

Məşğələ 13

Komplementin birləşmə reaksiyası. Radial hemoliz reaksiyası. İmmunflüoresensiya reaksiyası (İFR), immunferment analizi (İFA), Radioimmun metod (RİM). İmmunblotinq (İB). Genetik metodların mikrobioloji diaqnostikada tətbiqi. Zəncirvari polimeraza reaksiyası (ZPR). Molekulyar hibridləşmə üsulu. Sekvenləşdirmə

Müzakirə olunan suallar:

1. Komplementin birləşməsi reaksiyası (KBR) və onun mahiyyəti
2. KBR-in mexanizmi və diaqnostikada əhəmiyyəti.
3. Nişanlanmış anticisimlərin iştirakı ilə gedən reaksiyaların mahiyyəti.
4. Nişanlanmış anticisimlərin iştirakı ilə gedən reaksiyaların ekspress diaqnostikada əhəmiyyəti.
5. İmmunflüoresensiya reaksiyasının (Kuns reaksiyası) mexanizmi: düz variant (İFR) və dolay variant (dİFR).
6. İmmunferment analiz və onun mahiyyəti: düz və dolay variantlar.
7. Radioimmun metod (konkurent, əks və dolay), tətbiqi.
8. İmmunblotinq, mexanizmi.
9. Genetik metodların mikrobioloji diaqnostikada tətbiqi.
10. Molekulyar-genetik üsullar, növləri, diaqnostikada tətbiqi.
11. Zəncirvari polimeraza reaksiyasının (ZPR, real-time ZPR) mahiyyəti, mexanizmi və təcrübi əhəmiyyəti.
12. Molekulyar hibridləşmə üsulu, mahiyyəti, mexanizmi və təcrübi əhəmiyyəti.
13. Restriksion analiz, mahiyyəti, mexanizmi və təcrübi əhəmiyyəti.
14. Sekvenləşdirmə üsulu, mahiyyəti, mexanizmi və təcrübi əhəmiyyəti.
15. Gen mühəndisliyi, məqsəd və vəzifələri.

Lizis və hemoliz reaksiyaları. İnfeksiya və immunizasiya zamanı insan və heyvan zərdabında lizin adlanan anticisimlər də əmələ gəlir ki, bunlar da uyğun antigenlərlə rastlaşdıqda onları əritmə qabiliyyətinə malik olurlar.

Lizis reaksiyası mürəkkəb reaksiya olub, 3 komponentin: antigen (mikrob hüceyrələri, eritrositlər), anticisim (lizin) və heyvanın qan zərdabında olan komplementin iştirakı ilə gedir. Bakteriyaların lizisinə səbəb olan anticisimlər *bakteriolizinlər*, eritrositləri lizisə uğradanlar isə *hemolizinlər* adlanırlar.

Vəba vibrionları və treponemalardan başqa, əksər mikroblar anticisimlərin *litik* (əridici) təsirinə davamlıdırlar. Ona görə də, lizis reaksiyası laboratoriya təcrübəsində infeksiya xəstəliklərin diaqnostikasında geniş tətbiq olunmur.

Bakterioliz reaksiyası. Bioloji lizis hadisəsini ilk dəfə Pfeyffer və İsayev müşahidə etmişlər. Onlar bu reaksiyadan həqiqi vəba vibrionlarını yalançı vibrionlardan fərqləndirmək məqsədilə istifadə etmişlər.

Həmin fenomeni qoymaq üçün iki dəniz donuzunun birini vəbaya qarşı immunlaşdırmışlar. Sonra hər 2 heyvanın qarın boşluğuna yoxlanılacaq mikrob kulturasından hazırlanmış suspenziya yeritmişlər. 10dəq, 20dəq, 60dəq fasilələrlə hər iki dəniz donuzunun qarın boşluğundan Paster pipetkəsi ilə alınmış eksudatı mikroskopik (yaxma, əzilən damcı, neqativ preparat) və bakterioloji üsullarla müayinə etmişlər. Əgər peyvənd edilmiş heyvanın bədənində lizinlər əmələ gəlsə, o zaman əzilən damcıda vibrionlar hərəkətdən qalır, deformasiyaya uğrayır, dənəciklər şəklində görünür və nəhayət, onlar yox olurlar. Aqarda əkilmiş materialda əkmə müddətindən asılı olaraq, mikrob koloniyalarının sayı get-gedə azalır, heyvan sağ qalır. Kontrol heyvanlardan alınmış eksudatın müayinəsi tamamilə əks nəticə verir, yəni mikroskopik tədqiqat zamanı vibrionlarda nəzərə çarpan morfoloji və bioloji dəyişiklik qeyd edilmir, hətta bakterioloji müayinədə aqarda mikrob koloniyalarının miqdarca bir qədər də artması müşahidə edilir və heyvan ölür.

Hemoliz reaksiyası. Hemoliz reaksiyası, demək olar ki, bakterioliz reaksiyasından fərqlənir. Belə ki, bunun da qoyuluşunda hüceyrə (eritrosit), müvafiq anticisim, hemolizin və complement iştirak edir. Ancaq burada eritrositlər bakteriyalara nisbətən daha asan əriyir.

Bundan başqa, bakterioliz reaksiyası zamanı gözlə görülmə biləcək bir dəyişiklik nəzərə çarpmadığı halda, hemoliz reaksiyasında bulanıq qarışıq bir neçə dəqiqə ərzində 37°C temperaturda eritrositlərin tamamilə əriməsi nəticəsində şəffaflaşaraq, al qırmızı lak rəngi alır və sonralar heç bir çöküntü müşahidə edilmir. Hemoliz reaksiyası da bakterioliz reaksiyası kimi spesifikdir. Belə ki, sağlam dovşanın qan zərdabı qoyun eritrositləri emulsiyası ilə qarışdırıldıqda, adətən eritrositlər ərimir və tədricən çöküntüyə keçir və maye rəngsizləşir (şəffaflaşır).

Əgər qoyun eritrositləri bir neçə dəfə sağlam dovşanın qulaq venasına yeridilirsə, axırını ineksiyadan 5-6 gün keçdikdən sonra heyvandan qan alıb, onun zərdabı yenidən həmin eritrositlərin emulsiyası ilə qarışdırılarsa, eritrositlərin bir neçə dəqiqədən sonra əriməsi müşahidə edilir. Buradan belə bir nəticə çıxarmaq olur ki, dovşanın qanında qoyunun eritrositlərinə qarşı müəyyən litik amil (lizinlər) əmələ gəlmişdir. Ona görə də belə dovşanın qan zərdabını digər heyvanların qanı ilə qarışdırdıqda hemoliz hadisəsi müşahidə olunmur. Bəzi qoyun eritrositlərinə qarşı immun zərdabı 56°C temperaturda 30 dəq qızdırdıqda zərdabın hemolitik xassəsinin itdiyini görmüşdür. Lakin bu qarışıqda hər hansı bir heyvandan alınmış təzə zərdab əlavə edilən zaman eritrositlərin yenidən hemolizə uğradığı müşahidə edilmişdir. Beləliklə, hemoliz reaksiyasında, əsasən, iki amilin iştirak etdiyi müəyyən edilmişdir. Bunlardan biri spesifik, nisbətən termostabildir ki, *hemolizin* adlanır, digər isə qeyri-spesifik termolyabildir, buna da *komplement* deyilir. Hemoliz reaksiyasının diaqnostik əhəmiyyəti yoxdur, lakin ondan komplementin birləşmə reaksiyasında bir indikator kimi istifadə olunur.

Hemoliz reaksiyası 2 fazada gedir. Birinci fazada eritrositlərlə hemolitik zərdab arasında qarşılıqlı təsir nəticəsində eritrositlər sensibilizasiya olunurlar. İkinci fazada sensibilizasiya olunmuş eritrositlər komplementi fiksə edirlər və nəticədə onların hemolizi baş verir. Bu reaksiya hemoliz deyil, *hemoqlobulinoliz* reaksiyasıdır, belə ki, hemoqlobulinlə eritrositlərin xarici divarı arasındakı əlaqənin pozulması ilə müşayiət olunur. Azad olmuş hemoqlobin eritrositlərdən asanlıqla xarici mühitə çıxır. Həqiqi hemoliz isə eritrositlərə hipertonik məhlulla təsir etmək nəticəsində baş verir. Bu zaman eritrositlərin xarici divarı əvvəlcə dartılır, sonra dağılır, nəticədə eritrositlərdən sərbəst hemoqlobin xaric olur.

Eritrosit suspenziyası reaksiyanın qoyulması ərəfəsində hazırlanır. Qan, qoyunun yuxarı boş venasından götürülür və içərisində muncuqlar olan flakona tökülür, 10-15 dəq müddətində çalxalamaqla o, fibrinsizləşdirilir. Eritrositlər sentrifugallaşdırılır, izotonik məhlulda bir neçə dəfə yuyulur. Axırını dəfə yuyulan məhlul tam şəffaf olmalıdır. Eritrositlərin 3%-li suspenziyasını əldə etmək üçün eritrosit çöküntüsündən götürülür, izotonik məhlulda həll edilir.

Hemolitik zərdab xüsusi institutlarda və ya biofabriklərdə hazırlanır. Bu məqsədlə dovşanlar 2-5 ml 50%-li qoyun eritrositləri suspenziyasını 3-4 dəfə venadaxili yolla yeritməklə immunizasiya edilir. Axırını ineksiyadan 6 gün keçdikdən sonra, nümunə üçün qan götürülür və xüsusi sxemə əsasən zərdabın titri təyin edilir. Əgər titr kifayət qədərdirsə, onda lazımı miqdarda qan götürülür.

Hemolitik zərdabın titri, onun elə yüksək durulaşmasıdır ki, bu durulaşmada o, komplementin iştirakı ilə 1 saat müddətində 37°C temperaturda tam hemolizin getməsinə səbəb olur. Hemolitik zərdabın titri 1:1200-ə nisbətdən az olmamalıdır. Hemoliz reaksiyası üçün hemolitik zərdab üç qat titrdə, yəni üç qat miqdarda götürülür.

Komplement hər bir təzə qan zərdabında olur. Adətən dəniz donuzunun zərdabından istifadə edilir. Qanı təcrübə ərəfəsində heyvanın ürəyindən götürmək lazımdır. Komplementin miqdarının heyvanın fizioloji halından, yaşından və qidalanmasından asılı olduğunu nəzərə alıb, qanı 3-4 heyvandan götürmək vacibdir. Qan laxtalandıqdan sonra zərdabı ayıraraq NaCl-un izotonik məhlulunda 1:10-a və ya 1:20-yə nisbətində durulaşdırıb titrləmək lazımdır.

Titrlənmə təcrübəsi iki kontrolla müşahidə olunur. Onların birində hemolitik zərdabla sensibilizasiya olunmamış eritrositlər və komplement, ikincisində isə komplementsiz sensibilizasiya olunmuş eritrositlər iştirak edir. Bu iki sınaq şüşəsində hemoliz baş vermir.

Qeyd edildiyi kimi, insan zərdabında komplementin titri orqanizmin immunoloji vəziyyətini öyrənmək üçün təyin edilir. İnsan qanında olan komplementin titrlənmə metodikası, dəniz donuzlarının zərdabındakı komplementin titrlənməsi təcrübəsi ilə analojidir.

Komplementin birləşmə reaksiyası (KBR). Komplementin birləşmə reaksiyası antigen-anticism kompleksinin əmələ gəlməsi əsasında baş verən mürəkkəb seroloji reaksiyadır ki, əgər bu baş verərsə komplement də onun üzərinə adsorbsiya olunur və reaksiya müsbət hesab olunur,

yəni komplementin birləşmə reaksiyası baş vermiş olar. Əgər bu antigen eritrosit olarsa, onda eritrosit hemolizə uğrayır.

Bu reaksiya mürəkkəb seroloji reaksiyalardan biri olub, özünün qoyuluş texnikası, həssaslığı, spesifikliyi, infeksiyon xəstəliklərin seroloji diaqnozunda geniş tətbiq edilməsi ilə başqalarından fərqlənir. KBR ilk dəfə 1901-ci ildə Belçika alimləri Borde və Janqu tərəfindən işlənib hazırlanmışdır. 1910-cu ildə alman alimi Vasserman onu sifilisin seroloji diaqnozunda tətbiq etmişdir. Bu alimlərin fikrincə infeksiya və immunizasiya prosesində insan və heyvanların qanında xüsusi anticisimlər əmələ gəlir ki, bu da müvafiq antigenlərlə qarşılaşdıqda onlar birləşib komplement adlanan termolabil qeyri-spesifik maddəni adsorbsiya edir. Ancaq bu birləşmə zamanı mühitdə nəzərə çarpan heç bir dəyişiklik müşahidə olunmur. Reaksiyanın qoyuluşunda qan zərdabı, müvafiq antigen, bir də komplement götürülür (hamısı ekvivalent miqdarda). Bu qarışıq termostata bir saat ərzində saxlanılır. Əgər xəstənin qan zərdabında antigenə uyğun anticisimlər olarsa, onda bunlar birləşib antigen-anticisim kompleksi əmələ gətirir, bu zaman mühitdə olan komplement həmin kompleksə adsorbsiya edilərək komplementin birləşmə reaksiyasını törədir. Lakin sınaq borusunda gözlə görünə biləcək bir dəyişiklik olmadığından reaksiyanın müsbət və ya mənfi olması barədə qəti fikir söyləmək mümkün olmur. Ona görə də reaksiyanın ikinci fazasında hemolitik sistemdən (indikator sistemdən) istifadə olunur, yəni bu sistem birincinin üzərinə tökülüb yenidən termostata qoyulmalıdır.

Hemolitik sistem qoyun eritrositlərinin emulsiyası ilə onlara qarşı əmələ gətirilən hemolitik zərdabın bərabər qarışıqından ibarətdir. Qanın əriməsi üçün sərbəst komplementin olması zəruridir. 1-ci və 2-ci sistemlər qarışdırıldıqdan sonra qarışıq yenidən 1 saat termostata və 18-24 saat otaq temperaturunda saxlanılır, bundan sonra reaksiyanın nəticəsi qeyd olunur. Əgər 1-ci sistemdə uyğunluq varsa, yəni antigen-anticisim kompleksi əmələ gəlibsə komplement antigen-anticisim kompleksi ilə birləşir və eritrositlərin əriməsi üçün komplement sərbəst olmadığından hemoliz getmir və eritrositlər çöküntüyə keçərək üzərindəki mayenin şəffaflaşmasına səbəb olur.

Əksinə, birinci fazada zərdabla antigen arasında uyğunsuzluq olduqda onlar birləşmir, komplement də sərbəst qaldığından o, hemolitik sistemlə köməkləşir və eritrositlərin əriməsinə şərait yaranır, bu da reaksiyanın mənfi olduğunu göstərir, yəni KBR mənfi, hemoliz reaksiyası müsbət olur, deməli şəxs xəstə deyildir. Bu reaksiya virus xəstəliklərində, rikketsioz, süsənək, vərəm, brusellyoz, göy öskürək və s. bir sıra infeksiyon xəstəliklərin seroloji diaqnostikasında tətbiq edilir.

Reaksiyanın qoyulma texnikası. KBR-i qoymaq üçün xüsusi hazırlıq tələb olunur. İstifadə olunacaq qablar (sınaq boruları, pipetkalar, flakonlar) təmiz yuyulur, başqa məqsədlə istifadə olunmur. Təcrübə qoyulana qədər reaksiyanın bütün inqridientləri hazırlanır və titrlənir.

Xəstənin qan zərdabı. Müayinə üçün qan ac qarnına götürülür və həmin müddətdə xəstənin spirtli içkilər, yağlı və duzlu yeməklər qəbul etməsi qadağan edilir.

Reaksiyanın qoyulmasından bir gün əvvəl komplementi kənar etmək məqsədilə qan zərdabı 30 dəq müddətində 56°C temperaturda su hamamında qızdırılmaqla inaktivləşdirilir.

Reaksiya qoyulan gün qan zərdabı 1:5, 1:10 və s. nisbətlərində durulaşdırılır. Bu reaksiyada titr tək-tək hallarda 1:320 nisbətində ola bilər.

Antigen, xüsusi institutlarda hazırlanır. KBR-də antigen kimi öldürülmüş bakteriya suspenziyasından, mikroblu toxuma ekstratlarından, lipidli toxuma ekstratından istifadə olunur.

Spesifik zərdabla antigenin titri təyin edilir. Antigenin titri ampula üzərində olan etikətdə qeyd olunur. Bütün mikrob antigenləri müəyyən miqdar komplementi adsorbsiya edir. Ona görə də titrləmədən əvvəl onların antikomplementar xüsusiyyəti, təyin edilir. KBR-i qoymaq üçün antigenin $\frac{1}{2}$ və $\frac{2}{3}$ titrinə bərabər olan işçi dozасыndan istifadə edilir.

Reaksiyanı qoymazdan əvvəl antigen natrium-xlorun izotonik məhlulunda elə durulaşdırılır ki, 1ml-də olan doza titrə bərabər olsun. Məsələn, antigenin titri 0,04ml-ə bərabərdir. Durulaşdırmaq üçün 0,04ml antigen və 0,96ml izotonik məhlul götürülür.

Reaksiyada bütün inqridientlər 0,5ml həcmində götürüldüyü üçün antigenin miqdarı titrin yarısına bərabər olacaqdır (işçi doza). Digər komponentlər isə hemoliz reaksiyası üçün hazırlanmış kimi hazırlanır (cədvəl).

Cədvəldən görüldüyü kimi, KBR iki fazada aparılır. Birinci fazada, yəni inkubasiya fazasında 1-ci sınaq borusuna zərdab, antigen və komplement, 2-ci sınaq borusuna zərdab,

komplement və 0,85%-li NaCl məhlulu (zərdabın kontrolu), 3-cü sınaq borusuna antigen, komplement və 0.85%-li NaCl məhlulu (antigenin kontrolu) tökülür.

Komplementin birləşmə reaksiyasının qoyulma sxemi.

Cədvəl

Birinci sistem (faza)				İkinci sistem (faza)	
Sınaq boruları inqridient, ml	1-ci təcrübə	2-ci zərdabın kontrolu	3-cü antigenin kontrolu	Sınaq boruları inqridient, ml	4-cü
Müayinə olunacaq zərdab, 1:5 nisbətində durulaşmışdır	0,5	0,5	-	Hemolitik zərdab üçqat titrdə	2
Antigen, işçi dozada	0,5	-	0,5	3%-li qoyun eritrositlərinin suspensiyası	2
Komplement, işçi dozada	0,5	0,5	0,5		
0,85%-li NaCl məhlulu	-	0,5	0,5	Sınaq boruları 37°C 30dəq termostata qoyulur	
	Sınaq boruları 37°C-də 1 saat termostata qoyulur				

İkinci fazada, yəni indikator fazasında 1 sınaq borusuna hemolitik zərdab və qoyun eritrositləri, yəni hemolitik sistem tökülür və hər iki sistemin (fazanın) sınaq boruları 37°C termostatda 1 saat saxlanılır.

Sonra birinci sistemin sınaq borularının hər birinə 1ml ikinci sistemdən (hemolitik zərdab və eritrosit qarışığı) əlavə olunur və qarışdırıldıqdan sonra yenidən 1 saat müddətində 37°C temperaturda saxlanılır.

Sınaq boruları termostatdan çıxarıldıqdan sonra təxmini nəticə, onları 15-18 saat otaq temperaturunda və ya soyuducuda saxlandıqdan sonra isə axırncı nəticə qeyd olunur.

Axırncı nəticədə, reaksiyanın intensivliyi müsbətlərlə qeyd olunur: ++++ reaksiya kəskin müsbət, yəni hemolizin tam dayanması ilə xarakterizə olunur, sınaq borusunda maye şəffaf olmaqla, bütün eritrositlər dibə çökür. +++ və ++ müsbət, reaksiyadan zəif hemoliz nəticəsində mayenin azacıq rənglənməsi müşahidə edilir və çöküntüdə eritrositlərin miqdarı az olur; + reaksiya zəif müsbət, maye intensiv rənglənməmiş olur və sınaq borusunun dibində çökmüş eritrositlərin nəzərə çarpacaq miqdarı az olur.

Reaksiyanın mənfi olması “-” işarəsilə qeyd olunur. Bu zaman tam hemoliz nəticəsiündə sınaq borusundakı maye intensiv çəhrayı (al qırmızı lak) rəngdə müşahidə edilir.

İmmunflüoressensiya reaksiyası (İFR). Hal-hazırda nişanlanmış antigen və yaxud anticisimlərin iştirakı ilə gedən seroloji reaksiyalar geniş tətbiq olunur. Bunlara immunflüoressensiya reaksiyası, radioimmun və immunerferment üsullar aiddir. Öz həssaslığına görə onlar digər seroloji reaksiyalardan üstün hesab edilir.

Əksər virus infeksiyalarının (qrip, paraqrip, çiçək, uçuq, adenovirus, arbovirus infeksiyalarında və s.) ekspres diaqnostikasında bu reaksiyadan istifadə olunur. Bu üsulun üstün cəhəti ondan ibarətdir ki, hətta tək-tək yoluxmuş hüceyrənin belə aşkar edilməsinə imkan yaradır. Bu reaksiyadan həm virusların indikasiyasında, həm də identifikasiyasında istifadə etmək olar.

İmmunoflüoressensiya zamanı işlədilən flüoressensiyaedici immün zərdab xüsusi maddələrlə, yəni flüoroxromlarla işlənmiş zərdab olur.

Məlum olduğu kimi, virusun reproduksiyasından asılı olaraq antigen nüvədə, protoplazmada, ya da ki, hər ikisində yerləşə bilər. Məsələn, quduzluqda, çiçəkdə işıqsəcma hüceyrənin protoplazmasında, adenovirus infeksiyalarında isə nüvəsində müşahidə olunur. Ona görə də çalışmaq lazımdır ki, öyrəniləcək hüceyrənin strukturu dağılmasın.

İmmunflüoressensiya üsulunun mahiyyətini antigenlə spesifik anticisim arasında gedən reaksiya təşkil edir. Əvvəlcə immün zərdab hər hansı bir flüoroxromla (rodamin, izotiosionat) işlənir və həmin flüoroxromla birləşmiş anticisimlər özlərinin müvafiq antigenlə birləşmə qabiliyyətini saxlayır. Müayinə ediləcək yaxmaya flüoroxromla nişanlanmış anticisim əlavə

edildikdə o, spesifik antigenin üzərinə adsorbsiya olunur və onunla möhkəm birləşir, çökməmiş anticisimlər isə fizioloji məhlulla yuyulub gedir. Preparata lüminessent mikroskopla baxdıqda qara fonda yalnız spesifik anticisimlə birləşmiş antigenlər işıq saçır.

İmmunflüoressensiya reaksiyası iki cür olur: düz və dolay.

Düz immünflüoressensiyanın köməylə patoloji materialda virusun olub-olmaması meydana çıxarılır. Bunun üçün orqan kəsiklərindən, toxuma kulturasından basma (iz) yaxmalar hazırlanır, otaq temperaturunda qurudulur, sonra metil spirtində və asetonla 10 dəq fiksasiya edilir. Əgər patoloji material kimi burun-udlaq epitel heceyrələri lazımdırsa, onda quru tamponla material götürülür və içərisində 2-3 ml fizioloji məhlul olan sınaq şüşəsinə salınır, çalxalandıqdan sonra tampon çıxarılır, sonra isə sınaq şüşəsində qalan maye 5-10 dəq müddətində 3000 dövr/dəq sürətlə sentrifüqadan keçirilir. Çöküntüdən 4 yaxma hazırlanır, otaq temperaturunda qurudulur, metil spirti və asetonla 10-15 dəq fiksasiya edilir. Rəngləmədən əvvəl preparat 20 dəq ərzində axar su altında yuyulur, qurudulur. Etikatkada göstərilən qayda üzrə fizioloji məhlulla durulaşdırılmış işçi qarışıq, yəni flüoressin– izotiosionatla nişanlanmış spesifik flüoressensiyaedici anticisim və radominlə nişanlanmış normal öküz zərdabı albumini qarışığıyla rənglənilir. Rəngləmə 30 dəq müddətində 37°C-də nəm kamerda aparılır. Sonra konyuqatin artığı axar su altında 1 saat ərzində yuyulur, distillə edilmiş su ilə yaxalanır və havada qurudulur. Yaxşı olar ki, mikroskopiyaadan əvvəl preparatın üzərinə qələvi qliserinli bufer məhlulu (məsələn: qliserinin 10%-li tris-bufer məhlulu ilə 9:1 nisbətli qarışığı) əlavə edilsin. Bu, flüoressensiyanı stabilləşdirir və flüoressensiyaedici obyektin şəklinin çəkilməsinə imkan verir.

Lüminessent mikroskopiya üçün ML-1, ML-2, MLD və s. mikroskopun yağlı sistemlə baxılır. Konyuqat qarışığının düzgün seçilməsi hüceyrəni əhatə edən sahənin və əlavə heterogen hissəciklərin sarı-qırmızı (rodaminin rəngi) rəngi fonunda, hüceyrə daxilində yerləşən virusun açıq-yaşıl rəngdə işıq verməsinə imkan yaradır.

Dolay immünflüoressensiya üsulu daha həssas üsuldur. Bu reaksiyada mütləq üç komponent iştirak etməlidir: antigen+immun-qlobulin + flüoressensiyaedici antiqlobulin. Əvvəlcə antigen nişanlanmamış immun-qlobulinlə birləşir və əmələ gəlmiş kompleks flüoressensiyaedici antiqlobulin zərdabının köməylə aşkar edilir. Belə ki, yaxmanın üzərinə 1-2 damla 1:2 nisbitində durulaşdırılmış nişanlanmamış immun zərdab əlavə edib 30 dəq 37°C-də nəm kamerada yerləşdirilir. İmmun zərdab həm polivalent, həm də tip spesifikliyinə malik ola bilər. Məsələn, Herpes virusu ilə yoluxmuş hüceyrə qatının üzərinə dovşandan alınmış nişanlanmamış anti Herpes zərdabı əlavə edilir. Sonra yaxma 30 dəq müddətində axar su altında yuyulur və üzərinə flüoressensiyaedici spesifik növ əleyhinə (immün zərdabla işlənmiş) qlobulin əlavə edib, yenidən 15 dəq 37°C-də nəm kamerada yerləşdirilir.

Bu zaman tam bir kompleks aşkara çıxarılır: antigen + anticisim + flüoressensiyaedici antiqlobulin.

Yaxmaların yuyulması və mikroskopiya düz immün flüoressensiyadakı kimi aparılır. Reaksiya müsbət olduqda nüvədə və ya sitoplazmada, bəzən də hər ikisində parlaq yaşıl işıqlanma görünür. Polivalent zərdabla reaksiya müsbət olduqda monovalent zərdabın köməylə virusun tipi təyin edilir.

İmmunferment analiz (İFA). Üsulun mahiyyəti fermentlərlə nişanlanmış anticisimlərin (AT) substratı parçalamaq xassəsindən və boyanmış məhsulların (xromogenin) əmələ gəlməsindən ibarətdir. Fermentlə birləşmiş (konyuqasiya olunmuş) anticisim homoloji antigenlə (AG) birləşə bilmək qabiliyyətini saxlayır. Xromogenin boyanma intensivliyi əmələ gələn antigen-anticisim + ferment kompleksinin miqdarına uyğun gəlir.

Ferment kimi ən çox peroksidaza və qələvi fosfatazadan istifadə edilir. Peroksidaza üçün substrat hidrogen peroksiddir, xromogen isə 5-aminosalisilin turşusu, orto-fenilendiamid və s. təşkil edir.

Bu reaksiyanın homogen və heterogen, yaxud bərk fazalı İFA variantı xüsusilə əhəmiyyət kəsb edir.

Hal-hazırda mikrobioloji tədqiqatlarda ən çox İFA-nın *bərk fazalı modifikasiyasından* istifadə edilir. Bu üsulda hər hansı bərk maddəyə antigen yaxud anticisim toplanır (yığılır), bundan sonra seroloji reaksiyanın digər inqridiyentləri əlavə edilir. Məlum olmayan anticisimləri təyin etmək üçün aşağıdakı mərhələlərdən istifadə edilir: 1) məlum antigenin planşetin çuxurlarının divarları ilə birləşməsi; 2) müayinə olunan serumun daxil edilməsi; 3) konyuqatin (fermentlə nişanlanmış antiqlobulin serum) daxil edilməsi; 4) xromogen substratın əlavə edilməsi.

Məlum olmayan antigenin təyin edilməsi aşağıdakı mərhələlər üzrə gedir: 1) təyin ediləcək antigenə spesifik olan anticismin planşetin çuxurlarının dibinə və divarlarına birləşməsi; 2) tərkibində antigen olan materialın həmin çuxurlara daxil edilməsi; 3) həmin spesifikli 2 anticismin oraya əlavə edilməsi; 4) konyuqatın (fermentlə nişanlanmış antiqlobulin serum) daxil edilməsi; 5) xromogen substratın əlavə edilməsi. Anticisim və antigenin bərkfazlı daşıyıcısı kimi adətən plastikli planşetdən istifadə edilir. O, müxtəlif sintetik təsirsiz (inert) materiallardan – polistiroldan, metakrildən hazırlanır. Belə materialların səthinə adsorbsiya olunmuş anticisim və ya antigen, hətta qurudulmuş halda uzun müddət öz immunoloji spesifikliyini saxlayır və seroloji reaksiyalarda iştirak edə bilər.

Antigenlərin immunofermentlə aşkar edilməsinin müxtəlif variantları məlumdur. Əksər hallarda antigen bərk fazaya birləşmiş anticisimlərlə tutulur. Tədqiq olunan antigen, kliniki materialla inkubasiya olunduğu zaman bərk fazaya yapışmış anticisimlə birləşir. Sonra birləşmiş (yapışmış) antigen, həmin antigenin əksinə olan və fermentlərlə nişanlanmış anticismin köməyi ilə aşkar olunur. Bu immun ferment analizin düz variantıdır.

Qeyri-düz (vasitəli) variantda fermentlə nişanlanmış növ əleyhinə (antiqlobulin) serumdan istifadə edilir. Bərk fazaya birləşmiş fermentin miqdarı, antigenin miqdarına uyğun olur. Fermentin fəallığı, substratın parçalanma məhsulu ilə modifikasiya olunmuş xromogenin boyanma intensivliyinə görə aşkar olunur və kəmiyyət göstəricisi ilə qiymətləndirilir. Reaksiyanın nəticəsi vizual (adi gözlə) yaxud xüsusi fotoelektrokolorimetrlə hesablanır. Avtomatik analizatorlardan da istifadə edilir. Miqdari hesablama üçün dalğa uzunluğu 492 nm olan spektrofotometrdən də istifadə edilir.

İmmun ferment analiz (İFA) yüksək həssaslığı ilə və tez nəticə əldə edilməsi ilə (4-6 saat müddətində) xarakterizə olunur. İFA-nın bərk fazalı modifikasiyasının həssaslığını artırmaq üçün yüksək spesifikli anticisimdən, məsələn, yüksək affinni monoklonal anticisimlərdən istifadə edilməlidir.

İFA-nı aparmaq üçün bufer məhlullar. Sensibilizasiya buferi. Bərk daşıyıcıya antigeni və ya anticismi sorbsiya etmək üçün 0,05M natrium-karbonat-bikarbonat buferi (KBB, pH 9,5-9,7). Buferin tərkibi: 1,18qr NaCO_3 ; 3,47qr NaHCO_3 ; 200mqr NaNO_3 . Buferin həcmi distillə olunmuş su ilə 1l-ə çatdırılır. Fosfat buferdən də istifadə edilə bilər (inkubasiya buferinə bax).

İnkubasiya buferi – fosfat-duz məhlulu (pH 7,3-7,5). O, daşıyıcıya birinci komponent sorbsiya olunduqdan sonra, komponentləri durulaşdırmaq üçün reaksiyaya daxil edilir. Buferin tərkibi: 17,9qr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,8qr $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 42,5qr NaCl ; 2,5ml tvin-20. Buferin həcmi distillə olunmuş su ilə 5l çatdırılır. 20-25°C temperaturda saxlanılır.

Reaksiyanın komponentlərini yumaq üçün bufer – tərkibində 0,05% tvin-20 olan natrium-xloridin izotonik məhlulu. Yuyucu bufer kimi, 0,05% tvin-20 olan fosfat-duz məhluldan da istifadə etmək olar.

Ortofenilendiamin aşağıdakı qaydada ex tempore hazırlanır. 10mq ortofenilendiaminə 6,1ml 0,1M limon turşusu, 6,4ml 0,2M $\text{N}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (tam həll olmaq üçün su hamamında qızdırılır), 12,5 ml distillə olunmuş su, 0,35ml 3%-li H_2O_2 əlavə edilir.

80 mq 5-aminosalisilin turşusu 100 ml distillə olunmuş suda həll edilir. pH extempora olaraq 1M NaOH-la 6-ya çatdırılır. İstifadə edilməkdən əvvəl hər 9ml məhlula 1ml 0,05%-li H_2O_2 əlavə edilir.

Planşet yuvacılıqlarında İFA-nın aparılma üsulu. İFA bir neçə mərhələdə aparılır. Hər bir mərhələdən sonra planşetdə artıq qalan maddələr, detergentlər əlavə etməklə buffer məhlulla yuyulur. İFA-nın birinci mərhələsi, antigen yaxud anticismin karbonat-bikarbonat buferdə (0,1 ml həcmdə) müvafiq durulaşmasını (10-20 mq/ml konsentrasiyada) 37°C-də 1-4saat və 4°C-də 10-12 saat müddətində sensibilizasiya etməklə bərk fazaya sorbsiya etməkdən ibarətdir. Sonra çuxurcuqlar, daşıyıcıya sorbsiya olunmayan anticismin, yaxud antigenin rədd edilməsi üçün otaq temperaturunda adi su ilə və 0,05%-li tvin-20 ilə 5 dəq. müddətində iki dəfə yuyulur. Bundan sonra hər bir çuxurcuğa (bərk fazaya) 0,1 ml 1%-li qaramal zərdabı albumini karbonat-bikarbonat buferlə əlavə edilir və sensibilizasiyadan sonra çuxurcuqların səthindəki boş qalan hissələri bağlamaq (doldurmaq) üçün 1saat 37°C-də inkubasiya edilir. Çuxurcuqlar birləşməmiş qaramal zərdabı albuminindən təmizləmək üçün yuyulur və onlara 0,1 ml fosfat-duz məhlulunda durulaşdırılmış (pH 7,2) 0,05%-li tvin-20 ilə birlikdə müayinə olunan material (antigen yaxud anticisim) tökülür. Sonra çuxurcuqlar 37°C-də 1-3 saat inkubasiya edilir. Termostatdan götürdükdən sonra immun reaksiyaya girməmiş antigen yaxud anticisim yuyulur və 0,05%-li

tvin-20 ilə fosfat-duz məhlulunda işçi dozada durulaşdırılmış, tədqiq edilən antigenə yaxud anticismə qarşı 0,1 ml miqdarında konyuqasiya olunmuş anticisim əlavə edilir. Sonra onlar 37⁰C-də 2saat inkubasiya edirlər. Birləşməmiş konyuqat 3 dəfə buferlə yuyulmaqla atılır.

Çuxurcuğa 0,1 ml substrat məhlulu ilə xromogenin qarışığı tökülür və 30dəq otaq temperaturunda qaranlıq yerdə saxlanılır. Inkubasiya prosesində peroksidaza substratı (H₂O₂) parçalayır və fəal oksigen əmələ gətirir, o da, xromogeni oksidləşdirir. Nəticədə, xromogen rəngini dəyişir. Ortofenilendiamin sarı rəng, aminosalisilin turşusu isə qəhvəyi rəng alır.

Substratın parçalanma reaksiyasının qarşısının alınması üçün çuxurcuqların hər birinə 0,1ml 1N H₂SO₄ yaxud M HOH əlavə etmək lazımdır.

Vizual baxış zamanı müayinə olunan materialın. Kontrola nisbətən daha intensiv boyanmış ən yüksək durulaşması aşkar edilir.

Reaksiyanın kontrolunda müayinə olunan antigen yaxud anticisim reaksiyanın homoloji komponentləri ilə əvəz olunur.

Reaksiyanın nəticələri fotoelektrokolorimetrlə hesablandıqda, reaksiyanın heteroloji komponentlərinin müvafiq durulaşmalarının eksitensiyasından 2 dəfədən az olmayaraq artıq eksitensiyaya malik olan müayinə materialın ən yüksək durulaşması qəbul edilir.

Fermentlə konyuqasiya olunmuş anticisimləri almaq üçün antigenə yaxud qlobulinlərə qarşı yüksək fəallığa malik olan presipitasiyaedici serum lazımdır. immunoqlobulinlər qlüturaldehidin köməyi ilə fermentlə birləşir (konyuqasiya olunur). Birləşməyən ferment dializlə yaxud səfələksdə xromatoqrafiya vasitəsilə rədd edilir. Mikroba deqradasiyasının qarşısını almaq üçün konyunqanta 0,01%-ə qədər mertiolat əlavə edilir və donmuş halda yaxud liofil qurudulmuş halda 4⁰C-də saxlanılır.

Tədqiq olunan materialda antigenlərin və ya anticisimlərin miqdarını təyin etmək üçün bərk fazalı immunferment analiz (BİFA) müxtəlif variantlarda tətbiq edilir. Bunlardan ardıcıl durulaşdırma daha çox istifadə edilir.

İmmunblotinq. Bu üsulun əsasını elektroforezlə immunferment analizinin bərk fazalı variantı və radioimmun metodla məlum olmayan anticismin aşkar edilməsi təşkil edir. Naməlum anticisimləri aşkar etmək üçün məlum antigenlərdən, yəni mikrob hüceyrəsindən, virus hissəciklərindən və mikrob hüceyrələrinin fraqmentlərindən istifadə edilir. Onlar bir neçə antigendən təşkil olunduğu üçün immunferment analizinin çox yüksək spesifikliyə malik olmasını təmin etmir.

İmmunoblotinq reaksiyasını qoymaq üçün, əvvəlcə məlum antigen fraksiyalaşdırılır. Çünki, hər bir bakteriya hüceyrəsində yaxud virus hissəciyində bir çox antigen olur. Ona görə də, monoantigen almaq üçün qeyd olunan mikroorqanizmlər aqar jelesində elektroforez vasitəsilə fraksiyalaşdırılır. Bundan sonra aqar jelesi nitrosellüloz kağız (filtr kağızı) üzərinə möhkəm yapışdırılır və elektrik sahəsi yaradılır. Əmələ gələn antigen fraksiyaları kağıza köçürülür. Buna blotinq deyilir (ing. blot – ləkə deməkdir). Bu zaman filtrdə fraksiyaların qarşılıqlı yerləşməsi və onların arasındakı məsafə aqar jelesində olduğu kimi qalır. Bundan sonra filtr götürülür və onunla, immunferment analizdə olduğu kimi, reaksiya aparılır. Bəzən radioimmun metoddan da istifadə etmək olar.

Qeyd etmək lazımdır ki, immunoblotinq reaksiyasında fraksiyalaşdırılmış antigenlərdən istifadə edildiyi üçün bu reaksiya immunferment analizdən və radioimmun üsuldan daha yüksək spesifikliyə malikdir.

Radioimmunoloji metod (RİM). Radioimmun analiz üçün antigen yaxud anticisim radioaktiv izotopla, ən çox J¹²⁵-lə nişanlanır. Bu reaksiya çox həssasdır, onunla həm antigenlər, həm də anticisimlər aşkar edilə bilər.

Radioimmun analizinin bir neçə modifikasiyası məlumdur. Ən çox bərk fazalı modifikasiyadan istifadə edilir. Bərkfazalı immunferment analizdə olduğu kimi, bu üsulda da anticisim yaxud antigen bərkfazalı daşıyıcıya adsorbsiya olunur (hopdurulur). Adsorbsiya olunmuş (immobilizasiya olunmuş) antigen, yaxud anticisim uzun müddət seroloji reaksiyada iştirak edə bilər. Bərkfazalı radioimmun analizinin üç üsulu daha çox istifadə olunur. Bunlara rəqəbatli, geri-dönən və qeyri-düz üsullar aiddir.

Rəqəbatli üsulda polistirol çuxurcuqların səthinə məlum anticisim hopdurulur. Sonra çuxurcuqlara, tərkibində antigen olan müayinə edilən material əlavə olunur, müəyyən müddətdən, yəni antigenlə immobilizasiya olunmuş anticisim arasında spesifik qarşılıqlı təsir əmələ

gəldikdən sonra, radioaktiv izotopla nişanlanmış, həmin spesifik təmizlənmiş antigen əlavə olunur.

Müayinə edilən materialda antigen olarsa, immobilizasiya olunmuş anticismin müəyyən hissəsinin fəal mərkəzləri blokada olunur. Bu halda çuxurcuqlara əlavə olunmuş nişanlanmış antigen az dərəcədə (kontrolla müqayisədə) immobilizasiya olunmuş anticisimlə birləşəcəkdir. Bu, qarışıqın maye hissəsində radioaktivliyə əsasən müəyyən edilir.

Geri-dönən üsulla radioimmun analizin (RİA) aparılması zamanı çuxurcuqların səthinə nişanlanmamış antigen hopdurulur. Bu antigen müayinə olunan antigenə homoloji olur. Ayrıca sınaq şüşəsində antigen birləşdirici materiala, çuxurun səthinə immobilizasiya olunmuş antigenə spesifik olan nişanlanmış anticisim birləşdirilir. Müayinə olunan materialda nişanlanmış anticisimə müvafiq antigen olduqda, anticisimlərin fəal mərkəzləri tamamilə, yaxud hissəvi olaraq blokada olunurlar. Belə halda səthinə, nişanlanmış anticisimlə antigen birləşmiş çuxurcuğa, həmin qarışıq əlavə edildikdə o, çuxurcuğa az miqdarda fiksasiya olunacaq. Bu, kontrollu müqayisədə, çuxurcuqda radioaktivliyin olmasına rəy verməyə imkan verir.

Qeyri-düz bərkfazlı radioimmun analizin (RİA), növ əleyhinə nişanlanmış anticisimlərdən istifadə etməklə aparılması daha sərfəlidir. Qeyri-düz RİA həm naməlum anticisimləri və həm də naməlum antigenləri aşkar etmək üçün istifadə edilə bilər. Hər iki halda, tərkibində antiqlobulin anticisim olan nişanlanmış antinöv serumdan istifadə edilir. Qeyri-düz RİA-nın köməyi ilə seroloji diaqnostika aparmaq üçün, çuxurcuqların səthinə antigen sorbsiya olunur, sonra isə onun üzərinə xəstənin durulaşdırılmış qan zərdabı əlavə edilir. Xəstənin qan zərdabında müvafiq anticisim olduqda, çuxurun iç səthində antigen-anticisim kompleksi əmələ gəlir. Həmin çuxurcuğa, tərkibində anticisim olan və izotopla nişanlanmış serum əlavə edildikdə, anticisim, antigen-anticisim (AG-AT) kompleksinə sorbsiya olunur (burada antigen rolunu insan qamma-qlobulinləri oynayır). Xəstənin qanında anticisim nə qədər çox olarsa, çuxurların səthinə bir o qədər çox radioaktiv maddə birləşər. Çuxurların içərisində olan maye fazada radioaktivliyin təyin edilməsinə əsasən, xəstənin qanında olan anticisimlərin miqdarı haqqında rəy vermək olar.

Radioimmun üsul KBR-dən 35 dəfə, dolayısı hemaqlütinasiya reaksiyasından isə 10 dəfə çox həssasdır. Hazırda bu üsul bir sıra virus infeksiyalarının diaqnozunda, xüsusilə virus hepatitində, eləcə də qanda dərman preparatlarının, hormonların konsentrasiyasının təyin edilməsində tətbiq edilir. Adi diaqnostik laboratoriyalarda radioizotoplarla işləmək çətinlik törətdiyindən bu üsuldən istifadə bir qədər məhdudlaşmışdır.

Zəncirvari polimeraza reaksiyası (ZPR). *Zəncirvari polimeraza reaksiyası* ilk dəfə Dr.Kary və B.Mullis tərəfindən 1983 ildə kəşf olunaraq Nobel mükafatına layiq görülmüşdür.

ZPR, hər hansı növ üçün marker sayılan DNT-nin müəyyən fraqmentinin (sahəsinin) DNT-polimeraza fermenti köməyi ilə çoxsaylı sürətlərinin əmələ gəlməsi (çoxalması) prinsipinə əsaslanır. Bu, tədqiq olunan materialda axtarılan DNT-nin, müasir dövrdə mövcud olan digər tədqiqat üsulları vasitəsilə aşkar edilməsi mümkün olmayan ilk (başlanğıc) miqdarını aşkar etməyə imkan verir.

Məlumdur ki, DNT-nin reduplikasiyası molekulun istənilən nöqtəsindən deyil, yalnız onun müəyyən başlanğıc bloklarından-ikisaplı qısa sahəsindən başlaya bilər. Belə sahələri xaricdən induksiyləşdirmək mümkündür. DNT-nin qeyd olunan sahələrində (bloklarında) başlanğıc blok yaratmaq üçün müxtəlif törədicilərin (mikroorqanizmlərin) məlum genlərindən xüsusi praymerlər (zatravki-praymeri) sintez edilir. Xüsusi aparatlarda-sintezatorlarda sintez olunan bu praymerlər, uzunluğu 20-30 nukleotid olan oliqonukleotidlərdən ibarətdir. Sintez olunan praymerin axtarılan DNT-fraqmentinə uyğun gəlməsi aşağıdakı şərtlərdən asılıdır.

- a) praymer axtarılan DNT-fraqmentinə komplementar olmalıdır;
- b) DNT-nin hər bir sapına (zəncirinə) o, elə uyğunlaşmalıdır ki, yeni DNT-nin sintezi, molekulun yalnız sapları arasında yerləşən hissəsindən baş versin.

Üsulun əsas prinsipi klinik materialda istənilən törədicinin nuklein turşusunu çoxaldaraq (amplifikasiya) təyin etməkdir. Bu məqsədlə üsul 3 mərhələdə aparılır.

Birinci mərhələ klinik materialda olan nuklein turşusunun ekstraksiyası, yəni əldə olunmasıdır.

Törədicinin kultivasiyası mümkün olduğu hallarda 24 saatlıq saf koloniyalar istifadə olunur. Bu zaman Luria Bertani aqardan istifadə olunması tövsiyyə olunur. Mümkün olmadığı hallarda isə qanlı aqara inokulyasiya oluna bilər. Bir çox mikroorqanizmin nuklein turşusunu kulturdan qaynatmaq yolu ilə əldə edə bilərik. Qaynatmaq üsulunda aşağıdakılar istifadə olunur:

1. Steril əlcək (talksız)

2. Steril ependorf
3. Kolle qələmi
4. Steril su

100 ml steril su ependorfa toplanır və koli qələmi vasitəsilə 3-5 koloniya götürülərək suya qarışdırılır. Əməliyyat yanan qaz lampası yanında və ya mikrobioloji kabində aparılmalıdır. Vəsaitlərin steril olması və kulturanın saf olması mütləqdir. Əldə olunan ependorflar 96°C 10 dəqiqə qızdırıcı bloka qoyulur. Bu zaman törədicinin strukturu parçalanır və nəticədə nuklein turşusu azad olur. Daha sonra ependorflar 3-5dəq ən yüksək temperaturda sentrifuqa olunur. Bununla bakteriya hüceyrəsinin struktur elementləri ependorfun dibinə çökür, üst hissəsində isə nuklein turşuları toplanır. Buna DNT-nin denaturasiyası - əriməsi deyilir. Bu cür nümunələri 6 ay müddətində 20°C də saxlamaq mümkündür.

Nuklein turşusunu qaynatmaq üsulu ilə yanaşı kimyəvi üsul və müxtəlif ticari kitlərlə (Qiagen və s.) ekstraksiya etmək mümkündür. Bu üsullara dətən kultivasiyası mümkün olmayan və ya çətin kultivasiya olunan (*Helicobacter* və s.) mikroorqanizmlər də istifadə olunur.

Beləliklə hər üç üsul vasitəsilə:

- Hüceyrə strukturu dağıdılır
- Proteinlər parçalanır
- Sərbəst hala keçən nuklein turşuları saf olaraq əldə edilir

Əldə olunmuş nuklein turşuları ilə **ikinci mərhələyə** start verilir. Bu mərhələ **amplifikasiya** və ya **çoxaltma** mərhələsidir. Bu zaman aşağıdakılar istifadə olunur:

1. Praymer- axtarılan DNT hissəsinə komplementar nukleotid ardıcılığı olub aşağı temperaturda komplementar DNT hissəciyinə birləşir.
2. Nukleotidlər- Adenin, Timin, Quanin və Sitozin
3. Taq polimeraza - DNT polimerazalara aid olunub, *Thermusaquaticus* bakteriyasından əldə olunur və yalnız yüksək temperaturda aktiv olur.
4. MgCl
5. Buffer məhlulları
6. H_2O
7. Termal cycle

DNT, Praymerlər (*forward* və *reverseprimer*), Taq polimeraza, Nukleotidlər, Mg^{+2} , bufer məhlulları və su ZPR qarışığını (mix) təşkil edir.

Beləliklə reaksiyada məqsəd öncədən quruluşu məlum olan DNT-nin müəyyən fraqmentini artırıb çoxaltmaqdır. Bunun üçün əvvəlcə yüksək temperatur vasitəsilə (95°C) DNT zəncirlərini bir birindən ayırır (denaturasiya). Daha sonra reaksiya qarışığı $55-65^{\circ}\text{C}$ -ə qədər soyudulur. Bu mərhələdə praymerlər komplementar olduqları DNT fraqmentinin qarşısında dayanır (annealing). Reaksiya qarışığının 75°C -ə qədər isidilməsi Taq polimeraza fermentinin aktivləşməsinə səbəb olur. Taq polimeraza fermenti “dərzi” kimi praymerə uyğun olan hər bir nukleotidi praymer qarşısında müvafiq ardıcılıqla yığır və praymerə uyğun olmuş olan sahə ikiləşir (elongation). Bu dövrə amplifikasiya dövrü deyirik (şəkil 26). Beləliklə reaksiyadan əvvəl 2 zəncirli 1 DNT olduğu halda amplifikasiya dövründən sonra 2 ədəd DNT əldə edilmiş olur. Dövrələrin sayını artırmaqla DNT fraqmentlərini 2^n sayda artırma bilərik. Əksər hallarda minimum 40 dövr istifadə olunur.

Amplifikasiyanı həyata keçirmək üçün Termal Cycle adlanan cihazlardan istifadə olunur. Hər bir cihazda temperaturu dəyişməklə reaksiyanıza müvafiq olan termal dövr qurmaq olar.

ZPR-in sonuncu mərhələsi **DNT-nin təyini mərhələsidir**. Ənənəvi metodlarda çoxaldılmış DNT sürətləri gel üzərində yaradılmış çuxurcuğa daxil edilir. Gel agarose tozundan müxtəlif konsentrasiyalar (2%-li, 1%-livə s.) olmaqla hazırlanır və daraqlı gel kasetlərinə tökülür (şəkil 28). Hazırlanan zaman gelin içində Saber Safe və ya Etidium Bromid əlavə olunur. Boya elektorforezdən sonra ayrılan DNT bantlarını görməyi təmin edir. Gel donduqdan sonra elektroforez tankına yerləşdirilir.

Tanka gelin üzərini örtəcək şəkildə bufer məhlulu əlavə olunur və hazırladığımız DNT ZPR məhsulu (DNT fraqmentləri) gel üzərində darağın açdığı çuxurcuqlara daxil edilir. İlk çuxurcuğa hər zaman marker (loader) daxil edilir (şəkil 30). Marker axtardığımız DNT fraqmentinə uyğun ağırlıqda olan nuklein turşusudur.

Daha sonra Tank Anod və Katod olmaqla elektrik cərəyanına bağlanılır və bu zaman anoddan katoda doğru DNT fraqmentləri hərəkətə başlayır. Fərqli bazlara (çəkiyə) malik DNT fraqmentləri elektrik sahəsində müxtəlif məsafələrə “qaçır”.

Axtarılan DNT fraqmentinin ağırlığından və hazırlanan gelin konsentrasiyasından asılı olaraq elektroforezin müddəti və istifadə olunan Vatt müxtəlif olur. Elektroforez tamamlandıqdan sonra gelin şəkli xüsusi ultraviolet cihazlarında çəkilir. Cihaza bağlı olan kompyuterlərdə gelin şəklini əldə etmiş oluruq. Nümunələrdə olan fraqmentlərin qaçış məsafəsi və bantların sayı ilə ilk çuxurcuqda olan markerin qaçış məsafəsi və bantlarının sayı müqayisə olunur. Nümunələr markerə uyğun olduğu halda pozitiv hesab olunur.

Amplifikasiya prosesi çox sayda təkrar olunur. Belə ki, əvvəlki tsikldə əmələ gələn məhsul, sonrakı amplifikasiya tsikli üçün matris (bünövrə) rolunu oynayır. Adətən reaksiya 30 tsikldə aparılır. Bu zaman axtarılan DNT-nin 2^{30} (10^8) sürəti əmələ gəlir.

Bu miqdar nəticələri hesablamağa kifayət edir. Reaksiyanın nəticələrinin vizual qeydiyyatı, yəni DNT fraqmentinin artıb çoxalmış sürətlərinin identifikasiyası aqaroza və ya poliaksilamid jelesində elektroforezlə, yaxud da immunferment analiz vasitəsilə aparılır.

Sekvenləşdirmə üsulu. DNT molekulunda nukleotidlər ardıcılığını təyin etməyə imkan verir (ingiliscə, *sequence* – ardıcılıq).

- **Sanger üsulu** ilə sekvenləşdirmə daha çox tətbiq edilir. Bunun üçün əvvəlcə müayinə edilən DNT molekulunu qələvi hidroliz vasitəsilə müxtəlif uzunluqlu təkzəncirli fraqmentlərə parçalanır.
- Alınmış qarışığa müxtəlif cür nişanlanmış didezoxsinukleotidlər (adenin, timin, ¹qvanin və sitozin) əlavə edilir. Nişanlanmış didezoxsinukleotidlər hər bir DNT-fraqmentinin 3 -sonluğunda olan komplementar nukleotidlərlə birləşir. Beləliklə, müxtəlif uzunluqlu təkzəncirli DNT fraqmentləri ¹3 -sonluğunda hansı nukleotidin olmasından asılı olaraq fərqli nişanlanmış olur.
- Sonra nişanlanmış DNT fraqmentləri vertikal poliakrilamid gelində elektroforezə məruz qoyulur. Bu zaman fraqmentlər molekul kütlələrindən asılı olaraq müxtəlif məsafələr qət edir və sonda nişanlanmış didezoxsinukleotidlər müayinə edilən fraqmentdəki nukleotidlər ardıcılığına müvafiq olan qaydada düzülür. Elektroforez prosesi kompüter təhlilinə malik avtomatik rejimli xüsusi qurğularda – **sekvenatorlarda** aparılır.

