

ÚLOHA 8: Turbidimetrické stanovení celkových Ig

Princip

Tato metoda využívá změny konformace a optických vlastností ke kterým dochází při denaturaci proteinů. Tyto změny nastávají při srážení frakce proteinů ze séra, která odpovídá imunoglobulinům, vhodnou chemikálií např. síranem zinečnatým. Výsledkem této reakce je vznik zákalu, který lze detekovat spektrofotometricky.

Výhody a nevýhody

Poměrně spolehlivá, jednoduchá a levná metoda, která vyžaduje pouze spektrofotometr s filtrem pro určitou vlnovou délku a příslušné kontrolní sérum.

Chemikálie a roztoky

1. Komerční lidské sérum s koncentrací Ig 40 g/l (Orion Diagnostica)
2. Fyziologický roztok
 $0,85 \text{ g NaCl} + 100 \text{ ml dH}_2\text{O}$
3. Roztok síranu zinečnatého (pH 5,8)
 $208 \text{ mg ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + 1000 \text{ ml dH}_2\text{O}$

Vzorek: Komerční lidské sérum s neznámým množstvím Ig (Orion Diagnostica).

Přístroje a pomůcky

Spektrofotometr pro viditelnou oblast schopný měřit při vlnové délce 590 nm.

Postup

1. Ze zásobního komerčního séra o známé koncentraci Ig si připravíme řadu ředění pro kalibraci
 - a) do 1. zkušavky napipetujeme 16 μl fyziologického roztoku
 - b) do 2.-4. zkušavky napipetujeme 10 μl fyziologického roztoku
 - c) do 1. zkušavky napipetujeme 4 μl komerčního séra o známé koncentraci
 - d) z 1. zkušavky přeneseme 10 μl do 2. zkušavky, důkladně promícháme, poté přeneseme 10 μl do 3. zkušavky, důkladně promícháme a přeneseme 10 μl do 4. zkušavky

Označení zkušavky	1.	2.	3.	4.
Fyziologický roztok	16 μl	10 μl	10 μl	16 μl
Vzorek	-	-	-	4 μl
Antigen (sérum)	4 μl	-	-	-

10 μl 10 μl

Ředění:	5x	10x	20x	-
Koncentrace:				
Celkový objem:	10 μl	10 μl	20 μl	20 μl

2. Připravíme si 5x ředění vzorek ze vzorku (séra o neznámé koncentraci Ig).
 - a) do 5. zkušavky napipetujeme 16 μl fyziologického roztoku
 - b) přidáme 4 μl séra s neznámým množstvím Ig a důkladně promícháme

3. Různé ředění zásobního séra a vzorku smícháme s roztokem síranu zinečnatého přímo na mikrotitrační destičce:
- do celého sloupečku na destičku napipetujeme 150 μ l roztoku síranu zinečnatého do každé jamky
 - napipetujeme 2,5 μ l do patřičné jamky z každé stejně označené zkumavky a důkladně promícháme.

Zkumavka		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.	A												
	B												
2.	C												
	D												
3.	E												
	F												
4. vzorek	G												
	H												
		st. 1	st. 2	st. 3	st. 4	st. 5	st. 6	st. 7	st. 8	st. 9	st. 10	st. 11	st. 12

Tab. 4. Rozvržení vzorků na společné destičce pro celou skupinu. Každý student bude mít 1 sloupec, což popisuje poslední řádek (zkratka st. = student). Vzorky se nanáší v duplikátech pod sebou.

4. Směs síranu zinečnatého a séra necháme kultivovat 2 hodiny při laboratorní teplotě.

Provádí vyučující

5. Po uplynutí dané doby směs promícháme a změříme absorbanci při vlnové délce 590 nm na spektrofotometru.

Hodnocení

Výstupem je série hodnot v tabulce, ve které jsou uvedeny hodnoty absorbance pro každou jamku. Absorbance je bezrozměrná veličina, která udává množství pohlceného světla. S tabulkou lze pracovat v excelu nebo jiném tabulkovém programu. Každý si vybere jamky ze sloupce, který pipetoval a s těmito hodnotami dále pracuje. Zprůměrujete hodnoty duplikátů a získáte 3 hodnoty absorbancí pro sestavení kalibrační křivky a hodnotu pro vzorek.

Vytvořte lineární kalibrační přímku se zobrazením rovnice regrese a hodnoty spolehlivosti. Pomocí této rovnice spočítejte koncentraci imunoglobulinů ve vzorku. Nezapomeňte operovat s patřičným ředěním.

Výstup

- Tabulka hodnot (koncentrace a absorbance) kalibračních sér a vzorku. Uveďte koncentraci imunoglobulinů v ředěném vzorku, ale i hodnotu I_g v původním neředěném vzorku.
- Bodový graf s proloženou lineární regresní křivkou, hodnotou spolehlivosti R a rovnicí regrese

ÚLOHA 9: Turbidimetrické stanovení celkových IgG

Princip

Určení lidského imunoglobulinu určité třídy je založeno na reakci mezi imunoglobuliny jako antigeny a specifickém antiseru jako protilátce, se kterou budou imunoglobuliny reagovat. Při této reakci vzniká nerozpustný imunokomplex antigen-protilátka tvořící zákal, který je měřen spektrofotometricky.

Výhody a nevýhody

Podobně jako u stanovení celkových Ig se jedná o dosti spolehlivou a jednoduchou metodu, která vyžaduje spektrofotometr s filtrem pro určitou vlnovou délku, kontrolní sérum o známé koncentraci IgG a příslušné antiserum.

Chemikálie a roztoky

1. Komerční lidské sérum s koncentrací Ig 40 g/l (Orion Diagnostica)
2. Komerční prasečí antiserum s anti-IgG protilátkami (Orion Diagnostica)
3. Fyziologický roztok
 $0,85 \text{ g NaCl} + 100 \text{ ml dH}_2\text{O}$
4. Reakční pufr (0,05M Tris)
 $6,057 \text{ g C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3 + 1000 \text{ ml dH}_2\text{O}$

Vzorek: Komerční lidské sérum s neznámým množstvím Ig (Orion Diagnostica)


Přístroje a pomůcky

Spektrofotometr pro UV oblast schopný měřit při vlnové délce 340 nm.

Postup

1. Ze zásobního komerčního séra o známé koncentraci IgG si připravíme řadu ředění pro kalibraci.
 - a) do 1. zkumavky napipetujeme 20 μl séra
 - b) do 2.-3. zkumavky napipetujeme 10 μl fyziologického roztoku
 - c) z 1. zkumavky přeneseme 10 μl do 2. zkumavky, důkladně promícháme, poté přeneseme 10 μl
 - d) do 3. zkumavky a důkladně promícháme.

Označení zkumavky	1.	2.	3.
Fyziologický roztok	-	10 μl	10 μl
Vzorek	-	-	-
Antigen (sérum)	20 μl	-	-



	1.	2.	3.
Ředění:	-	2x	4x
Koncentrace:			
Celkový objem:	10 μl	10 μl	20 μl

2. Smícháme antigen (řada ředění séra o známé koncentraci IgG a vzorek) s protilátkou (antisérum s anti-IgG) a reakčním pufrém
 - a) přímo na destičku napipetujeme napřed 2,5 µl kalibračního séra nebo vzorku
 - b) poté napipetujeme multikanálovou pipetou do každé jamky 25 µl antiséra
 - c) nakonec do všech jamek napipetujeme multikanálovou pipetou po 150 µl reakčního pufru do každé jamky a pořádně promícháme špičkou.

Zkumavka		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kalibračka	1.	A											
		B											
	2.	C											
		D											
	3.	E											
		F											
	4. vzorek	G											
		H											
		st. 1	st. 2	st. 3	st. 4	st. 5	st. 6	st. 7	st. 8	st. 9	st. 10	st. 11	st. 12

Tab. 5. Rozvržení vzorků na společné destičce pro celou skupinu. Každý student bude mít 1 sloupec, což popisuje poslední řádek (zkratka st. = student). Vzorky se nanáší v duplikátech pod sebou.

3. Mikrotitrační destičku inkubujeme minimálně 10 minut při 37 °C, aby se stihly vytvořit imunokomplexy.
4. Po uplynutí dané doby ještě jednou promícháme a změříme absorbanci při vlnové délce 340 nm.

Hodnocení

Výstupem je série hodnot v tabulce, ve které jsou uvedeny hodnoty absorbance pro každou jamku. Absorbance je bezrozměrná veličina, která udává množství pohlceného světla. S tabulkou lze pracovat v excelu nebo jiném tabulkovém programu. Každý si vybere jamky ze sloupce, který pipetoval a s těmito hodnotami dále pracuje. Zprůměrujte hodnoty duplikátů a získáte 3 hodnoty absorbancí pro sestavení kalibrační křivky a hodnotu pro vzorek.

Vytvořte lineární kalibrační přímkou se zobrazením rovnice regrese a hodnoty spolehlivosti. Pomocí této rovnice spočítejte koncentraci imunoglobulinů ve vzorku.

Výstup

- 1) Tabulka hodnot (koncentrace a absorbance) kalibračních sér a vzorku. Uveďte koncentraci imunoglobulinů v ředěném vzorku, ale i hodnotu Ig v původním neředěném vzorku.
- 2) Bodový graf s proloženou lineární regresní křivkou, hodnotou spolehlivosti R a rovnicí regrese