

# *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'*-metylen-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.

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

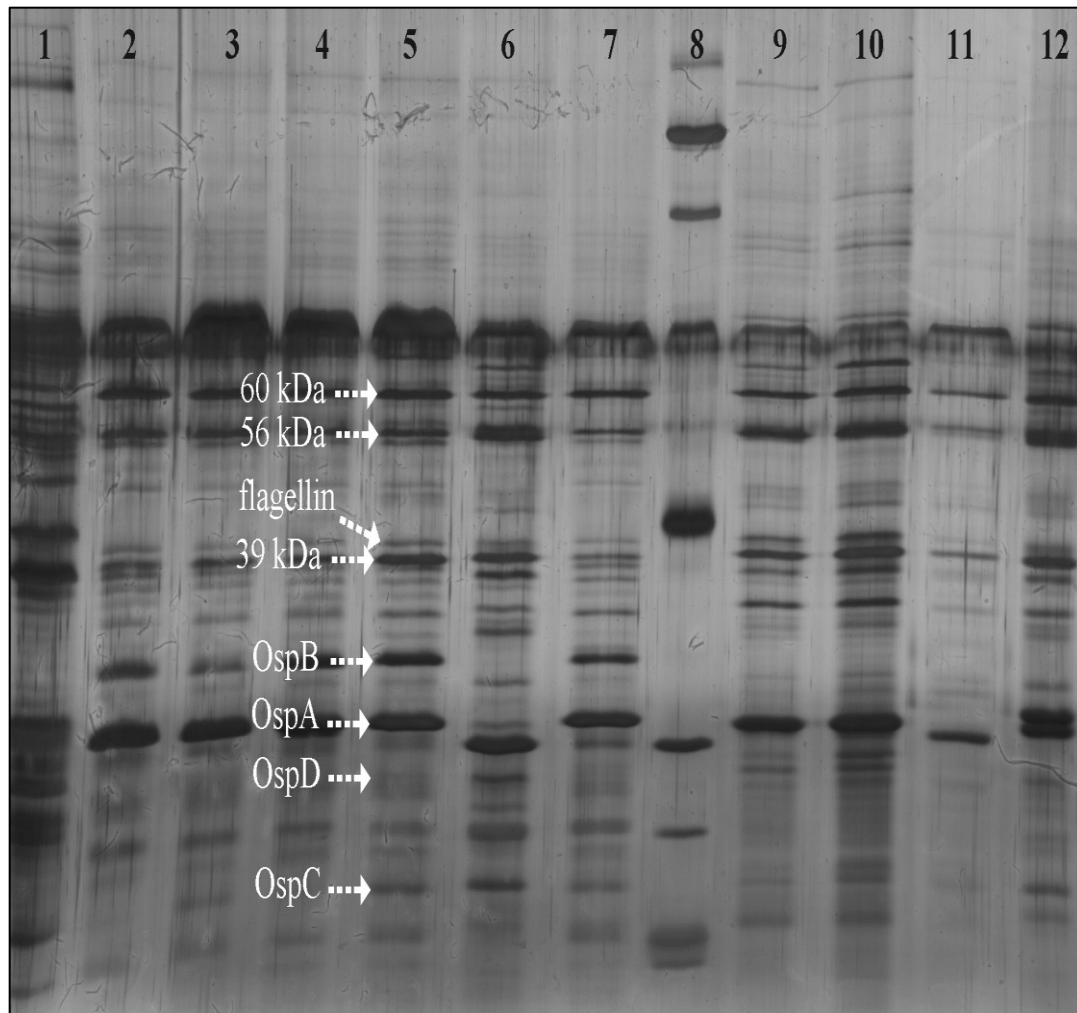
# WB

- **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



8. standard

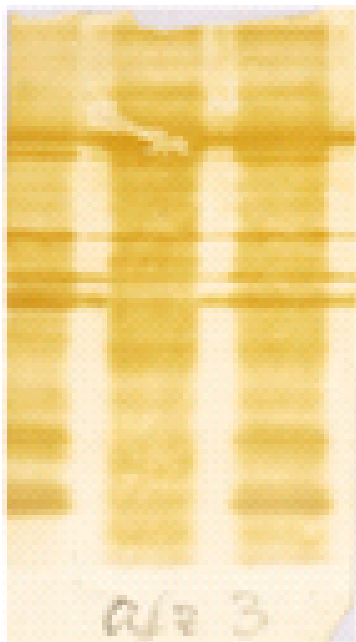
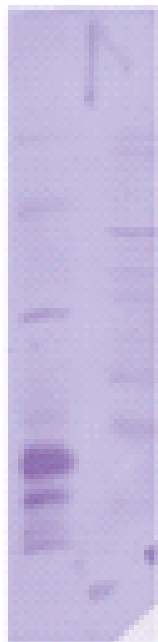
Vyhodnocení  
Denzitometricky  
**Legenda:**

**Z gelu se mohou rozeznat typické rozdíly mezi**

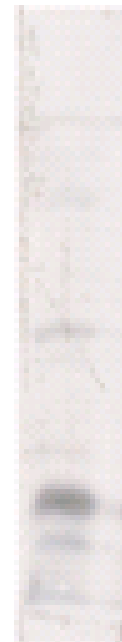
- *B. afzelii* a *B. garinii* (linie 5, Linie 6)
- spirochetou (linie **1**) izolovanou z larvy *Culex (C.) pipiens pipiens* a *B. afzelii* (linie 2) izolovaná z imaga *Culex (C.) pipiens molestus*

# WB

standard



standard



$M_r$  (kDa)

66

45

31

14,4

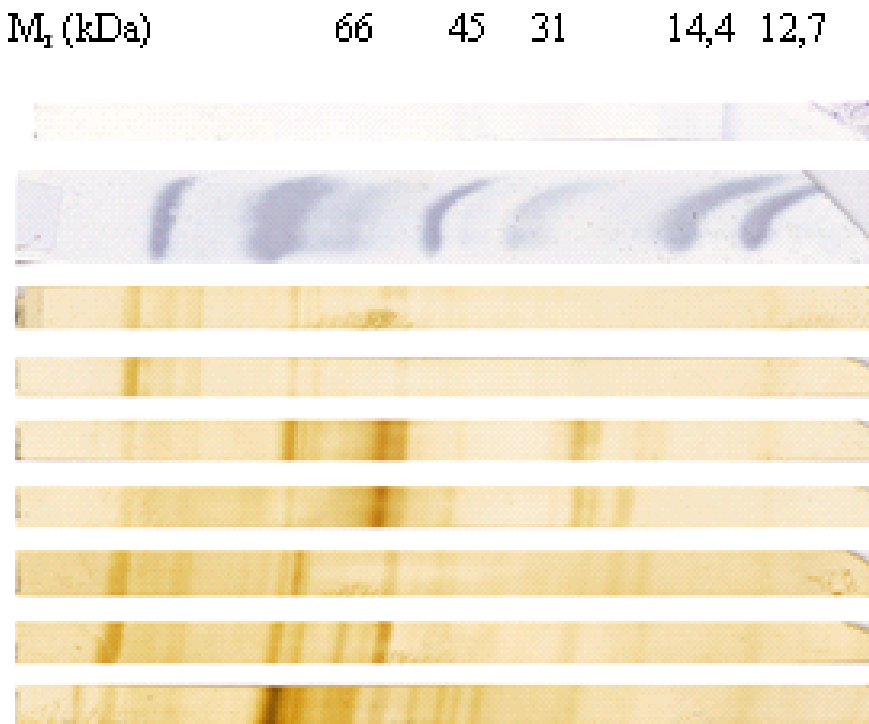
12,7

Nitrocelulózová membrána s rozděleným antigenem *B. afzelii*, směs, *B. garinii*  
metodou **SDS PAGE**

Po obou stranách membrán jsou zachyceny standardy, podle kterých byly odečítány molekulové hmotnosti neznámých vzorků sér.

# WB

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 jedné straně membrány je zachycen standard, podle kterého byly odečítány molekulové hmotnosti vzorků sér.



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



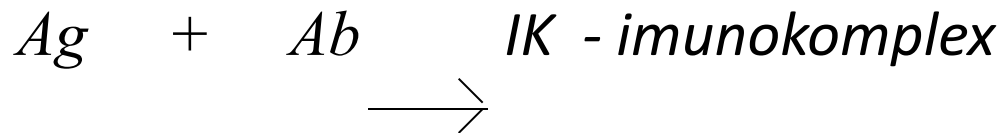
- **Úskalí:**

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, CL

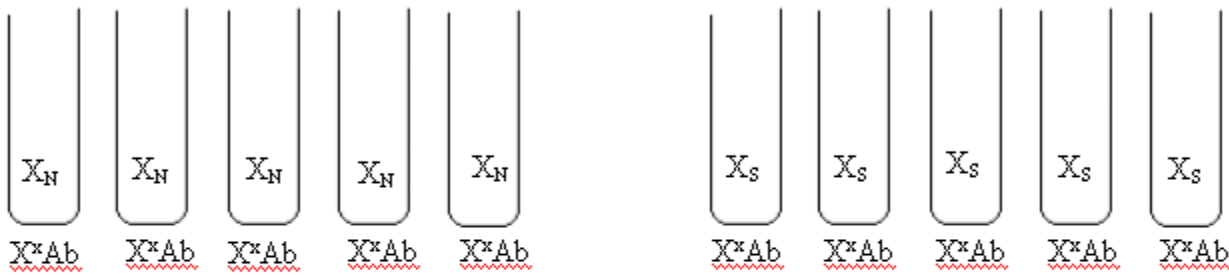
- **Antigeny *Ag*** – makromolekuly (polymery: proteiny, polypeptidy...)
  - navozují specifickou imunitní odpověď
  - specificky reagují s protilátkami
  - haptén – nízkomolekulární látka (léčiva, drogy) navázána na
    - vysokomolekulární nosič
- **Protilátky *Ab*** – bílkoviny (glykoproteiny) tělních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

# *Imunochemické metody*

- ***Heterogenní imunometody*** – oddělení volných molekul značených reaktantů (Ag, Ab, H, Abs) od značeného reaktantu vázaného v imunokomplexu, intenzita značené reakce se nemění, stanovení makromolekulárních látek (radioimunometody, ELISA) – vysoká citlivost
- ***Homogenní imunometody*** – bez separace frakcí, intenzita značené reakce se mění, stanovení nízkomolekulárních látek, 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 → velmi 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 injekcí Ag či haptenu do králíka nebo morčete
- **značení radioaktivním prvkem** (Ag = X...značka)
- - 3 prvky:  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$
- - označený Ag → **Xx**
- **vlastní reakce:**
- - 4 složky:



**Xx**.....značený Ag

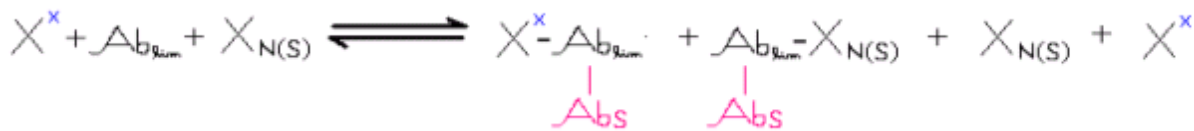
**Ab lim 60%**.....protilátka ze zvířete /je limitováno ~ známo její množství/

**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



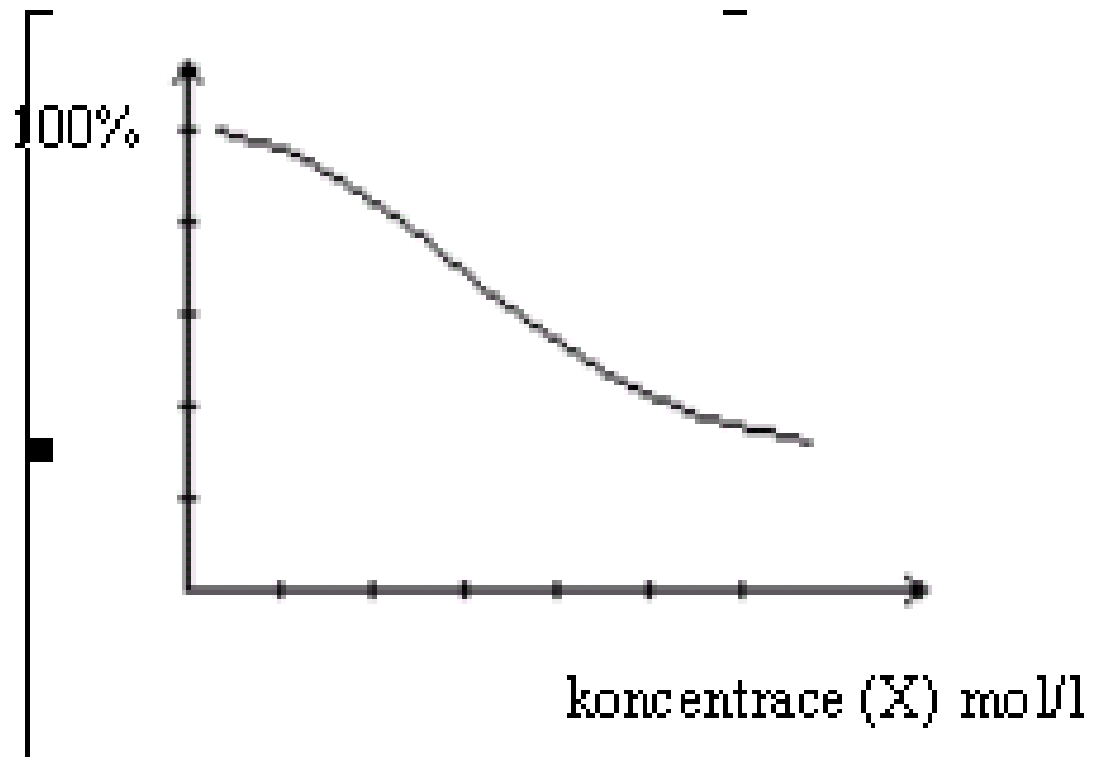
- **izolace IK** -imunochemicky – Abs, **fyzikálně** - filtrace, centrifugace...  
**molekulární metody** – elektroforéza, chromatografie ...

**vyhodnocení:**

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

## Vyhodnocení:

%  $\Sigma X^*$   
v imunokomplexu  
nebo  
počet impulsů  
za minutu





# RIA

- **- výhody:** \* vysoká *citlivost, specifčnost, přesnost, automatizace procesů*
- \* *mikromnožství* látek přímo v biologických kapalinách
- **nevýhody:**
- \* *nákladné* zařízení, drahé přístroje-scintilátory, drahá scintilační tekutina
- \* *radioaktivní materiál* – zdravotní riziko,  $\gamma$  nebo  $\beta$  záření, zvl. bezpečnost při práci, likvidace radioakt. materiálu
- \* *vlastnosti radionuklidů* ~ znehodnocování krátkým *poločasem rozpadu* – časová náročnost (musí se provést hned), u izotopů vydávajících  $\gamma$  záření ( *$^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{75}\text{Se}$* ) 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. IgE) např.: kardiotonika, cytostatika (léčba infekčních onemocnění, nádorových onemocnění), hladiny hormonů, léčiv, vitamínů, drogy, minoritních složek séra, ve virologické diagnostice, vyšetření specif. autoprotílátek 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, **Radioimmunoprecipitace** 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
  - FITC .....fluorescein izothiokyanát, PE ...phycoerythrin
- - podstata: molekula přechází **ze základního energetického stavu** při absorbování energie do stavu **EXCITOVANÉHO**, kde je **nestabilní** a **vyzářením energie** ve formě tepla či světla (emise) se **vrací zpět**
- - energie dodána lampou v přístroji

## 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  $\Rightarrow$  umožní jejich zviditelnění a další analýzu  $\sim$  vyšší fluorescence = více fluoroforu = více látky v BB)

### *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  $\rightarrow$  pozadí***

★ **HOMOGENNÍ FIA**

★ **HETEROGENNÍ**

- ***background fluorescence*** ~ fluorescence pozadí – je nežádoucí, musí se odfiltrovat, existují v podobě :
  - ● ***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

# • FLUORESCENCE

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

## • 1. FÁZE → EXCITACE

## 2. FÁZE → DOBA EXCITOVANÉHO STAVU

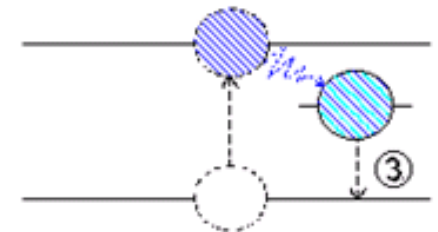
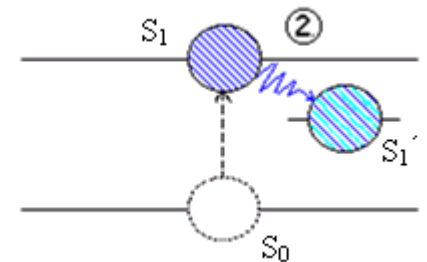
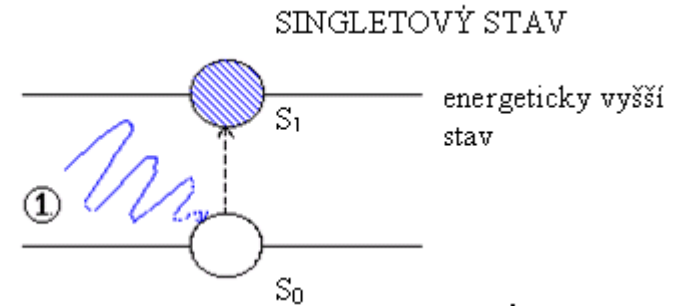
- trvá  $10^{-9}$ s ~ velmi krátká
- *konformační změna*
- *disipace energie* → část energie se ztrácí
- – přechází na nižší stav

## 3. FÁZE → EMISE

- vyzáření energie, přechází na základní stav → *vyzáření EMISNÍ ENERGIE*
- /~ energie emisního spektra/

*energie EXCITAČNÍ se NErovná EMISNÍ !!!*  
 $E_{ex} > E_{em}$                        $h \cdot (c/\lambda_{ex}) > h \cdot (c/\lambda_{em})$   
 $\Rightarrow \lambda_{ex} < \lambda_{em} \Rightarrow$  vl. délka excitační je  
menší než emisní

laser  
obl. Lampa  
~ ENERGIE  
EXCITACE



- 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 IFA***

- 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



# Heterogenní FIA

- 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
- $\text{||-AgF, HF + Ab} \rightarrow \text{||-}$  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
- $\text{||-Ag + Ab + AbSF} \rightarrow \text{||-}$  měření fluorescence

# Detekce FIA

**přístroje :**

- SPEKTROFLUOROMETR

- měří fluorescenci vztaženou na celý preparát

- FLUORESCENČNÍ MIKROSKOP

**Fluorescenční:** jako zdroj excitace využívá lampu s výbojkou pro UV záření. Obraz fluoreskujícího objektu na tmavém pozadí získáme pomocí **2 komplementárních filtrů: 1. primárního excitačního 2. sekundárního okulárového**

# FIA

- **Využití:** průkaz a titrace Ab, průkaz Ag např. ANA test – protilátky proti nukleárnímu Ag (fluorescenční reakce v oblasti jader)
- **Přímá:** k průkazu Ag v tkáňových řezech (např. deponované IK) nebo v další biolog. vzorcích pro rychlý průkaz patogenů ve sputu či bronchoalveolární laváži
- **Nepřímá:** k průkazu autoprotilátek jak a) orgánově nespecifických (antinukleárních) Ab proti mitochondriím, hladkému svalstvu b) orgánově specifických (ab proti parietálním b. žaludku,  $\beta$  buňkám pankreatu, bazální membráně glomerulů, slinným žlázám a pod)