

ÚLOHA Č.4: IMUNOCHEMICKÉ METODY

(studenti pracují ve skupinách)

A) IMUNODOTTING

Imunodotting je analytická metoda využívaná pro detekci specifických proteinů ve směsi, např. ve vzorku homogenátu tkáně či jiného biologického materiálu. Samotná detekce probíhá na povrchu membrány (nejčastěji nitrocelulosoové) pomocí specifických protilátek.

V prvních krocích dochází k nanesení směsi proteinů (v kapkách) na membránu, na které je po jejich vazbě nutné všechna volná vazebná místa zablokovat. To se provádí pomocí blokovacího pufru (zředěný roztok běžného proteinu), který znemožní nespecifickou vazbu protilátky na prázdný povrch membrány, a tedy získání falešně pozitivního výsledku. Následnou inkubací membrány se specifickými (primárními) protilátkami dochází ke tvorbě imunokomplexů, které lze detekovat dvojím způsobem:

1. za použití další (sekundární) protilátky - protilátky proti celé škále primárních protilátek, která je konjugována s enzymem (nejčastěji křenovou peroxidasou, HRP),
2. za použití primární protilátky, která je již konjugována s enzymem, umožňující jedнокrokovou detekci vzniklého imunokomplexu.

Komplex je zviditelněn enzymovou reakcí, při které dochází po přidavku substrátu (v případě HRP se jedná o H_2O_2) ke vzniku barevného produktu.

Úkol: Pomocí metody immunodotting stanovte proteiny s oligohistidinovou kotvou v buněčném lyzátu

Roztoky:

TBS pufr: 50 mM Tris/HCl, pH=7,4

Blokovací pufr: 4 % sušené netučné mléko v TBS

Barvicí roztok: PONCEAU S

Roztok anti-oligohistidinových protilátek (ředění 1: 2000 v TBS pufru)

Roztok substrátu: 4-chloro-1-naftol (3 mg/ml methanolu) v TBS pufru

DOTTING

V mikrotitrační destičce geometrickou řadou nařed'te:

Vzorek č. 1 - buněčný lyzát *E. Coli* obsahující rekombinantní protein CV-IIL s oligohistidinovou kotvou a Vzorek č. 2 – prostý buněčný lyzát *E. Coli*.

Od druhé jamky dále si nachystejte po 25 µl TBS pufru. Do první jamky pipetujte 50 µl Vzorku č. 1 a pokračujte v ředění 25 µl z první jamky do 25 µl TBS pufru ve druhé jamce, promíchat a z druhé jamky přenést 25 µl do třetí jamky, atd. ...

Na 2 nitrocelulosoové membrány pipetujte (po 5 µl) jednotlivé vzorky vzniklé ředěním Vzorku č. 1. Vedle pipetujte vzorky vzniklé ředěním Vzorku č. 2. Jako negativní kontrolu napipetujte 5 µl Vzorku č. 3 (BSA).

První membránu použijte pro stanovení všech proteinů pomocí barvy PONCEAU S. Druhou membránu použijte pro specifickou imunochemickou detekci rekombinačního proteinu CV-III s oligohistidinovou kotvou.

1) Barvení bílkovin

Nitrocelulosoovou membránu promyjte 3x destilovanou vodou a vložte ji do roztoku PONCEAU S na 5 minut. Pozadí odbarvěte 3x promytím v 3% kyselině octové.

2) Imunodetekce

Blokování

Membránu s nanesenými vzorky vložte do blokovacího roztoku a nechte míchat 15 minut.

Inkubace s protilátkou

Promyjte membránu 3x TBS pufrem a následně vložte membránu do roztoku protilátek a nechte inkubovat za stálého míchání 1 hodinu. Membrána musí být plně ponořena do roztoku protilátky. Po 1 hodině promyjte 3x TBS pufrem.

Detekce komplexu antigen-protilátka enzymatickou reakcí (křenová peroxidasa)

Připravte detekční směs:

5 ml methanolického roztoku 4-chloro-1-naftolu doplňte do 30 ml TBS pufrem. přidejte 20 µl H₂O₂.

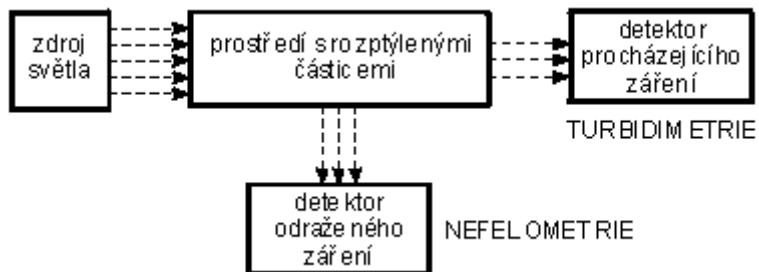
Vložte membránu do detekční směsi a nechte vyvíjet. Modré zbarvení by se mělo objevit do 5 minut.

Do protokolu uveďte princip imunodottingu, fotku membrán s popisem a zhodnocením výsledku barvení a imunodottingu. Výsledek zdůvodněte.

B) IMUNOTURBIDIMETRIE

Kromě absorpce může při průchodu světla vzorkem, pokud jde o disperzní nebo koloidní soustavu, docházet i k jeho rozptylování. Tohoto jevu se využívá v optické metodě zvané turbidimetrie - optická metoda spočívající v měření procházejícího světla zeslabeného difúzním rozptylem na částicích (zákalu), při které se měří intenzita světla procházejícího vzorkem v původním směru paprsku. Naopak nefelometrie je optická metoda založena na měření intenzity rozptýleného světla na dispergovaných částicích. Rozptýlené (Tyndallové) světlo vychází z roztoku všemi směry a měří se pod úhlem, který je odlišný od směru dopadajícího záření.

Turbidimetrické měření lze uskutečnit pomocí obvyklého fotometrického vybavení a úbytek světla rozptylem při průchodu vzorkem se dá snadno popsat pomocí absorpance a dalších veličin obvyklých ve fotometrii. Množství rozptýleného světla závisí na koncentraci a velikosti částic a také na vlnové délce světla.



Turbidimetrie se nejčastěji využívá v imunochemických metodách k vyhodnocování imunoprecipitačních reakcí, při kterých zákal tvoří imunitní komplexy vytvořené interakcí specifických protilátek s antigenem – analytem.

Matematický popis zákalu (turbidity) - T - lze vyjádřit rovnicí:

$$T = (1/b) \cdot \ln(I_0/I),$$

kde b je tloušťka kyvety, I_0 počáteční intenzita světelného paprsku, I intenzita paprsku po průchodu suspensí částic (imunitních komplexů).

Transferin

Transferin, nebo-li siderofilin, je bílkovina krevní plazmy, která váže a přenáší železo v krevním oběhu do míst, kde je ho potřeba. Tento β -glykoprotein je vytvářen v játrech a může vázat dva atomy Fe^{3+} , čímž zajišťuje, že se tento prvek nevyskytuje v plazmě ve volné formě. Za fyziologických podmínek je kapacita transferinu nasycena asi z 1/3, zbytek se nazývá volná vazebná kapacita séra pro železo, která je k dispozici pro transport železa při zvýšených požadavcích. Zvýšená hodnota transferinu se vyskytuje během těhotenství a při užívání hormonální antikoncepce. Zpravidla klesá s věkem.

Fyziologické hodnoty

- Muži, Ženy: 1,69 - 3,09 g/l

Snížená hodnota může indikovat

- přebytek železa v organismu (hemochromatóza, hemosideróza)
- anémii u dlouhodobých chorob a nádorových onemocnění
- dlouhodobé jaterní choroby (porucha tvorby bílkovin v játrech)
- nefrotický syndrom (onemocnění ledvin, které způsobuje ztráty bílkovin močí)
- atransferinémii (dědičná porucha tvorby transferinu)
- podvýživu (malnutrice)
- akutní zánět (transferin patří mezi tzv. negativní proteiny akutní fáze, tzn., že organismus reaguje na přítomnost zánětu v těle snížením jeho hladiny)

Zvýšená hodnota může indikovat

- nedostatek železa v organismu
- chudokrevnost z nedostatku železa
- zvýšený rozpad červených krvinek
- akutní zánět jater, aktivní cirhóza jater
- nadměrný přívod železa (opakované transfúze)
- alkoholismus

Úkol: Stanovte koncentraci transferinu ve vzorku pomocí komerčního kitu.

Před vlastním stanovením si řádně přečtěte přiložený návod.

Činidla:

Roztok 1: 35 mM imidazolový pufr pH 7; 4 % PEG, 150 mM NaCl

Roztok 2: 2 % kozí antisérum proti lidskému transferinu v 50 mM pufru HEPES pH 7,4; 9 mM EDTA

Kalibrační roztok: krevní sérum obsahující certifikovanou koncentraci lidského transferinu o koncentraci 7g/l.

Použijte tento **postup měření:**

Vlnová délka 340 nm (měřte blank proti vzduchu).

Měřte:

| | Vzorek | Standard | Reagent blank |
|--|-------------|-------------|---------------|
| Standard | - | 6 μ l | - |
| Vzorek | 6 μ l | - | - |
| Destilovaná voda | - | - | 6 μ l |
| Činidlo 1 | 750 μ l | 750 μ l | 750 μ l |
| Promíchá se a inkubuje 5 minut při 37°C. Poté se odečte absorbance A1. | | | |
| Činidlo 2 | 210 μ l | 210 μ l | 210 μ l |
| Promíchá se a inkubuje 5 minut při 37°C. Poté se odečte absorbance A2. | | | |

Do protokolu uveďte princip imunoturbidimetrie, jakým kitem bylo stanovení provedeno, tabulku naměřených hodnot a graf kalibrační závislosti absorbance na koncentraci transferinu. Okomentujte naměřené výsledky a přesnost vlastní práce.

Závěr: Do protokolu stručně shrňte všechny výsledky z tohoto cvičení.

Doplňující otázky:

- Co je to imunoprecipitace? Uveďte příklad precipitační reakce. (2 body)
- Co je to avidita a afinita protilátek? Jaký je mezi nimi rozdíl? (2 body)
- Jaké funkce plní železo v organismu? (1 bod)