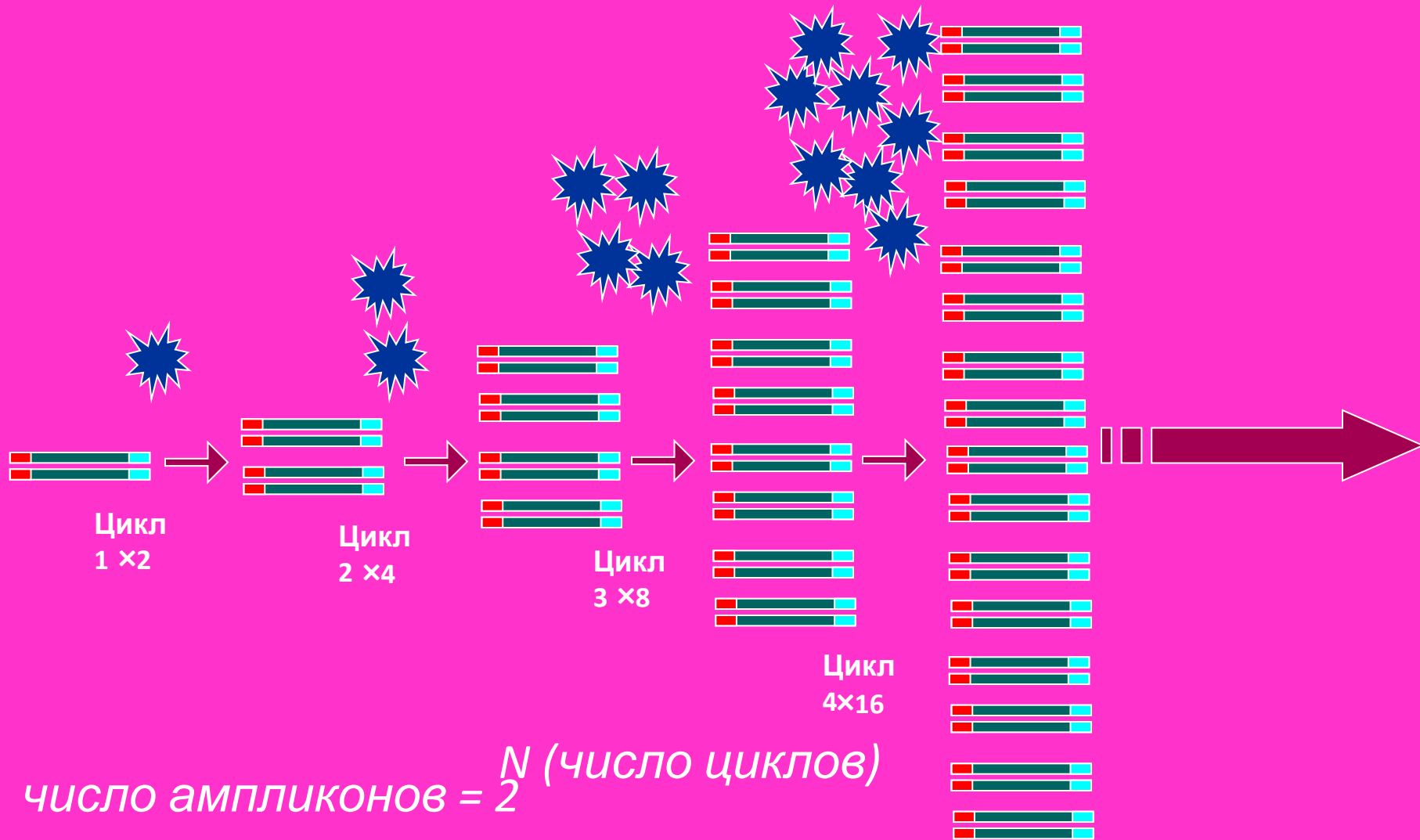


# Детекция продуктов ПЦР в режиме реального времени

## Технология TaqMan

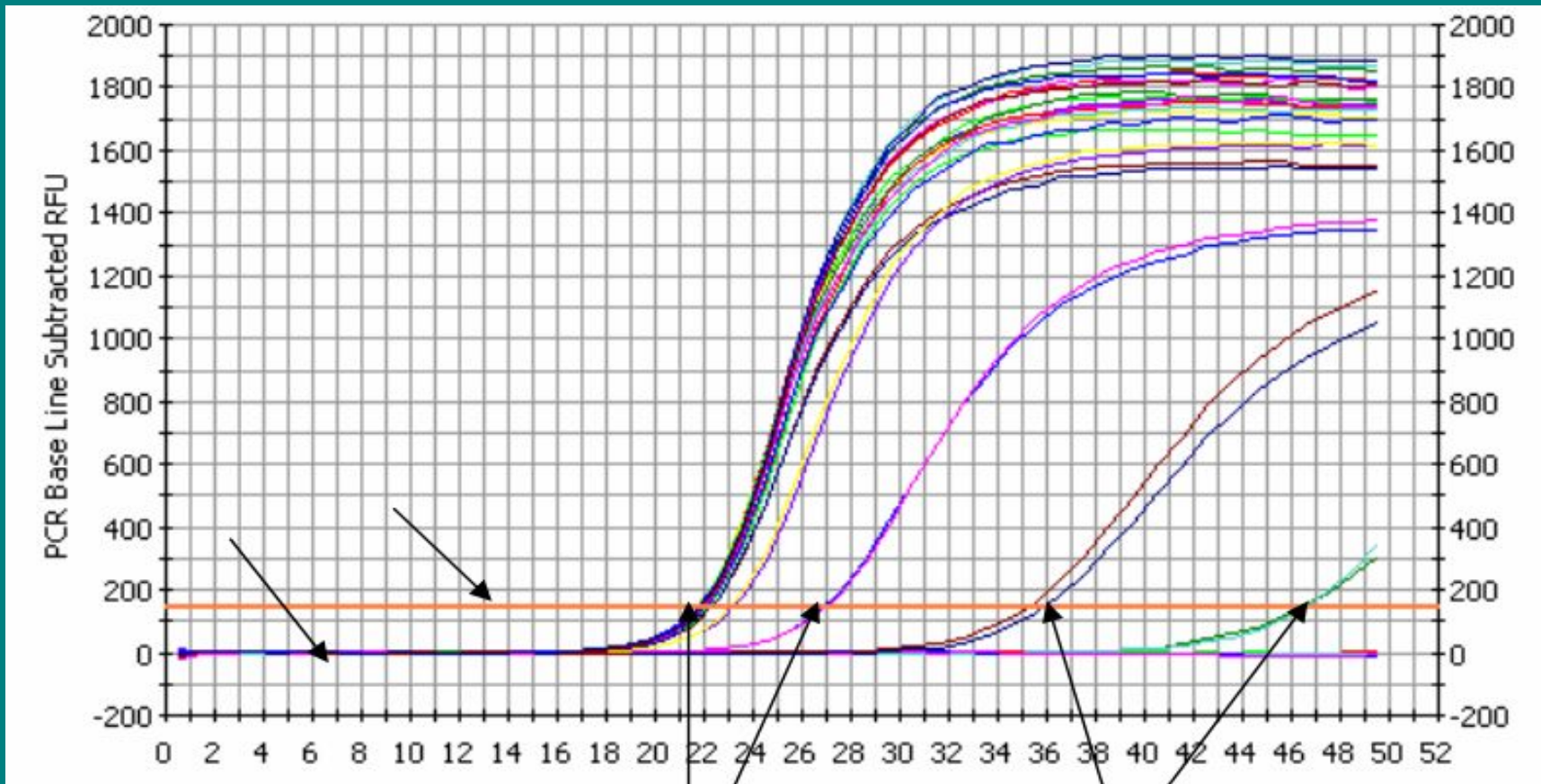


# Накопление продукта амплификации



# «Пороговый цикл» Ct

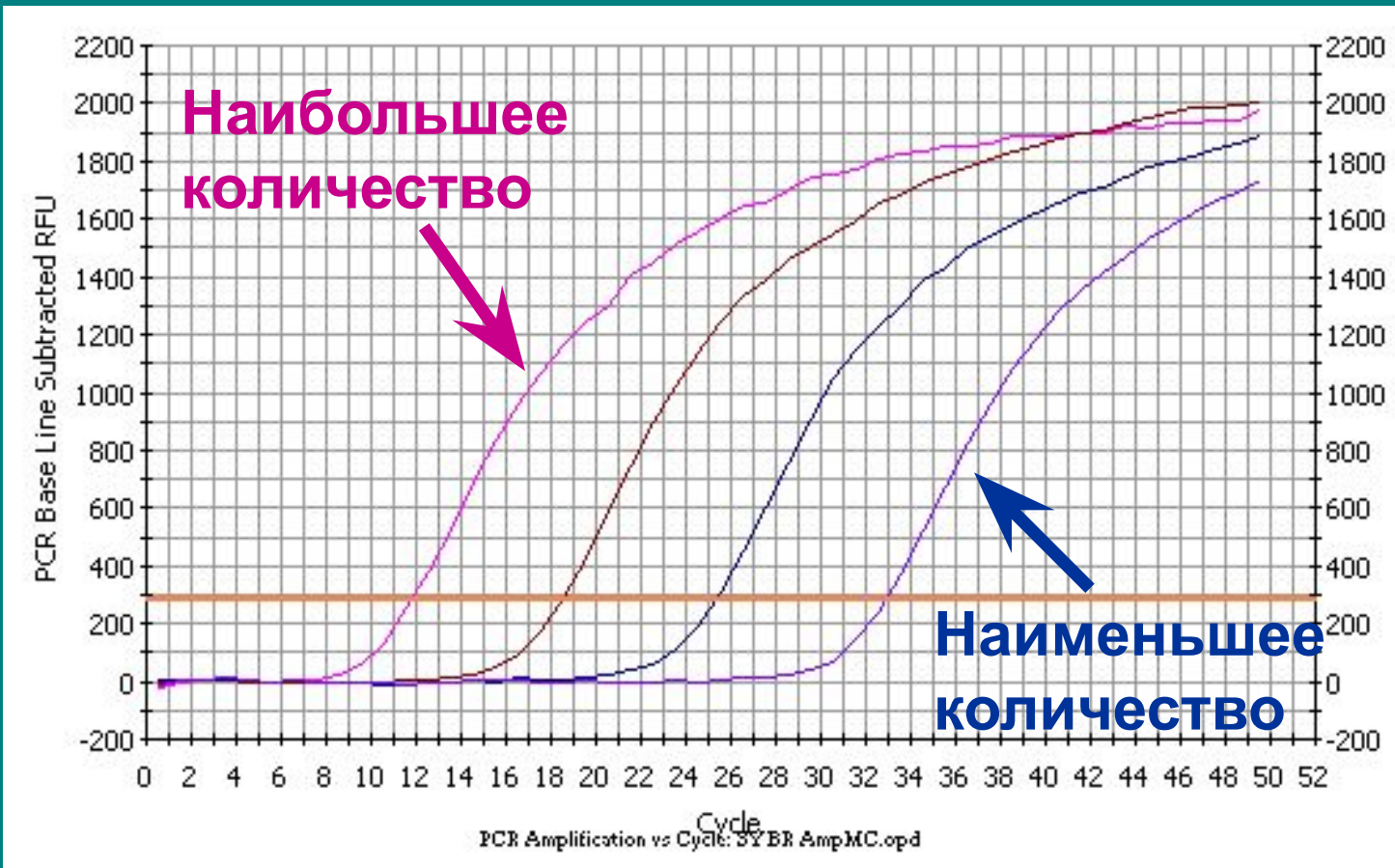
Пороговый цикл Ct – значение цикла амплификации, на котором флуоресценция зонда превысила значение фоновой флуоресценции



«Пороговый  
цикл»

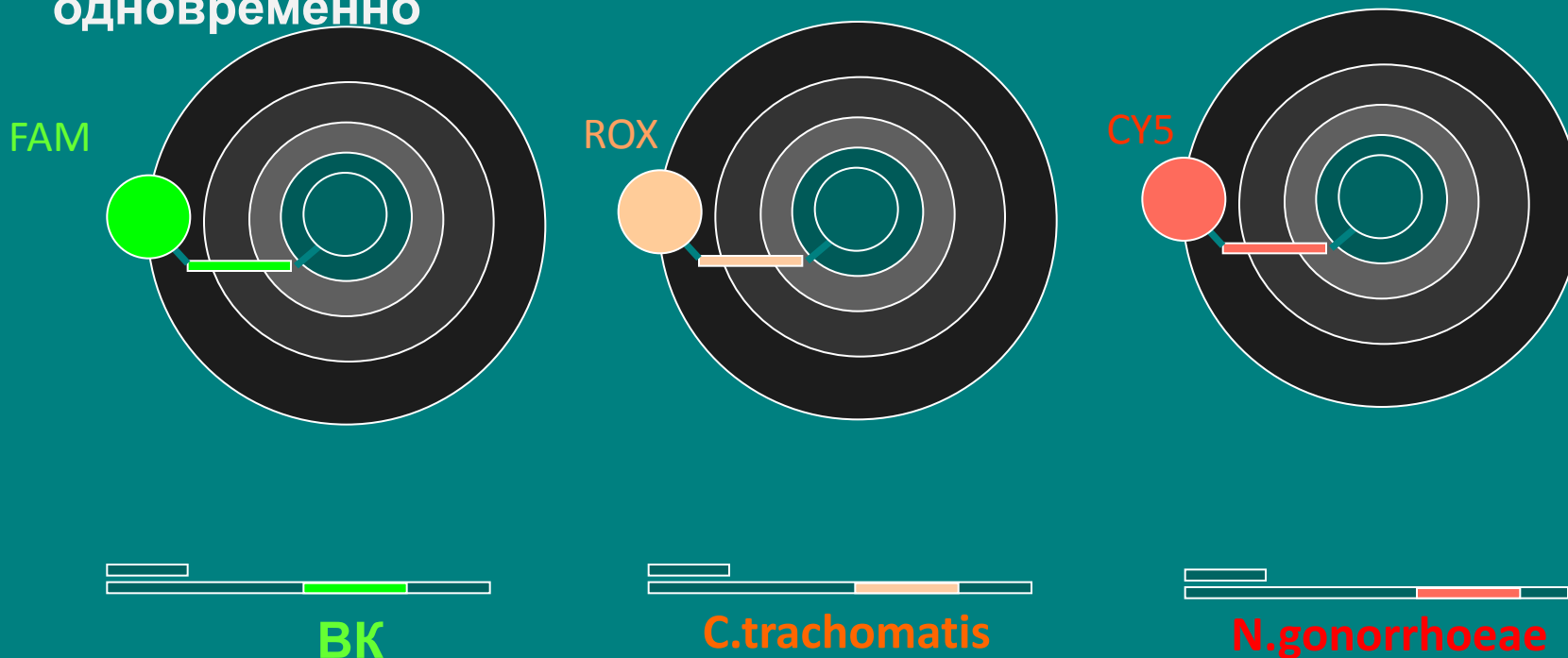


# Чем больше значение $C_t$ , тем меньше концентрация исходной НК



# 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