

ÚLOHA 9: Raketová elektroimunodifuze podle Laurella

Princip

Zkoumaný antigen je stejnosměrným elektrickým proudem unášen po gelu s protilátkou. Vazbou antigenu a protilátky vznikají imunokomplexy, které se projeví jako precipitát v podobě tzv. raket. Podstatou techniky je putování antigenu a tvorba imunokomplexů až do vzdálenosti, ve které je veškerý antigen ze vzorku vyváznut protilátkou v gelu. Jde o jednu z nejpřesnějších kvantitativních elektroimunodifuzních metod.

Výhody a nevýhody

Metoda je poměrně přesná a jednoduchá na provedení. Vyžaduje však nákladné přístrojové vybavení. Je také nutné počítat s nejméně hodinovou rezervou při elektroforetické fázi a vyhodnocení výsledku je možné až po určité době.

Chemikálie a roztoky

1. Komerční lidské sérum obsahující IgM pro kalibraci (Orion Diagnostica)
Obsah IgM je 2 g/l.
2. Protilátka - sérum s anti-IgM protilátkami
3. Fyziologický roztok
0,85 g NaCl + 100 ml dH₂O
4. Agaróza v práškové formě
5. Borát-fosfátový pufr (pH 6,8)
25,99 g H₃BO₃ + 2,4 g NaOH + 2,04 g KH₂PO₄ + 1000 ml dH₂O
6. Roztok Coomassie blue - malé množství rozpuštěné v dH₂O
Nemusí být přesné množství, slouží pouze pro informaci o průběhu elektroforézy.
7. Barvicí roztok
225 ml CH₃OH + 25 ml CH₃COOH + 0,25 g amidočerni 10B
8. Odbarvovací diferenční roztok
CH₃OH : CH₃COOH - 10:1

Vzorek: Komerční lidské sérum obsahující neznámé množství IgM (Orion Diagnostica)
Vystupuje jako antigen.

Přístroje a pomůcky

Skleněné plotny 5x5 cm, skleněná pipeta, korkovrt na vysekávání jamek, vývěva, zdroj napětí, elektroforetické komory, Petriho misky na vlhkou komůrku, filtrační papír.

Postup (vlastní práce) - pracujeme ve dvojicích

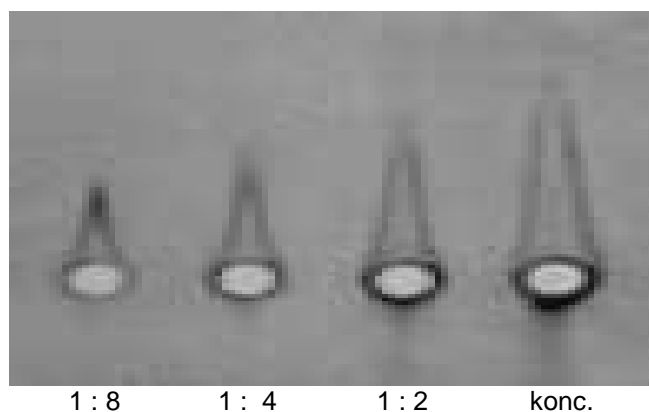
1. Ze zásobního komerčního séra o známé koncentraci IgM si připravíme další ředění.
 - a) do zkumavek 2. a 3. napipetujeme 10 µl fyziologického roztoku
 - b) do zkumavky 1. napipetujeme 20 µl séra se známou koncentrací IgM
 - c) ze zkumavky 1. přenášíme 10 µl do zkumavky 2., důkladně promícháme a přeneseme 10 µl do zkumavky 3.
 - d) do další zkumavky si připravíme směs 10 µl ze zkumavky 3. a 5 µl roztoku coomassie blue

Označení zkumavky	1.	2.	3.	4.
Coomasie Blue	-	-	-	5 μ l
Fyziologický roztok	-	10 μ l	10 μ l	-
Antigen (sérum)	20 μ l	-	-	-

10 μ l 10 μ l 10 μ l

Ředění:	-	2x	4x	-
Koncentrace [g/l]:				
Celkový objem:	10 μ l	10 μ l	10 μ l	15 μ l

- Podle šablony vysekáme do gelu s protilátkou řadu pěti jamek. Do jamek nanese:
 - do prvních tří jamek 5 μ l ze zkumavek 1.-3.
 - do čtvrté jamky 5 μ l séra o neznámé koncentraci
 - do páté jamky 5 μ l naředěného kontrolního séra smíchaného s roztokem coomassie blue.
- Do elektroforetických komor nalijeme borát-fosfátový pufr, na hranici mezi katodou a anodou položíme připravená sklíčka a ze dvou protilehlých stran (od katody a anody) přiložíme na kraj gelu filtrační papír nasátý borát-fosfátovým pufrem za účelem vedení elektrického proudu.
- Každou komoru obsahující tři sklíčka zakryjeme a zapojíme elektrický obvod tak, aby do každé elektroforetické komory vedl proud o velikosti 60 mA (20 mA na sklíčko). Elektroforéza bude probíhat cca 1 hodinu, přičemž její průběh budeme sledovat na séru označeném roztokem coomassie blue.
- Po skončení elektroforézy pereme skla nejvýše 2 minuty ve fyziologickém roztoku, zabalíme je do chromatografického papíru navlhčeného fyziologickým roztokem a přes noc sušíme při pokojové teplotě.
- V dalším cvičení sejmeme ze sklíček papír, skla opereme pod tekoucí vodou a barvíme barvicím roztokem do dostatečného obarvení linií. Pozadí odbarvíme diferenciačním roztokem. Nakonec opereme v destilované vodě a usušíme bez papíru.



Ukázka raketové elektroimunodifuze

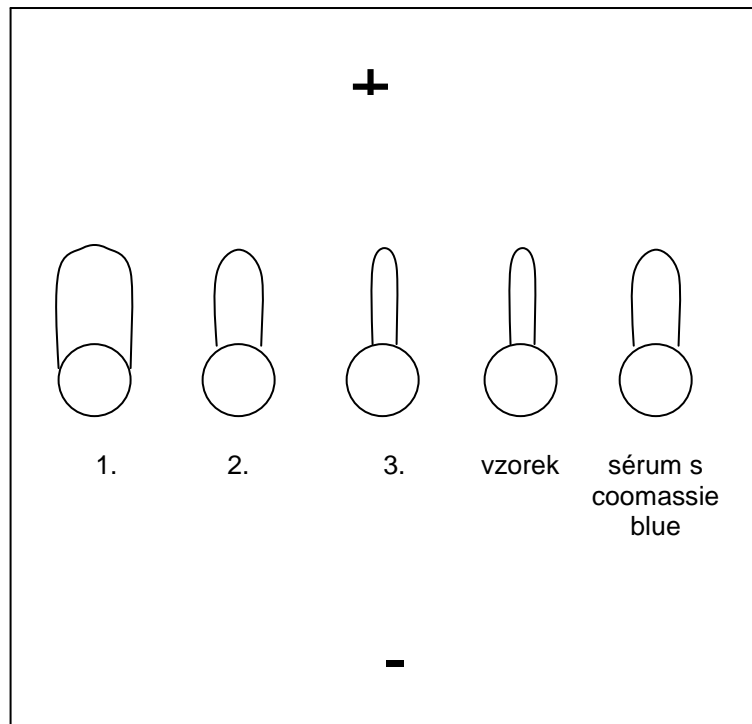
Hodnocení

Plocha raketky po odečtení startovací jamky je úměrná koncentraci antigenu. Pro zjednodušení je možné změřit pouze výšku raketky od horního okraje startovací jamky.

Změřte výšku a šířku vzniklých precipitačních útvarů a vypočítejte jejich plochu.

Hodnoty plochy precipitačních útvarů (cm^2) u prvních tří jamek vynesete do bodového grafu proti hodnotám koncentrace séra v příslušné jamce a vynesete kalibrační křivku s rovnicí regrese a hodnotou spolehlivosti

Hodnotu plochy precipitačního útvaru u čtvrté jamky (lidské sérum o neznámé koncentraci IgM) dosadíte do rovnice regrese a vypočítejte koncentraci IgM.



Výstup

- 1) Tabulku s hodnotami plochy precipitačních útvarů různých koncentrací kontrolního séra a vzorku.
- 2) Kalibrační graf závislosti plochy precipitačních útvarů na koncentraci kontrolního séra s rovnicí regrese a hodnotou spolehlivosti.
- 3) Výpočet koncentrace IgM ve vzorku lidského séra.
- 4) Oskenovaný obrázek sklíčka s precipitačními útvary (dodá vyučující).