



AZƏRBAYCAN TİBB UNIVERSİTETİ
TİBBİ MİKROBİOLOGİYA və İMMUNOLOGİYA KAFEDRASI

Məşğələ 20.

Komplementin birləşmə reaksiyası (KBR). İmmunflüoressensiya reaksiyası (İFR). İmmunferment analiz (İFA). Radioimmün metod (RİM). İmmunblotinq (İB). Genetik metodların mikrobioloji diaqnostikada tətbiqi. Zəncirvari polimeraza reaksiyası (ZPR).

Sekvenləşdirmə

FAKÜLTƏ: *Müalicə-profilaktika*

FƏNN: *Tibbi-mikrobiologiya - 1*

Müzakirə olunan suallar:

- Komplementin birləşməsi reaksiyası (KBR) və onun mahiyyəti
- KBR-in mexanizmi və diaqnostikada əhəmiyyəti.
- Nişanlanmış anticisimlərin iştirakı ilə gedən reaksiyaların mahiyyəti.
- Nişanlanmış anticisimlərin iştirakı ilə gedən reaksiyaların ekspress diaqnostikada əhəmiyyəti.
- İmmunflüoressensiya reaksiyasının (Kuns reaksiyası) mexanizmi: düz variant (İFR) və dolay variant (dİFR).
- İmmunferment analiz və onun mahiyyəti: düz və dolay variantlar.
- Radioimmün metod (konkurent, əks və dolay), tətbiqi.
- İmmunblotinq, mexanizmi.
- Genetik metodların mikrobioloji diaqnostikada tətbiqi.
- Molekulyar-genetik üsullar, növləri, diaqnostikada tətbiqi.
- Zəncirvari polimeraza reaksiyasının (ZPR, real-time ZPR) mahiyyəti, mexanizmi və təcrübi əhəmiyyəti.
- Molekulyar hibridləşmə üsulu, mahiyyəti, mexanizmi və təcrübi əhəmiyyəti.
- Restriksion analiz, mahiyyəti, mexanizmi və təcrübi əhəmiyyəti.
- Sekvenləşdirmə üsulu, mahiyyəti, mexanizmi və təcrübi əhəmiyyəti.
- Gen mühəndisliyi, məqsəd və vəzifələri.

Məşğələnin məqsədi:

- Tələbələrə komplementin və nişanlanmış anticisimlərin iştirakı ilə gedən reaksiyaları izah etmək. Onları KBR, İFR, İFA, RİM və eləcə də immunblotinq reaksiyalarının mahiyyəti, mexanizmi və reaksiyaların qoyulma texnikası və bu reaksiyaların infeksiyon xəstəliklərin diaqnostikasında əhəmiyyəti ilə tanış etmək. Tələbələrə molekulyar-genetik üsullar (ZPR, molekulyar hibridləşmə, restriksion analiz, sekvenləşdirmə üsulu) haqqında məlumat vermək və onların diaqnostikada tətbiqi, əhəmiyyəti və mexanizmlərini izah etmək.

Lizis reaksiyaları

Lizis reaksiyaları hüceyrələrin (bakteriyaların, eritrositlərin və s.) müvafiq anticisimlərlə – lizinlərlə birləşərək komplementin iştirakı ilə lizisinə (parçalanmasına) əsaslanır. Lizis reaksiyası antigen-anticisim kompleksinə birləşərək aktivləşmiş komplementin membrana həmləedici kompleksinin təsiri ilə əlaqədardır.

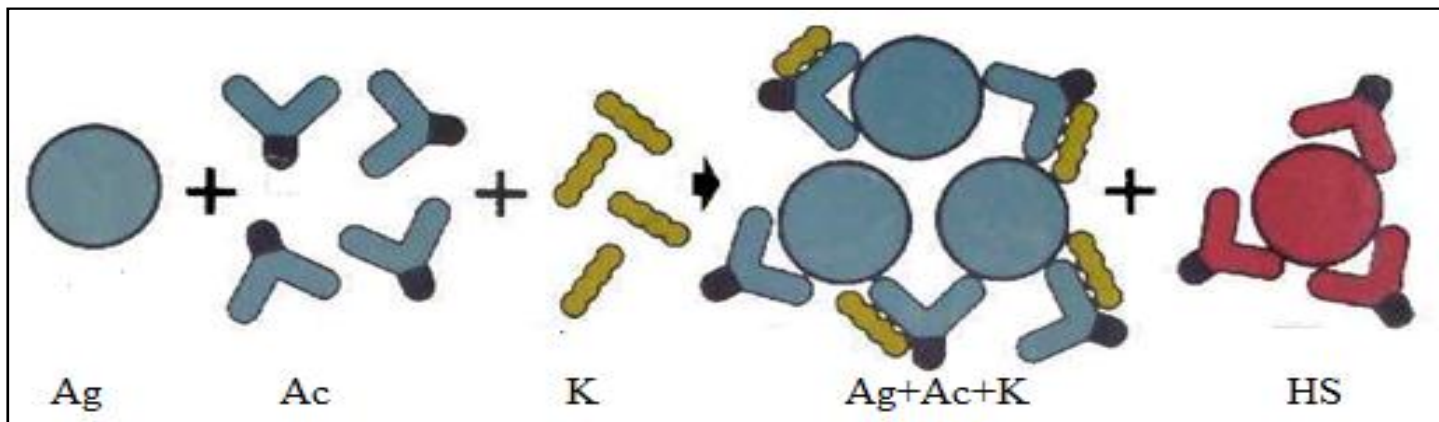
- ***Bakterioliz reaksiyası*** – bakteriyaların (vibrionların, spiroxetlərin və s.) müvafiq anticisimlərlə – bakteriolizinlərlə komplement iştirakı ilə lizisinə (parçalanmasına) əsaslanır. Vibrionlar və spiroxetlər istisna olmaqla mikroorqanizmlərin əksəriyyəti komplementin litik təsirinə həssas olmadığından, bu reaksiyalardan geniş istifadə edilmir.
- ***Hemoliz reaksiyası*** - eritrositlərin müvafiq anticisimlərlə – hemolizinlərlə komplement iştirakı ilə lizisinə əsaslanır. Reaksiya diaqnostik əhəmiyyətə malik deyil, ancaq komplementi titrləmək üçün, eləcə də KBR-də indikator reaksiya kimi istifadə edilir.

Komplementin birləşmə reaksiyası (KBR)

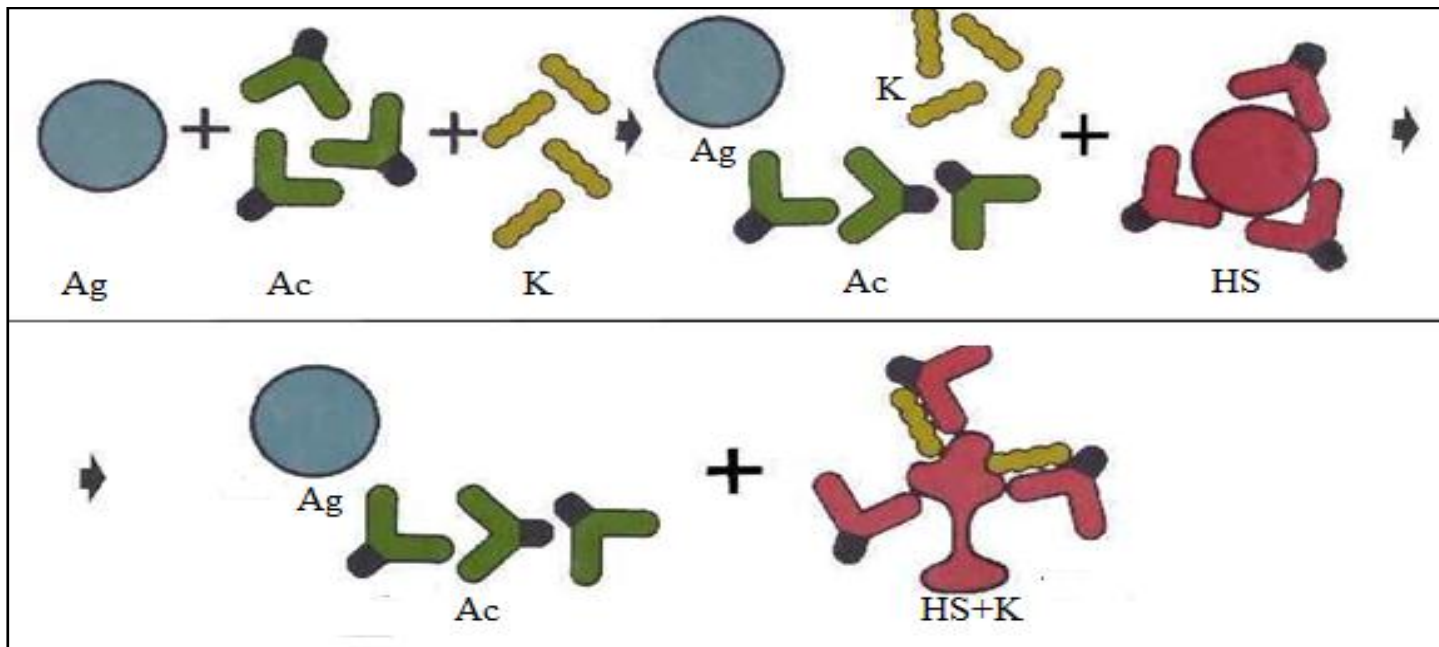
- Bu reaksiyada antigen-anticisim kompleksinin əmələ gəlməsi ***komplementin birləşməsinə*** əsasən təyin edilir.
- Antigen-anticisim kompleksi əmələ gəldiyi təqdirdə, yəni reaksiya müsbət olduqda, komplement anticismin Fc-fraqmenti vasitəsi ilə bu kompleksə birləşir, başqa sözlə, komplementin antigen-anticisim kompleksi ilə birləşməsi baş verir.
- Əgər antigen-anticisim kompleksi əmələ gəlmirsə, onda komplement sərbəst qalır. Beləliklə, reaksiyanın nəticəsini komplementin birləşməsinə, yaxud da sərbəst qalmasına əsasən qiymətləndirmək mümkündür.

KBR (reaksiyanın prinsipi)

- KBR mürəkkəb reaksiya olmaqla mahiyyətcə iki seroloji reaksiyadan ibarətdir. Bu reaksiyalardan biri əsas reaksiya, digər isə komplementin birləşmiş, yoxsa sərbəst qalmasını aşkar etmək üçün indiqator reaksiyasıdır.
- Xəstənin inaktivləşdirilmiş və durulaşdırılmış qan zərdabı üzərinə müvafiq antigen və komplement əlavə edilir.
- İnkubasiyadan sonra qarışıqda sərbəst komplementi aşkar etmək üçün bura hemolitik sistem əlavə edilir.
- Hemolitik sistem qoyun eritrositlərindən və onlara qarşı anticisimlərdən ibarətdir. Komplement əlavə edildikdə bu sistemdə hemoliz baş verir.
- **Reaksiya müsbət olduqda** əmələ gəlmiş antigen-anticisim kompleksi komplementi birləşdirir, nəticədə qarışıqda komplement olmadığından hemolitik sistemdə hemoliz baş vermir.
- **Reaksiya mənfi olduqda** komplement sərbəst halda qaldığından hemolitik sistemdə hemoliz müşahidə edilir



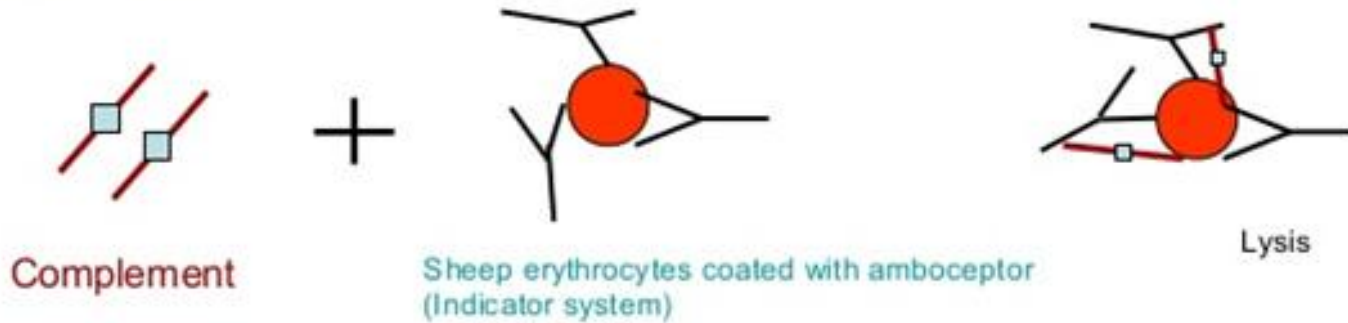
Komplementin birləşmə reaksiyasının sxemi: müsbət reaksiya
(Ag-antigen, Ac-anticisim, K-komplement, HS-hemolitik sistem)



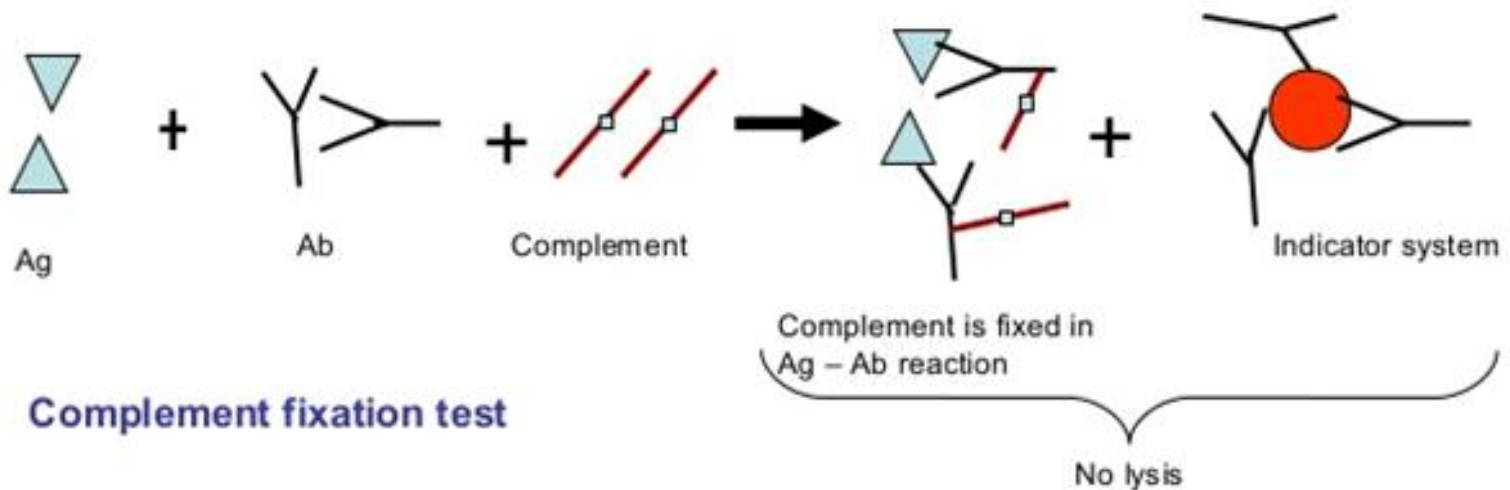
Komplementin birləşmə reaksiyasının sxemi: mənfi reaksiya.
(Ag-antigen, Ac-anticisim, K-komplement, HS-hemolitik sistem)

KBR (reaksiyannın prinsipi)

Negative CFT



Positive CFT



KBR (tətbiqi)

- KBR infeksiyon xəstəliklər (toksoplazmoz, virus infeksiyaları və s.) zamanı qan zərdabında komplementi birləşdirən anticisimlərin aşkar edilməsi üçün tətbiq edilir.
- KBR yüksək spesifikliyi və həssaslığı ilə fərqlənir. Reaksiyanı qoymaq üçün bütün inqredientlərin (tərkib hissələrinin) – müayinə edilən zərdabın, antigenin, komplemetin və hemolitik zərdabın nisbi miqdarı dəqiq təyin edilməlidir.

KBR (inqredientlər)

- **Qoyun eritrositləri suspenziyasını** fibrinsizləşdirilmiş qoyun qanından alırlar. Bunun üçün qoyun qanının eritrositlərini fizioloji məhlulla bir neçə dəfə sentrifuqadan keçirməklə yuyur, sonra alınmış eritrositlərin fizioloji məhlulda 3%-li suspenziyasını hazırlayırlar.
- **Hemolitik zərdab** adətən kommersiya yolu ilə əldə edilir. Xüsusi müəsisələrdə qoyun eritrositlərinin 50%-li suspenziyası ilə dovşanları 3-5 dəfə venadaxili immunizasiya (hiperimmunizasiya) edirlər. Dovşanlardan alınmış zərdabı 56⁰C-də 30 dəq. qızdırmaqla inaktivləşdirirlər (zərdabın tərkibindəki komplementin inaktivləşdirilməsi). Belə zərdablar flakonlarda buraxılır, üzərində zərdabın titri, yəni onun 37⁰C-də 1 saat müddətində komplementin iştirakı ilə qoyun eritrositlərinin 3%-li suspenziyasını tam lizisə uğradan minimal durulaşması qeyd edilir. KBR üçün işçi doza kimi hemolitik zərdabı 3 qat artıq titrdə götürürlər. Məsələn, əgər hemolitik zərdabın titri 1:1200 isə, KBR üçün 1:400 durulaşmasında istifadə olunur.

KBR (inqredientlər)

- ***Hemolitik sistem.*** Bərabər həcmdə hemolitik zərdabdan və qoyun eritrositlərinin 3%-li suspenziyasından ibarətdir.
- Hemolitik zərdab 3 qat artıq titrdə götürülür. Eritrositlərin sensibilizasiyası üçün bu qarışıq 37⁰C-də 30 dəq. termostatda saxlanılır.
- Hemolitik sistemdə komplement olmadığından burada hemoliz müşahidə edilmir. Komplementin əlavə edilməsi hemolitik sistemdə hemolizə səbəb olur, yəni hemoliz reaksiyası baş verir.

KBR (inqredientlər)

- ***Komplement*** kimi dəniz donuzunun quru, yaxud təzə qan zərdabından istifadə edilir.
- Komplementin titrini və işçi dozasını təyin etmək üçün onu hemoliz reaksiyası vasitəsilə titrləyirlər. Bunun üçün dəniz donuzunun qan zərdabını fizioloji məhlulla 1:10 nisbətində durulaşdırırlar. Sonra bu durulaşmadan bir neçə sınaq şüşəsinə 0,05 ml-dən 0,5 ml-dək müxtəlif həcməldə (0,05 ml, 0,1ml, 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, 0,5 ml) əlavə edilir. Hər bir sınaq şüşəsindəki məhlulun həcmi fizioloji məhlulla 1,5 ml-ə çatdırılır.
- 37°C-də 45 dəq. müddətində inkubasiya edildikdən sonra, hər bir sınaq şüşəsinə 0,5 ml hemolitik sistem əlavə edilir.
- Yenidən 30 dəq. müddətində inkubasiya edildikdən sonra *komplementin titri* – onun tam hemoliz əmələ gətirən ən kiçik miqdarı təyin edilir.
- KBR üçün *komplementin işçi dozасыndan* istifadə olunur. Komplementin işçi dozası onun titrindən 20-30% çox olur. Məsələn, komplementin titri 0,3 ml isə, KBR üçün işçi doza təqribən 0,4 ml olacaqdır.

KBR (inqredientlər)

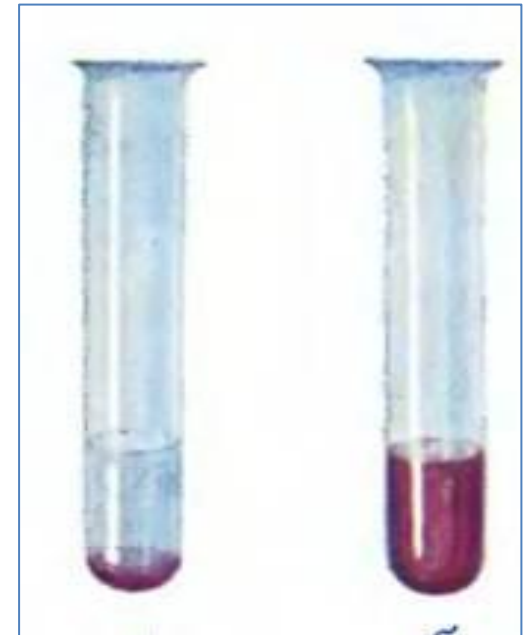
- ***Antigen.*** KBR üçün antigenləri xüsusi müəssisələrdə mikroorqanizmlərdən, onların lizatından, toxuma ekstraktlarından və s. hazırlayırlar. KBR-də bu antigenlər işçi dozada tətbiq edilir.
- ***Xəstənin qan zərdabı.*** Reaksiya qoyulmazdan bilavasitə əvvəl xəstənin qan zərdabını 56°C -də 30 dəq. qızdırmaqla inaktivləşdirirlər (zərdabın tərkibindəki komplementin inaktivləşdirilməsi).

KBR (texnikası)

Reaksiyanın fazaları	Reaksiyada iştirak edən komponentlər	Sınaq şüşələrinə əlavə edilən komponentlərin miqdarı, ml		
		Təcrübə	Zərdabın kontrolu	Antigenin kontrolu
I	1. Müayinə olunan zərdab (1:10, 1:20, 1:40 və s. durulaşmalarda), ml	0,5	0,5	-
	2. İşçi dozada antigen, ml	0,5	-	0,5
	3. İşçi dozada komplement, ml	0,5	0,5	0,5
	4. İzotonik məhlul, ml	-	0,5	0,5
37 ⁰ C-də 30 dəq. müddətində inkubasiya				
II	5. Hemolitik sistem, ml	1,0	1,0	1,0
37 ⁰ C-də 30 dəq. müddətində inkubasiya				
Nəticə:				
		Hemoliz yoxdur	Hemoliz	Hemoliz

KBR (nəticənin qeydiyyatı)

- **KBR nəticəsi** hər bir sınaq şüşəsində hemolizin olub-olmaması qeyd edilməklə qiymətləndirilir.
- Hemoliz olmadıqda reaksiya müsbət hesab olunur, bu zaman eritrositlər çökdüyündən sınaq şüşəsindəki maye rəngsizləşir.
- Reaksiya mənfi olduqda eritrositlərin lizisi müşahidə olunur, nəticədə sınaq şüşəsindəki məhlul müxtəlif intensivlikli qırmızı rəng alır.
- Hemolizin dərəcəsi mayenin rənglənmə intensivliyindən və eritrositlərin dibə çökməsi miqdarından asılı olaraq qiymətləndirilir (++++, +++, ++, +).
- Hemoliz müşahidə olunmayan sonuncu sınaq şüşəsindəki zərdabın durulaşması **komplementin birləşmə reaksiyasının titri** kimi qəbul edilir.



Mikroplanşetdə KBR (nəticə)

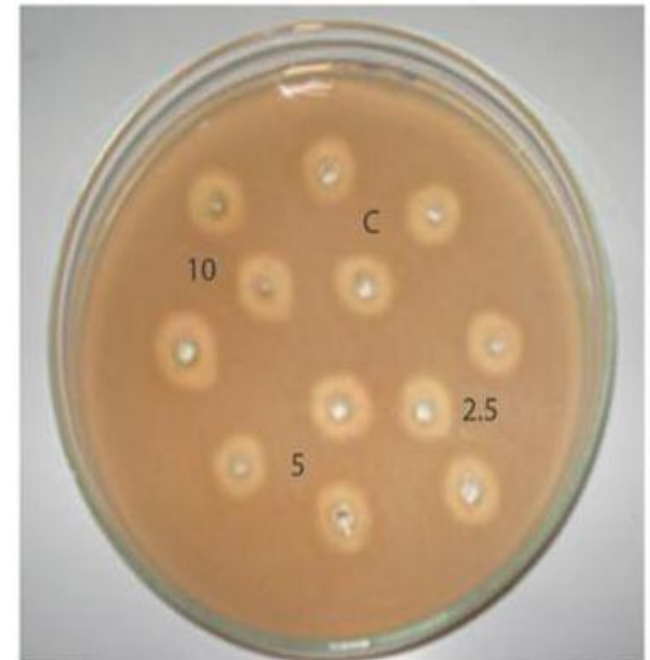
	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	Control serum	Titer
Active Acute							Titer <16
Recovering							Titer ≥256
Active Acute							Titer <16
Recovering							Titer =128

Sınaq şüşələrində KBR (nəticə)



Radial hemoliz reaksiyası (RHR)

- Eritrositlərə adsorbsiya edilmiş antigenlərin müvafiq anticisimlərlə birləşməsi komplementin aktivləşməsinə və eritrositlərin lizisinə səbəb olur.
- Müvafiq antigenlərlə adsorbsiya olunmuş eritrositlər və komplement əridilib 40°C-yə qədər soyudulmuş aqar geli ilə qarışdırılır. Aqar şüşə lövhə üzərinə tökülür, bərkidikdən sonra burada açılmış çuxurcuqlara xəstənin qan zərdabı əlavə edilir.
- Reaksiya müsbət olduqda anticisimlərin aqara diffuziyası nəticəsində çuxurcuqların ətrafında radial hemoliz zonası əmələ gəlir. Bu reaksiya vasitəsilə bir çox virus xəstəlikləri - qrip, məxmərək, gənə ensefaliti və s. zamanı xəstələrin qan zərdabında spesifik anticisimləri təyin etmək mümkündür

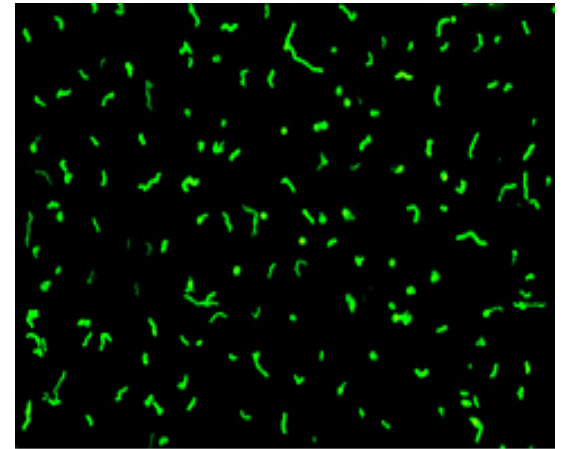


Nişanlanmış anticisimlər və antigenlərin iştirakı ilə gedən reaksiyalar

- Seroloji reaksiyalarda əmələ gəlmiş antigen-anticisim kompleksini təyin etmək üçün bəzi hallarda bu reaksiyalarda iştirak edən anticisimləri və ya antigenləri əvvəlcədən nişanlayırlar.
- Nişanlamaq məqsədilə flüoroxromlardan, fermentlərdən və radioaktiv izotplardan istifadə edilir. Nişanlanma anticisimlərin, yaxud antigenlərin göstərilən agentlərlə kimyəvi birləşdirilməsinə (konyuqasiyasına) əsaslanır.
- Nişanlamaq məqsədilə istifadə edilən agentin tipindən asılı olaraq müxtəlif reaksiyalar fərqləndirilir.

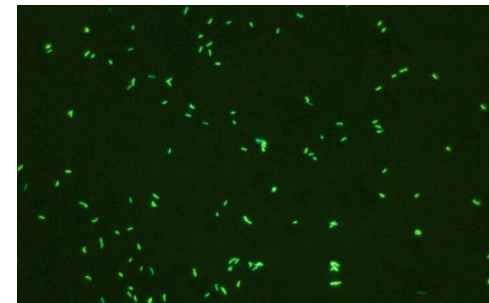
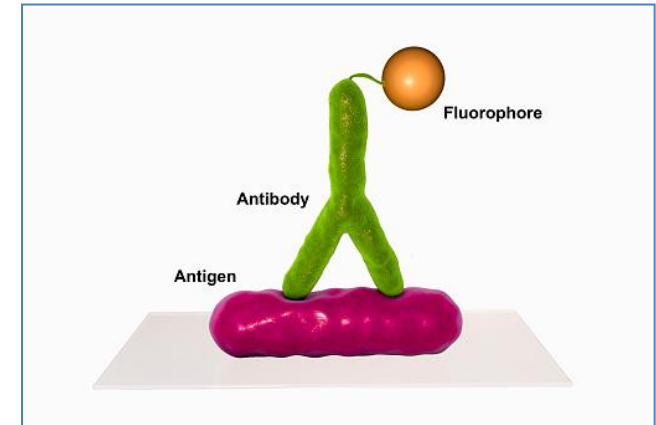
İmmunoflüoresensiya reaksiyası (İFR)

- Kuns üsulu adlandırılan bu reaksiyada məlum anticisimləri flüoroxromlar adlandırılan maddələrlə (məsələn, izotiosionatla) nişanlayırlar.
- Bu maddələr ultrabənövşəyi şüaların təsirindən sarı-yaşıl rəngli işıq saçırlar. Anticisimlərin immunoloji spesifikliyi nişanlandıqdan sonra da saxlanılır və onlar müvafiq antigenlərlə reaksiyaya girə bilirlər. Nəticədə əmələ gəlmiş antigen-anticisim kompleksini lüminessent mikroskopda asanlıqla təyin etmək olur.
- Kuns reaksiyası mikrob antigenlərinin aşkar olunması və ya anticisimlərin təyininə istifadə olunan ekspress-diaqnostik üsuldur. Üsulun bir-neçə variantı mövcuddur.



İFR (düz variant)

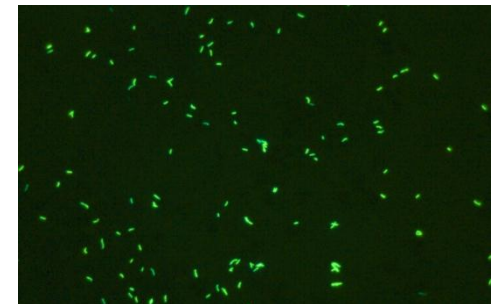
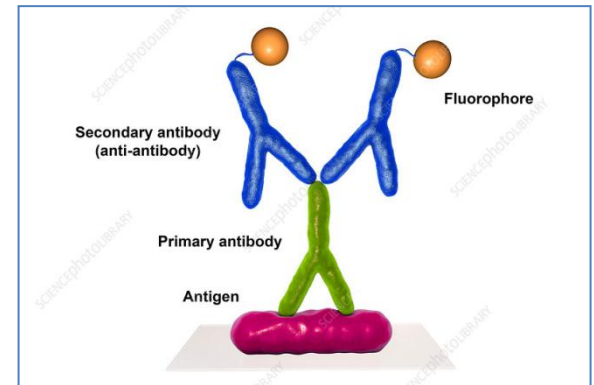
- **Düz variant** flüoroxromla nişanlanmış anticisimlərlə işlənilmiş yaxmalarda, histoloji preparatlarda və s. mikroorqanizmlərin aşkar edilməsinə əsaslanır.
- Hazırlanmış yaxmanı kimyəvi üsulla fiksasiya etdikdən sonra onun üzərinə flüoressensiyaedici zərdab əlavə edir və müəyyən müddət inkubasiyadan sonra diqqətlə yuyurlar.
- Reaksiya **müsbət olduqda** əmələ gəlmiş antigen-anticisim kompleksi lüminessent mikroskopda yaşıl rəngli işıqlanma kimi müşahidə edilir.
- Reaksiya **mənfi olduqda** nişanlanmış anticisimlər yuyulmaqla kənarlaşdırıldığından işıqlanma müşahidə edilmir.



Dolay variant

(dolay immunflüoresensiya reaksiyası - DİFR)

- İFR-in düz variantı hər bir mikroorqanizmə qarşı nişanlanmış anticisimlərin olmasını tələb edir. Ona görə də reaksiyanın dolay variantından daha çox istifadə edilir.
- Bu variant flüoroxromla nişanlanmış antiqlobulin anticisimlərin köməyi ilə antigen-anticisim kompleksinin aşkar edilməsinə əsaslanır.
- Fiksasiya edilmiş yaxmanın üzərinə diaqnostik dovşan zərdabı əlavə edir və müəyyən müddət inkubasiyadan sonra diqqətlə yuyurlar. Sonra yaxmanın üzərinə flüoroxromla nişanlanmış antiqlobulin (dovşan qlobulinlərinə qarşı) zərdab əlavə edir və müəyyən müddət inkubasiyadan sonra yenidən yuyurlar.
- Reaksiya **müsbət olduqda** əmələ gəlmiş kompleks (mikroorqanizm-anticisim-flüoroxromla nişanlanmış antiqlobulin kompleksi) lüminessent mikroskopda aşkar edilir.



İmmunoferment analiz (İFA)

- İFA fermentlərlə nişanlanmış anticisimlərin köməylə müvafiq antigenin aşkar edilməsinə əsaslanır. Nişanlamaq məqsədilə daha çox peroksidaza, qələvi fosfataza və s. fermentlərdən istifadə edilir.
- Nişanlanmış anticisimlər müvafiq antigenlərlə birləşdikdən sonra əmələ gəlmiş antigen-anticisim kompleksini fermentə görə təyin edirlər.
- Bunun üçün reaksiyaya fermentin (məsələn, peroksidazanın) parçalaya biləcəyi substrat (hidrogen peroksid) və parçalanma nəticəsində əmələ gəlmiş maddəni (atomar oksigeni) təyin etmək üçün indikator (xromogen, məsələn, 5-aminosalisil turşusu, ortofenildiamin və s.) əlavə edilir.
- Substrat fermentlə parçalandığı təqdirdə indikatorun rəngi dəyişilir və rəng dəyişikliyinə intensivliyi antigen-anticisim molekulunun miqdarı ilə düz mütənəsib olur. Reaksiya nəticəsində əmələ gəlmiş rəng dəyişikliyi kolorimetrik üsulla qiymətləndirilir.
- Reaksiyanın komponentlərindən birini – antigen, yaxud anticisimi bərk daşıyıcıya, məsələn, polistirol planşetin çuxurcuğuna sorbsiya etməklə aparılan **bərkfazlı İFA** daha çox istifadə edilir

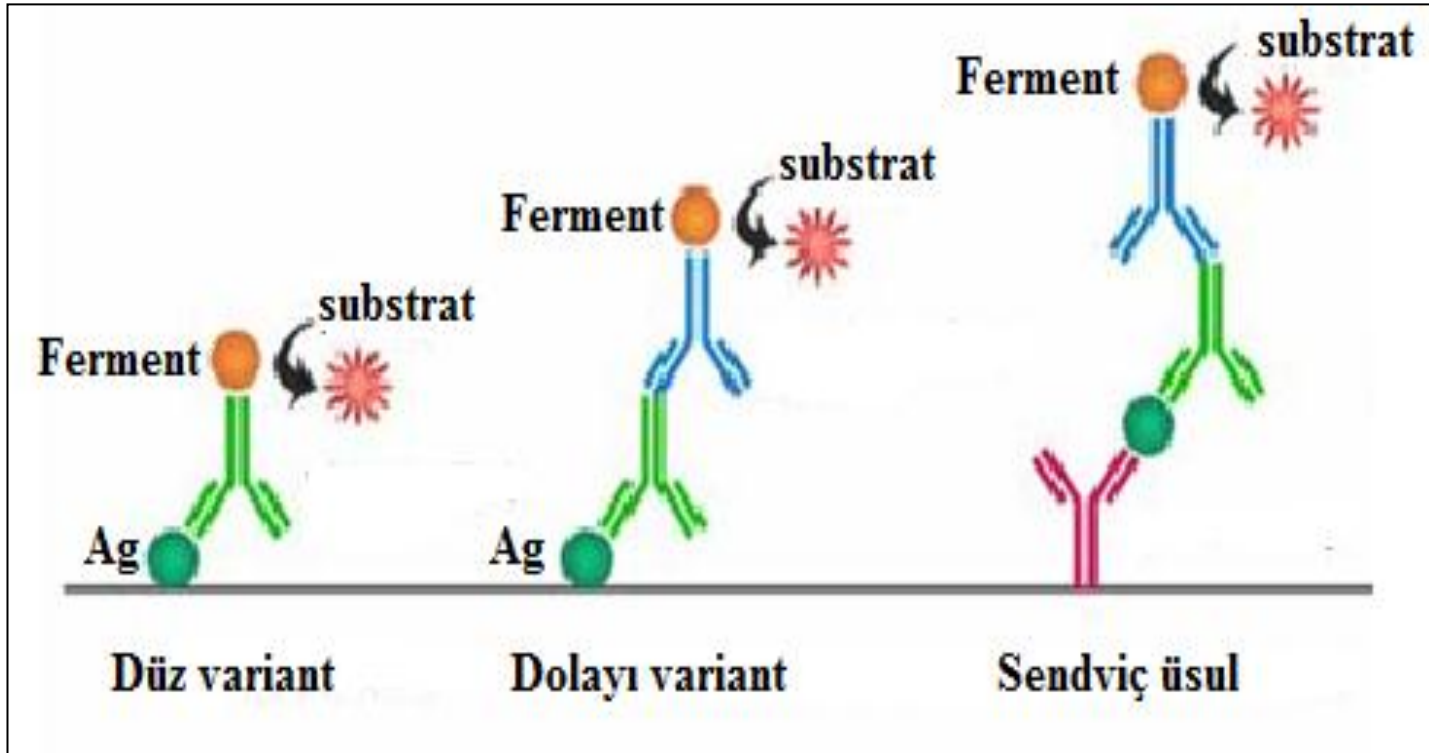
Bərkfazalı İFA (dolay variantı)

- Anticisimi təyin etmək üçün istifadə edilən bərkfazalı İFA zamanı planşetin çuxurcuğuna məlum antigen sorbsiya edilir.
- Reaksiyanın ***dolay variantı*** daha çox tətbiq edilir. Bunun üçün məlum spesifik antigen sorbsiya olunmuş planşetin çuxurcuğuna ardıcıl olaraq xəstənin qan zərdabı, fermentlə nişanlanmış antiqlobulin zərdab, fermentin parçalayacağı substrat və xromogen əlavə edilir. Hər dəfə növbəti komponent əlavə edildikdən sonra, birləşməmiş reagentlər yuyulmaqla çuxurcuqdan kənarlaşdırılır.
- Reaksiya müsbət olduqda xəstənin qan zərdabında olan anticisimlər antigenlə birləşərək çuxurcuğun divarında qalır və fermentlə nişanlanmış antiqlobulin anticisimləri də özünə birləşdirərək burada saxlayır. Sonda əlavə edilmiş substrat fermentin təsiri ilə parçalanır, əmələ gəlmiş maddə indikatorun (xromogenin) rəngini dəyişir.

Bərkfazlı İFA (Sendviç üsul)

- Antigeni təyin etmək üçün istifadə edilən bərkfazlı İFA zamanı isə planşetin çuxurcuğuna məlum anticişim sorbsiya edilir.
- ***Sendviç üsul*** daha çox tətbiq edilir. Bunun üçün planşetin çuxurcuğuna ardıcıl olaraq axtarılan antigenə qarşı nişanlanmamış spesifik immun zərdab, fermentlə nişanlanmış antiqlobulin zərdab və fermentin parçalayacağı substrat və xromogen əlavə edilir.
- Reaksiyanın sonrakı gedişi yuxarıda göstərildiyi kimidir.

Bərkfazlı immunoferment analizinin sxemi



İmmunoferment analizin texnikası

Hazırda hər bir xəstəliyin diaqnostikasında istifadə olunan avadanlıq və reaktivlər dəsti hazır şəkildə kommersiya yolu ilə əldə edilir



İmmunoferment analizinin texnikası

- Xüsusi bufer məhlulunda müayinə edilən materialın müəyyən durulaşmaları hazırlanır. Materialın hər bir durulaşmasından planşetin (bu planşetin çuxurcuğuna məlum antigen, yaxud məlum anticisim sorbsiya edilmişdir) iki çuxurcuğuna əlavə olunur, 37°C-də termostatda 1-3 saat müddətində inkubasiya edilir.
- Inkubasiyadan sonra birləşməmiş antigen, yaxud anticisimləri kənarlaşdırmaq üçün planşetin çuxurcuqları xüsusi bufer məhlulu ilə diqqətlə yuyulur. Sonra çuxurcuqlara axtarılan antigenə qarşı fermentlə nişanlanmış anticisim, yaxud fermentlə nişanlanmış antiqlobulinin bufer məhlulunda işçi durulaşmasından 0,1 ml həcmdə əlavə edilir, 37°C-də termostatda 2 saat müddətində inkubasiya edilir, birləşməmiş konyuqatların kənarlaşdırılması üçün bufer məhlulla 3 dəfə yuyulur.
- Bundan sonra çuxurcuqlara 0,1 ml həcmdə substrat (H_2O_2) və xromogen (məsələn, ortofenildiamin) qarışığı əlavə olunur, 30 dəq müddətində otaq temperaturunda qaranlıqda saxlanılır.
- Inkubasiya prosesində çuxurcuqların divarında birləşib qalmış ferment (peroksidaza) substratı (H_2O_2) atomar oksigenə parçalayır ki, bu da xromogeni oksidləşdirərək onun rəngini dəyişir (sarı rəng əmələ gəlir). Substratın parçalanma reaksiyasını saxlamaq üçün çuxurcuqlara *stop reagent* (0,1ml 1N H_2SO_4 , yaxud 1N NaOH) əlavə edilir.

İFA (nəticənin qiymətləndirilməsi)

- Reaksiyanı adi gözlə qiymətləndirmək mümkündür. Bunun üçün əsas təcrübənin rəng dəyişikliyi kontrolla müqayisə etmək kifayətdir. Materialın elə ən böyük durulaşmasını qeyd edirlər ki, bu durulaşmada əmələ gələn rəngin intensivliyi kontrolun müvafiq durulaşmasına nisbətən daha intensivdir.
- Reaksiyanı daha dəqiq qiymətləndirmək üçün fotoelektrokolorimetrik üsuldən istifadə olunur.
- Müsbət nəticə kimi müayinə edilən materialın elə ən böyük durulaşması götürülür ki, onun ekstinksiya səviyyəsi kontrolun müvafiq durulaşmasının ekstinksiya səviyyəsindən minimum 2 dəfə artıq olsun.



İFA (nəticənin qiymətləndirilməsi)

Hazırda nəticəni
avtomatik
qiymətləndirməyə
imkan verən
mikroplanşet
fotomerləri (riderlər)
geniş istifadə edilir



İmmunoferment analizin nəticəsini
avtomatik qiymətləndirmək üçün
mikroplanşet fotomeri (STAT FAX®)

Radioimmun metod (RİM)

- Yüksək həssaslığa malik olan RİM mikrob antigenlərini, həmçinin, müayinə materiallarında çox cüzi konsentrasiyalarda olan hormonları, fermentləri, dərman maddələrini, immunoqlobulinləri və s. təyin etməyə imkan verir.
- Lakin radioaktiv şüalanmanın mümkünlüyü səbəbindən bu metod geniş istifadə edilmir.

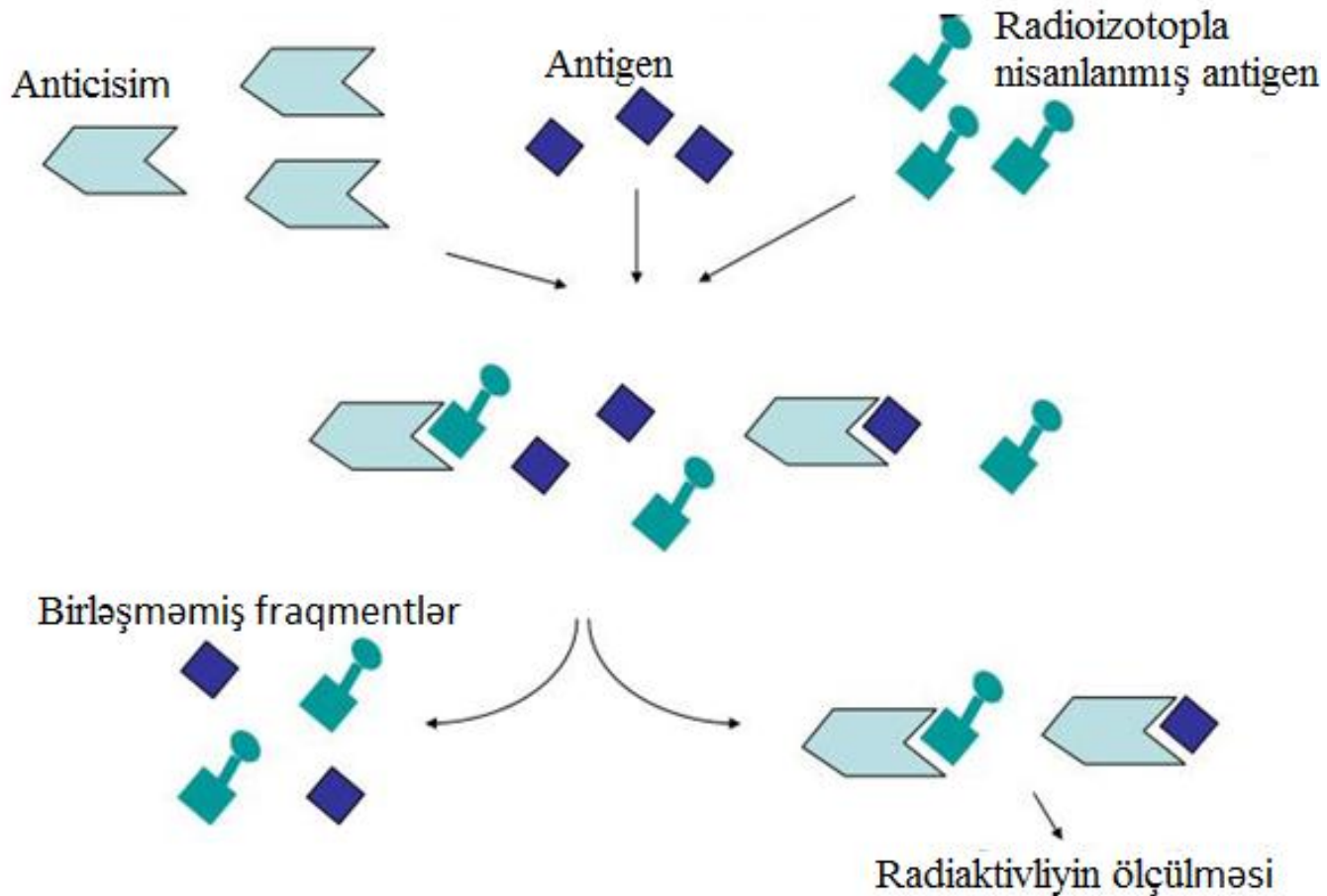
Radioimmun metod (RİM)

- RİM - radioizotoplarla, əsasən ^{125}J ilə nişanlanmış antigen və ya anticisimlərin istifadəsinə əsaslanır.
- İzotopla nişanlanmış anticisimlər müvafiq antigenlərlə birləşdikdən sonra əmələ gəlmiş antigen-anticisim kompleksini radioaktivliyi ölçməklə təyin edirlər. Radioaktivliyin intensivliyi əmələ gəlmiş antigen-anticisim kompleksinin miqdarına düz mütənasib olur.
- Reaksiya komponentlərindən birini – antigeni, yaxud anticisimi bərk daşıyıcı üzərinə, məsələn, polistirol mikroplaqşelin çuxurcuğuna sorbsiya etməklə aparılan **bərkfazlı** RİM prinsipcə İFA ilə oxşardır. Lakin reaksiyanın nəticəsi fermentin aktivliyini təyin etməklə deyil, radioaktivliyi ölçməklə qiymətləndirilir.

Radioimmun metod (RİM)

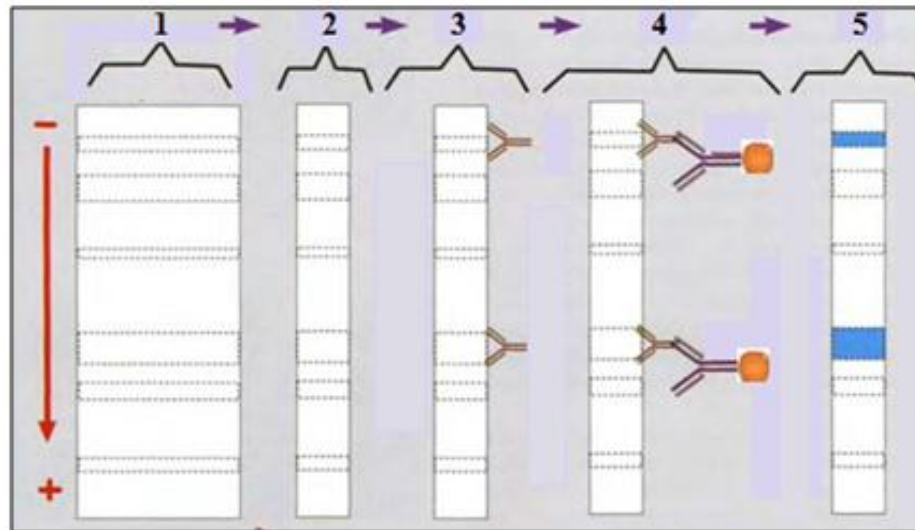
- Metodun ***konkurent*** variantı müayinə materialında antigenin miqdarını təyin etmək üçün istifadə edilir.
- Bunun üçün polistirol mikroplənşelin çuxurcuğuna məlum anticisim sorbsiya edilir. Bu çuxurcuğa müayinə eilən material əlavə edilir, müəyyən müddət inkubasiyadan sonra miqdarı təyin ediləcək antigenlə eyni spesifikliyə malik olan, radioaktiv izotopla nişanlanmış antigen əlavə edilir.
- Müayinə materialında müvafiq antigen olduğu təqdirdə çuxurcuğun divarına sorbsiya edilmiş anticisimlərlə birləşərək onu blokada edir. Nəticədə reaksiyadan sonra əlavə edilmiş nişanlanmış antigenin miqdarında əhəmiyyətli dəyişiklik baş vermir.
- Müayinə materialında müvafiq antigen olmadıqda, çuxurcuğun divarına sorbsiya edilmiş anticisimlər sərbəst halda qalır. Buna görə də sonradan əlavə edilən nişanlanmış antigenin miqdarı reaksiyadan sonra əhəmiyyətli dərəcədə azalır.

RİM (konkurent variantın prinsipi)



İmmunoblotting

İmmunoblotting (ing. *blot* - ləkə) – əvvəlcədən elektroforez üsulu ilə tərkib hissələrinə ayrılmış antigenlərin İFA, yaxud RİM vasitəsilə aşkar edilməsinə əsaslanır . Bunun üçün antigeni poliakrilamid gelində elektroforez vasitəsilə tərkib hissələrinə ayırır (1), sonra onu gəldən nitrosellüloz membran zolaqlara köçürülər (2). Xəstənin qan zərdabını belə zolaqlara əlavə edir (3), müəyyən müddət inkubasiyadan sonra birləşməmiş anticisimləri kənarlaşdırmaq üçün diqqətlə yuyur və üzərinə insan immunoqlobulininə qarşı fermentlə nişanlanmış antiqlobulin zərdab əlavə edirlər (4). Müayinə edilən qan zərdabındakı anticisimlər nitrosellüloz membran zolaqlarda olan antigenlərlə birləşdiyindən burada antigen-anticisim-nişanlanmış antiqlobulin kompleksi əmələ gəlir. Belə zolaqlara substrat və xromogenin əlavə edilməsi müvafiq sahələrdə rəngli ləkələrin əmələ gəlməsinə səbəb olur (5).



Gen mühəndisliyi

- Gen mühəndisliyinin əsasında nukleotid ardıcılıqlarına parçaladıqdan sonra DNT-nin prokariot və eukariot hüceyrələrə köçürülməsi durur.
- Nəticədə əmlə gəlmiş belə hüceyrələr – **hibridlər** yad gen fragmentlərinə malik olmaqla köçürülmüş genin ekspressiyasını təmin edir.
- Gen mühəndisliyinin son məqsədlərindən biri müəyyən genin kodlaşdırdığı məhsulun və ya əlamətin resipient orqanizmdə təmin edilməsindən ibarətdir.



Gen mühəndisliyi (genin əldə edilməsi)

- Bunun üçün əvvəlcə həmin məhsulu, yaxud əlaməti kodlaşdıran gen (DNT molekulu) əldə edilir, yaxud sintez edilir. Bundan sonra **restriktaza** adlanan fermentlərdən istifadə edərək DNT molekulunu fragmentlərə parçalayırlar. Bu ferment endonukleazalara aid olub, DNT molekulunu ancaq müəyyən yerlərdən parçalamaq qabiliyyətinə malikdir.
- Restriktazaların təsirindən alınmış DNT molekulu fragmentləri **restriktlər** adlanır. Lazım gəldikdə restriktlərin uc hissələrini **DNT-liqazalar** vasitəsilə birləşdirmək də mümkündür.

Gen mühəndisliyi (genin köçürülməsi)

- DNT-fraqmentlərini vektora birləşdirirlər. **Vektor** yad DNT fraqmentini resipient hüceyrəyə keçirən agentə deyilir.
- Vektor kimi ən çox plazmidlərdən, faqlardan, yaxud da onların kombinsiyasından – ***kosmid*** və ***fazmidlərdən*** istifadə edilir.
- Rekombinant DNT-ni (rDNT) vektor vasitəsilə resipient hüceyrəyə köçürmək ***üçün transformasiya, transfeksiya və mikroinyeksiya*** üsulları tətbiq edilir.

Gen mühəndisliyi (genin köçürülməsi)

- Təbii **transformasiya** vasitəsilə rDNT *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae* və *E.coli*-nin bəzi ştammlarına köçürülə bilər.
- rDNT-nin prokariot və eukariot hüceyrələrə faq vasitəsilə köçürülməsi **transfeksiya** adlanır. Bəzi hallarda eukariot hüceyrələrini vektor virusla yoluxdururlar. Bu halda vektor kimi ən çox polioma və SV-40 viruslarından istifadə edilir.
- **Mikroinyeksiya** üsulu vasitəsilə DNT molekulunu, həmçinin rDNT-ni heyvan və bitkilərin kultivasiya edilən hüceyrələrinə şüşə mikroinyeulərdən istifadə etməklə köçürürlər.
- rDNT-ni resipient hüceyrələrə **liposomlar** vasitəsilə də köçürmək olar. Liposomlar fosfatidilserin və xolesterinin bərabər qarışığı əsasında hazırlanır. rDNT və liposom qarışığını ultrasəsle işləyir, sonra isə onu resipient hüceyrə ilə birlikdə inkubasiya edirlər

Gen mühəndisliyi (son məhsulun əldə edilməsi)

- rDNT-ni ***permissiv hüceyrələr*** (ingiliscə, *permission* – icazə, imkan vermə) adlandırılan resipient hüceyrələrə köçürürlər. Bu hüceyrələr elə hüceyrələdirlər ki, köçürülən rDNT parçalanmadan həmin hüceyrənin tərkibində qalır və vektorun replikasiyası mümkün olur, başqa sözlə rDNT-nin ekspressiyası müşahidə olunur.
- Gen mühəndisliyində prokariotlardan *E.coli*, *B.subtilis*, eukariotlardan isə *Saccharomyces cerevisiae* maya göbələkləri daha çox istifadə edilir.
- Hazırda rDNT-də müvafiq genlərin ekspressiyası əsasında insulin, somatotrop hormon, interferonlar, interleykinlər və s. istehsal edən bakteriya və maya göbələkləri şammlarının superprodusientləri alınmış və biotexnologiyada istifadə edilir.

Gen mühəndisliyinin müasir imkanları

- rDNT-nin heyvanların rüşeym hüceyrələrinə (yaxud yumurtahüceyrəyə) mikroinyeksiyası yolu ilə **transgen heyvanlar** əldə etmək mümkün olmuşdur. Belə orqanizmlərin genomunun tərkibində donorun müəyyən genlərinin olması hesabına onlar yeni əlamətlər qazanırlar.
- Eyni qayda ilə fitopatogen mikroorqanizmlərə, soyuğa və s. amillərə davamlı xüsusiyyətlərə malik **transgen bitkilər** də alınmışdır. Bəzi mikroorqanizmlərin immunodominant antigenlərinin genlərini bitkilərə köçürməklə tərkibində müəyyən «vaksinlər» olan meyvə və yerkökü sortları alınmışdır.
- Son dövrdə genetikanın uğurlarından biri də **genetik klonun**, yəni **genetik surətlərinin** yaradılmasıdır. Genetik klon ilk dəfə keçən əsrin sonlarında Şotland alimləri Yan Velhmut və Ken Kembpell tərəfindən yaradılmışdır.

Genetik metodların diagnostikada tətbiqi

- Zəncirvari polimeraza reaksiyası
- Molekulyar hibridləşdirmə üsulu
- Restriksion analiz
- Sekvenləşdirmə üsulu

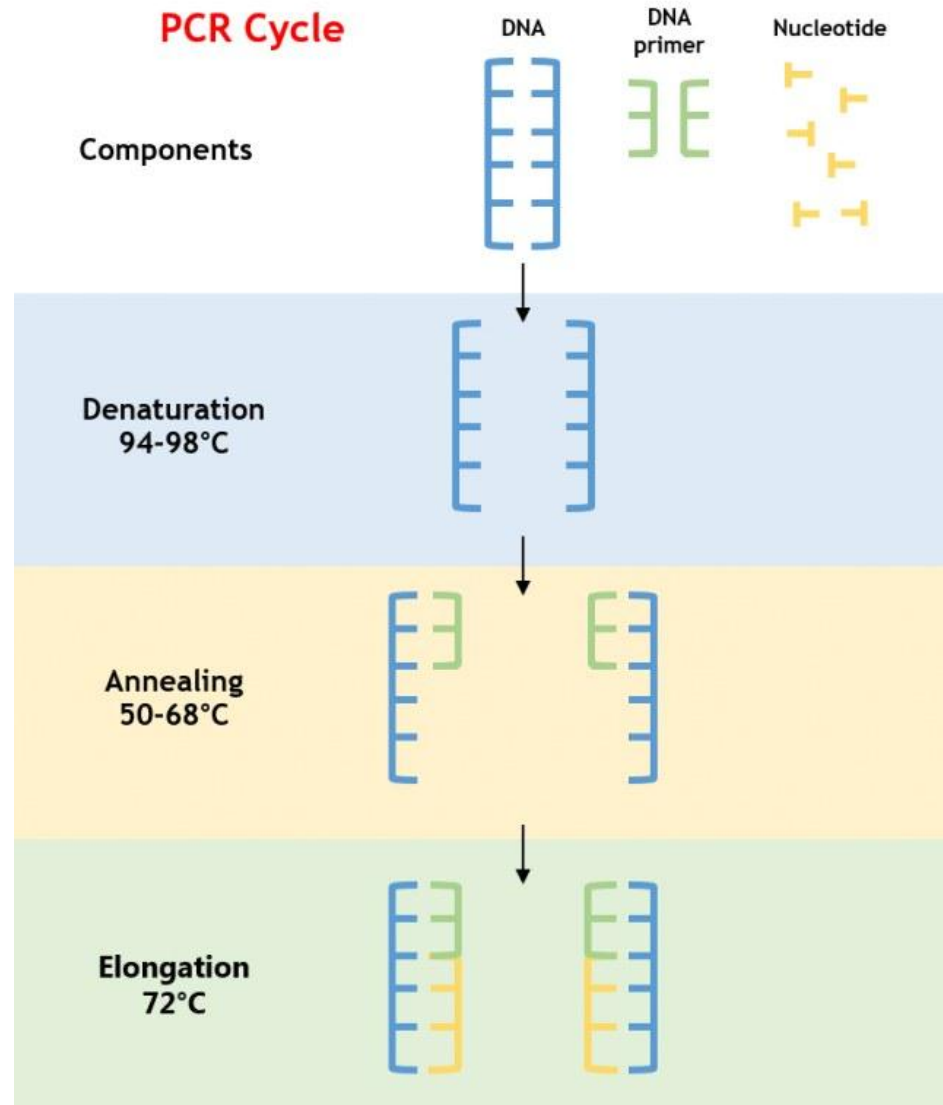
Zəncirvari polimeraza reaksiya (ZPR)

- müayinə olunan materiallarda törədicinin DNT, yaxud RNT fraqmentlərinin sürətlərinin çoxaldılaraq aşkar edilməsinə əsaslanan üsuldur. ZPR yüksək həssaslıq və spesifikliyə malik olmaqla müayinə olunan materiallarda törədicinin DNT, yaxud RNT fraqmentlərinin çox kiçik hissələrini belə aşkar etməyə imkan verir. ZPR aparmaq üçün xüsusi avadanlıq dəstindən istifadə edilir.
- Əvvəlcə ikizəncirli DNT-matriksini 0.5-2 dəq müddətində 92-96 °C-yə (yaxud, termiki stabil polimeraza istifadə edilirsə - 98°C-yə qədər) qədər qızdırırlar ki, DNT zəncirləri ayrılınsın. Bu mərhələ denaturasiya adlanır, DNT zəncirləri arasındakı hidrogen əlaqələri pozulur. Adətən, birinci sikldən əvvəl matriks və praymerlərin tam denaturasiyası üçün reaksiya qarışığı 2-5 dəq ərzində qızdırılır.
- Bundan sonra axtarılan DNT praymeri və polimeraza fermenti əlavə edilir, praymer DNT zəncirinə komplementar olduqda onunla birləşir. Göstərilən sikl adətən 70-80 dəfə təkrar edilir. Müayinə materialında axtarılan DNT fraqmentləri olduğu təqdirdə yeni DNT zəncirlərinin əmələ gəlməsi hesabına onun miqdarı dəfələrlə artır (amplifikasiya).
- Bundan sonra DNT-nin elektroforetik identifikasiyası aparılır.

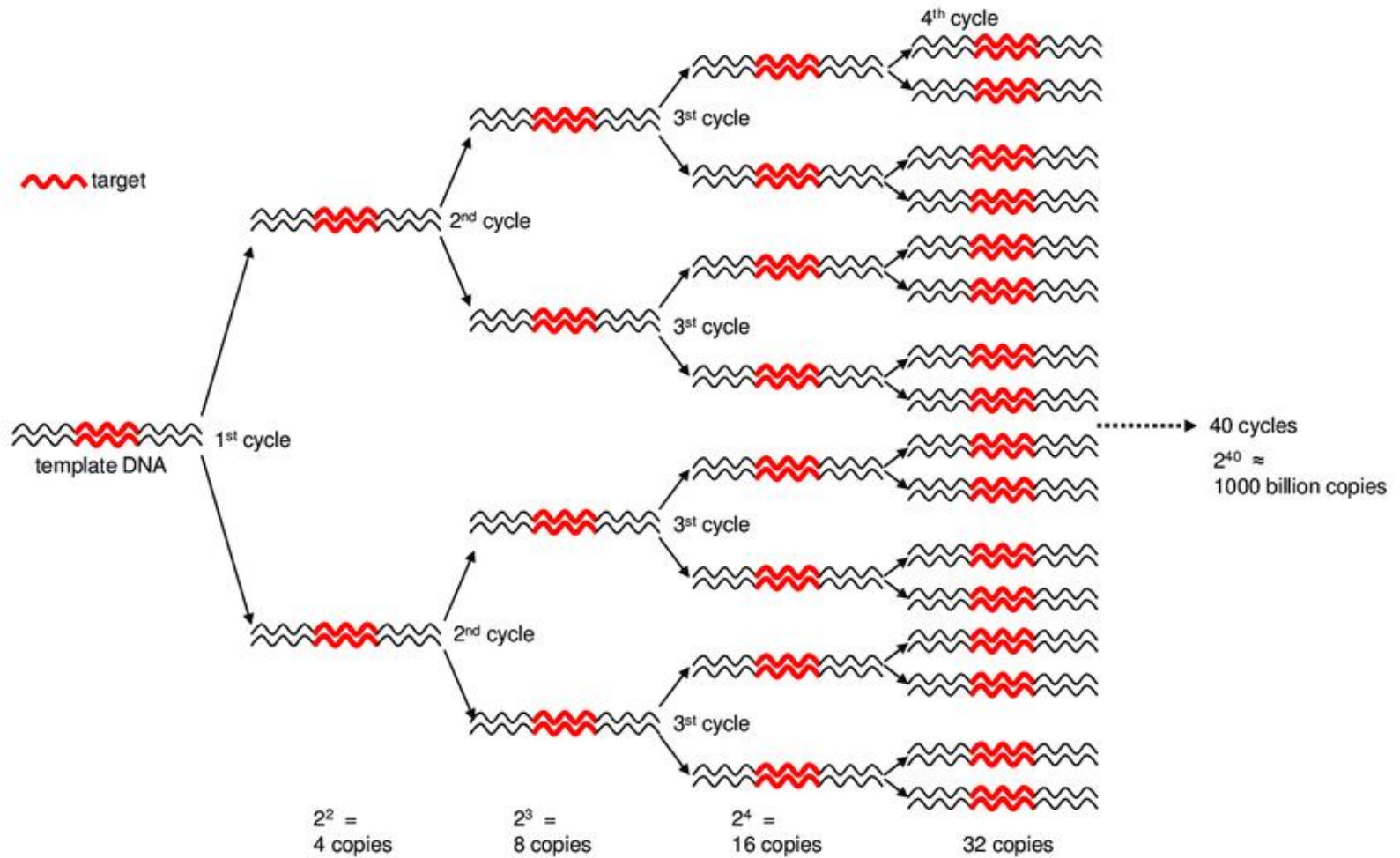
Real time PCR

- **Real vaxtda ZPR (*real time PCR*)** amplifikasiya məhsullarının bilavasitə amplifikasiya zamanı toplanmasını aşkar etməyə imkan verir.
- Amplikonların toplanmasının kinetikasi bilavasitə tədqiq olunan matriks nüsxələrinin sayından asılı olduğundan, törədicinin DNT və RNT-nin kəmiyyət ölçülərini aparmağa imkan verir.
- Əldə edilmiş məlumat aparılan müalicənin effektivliyinə nəzarət üçün istifadə edilə bilər

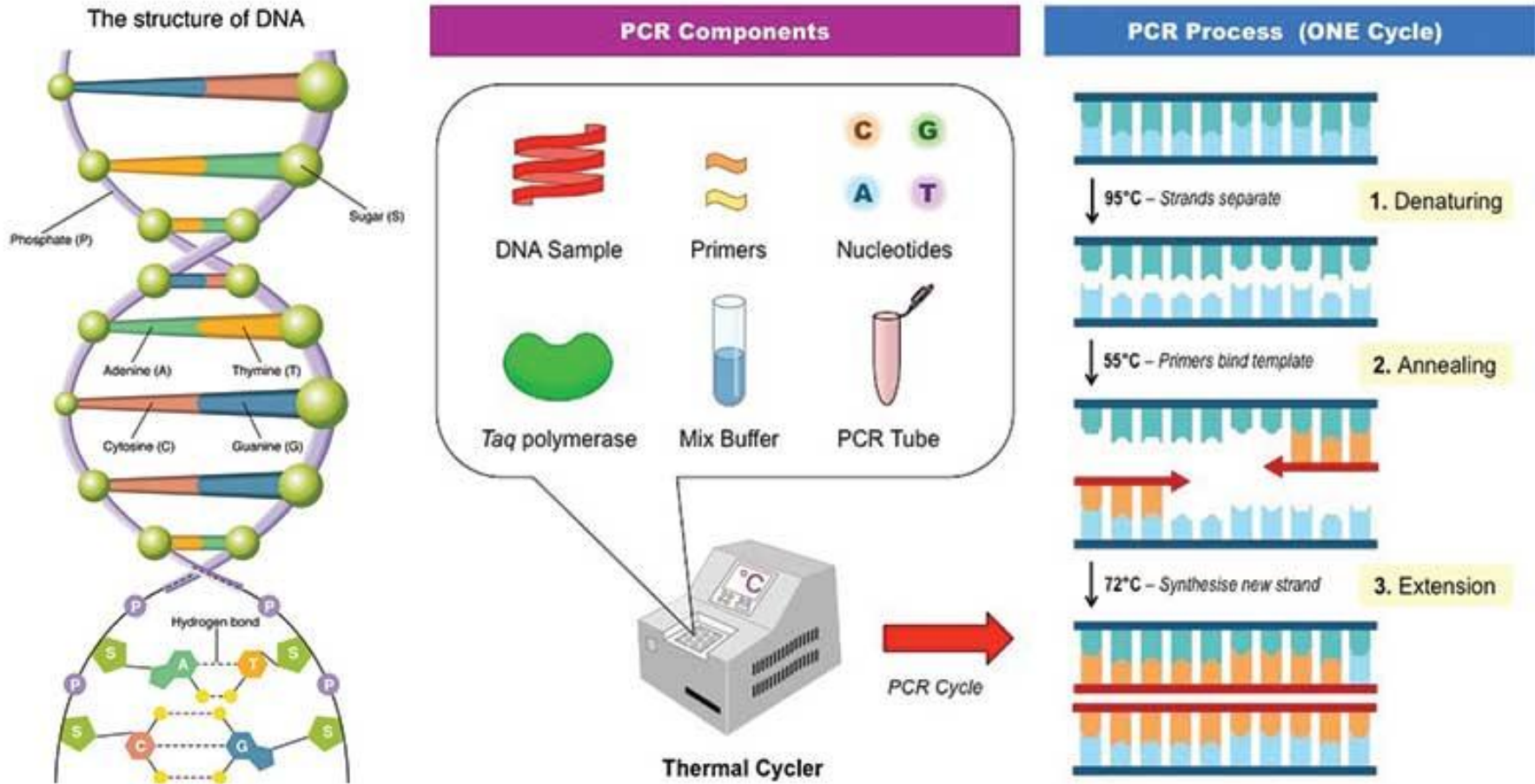
Amplifikasiyanın prinsipi



Amplifikasiyanın sxemi

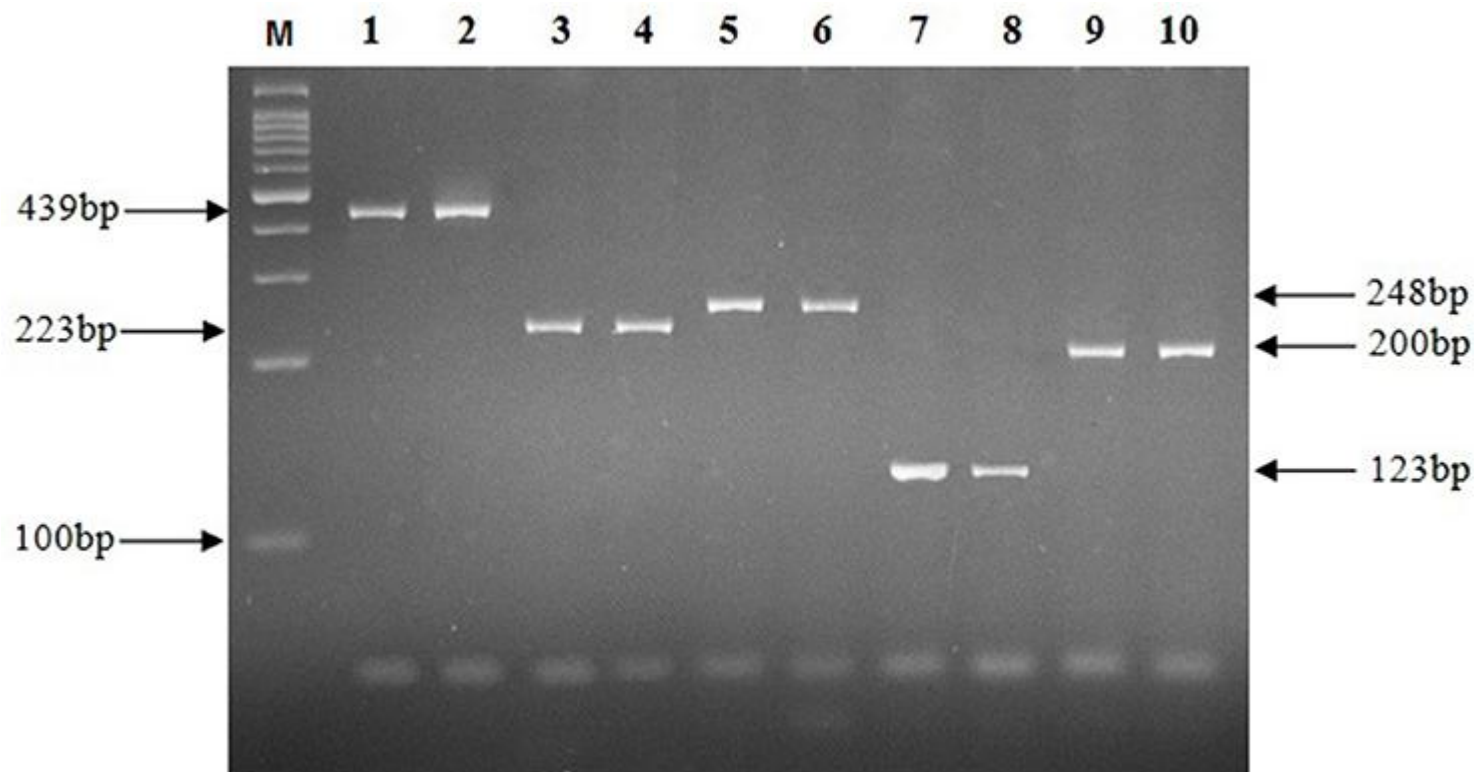


Zəncirvari polimeraza reaksiyasının prinsipi



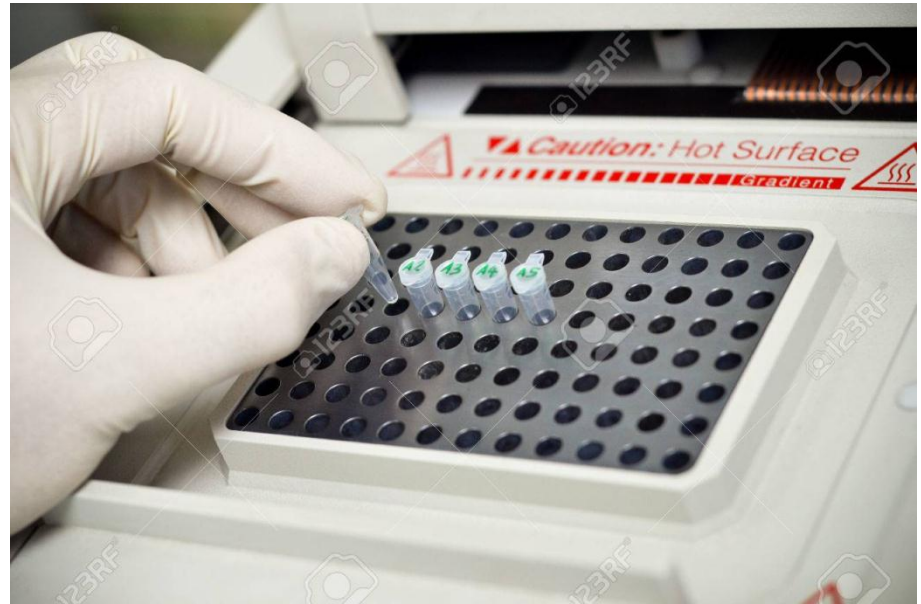
DNT-nin elektroforetik identifikasiyası

(2%-li aqaroza gelində elektroforez)



M, Molecular size marker; Lanes 1, 2, 439 bp fragment of *hsp65* gene; Lanes 3, 4, 223 bp fragment of *mtp40* gene; Lanes 5, 6, 248 bp fragment of *IS1081* gene; Lanes 7, 8, 123 bp fragment of *IS6110* gene; Lanes 9, 10, 200 bp fragment of *mpb64* gene

ZPR amplifikator cihazı

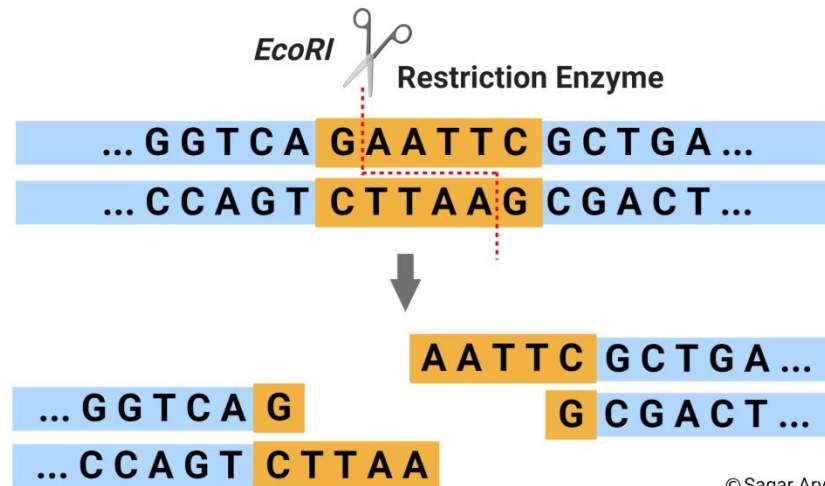


Molekulyar hibridləşdirmə üsulu

- Bu üsulla müayinə edilən materialda nuklein turşuları radioaktiv izotopla, yaxud fermentlə nişanlanmış zondlar vasitəsilə aşkar edilir.
- Zond kimi axtarılan nuklein turşusu molekuluna komplementar olan təkzəncirli DNT, yaxud RNT molekulundan istifadə edilir.
- Müayinə materialında zonda müvafiq (komplementar) nuklein turşusu olduğu təqdirdə onlar öz aralarında birləşir (hibridləşir) və ikili spiral əmələ gətirir.
- Hibridləşmiş molekullar radioimmün, yaxud immunoferment analizlərin köməyi ilə aşkar edilir.

Restriksion analiz

- **Restriksion analiz** əsasən mikroorqanizmlərin identifikasiyasında tətbiq edilir.
- Analizin prinsipi restriktazalar vasitəsilə parçalanmış DNT fraqmentlərinin elektroforetik üsulla identifikasiyasından ibarətdir.
- **Restriktaza** adlanan fermentlər endonukleazalara aid olub, DNT molekulunu ancaq müəyyən yerlərdən parçalamaq qabiliyyətinə malikdirlər.
- Restriksiya fraqmentinin uzunluq polimorfizmi (**restriction fragment length polymorphism - RFLP**) adlanan metod alınmış restriksiya fermentlərinin aqaroza gelində elektroforezi və etidium bromid ilə boyadıldıqdan sonra gəldə əmələ gələn DNT ləkələrinin yeri və sayının standartla müqayisə edilməsinə əsaslanır.



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 didezoksinukleotidlər (adenin, timin, qüanin və sitozin) əlavə edilir. Nişanlanmış didezoksinukleotidlər hər bir DNT-fraqmentinin 3'-sonluğunda olan komplementar nukleotidlərlə birləşir. Beləliklə, müxtəlif uzunluqlu təkzəncirli DNT fraqmentləri 3'-sonluğunda hansı nukleotidin olmasından asılı olaraq fərqli nişanlanmış olur.
- Sonra nişanlanmış DNT fraqmentləri vertikal poliakrilamid gelində elektroforezə məruz qoyulur. Bu zaman fraqmentlər molekulyar kütlələrindən asılı olaraq müxtəlif məsafələr qət edir və sonda nişanlanmış didezoksinukleotidlər müayinə edilən fraqmentdəki nukleotidlər ardıcılığına müvafiq olan qaydada düzülürlər. Elektroforez prosesi kompüter təhlilinə malik avtomatik rejimli xüsusi qurğularda – **sekvenatorlarda** aparılır.