

Imunoblotting

- **SOUTHERN BLOTTING**

- vyvinut v r. 1970, k detekci DNA, molekuly DNA se přenášejí z agarózového gelu na membránu k nalezení části sekvence DNA či konkrétního genu v genomu

- **NORTHERN BLOTTING**

- slouží k detekci RNA
- přenos nám umožňuje zjistit přítomnost, nepřítomnost a relativní množství specifických RNA sekvencí

- **WESTERN BLOTTING**

- slouží k detekci bílkovin
- touto metodou dokážeme najít jednu bílkovinu v množství jiných, přičemž určit i délku daného proteinu
- je závislá na použití velmi kvalitních Ab zaměřených na vybranou bílkovinu

Podstatou blottingu: izolovaná látka (obvykle separovaná) se přenáší na membránu.

Podle typu přenosu se bloty liší:

- **Difúzní blotting:** v přenosovém pufru
- **Vakuový blotting:** přenos pomocí vakua
- **Kapilární blotting:** přenos kapilárními silami přes filtrační papír
- **Tankový elektroblotting:** k přenosu využito el. pole (2-3l pufru), na boku nádoby - elektrody
- **„Semi dry“ blotting:** využití plošných elektrod (100 ml)
- **Kapkovací dot blotting:** bílkoviny nejsou rozseparovány – imobilizace jednotlivých vzorků

Používané membrány:

- **Nylonová** – elektrostatická interakce
- **PVDF** (polyvinylen difluoridová) – hydrofilní interakce
- **Nitrocelulosová** – hydrofilní interakce

WESTERN BLOT

3 kroky: **1. SDS PAGE** (gradientová elektroforéza) **2. BLOTTING** **3. IMUNODETEKCE**

SDS PAGE

Nejpoužívanější metodou je PAGE – SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti **SDS** (sodium dodecyl sulphate). Umožňuje následné určení relativních molekulových hmotností jednotlivých proteinových frakcí.

Polyakrylamidové gely se připravují kopolymerací polymerů – **akrylamidu** a ***N,N'*-methylen-bis-akrylamidu (BISu)**.

Polymerací akrylamidu vznikají dlouhé řetězce polymerů, zařazení BISu způsobuje zesílení „můstky“, které vznikají z bifunkčních zbytků BISu. Vytvořená polyakrylamidová matice nese elektrický náboj a je chemicky dost inertní. Pro stanovení M_r se používá SDS detergent.

Vlastnosti: homogenní, hydrofilní, výborné mechanické vlastnosti, nízká elektroosmóza a nízká absorpce

- **SDS** – **sodium dodecylsulfát** – TENZID, váže se v poměru 1,4 g SDS/ 1 g bílkoviny

■ dílí bílkovinám **UNIFORMNÍ** náboj, její vlastní náboj pozbude významu a dělení může probíhat podle velikosti molekul.

Molekula určitého proteinu postupuje v gelu až do momentu, kdy velikost pórů je menší než velikost molekuly a ta se v tomto místě gelu „zasekne“.

Použitím směsi standardních bílkovin se známou M_r a po sestrojení kalibrační křivky je možné vypočítat M_r jednotlivých frakcí

- **WESTERN BLOTTING**

Blotovacím zařízením pro semi-dry blotting přeneseme rozdělené proteiny pomocí el. proudu.

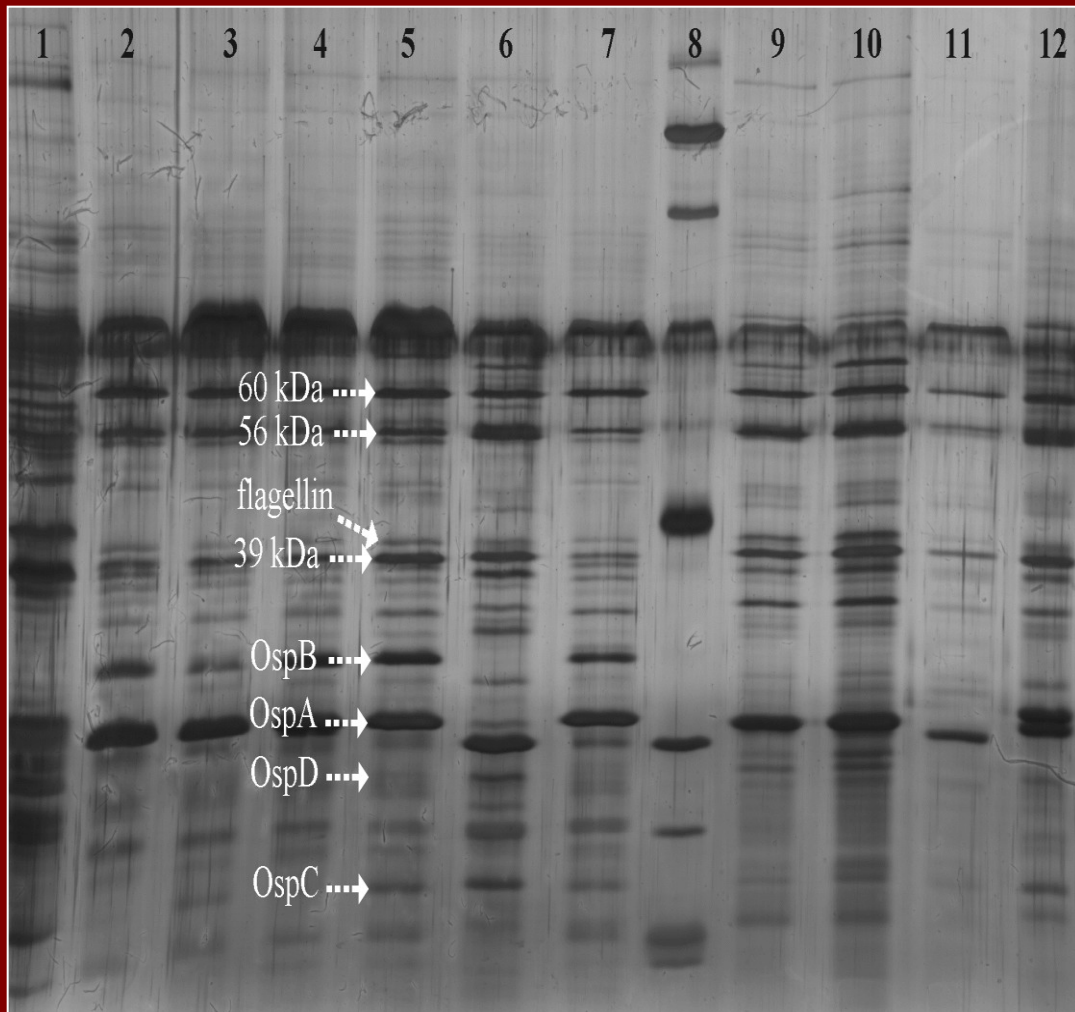
- Sestavíme blotovací zařízení pro semi-dry blotting
- Na grafitovou elektrodu umístíme filtr. Papíry navlhčené transferovým pufrem, pak nitrocelulózovou membránu, gel s proteiny a další navhčené filtr. Papíry
- Přiložíme elektrody a zapojíme ke zdroji

- **IMUNODETEKCE**

- Z membrány odřízneme sjezd s proteinovými standardy a obarvíme amidočerní, propláchneme v prom. roztoku
- Inkubace s primární protilátkou v blokov. roztoku
- a následně se sekundární protilátkou v blokovacím roztoku.
- Promyjeme a vložíme do substrátového roztoku, dokud se neobjeví bandy (barví se proteiny)
- Vyvolávání ukončíme namočením membrán do vodovodní vody,

Výsledky PAGE analýzy

SDS-gradient PAGE proteinový profil



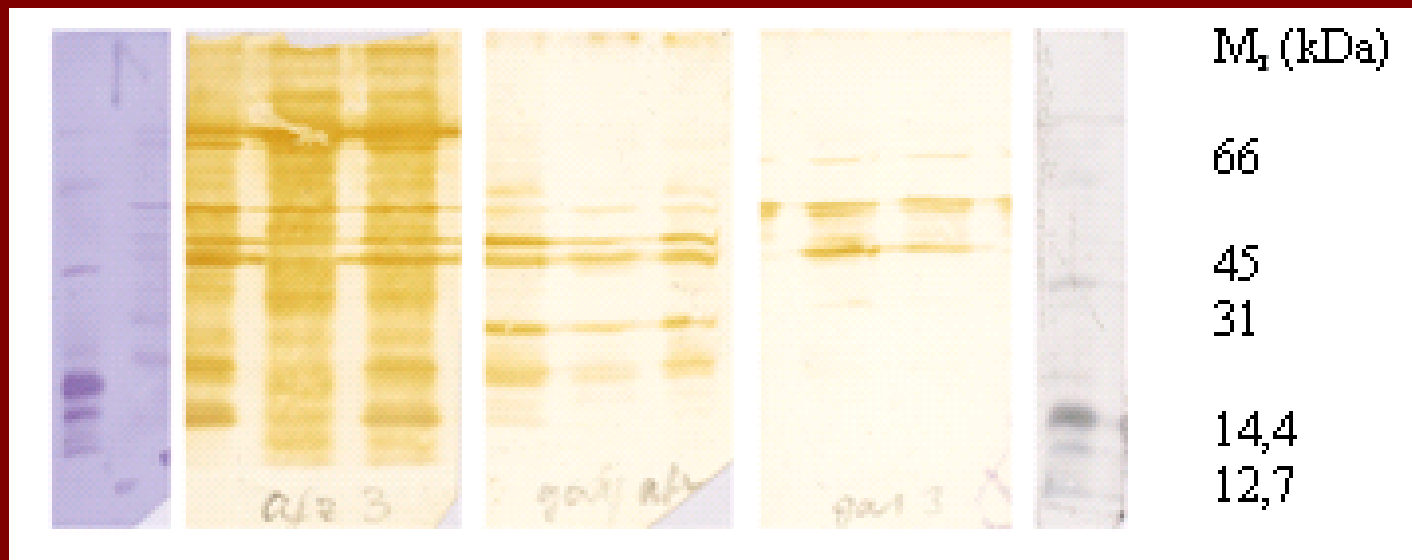
denzitometricky

Legenda:

Z gelu se mohou
rozeznat typické
rozdíly mezi

- *B. afzelii* a *B. garinii*
(linie 5, Linie 6)

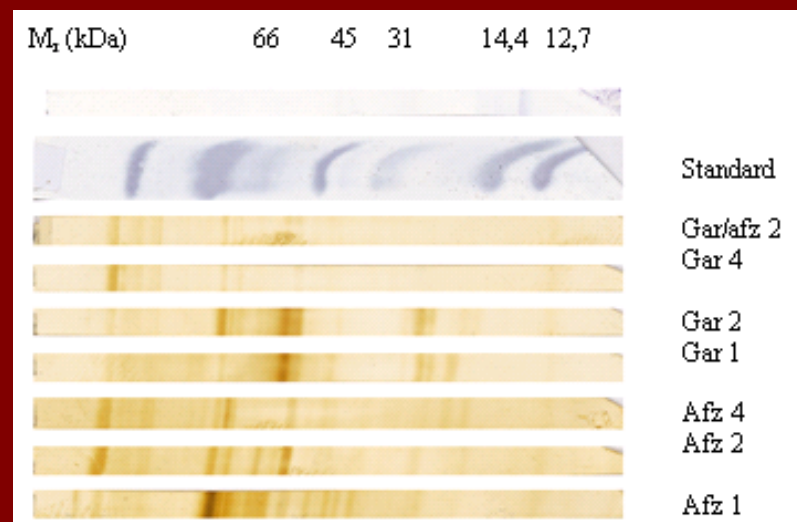
- spirochetou (linie 1)
izolovanou z larvy *Culex*
(*C.*) *pipiens pipiens* a *B.*
afzelii (linie 2) izolovaná
z imaga *Culex* (*C.*)
pipiens molestus



Nitrocelulózová membrána s antigenem *B. garinii*, *afzelii*, směs

Nitrocelulózová membrána

Na každé části membrány jsou postupně nanášeny antigeny *B. afzelii*, *B. garinii* a směs obou antigenů. Text na spodní části membrány reprezentuje antigen, který byl použit při imunizaci pokusného jedince. Po obou stranách membrán jsou zachyceny standardy, podle kterých byly odečítány molekulové hmotnosti neznámých vzorků sér.



Nitrocelulózová membrána s antigenem *B. garinii*, *afzelii*, směs

- **Úskalí:**

1. akrylamid je jedovatý
2. dostatečné napětí při blottingu
3. vlhké prostředí v pufru, aby gel nevyschl
4. gel pořádně zatuhnout a bez bublin
5. elfo od $-$ k $+$, gel na $-$, membr. na $+$

Imunochemické metody

- Je to praktická realizace poznatků imunologie, radiochemie, enzymologie a fotometrie a dalších.
- Vznik imunochemických diagnostických metod:
V průběhu 70-80tých let s rozvojem klinické imunologie, virologie, farmakologie a dalších oborů
- Zvýšily se nároky na rychlost a kvalitu požadovaných laboratorních vyšetření. Klade se důraz na vysokou citlivost, specifitu a možnost automatizace.
- Do té doby sloužily k detekci Ag a Ab klasické metody: KFR, neutralizace Ag pomocí specifické Ab, světelná či elektronová mikroskopie, prostá či elektroforetická imunodifuze, které byly nahrazeny imunochemickými metodami: FIA, RIA, EIA a další

- *stanovení Ag či Ab v histologických preparátech, tělních tekutinách, a jiných vzorcích, Imunoeseje, reakce třetí generace.*
základem je reakce:



-jeden z reaktantů nese značku a tím je vizualizován výsledek. Detekční systém tak zvyšuje citlivost reakce a umožňuje modifikace, které prostou precipitací reakce nejsou dosažitelné.

Druhy reakcí:

-enzym EIA, EMIT enzyme multiplied immunoassay technique

-geneticky upravený enzym CEDIA

-radioizotop RIA

-fluorescenční látka FIA

-chemiluminiscenční látka LIA

- **Antigeny *Ag*** – makromolekuly (polymery: proteiny, polypeptidy...)
- navozují specifickou imunitní odpověď
- specificky reagují s protilátkami
- haptén – nízkomolekulární látka (léčiva, drogy) navázána na vysokomolekulární nosič
- **Protilátky *Ab*** – bílkoviny (glykoproteiny) tělních tekutin
- vykazují specifickou vazebnou schopnost vůči antigenu, na jehož podnět se vytvořily, mohou být cíleně připravené
- jen proti **jedné chemické skupině**
- **kteřá je společná pro více strukturně chemicky příbuzných látek**

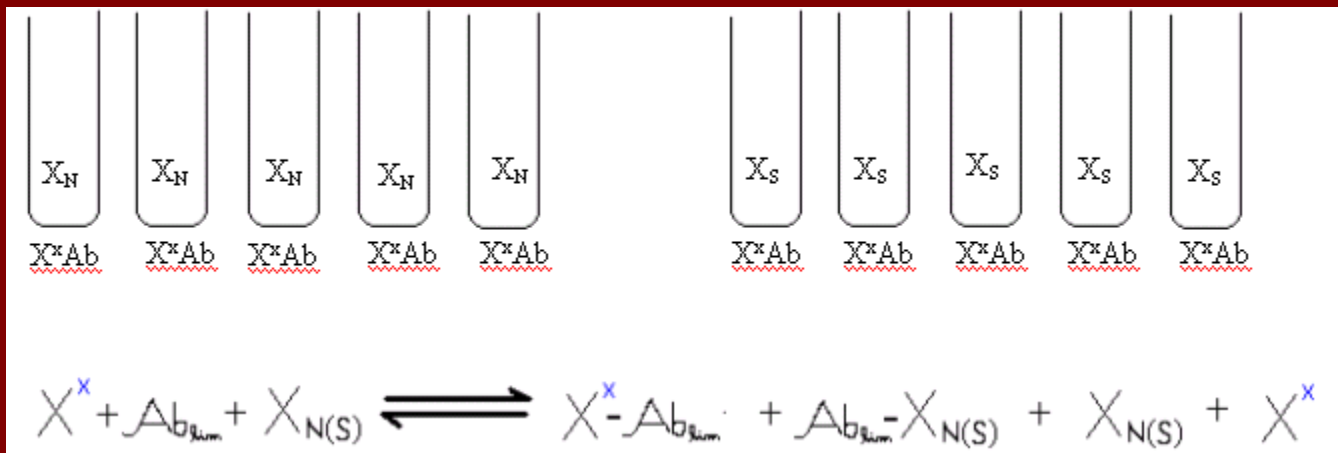
Imunochemické metody

- ***Heterogenní imunometody*** – separace molekul značeného reagens vázaného v imunokomplexu od volných molekul značeného reagens v roztoku (radioimunometody, ELISA) – vysoká citlivost
- ***Homogenní imunometody*** – bez separace frakcí, jsou jednodušší, rychlejší, lze je automatizovat (enzymová, fluorescenční a chemiluminiscenční imunoanalýza)

RIA ~ radioimmunoassay

- zavedena 1959
- **Princip metody:** spojuje jednoduchou imunologickou reakci Ag s Ab s metodikami radiochemie, která používá Ag nebo Ab značené radionuklidy
- - citlivost: 10^{-9} - 10^{-17} mol/l ████████ lmi významné, nejcitlivější
- - je možné stanovovat látky i v tělesných tekutinách */krev, moč, mozkomíšní mok.../* i více než v pg 10^{-12} (pikogramech)
- - stanovujeme ***jakékoliv látky, proti nimž lze vytvořit protilátku***
- protilátku získáme komerčně nebo injikací Ag či haptenu do králíka nebo morčete

- POSTUP:
- V metodě je využito kompetice, kdy stanovený Ag a známé mn. téhož Ag značeného radioaktivním izotopem soutěží při tvorbě imunokomplexu o omezený počet vazebných míst specifické Ab (ta je v lim. množství)
- ↪ **imunizace** ■ příprava Ab:
 - - injekce **Ag** či **haptenu** do zvířete /králík, morče/
 - - *nekompletní Ag – je potřeba navázat makromolekulární nosič*
 - ✨ **značení radioaktivním prvkem** (Ag = X...značka)
 - - 3 prvky: ^3H , ^{14}C , ^{125}I , ^{131}I
 - - označený Ag ■ x
 - ✨ **vlastní reakce:**
 - - 4 složky:



Xx.....značený Ag

Ab lim60%.....protilátka ze zvířete /je limitováno ■ známo její množství/

XN.....neznámý antigen

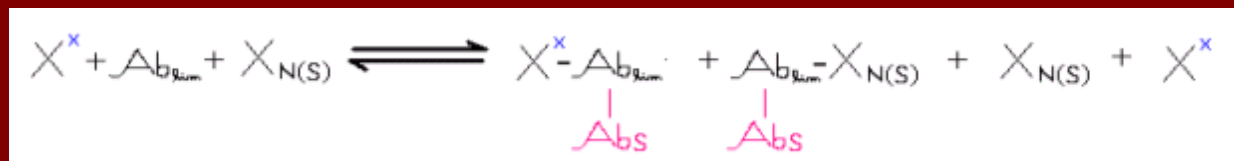
XS.....standardní antigen

☞ **oddělení IK:**

■ **imunochemické** – sekundární protilátka **Abs**

- vyrobí se proti prvotní protilátce Ab ■ Ab pak vystupuje jako Ag

■ Abs + Ab ...vznikají sraženiny IK

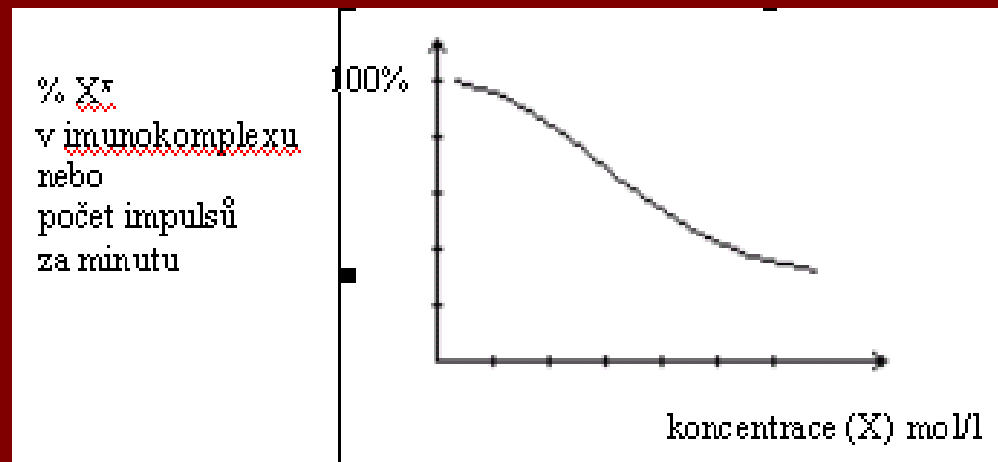


- **izolace IK** -imunochemicky – Abs, **fyzikálně** - *filtrace, centrifugace...*
molekulární metody – elektroforéza, chromatografie ...

☞ **vyhodnocení:**

- čím **více molekul X** se bude v každé zkumavce nacházet, tím **méně molekul Xx** se bude moc **navázat s protilátkou**

Vyhodnocení:



- **výhody:** ■ vysoká citlivost, specifčnost, přesnost, automatizace procesů
■ mikromnožství látek přímo v biologických kapalinách

- **nevýhody:** ■ nákladné zařízení, drahé přístroje, drahá scintilační tekutina
■ radioaktivní materiál – zdravotní riziko, γ nebo β záření, zvl. bezpečnost při práci, likvidace radioakt. materiálu

■ vlastnosti radionuklidů ■ znehodnocování krátkým poločasem rozpadu – časová náročnost (musí se provést hned), u izotopů vydávajících γ záření (^{125}I , ^{131}I , ^{75}Se) je omezena expirace souprav krátkým poločasem rozpadu

využití:

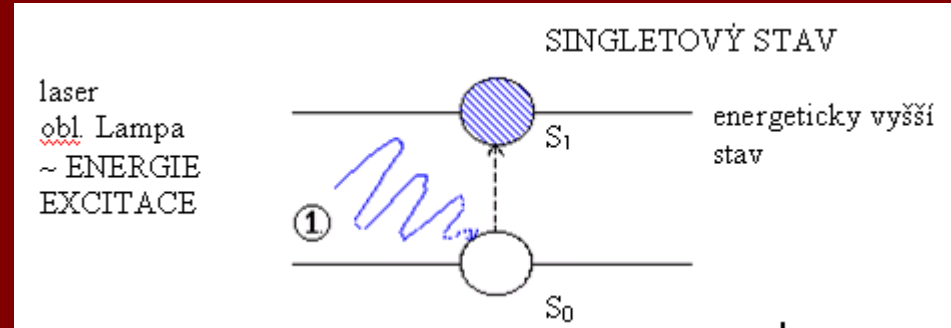
- využití v kriminalistice, soudním lékařství (detekce jedovatých látek), stanovování velmi malého množství látek (nízko i vysokomolekulárních) např.: kardiotonika, cytostatika (léčba infekčních onemocnění, nádorových onemocnění), hladiny hormonů, léčiv, vitamínů, drogy, minoritních složek séra, ve virologické diagnostice, vyšetření specif. autoprotilátek např. proti acetylcholinovému receptoru při *myastemia gravis*,
- v alergendiagnostice: **RAST** test (**radioallergensorbent test**) je vyvinutý pro detekci Ab proti specifickému alergenu, **RIST** test (**radioimmunosorbent test**) je testem vyvinutým pro zjištění antigenu, **Radioimunoprecipitace** je pokládána za nejpřesnější metodu pro stanovení IgE v sérech

FIA

- Vypracována v r. 1941, uvedena do praxe v 50. letech
 - **Princip:** navázáním fluoresceinu – fluorochromu na bílkovin séra (Ag nebo Ab), podmínkou je neztratit imunologické vlastnosti. Výsledkem je spojení vysoké specifity imunologických reakcí s citlivostí průkazu fluorescence pomocí fluorescenčního mikroskopu- citlivost: 10^{-9} - 10^{-12} mol/l
 - **fluorescenční barviva:** TMRITC.....tetramethylrodaminizothiokyanát
 - FITCfluorescein izothiokyanát, PE ...phycoerythrin
 - - podstata: molekula přechází **ze základního energetického stavu** při absorbování energie do stavu **EXCITOVANĚHO**, kde je **nestabilní** a **vyzářením energie** ve formě tepla či světla (emise) se **vrací zpět**
 - - energie dodána lampou v přístroji
 - **vlastnosti SONDY:**
 - **intenzita fluorescence** dostatečně vysoká
 - **fluorescenční signál odlišitelný** od pozadí
 - **vazba na sondu nesmí deformovat vazebné vlastnosti** Ag a Ab
 - **nenavázané barvivo musí být lehce odstranitelné**
- ! biologický materiál sám o sobě vyzařuje energii** **pozadí**
- ★ **HOMOGENNÍ FIA**
 - ★ **HETEROGENNÍ**

• FLUORESCENCE

- třístupňový proces u FLUOROFORŮ a FLUOROCHROMŮ
- schopny absorbovat určité množství světla /struktura – ar. kruh/
- 1. FÁZE **EXCITACE**



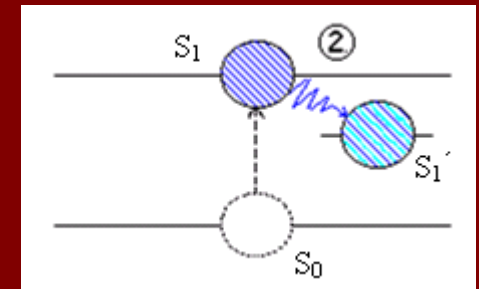
2. FÁZE **ROZPAD EXCITOVANÉHO STAVU**

- trvá 10^{-9} s velmi krátká

konformační změna

disipace energie část energie se ztrácí

– přechází na nižší stav

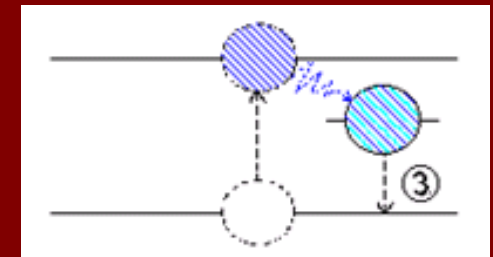


3. FÁZE **EMISE**

- vyzáření energie, přechází na základní stav

vyzáření **EMISNÍ ENERGIE**

energie emisního spektra/



energie **EXCITAČNÍ** se **NEROVNÁ** **EMISNÍ** !!!

$$E_{ex} = h \cdot (c/\lambda_x) \quad E_{em} = h \cdot (c/\lambda_m)$$

$\lambda_x < \lambda_m$. délka excitační je menší než emisní

- **FUNKCE FLUOROFORŮ :**
- Mají schopnost absorbovat světlo v UV oblasti a vyzařovat ve viditelné.
- Jsou vhodné k vizualizaci sledovaných objektů. Jsou látky schopné vyzařovat (emitovat) přebytečnou E jako záření vyšší vlnové délky. Na konjugaci jsou vhodné pouze fluorochromy obsahující chemickou skupinu, která se pevně váže na bílkovinu. (Specificky se váží na určité struktury v BB) možná jejich zviditelnění a další analýzu vyšší fluorescence = více fluoroforu = více látky v BB)
- - **background fluorescence** fluorescence pozadí – je nežádoucí, musí se odfiltrovat
- - 2 složky : **AUTOFLUORESCENCE** samotného vzorku /flavony, flavoprot., NADH.../
- **REAGENČNÍ POZADÍ** / fluorofor se naváže tam, kam nemá /
- **Pozitivní reakce:** se jeví ve fluoresc. mikroskopu vyzařováním světla určité barvy typické pro použitý fluorochrom, zvýší se fluorescence v případě vzniku IK na rozdíl od pozadí Ag s navázaným F, či jiným způsobem se upřednostní vznik signálu v případě vzniku IK

- heterogenní techniky
- homogenní techniky
- **Homogenní FIA**
- nevyžaduje separaci volného a v imunokomplexech vázaného Ag či Ab před měřením fluorescence.
- Citlivost je omezována interferencí s různými látkami ve vzorku (zejména v krevním séru), malý stupeň fluorescenčních změn.
- **Podstata:** kompetitivní princip, využívá se fluorescenční polarizace, zhášení, stupňované fluorescence, excitační přenos fluorescence, fluorescenčně značený substrát.
- **Heterogenní FIA**
- **Podstata:** volné označené Ag se musí oddělit od Ag vázaných v imunokomplexech (nebo volné značené Ab od Ab v komplexech) ještě před uskutečněním měření.
- **Oddělení:**
- precipitací imunokomplexů,
- použitím značeného reaktantu Ag nebo Ab vázaného v tuhé fázi

- **Heterogenní FIA**
- Mikroskopická IFA má 2 modifikace: 1. Přímá a 2. nepřímá IFA patří mezi heterog. techniky
- **Přímá**
- **a) detekce Ag**
- Vyšetřovaná tkáň je fixovaná na sklíčku (Ag), přidáme známou značenou protilátku AbF, inkubujeme a promyjeme. Ve fluorescenčním mikroskopu pak pozorujeme pozitivitu vzorku - záření na sklíčku
- $\text{Ag} + \text{AbF} \rightarrow$ měření fluorescence
- **b) detekce Ab**
- známý značený Ag nebo haptén fixován na sklíčku, HF nebo AgF převrstvíme vyšetřovaným sérem. Po inkubaci a promytí pozorujeme sklíčko pod fluor. mikroskopem
- $\text{AgF}, \text{HF} + \text{Ab} \rightarrow$ měření fluorescence
- **Nepřímá – průkaz Ab ve vyšetřovacím séru**
- Tkáň se známým Ag nebo buněčná kultura (suspenze jader. buněk) fixovaná na sklíčku převrstvíme vyšetřovaným sérem i kontrolními vzorky, následuje inkubace a promytí. Přidáme konjugát (sekund. Ab) s fluorochromem, opět inkubujeme a promyjeme a pak pozorujeme v mikroskopu
- $\text{Ag} + \text{Ab} + \text{AbSF} \rightarrow$ měření fluorescence