

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
3. Roztok síranu zinečnatého (pH 5,8)

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 do dvojice připravíme řadu ředění pro kalibraci
 - a) do 1. zkušební zkumavky napipetujeme 16 μ l fyziologického roztoku
 - b) do 2.-4. zkušební zkumavky napipetujeme 10 μ l fyziologického roztoku
 - c) do 1. zkušební zkumavky napipetujeme 4 μ l komerčního séra o známé koncentraci
 - d) z 1. zkušební zkumavky přeneseme 10 μ l do 2. zkušební zkumavky, důkladně promícháme, poté přeneseme 10 μ l do 3. zkušební zkumavky

Označení zkumavky	1.	2.	3.	4.
Fyziologický roztok	16 μ l	10 μ l	10 μ l	16 μ l
Vzorek	-	-	-	4 μ l
Antigen (sérum)	4 μ l	-	-	-

10 μ l 10 μ l

Ředění:				
Koncentrace:				
Celkový objem:	10 μ l	10 μ l	20 μ l	20 μ l

2. Připravíme si 5x ředění vzorek ze vzorku (séra o neznámé koncentraci Ig).
 - a) do 5. zkušební zkumavky napipetujeme 16 μ l fyziologického roztoku
 - b) přidáme 4 μ l 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 roztoku do patřičné jamky z každé stejně označené zkumavky a důkladně promícháme.

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

Tab. 4. Rozvržení vzorků na společné destičce pro celou skupinu. Každá dvojice bude mít 1 sloupec.

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. 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. Nezapomeňte operovat s patřičným ředěním.

Výstup

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

ÚLOHA 9: Turbidimetrické stanovení celkových IgG

Princip

Určení lidského imunoglobulinu konkrétní třídy je založeno na reakci mezi imunoglobuliny jako antigeny a specifickým antisérum 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 antisérum.

Chemikálie a roztoky

1. Komerční lidské sérum s koncentrací IgG 18 g/l (Orion Diagnostica)
2. Komerční prasečí antisérum s antiHuman-IgG protilátkami (Orion Diagnostica)
3. Fyziologický roztok
4. Reakční pufr (0,05M Tris)

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 μ l séra
 - b) do 2.-3. zkumavky napipetujeme 10 μ l fyziologického roztoku
 - c) z 1. zkumavky přeneseme 10 μ l do 2. zkumavky, důkladně promícháme
 - d) poté přeneseme 10 μ l do 3. zkumavky a důkladně promícháme.

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



Ředění:			
Koncentrace:			
Celkový objem:	10 μ l	10 μ l	20 μ l

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 μ l kalibračního séra nebo vzorku
 - b) poté napipetujeme multikanálovou pipetou do každé jamky 25 μ l antiséra

- c) nakonec do všech jamek napipetujeme multikanálovou pipetou po 150 μ l 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											
	2.	B											
	3.	C											
	4. vzorek	D											
	E												
	F												
	G												
	H												

Tab. 5. Rozvržení vzorků na společné destičce pro celou skupinu. Každá dvojice bude mít 1 sloupec.

- Mikrotitrační destičku inkubujeme minimálně 10 minut při 37 °C, aby došlo k vytvoření imunokomplexů.
- 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. 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

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