

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 (obvykle zředěný roztok proteinů, které neinteragují s protilátkou), 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 dvojitým 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, 150 mM NaCl, pH=7,6

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-III 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 pufru. přidejte 20 µl H₂O₂.

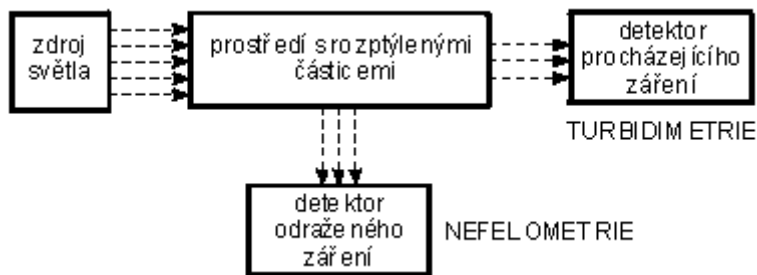
Vložte membránu do detekční směsi a nechte vyvíjet. Modré zbarvení by se mělo objevit do 5 minut.

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 květy (odpovídá l – délce optické dráhy), I_0 počáteční intenzita světelného paprsku, I intenzita paprsku po průchodu suspenzí 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:

| | 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.

C) IMUNOPRECIPITACE (hemaglutinace - stanovení krevních skupin AB0)

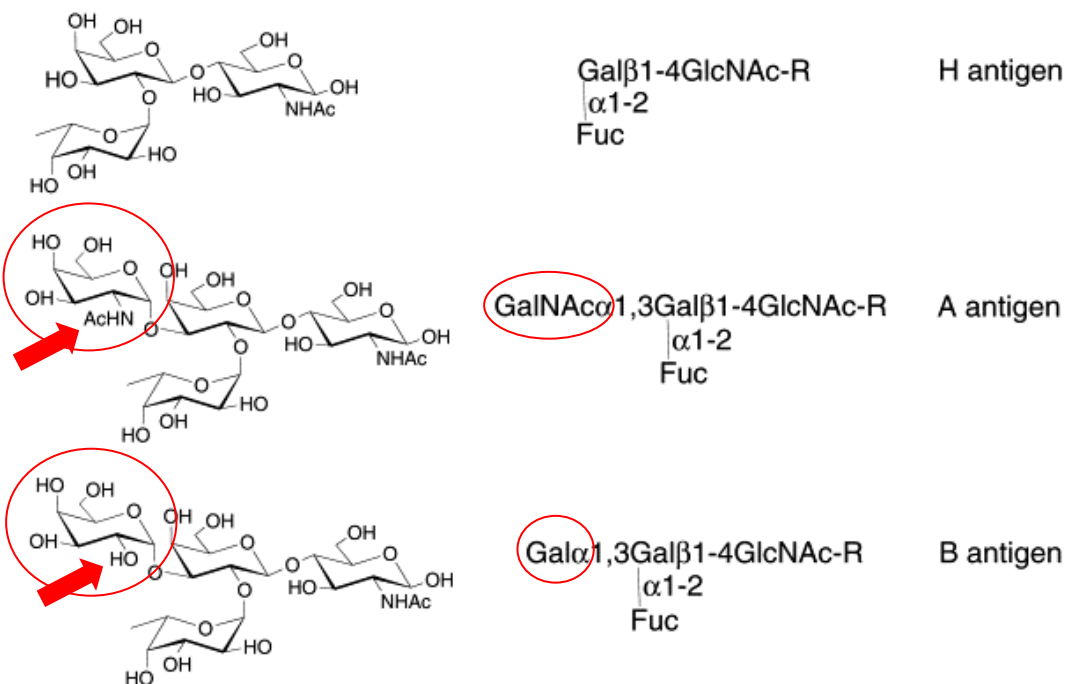
V současnosti se rozlišuje 32 systémů lidských krevních skupin. Nejznámější jsou systémy **AB0**, **Rh**. Krevní skupiny **AB0 systému** jako první objevil vídeňský lékař Karl Landsteiner v roce 1900 (identifikoval pouze 3 krevní skupiny). Všechny čtyři krevní skupiny (A, B, AB, 0) popsal v roce 1907 český psychiatr Jan Janský. Krevní typy (skupiny) se v AB0 systému určují podle antigenů (látek vyvolávajících imunitní odpověď) přítomných na povrchu červených krvinek. Tyto antigeny se nazývají aglutinogeny (shlukovatelné), podle schopnosti aglutinovat (shlukovat) erythrocyty. Protilátky, přirozeně se tvořící proti těmto aglutinogenům, se nazývají aglutininy (shlukující).

Antigeny AB0 jsou komplexní oligosacharidy, které se vyskytují na membránách erythrocytů ve formě glykosfingolipidů a v sekretech jsou tytéž oligosacharidy přítomny ve formě glykoproteinů. Specifickou povahu AB0 antigenů určuje terminální cukerné reziduum, které představuje imunodeterminantu antigenu.

Prekurzorem pro biosyntézu antigenů A a B je antigen H (odpovídá krevní skupině 0), který vzniká připojením L-fukosy (6-deoxy-L-galaktosy) vazbou α 1-2 na terminální galaktosu oligosacharidového řetězce pomocí enzymu fukosyltransferasy (kódovaná H lokusem na chromozomu 19).

Gen AB0 lokovaný na chromozomu 9 má tři typy alel - dvě kodominantní (I^A a I^B) a třetí recesivní (i). Alela I^A kóduje enzym N-acetylgalaktosaminyltransferasu, která připojuje N-acetyl-D-galaktosamin na galaktosu antigenu H. Alela I^B se liší od alely I^A substitucí 4 nukleotidů a kóduje enzym galaktosyltransferasu, která připojuje na antigen H D-galaktosu.

Jedinci s krevním typem 0 mají v tomto genu delecí (posun čtecího rámce), proto syntetizují inaktivní enzym.



| Krevní skupina | Typ aglutinogenů (antigenů) přítomných na povrchu ery | Typ aglutininů (protilátek) přítomných v plasmě | Typ krve, který budou tyto aglutininy srážet | Genotyp |
|----------------|---|---|--|------------------|
| A | A | anti-B | B, AB | $I^A I^A, I^A i$ |
| B | B | anti-A | A, AB | $I^B I^B, I^B i$ |
| AB | AB | - | - (univerzální příjemce) | $I^A I^B$ |
| 0 | - (H) (univerzální dárce) | anti-A anti-B | A, B, AB | ii |

Druhým nejdůležitějším krevním systémem je **Rh systém**, který byl pojmenován podle makaků *Macaca mulatta* (anglicky Rhesus Macaque), u kterých byl v roce 1940 objeven Karlem Landsteinerem a Alexanderem Weinerem. Tento systém 50-ti antigenů zahrnuje pět nejvýznamnějších – antigen C, antigen c, antigen D, antigen E, antigen e. Nejsilnější – antigen D, se nazývá Rh faktor. Jedná se o integrální protein, a jestliže je přítomen na povrchu buněčné membrány erytrocytů označuje se krev jako Rh+, v opačném případě Rh-.

Určení Rh faktoru má velký význam zejména při transfúzích krve. Po špatné transfúzi by došlo ke tvorbě protilátek proti antigenu D a následné hemolytické reakci.

Úkol: Stanovte krevní skupinu ve vzorku kapilární krve pomocí komerčního kitu.

Před vlastním stanovením si řádně přečtěte příložený návod.

Do protokolu uveďte princip imunoprecipitace, jakým kitem bylo stanovení provedeno a jaké krevní skupiny jste stanovili jednotlivým členům vaší pracovní skupiny.

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

Doplňující otázky:

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