


МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Тульский государственный университет»

Медицинский институт
кафедра Санитарно-гигиенических и профилактических дисциплин

Утверждено на заседании кафедры
«СГ и ПД»
«22» января 2024 г., протокол № 6

Заведующий кафедрой

 Т.В.Честнова

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по самостоятельной работе
по дисциплине (модулю)
«Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - анализ в лабораторной
практике»

основной профессиональной образовательной программы
высшего образования – программа подготовки кадров высшей
квалификации - ординатура


по направлению подготовки (специальности)
31.08.05 – Клиническая лабораторная диагностика

Идентификационный номер образовательной программы: 310805-01-24

Тула 2024 год


Разработчик(и) методических указаний

Честнова Т.В., зав. кафедрой, д.б.н., доцент
(ФИО, должность, ученая степень, ученое звание)



(подпись)

Игнаткова А.С., доцент, к.м.н.
(ФИО, должность, ученая степень, ученое звание)



(подпись)

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА ОРДИНАТОРА

№№	Темы, выносимые для самостоятельного изучения
1.	Современный иммунохимический анализ. Общая характеристика иммуноферментного анализа, преимущества и недостатки фермент-зависимых меток. Области применения ИФА.
2.	Антигены. Структурные основы антигенной специфичности белков, полисахаридов, нуклеиновых кислот. Гаптены. Использование гаптенных для изучения специфичности антигенных детерминант, работы К. Ландштейнера. Требования, предъявляемые к антигенам, использующимся в ИФА в качестве меченых препаратов и стандартов.
3.	Антитела. Общая характеристика структуры молекул иммуноглобулинов. Первичная структура H- и L-цепей иммуноглобулинов. Трехмерная структура иммуноглобулинов. Антигенсвязывающие центры антител. Характеристика классов иммуноглобулинов: IgG, IgA, IgM, IgE, IgD. Специфичность и гетерогенность антител, перекрестная реактивность. Понятие аффинности и авидности антител.
4.	Термодинамические и кинетические закономерности реакции взаимодействия антиген-антитело.
5.	Методы определения аффинности антител: равновесный диализ, фракционное осаждение, флуоресцентные методы.
6.	Способы расчета констант комплексообразования реакции антиген-антитело: взаимодействие одной субпопуляции антител с моновалентным антигеном; взаимодействие одной субпопуляции антител с поливалентным антигеном; взаимодействие двух субпопуляций антител с моновалентным антигеном; взаимодействие поликлональной антисыворотки с антигеном.
7.	Основные понятия и термины, используемые в энзимологии. Физико-химические и каталитические свойства ферментов.
8.	Кинетические закономерности протекания ферментативных реакций. Экспериментальные методы определения ферментативной активности. Критерии выбора ферментных меток.
9.	Характеристика ферментов, используемых в ИФА в качестве меток: пероксидаза хрена, глюкозооксидаза, щелочная фосфатаза, β -D-галактозидаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа. Факторы, влияющие на активность ферментов при проведении ИФА.
10.	Получение антител. Иммуногенность антигенов. Антисыворотки как источники поликлональных антител. Иммунизация, факторы, влияющие на успех иммунизации: природа и доза иммуногена, использование адъюванта, вид взятых для иммунизации животных, способ иммунизации, порядок и время введения антигена и сбора антисыворотки.

11.	Хранение антисывороток. Тестирование антисывороток. Моноклональные антитела. Получение гибридом. Использование моноклональных антител в иммуноанализе.
12.	Выделение и очистка антител из различных источников: осаждение сульфатом аммония, хроматография, иммуноадсорбция. Получение иммобилизованных антител и антигенов: носители, применяемые в ИФА; иммобилизация антител и антигенов; неспецифическое связывание с иммуносорбентом. Свойства иммобилизованных антител. Получение конъюгатов: синтез конъюгатов гаптен с носителями для получения антител; получение конъюгатов фермент-белок; получение конъюгатов гаптен-фермент; получение конъюгатов антигенов (антител) с субстратами.
13.	Направления и перспективы развития ИФА.
14.	Анализ результатов определения антигена. Особенности анализа экспериментальных данных определения антител. Источники ошибок при проведении ИФА. Параметры, характеризующие ИФА: предел обнаружения, длительность, точность и специфичность. ИФА в диагностике гормональных заболеваний. ИФА в диагностике аллергических заболеваний.
15.	Синтетические олигонуклеотиды. Состав буфера. Роль ионов магния. Дезоксинуклеотидтрифосфаты.
16.	Подготовка к зачету.

Перечень контрольных вопросов усвоения темы.

Тема 1. Современный иммунохимический анализ.

1. Общая характеристика иммуноферментного анализа
2. Преимущества и недостатки фермент-зависимых меток.
3. Область применения ИФА.

Тема 2. Структура и свойства антигенов.

1. Понятие антигена
2. Свойства антигенов.
3. Классификация антигенов.
4. Гаптены. Использование гаптенов для изучения специфичности антигенных детерминант, работы К. Ландштейнера.
5. Требования, предъявляемые к антигенам, используемым в ИФА в качестве меченых препаратов и стандартов.

Тема 3. Структура и свойства антител.

1. Определение антител.
2. Общая характеристика структуры молекул иммуноглобулинов. Первичная структура Н- и L-цепей иммуноглобулинов. Трехмерная структура иммуноглобулинов. Антигенсвязывающие центры антител.
3. Свойства антител. Понятие аффинности и авидности антител.
4. Характеристика классов иммуноглобулинов: IgG, IgA, IgM, IgE, IgD.
5. Специфичность и гетерогенность антител, перекрестная реактивность.

Тема 4. Термодинамические и кинетические закономерности реакции взаимодействия антиген-антитело.

1. Иммунологическая специфичность.
2. Аффинность АТ
3. Авидность АТ
4. Равновесная константа образования иммунокомплекса
5. Методы, определяющие концентрацию свободного и связанного АГ.

Тема 5. Методы определения аффинности антител

1. Равновесный диализ
2. Фракционное осаждение
3. Флюоресцентные методы.

Тема 6. *Способы расчета констант комплексообразования реакции антиген-антитело*

1. Расчет констант взаимодействия одной субпопуляции антител с моновалентным антигеном.
2. Расчет констант взаимодействия одной субпопуляции антител с поливалентным антигеном.
3. Расчет констант взаимодействия двух субпопуляций антител с моновалентным антигеном.
4. Расчет констант взаимодействия поликлональной антисыворотки с антигеном.

Тема 7. *Энзимология.*

1. Основные понятия и термины, используемые в энзимологии.
2. Физико-химические свойства ферментов.
3. Каталитические свойства ферментов.

Тема 8. *Кинетические закономерности протекания ферментативных реакций.*

1. Экспериментальные методы определения ферментативной активности.
2. Критерии выбора ферментных меток.

Тема 9. *Характеристика ферментов, используемых в ИФА в качестве меток.*

1. Пероксидаза хрена
2. Глюкозооксидаза
3. Щелочная фосфатаза
4. β -D-галактозидаза
5. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа.
6. Факторы, влияющие на активность ферментов при проведении ИФА.

Тема 10. *Получение реагентов для ИФА*

1. Получение антител.
2. Иммуногенность антигенов.
3. Антисыворотки как источники поликлональных антител.
4. Иммунизация, факторы, влияющие на успех иммунизации: природа и доза иммуногена, использование адъюванта, вид взятых для иммунизации животных, способ иммунизации, порядок и время введения антигена и сбора антисыворотки.

Тема 11. *Получение реагентов для ИФА*

1. Хранение антисывороток.
2. Тестирование антисывороток.
3. Моноклональные антитела.
4. Получение гибридом.
5. Использование моноклональных антител в иммуноанализе.

Тема 12. Методы ИФА

1. Выделение АТ с помощью осаждения сульфата аммония
2. Хроматография
3. Иммуноадсорбция.
4. Носители, применяемые в ИФА
5. Иммобилизация антител и антигенов; неспецифическое связывание с иммуносорбентом.
6. Свойства иммобилизованных антител.
7. Получение конъюгатов: синтез конъюгатов гаптен с носителями для получения антител; получение конъюгатов фермент-белок; получение конъюгатов гаптен-фермент; получение конъюгатов антигенов (антител) с субстратами.

Тема 13. Направления и перспективы развития ИФА.

1. ИФА в диагностике гормональных заболеваний
2. ИФА в диагностике аллергических заболеваний
3. ИФА в диагностике инфекционных заболеваний
4. ИФА в диагностике онкомаркеров.

Тема 14. Методы представления и обработки экспериментальных данных

1. Анализ результатов определения антигена.
2. Особенности анализа экспериментальных данных определения антител.
3. Источники ошибок при проведении ИФА.
4. Параметры, характеризующие ИФА: предел обнаружения, длительность, точность и специфичность.

Тема 15. Основные компоненты реакционной смеси ПЦР.

1. Синтетические олигонуклеотиды (праймеры).
2. Состав буфера.
3. Роль ионов магния.
4. Дезоксинуклеотидтрифосфаты (dНТФ).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики : для врачей и фельдшеров, оказыв. первичную мед.-санитарную помощь / А.А.Кишкун .— М. : ГЭОТАР-Медиа, 2007 .— 800с. — ISBN 5-9704-0316-4 /в пер.
2. Меньшиков В.В. Руководство по клинической лабораторной диагностике / под ред.В.В.Меньшикова.— М.: Медицина, 1982 .— 576с. : ил. —Библиогр.в конце кн. — ISBN /в пер.
3. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т. Т.1 .— Минск: Беларусь, 2000 .— 495с. : ил. — /в пер.
4. Карпищенко А.И. Медицинская лабораторная диагностика: Программы и алгоритмы : справочник / А.М.Чайка, А.И.Карпищенко, А.А.Бутко и др.; Под ред.А.И.Карпищенко .— СПб. : Интермедика, 1997 .— 304 с. : ил.
5. Цынко Т.Ф. Диагностика заболеваний по анализам крови и мочи / Авт.-сост.Цынко Т.Ф. — 2-е изд. — Ростов-н/Д : Феникс, 2002 .— 128с. — (Медицина для вас).— Библиогр.в конце кн. — ISBN 5-222-02753-8
6. Финогеев Ю.П. Клинико-лабораторная диагностика инфекционных болезней: Руководство для врачей / Ю.П.Финогеев, Ю.В.Лобзин, Ю.А.Винакмен и др.; Под общ.ред. Ю.В.Лобзина .— СПб. : Фолиант, 2001 .— 384с. — Библиогр.в конце кн. — /В пер./:130р.
7. Вахрушев Я.М. Лабораторные методы диагностики : учеб. пособие / авт.-сост. Я. М. Вахрушев, Е. Ю. Шкатова .— 2-е изд.— Ростов-н/Д : Феникс, 2007 .— 96 с. : ил.— (Медицина) .— Библиогр.: с. 94 .— ISBN 978-5-222- 12685-1.