

[Akceptuję](#)

W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej [Polityce Prywatności](#)

[Portal Informacje](#) [Katalog firm](#) [Praca](#) [Szkolenia](#) [Wydarzenia](#) [Porównania międzylaboratoryjne](#)
[Kontakt](#)



[Laboratoria](#)
[.net](#)
[Innowacje](#)
[Nauka](#)
[Technologie](#)

[Logowanie](#) [Rejestracja](#) [pl](#)

Newsletter

zapisz się



[Strona główna](#) > [Start](#)

Współczesna diagnostyka molekularna

Najmłodszą dziedziną diagnostyki laboratoryjnej jest diagnostyka molekularna, będąca najczulszą i najszybszą metodą, docierającą do pierwotnych przyczyn choroby. Materiałem do badań jest DNA i RNA

Diagnostyka molekularna znajduje szerokie zastosowanie w onkologii, w wykrywaniu chorób zakaźnych, w badaniach zgodności tkankowej w przypadku doboru dawców i biorców przeszczepów, identyfikacji przestępców czy ustalaniu ojcostwa. Głównym przedmiotem badań jest wykrywanie zmiany w obrębie materiału genetycznego osoby chorej w przypadku kiedy chorobę cechuje występowanie zmienionych pod wpływem mutacji fragmentów DNA lub wykrywania materiału genetycznego patogenu. Takim materiałem może być genom mikroorganizmu wywołującego chorobę. Metody stosowane w diagnostyce molekularnej można podzielić na dwie grupy:

- Pierwszą grupę stanowią techniki hybrydyzacji kwasów nukleinowych, które pozwalają na wykrycie i pomiar stężenia specyficznych sekwencji kwasu nukleinowego z wykorzystaniem znakowanej sondy DNA. W badaniach ilościowych nadmiar sondy ulega rozkładowi za pomocą nukleazy, a ilość sondy która nie uległa rozkładowi stanowi miarę stężenia badanej sekwencji. Do metod

hybrydyzacyjnych zaliczamy m.in.:

- Metodę Southerna, oparta na elektroforetycznym rozdziale fragmentów DNA, które potem przenosi się na filtr nitrocelulozowy i inkubuje z sondą znakowana DNA, co ma na celu wykrycie tych fragmentów DNA które są komplementarne do sondy
 - Metodę Northerna, będąca analogiczna metoda, z tym że analizie podawane jest RNA
 - Hybrydyzacje in situ w której badaną tkankę inkubuje się z sondą w postaci znakowanego kwasu nukleinowego. Nadmiar sądy odmywa się i określa lokalizację tej jej części, która uległa hybrydyzacji. Jest to metoda o wysokiej czułości i specyficzności, ale bardzo pracochłonna i wymagająca dużej wprawy.
- Drugą grupę stanowią metody pozwalające na analizę odcinków DNA powstałych po strawieniu enzymami restrykcyjnymi, które to enzymy rozpoznają w dwuniciowym DNA specyficzne sekwencje nukleotydowe i rozcinają obydwie nici DNA w ściśle określonych miejscach umiejscowionych w obrębie rozpoznanej sekwencji. Uzyskane w ten sposób fragmenty restrykcyjne można rozdzielić elektroforetycznie a następnie sporządzić mapę restrykcyjną pokazującą lokalizację miejsc rozcięcia. Mapy te umożliwiają porównanie dwóch cząsteczek DNA bez konieczności określania ich sekwencji nukleotydowych oraz umożliwiają tworzenie zrekombinowanych cząsteczek DNA in-vitro.

Do amplifikacji materiału genetycznego służą między innymi:

1. PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy)
2. LCR (ligazowa reakcja łańcuchowa)
3. Amplifikacja RNA

Sz szczególnie popularna jest technika PCR, opracowana przez Karla Mullisa, który w 1993 roku dostał Nagrodę Nobla za jej odkrycie. Jest to niezwykle prosta, ale i bardzo skuteczna metoda pozwalająca na wielokrotne powielenie dowolnej sekwencji DNA, ale pod warunkiem, że znane są sekwencje krótkich odcinków DNA po każdej stronie sekwencji przeznaczonej do powielania. Mieszanina reakcyjna PCR zawiera dwuniciowy odcinek DNA przeznaczony do powielania, startery hybrydujące z sekwencjami oskrzydłającymi, 4 trifosforany deoksyrybonukleozydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) oraz termostabilną polimerazę DNA, pochodzącą z bakterii termofilnych. PCR przeprowadza się w aparatach zwanych termocyklerami i składa się z trzech etapów:

1. Denaturacja, czyli rozplątywanie podwójnej nici DNA, co ułatwi starterom dostęp do nich. Proces denaturacji zachodzi w temperaturze 90°C, od kilkunastu do kilkudziesięciu sekund.
2. W drugim etapie temperaturę obniża się do 37-72°C, co umożliwia przyłączenia się starterów do pojedynczej nici DNA. Temperatura dobierana jest odpowiednio do używanych starterów.
3. Trzeci etap obejmuje dobudowanie przez polimerazę DNA brakujących nukleotydów co pozwala na odtworzenie dwuniciowej struktury DNA. Proces syntezy zachodzi w 72°C.

Każdy cykl składający się z trzech zmiany temperatury, pozwala na uzyskanie dwóch cząsteczek potomnych z jednej macierzystej cząsteczki DNA. Wydajność tej metody jest bardzo duża, ale nie może być ona bezpośrednio stosowana do badań ekspresji genów, czyli syntezy mRNA ani też do wykrywania patogenów, których materiałem genetycznym jest RNA. W takiej sytuacji stosuje się dodatkowy etap poprzedzający PCR - etap odwrotnej transkrypcji, w czasie którego na matrycy RNA powstaje komplementarny DNA. Diagnostyka immunochemiczna

W nowoczesnych metodach immunochemicznych wykorzystywane są reakcje antygen-przeciwciała. Do wytwarzania przeciwciał przeciwko oznaczanym substancjom, czyli antygenem, używa się gatunków heterologicznych (królik, mysz, świnka morska). W reakcji antygen - przeciwciała używane są przeciwciała poliklonalne i monoklonalne. Przeciwciała poliklonalne są produkowane przez różnorodne komórki, z tego powodu są immunochemicznie różne i reagują z kilkoma epitopami na antygenie. Natomiast przeciwciała monoklonalne produkowane z komórek myszy laboratoryjnych są identyczne immunochemicznie i reagują z jednym specyficznym epitopem na antygenie.

Nowoczesne metody immunochemiczne, charakteryzujące się wysoką czułością rzędu pikogram - nanogram/ml, można podzielić na :

- Metody radioimmunologiczne (RIA)
- Metody immunoenzymatyczne (EIA)
- Metody fluorescencyjne (FIA)
- Metody chemiluminescencyjne

Dodatkowo metody immunochemiczne mogą być:

- heterogenne (jedna z reakcji składowych jest związana z fazą stałą)
- homogenne (reakcja w całości przebiega w roztworze)
- kompetycyjne (przeciwciała reagują z oznaczanym antygenem w obecności znanej ilości antygenu znakowanego. Antygeny konkurują o ograniczoną ilość miejsc wiążących na powierzchni antygenu)
- niekompetycyjne (bezpośrednie, w których znakowany antygen poddaje się reakcji z badanym płynem ustrojowym zawierającym oznaczane przeciwciała)

Metody radioimmunologiczne (RIA) - izotopowe, oparte na pomiarze radioaktywności substancji znakowanej izotopem promieniotwórczym wchodzącej w skład reakcji antygen-przeciwciała. Znakowaniu można poddać antygen lub przeciwciała. Używa się izotopów: ^{125}J , ^{131}J oraz ^{14}C , ^3H . Do znakowania antygenów białkowych używa się jodu a do związków drobnocząsteczkowych - trytu lub węgla.

Metody fluorescencyjne (FIA) - nieizotopowe, w których stosuje się substancje inne niż izotopy, substancje fluoryzacyjne zwane fluoroforami np.: fluoresceina, rodamina, umbeliferon.

W przypadku tych metod stosuje się dwa rodzaje znaczników:

- Fluorofory bezpośrednio przyłączone do antygenu
- Enzym, którego aktywność oznacza się za pomocą produkty końcowego reakcji powodującego fluorescencje

Metody immunoenzymatyczne (EIA), w których antygen lub przeciwciała sprzęga się z enzymem, a pomiar produktu powstającego w reakcji enzymatycznej rozkładającej określony substrat jest miernikiem ilościowym. Produkt reakcji jest barwny, a natężenie barwy zależy pośrednio od zawartości oznaczanego antygenu czy przeciwciała i jest mierzone z użyciem metod spektrofotometrycznych.

Najczęściej stosowanymi enzymami są:

- Fosfataza alkaliczna AP (substrat - p-nitrofenylofosforan [p-NPP])
- Peroksydaza chrzanowa HRP (substrat - o-fenylendiamina [OPD])

Dalsze rozwinięcie tych, metod doprowadziło do ich rozbudowania przez zastosowanie drugiego przeciwciała przeciw temu pierwszemu, znakowanego np. izotopem, enzymem. Wprowadzenie

układów biotyna-awidyna lub biotyna-streptawidyna do tej techniki znacznie zwiększa czułość detekcji - w takim układzie drugie przeciwciało jest wcześniej biotynylowane. Awidyna może być kowalencyjnie znakowana np.: enzymami. Streptawidyna nie posiada reszt cukrowych przez co zwiększa się specyficzność metody. Coraz częściej stosowaną metodą jest heterogenna i niekompetycyjna metoda ELISA. Białko wiążące w tym przypadku przeciwciało wobec oznaczanego antygeny, adsorbuje się na powierzchni przezroczystego plastiku, a następnie poddaje działaniu antygenem w obecności analogu antygeny wyznakowanego enzymem.

Metody chemiluminescencyjne, w których wykorzystuje się znaczniki chemiluminescencyjne (lucyferyna, izoluminol), emitujące pod wpływem reakcji światło o określonej długości fali, co pozwala na pomiar stężenia badanej substancji.

1. Dulak J., Piwońska B., Dębińska-Kieć A.: Metody biologii molekularnej w diagnostyce klinicznej. „Badania Diagnostyczne”, 1998,4 , 1-6.
2. Odrowąż-Sypniewska G., Czerski T.: Nowe metody diagnostyki molekularnej w badaniach epidemiologicznych. „ Laboratorium - Przegląd ogólnopolski”, 2004, 6, 36-38.
3. Kozik A., Rapała-Kozik M., Guevara-Lora I.: Analiza instrumentalna w biochemii, Kraków 2001
4. Hames B.D., Hooper N.M., Houghton J.D.: Biochemia-krótkie wykłady. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2000.
5. Dębińska-Kieć A., Naskalski J. Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Wrocław 2002, 59-106.

<https://laboratoria.net/home/10369.html>

Informacje dnia: [Ruszyła IV edycja konkursu Pomosty Przyszłości Kleszcz to tylko pośrednik Jak rower zmienił świat Polacy opracowują aparaturę dla teleskopów europejskiej misji kosmicznej](#) [Badanie: portale społecznościowe nie chronią przed samotnością](#) [Norowirusy - biegunka brudnych rąk](#) [Ruszyła IV edycja konkursu Pomosty Przyszłości Kleszcz to tylko pośrednik Jak rower zmienił świat Polacy opracowują aparaturę dla teleskopów europejskiej misji kosmicznej](#) [Badanie: portale społecznościowe nie chronią przed samotnością](#) [Norowirusy - biegunka brudnych rąk](#) [Ruszyła IV edycja konkursu Pomosty Przyszłości Kleszcz to tylko pośrednik Jak rower zmienił świat Polacy opracowują aparaturę dla teleskopów europejskiej misji kosmicznej](#) [Badanie: portale społecznościowe nie chronią przed samotnością](#) [Norowirusy - biegunka brudnych rąk](#)

Partnerzy