

CH50

Funkční vyšetření komplementového systému (klasická cesta aktivace)

Teorie:

Komplement řadíme mezi humorální složky vrozené imunity. Je tvořen souborem asi 30 sérových a membránových termolabilních proteinů, které za normálních okolností kolují v těle ve formě inaktivních proenzymů. Komplementový systém je aktivován třemi způsoby: alternativní, klasickou či lektinovou cestou. Po aktivaci komplementu se spouští kaskáda po sobě následujících kroků, které vedou k amplifikaci imunitní odpovědi a tvorbě lytického komplexu MAC (membrane attack komplex). Hlavními funkcemi komplementových složek jsou: lýza buněk, opsonizace a chemotaxe.

CH50 je funkčním testem komplementového systému spouštěného klasickou cestou. K tomuto účelu se využívají beraní erythrocyty a amboceptor (králičí protilátka proti beraním erythrocytům), ke kterým se přidá vzorek vyšetřovaného séra. Pokud je komplementový systém v séru funkční, dojde v přítomnosti amboceptoru k lýze beraních erythrocytů. Uvolněný hemoglobin způsobí zvýšení absorbance roztoku, která se změří spektrofotometricky. K vyjádření výsledku se používá tzv. jednotka CH-50, která udává množství komplementu v 1 ml séra, které způsobí za standardních podmínek 50% lýzu definované suspenze beraních erythrocytů. V prostředí destilované vody dojde ke 100% hemolýze.

Materiál a pomůcky:

5% suspenze beraních erythrocytů, pracovní roztok amboceptoru (králičí protilátka třídy IgM proti beraním erythrocytům), fyziologický roztok, destilovaná voda, kádinky, mikrozkušavky (eppendorfy), vortex, centrifuga, reader absorbance, pipety, špičky, stepper + nástavec, mikrotitrační destičky.

Postup:

1. **Příprava sér:** Sérum, které bylo do hodiny od odběru zamrazeno (složky komplementu jsou termolabilní!) je nutno rozmrazit na pokojovou teplotu a před pipetováním důkladně promíchat na vortexu.

Pro každé sérum připravíme do mikrozkušavky **2 ředění:**

ředění I (40x) ... 25 μ l séra + 975 μ l fyz.roz.

ředění II (60x) ... 15 μ l séra + 885 μ l fyz.roz.

Promíchejte na vortexu.

2. Příprava **hemolytického systému:** do 5% suspenze beraních erythrocytů se přidá stejný objem pracovního roztoku amboceptoru (JE NUTNÉ PŘIDÁVAT AMBOCEPTOR DO ERYTHROCYTŮ, NE NAOPAK!) – inkubace 15-30 min v lednici.

Na 1 desku se připraví 4 ml hemolytického systému (2 ml suspenze + 2 ml amboceptor).

3. Rozmístění vzorků na mikrotitrační destičce:

Každý vzorek séra se pipetuje v dubletu (2 sloupce). Máme 2 vzorky séra, takže obsadíme první 4 sloupce destičky.

Do jamek B,C,D a F,G napipetujte 100 µl fyz. roztoku.

Do jamek A a B napipetujte 100 µl séra ředění I (40x).

V jamkách B promíchejte špičkou obsah a přepipetujte z nich 100 µl do jamek C.

V jamkách C promíchejte špičkou obsah a přepipetujte z nich 100 µl do jamek D

V jamkách D promíchejte špičkou obsah, odsajte z nich 100 µl a vyhod'te.

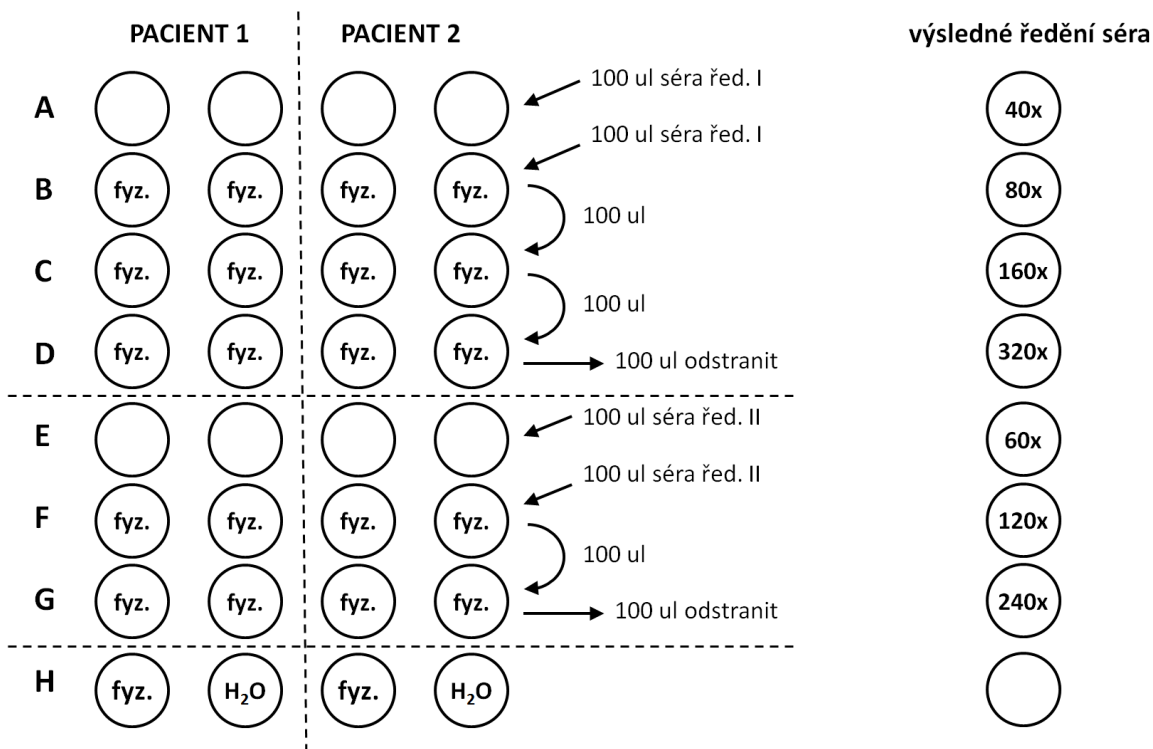
Do jamek E a F pro příslušný vzorek napipetujte 100 µl séra ředění II (60x).

V jamkách F promíchejte špičkou obsah a přepipetujte z nich 100 µl do jamek G.

V jamkách G promíchejte špičkou obsah, odsajte z nich 100 µl a vyhod'te.

Do liché jamky H napipetujte 100 µl fyz. roztoku, do sudé jamky H 100 µl destilované vody.

Do všech jamek napipetujte 100 µl hemolytického systému (multikanálovou pipetou).



4. Přikryjte desku víčkem a inkubujte 60 min v termostatu při 37°C.

5. Centrifugace destičky 5 min při 2000 ot./min (centrifuga MPW, prog. 22)

6. Po centrifugaci přepipetovat 100ul z každé jamky do nepoužitých jamek mikrotitrační destičky při zachování pořadí a umístění jamek.

7. Změřit na readeru absorbanci při 541 nm. (ELISA reader SUNRISE, program CH50)

8. Výsledky jamek v dubletu vždy zprůměrovat kromě jamek v řadě H. Seřadit dle stoupající koncentrace séra v jamce – tzn. dle stoupající hemolýzy.