

Imunologie cvičení

Imunodifúzní metody Stanovení lysozymu

MVDr. Mgr. Monika Dušková, Ph.D.

Metoda imunodifúze

Stará metoda, různé možnosti uspořádání a využití – tabulka.

Dříve pro stanovení protilátek, hemolytické aktivity komplementu, nyní hlavně stanovení lysozymu

1 složka rozpuštěna v gelu, druhá složka se nanáší do jamek a difunduje

| | V gelu | V jamce | Výsledek reakce |
|---|-----------------------------|----------------------|--------------------------------------|
| 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 |

Lysozym je látka enzymatické povahy. Rozkládá polysacharid murein, který je základní komponentou buněčných stěn bakterií, zejména G^+ .

Výskyt:

u obratlovců - sliny, krevní sérum, mléko moč, pot, cytoplazma fagocytů

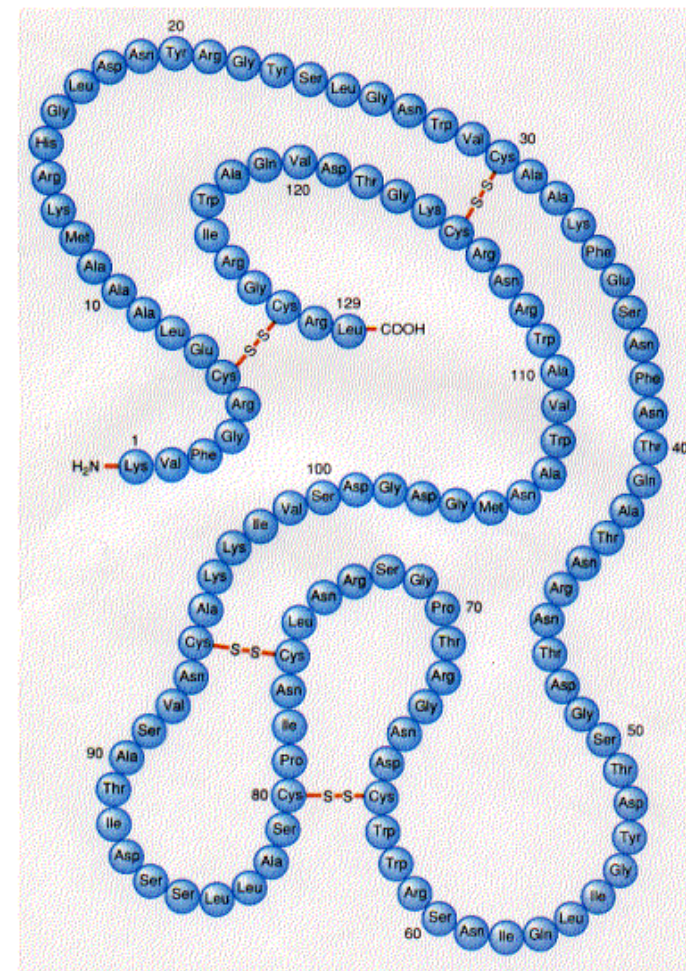
u bezobratlých v hemolymfě

u rostlin např. *Papaya latex*, *Ficus*

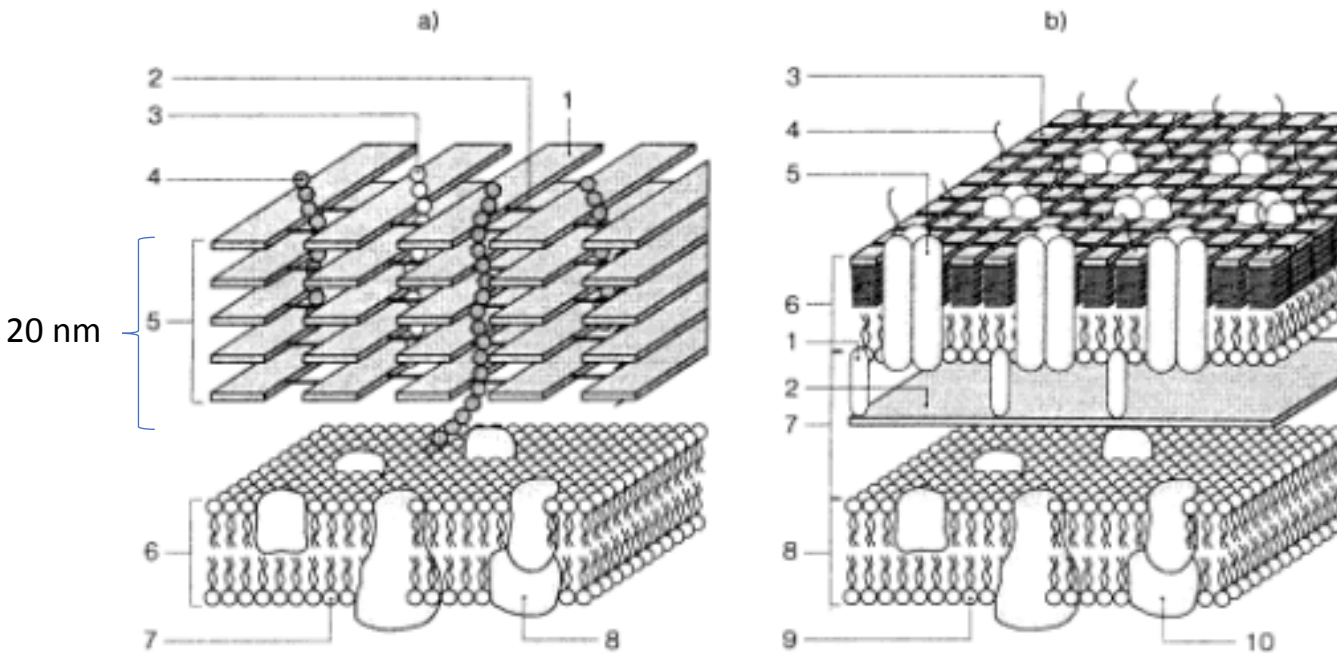
u bakteriofágů v základní destičce bičíku

Vysoký obsah je ve vaječném bílku - z něj výroba

- objeven v roce 1922 Alexandrem Flemingem
- malá molekulová hmotnost (14,6 KDa)
- jeden polypeptidový řetězec tvořený 129 aminokyselinami
- disulfidické můstky, sekvence je známá.



Účinek na buněčnou stěnu 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

Lysozym rozkládá polysacharid murein tím, že štěpí β -1,4-glykosidickou vazbu, která spojuje zbytky n-acetylglukósamínu a kyseliny n-acetylmuramové.

Vysoce účinný proti grampozitivním bakteriím, kterým chybí vnější membrána. Gramnegativní bakterie mohou být vystaveny působení lysozymu teprve po poškození nebo odstranění vnější membrány (laktoferinem).

Princip metody a provedení

V agarozovém gelu je rozsuspendedována bakterie *Micrococcus luteus* – mírný zákal

Do gelu se vysekají dírky (jamky) a do nich se nanáší:

- kalibrační roztoky čistého lysozymu (zkum 1-5)
- měřené vzorky

Inkubace do doby vytvoření projasněných koleček

Změření průměru (druhá mocnina) projasněných koleček

Konstrukce kalibrační přímky a z její rovnice výpočet obsahu lysozymu

Množství lysozymu lze vyjadřovat: jako **koncentraci (mg/ml)**

nebo **v jednotkách enzymatické aktivity U (do protokolu obojí)**

