

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ»

**СОВРЕМЕННЫЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ  
И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ  
МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ**

Учебное пособие

Составители:  
О. А. Сафонова  
А. В. Семенихина  
Т. И. Рахманова  
Т. Н. Попова  
И. Ю. Степанова

Издательско-полиграфический центр  
Воронежского государственного университета  
2009

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>5</b>
<b>1. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ.....</b>	<b>6</b>
1.1. Реакция агглютинации (РА).....	7
1.1.1. Ориентировочная РА для идентификации микроба .....	8
1.2. Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) .....	8
1.3. Иммуноферментный анализ .....	10
1.3.1. Общие принципы метода гетерогенного ИФА.....	16
1.3.2. Динамика изменений показателей ИФА-тестов при инфицировании .....	19
<b>2. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ .....</b>	<b>22</b>
2.1. Выделение и анализ нуклеиновых кислот.....	23
2.1.1. Качественный анализ.....	24
2.1.2. Количественный анализ нуклеиновых кислот .....	24
2.2. Некоторые ферменты, применяемые в молекулярной диагностике .....	25
2.2.1. Нуклеазы и их применение .....	25
2.2.2. Ингибиторы РНКаз и их практическое применение.....	25
2.2.3. Рестриктазы .....	26
2.3. Гибридизационные методы .....	26
2.3.1. Получение зондов .....	29
2.3.2. Метод гибридизации в растворе .....	31
2.3.3. Метод гибридизации на твердом носителе.....	32
2.3.4. Гибридизация <i>in situ</i> .....	32
2.3.5. Блот-гибридизация.....	35
2.3.6. Метод сэндвич-гибридизации.....	36
2.3.7. Метод разветвленной ДНК.....	37
2.4. Методы амплификации нуклеиновых кислот .....	37
2.4.1. Полимеразная цепная реакция .....	38
2.4.2. Лигазная цепная реакция.....	56
<b>3. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ.....</b>	<b>57</b>
3.1. Метод ПЦР/ЛОЗ .....	57
3.2. Методы первичной идентификации мутаций .....	58
3.2.1. Секвенирование ДНК .....	59
3.2.2. Метод анализа конформационного полиморфизма одно- нитевой ДНК (Single Strand Conformation Polymorphism – SSCP).....	60

## 1. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Многие иммунологические системы детекции обладают высокой чувствительностью и специфичностью, являясь в то же время достаточно простыми. Они широко используются для тестирования лекарственных препаратов, оценки и мониторинга различных онкологических заболеваний, определения специфических метаболитов, идентификации и контроля патогенных микроорганизмов. Применение данных систем возможно при условии, что анализируемый компонент обладает свойствами антигена (АГ), то есть способностью вызывать в организме человека или животных синтез особых белков – антител (АТ), с высокой специфичностью связывающих антиген.

В качестве антигена могут выступать клетки микроорганизмов, вирусы, белки и полисахариды. Это полноценные антигены. Антитела образуются не против всей молекулы белка или бактериальной клетки, а только к небольшим участкам на их поверхности – антигенным детерминантам (эпитопам). Такие участки у белков включают не менее пяти аминокислотных остатков. Антигенные детерминанты разветвленных молекул полисахаридов представлены цепочками из четырех-шести остатков. Существуют также неполноценные антигены – гаптены. Антитела к гаптенам образуются лишь при их посадке на полимерную матрицу, в качестве которой используются белки, полимеры клеточных стенок бактерий, синтетические полиэлектролиты. Таким способом можно получить антитела к антибиотикам и другим лекарственным соединениям, стероидным и пептидным гормонам, витаминам, пестицидам и т.д. Гаптены представлены не только низкомолекулярными соединениями. Так, нуклеиновые кислоты сами по себе неиммуногенны. Однако антитела к нуклеиновым кислотам синтезируются, если они находятся в комплексе с белками. Антигенные детерминанты нуклеиновых кислот – три- и тетра-нуклеотиды.

Выделение и очистка антигена для создания диагностикума – достаточно трудоемкий процесс. В настоящее время данные задачи решаются с помощью методов биотехнологии путем создания генноинженерных (трансгенных) бактерий или дрожжей, синтезирующих антиген в необходимых количествах.

Иммунный ответ на введение одного антигена сопровождается синтезом антител, различающихся по структуре и функциональному предназначению. Это иммуноглобулины (Ig) классов G, D, E, A, M, из которых первые три могут связать по две молекулы антигена, то есть двухвалентны, IgA четырех- или восьмивалентны, IgM десятивалентны. С учетом того, что антиген, используемый для иммунизации животного, содержит не одну, а несколько антигенных детерминант, можно представить, какое множество антител вырабатывается в организме на введение одного антигена. Такие антитела называются поликлональными. Они гетерогенны по родству к антигенам. Их состав непостоянен и зависит от вида животного, его генетических особенностей и физиологического состояния.

Антитела получают путем иммунизации животных соответствующим антигеном: в лабораторных условиях это мыши, морские свинки, кролики, на производстве – овцы, козы, лошади. Пригодны куры: антитела после иммунизации выделяют из желтков яиц.

Для очистки и стандартизации поликлональных антител используется аффинная хроматография. Сыворотка крови от иммунизированного животного пропускается через колонку с полисахаридным носителем, к которому ковалентно пришит антиген. Специфические антитела связываются антигеном, все другие белки, и в том числе антитела с низким сродством к антигену, проходят через колонку, вслед за этим специфически связанные антитела смывают с колонки кислым или щелочным раствором: связь антигена с антителом нековалентна. Один цикл аффинной хроматографии позволяет очистить белки в 1000 раз и более.

Однако даже такой способ очистки не позволяет полностью избавиться от гетерогенности препарата антител. Антитела с одной специфичностью, реагирующие с единственной антигенной детерминантой (моноклональные) получают методами клеточной инженерии путем гибридизации иммунокомпетентных В-лимфоцитов и клеток миеломных опухолей, способных к быстрому размножению, неограниченному числу делений (в отличие от большинства неопухолевых клеток, у которых число делений ограничено). Препараты моноклональных антител характеризуются постоянством состава и физико-химических свойств, низкой вероятностью перекрестной реакции с «чужими» антигенами. Это высокотехнологичный продукт. Его недостаток – сравнительно низкое сродство к субстрату, низкая аффинность.

Все иммуномикробиологические методы (ИМ) можно разделить на 3 группы:

- основанные на прямом взаимодействии антигена с антителом (феномены агглютинации, преципитации, гемагглютинации, иммобилизации и др.);
- основанные на опосредованном взаимодействии антигена с антителом (реакции непрямой гемагглютинации, коагглютинации, латекс-агглютинации, угольной аггломерации, бентонит-агглютинации, связывания комплемента и др.);
- с использованием меченых антител или антигенов (метод флуоресцирующих антител, иммуноферментный и радиоиммунный анализы, спиниммунологический и другие методы).

### 1.1. Реакция агглютинации (РА)

Реакция основана на взаимодействии поверхностных антигенов бактерий и других корпускулярных частиц с антителами и протекает в две фазы:

*специфическая фаза* – связывание детерминантной группы (эпитопа) антигена с паратопом – активным центром иммуноглобулина (невидимая фаза);

*неспецифическая (видимая) фаза* – образующийся комплекс (АГ+АТ) утрачивает растворимость и выпадает в осадок в виде хлопьев. Однако это явление возможно лишь в электролитной среде, например в 0,85 % растворе натрия хлорида.

РА можно применять для обнаружения специфических антител в сыворотке крови и, наоборот, при помощи стандартной агглютинирующей сыворотки можно идентифицировать выделенные микробы.

### ***1.1.1. Ориентировочная РА для идентификации микроба***

Реакция служит для предварительного определения вида микроба. На предметное стекло наносят каплю узкоспецифичной адсорбированной сыворотки (т.е. сыворотку, содержащую только специфические антитела). Сыворотку наносят в разведении 1:10 и рядом – каплю физиологического раствора (контроль). Исследуемую культуру микроба петлей вносят в обе капли и размешивают. Через 2–4 мин учитывают результат. При положительной реакции (соответствие исследуемой культуры диагностической сыворотке) наблюдается скучивание бактерий в виде хлопьев на фоне прозрачной жидкости. В контроле – равномерная муть.

Кроме специфической агглютинации бактерий, вызванной антителами, возможна спонтанная агглютинация (в отсутствие иммунной сыворотки). Спонтанную агглютинацию дают L-формы бактерий, не образующие гомогенной взвеси в изотоническом растворе хлорида натрия и осаждающиеся в виде клеточных агрегатов. При кислой реакции среды в результате снятия одноименного заряда с поверхности бактериальных клеток в изoeлектрической зоне также происходит склеивание – наступает «кислотная» агглютинация. Чтобы исключить возможность учета ложноположительных результатов спонтанной агглютинации, всегда ставят контрольную пробу с изотоническим раствором хлорида натрия.

## **1.2. Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)**

РНГА является своеобразной модификацией РА. Сущность реакции состоит в том, что молекулы антигена адсорбируются на поверхности эритроцитов. Такие «нагруженные» антигенами эритроциты приобретают способность агглютинироваться иммунной сывороткой, специфичной для данного антигена. Эритроциты склеиваются и выпадают в осадок, образуя на дне пробирки гемагглютинат. В последнее время РНГА получила широкое распространение благодаря высокой чувствительности, экспрессивности и простоте постановки.

В лунках полистироловых планшетов готовят ряд последовательных двукратных разведений сыворотки. В предпоследнюю лунку вносят 0,5 мл заведомо положительной сыворотки и в последнюю – 0,5 мл физиологического раствора (контроль). Затем во все лунки добавляют по 0,1 мл разве-