Cvičení č. 1: STANOVENÍ KONCENTRACE CELKOVÝCH BÍLKOVIN VE VZORKU SÉRA POMOCÍ AUTOMATIZOVANÉHO FOTOMETRICKÉHO ANALYZÁTORU BS 200

TEORETICKÁ PŘÍPRAVA NA CVIČENÍ

Celková bílkovina

Stanovení celkové bílkoviny v séru je běžná a dostupná metoda. Vyšetření koncentrace celkové bílkoviny v séru nám poskytuje orientační informaci o biosyntéze, utilizaci a exkreci bílkovin. Změnu ve složení sérových bílkovin vyvolávají různá onemocnění, ale pouze některá se projeví odchylkou v hodnotách celkové bílkoviny. Celková bílkovina se podílí na udržování onkotického tlaku a tím udržení objemu tělních tekutin (zejména albumin). Má obranné funkce proti patogenům (imunoglobuliny, komplement, proteiny akutní fáze (např. CRP)), antioxidační funkce (obrana proti reaktivním formám kyslíku) – např. albumin, ceruloplazmin, transportní funkce – pro hormony (kortizol, hormony štítné žlázy), prvky (Ca, Mg, Cu, Fe), bilirubin. Celková bílkovina se účastní srážení krve (koagulační faktory) a je součástí enzymů a inhibitorů.

Koncentrace celkové bílkoviny v séru může být ovlivněna těmito základními faktory:

- hydratací organismu;
- změnou biosyntézy jednoho nebo více specifických proteinů;
- rychlostí ztrát jednoho nebo více specifických proteinů.

Hypoproteinemie

Hypoproteinemie je označení pro *sníženou koncentraci bílkoviny v séru*.

Absolutní hypoproteinemie vzniká v důsledku *sníženého množství bílkoviny v séru* při:

- zvýšených ztrátách;
  - ledvinami;
  - gastrointestinálním traktem (např. záněty střeva);
  - kůží (popáleniny);
  - krvácením;
  - do „3. prostoru“ (např. do břišní dutiny při ascitu);
- snížené proteosyntéze v játrech (chronická jaterní onemocnění);
- nedostatečném příjmu bílkoviny potravou při poruchách výživy.

U **relativní hypoproteinemie** je zachováno normální množství bílkovin, které jsou ale v důsledku retence vody a elektrolytů „naředěné” (stav *hyperhydratace*). Koncentrace individuálních proteinů jsou snížené ve stejném poměru.

Hyperproteinemie

Hyperproteinemií rozumíme *zvýšenou koncentraci celkové bílkoviny v séru*. Dochází k ní při infekci, zánětu, dehydrataci, hemolýze, traumatu, hyperfunkci štítné žlázy, při deficitu železa, nejčastější příčinou je snížení objemu vody v těle, při ztrátách vody.

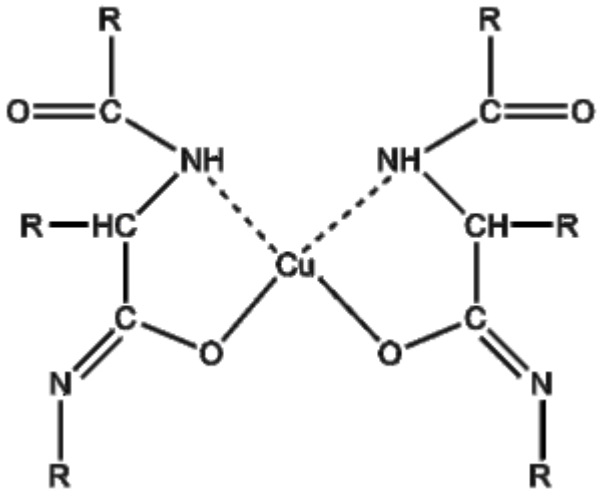
Absolutní hyperproteinemie je *zvýšení koncentrace bílkoviny* vyvolané obvykle zvýšenou syntézou některých specifických proteinů, např. imunoglobulinů (plazmocytom).

Relativní hyperproteinemie vzniká jako následek *dehydratace organismu* při nedostatečném příjmu či nadměrných ztrátách tekutin (těžké průjmy, zvracení). Celkové množství bílkovin je zachováno a koncentrace jednotlivých proteinů je zvýšená proporcionálně.

Referenční rozmezí: Koncentrace celkové bílkoviny v séru (S-celková bílkovina): 65 – 85 g/l

PRINCIP METODY

Princip stanovení celkové bílkoviny
Celkovou bílkovinu v séru stanovujeme **biuretovou reakcí**.



Komplex bílkoviny s mědí v alkalickém prostředí
V ***alkalickém prostředí v přítomnosti měďnatých solí*** dávají bílkoviny fialové zbarvení, vhodné k fotometrickému stanovení. Zjednodušeně se dá říci, že se vytvářejí komplexní sloučeniny Cu^{2+} s ionty peptidových vazeb. Vzniklý komplex silně absorbuje světlo v oblasti 540 – 560 nm. Intenzita zbarvení komplexu se měří fotometricky a je přímo úměrná koncentraci bílkovin. Biuretovou reakci obecně poskytují látky obsahující v molekule alespoň dvě peptidové vazby (-CO-NH-) nebo dvě skupiny -CO-NH_2. Reakce tedy není specifická pouze pro bílkoviny. Nejjednodušší sloučeninou reagující s měďnatými solemi v alkalickém prostředí je biuret obsahující dvě peptidové vazby. Aminokyseliny a dipeptidy nereagují.
Součástí biuretového činidla je ***síran měďnatý***, který poskytuje Cu^{2+} pro tvorbu komplexů s peptidovými vazbami, a alkalizující složka (hydroxid), který převede peptidovou vazbu na enolformu a umožní tak účast atomů kyslíku v komplexu. Dalšími složkami činidla jsou ***vinandraselno-sodný***, který zabraňuje jako komplexotvorná látka srážení Cu^{2+} na $Cu(OH)_2$, a ***jodid draselný***, který chrání Cu^{2+} před autoredukcí. Citlivost biuretové metody se pohybuje kolem 1 – 10 g bílkoviny/l.

POPIS PŘÍSTROJE BS-200

K měření celkové bílkoviny v séru bude použit automatizovaný fotometr BS-200 (Mindray, China), který se skládá z kyvetového prostoru, reagenčního prostoru s karuselem pro reagencie a přípravu vzorků (temperovaný na 4 ± 1 °C) a optického detektoru. Zdrojem světla je halogeno-wolframová žárovka. Přenos vzorků a reagencí zabezpečuje robotické rameno s dávkovací jehlou. Obsah kyvet je promíchán automatickým míchadlem ihned po přidání činidla nebo vzorku o objemu 2 – 45µl. Kontaminace je minimalizována díky proplachování jak dávkovací jehly, tak míchadla destilovanou vodou. Pro detekci je možné využít vlnových délek: 340, 405, 450, 510, 546, 578, 630, 670 nm. Zařízení je plně kontrolováno softwarem BS 200 (Mindray, China).

POSTUP MĚŘENÍ NA AUTOMATIZOVANÉM FOTOMETRU BS 200

Do kyvety je napipetováno 200 µl biuretova činidla (100 mM vinansodno-draselný, 100 mM NaOH, 15 mM KI, 6 mM $CuSO_4$) a následně jsou napipetovány 4 µl vzorku. Po 5 min inkubace při 37 °C je změřena absorbance při vlnové délce $\lambda = 546$ nm. Pro výpočet je použito hodnoty absorbance samotné reagencie a hodnoty absorbance po 5 minutové inkubaci se vzorkem. V přístroji je už nachystané v reagenční lahvičce biuretovo činidlo (modré barvy). Proto připravujeme jenom vzorky.

MATERIÁL

Neznámý vzorek : Kalibrátor Lyonorm **celková bílkovina neznámé koncentrace 4 × naředěná**
Kalibrátor je výrobcem dodáván lyofilizovaný a pro použití jej budete mít připraven těsně před cvičením rekonstituováním s deionizovanou vodou podle návodu výrobce. Doba expirace rekonstituovaného kalibrátoru bude vyznačena na každé lahvičce

Standard bovinního sérového albuminu (BSA) o koncentraci 20 g/l a neznámy vzorek (4 × naředěný) připravené jsou v mikrozkumavce**.**

Destilovaná voda na ředění standardu, mikrozkumavky, nastavitelná pipeta 100 –1000 µl.

PRACOVNÍ POSTUP:

1. Nachystáme si 5 mikrozkumavek (1,5 ml) a označíme si je písmenem skupiny (A, B, C, a pořadovým číslem (např. A1, A2, A3, A4, A5; B1, B2, B3 atd.) neznámý vzorek a standard BSA (20g/l)
2. Připravíme si ředící řadu z koncetrovaného standardu BSA (20 g/l) půlkovým ředěním.
3. Do mikrozkumavek č. 2, 3 a 4 pipetujeme nejdříve 200 µl vody.
4. Poté do mikrozkumavky č. 1 napipetujeme 200 µl standardu BSA (20g/l) a také stejný objem standardu pipetujeme do mikrozkumavky č. 2, ve které máme již 200 µl vody a obsah které promícháme pipetou a tak dostaneme roztok standardu BSA o poloviční koncentraci (10g/l). Poté zmikrozkumavkyč. 2 napipetujeme opět 200 µl do mikrozkumavky č. 3 (ve které máme již 200 µl vody) a opět obsah mikrozkumavky promícháme pipetováním. Dostaneme tím roztok standardu BSA č. 3 (5g/l). V mikrozkumavce č. 4 máme již 200 µl vody a to je blank. Do mirozkumavky č. 5 napipetujeme 200 µl neznámého vzorku

Přesun do centrální laboratoře k analyzátoru BS 200

5. Umístíme mikrozkumavky do fotometru BS 200 a spustíme měření.
6. Měříme absorbanci při vlnové délce 546nm (měření trvá 18 minut).
7. Po ukončení měření, si zapíšeme hodnoty absorbance do tabulky.

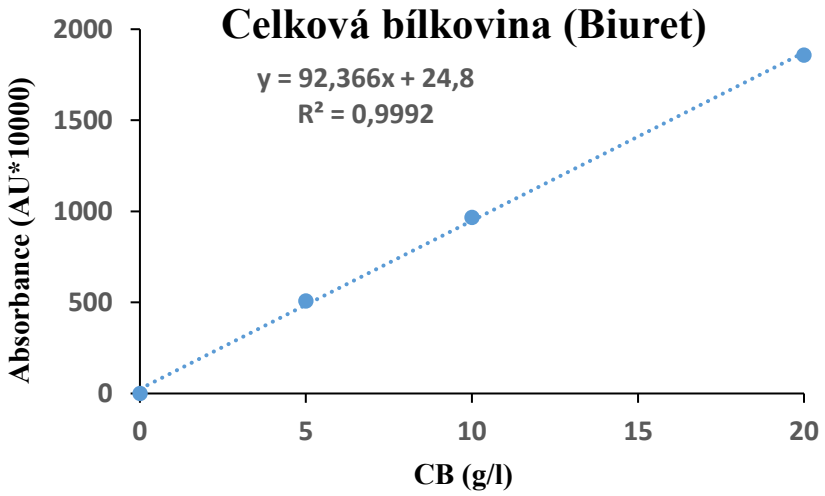
Přesun zpátky do původní laboratoře

Z naměřených hodnot absorbance a známých koncentrací albuminu vytvoříme v programu Excel kalibrační křivku a z rovnice kalibrační přímky vypočteme koncentraci 4 × naředěného neznámého vzorku. Vypočteme koncentraci neznámého vzorku.

Zkumavka	**Koncentrace CB (osa x)**	A_{546} (odvozená A v 10 000 vých jednotkách)	**A_{546} VZ - A_{546} BLANK (osa y)**	**Naměřená koncentrace**
1	Standard 1 koncentrace **20 g/l**			
2	Standard 2 koncentrace **10 g/l**			
3	Standard 3 koncentrace **5 g/l**			
4	Blank (voda) **0 g/l**			
5	Neznámý vzorek (kalibrátor, 4 × ředěný)			4 × koncentrace odečtena z kalibrační křivky

PROTOKOL (SCHÉMA):

Význam stanovení celkové bílkoviny v séru.
Kdy dochází k hyperproteinemii a kdy dochází k hypoproteinemii?
Referenční rozmezí koncentrace celkové bílkoviny v lidském séru.
Princip stanovení celkové bílkoviny biuretovou reakcí.
Postup měření na automatizovaném fotometru BS 200.
Vyplněná tabulka a graf kalibrační křivky.



Výpočet koncentrace neznámého vzorku.

Cvičení č. 2: Imunochemická detekce proteinu p53 na nitrocelulosové membráně (dot blot)

Úvod

Protein **p53** je kódován genem *TP*53 a hraje roli především jako **nádorový supresor (antionkogen)**. Díky své funkci transkripčního faktoru reguluje expresi mnoha cílových genů, zodpovědných za růst buněk a apoptózu, tím že se sekvenčně specificky váže na DNA. V normálním stavu buňky se vyskytuje v malé špatně detekovatelné míře. Více než 50% tumorů je asociováno s mutací v genu *TP*53. Vzniká mutantní protein, onkogen, který je naopak v buňce akumulován a dobře pomocí protilátek detekován.

Dot blot je zjednodušenou alternativou k western blotu a slouží pro detekci a identifikaci proteinů. Na rozdíl od western blotu nedochází k elektroforetické separaci, nelze tedy určit velikost cílového proteinu, můžeme však přítomnost daného proteinu potvrdit – v našem případě p53. Kapka vzorku je nanesena přímo na nitrocelulosovou membránu, kde je následně protein zájmu imunochemicky detekován.

Princip metody

Principem imunochemické detekce je využití reakce **antigen-protilátka**. **Antigeny** jsou látky, které organismus rozpoznává jako cizorodé. Jejich přítomnost stimuluje tvorbu protilátek. Každý antigen obsahuje antigenní determinanty (**epitopy**) tvořené 5-8 aminokyselinami. Schopnost protilátek rozlišovat i malé rozdíly epitopů je základem specifity imunitních reakcí.

Protilátky patří mezi **imunoglobuliny** a jsou produkovány jako součást imunitní odpovědi. Rozlišujeme několik tříd - IgG, IgM, IgA, IgE a IgD. Protilátky jsou charakterizovány **afinitou** – síla vazby protilátky s jednou vazebnou determinantou antigenu, **aviditou** – síla vazby mezi protilátkou a celou molekulou antigenu (většina antigenů je multivalentních, tzn. má více vazebných determinant pro různé protilátky) a **specifitou** – protilátky jeví minimální interferenci s látkami, pro které není protilátka určena. Protilátky mohou být polyklonální či monoklonální.

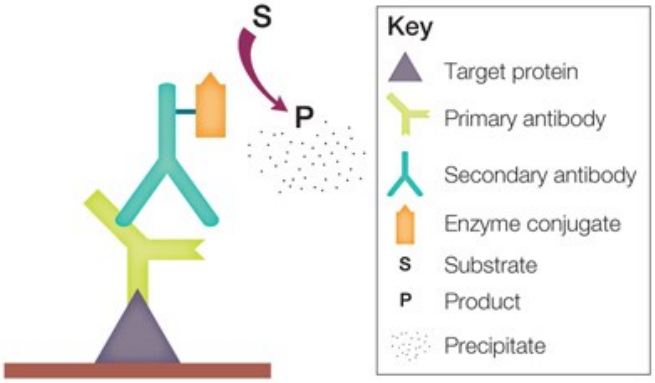
Polyklonální protilátky se připravují imunizací zvířat, kdy se zvířeti aplikuje příslušný antigen. V době imunizace (2-6 měsíců) se v krevním séru tvoří protilátky proti různým antigenním determinantám antigenu. Polyklonální protilátka může obecně reagovat **s několika antigenními determinantami**. Výhodou je vyšší citlivost a avidita. Nevýhodou je individuální imunitní odpověď a tedy i nereprodukovatelnost.

Monoklonální protilátky nejsou produkovány organismem, ale buněčnou kulturou. Myš je imunizována antigenem, následně se ze sleziny získají lymfocyty produkující protilátky. Jejich hybridizací s myelomovými buňkami dojde k fúzi obou typů buněk. Klonováním lze vybrat buňky, které produkují protilátky proti konkrétní antigenní determinantě antigenu. Takto syntetizovaná protilátka obsahuje jediný typ vazebného místa, a tedy rozeznává **jedinou antigenní determinantu**. Monoklonální protilátky se vyznačují vyšší čistotou a specifitou, jsou reprodukovatelné, mají však nižší afinitu.

Povrch nitrocelulózové membrány váže proteiny, proto je třeba po nanesení vzorku membránu **zablokovat**. Membrána se ponoří do roztoku levného proteinu, např. BSA či odtučněného sušeného mléka v PBS s přídavkem detergentu pro snížení šumu pozadí. Proteiny BSA či mléčný kasein se naváží na všechna místa, kam se dosud nenavázaly proteiny z našeho vzorku. Po přidání protilátky tedy nemůže dojít k její nespecifické vazbě na povrch membrány, nýbrž musí specificky hledat svůj epitop na antigenech vzorku.

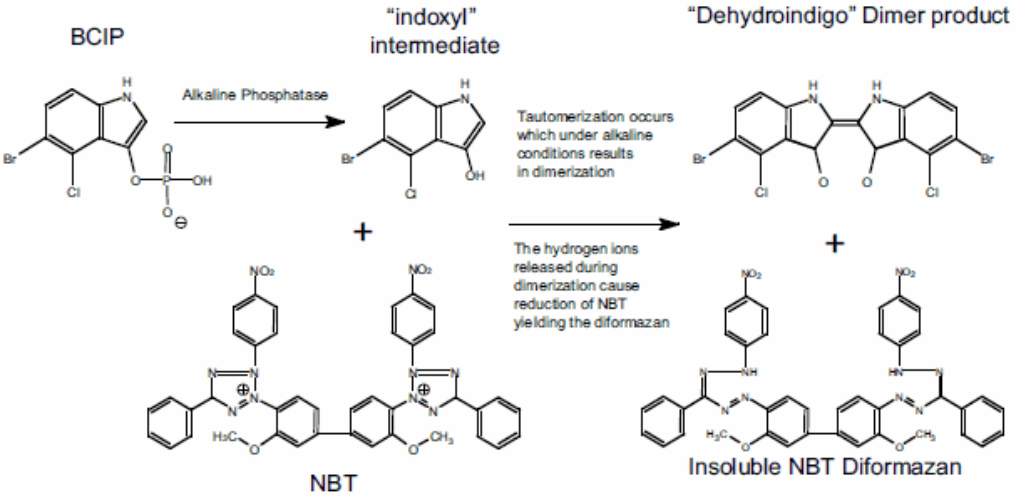
Pro detekci cílového proteinu je nutné použití specifické **primární protilátky** proti tomuto proteinu a **sekundární protilátky konjugované s reportérovým enzymem**. V našem případě je primární protilátkou DO1 (aa 20-25), která specificky rozpoznává N-konec přirozené i mutantní formy proteinu p53, oblast mezi 20-25 aminokyselinou. Jedná se o **myší monoklonální protilátku** třídy IgG. Sekundární protilátka je produkována imunizací pomocí

antigenů z daného organizmu. Imunizace probíhá v jiném druhu hostitelského organismu, než u primární protilátky. V našem případě byla protilátka DO1 produkována myší, proto **sekundární polyklonální protilátka** (anti-mouse IgG) byla produkována kozou, které byla injikována primární protilátka. Sekundární protilátka se tedy váže na primární protilátku a je konjugována s reportérovým enzymem umožňujícím detekci, v našem případě **alkalickou fosfatázou a /nebo křenovou peroxidázou**.



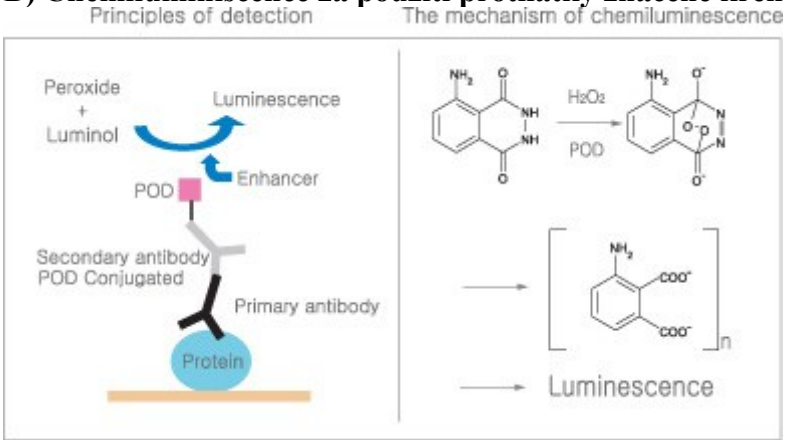
Obr. 1: Princip imunochemické detekce proteinu

A) Pro **kolorimetrickou detekci** molekul značených **alkalickou fosfatázou** se běžně používá 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát (BCIP) a nitro blue tetrazolium (NBT). Jsou-li tyto látky inkubovány s alkalickou fosfatázou, dochází k tvorbě nerozpustného **diformazanu NBT**, který se projeví fialovým zbarvením.



Obr. 2: Reakce BCIP/NBT

B) Chemiluminiscence za použití protilátky značené křenová peroxidázou



Obr. 2: Reakce ECL- POD (peroxidáza, HRP)

Pracovní postup s primární a sekundární protilátkou

1. Pracujte ve dvojici, na kousek nitrocelulózové membrány naneste pipetou **1µl vašeho vzorku** proteinu o různé koncentraci (1x, 100x a 1000x zředěný). Ředění vzorku 10x a 100x připravte v PBS. Membrány je třeba dotýkat se co nejméně. Membránu popište obyčejnou tužkou.
2. Membránu vložte do 2 ml plastové zkumavky (ependorfky), **v tomto kroku práci přerušíte do dalšího cvičení**, a přelijte 1-2 ml 5% PBS mléka. Inkubujte na termobločku 30 min.
3. Do mléka přidejte 1 µl primární protilátky a inkubujte na třepačce alespoň 30 min.
4. Mléko s protilátkou slijte do falkonky a přelijte membránu promývacím pufrem 1x PBST. Po 5-ti min pufr vylijte a promytí po 5-ti min ještě 2x zopakujte.

5. Membránu přelijte 5-ti ml mléka a přidejte **2 µl sekundární protilátky anti-mouse IgG konjugovanou s alkalickou fosfatázou.** Inkubujte 30 min.
6. Zopakujte promývací krok 4.
7. Kolorimetrická detekce pro 1 ml substrátového pufru přidejte 3,3 µl BCIP a 33,0 µl NBT. Membránu v roztoku inkubujte asi 10 min, dokud nepozorujete fialové zbarvení.
8. Vylijte roztok BCIP/NBT. Reakci zastavíte opláchnutím membrány v destilované vodě.

5. Membránu přelijte 5-ti ml mléka a přidejte **2 µl sekundární protilátky anti-mouse IgG konjugovanou s křenovou peroxidázou.** Inkubujte 30 min.
6. Zopakujte promývací krok 4.
7. Pro detekci chemiluminiscence umístěte membránky na eurofolii, pokryjte směsí roztoku 1+2 (100ul 1 + 100ul 2), detekujeme chemiluminiscenci .

Použité chemikálie

5% PBS mléko – 5% sušeného mléka v 1% PBS
BCIP – vodný roztok 50 mg/ml
NBT – vodný roztok 10mg/ml
Substrátový pufr – 0,1 M Tris, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 9,5
Vyhodnocení

Otázky:
Co je to SDS-PAGE, western blot, dotblot, epitop, avidita, afinita, funkce mléka……..

Příklad:
Protein p53 (1-393 aa) se vyskytuje v buňce v několika variantách: p53A (1-363 aa), p53B (45-345 aa), která z protilátek rozpozná všechny varianty:
Seznam protilátek DO1 (20-25 aa), DO11 (120-135 aa), Pab421 (363-393 aa).

Protokol:
Název metody
Princip stanovení
Nákres obrázku
Odpovědi na otázky
Reakce katalyzované enzymy