

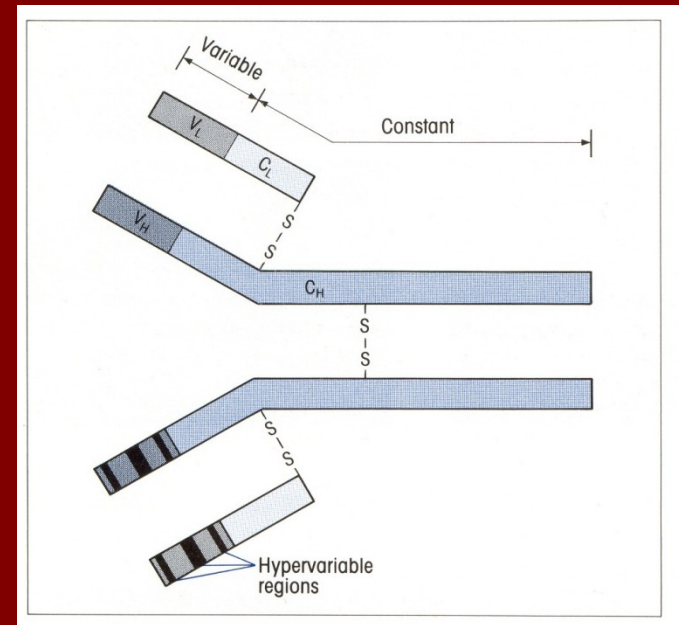
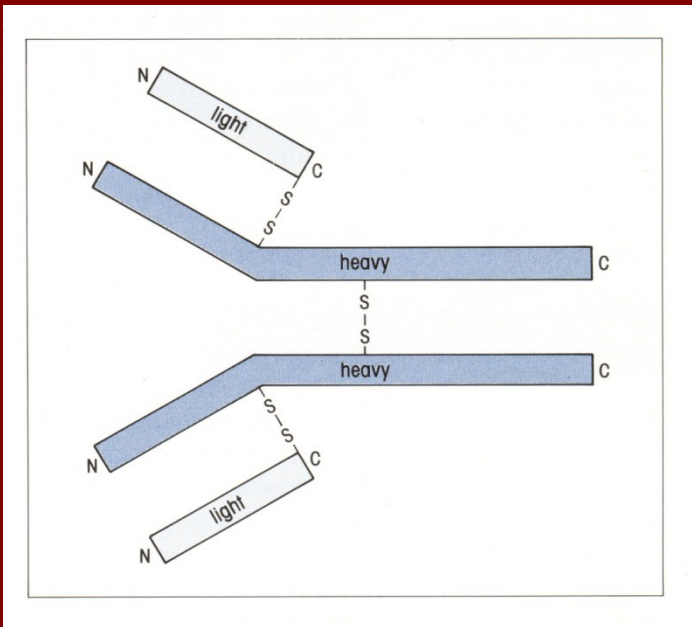
Protilátky

Nejdůležitější Vlastnosti:

Patří do gama frakce krevních bílkovin (gamaglobuliny), přítomnost některých úseků na bílkovinném řetězci-immunoglobulinové domény – konstantní a variabilní (110AK zbytků), je prototypem rozsáhlé imunologické rodiny molekul (800 důležitých molekul)

-variabilní úseky mají odlišné AK složení u různých plazmatických buněk, konstantní úseky-primární struktura C-koncových částí je

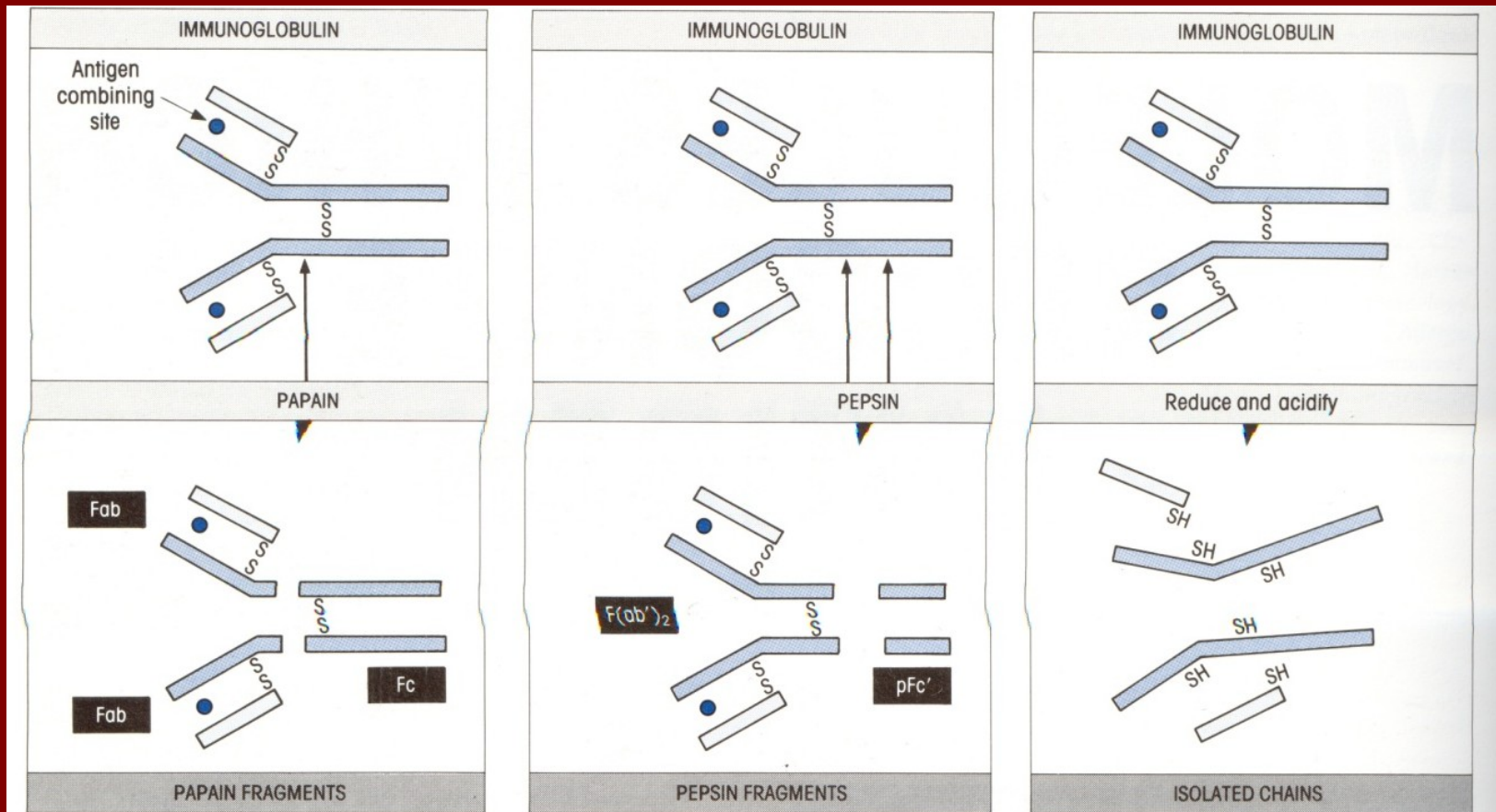
obdobná u různých molekul Ig, tvar molekuly Y odpovídá schopnosti vázat se na Ag struktury, pantovou oblastí (disulfidické můstky) se přizpůsobuje tvar vazebného místa molekule Ag (zodpovědné za prostorové uspořádání, řetězce Ig jsou glykosylovány a to umožňuje biologické vlastnosti Ab



Ab model se dvěma těžkými (určují třídu a izotyp Ig) a 2 lehkými polypeptidickými řetězci (kappa lambda) spojené interakcí disulfidických můstků, N terminální zbytky

Působením proteolytických enzymů je štěpena Ab pod (pepsin) nebo nad (papain) disulfidickými můstky

Vzniklé proteolytické fragmenty ukazují divalenci (váží se se dvěma Ag) pepsinu a univalenci papainu. pFc reprezentuje C-terminální konec Fc oblasti a je tvořen nekovalentními vazbami



Variabilní a konstantní domény spolu asociují a vytváří globulární struktury, např Y

Hapten s králičími Ab vytváří

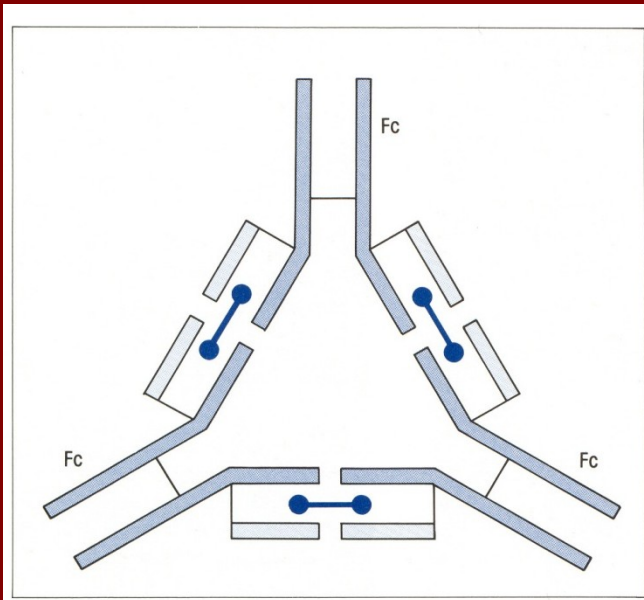
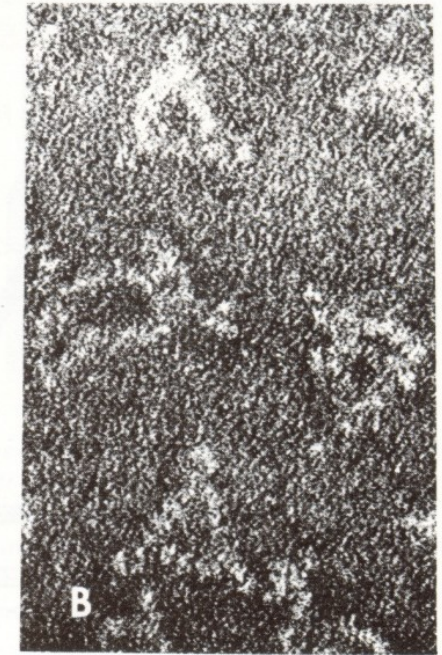
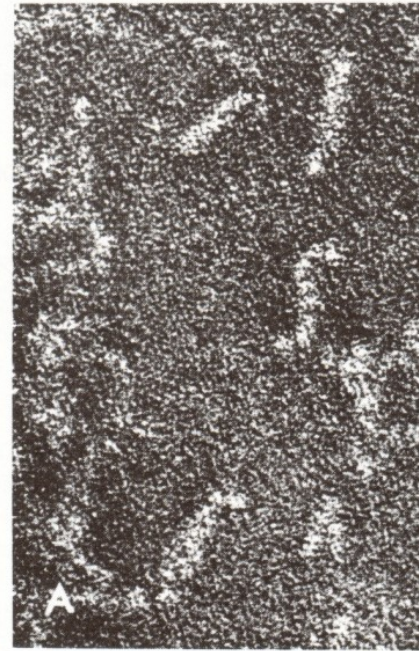
A) dimery B) trimery

C) Tetramery D) pentamery

Obr. A flexibilita v pantové oblasti

Obr. E Fc fragmenty byly natráveny pepsinem, nelze je zde pozorovat jako u obr. B v každém rohu

Zvětš. 1.000.000x



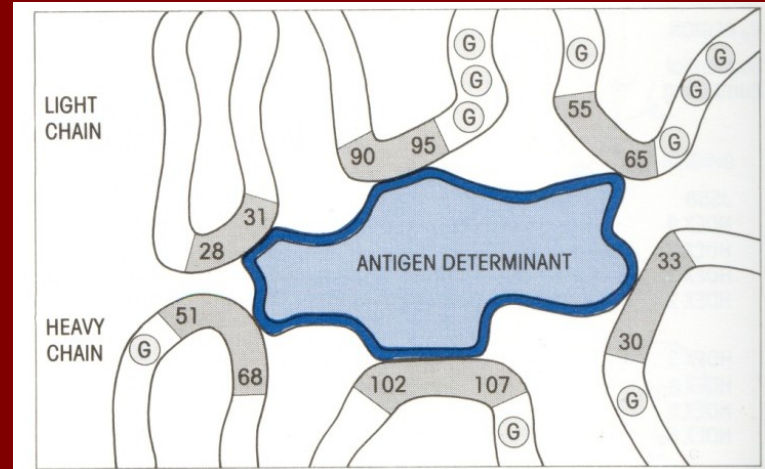
Trimer s Fc fragmenty

Idealizovaná dvojrozměrná struktura Ag

a) Vazbové místo tvoří peptidické smyčky, které tvoří hypervariabilní úseky na lehkém i těžkém řetězci (číslo znamená počet zbytků AK) a G cukerné zbytky.

Cukerné zbytky jsou důležité pro zpětné poskládání peptidických řetězců a tvorbu beta struktury skládaného listu. Ta umožňuje, aby hypervariabilní úseky ležely těsně u sebe. Díky vazbě k různým kombinacím hypervariabilních úseků a různým zbytkům uvnitř každé z této oblasti, každá z Ab může tvořit komplex s různými antigenními determinanty.

b) Simulované kombinační místo tvoření třemi prsty každé ruky
Každý prst představuje hypervariabilní smyčky

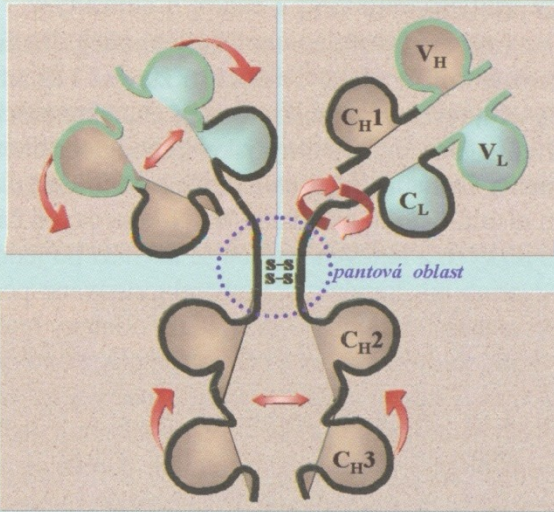


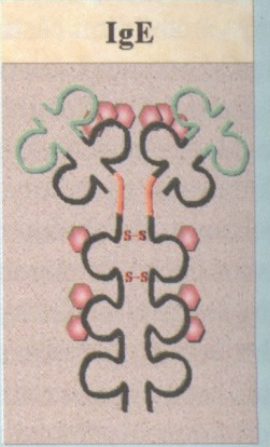
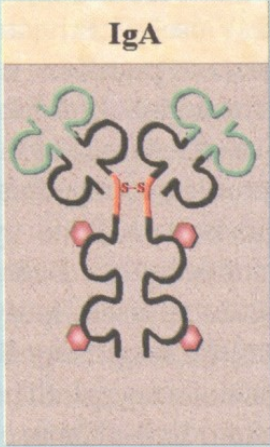
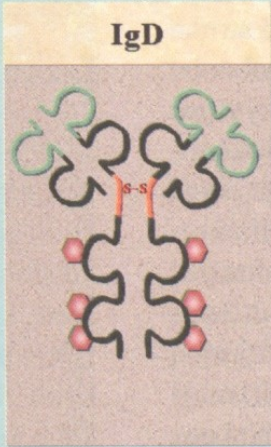
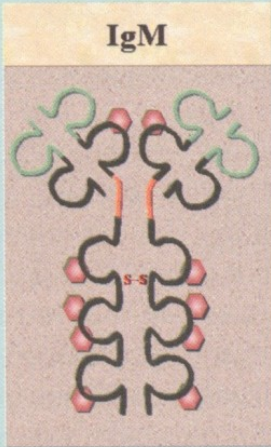
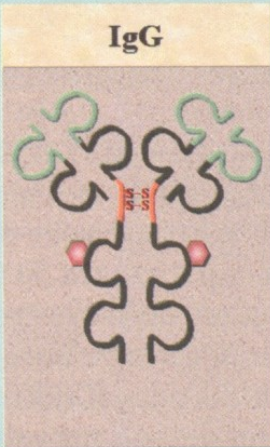
(a)



(b)

FLEXIBILITA MOLEKULY IMUNOGLOBULINU





S-S disulfidické můstky

cukerné molekuly

metody využívající sérologické reakce

A. Precipitační metody

V kapalinách

V gelu

B. Imunodifuzní metody

- Jednoduchá imunodifúze
- dvojitá imunodifúze

C. Imunoelektroforetické metody

Kombinace s elfo

- Imunoelektroforéza podle Williamse a Grabara
 - Raketová imunoelektroforéza
 - Protisměrná
 - Dvojrozměrná
 - D. Aglutinační metody
 - E. Hemaglutinační
 - F. Komplementové
 - G. Immunoblotting
 - Zákalové reakce
 - Imunonefelometrie
 - Imunoturbidimetrie

H. Imunochemické metody

a) RIA

b) FIA

c) EIA

Časové rozdělení metod

Metody I.generace

- Některé techniky v roztoku – precipitační, aglutinační, KFR

Metody II.generace

- Kvantitativně i složité směsi antigenu,
- Imunodifúze, imunoelfo

Metody III.generace

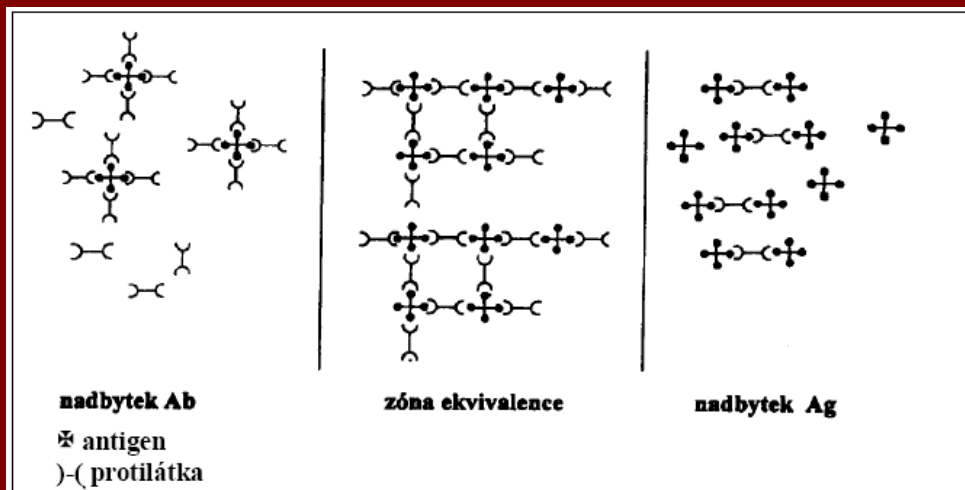
- Velmi citlivé metody, stanoví Ag, Ab i hapteny
- Imunoanalýzy – př. RIA, FIA, EIA, imunoturbidimetrie
- – nefelometrie, -fluorimetrie, popř jejich kombinace

Metody IV.generace

- Kontinuálně měří Ag, Ab i hapteny
- imunosenzory

Serologické metody - precipitace

Imunoprecipitační křivka (Ag – antigen, Ab – protilátka)



Oblast ekvivalence

Precipitační metody

Oblast nadbytku protilátky

Nekompetitivní metody

- zákalové nefelometrie
- turbidimetrie

- s markerem EIA, IRMA..

Oblast nadbytku antigenu

Kompetitivní metody

- heterogenní RIA, ELISA..
- homogenní EMIT...

- faktory ovlivňující precipitaci:

typ Ab /např. IgG/

teplota – se zvyšující se teplotou se urychluje precipitace /např. 38°C/

vzájemná koncentrace Ag a Ab

pH

iontový náboj

tvář a velikost částí

PRECIPITAČNÍ metody:

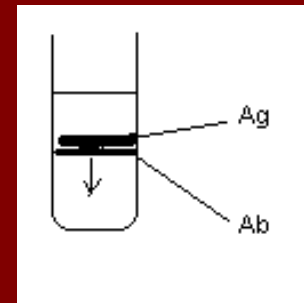
- Ag + Ab → Ag-Ab
- precipitinogen precipitin precipitát sraženina
- solubilní /rozpustný/

• - dělíme:

• A) v kapalinách :

• I. prstencová

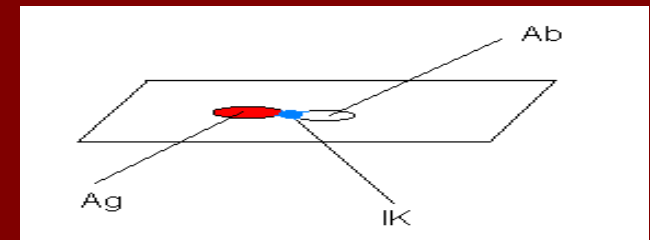
• – prsteneček sraženiny precipitátu



• II. sklíčková – určení pod mikroskopem

• B) v gelu:

• **IMUNODIFÚZE**



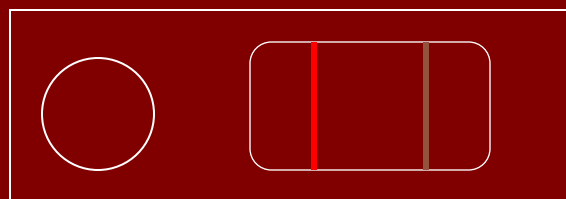
• **využití** : ke stanovení Ag, Ab, H

PRECIPITAČNÍ metody:

- **praxe** – 1. zjištění výskytu či stanovení Ab v séru při inf. onemocnění
2. identifikace patogena
- Koncentrace Ab se vyjadřuje jako **TITR SÉRA**.
- = **nejmenší zředění Ab, které ještě reaguje s Ag**
- - hodnocení : **kvalitativně** – odečtení okem
- **kvantitativně** :
 - a, zjištěním **množství precipitátu**
 - b, zjištěním **množství Ag** v precipitátu či supernatantu
 - c, změna **optických vlastností** vzorku – 2 metody :
 - **NEFELOMETRIE – TURBIDIMETRIE**

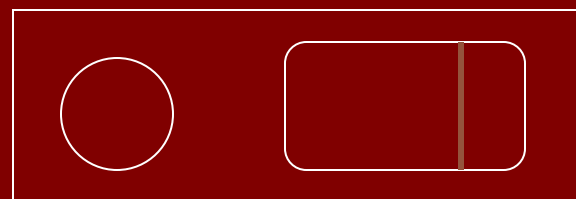
př. Precipitační imunochemické metody

Screeningové metody – jednoduché precipitační testy
terénní kazetové testy pracující v oblasti ekvivalence



S T C

Negativní výsledek



S T C

Pozitivní výsledek

Za nepřítomnosti nebo nedostatku drogy ve vzorku moče vytvoří protilátka imunokomplex (precipitát) se značenou drogou vázanou v místě testu T. (S – vzorek, C – kontrola)

Imunodifúze

- specifická **reakce Ag s Ab - precipitace**

/gel z agaru nebo agarózy/- AGAR směs polysacharidů extrahovaných z červených mořských řas

■ přírodní agar nutno přečišťovat ■ **frakcionací** vznikají 2 složky: ■ **agaróza**

- neobsahuje vedlejší aniontové skupiny - pro difúzi více vhodná

- **standardnější složení** než agar a nižší schopnost **nespecifické adsorpce**

■ **agaropektin**

- obsahuje aniontové skupiny ■ **pro difúzi nevhodný**

• - **příprava gelu:**

• rozvaření agarózy v pufru na vodní lázni

• nanesení na skleněné destičky – ztuhnutí ve vodorovné poloze /při teplotě pod 42°C/

• - **princip ID:**

• - vzájemná **volná difúze Ab a Ag** v gelu na základě **koncentračního spádu** až do místa střetnutí ■ zde vznikají **precipitační linie** ■ **ploučky** ■ **stence** ■ **uhy** /záleží na použitém materiálu/

• - vzniklé precipitáty **detegujeme:**

■ **optikem** - zákal

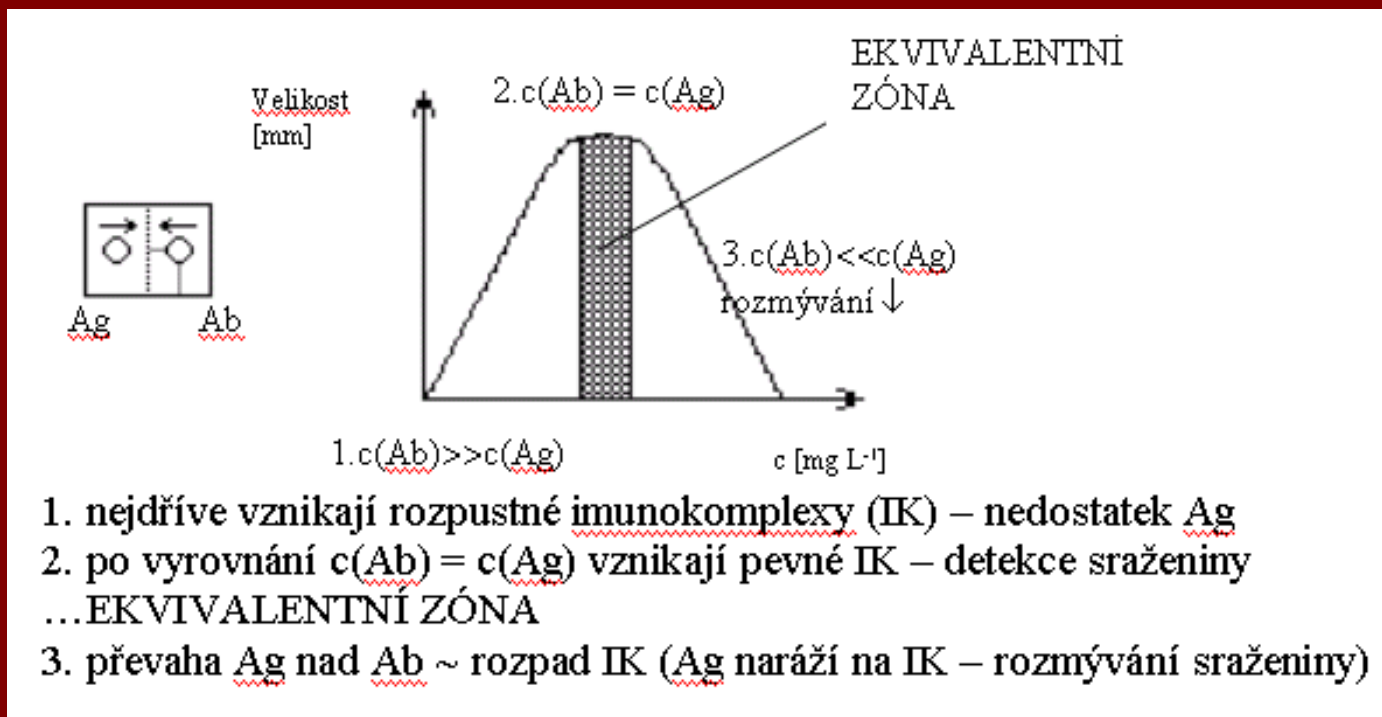
■ **barvením** – Coomassie blue, amidočerň

■ **sekundárními protilátkami**

■ **Au, Ag, radioizotopy**

- vznik precipitátů je **děj postupný!!!**

Imunodifúze



1. nejdříve vznikají rozpustné imunokomplexy (IK) – nedostatek Ag
2. po vyrovnání $c(\text{Ab}) = c(\text{Ag})$ vznikají pevné IK – detekce sraženiny
...EKVIVALENTNÍ ZÓNA
3. převaha Ag nad Ab ~ rozpad IK (Ag naráží na IK – rozmývání sraženiny)

- rozdělení imunodifúzních metod:

jednoduchá imunodifúze – gelem difunduje pouze jedna složka – Ag nebo Ab

dvojitá imunodifúze – gelem difundují obě složky – Ag i Ab

jednorozměrná – složka putuje v gelu jedním směrem

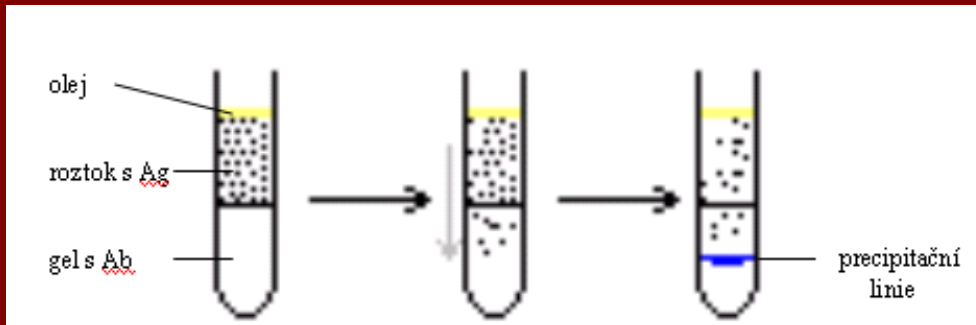
dvojezměrná /radiální/ – složka putuje více směry

Ag a Ab si neodpovídají – **nevytvoří se precipitační linie**

Směs více typů Ag a Ab – počet **linií** odpovídá **počtu** sobě si odpovídajících párů

Ab a Ag

Imunodifúze



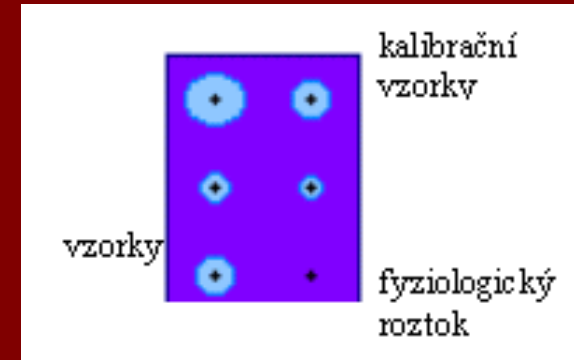
roztok s Ag
gel s Ab
olej

- **jednoduchá imunodifúze**
- - migruje 1 složka:
- **1. složka se smíchá s gelem už při jeho přípravě (nemigruje)**
- **2. složka se aplikuje následně do vyřezaných jamek – MIGRUJE – v místě vyrovnání koncentrací vzniká precipitační linie**
- ↗ **jednoduchá jednorozměrná imunodifúze podle OUDINA**
- - ve spodní části zkumavky agarózový gel s Ab, převrstveno roztokem s Ag - zalito parafínovým olejem – zábrana odpařování
- - čím je Ag koncentrovanější, tím dále od roztoku s Ag vznikají precipitační linie /odečitatelnější/
- - využití: **detekce počtu Ag párů**

Imunodifúze

✧ jednoduchá radiální /dvojrozměrná/ imunodifúze dle MANCINIOVÉ

- - na skleněnou destičku se nalije gel, který obsahuje Ab
- inkubace ve vlhké komůrce ve vodorovné poloze → difúze všemi směry (radiální)
- po obarvení - modré precipitační prstence
- čím je vzorek koncentrovanější – větší průměr prstence
- → změření druhé mocniny průměrů prstenců – vynesení kalibrační křivky a odečet koncentrace neznámého vzorku-
- využití:
- ke kvantitativnímu stanovení Ag
- klinická praxe: stanovení koncentrace IgG, IgA, IgM, IgD, složek komplementu a proteinů akutní fáze



jamky - vzorky:

-gel s Ab

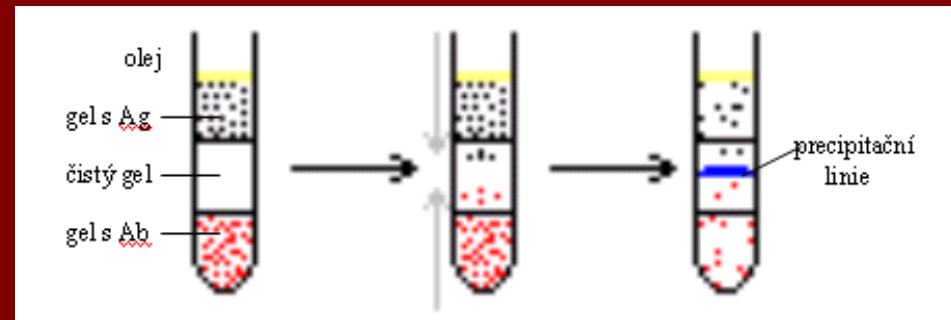
fyziologický roztok –blank

vzorky o neznámé koncentraci

vzorky o známé koncentraci (kalibrační)

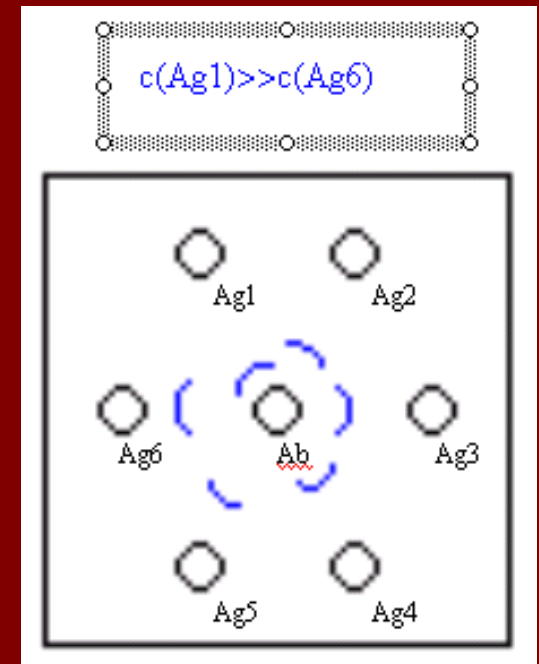
Imunodifúze

- **dvojitá imunodifúze**
- - gelem *difundují* obě složky
- - *koncentrace* Ag a Ab musí být vzájemně **ekvivalentní** – proti překrývání linií
- ↗ **dvojitá jednorozměrná imunodifúze**
- - ve zkumavce **agarózový gel s Ab** a agarózový gel s **Ag**
- - mezi nimi **čistý gel** – v místě vyrovnání koncentrací se vytvoří **precipitační linie**-
- **využití:** ■ **kvalitativní důkaz Ag**
■ **určení imunochemické příbuznosti či odlišnosti Ag**



Imunodifúze

- dvojité *radiální* imunodifúze **dle OUCHTERLONYHO**
- na *skleněné desky* nanesen **čistý gel**
- menší jamky – *různé Ag* či *různé koncentrace* jednoho Ag
- větší prostřední jamka – Ab
- koncentrovanější Ag → **precipitační obloučky** blíže jamky s Ab
- inkubace ve vlhké komůrce
- počet precipitačních linií odpovídá počtu odpovídajících si párů Ag a Ab
- **Využití** –průkaz Ab při alergických alveolitidách, průkaz Ab proti některým patogenům, např. *Toxoplasma gondii*



Imunodifúze

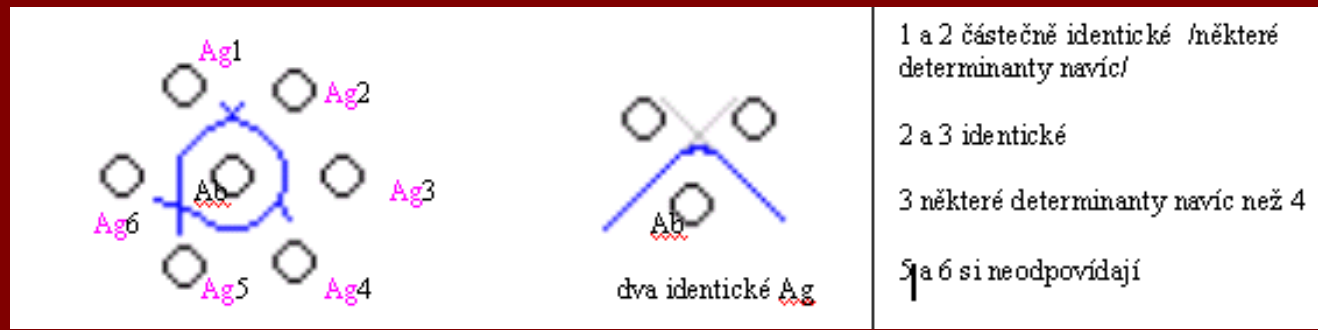
- *využití:*

titrace Ag –
koncentrace Ag
 určuje *umístění*
precipitační linie

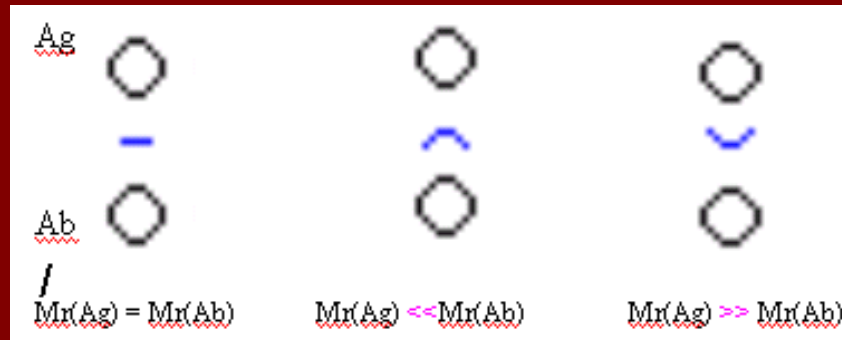
důkaz *přítomnosti Ab*

porovnávání *identity a*
neidentity Ag směsí

umístění
precipitační linie



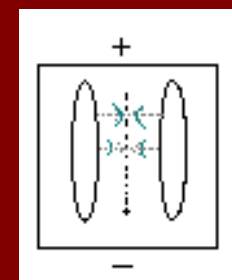
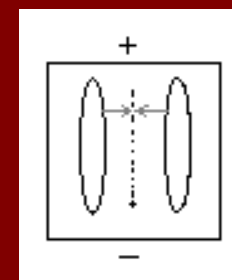
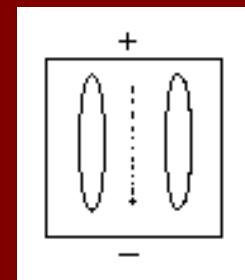
porovnání M_r (Ag) a M_r (Ab) určuje *tvar precipitační linie*



- *menší molekula se dostane dále do gelu*

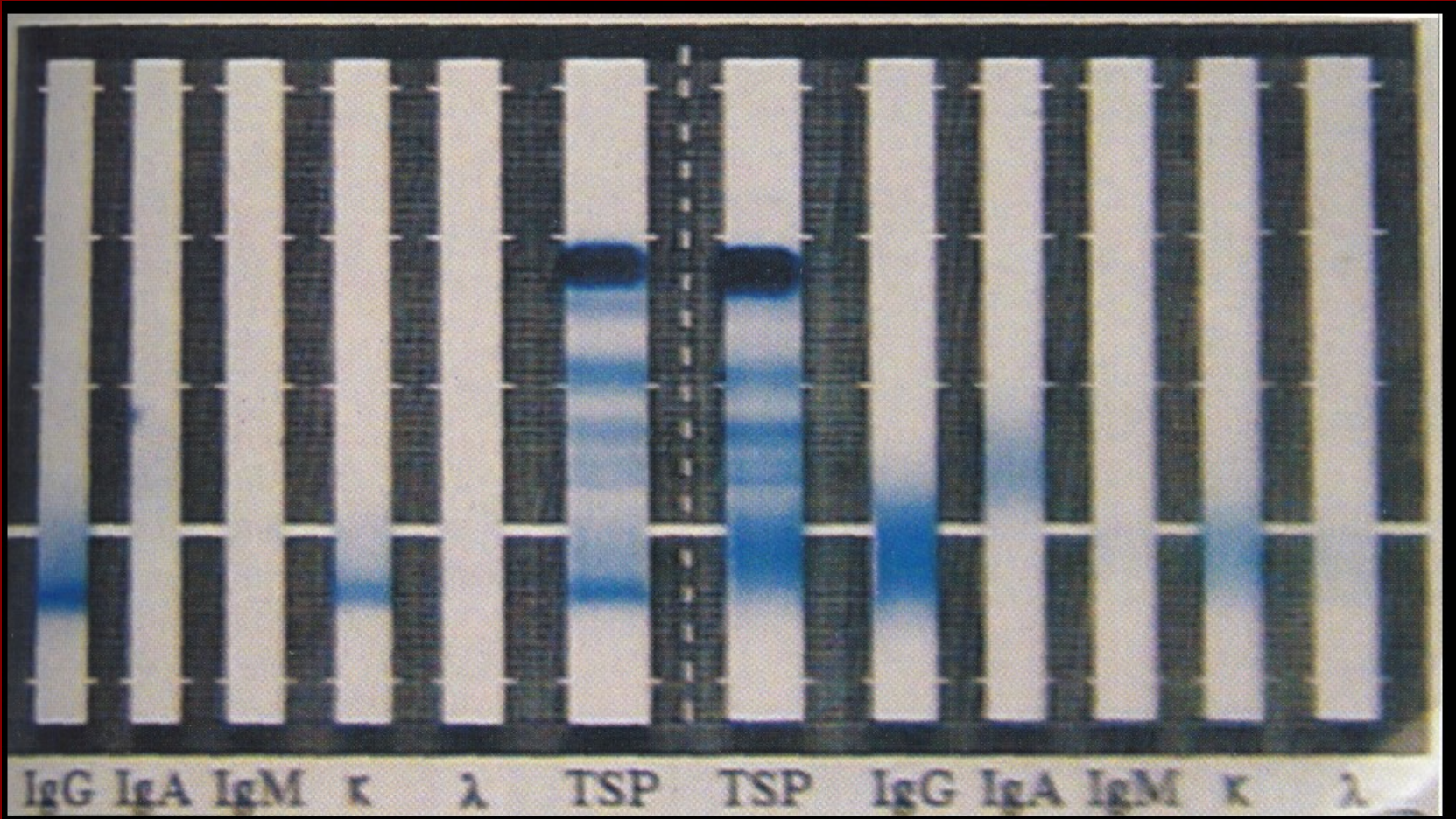
Imunoelektroforetické metody

- kombinace metod elektroforetických a imunodifúzních
- Bílkoviny se dělí v závislosti na molekulové váze a elektrické náboji jednotlivých molekul. Při běžné elfo se sérum dělí na zónu albuminu, $\alpha - 1$, $\alpha - 2$, β , γ globulinů. Stanovení zastoupení jednotlivých frakcí může mít význam při hodnocení stádia zánětlivého procesu. Při akutních zánětech stoupá zastoupení $\alpha - 1$, později i $\alpha - 2$, při chronických zánětech dochází ke zvýšení zastoupení γ globulinů a poklesu albuminu.
- imunoelektroforéza **podle WILLIAMSE a GRABARA**
- **RAKETOVÁ** imunoelektroforéza
- **PROTISMĚRNÁ** imunoelektroforéza
- **DVOJROZMĚRNÁ** imunoelektroforéza
- **Př. imunoelektroforéza podle WILLIAMSE a GRABARA:**
 - - 1953 Williams a Grabar
 - - 2 stupně: 1. **nalití destičky** (agarózní gel s pufrům)
 - vytvoření 2 žlábků a nanesení Ag mezi ně
 - po rozdělení elektroforézou se do žlábků 2. napipetují **protilátky**
 - inkubace 48 hodin v lednici ████████ dochází **k DIFUZI**
 - ████████ místě ekvivalence se vytváří **PRECIPITAČNÍ obloučky**



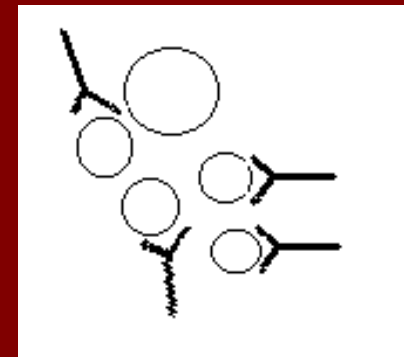
Imunoelektroforetické metody

- **Využití:** Imunoelfo séra se v současné době používá výhradně k průkazu monoklonálního imunoglobulinu v lidském séru – paraproteinu. Je vždy produkován klonem buněk vycházející z jedné plazmatické b., mající genetickou informaci pro tvorbu jedné variabilní oblasti lehkých a těžkých řetězců a jedné třídy Ig molekuly. Na rozdíl od imunoglobulinů běžného séra s velkým mn. Různých variabilních oblastí Ig molekul.
- **Paraprotein** se nachází. 1. u nemocných s myelomem (nádor vycházející z plazmatických buněk) 2. při jiných malignitách lymfatického systému, 3. při chronických zánětech 4. ve vyšších věk. skupinách
- Vzniká neobvyklý pruh při klasické elfo séra, neboť paraprotein se pohybuje uniformně (stejný náboj a Mr). V určitém místě elektroforetického pruhu způsobí vysokou koncentraci Ig příslušné třídy. Při následné precipitaci s přidáním antisérem je v oblasti, kam paraprotein doputoval, výrazně více antigenu, precipitační linie je deformovaná a posunuta blíže ke žlábků s antisérem.



Aglutinační metody

- Ag + Ab → Ag-Ab
- *aglutinogen* *aglutinin* *aglutinát*
- korpuskulární-
- *princip* : **KORPUSKULÁRNÍ** / částicový / Ag
- při reakci dochází ke shlukování Ag a Ab na základě vytváření můstků - Ab mezi buňkami za vzniku shluků
- **přímá** – použití bakterií, buněk
- **nepřímá, pasivní** – na jejich povrch je Ag uměle navázán, př. latex-fixační test, HIT
- **Předpoklady ke vzniku vazeb:**
 1. dostatek Ab, 2. přítomnost Ab proti různým epitopům 3. vzdálenost mezi částicemi co největší 4. Ab funkčně jednovazebné nevytváří aglutinaci (IgA, IgE) – inkompletní Ab viz hemaglutinace
- - **hodnocení:** kvalitativně - odečtení okem
- **kvantitativně** : a, zjištěním *množství aglutinátu*
- b, zjištěním *množství Ag* v aglutinátu či supernatantu



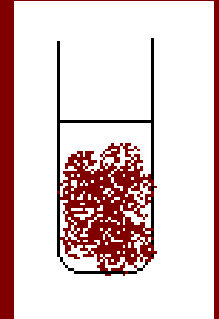
Aglutinace

- **využití** : ke stanovení **Ag, Ab, H** (viz precipitační metody)
 1. K určování izolovaných bakteriálních kmenů
 2. K průkazu Ab proti patogenům –Widalova reakce – průkaz tyfu, paratyfu, Weil-Felixova – skvrnitého tyfu, Ab proti *Francisella tularensis*
 3. Nepřímá k průkazu auto Ab proti štítné žláze, Ab proti autoAg –

Latexová aglutinace, latex-fixační test

- **rychlé kvalitativní stanovení**
- **Ag nebo Ab imobilizován na latexových kuličkách**
- **Stanovení Ab proti IgG – revmatoidní faktor**

Hemaglutinační



- Ag + Ab → Ag-Ab
- hemaglutinogen hemaglutin hemaglutinát
- - savčí krvinky (i části)
- - dochází ke **shlukování krvinek**, vlivem komplementu či virové částice pak dochází k **LYZI**.

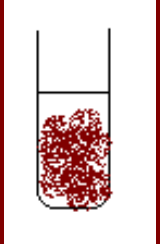
Ke zviditelnění aglutinačních reakcí při použití inkompletních Ab je možno použít **a)** aglutinaci v bílkovinném prostředí **b)** v prostředí s proteolytickými enzymy **c)** použitím antiglobulinového Coombsova séra - králičí ab proti lidským Ig

Hemaglutinace

- **využití:** K zjišťování krevních skupin a průkaz Ab proti krevním elementům. **Přímý Coombsův test** – k průkazu navázaných antierytrocytárních Ab, reakce pacientových ery s Coombsovým antisérem, přítomnost navázaných Ab se projeví hemaglutinátem
- **Nepřímý Coombsův test** – k průkazu cirkulujících antierytrocytárních Ab
- 1. fáze, pacientovo sérum s ery od dárce, navázání Ab pokud jsou přítomny, vmytí, přidání Coomsova séra, které způsobí aglutinaci
- při 2 reakcích:
- **KFR** – *komplement fixační reakce*
- **HIT** – *hemaglutinačně inhibiční test* :

HIT

- Patří také mezi metody serologické, založené na inhibici biologických účinků antigenů
- **HIT – pasivní hemaglutinace**
- Vycházíme ze skutečnosti, že viry (některé bakterie atd) mají schopnost se spontánně absorbovat na červené krvinky (rozpustný Ag). Ery pak aglutinují – shlukují se jen v přítomnosti specifické Ab



■ **odpovídá-li** protilátka Ag, po přidání obalených ERY Ag se Ag vyváže a vznikne **HEMAGLUTINÁT**

Ab + Ag - Ery ■ **hemaglutinát, proběhne hemaglutinace**

■ **neodpovídá-li** protilátka virovému Ag, nedojde k hemaglutinaci

- situace, kdy přidáme stejný Ag do reakce



• Ab + Ag - Ery ■ **hemaglutinát** + stejný Ag ■ Ag - Ab + Ag - Ery ■ **inhibice hemaglutinace**

- *Metodou inhibice pasivní hemaglutinace lze dokázat velmi malé mn. rozpustného Ag nebo H (metoda je velmi citlivá)*

pro vyhodnocení můžeme použít i optické metody

Komplementové metody

metody využívající faktu aktivace komplementového systému komplexem
– antigen-protilátka, KFR

- složky reakce: Ab, Ag, C, ERY, hemolyzin

■ Ab- vyšetřované sérum

- chceme v něm **prokázat protilátku** / komplement v séru je tepelně inaktivován /

■ známý specifický Ag

- jsou-li v séru Ab, vytvoří se **imunokomplex IK**

■ **KOMPLEMENT** - zdrojem nejčastěji sérum morčete (**váže se na IK a aktivuje protilátku**)

hemolytický komplex: komplex Ag /beraní ERY/ a protilátky ■ EMBOCEPTORu /hemolyzinu/, získaného imunizací králičího séra beraními erythrocyty

- ■ by došlo k hemolyze je nutná **spoluúčast KOMPLEMENTU** a inkubace 30 minut při 30 °C

• průběh reakce:

- * **POZITIVNÍ** ■ ve vyšetřovaném séru **je Ab**

• protilátka v séru vytvoří **komplex s Ag** – na něj se **naváže komplement**. Po přidání hemolytického systému **nezbývá** již komplement **do 2. části reakce**

• ■ hemolyze **NEDOJDE**:

- * **NEGATIVNÍ** ■ ve vyšetřovaném séru **není Ab**

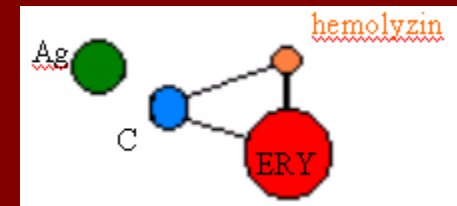
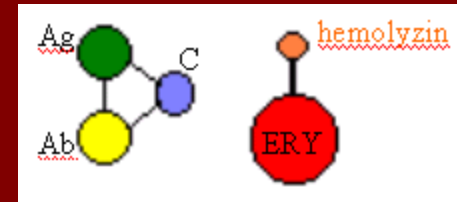
• - v 1. fázi reakce se **nevytvoří IK** – **komplement se nevyváže** a zbývá do 2. fáze reakce, kdy **aktivuje hemolyzin**

• ■ **OJDE** k hemolyze:

• - velmi **záleží na množství komplementu** – **každý vzorek se musí titrovat**, aby bylo množství komplementu konstantní

• - použití:

- ■ **diagnostika** příjice /syfilis/, bruceózy, pasteurely
- ■ ve **virologii** průkaz protilátek téměř všech virových nákaz
- ■ **typizace neznámých Ag** nově izolovaných virů
- ■ **průkaz protiorqánových Ab**



Vyšetření komplementového systému

- Stanovují se

- a) hladiny jednotlivých složek K v séru –
za pomoci antisér, většinou proti C3, C4, C1q

- b) celková aktivita komplementové kaskády-

Se provádí testem CH50 – (50% hemolýza způsobená komplementem),
stupeň hemolýzy závisí na množství přidaného K, nepřímá úměra

Využití: K detekci poruch nedostatečného mn. Nebo defektů složek K systému

Vyšetření cirkulujících a deponovaných IK

Principy metodik

1. Využívající fyz – chem vlastností – CIK- největší makromolekuly séramohou být precipitovány pomocí PEG (polyetylénglykol). Precipitát je úměrný mn. cirkulujících CIK

Vyšetření komplementového systému

- 2. CIK na sebe váží C1 – C3 složky K. V první fázi se odstraní nenavázaný C1q. V druhé fázi se stanoví koncentrace C1q, jež odráží i hladinu CIK (totéž pro C3,C4)
- 3. průkaz vazbou na buňky, které exprimují receptor pro Fc fragment IgG. Lze využít trombocyty
- *Využití:* Pro monitoring jakýchkoliv zánětlivých procesů. Pro diagnostiku imunokomplexových chorob je důležitější průkaz IK deponovaných v tkáních. To se provádí po bioptickém odběru vzorku z tkáně (kůže, svaly, ledviny) pomocí přímé fluorescence se prokazuje uložení IgG

Zákalové reakce

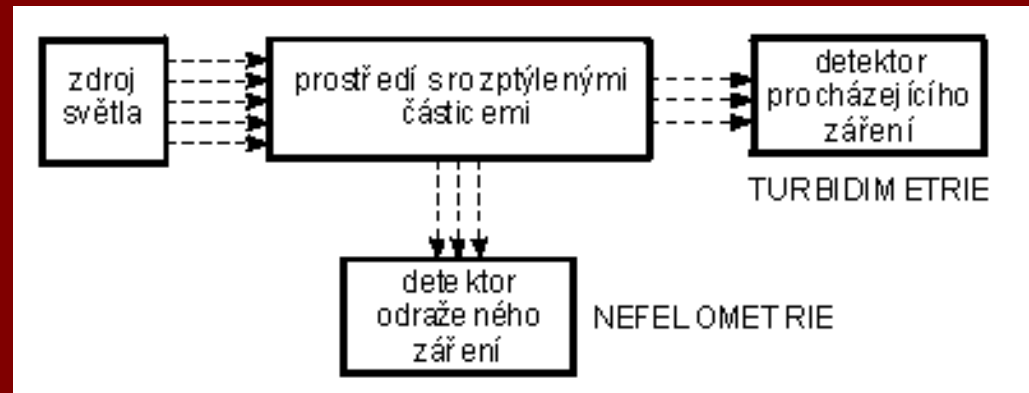
metoda probíhající v roztoku

Princip: při reakci Ag a Ab vzniká zákal-precipitát, jehož intenzita je při konstantním množství mn. Ab úměrná koncentraci vyšetřovaného Ag

■ **NEFELOMETRIE** – rozptyl viditelného světla měřeného pod úhlem

■ **TURBIDIMETRIE** – úbytek viditelného světla při průchodu vzorkem měřeného ve stejné rovině

■ **výhoda:** možnost automatizace, rychlost provedení, přesnost, ale vyšší cena



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 (2-3 l 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** (polyvinyliden difluoridová) – hydrofilní interakce
- **Nitroceluloso**vá – 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 detergent SDS. Všechny bílkoviny vážou SDS v poměru **1,4 SDS na 1 g bílkoviny**. Molekuly SDS bílkovině udělí negativní náboj. Na molekulu bílkoviny se naváže takové množství molekul SDS, že 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.

- **IMUNODETEKCE**

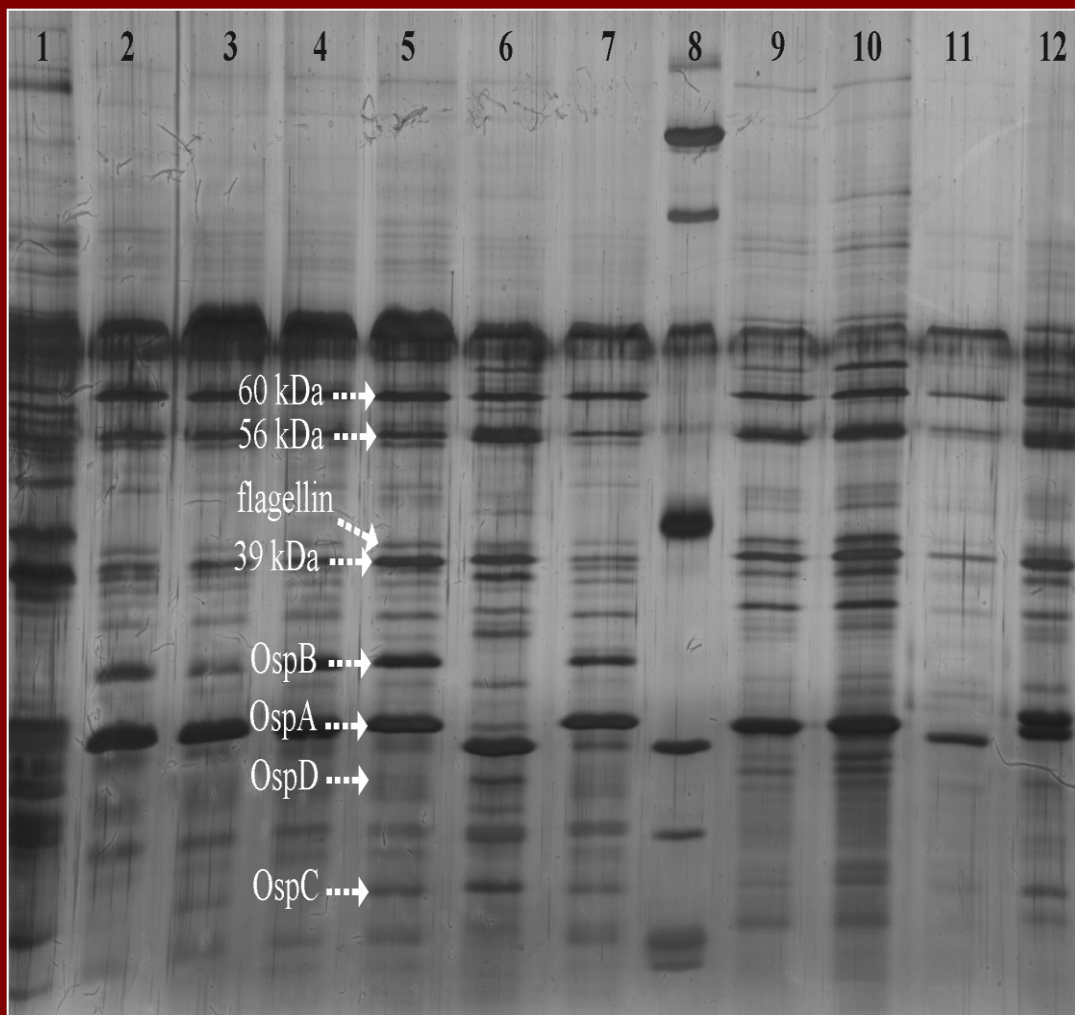
- Inkubace s primární protilátkou a následně se sekundární protilátkou v blokovacím roztoku.

- substrátového roztoku, dokud se neobjeví bandy.

- Vyvolávání ukončíme namočením membrán do do vodovodní vody.

Výsledky PAGE analýzy

SDS-gradient PAGE proteinový profil



Legenda:

Z gelu se mohou
rozeznat typické
rozdíly mezi

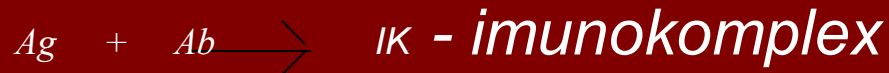
- *B. afzelii* a *B. garinii*
(linie 5, Linie 6)

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

Imunochemické metody

- 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.

-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
 - a) jen proti **jedné chemické skupině**
 - b) **která je společná pro více strukturně chemicky příbuzných látek**

Imunochemické metody

moderní imunologické diagnostické metody, vznikly v 80. letech min. století

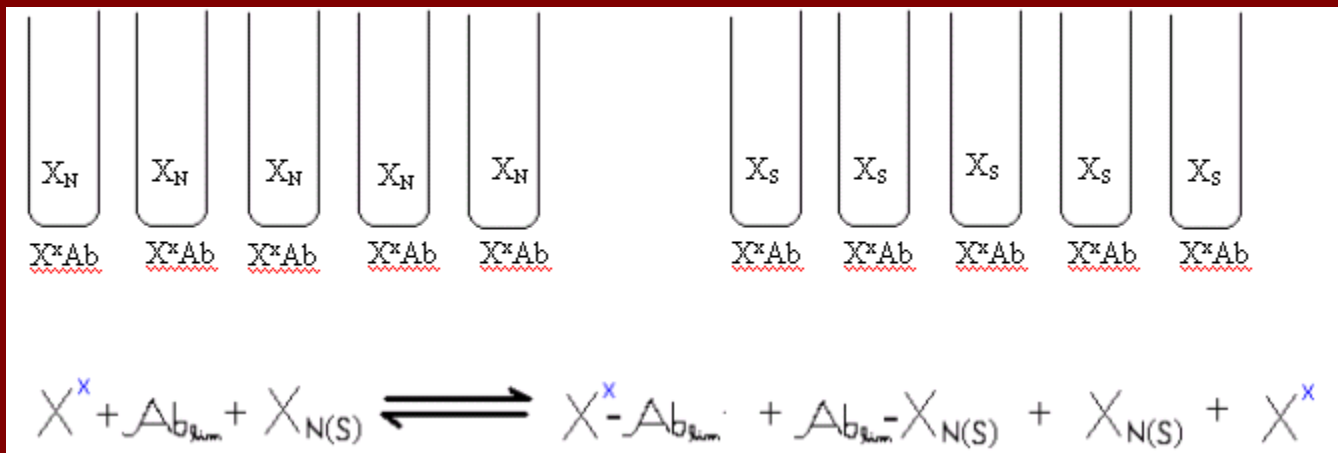
vychází z poznatků imunologie, molekulární biologie, enzymologie, fotometrie a radiochemie

- ***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 immunoanalýza)

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 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

- **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

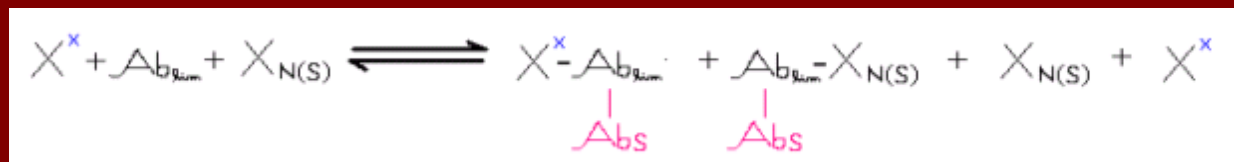
XS.....standardní antigen

☞ **oddělení IK:**

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

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

■ Abs + Ab ...vznikají sraženiny IK

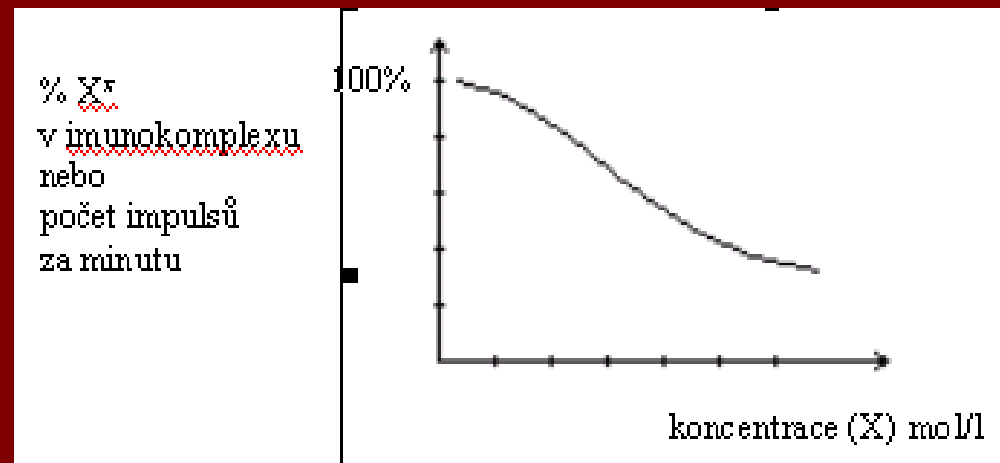


- **izolace IK** -imunochemicky – Abs, **fyzikálně** - filtrace, centrifugace...
molekulární metody – elektroforéza, chromatografie ...

☞ **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, specifičnost, 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:

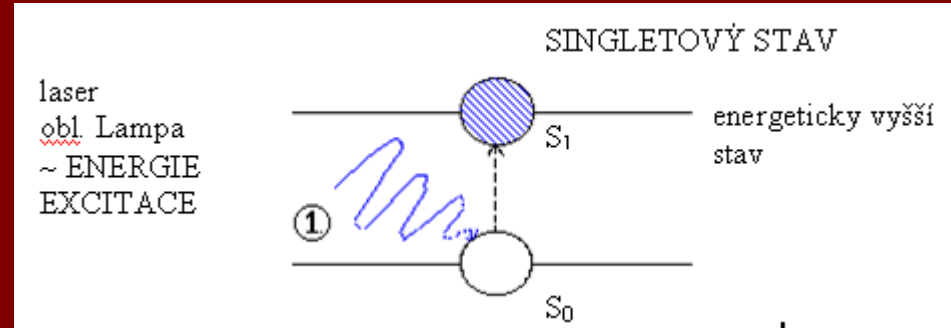
- využití v kriminalistice, soudním lékařství (detekce jedovatých látek), stanovování velmi malého množství látek (nízko i vysokomolekulárních) např.: kardiotonika, cytostatika (léčba infekčních onemocnění, nádorových onemocnění), hladiny hormonů, léčiv, vitamínů, drogy, minoritních složek séra, ve virologické 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 **EXCITOVANÉHO**, 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 protilátky
- **nenavázané barvivo musí být lehce odstranitelné**
- **! biologický materiál sám o sobě vyzařuje energii** **pozadí**
- - 2 druhy:
- ★ **HOMOGENNÍ**
- ★ **HETEROGENNÍ**

• FLUORESCENCE

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



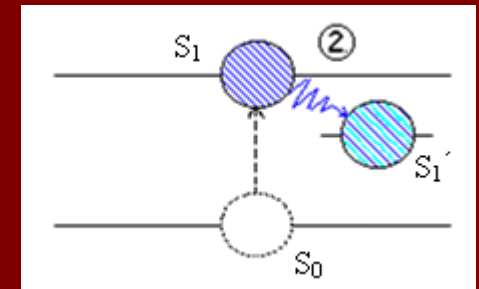
2. FÁZE

- trvá 10^{-9} s velmi krátká

konformační změna

disipace energie část energie se ztrácí

– přechází na nižší stav

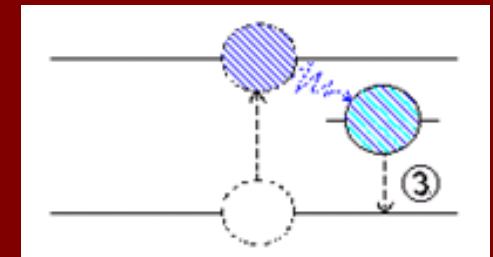


3. FÁZE

- vyzáření energie, přechází na základní stav

vyzáření **EMISNÍ ENERGIE**

energie emisního spektra/



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

$$E_{ex} > E_{em}$$

$$h \cdot (c/\lambda_x) > h \cdot (c/\lambda_m)$$

$\lambda_x < \lambda_m$. 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 o 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 ■■■■ možní 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
- **Vlastnosti sondy:**
- navázané barvivo musí být lehce odstranitelné
- musí mít vysokou intenzitu fluorescence,
- fluorescenční signál musí být dobře odlišitelný od pozadí,
- vazba sondy na Ab či Ag nesmí měnit jejich imunologické vlastnosti.

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

FIA

přístroje :

- **SPEKTROFLUOROMETR**

- měří fluorescenci vztaženou na celý preparát

- **FLUORESCENČNÍ MIKROSKOP**

- **FLOWCYTOMETR**

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** propouštějícího krátkovlnné záření a **2. sekundárního okulárového** zadržujícího emitované primárním filtrem pouze viditelné záření objektu.

- **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 autoprotilátěk jak a) orgánově nespecifických (antinukleárních Ab proti mitochondriím, hladkému svalstvu b) orgánově specifických (ab proti parietálním b. žaludku, β buňkám pankreatu, bazální membráně glomerulů, slinným žlázám a pod)

- **★ HOMOGENNÍ:** - *vlastnosti:*
- **■ Intenzita** fluorescence se při vzniku konjugátu **mění**
- **■** stanovení **nízkomolekulárních látek** /haptenu/ - *antibiotika, sedativa, hypnotika ...*
- **■ nemusíme oddělovat IK** od volných reaktantů
- **★ HETEROGENNÍ:** - *vlastnosti:*
- **■ Intenzita** fluorescence se v průběhu reakce **nemění**
- **■** stanovení **vysokomolekulárních látek**
- **■ nutné oddělení IK** od volných reaktantů
- - 2 způsoby oddělování:
- **■ PRECIPITACE** ■ srážení v imunologii
- - PEG ■ polyethylenglykol ■ **■** **razí se**
- **■ navázání na pevný nosič**
- - využití: ↗ u separační FIA
- **✿ imunofluorescenční analýzy**

- **Testy funkce a počtu buněk IS-základní cvičení, zatím kromě CIK**
- **a) stanovení leukocytárních (lymfoc) populací a jejich funkce**
- **b) speciální in vitro testy-my jen část, tj testy na vyšetřování lymfocytárních funkcí, testy na proliferaci lymfocytů, test blastické transformace lymfocytů**

Imunologické vyšetření

- Oběh materiálu
- Výsledky Imun. Vyšetření
- Základy interpretace výsledků imunologických laborat. Testů viz skripta

- **6. přednáška: Vyšetření funkce fagocytů-základní cvičení**
- **Vyšetření HLA-antigenů**
- **Molekulárně biologické metody v imunologické laboratorní diagnostice (podrobně bude se přednášet jen ty metody, které nebyly probírány v jiných předmětech, spíše jen obecný přehled, ne popis metod), PCR, RT-PCR, Hybridizace, atd**
- **a) diagnostika primárních imunodeficitů**
- **b) diagnostika nezjistitelných i běžných onemocnění**
- **c) diagnostika polymorfizmu imunologicky důležitých genů**
- **d) diagnostika HLA-Ag**
- **HLA diagnostika, ne teorie**

Př. Laboratoř Bioplus

- Probrat metody- rozdělení
- Jednotlivé laboratoře
- Které techniky na jaké druhy vyšetření