

## 6 Imunodifuzní metody

Metoda radiální difuze byla nejvíce používána v 80tých letech minulého století, kdy sloužila jako standardní metoda pro stanovení různých sérových proteinů. Stanovovaly se nejčastěji protilátky a části komplementu. Dnes se ke stanovení těchto parametrů nahrazeno nefelometrií a turbidimetrií. V současné době se pomocí radiální difuze stanovují hlavně IgD protilátky, které mají malou aviditu, proto nelze využít turbidimetrického respektive nefelometrického stanovení. Dále se radiální difuze používá při stanovení lysozymu.

### Příklady

	<i>V gelu</i>	<i>V jamce</i>	<i>Výsledek reakce</i>
Stanovení aktivity lysozymu	Bakterie	Lysozym	Projasnění gelu
Přítomnost antigenu ve vzorku	Protilátka	Antigen	Vznik precipitačního prstence
Stanovení hemolytické aktivity komplementu	Senzibilizované erythrocyty	Sérum s komplementem	Změna barvy gelu v důsledku hemolýzy

### ÚLOHA 6: Stanovení lysozymu metodou jednoduché radiální difuze

Lysozym je látka enzymatické povahy. Rozkládá polysacharid murein, který je základním komponentem buněčných stěn bakterií, čímž lyzuje grammpozitivní bakterie. Vyskytuje se nejen u obratlovců (sliny, sekrety, krevní sérum, mléko moč, pot, játra, cytoplazma fagocytů ...), ale i u bezobratlých (hemolymfa ...) a některých rostlin (*Papaya latex*, *Ficus apod.*). Více viz rozšiřující informace na konci kapitoly.

#### Princip

Při této metodě je jedna ze složek (**bakterie**, protilátky nebo senzibilizované erythrocyty) rozpuštěna v agarózovém gelu a druhá (**lysozym**, antigen, sérum s komplementem) difunduje z jamky radiálně do okolního gelu. Při manipulaci je potřeba dodržet správnou teplotu tak, aby gel byl tekutý a zároveň nedocházelo k denaturaci proteinů teplotou.

**Výhody a nevýhody:** jednoduchost, časová náročnost, nutná zkušenost a zručnost.

#### Chemikálie a roztoky

1. Bakteriální kultura - *Micrococcus luteus* (CCM 169; dříve *M. lysodeicticus*)
2. 1,25% Agarózový gel s bakteriální kulturou
3. Zásobní roztok lysozymu [10 mg/ml]  
*1 mg lyofilizovaného lysozymu má aktivitu přibližně 24 000 jednotek.*
4. Borát-fosfátový pufr, pH = 7,4

*Vzorek: slzy, sliny, hemolymfa bource morušového*

#### Přístroje a pomůcky

Skleněná plotna 5x5 cm, Petriho misky na vlhkou komůrku, borát-fosfátový pufr, zabroušená jehla na vysekávání jamek, vývěva, filtrační papír.

Skleněné plotny s agarózovým gelem:

1. *Vyvážíme podložku na nalévání do vodorovné polohy.*
2. *Skleněnou plotnu (5x5 cm) očistíme alkoholem a necháme uschnout.*
3. *Přípravenou skleněnou pipetu několikrát propláchneme horkou vodou.*

4. Na plotnu nanese skleněnou pipetou 2,4 ml důkladně promíchané agarózy s bakteriální kulturou.
5. Gel necháme několik minut zatuhnout na kalibrované vodorovné ploše.
6. Z Petriho misky a vlhkého filtračního papíru připravíme vlhkou komůrku. Do ní umístíme skleněnou plotnu s agarózou, aby tato nevyschla.

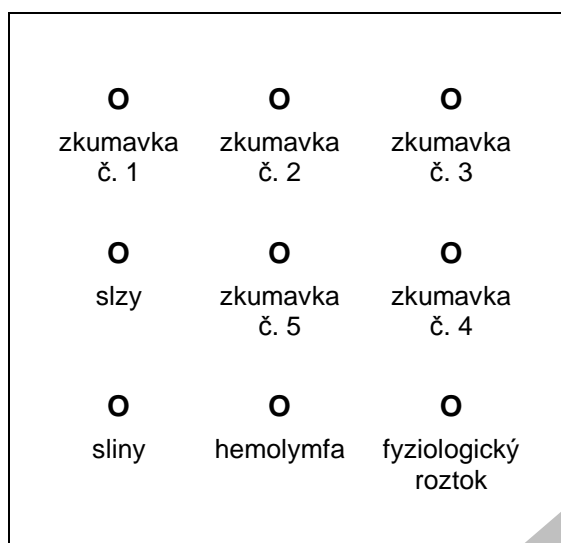
### Postup (vlastní práce):

1. Každá plotna musí mít kalibraci, proto si společně připravíme kalibrační řadu 5ti zkumavek podle následujícího schématu. Koncentraci a aktivitu lysozymu si dopočítejte:

Označení zkumavky	1.	2.	3.	4.	5.
Borát-fosfátový pufr	0 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Zásobní roztok lysozymu	2 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

Ředění:	1x	2x	4x	8x	16x
Koncentrace lysozymu [mg/ml]:					
Aktivita lysozymu [jednotek]:					
Celkový objem:	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	2 ml

2. Zabroušenou jehlou napojenou na vývěvu vysekáme do agarózy jamky dle šablony:



3. Do každé jamky napipetujeme 2,6  $\mu$ l vzorku podle schématu v bodě 2.
4. Desky inkubujeme 48 hodin ve vlhké komůrce při 4  $^{\circ}$ C.
5. Lyzozym difunduje do okolí jamek a lyzuje bakterie v gelu, čímž dochází k vyčeření gelu. Pomocí speciálního měřítka SEVAC odečteme druhé mocniny průměrů prstenců okolo jamek.

### Hodnocení:

Sestavte kalibrační křivku z jamek č. 1, 2, 3, 4 a 5 jako lineární závislost druhých mocnin průměrů prstenců na koncentraci lysozymu (v těchto jamkách znáte koncentraci lysozymu). Určete rovnici regrese kalibrační přímky a hodnotu spolehlivosti (R). Pomocí rovnice regrese kalibrační přímky určete koncentraci lysozymu ve slzách, slinách a v hemolymfě.

Pomocí známé koncentrace a aktivity lysozymu v zásobním roztoku, vypočtete koncentraci a aktivitu lysozymu v jednotlivých ředěních a v jednotlivých vzorcích (slzy, sliny, hemolymfa).

## Výstup

Výstupem této metody jsou 2 hodnoty, které udávají koncentraci a aktivitu lysozymu ve vzorku.

**1) Uveďte tedy tabulku s hodnotami:**

1. Druhá mocnina průměru prstence
2. Koncentrace lysozymu
3. Aktivita lysozymu

- v tabulce uveďte nejen hodnoty pro jednotlivé vzorky, ale také pro kalibrační zkumavky 1 – 5.

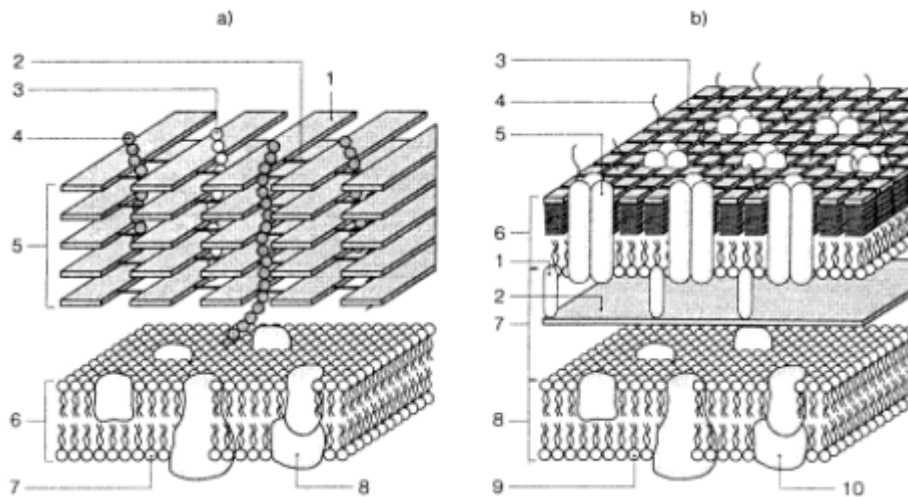
**2) Bodový graf kalibrační křivky s rovnicí regrese a hodnotou spolehlivosti (R).**

**3) Sloupcový graf s porovnáním koncentrace lysozymu ve vzorcích slz, slin a hemolymfy.**



**Gramnegativní bakterie (G-)** mají buněčnou stěnu tvořenou tenkou, ale pevnou peptidoglykanovou vrstvou (cca 10 nm), nad kterou se nachází ještě membrána tvořená dvojvrstvou fosfolipidů a bílkovin. Právě vnější fosfolipidová membrána brání průniku hydrofilních antibiotik (např. G penicilin). Tato antibiotika ovlivňují gramnegativní bakterie pouze v případě, že jsou schopna pronikat transmembránovými póry zevní membrány (např. ampicilin, amoxycilin). Vlastní murein tvoří cca 3 % suché hmotnosti buňky. I pro působení lysozymu musí mít G- bakterie poškozenou nebo odstraněnou vnější membránu, jinak jsou k účinkům těchto látek velmi málo citlivé.

Rozdíly ve stavbě buněčné stěny grampozitivních a gramnegativních bakterií



**a) Buněčná stěna grampozitivních bakterií:**

1. polysacharidový řetězec peptidoglykanu (mureinu) 2. příčné propojení 3. polysacharid 4. kyselina teichoová 5. buněčná stěna 6. cytoplazmatická membrána 7. fosfolipid 8. protein

**b) Buněčná stěna gramnegativních bakterií:**

1. lipoprotein 2. peptidoglykan 3. lipopolysacharid 4. antigeny 5. porinové trimery 6. vnější membrána 7. periplasmatický prostor 8. cytoplazmatická membrána 9. fosfolipid 10. protein

MJ Pelczar, ECS Chang y, NR Krieg. *Microbiology*. Mc Graw Hill inc.,1986. New York. 5.ed.