

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 20 g/l
2. Fyziologický roztok
3. Roztok 0,7 mM síranu zinečnatého (pH 5,8): 20,8 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ + 100 ml dest. H_2O

Vzorek: Komerční lidské sérum s neznámým množstvím Ig.


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 10 μ l komerčního séra
 - b) do 2. - 3. zkušební zkumavky napipetujeme 5 μ l fyziologického roztoku
 - c) z 1. zkušební zkumavky přeneseme 5 μ l do 2. zkušební zkumavky, důkladně promícháme, poté přeneseme 5 μ l do 3. zkušební zkumavky

Označení zkumavky	1.	2.	3.
Fyziologický roztok		5 μ l	5 μ l
Vzorek	-	-	-
Antigen (sérum)	10 μ l	-	-



Ředění:	Konc.	2x	4x
Koncentrace:	17 g/l	8,5 g/l	4,25 g/l
Celkový objem:	5 μ l	5 μ l	10 μ l

2. Různé ředění kalibračního séra a vzorek smícháme s roztokem síranu zinečnatého přímo na mikrotitrační destičce:
 - a) do čtyř jamek (tři jamky pro ředěné sérum a jednu pro vzorek) jednoho sloupce na destičce napipetujeme po 150 μ l roztoku síranu zinečnatého do každé jamky
 - b) napipetujeme 2,5 μ l roztoku do patřičné jamky z každé stejně označené zkuševky a důkladně promícháme.
3. Směs síranu zinečnatého a séra necháme kultivovat 0,5-2 hodiny při laboratorní teplotě.
4. 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. 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.

Výstup

- 1) Tabulka hodnot (koncentrace a absorbance) různých ředění kalibračního séra a vzorku. Uveďte koncentraci imunoglobulinů ve vzorku.
- 2) Bodový graf s proloženou lineární regresní křivkou, hodnotou spolehlivosti R a rovnicí regrese.

ÚLOHA 9: Turbidimetrické stanovení celkových IgM

Princip

Určení lidského imunoglobulinu konkrétní třídy je založeno na reakci mezi imunoglobuliny jako antigeny a specifickém antiséru 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 IgM a příslušné antisérum.

Chemikálie a roztoky

1. Komerční lidské sérum s koncentrací IgM 2 g/l
2. Fyziologický roztok
3. Reagent A (fosfátový pufr)
4. Reagent BC (naředěné komerční prasečí antisérum s antiHuman-IgM protilátkami (Orion Diagnostica))

Vzorek: Komerční lidské sérum s neznámým množstvím IgM.


Přístroje a pomůcky

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

Postup

1. Ze zásobního komerčního séra o známé koncentraci IgM si připravíme řadu ředění pro kalibraci.

Označení zkumavky	1.	2.	3.
Fyziologický roztok	-	25 μ l	25 μ l
Antigen (sérum)	50 μ l	-	-


25 μ l 25 μ l

Ředění:	Konc.	2x	4x
Koncentrace:	2 g/l	1 g/l	0,5 mg/l
Celkový objem:	25 μ l	25 μ l	50 μ l

2. Smícháme antigen (řada ředění séra o známé koncentraci IgM a vzorek) s protilátkou (antisérum s anti-IgM) a reakčním pufr
 - a) přímo na destičku napipetujeme do čtyř jamek po 90 μ l Reagent A
 - b) poté napipetujeme do každé jamky 10 μ l reagent BC
 - c) nakonec do všech jamek napipetujeme z příslušné zkumavky 20 μ l kalibračního séra nebo vzorku

3. Mikrotitrační destičku inkubujeme minimálně 10 minut při 37 °C, aby došlo k vytvoření imunokomplexů.
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. 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.
- 2) Bodový graf s proloženou lineární regresní křivkou, hodnotou spolehlivosti R a rovnicí regrese