

Vliv enzymatického natrávení krvinek BROMELINEM na citlivost serologického stanovení antigenů krevního systému ABO.

Teoretický úvod:

Antigeny krevního systému ABO jsou molekuly glykoproteinů vázané v membránách červených krvinek.

krevní skupina	antigen v membráně erytrocytů
A	A
B	B
O	H
AB	A i B

Podstatou sérologického stanovení těchto antigenů je *aglutinace* – *shlukování* erytrocytů, kdy reaguje antigen v membráně erytrocytů s příslušnou protilátkou označovanou jako *anti A*, *anti B* nebo *lektin* v případě antigenu H.

Výsledkem vzájemné reakce erytrocytárního antigenu a příslušné protilátky je *aglutinace* a reakci hodnotíme jako pozitivní, když shluk krvinek je pevný a nelze ho roztřepat.

Bromelin hydrolyzuje peptidické vazby v membránách erytrocytů a tímto způsobem membránu „natráví“. Z fyzikálního hlediska se jedná o snížení povrchového napětí membrány.

Důsledkem je zesílení některých interakcí antigen – protilátka, v našem případě by se účinkem bromelinu měla zvýšit intenzita aglutinace erytrocytů. Krvinky natrávené bromelinem by tedy měly být citlivější k působení příslušných protilátek, tj. aglutinace by se měla projevovat i při větším zředění protilátek, než tomu bude u krvinek neovlivněných bromelinem.

Cíl práce:

srovnat míru aglutinace erytrocytů ovlivněných bromelinem s aglutinací neovlivněných erytrocytů

Postup, pomůcky:

Pracujeme v rukavicích !!! *Dbáme na pečlivé značení všech zkumavek – krevní skupinu i číslo zkumavky (ředění), pro potřeby inkubace je nutno zkumavky značit navíc také vlastní značkou své pracovní skupinky.*

1. fyziologický roztok pro červené krvinky – 0,85% NaCl
2. 3% suspenze erytrocytů krevních skupin A, B, O ve fyziologickém roztoku – již připraveno
3. 3% suspenze erytrocytů hydrolyzovaných (natrávených) bromelinem – nutno připravit:
 - do malých eppendorfek s 20 µl 0,5% bromelinu přidáme 180 µl erytrocytární suspenze (z bodu 2).
 - zkumavky inkubujeme 10 – 15 minut při 37°C.
 - centrifugujeme při 1000 ot., cca 30 sec, opatrně odsajeme supernatant, k sedimentu erytrocytů na dně eppendorfky přidáme 180 µl fyziologického roztoku, opět centrifugujeme a odsajeme, celkem 3 x, čímž ze suspenze erytrocytů důkladně vymyjeme bromelin. Po posledním promytí přidáme 180 µl fyz. roztoku a tímto máme připravenou 3% suspenzi natrávených erytrocytů.
4. připravíme si zkumavky s protilátkami, ve kterých budeme provádět aglutinaci.
Protilátky anti A, anti B ředíme geometrickou řadou 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256
Lektin ředíme 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32

celkem připravíme 2 sady po 15 aglutinačních zkumavkách:

anti A (5 zkumavek), anti B (5 zkumavek), lektin (5 zkumavek) pro krvinky bez bromelinu
anti A (5 zkumavek), anti B (5 zkumavek), lektin (5 zkumavek) pro krvinky s bromelinem

Zkumavky značíme vždy A 1 až A 5, B 1 – B 5, H 1 – H 5.

Zásobní roztoky pro anti A, anti B i lektin (anti H) jsou již připraveny, způsob ředění protilátek pro krvinky s bromelinem i bez bromelinu je stejný.

Anti A	1	2	3	4	5
Ředění	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Pipetovat	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
	zás. r.	zás. r.	r. 2	r. 3	r. 4
		+	+	+	+
		200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
		fyz. r.	fyz. r.	fyz. r.	fyz.r.

Anti B	1	2	3	4	5
Ředění	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Pipetovat	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
	zás. r.	zás. r.	r. 2	r. 3	r. 4
		+	+	+	+
		200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
		fyz. r.	fyz. r.	fyz. r.	fyz.r.

Lektin	1	2	3	4	5
Ředění	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Pipetovat	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
	zás. r.	zás. r.	r. 2	r. 3	r. 4
		+	+	+	+
		200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
		fyz. r.	fyz. r.	fyz. r.	fyz.r.

Z 5. zkumavky vždy odebereme 200 μ l, aby objem byl ve všech zkumavkách stejný a to 200 μ l,

5. do takto naředěných protilátek přidáme vždy po 20 μ l příslušné erytrocytární suspenze: do prvních tří řad bez bromelinu, do druhých tří řad s bromelinem

Dáváme erytrocyty A do anti A, B do anti B, 0 do lektinu (anti H)

6. zkumavky inkubujeme 10 minut při 37°C, poté centrifugujeme půl minuty při 1000 ot. Po lehkém protřepání odečítáme aglutinaci.

7. do závěru vyhodnotíme citlivost reakce, (tj. uvedeme při kterém ředění byla reakce ještě pozitivní) a zhodnotíme vliv bromelinu na citlivost reakce.

