

MONOKLONÁLNE PROTILÁTKY V ANALYTICKEJ CYTOMETRII

Dominika Melničuková
408622

História

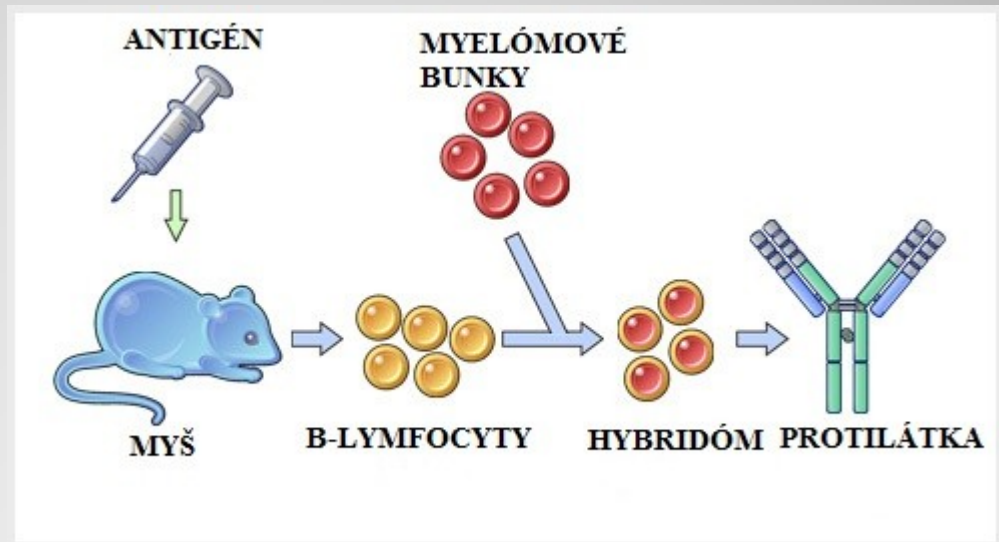
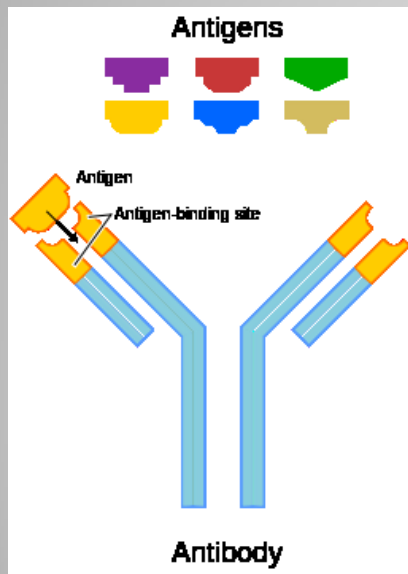
- **Leonard Arthur "Len" Herzenberg**
(5.11.1931 – 27.10.2013)
- **FACS**
(fluorescence-activated cell sorting)



<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/thumb/8/8e/LenHerzenberg.jpg/220px-LenHerzenberg.jpg>

Monoklonálne protilátky

- **Monoklonálna protilátka** (imunoglobulín) je protilátka získaná z klonálnej populácie jednej plazmatickej bunky (B-lymfocyty).



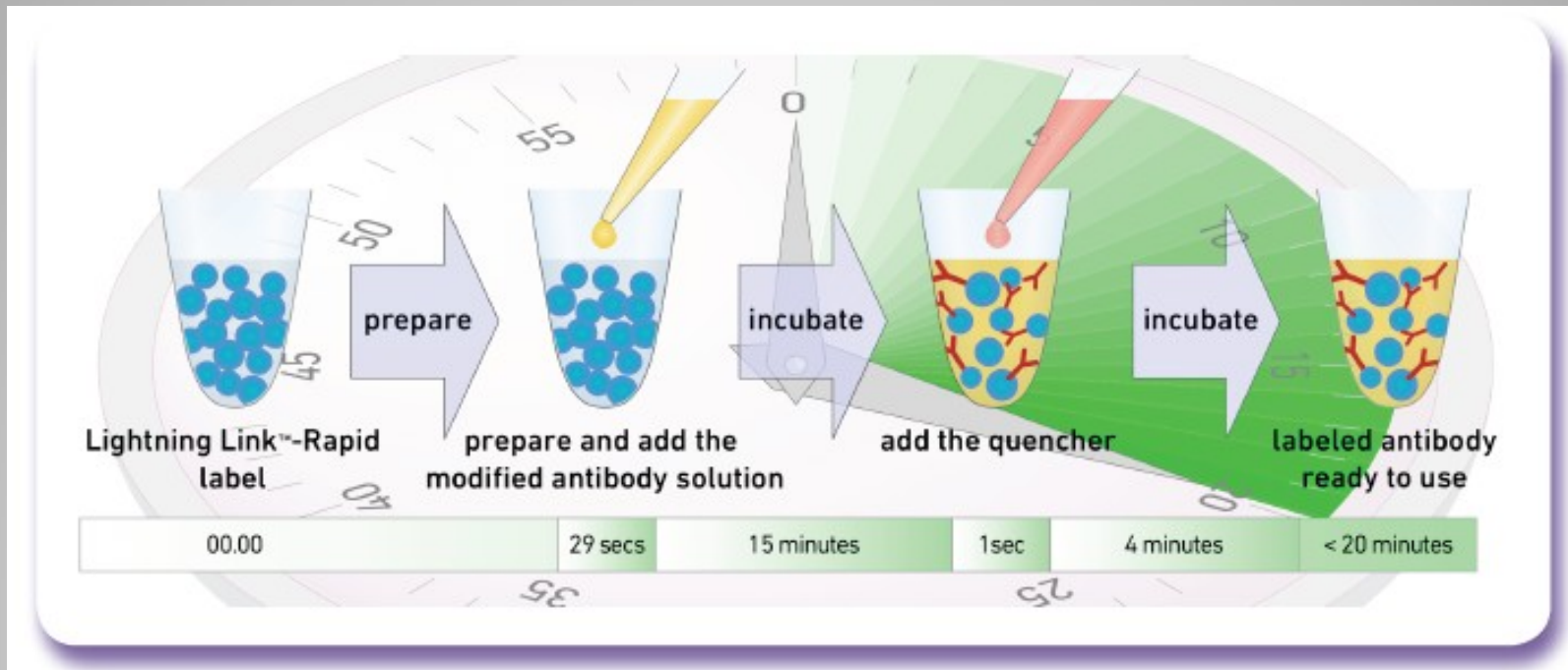
<https://en.wikipedia.org/wiki/Antibody#/media/File:Antibody.svg>

http://www.kyowa-kirin.co.jp/antibody/english/img/about/production_illustr.jpg
(upravené)

Protilátky a analytická cytometria

- **Imunofenotypizácia.**
- Najčastejšie IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b)
- Využívajú sa **fluorescenčne značené protilátky.**
- Metóda voľby pre **identifikáciu a triedenie** bunkových komplexov.
- Základný výskum, klinické laboratóriá.

- Lightning-Link®



Fluorescenčné značenie protilátok

Príprava vzoriek

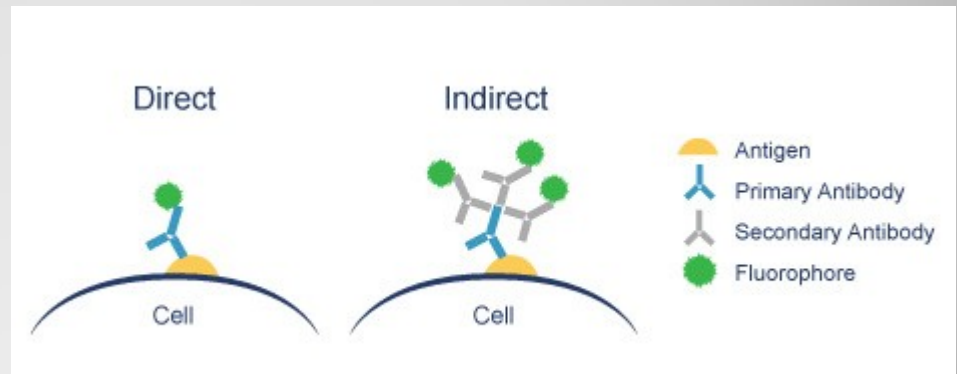
- Potreba **suspenzie** jednotlivých buniek
- Značenie **povrchových antigénov** - inkubácia s protilátkami
- Značenie **intracelulárnych antigénov** - fixácia a permeabilizácia (neexistuje žiadny štandardný postup).

1. Fixácia v 70% etanole pri 0 C

3. Fixácia v 1% formaldehyde v 0 C
následovaná metanolom pri -20 C.

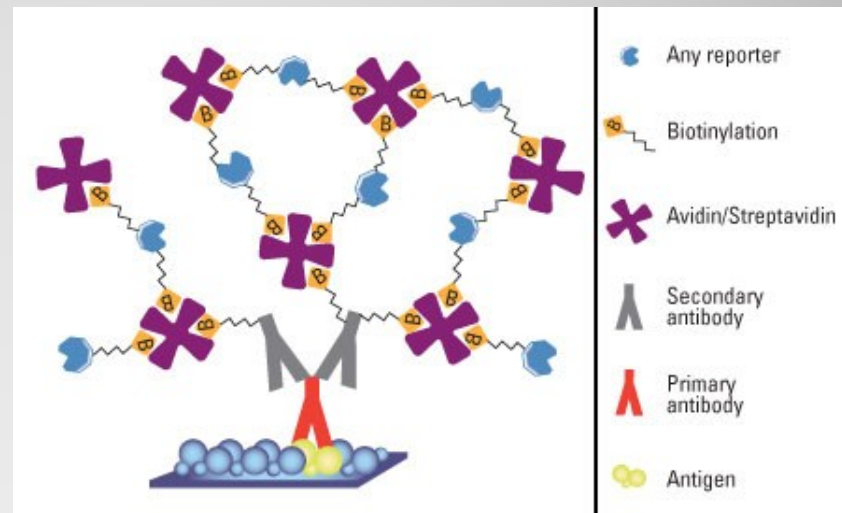
Značenie buniek

- **Priame značenie** využíva jednu protilátku na značenie cieľa (primárna protilátka). Protilátka je priamo konjugovaná s fluoroforom.
- **Nepriame značenie** využíva dve protilátky. Primárnu nekonjugovanú a sekundárnu konjugovanú s fluoroforom, ktorá sa viaže na primárnu protilátku.



<http://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence>

- **Priame značenie** – monoklonálna protilátka konjugovaná s fluoroforom.
- **Nepriame značenie** – polyvalentná (viac strán na primárnej Ab) alebo monoklonálna protilátka, špecifická pre Ig typ primárnej protilátky. Protein A, biotin-avidin.



Čo sa používa?

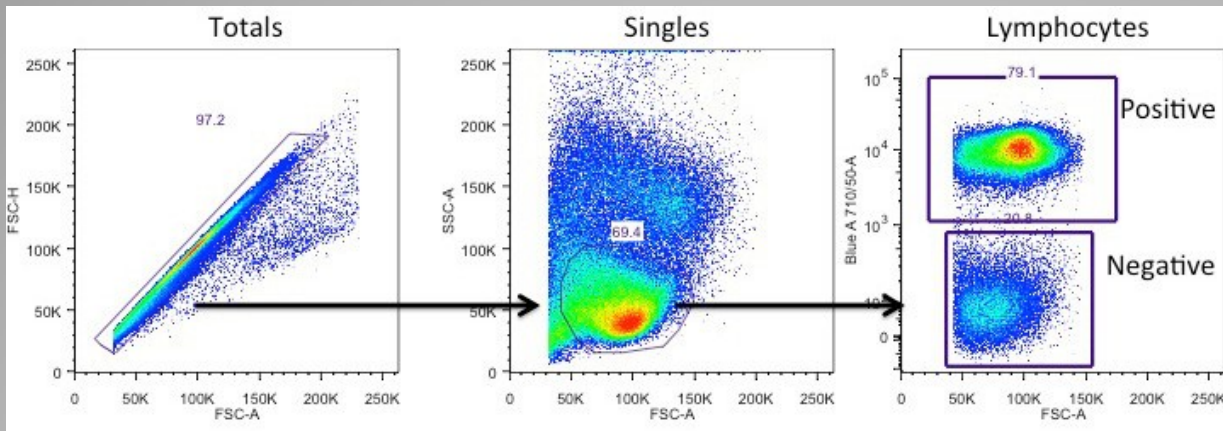
<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Images/integration/avidin-biotin-complex-alone.jpg>

	Čas	Cena	Komplexnosť	Flexibilita	Citlivosť	Skrížená reaktivita	Pozadie
Priame	Jeden krok	Konj. sú drahšie	Priama met.	Nízka	Slabší signál	Minim.	Reduk.
Nepriame	Viac krokov	Relat. lacné	Zložit.	Vysoká	Zosiln. signál	Pravd.	Zvýš.

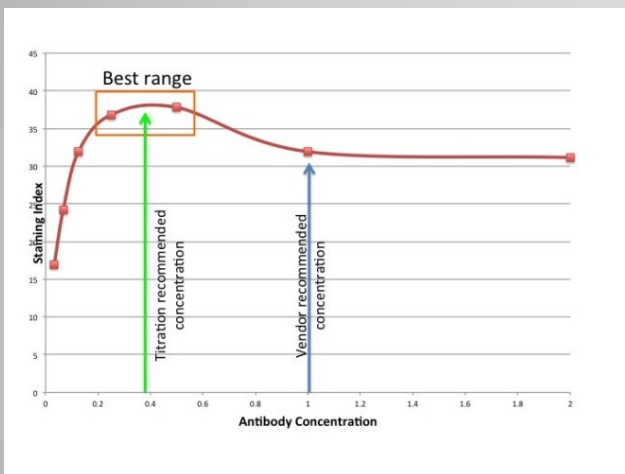
Obe metódy majú svoje výhody a nevýhody

Optimalizácia- Koncentrácia protilátok

- **Prečo titrujeme?**
 - Pre optimalizáciu signálu, dosiahnutie celkového nasýtenia, minimalizovanie signálu pozadia a pre zachovanie reagensie (šetrenie peňazí 😊).
- Väčšinou udávaná výrobcom. ALE!



<http://bitesizebio.s3.amazonaws.com/wp-content/uploads/2014/12/titration11.jpg>



$$SI = \frac{Med_{pos} - Med_{neg}}{[(84\%_{neg} - Med_{neg}) / 0.995]}$$

<http://bitesizebio.s3.amazonaws.com/wp-content/uploads/2014/12/titration2.jpg>

<http://bitesizebio.s3.amazonaws.com/wp-content/uploads/2014/12/titration3.jpg>

Príklad titračného experimentu

Izotypová kontrola

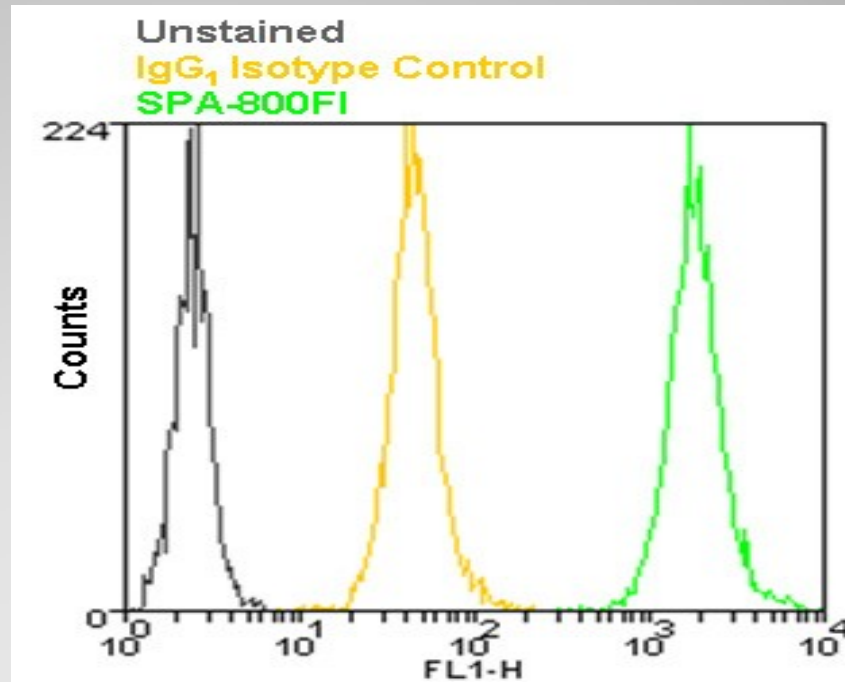
- **Prečo?**

- Potvrdenie špecifickosti primárnej väzby protilátky.
- Vylúčenie nešpecifického naviazania Fc receptora alebo inej bunkovej proteínovej interakcie.

- Mala by zodpovedať charakteristikám primárnej protilátky :

- Hostiteľský druh
- Izotypová forma
- Forma konjugácie
- Je namierená proti antigénu, ktorý sa v bunke nenachádza.

- **Negatívna kontrola/Kontrola autofluorescencie pozadia**



http://static.enzolifesciences.com/fileadmin/files/image/SAB-600FI_FC.jpg

Ďakujem za pozornosť!

