

Занятие 13

Реакция связывания комплемента (РСК). Реакция иммунофлюоресценции (РИФ).

Иммуноферментный анализ (ИФА).

Радиоиммунный метод (РИМ). Иммуноблотинг (ИБ). Применение генетических методов в микробиологической диагностике. Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Секвенирование

dos. V.Nərimanov
prof. A.Qurbanov

Обсуждаемые вопросы:

- 1. Реакция связывания комплемента (РСК) и ее сущность.
- 2. Механизм РСК и ее значение в диагностике.
- 3. Сущность реакций с использованием меченых антител.
- 4. Значение реакций с использованием меченых антител в экспресс диагностике.
- 5. Механизм реакции иммунофлюоресценции (реакция Кунса): прямой (РИФ) и непрямой (РНИФ) варианты.
- 6. Иммуноферментный анализ и его значение: прямой и непрямой варианты.
- 7. Радиоиммунный метод (конкурентный, обратный и непрямой), применение.
- 8. Иммуноблотинг, механизм.
- 9. Применение генетических методов в микробиологической диагностике.
- 10. Молекулярно-генетические методы, их виды и применение в диагностике.
- 11. Значение, механизм и практическое применение полимеразной цепной реакции (ПЦР, ПЦР в реальном времени)
- 12. Метод молекулярной гибридизации, его сущность, механизм и практическое значение.
- 13. Рестрикционный анализ, сущность, механизм и практическое значение.
- 14. Метод секвенирования, сущность, механизм и практическое значение.
- 15. Генная инженерия, цели и задачи.

Цель занятия:

- дать студентам информацию о реакциях, протекающих с участием меченых антител и комплемента. Ознакомить студентов с механизмом, сущностью и техникой постановки РСК, ИФА, РИФ, РИМ и иммуноблотинга, а также значением этих реакций в диагностике инфекционных заболеваний. Дать студентам информацию о молекулярно-генетических методах (ПЦР, молекулярная гибридизация, рестрикционный анализ, секвенирование), объяснить их значение, механизм и применение в диагностике

Реакции лизиса

Реакции лизиса происходят с участием трех компонентов: клетки (антигена), специфических антител и комплемента. Иммунная сыворотка совместно с комплементом обладает способностью лизировать микроорганизмы или другие клетки. В зависимости от антигена реакции лизиса называют:

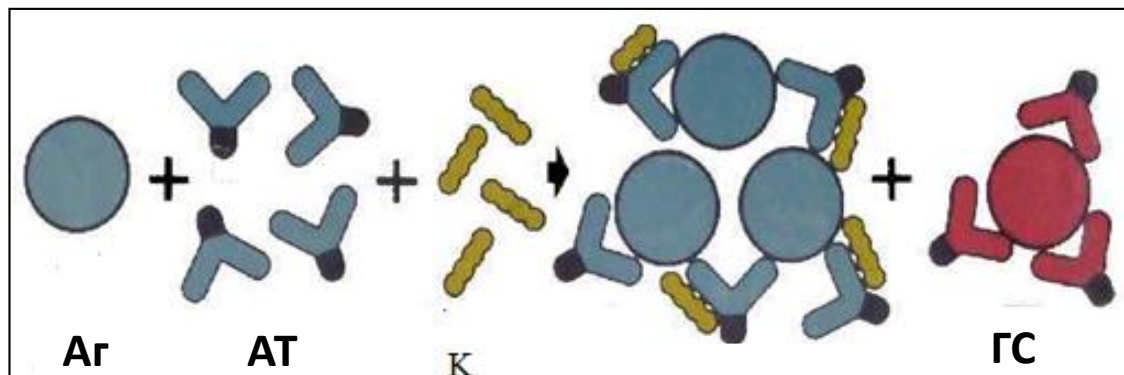
- **Реакции бактериолиза** основываются на лизисе (разрушении) бактерий (вибрионов, спирохет и др.) соответствующими антителами- бактериолизинами при участии комплемента.
- **Реакция гемолиза** - при взаимодействии эритроцитов, антител к ним и комплемента наблюдается их лизис. Реакцию гемолиза используют в качестве индикатора связывания комплемента при постановке РСК

Реакция связывания комплемента (РСК)

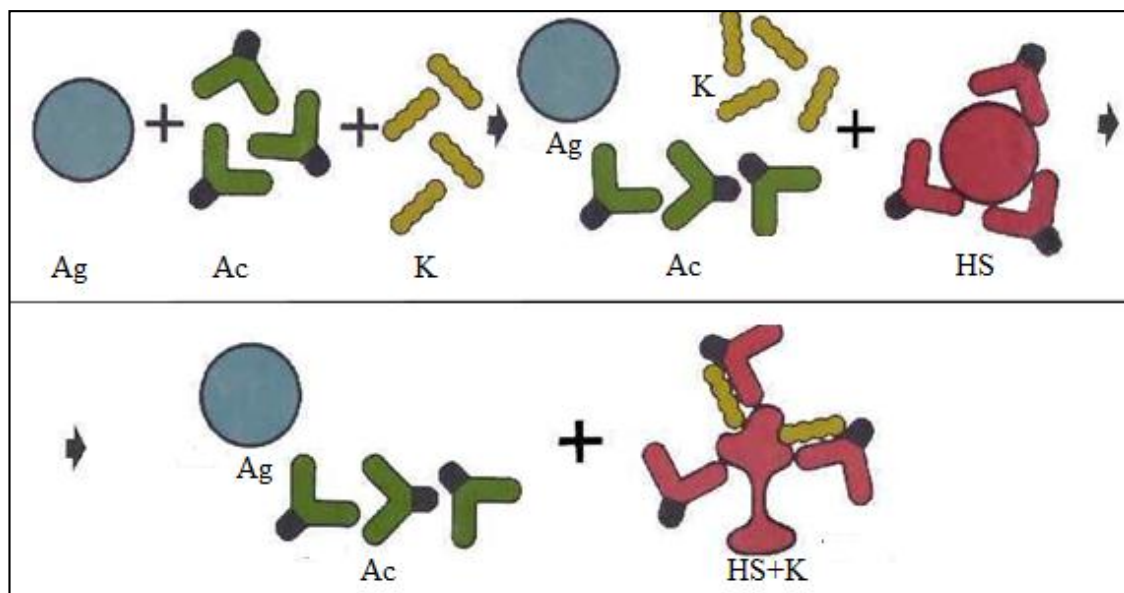
- Реакция основана на **активации комплемента** при образовании комплекса антиген–антитело
- При соответствии друг другу антигены и антитела образуют иммунный комплекс, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется комплемент (C), т. е. происходит связывание комплемента.
- Если же комплекс антиген–антитело не образуется, то комплемент остается свободным.
- Таким образом учет результата реакции основывается на том, связался ли комплемент или остался свободным.

РСК (принцип реакции)

- РСК представляет собой сложную реакцию состоящую из 2-ух серологических реакций. Одна из этих реакций является основной, а другая – индикаторной реакцией.
- К инактивированной и разбавленной сыворотке пациента добавляются соответствующий антиген и комплемент.
- После инкубации к смеси добавляют гемолитическую систему для обнаружения свободного комплемента
- Гемолитическая система состоит из эритроцитов барана и антител к этим эритроцитам. При добавлении комплемента к этой системе происходит гемолиз
- Если **реакция положительная**, образованный комплекс антиген-антитело связывает комплемент, что приводит к отсутствию гемолиза в гемолитической системе из-за отсутствия комплемента в смеси.
- Если **реакция отрицательная**, антиген и антитело не соответствуют друг другу комплемент остается свободным и присоединяется к комплексу эритроцит–антиэритроцитарное антитело, вызывая гемолиз (феномен лаковой крови)

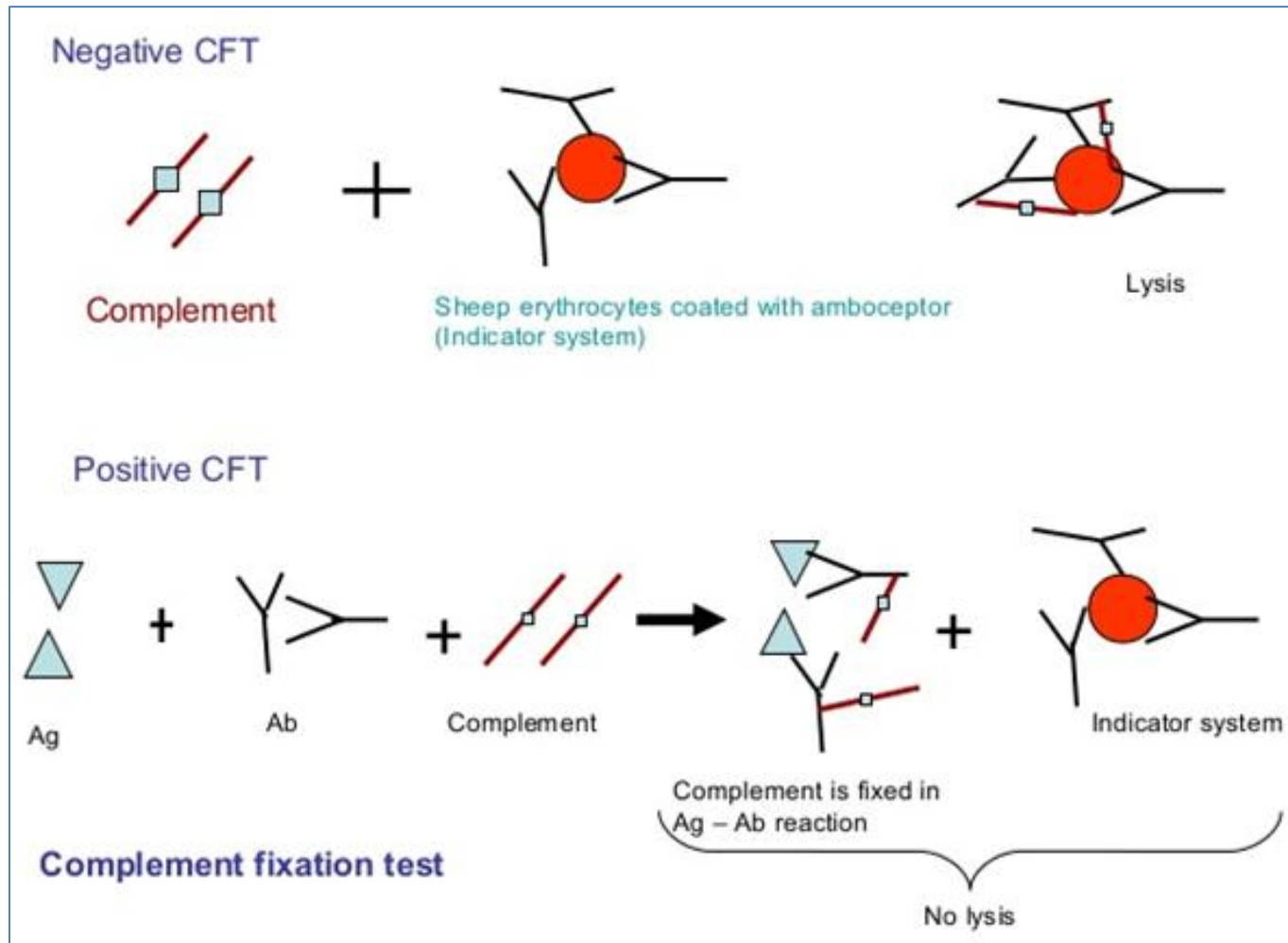


Положительная реакция связывания комплемента
 Ag- антиген, AT- антитело, K-комплемент, ГС-гемолитическая
 система



Отрицательная реакция связывания комплемента
 Ag- антиген, AT- антитело, K-комплемент, ГС-гемолитическая
 система

РСК (принцип реакции)



РСК (применение)

- РСК применяют для диагностики многих инфекционных болезней, в частности сифилиса, токсоплазмоза, вирусных инфекций.
- РСК отличается высокой специфичностью и чувствительностью
- При постановке реакции необходимо определять относительное количество всех ингредиентов реакции

РСК (ингредиенты)

- **Суспензию эритроцитов барана** получают дефибринованием эритроцитов путем встряхивания в течение 10-15 мин и фильтрованием для удаления фибрина. Отмывают 3 раза изотоническим раствором натрия хлорида, доливая его к осадку эритроцитов до первоначального объема крови. Эритроциты можно хранить 5-6 дней при температуре 4-6°C.
- **Гемолитическую сыворотку** для РСК получают путем иммунизации кроликов путем введения им 50% взвеси отмытых эритроцитов барана (по 1 мл 4-6 раз через день). Полученную через 7 дней после последней инъекции сыворотку прогревают 30 мин при температуре 56°C (для инактивации содержащегося в ней комплемента). Для предупреждения бактериального пророста в гемолитическую сыворотку добавляют консервант. Выпускают во флаконах в лиофилизированном виде, указывают титр (наибольшее разведение, вызывающее полный гемолиз 3% суспензии эритроцитов барана в присутствии комплемента при 37°C в течение часа).

РСК (ингредиенты)

- **Гемолитическая система** состоит из смешанных в равных объемах гемолитической сыворотки (взятой в тройном титре) и 3% взвеси эритроцитов барана. Для сенсibilизации эритроцитов гемолизинами смесь выдерживают в термостате при температуре 37°C в течение 30 мин.

РСК (ингредиенты)

- В качестве комплемента используют сыворотку морской свинки, взятую непосредственно перед опытом; можно также применять сухой комплемент. Чтобы получить основной раствор для последующего титрования, комплемент разводят 1:10 изотоническим раствором натрия хлорида.
- Перед проведением опыта основной раствор комплемента (1:10) разливают в ряд пробирок от 0,05 до 0,5 мл и добавляют в каждую изотонический раствор натрия хлорида, доводя объем жидкости до 1,5 мл
- Пробирки помещают в термостат при температуре 37°C на 45 мин, затем добавляют в них гемолитическую систему и выдерживают в термостате в течение 30 мин, после чего определяют *титр комплемента*
- Для опыта берут рабочую дозу комплемента (содержащуюся в объеме 0,5 мл), которая выше титра на 20-30%
- Например, если титр комплемента составляет 0,3 мл, то рабочая доза для РСК будет равна 0,4 мл.

РСК (ингредиенты)

- **Антигеном** для РСК могут быть культуры различных убитых микроорганизмов, их лизаты, компоненты бактерий, патологически измененных и нормальных органов, вирусы и вируссодержащие материалы. Многие антигены из микроорганизмов получают производственным путем.
- **Сыворотку** (больного или диагностическую) накануне проведения реакции прогревают на водяной бане при температуре 56°C в течение 30 мин для инактивации ее собственного комплемента.

РСК (техника)

Фазы реакции	Компоненты реакции	Количество компонентов добавляемое в пробирки (в мл)		
		Опыт	Контроль сыворотки	Контроль антигена
I	1 Исследуемая сыворотка (1:10, 1:20, 1:40 и др. разведения)	0,5	0,5	-
	2. Антиген, мл	0.5	-	0,5
	3. Комплемент, мл	0,5	0,5	0,5
	4. Изотонический раствор (мл)	-	0,5	0.5
Инкубация 30 мин, при 37°C				
II	5. Гемолитическая система (мл)	1,0	1,0	1,0
Инкубация 30 мин, при 37°C				
		Гемолиза нет	Гемолиз	Гемолиз

РСК (учет результатов)

- Отсутствие гемолиза в пробирках расценивают как положительный результат реакции (жидкость в пробирке бесцветная, все эритроциты оседают на дно)
- При отрицательной реакции (–) наблюдается полный гемолиз, жидкость в пробирке имеет интенсивно розовую окраску (лаковая кровь).
- При окончательном учете интенсивность реакции выражают плюсами: (++++; +++; ++; +)
- Разведение сыворотки в последней пробирке где не произошло гемолиза принимается **за титр реакции связывания компонента.**



На РСК микропланшетах (результат)

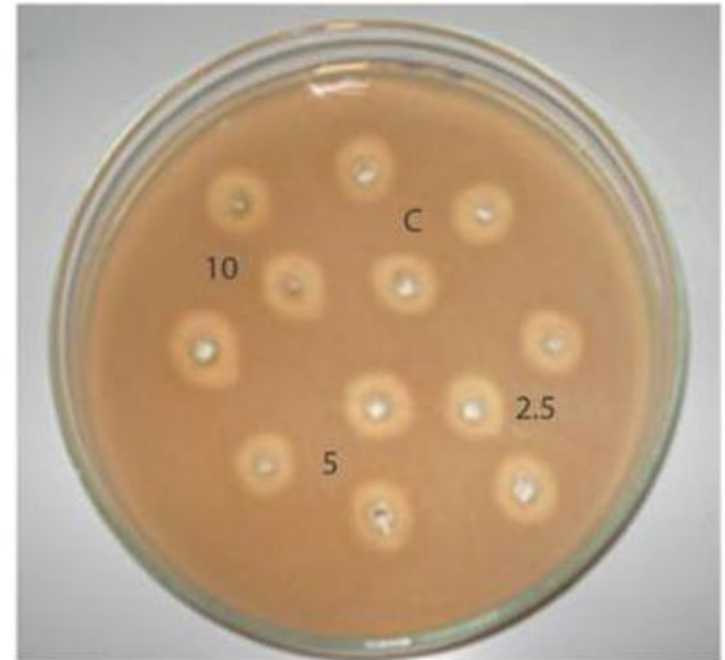
	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	Control serum	Titer
Active Acute							Titer <16
Recovering							Titer ≥256
Active Acute							Titer <16
Recovering							Titer =128

РСК в пробирках (результат)



Реакция радиального гемолиза (РРГ)

- **Реакцию радиального гемолиза (РРГ)** ставят в лунках геля из агара, содержащего эритроциты барана и комплемент. После внесения в лунки геля гемолитической сыворотки (антител против эритроцитов барана) вокруг них (в результате радиальной диффузии антител) образуется зона гемолиза. Таким образом, можно определить активность комплемента и гемолитической сыворотки, а также антитела в сыворотке крови у больных гриппом, краснухой, клещевым энцефалитом. Для этого на эритроцитах адсорбируют соответствующие антигены вируса, а в лунки геля, содержащего данные эритроциты, добавляют сыворотку крови больного. Противовирусные антитела взаимодействуют с вирусными антигенами, адсорбированными на эритроцитах, после чего к этому комплексу присоединяются компоненты комплемента, вызывая гемолиз.



Реакции с использованием меченых антител или антигенов

- Реакции с использованием меченых антител или антигенов составляют основу методов экспресс-диагностики инфекционных заболеваний, так как выявляют минимальное содержание антигенов и антител в исследуемых образцах.
- Для этих реакций используют специальные компоненты конъюгированные («сшитые») с меткой (конъюгат)
- В качестве меток могут быть использованы различные ферменты, красители- флюорохромы и изотопы.

Неизвестный образец фиксируется на пленке
(может содержать или не содержать искомые антигены)

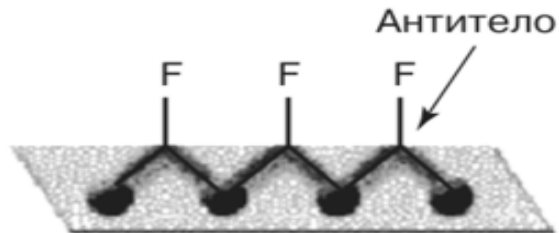
Антиген присутствует на пленке



Антиген отсутствует на пленке



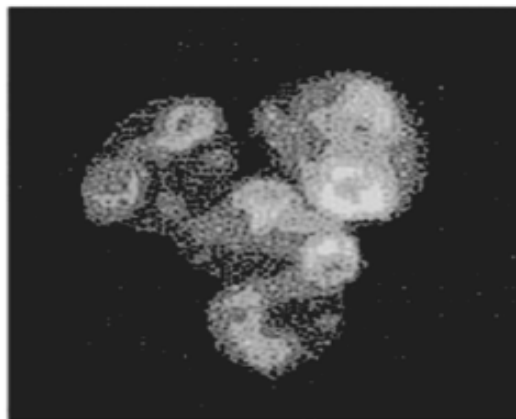
На пленку наносят меченные флуоресцином антитела к искомому антигену (дается время на протекание реакции связывания)



Несвязавшиеся антитела
смывают



Пленки просматривают под флуоресцентным микроскопом



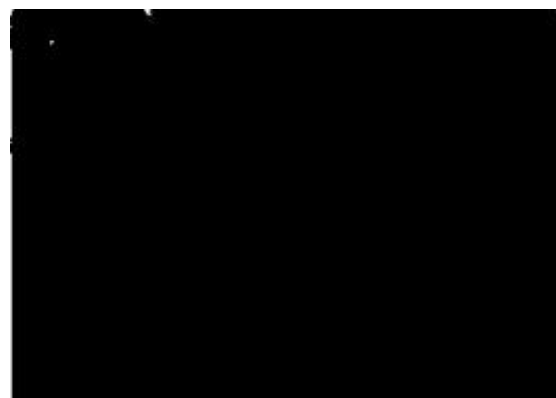
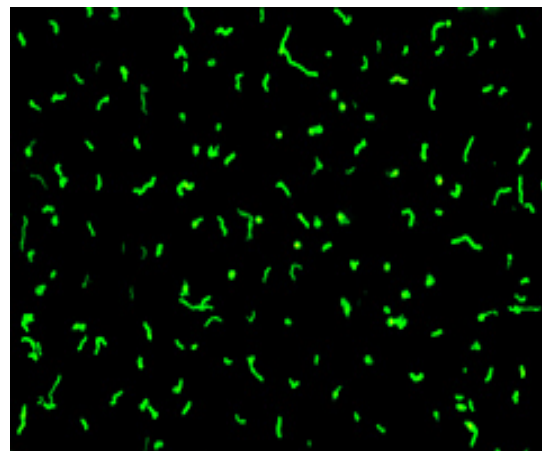
Положительный результат –
зеленая флуоресценция



Отрицательный результат –
отсутствие флуоресценции

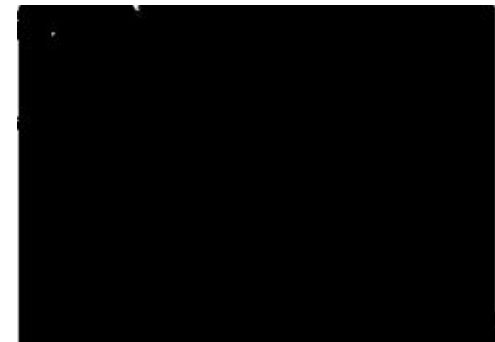
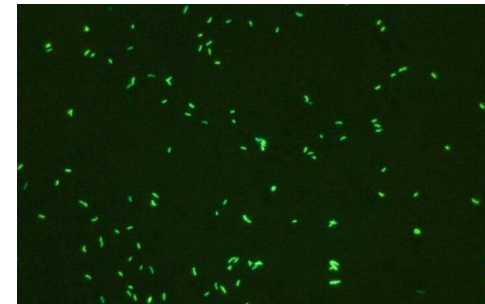
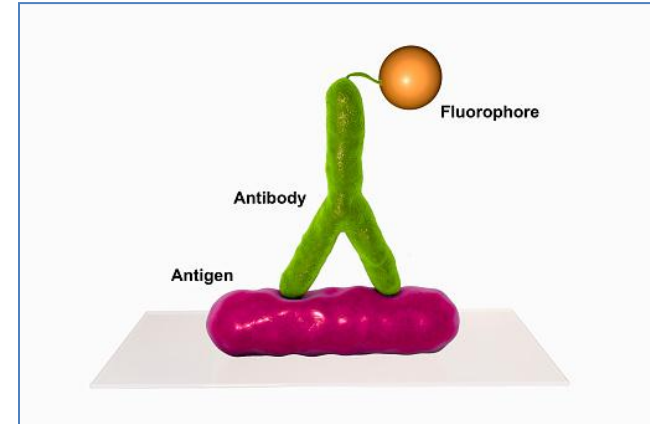
Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)

- Реакция Кунса основана на применении антител, меченных флюорохромными красителями.
- Такие антитела связывая различные антигены, вызывают свечение иммунных комплексов в УФ-лучах люминесцентного микроскопа.
- Реакция Кунса является методом экспресс-диагностики для выявления антигенов микробов или определения антител. На практике применяют несколько вариантов РИФ.



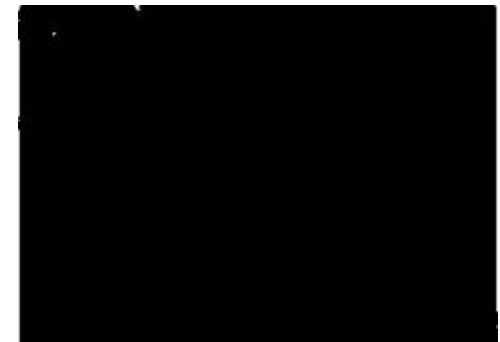
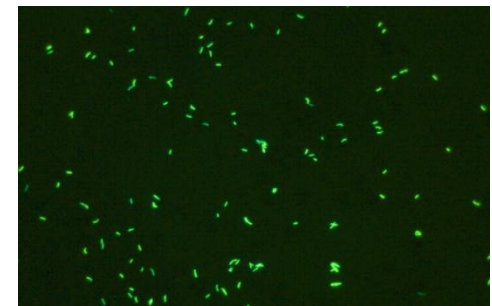
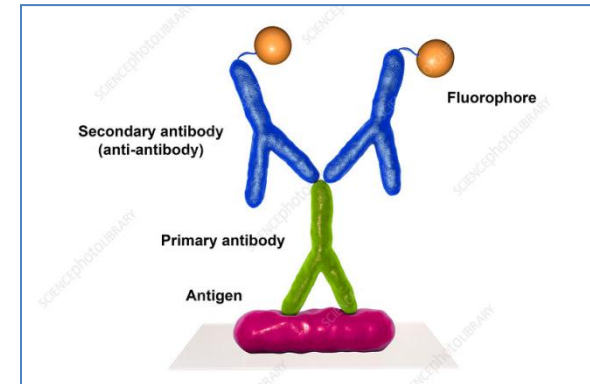
РИФ (прямой метод)

- **Прямой метод** РИФ основан на том, что антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками с антителами, меченными флюорохромами, способны светиться в УФ-лучах люминесцентного микроскопа.
- После химической фиксации приготовленного мазка к нему добавляют флюоресцирующую сыворотку и после инкубации тщательно отмывают
- **При положительном результате** бактерии в мазке, обработанные такой люминесцирующей сывороткой, светятся по периферии клетки в виде каймы зеленого цвета.
- **При отрицательной реакции** под микроскопом виден темный препарат, так как меченые антитела не комплементарные исследуемому антигену не фиксируются и смываются при отмывке



Непрямой метод (РНИФ)

- **Непрямой метод РИФ** заключается в выявлении комплекса антиген–антитело с помощью антиглобулиновой (против антитела) сыворотки, меченной флюорохромом.
- Для этого мазки обрабатывают антителами антимикробной кроличьей диагностической сыворотки. Затем антитела, не связавшиеся с антигенами микробов, отмывают, а оставшиеся на микробах антитела выявляют, обрабатывая мазок антиглобулиновой (антикроличьей) сывороткой, меченной флюорохромами.
- В результате образуется комплекс микроб + антимикробные кроличьи антитела + антикроличьи антитела, меченные флюорохромом. Этот комплекс наблюдают в люминесцентном микроскопе, как и при прямом методе.



Иммуноферментный анализ (ИФА)

- Метод ИФА позволяет обнаруживать антигены с помощью меченых ферментами антител. Наиболее часто для этого используют пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и β -галактозидазу
- Специфические антитела связываются с антигеном в результате образуется комплекс антиген-антитело который выявляют посредством фермента
- Для индикации фермента добавляют субстрат который расщепляется ферментом и хромоген. При положительной реакции субстрат разрушается, хромоген меняет свой цвет. Результат анализа регистрируют визуально или считывают с помощью спектрофотометра
- При **твердофазном варианте РИА** один из компонентов реакции (антиген или антитела) сорбирован на твердом носителе, например в лунках микропанелей из полистирола.

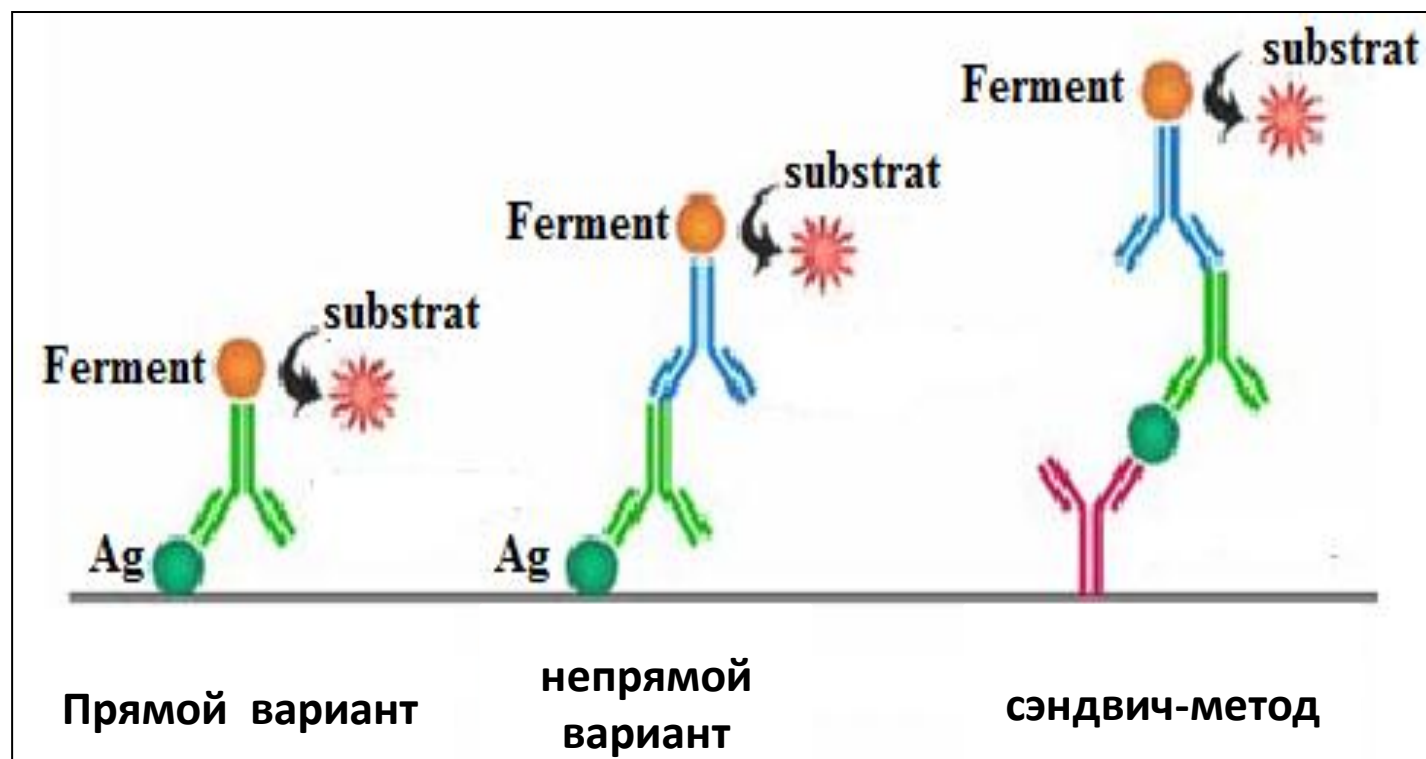
Твердофазный ИФА

- При определении антител в лунки планшеток с сорбированным антигеном последовательно добавляют сыворотку крови больного, антиглобулиновую (противочеловеческую) сыворотку, меченную ферментом, и субстрат (хромоген) для фермента. Каждый раз после добавления очередного компонента из лунок удаляют несвязавшиеся реагенты путем тщательного промывания. При положительном результате изменяется цвет раствора хромогена. Твердофазный носитель можно сенсibilизировать не только антигеном, но и антителами. Тогда в лунки с сорбированными антителами вносят искомый антиген, добавляют иммунную сыворотку против

Твердофазный ИФА (сэндвич-метод)

- На дно лунок адсорбируют известные антитела
- **Сэндвич метод** используют для определения антигена, в лунки последовательно добавляют материал больного (антиген), меченые ферментом антитела к антигену и субстрат хромоген.
- В случае положительной реакции в лунке находится фермент, наличие которого регистрируют по изменению цвета хромогена

Схема твердофазного иммуноферментного анализа



Техника иммуноферментного анализа

В настоящее время в продаже имеются наборы оборудования и реагентов, используемых для диагностики каждого заболевания



Техника иммуноферментного анализа

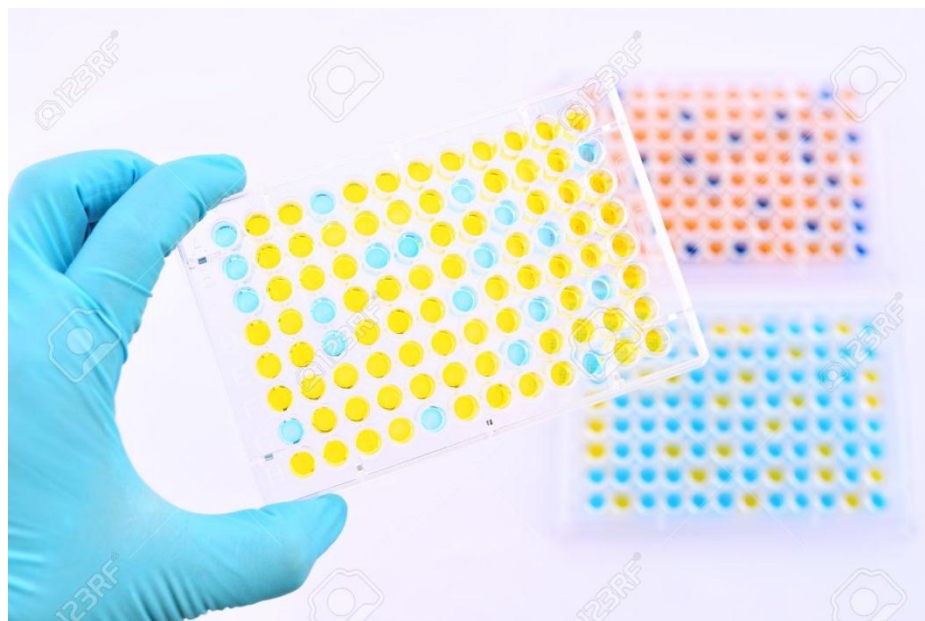
В специальном буферном растворе готовят определенные разведения исследуемого материала. Материал из каждого разведения вносят в две лунки планшета (известный антиген или известное антитело сорбированы в лунку этого планшета) и инкубируют в термостате при 37°C в течение 1-3 часов.

После инкубации лунки планшета тщательно промывают специальным буферным раствором для удаления не связавшегося антигена или антител. Затем в лунки вносят по 0,1 мл рабочего разведения меченого ферментом антитела или меченого ферментом антиглобулина в буферном растворе против искомого антигена, инкубируют в термостате при 37°C в течение 2 часов, промывают 3 раза буферным раствором для удаления несвязанных конъюгаты.

После этого в лунки вносят смесь субстрата (H_2O_2) и хромогена (например, ортофенилдиамина) в объеме 0,1 мл, выдерживают в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин. В процессе инкубации фермент (пероксидаза), связанный со стенкой лунок, разлагает субстрат (H_2O_2) на атомарный кислород, который окисляет хромоген и меняет его цвет (образуется желтая окраска). Стоп-реагент (0,1 мл 1 н. H_2SO_4 , или 1 н. NaOH) добавляют в лунки для остановки реакции разложения субстрата.

ИФА(оценка результатов)

- Оценку реакции можно провести невооруженным глазом. Для этого достаточно сравнить изменение цвета реакции с контролем. Отмечают наибольшее разведение материала, интенсивность цвета при котором более выражена чем интенсивность в соответствующем разведении контроля.
- Для более точной оценки реакции используется фотоколориметрический метод
- За положительный результат принимается максимальное разведение исследуемого материала, уровень экстинкции которого в 2 раза превышает таковой в контрольном разведении.



ИФА (оценка результатов)

В настоящее время широко используются микропланшетные фотомеры (ридеры), которые позволяют автоматически оценивать результат



Фотометр для микропланшетов
(STAT FAX®)

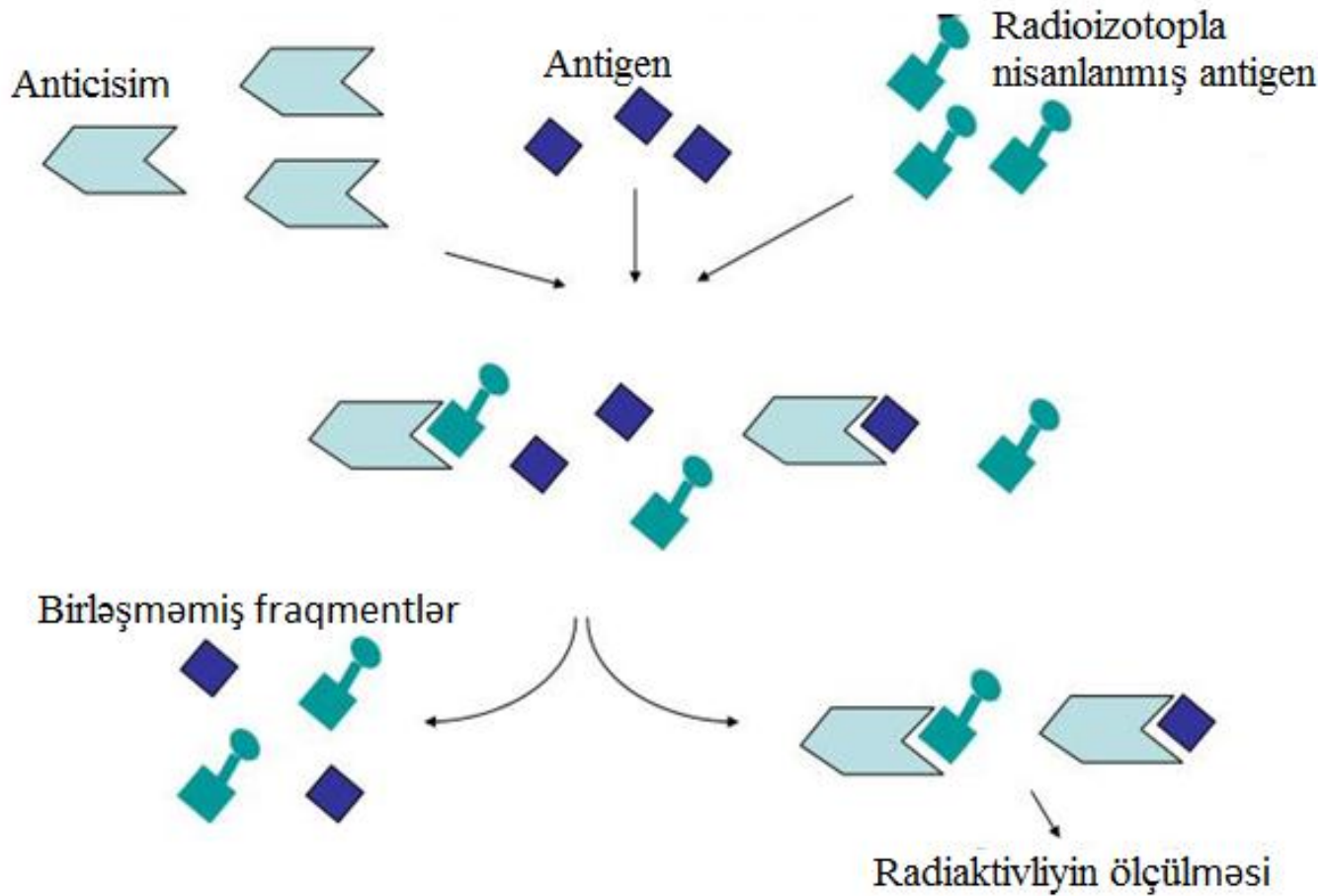
Радиоиммунологический метод (РИМ)

- Высокочувствительный метод, основанный на реакции антиген–антитело с применением антигенов или антител, меченных радионуклидом (^{125}I , ^{14}C , ^3H и др.). После их взаимодействия отделяют образовавшийся радиоактивный иммунный комплекс и определяют его радиоактивность в соответствующем счетчике (β - или γ -излучение): интенсивность излучения прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.

Радиоиммунологический метод (РИМ)

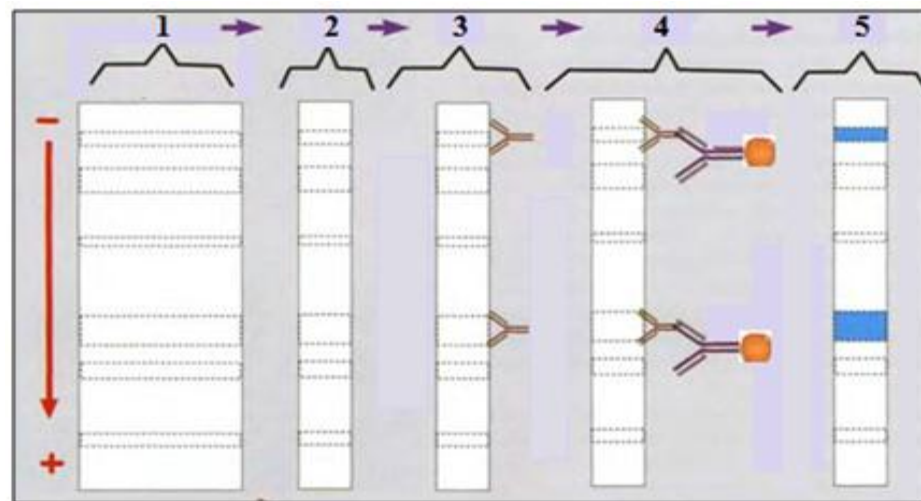
- При *твердофазном варианте радиоиммунного анализа (РИА)* один из компонентов реакции (антиген или антитела) сорбирован на твердом носителе, например в лунках микропанелей из полистирола.
- Другой вариант метода — **конкурентный РИА**: искомый антиген и меченный радионуклидом антиген конкурируют друг с другом за связывание ограниченного количества антител иммунной сыворотки. Этот вариант используют для определения количества антигена в исследуемом материале.

Конкурентный РИА



Иммуноблоттинг

ИБ, вестернблоттинг — высокочувствительный метод, основанный на сочетании электрофореза и ИФА или РИА. Антигены разделяют по молекулярной массе с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, затем осуществляют блоттинг (от англ. *blot* — пятно), т.е. перенос антигенов из геля на нитроцеллюлозную мембрану, и проявляют невидимые «блоты» антигенов с помощью антител, меченных ферментами (ИФА). Фирмы выпускают такие полоски с «блотами» антигенов. На эти полоски наносят сыворотку больного. Затем после инкубации отмывают от несвязавшихся антител больного и наносят сыворотку против иммуноглобулинов человека, меченную ферментом. Образовавшийся на полоске комплекс (антиген + антитело больного + антитело против Ig человека) выявляют добавлением субстрата/хромогена, изменяющего окраску под действием фермента.



Генная инженерия

- В основе **генной инженерии** лежит перенос ДНК в прокариотические и эукариотические клетки после ее расщепления на нуклеотидные последовательности. В результате такие клетки-**гибриды**, имеющие фрагменты чужеродного гена, обеспечивают экспрессию переносимого гена. Одной из конечных целей генной инженерии является получение продукта или сигнала, кодируемого определенным геном в организме реципиента.



Генная инженерия (получение гена)

- Для этого сначала получают или синтезируют ген (молекулу ДНК), кодирующий продукт или свойство. После этого молекула ДНК расщепляется на фрагменты с помощью ферментов, называемых рестриктазами.
- Этот фермент относится к эндонуклеазам и обладает способностью расщеплять молекулу ДНК только в определенных местах.
- Фрагменты молекулы ДНК, полученные под действием ферментов рестрикции, называются рестриктами. При необходимости возможно также соединение концов рестриктов с помощью ДНК-лигаз.

Генная инженерия (трансфер генов)

- Фрагменты ДНК присоединяют к вектору. Вектор — это агент, который переносит фрагмент чужеродной ДНК в клетку-реципиент.
- В качестве векторов чаще всего используются плазмиды, фаги или их комбинации - космиды и фазмиды.
- Для переноса рекомбинантной ДНК (рДНК) в клетку-реципиент используются методы трансформации, трансфекции и микроинъекции.

Генная инженерия (трансфер генов)

- Путем **естественной трансформации** рДНК может быть перенесена в некоторые штаммы *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae* и *E.coli*.
- Перенос рДНК в прокариотические и эукариотические клетки с помощью фага называется трансфекцией. В некоторых случаях они заражают эукариотические клетки векторным вирусом. При этом в качестве векторов чаще всего используются вирусы полиомы и SV-40.
- Методом **микроинъекций** переносится молекула ДНК, а также рДНК в культивируемые клетки животных и растений с помощью стеклянных микроигл.
- рДНК также может быть перенесена в клетки-реципиенты с помощью **липосом**. Липосомы готовят на основе равной смеси фосфатидилсерина и холестерина. Для этого смесь рДНК и липосом обрабатывают ультразвуком, а затем инкубируют ее с реципиентной клеткой.

Генная инженерия (получение конечного продукта)

- рДНК переносится в клетки-реципиенты, называемые ***пермиссивными клетками***. Эти клетки представляют собой такие клетки, в которых перенесенная рДНК остается в составе этой клетки без расщепления и возможна репликация вектора, другими словами, наблюдается экспрессия рДНК.
- Из прокариотов часто используются E.coli и B.subtilis а из эукариотов - Saccharomyces cerevisiae.
- В настоящее время для синтеза инсулина, соматотропного гормона, интерферонов, интерлейкинов и др. на основе экспрессии соответствующих генов в рДНК получены и используются в биотехнологии суперпродуценты бактерии и дрожжи.

Современные возможности генной инженерии

- Удалось получение **трансгенных животных** путем микроинъекции рДНК в половые клетки (или яйцеклетки). Благодаря наличию в геноме таких организмов определенных генов донора они приобретают новые характеристики.
- Таким же путем были получены **трансгенные растения**, устойчивые к фитопатогенным микроорганизмам, холоду и т. д. Сорта фруктов и моркови, содержащие определенные «вакцины», были получены путем переноса в растения генов иммунодоминантных антигенов некоторых микроорганизмов.
- Одним из последних успехов генетики является создание **генетических клонов**, то есть **генетических копий**. Генетическое клонирование впервые было создано в конце прошлого века шотландскими учеными Яном Велмутом и Кеном Кэмпбеллом.

Применение генетических методов в диагностике инфекционных болезней

- Полимеразная цепная реакция
- Метод молекулярной гибридизации
- Рестрикционный анализ
- Секвенирование

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

- ПЦР позволяет обнаружить ДНК или РНК микробов в исследуемом материале путем их накопления. Метод ПЦР обладает высокой чувствительностью, позволяющей определить наличие в изучаемой пробе молекулы ДНК или РНК. ПЦР проводят в специальных программированных аппаратах.
- Выделенную из исследуемого материала ДНК нагревают при 92-96 °С (в случае применения термостабильной *Taq*-полимеразы прогревают до 98°C). Тепловая денатурация приводит к разведению двух цепей двойной спирали. С целью полной денатурации компонентов прогревание проводят в течение 2-5 минут.
- Затем добавляют праймеры и полимеразу, и при наличии в смеси ДНК искомого гена, праймеры связываются с его комплементарными участками. В результате синтезируются две копии гена, после чего цикл повторяется снова, при этом количество ДНК гена будет увеличиваться каждый раз вдвое (амплификация)
- Специфический продукт ПЦР идентифицируется электрофорезом

ПЦР в реальном времени

- **ПЦР в реальном времени (*real time PCR*)**
ускоренный метод, при котором амплификация и определение продукта амплификации проводятся одновременно.
- Позволяет проводить мониторинг и количественный анализ накопленных продуктов ПЦР, и регистрировать и интерпретировать полученный результат в автоматическом режиме.
- Метод позволяет обнаружить даже одну молекулу ДНК или РНК
- Полученную информацию можно использовать для контроля эффективности лечения

Принцип амплификации

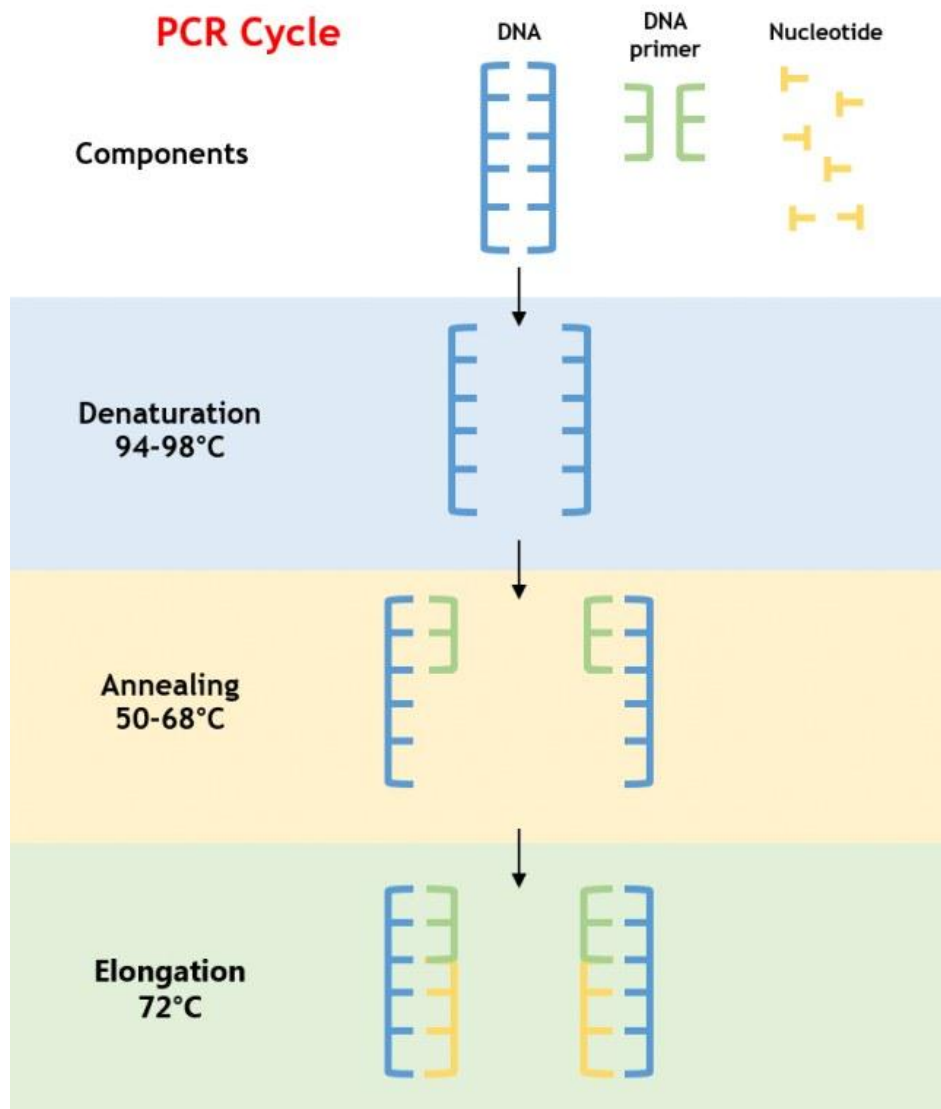
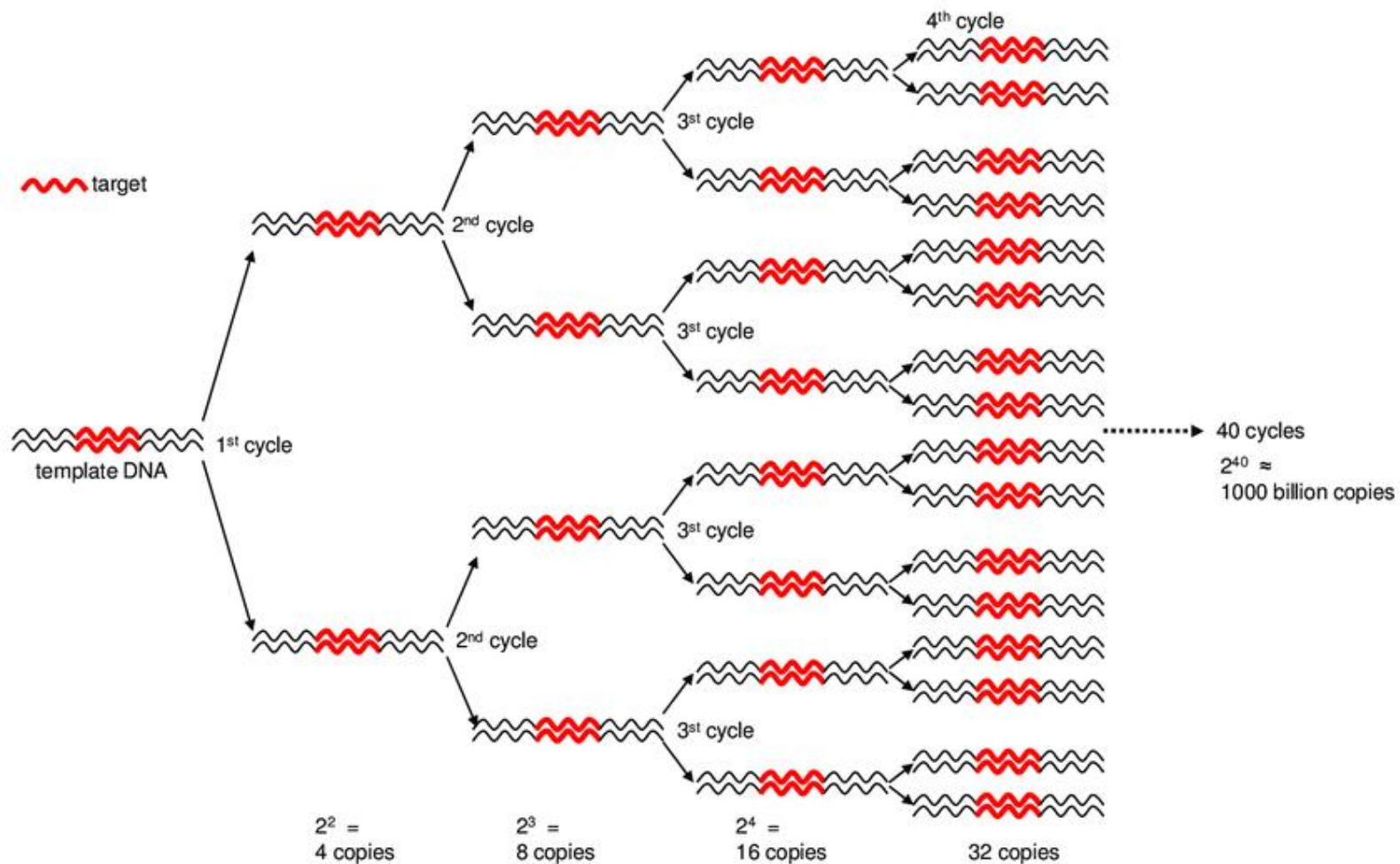
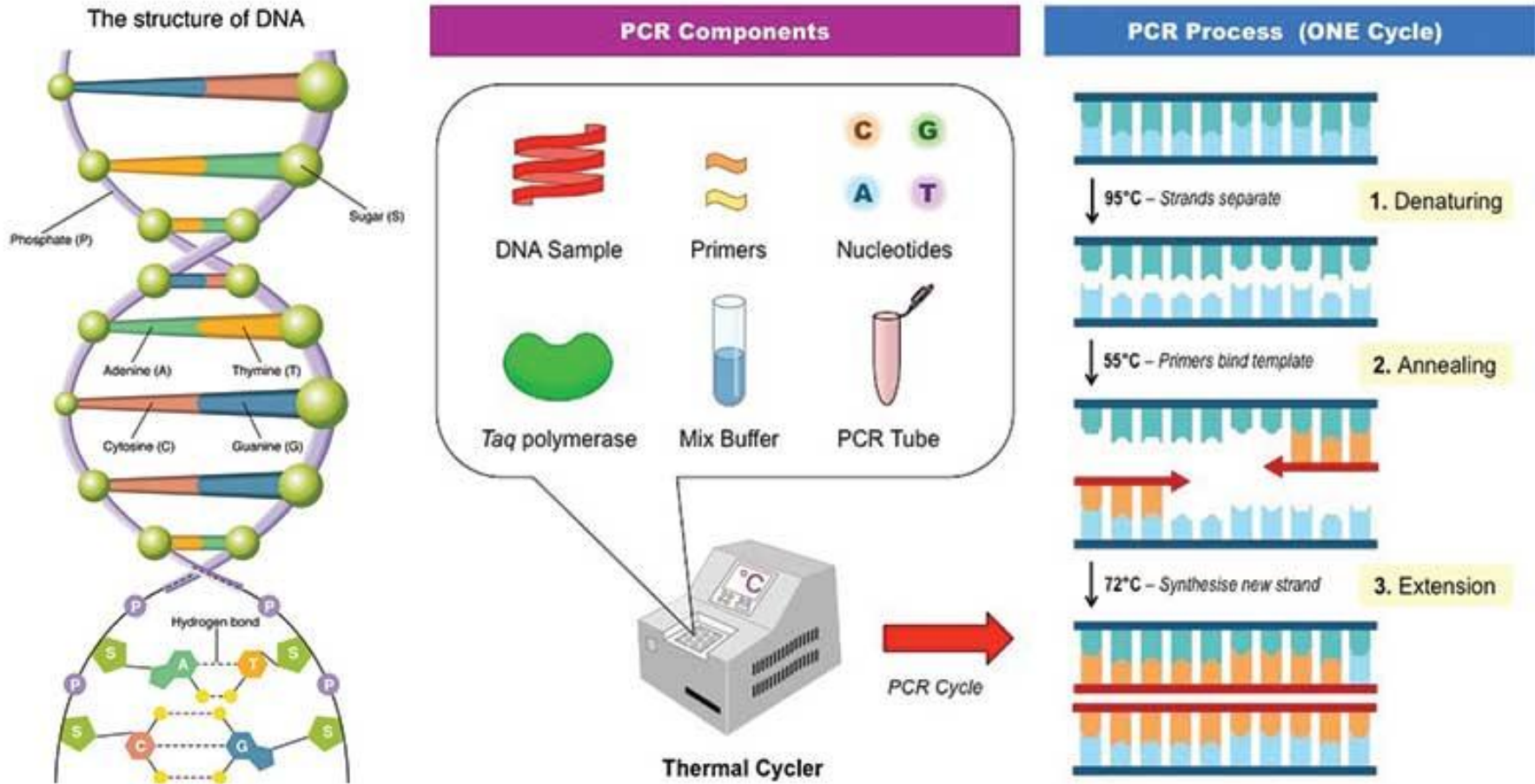


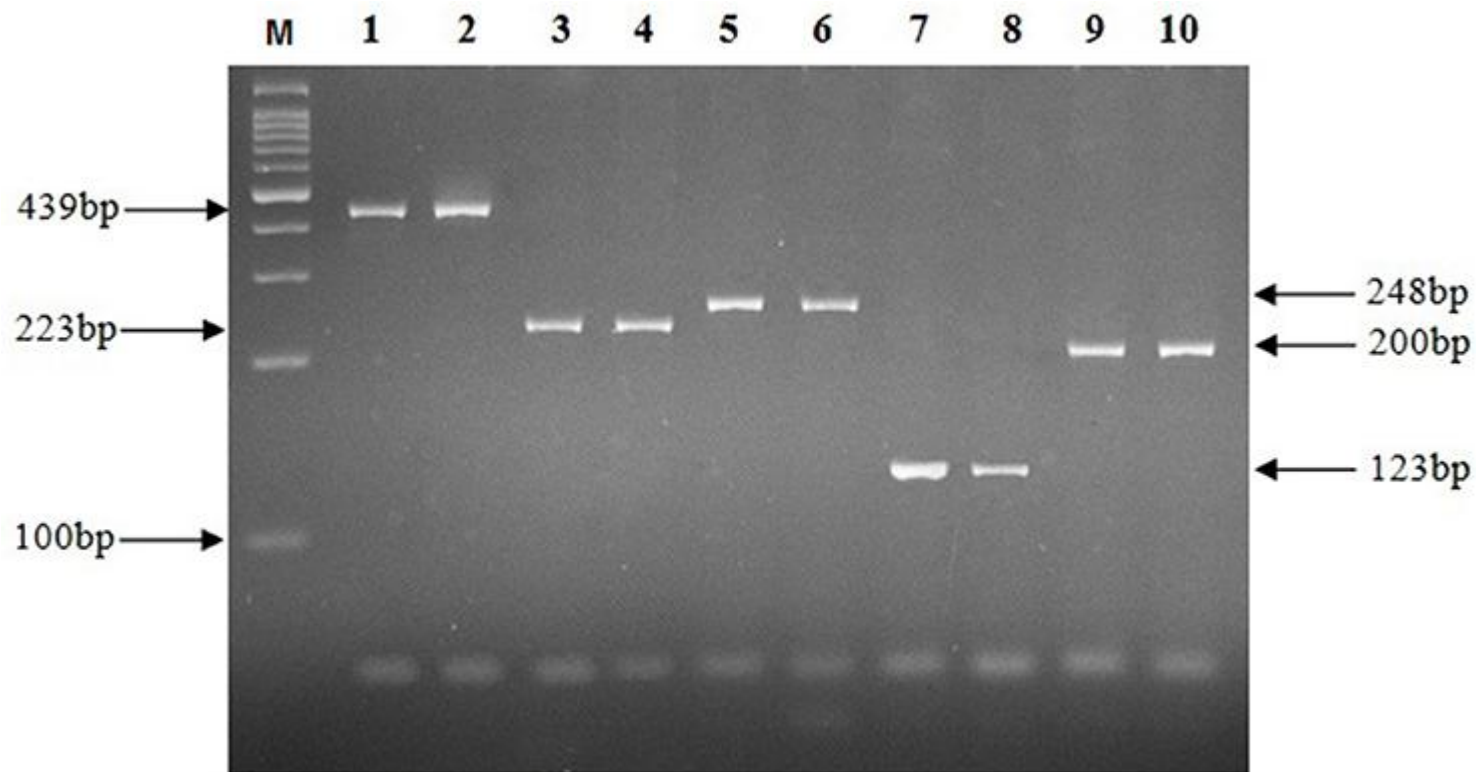
Схема амплификации



Принцип полимеразной цепной реакции

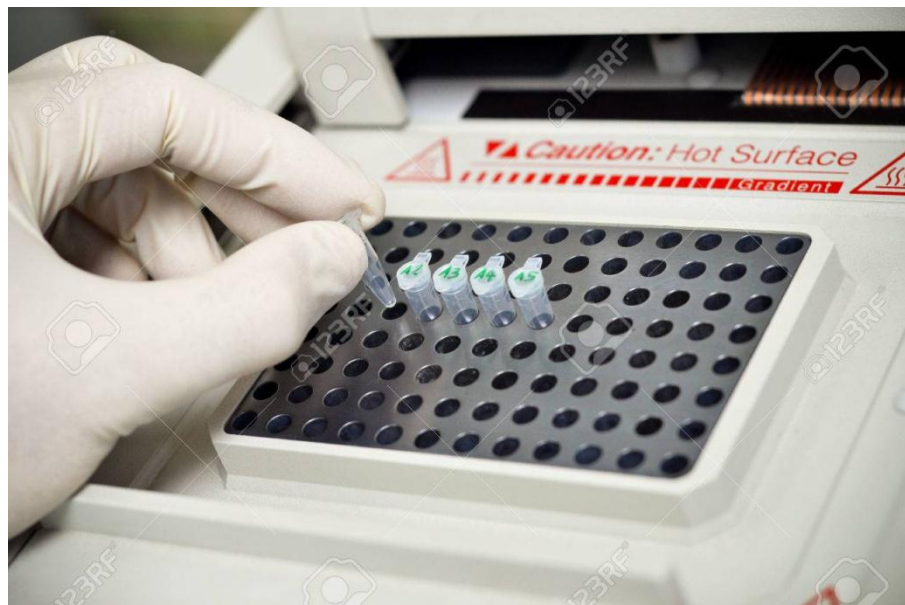


Электрофоретическая идентификация ДНК (электрофорез в 2%- агарозном геле)



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

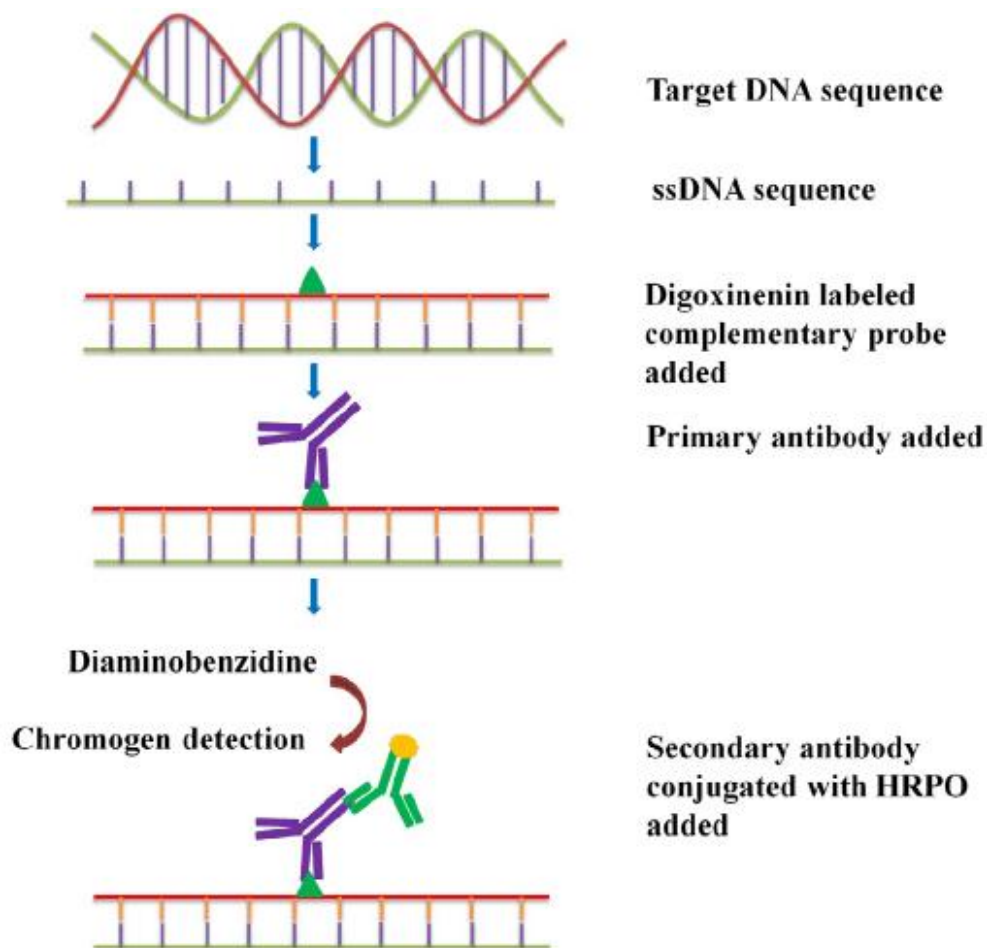
ПЦР амплификатор



Метод молекулярной гибридизации

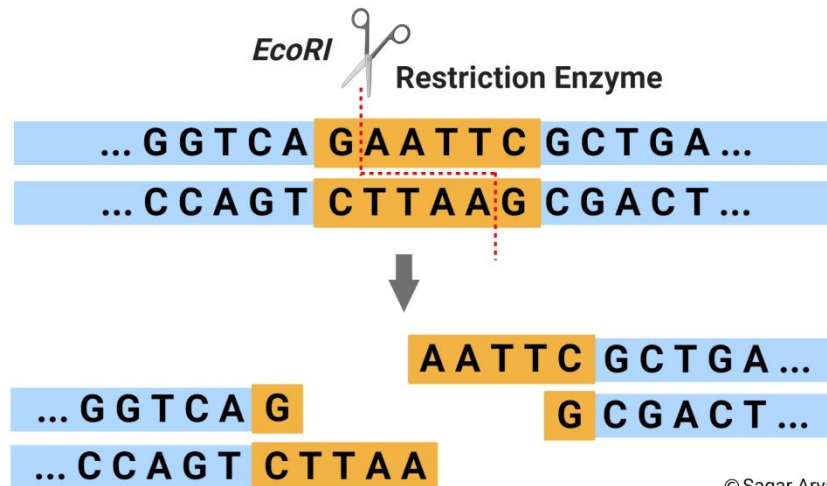
- Позволяет обнаружить нуклеиновые кислоты в исследуемом материале при помощи зондов, меченных радиоактивными изотопами или ферментами
- В качестве зонда используют одноцепочечную молекулу нуклеиновой кислоты, меченную радиоактивными нуклидами с которой сравнивают исследуемую ДНК
- В случае наличия комплементарности между зондом и исследуемой ДНК они образуют между собой двойную спираль (гибридизация)
- Локализацию молекулярных гибридов определяют иммуноферментным или радиоиммунным методом.

Схема гибридизации ДНК



Рестрикционный анализ

- **Рестрикционный анализ** в основном используется при идентификации микроорганизмов.
- Принцип метода заключается в идентификации расщепленных рестриктазами фрагментов ДНК с помощью электрофореза.
- **Рестриктазы** - это эндонуклеазы расщепляющие молекулы ДНК путем разрыва фосфатных связей в определенных последовательностях нуклеотидов.
- Размер рестрикционных фрагментов можно узнать с помощью электрофореза в агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Мелкие и крупные фрагменты ДНК перемещаются в геле с разной скоростью, что таким образом можно получить рестрикционную карту определённого вида микробов



Секвенирование

Секвенирование позволяет определить нуклеотидную последовательность ДНК (от англ, *sequence* – последовательность).

Наиболее распространенным является **метод Сэнгера**. Вначале исследования молекулу исследуемой ДНК расщепляют щелочным гидролизом на цепочки различной длины.

К полученной смеси присоединяют меченые дидезоксинуклеотиды (аденин, тимин, гуанин и цитозин), которые присоединяются к комплементарным нуклеотидам на 3'-конце фрагмента ДНК. Таким образом, образуется набор фрагментов ДНК разной длины, которые заканчиваются соответствующим дидезоксинуклеотидом.

- Полученные меченые фрагменты ДНК разделяют в полиакриламидном геле (с точностью до одного нуклеотида), проводят радиоавтографию и по картине распределения фрагментов в четырех пробах устанавливают нуклеотидную последовательность ДНК
- Проводят сравнение полученных результатов секвенирования с помощью специальных программ с результатами, имеющимися в базе данных

Секвенирование методом Сэнгера

