

1 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 difúze 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. Obě složky spolu interagují a dochází k lýze bakterií lysozymem, projevující se jako vyčeření v okolí jamky. Aktivitu lysozymu odráží velikost plochy, ve které došlo ke změně zakalení 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)
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. Rozpuštěno v borátovém pufru.
4. Borát-fosfátový pufr (BFP)

Vzorek: myší sérum, sliny, hemolymfa bource morušového
Myší sérum získáme z předchozích cvičení.

Přístroje a pomůcky

Skleněná plotna 5 x 5 cm, Petriho misky na vlhkou komůrku, borát-fosfátový pufr, korkovrt napojený na vývěvu – na vysekávání agarových ploten, filtrační papír, polystyrenové zkumavky (V=2,5 ml)

Připravíme předem:

1. Příprava mikrokoka:
 - a) *Micrococcus luteus* (dříve *M. lysodeicticus*) naočkujeme na misku a inkubujeme 24 – 48 hod.
2. Příprava skleněných desek:
 - a) očistíme skla alkoholem
 - b) na vodní lázni rozvaříme 1,2% agarózu v borát-fosfátovém pufru (budeme-li chtít nalité plotny uchovávat delší dobu, přidáme několik kapek merthiolátu pro konzervaci)
 - c) do agarózy přidáme mikrokoka pomocí kličky (cca 30 mg na 10 ml)
 - d) důkladně promícháme a pipetujeme 2,4 ml na skla 5x5 cm umístěné na absolutně vodorovné ploše. Necháme ztuhnout.
 - e) Z Petriho misky a vlhkého filtračního papíru připravíme vlhkou komůrku

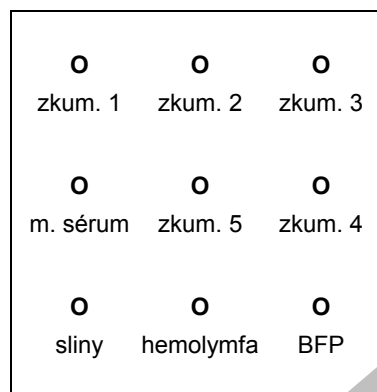
Postup (vlastní práce):

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

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

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

2. Korkovrtem napojeným na vývěvu vysekáme do agarózy jamky dle šablony:



3. Do každé jamky napipetujeme 2,6 µl vzorku podle schématu v bodě 2.
4. Desky inkubujeme 48 hodin ve vlhké komůrce při 4 °C.
5. Lyzozym difunduje do okolí jamek a lyzuje bakterie v gelu, čímž dochází k vyčeření gelu. Pomocí speciálního měřítka SEVAC odečteme druhé mocniny poloměrů 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, vypočítejte koncentraci a aktivitu lysozymu v jednotlivých ředěních a v jednotlivých vzorcích (slzy, sliny, hemolymfa). Doplňte do tabulky v postupu.

Výstup

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

1) Uveďte tedy tabulku s hodnotami:

1. Druhá mocnina průměrů 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).

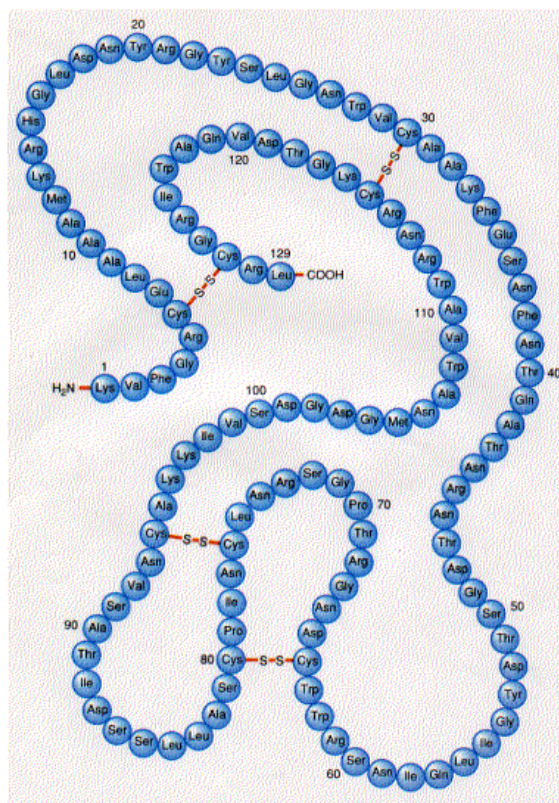
3) Sloupcový graf s porovnáním koncentrace lysozymu ve vzorcích slz, slin a hemolymfy.

Rozšiřující informace o Lyzozymu

Obecná charakteristika

Lyzozym je protein o velmi malé molekulové hmotnosti (14,6 kDa), který se skládá z jediného polypeptidového řetězce tvořeného 129 jednotkami. Vnitřní stabilitu zajišťují disulfidické můstky. Jedná se o důležitý enzym s antibakteriálním účinkem, který byl objeven v roce 1922 (Alexander Fleming). Vyskytuje se uvnitř speciálních lytických váčků, nebo je součástí přímo specializovaných buněčných organel (lyzozomů), ale nachází se také např. v granulích leukocytů. U člověka je lyzozym obsažen v krevním séru a ve velkém množství v tělních sekretech: mléko, moč, slzy, sliny, hlen. Obecně tento nespecifický humorální faktor nacházíme u bezobratlých i obratlovců, ale uvolňuje se např. i ze základní desky bičíku bakteriofága, čímž dochází k perforaci hostitelské buňky (a podruhé se uplatňuje, když se nové bakteriofágy dostávají z buňky ven).

Lyzozym se izoluje z vaječného bílku, kde se také ve velkém množství nachází, a v případě infekčních procesů dutiny ústní nebo hltanu ho lze podávat jako antiseptikum v podobě tablet (Larypront, Heinrich Mack Nachf., GMBH & CO. KG).



Mechanismus účinku

Lyzozym je bazický polypeptid enzymatické povahy, který se uplatňuje při rozkladu polysacharidu mureinu tím, že štěpí β -1,4-glykosidickou vazbu, která spojuje zbytky n-acetylglukosaminu a kyseliny n-acetylmuramové.

Murein (peptidoglykan) je základní stavební součástí buněčné stěny bakterií, jeho polysacharidové řetězce obsahují střídavě zbytky n-acetylglukosaminu a kyseliny n-acetylmuramové, na jejíž karboxyl je navázán řetězec 4 aminokyselin v pořadí L alanin, D glutamová kyselina, libovolná aminokyselina a D alanin. Jednotlivé tetrapeptidové řetězce jsou vzájemně propojeny, a právě účinkem lyzozymu z mureinu vznikají disacharidové jednotky. Inhibiční aktivita tohoto enzymu je nejsilnější proti grampozitivním bakteriím, kterým chybí vnější membrána. Gramnegativní bakterie mohou být vystaveny působení lyzozymu teprve po poškození nebo odstranění vnější membrány, např. prostřednictvím nisinu (narušuje membránu), EDTA nebo citrátu s chelatačním účinkem, kdy na sebe tyto látky váží vápenaté ionty, a tím naruší stabilitu lipopolysacharidů v membráně.

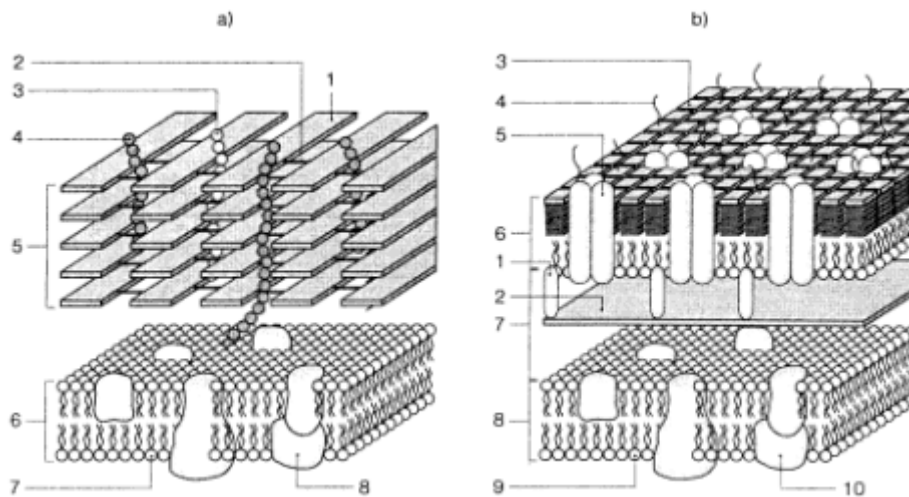
Působení látek na buněčnou stěnu bakterií

Bakterie mají (na rozdíl od živočišných buněk) cytoplazmatickou membránu krytou buněčnou stěnou, která se u jednotlivých kmenů liší svou stavbou, tloušťkou i kvalitou. Buněčná stěna je pro život bakterií velmi důležitá - je nezbytná pro jejich přežití, udržuje tvar buňky a zabezpečuje optimální vnitřní prostředí (vysoký intracelulární tlak). Poškození buněčné stěny nebo inhibice tvorby některé z komponent vedou k poruše její funkce, což může způsobit až lýzi buňky. Většina struktur bakteriální buněčné stěny se nevyskytuje v organismu člověka, proto je buněčná stěna pro inaktivaci mikroorganismu vhodným místem. Inhibice syntézy buněčné stěny je hlavním mechanismem účinku celé řady antibiotik (peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy, karbapenemy, vankomycin, bacitracin). Lyzozym buněčnou stěnu z vnějšku hydrolyzuje.

Buněčná stěna **grampozitivních** bakterií (G+) o síle 20-80 nm je tvořena převážně silnou peptidoglykanovou vrstvou (15-20 nm), přičemž samotný murein představuje 10-50 % suché hmotnosti celé bakterie. K účinku antibiotik i lyzozymu jsou G+ bakterie velmi citlivé.

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.