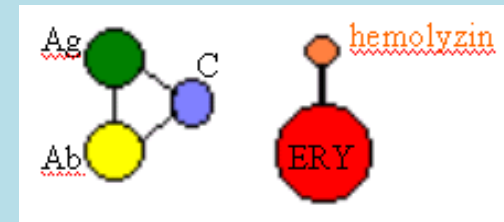


Komplementové metody

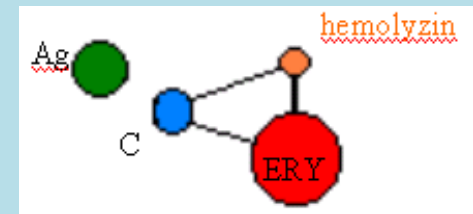
metody využívající faktu aktivace komplementového systému komplexem – antigen-
protilátka, KFR

- **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**

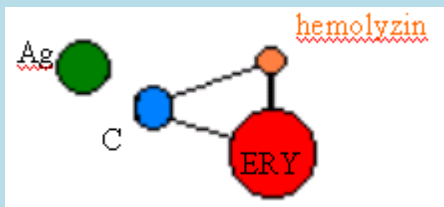


- **KOMPLEMENT** - zdrojem nejčastěji sérum morčete
(váže se na IK a aktivuje protilátku)

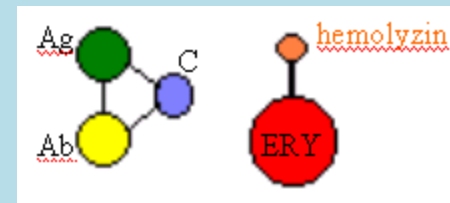
hemolytický komplex: komplex Ag /beraní ERY/ a
protilátky ~ **EMBOCEPTORu /hemolyzinu/**,
získaného imunizací králičího séra beraními
erytrocyty



→ aby došlo k hemolýze je nutná **spoluúčast**
KOMPLEMENTU a inkubace 30 minut při 30 °C



KFR



- 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**

- → **k hemolýze 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**

- **DOJDE k hemolýze:**

KFR

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

- ***použití:***

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

Vyšetření komplementového systému

- a) Stanovují se 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, hemolýza - spektrofotometrie

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

Reakční směs:

2% nálev krvinek, Ab(hemolyzin), C komerční (vyšetřované sérum)

Výsledek: lýze buněk, vyčerešení

Principy metodik

Ag+Ag=IK, CIK, DIK

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

Vyšetření cirkulujících a deponovaných IK

- **Principy metodik**
- Ag+Ag=IK, CIK, DIK
- **1.** Využívající fyz – chem vlastností – CIK- největší makromolekuly séra mohou být precipitovány pomocí PEG (polyetylénglykol). Precipitát je úměrný mn. cirkulujících CIK

Vyšetření CIK

- 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, žírné b., fygocyty

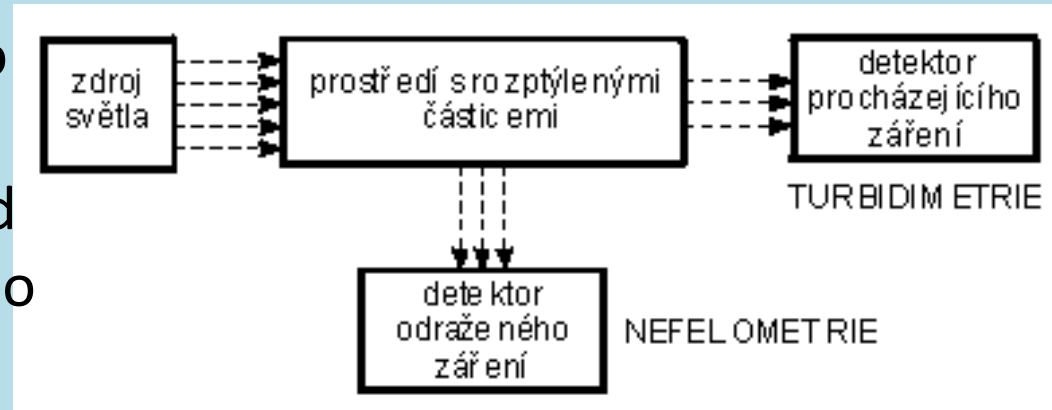
- *Využití:* Pro monitoring jakýchkoliv zánětlivých procesů. Pro diagnostiku imunokomplexových chorob je důležitější průkaz IK deponovaných v tkáních. To se provádí po **biooptickém odběru** vzorku z tkáně (kůže, svaly, ledviny) pomocí přímé fluorescence se prokazuje uložení IgG

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 monochrom. světla měřeného pod úhlem, měří se intenzita záblesků světla odraženého od IK (Tyndal. efekt), výbojka nebo laser



TURBIDIMETRIE – úbytek monochrom. světla o 320nm při průchodu vzorkem v kyvetě měřeného ve stejné rovině

Výhoda: možnost automatizace, rychlost provedení, přesnost, ale vyšší cena, dioda, méně přesná

Využití: Stanovení c Ig, hlavních sérových proteinů, stanovení sérových bílk.(složky C, proteiny akut. fáze (CRP – stand. 2mg/l, transferin, alfa2 – makroglobulin)

Úskalí: V prec. křivce je třeba vymezit oblasti:

a) zóna využitelná pro měření Ab, tj oblast nadbytku Ab

b) **Kritický bod, oblast ekvivalence**, zde leží nejvyšší konc. Ag, kterou lze ještě měřit

c) oblast za krit. bodem pro Ag, zde nelze měřit

Dva režimy stanovení

a) **End point** – měří se v prostředí polyetylénglykolu

b) **Rate kynetický systém** – měří se kineticky , v krátkých časových intervalech

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

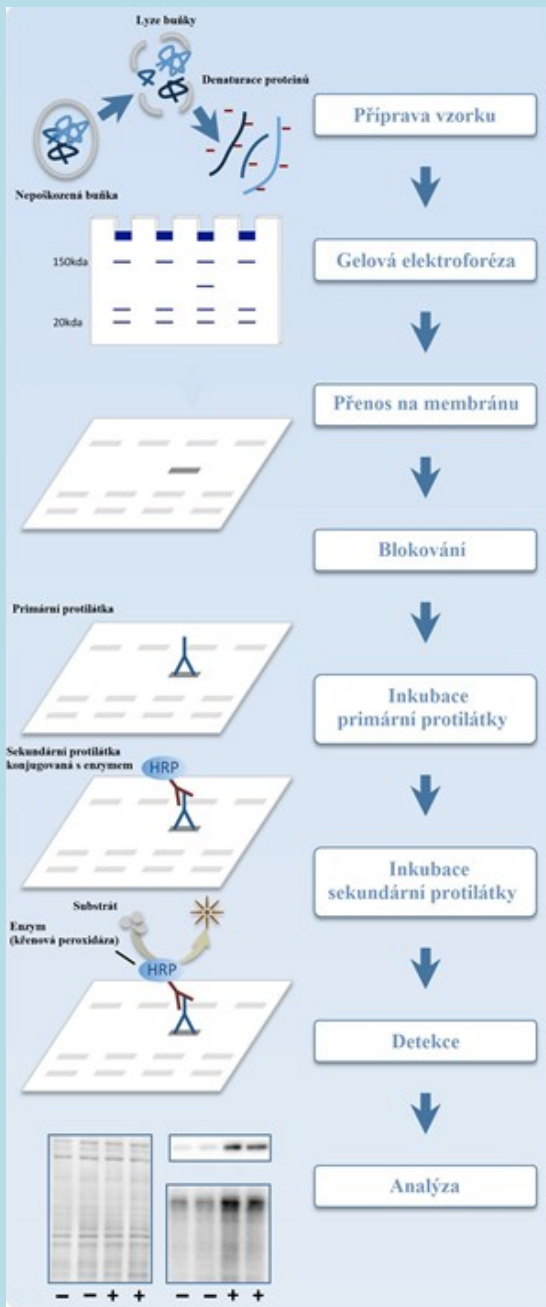
Používané membrány:

- **Nylonová** – elektrostatická interakce
- **PVDF** (polyvinylen difluoridová) – hydrofilní interakce
- **Nitrocelulosová** – hydrofilní interakce

WESTERN BLOT

3 kroky:

1. **SDS PAGE** (gradientová elektroforéza)
2. **BLOTTING**
3. **IMUNODETEKCE**



Princip metody Western blot
(Upraveno dle Bass et al., 2017).

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 Mr a po sestrojení kalibrační křivky je možné vypočítat Mr jednotlivých frakcí

- **WESTERN BLOTTING**

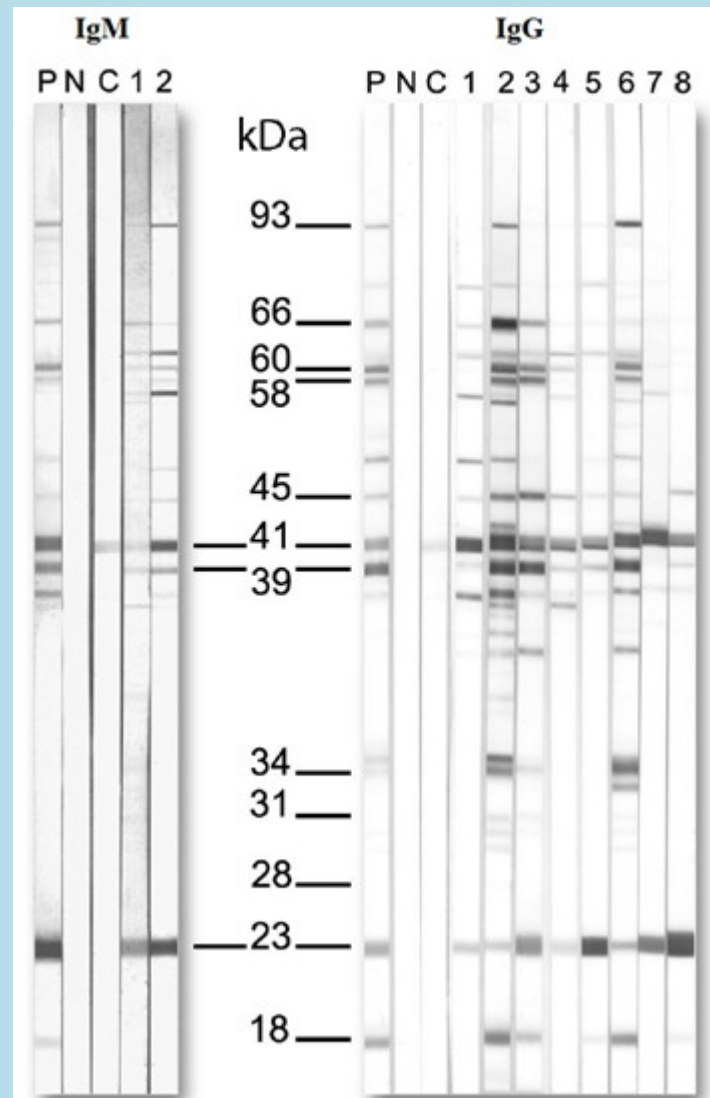
Blotovacím zařízením pro semi-dry blotting přeneseme rozdělené proteiny pomocí el. proudu.

- 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**

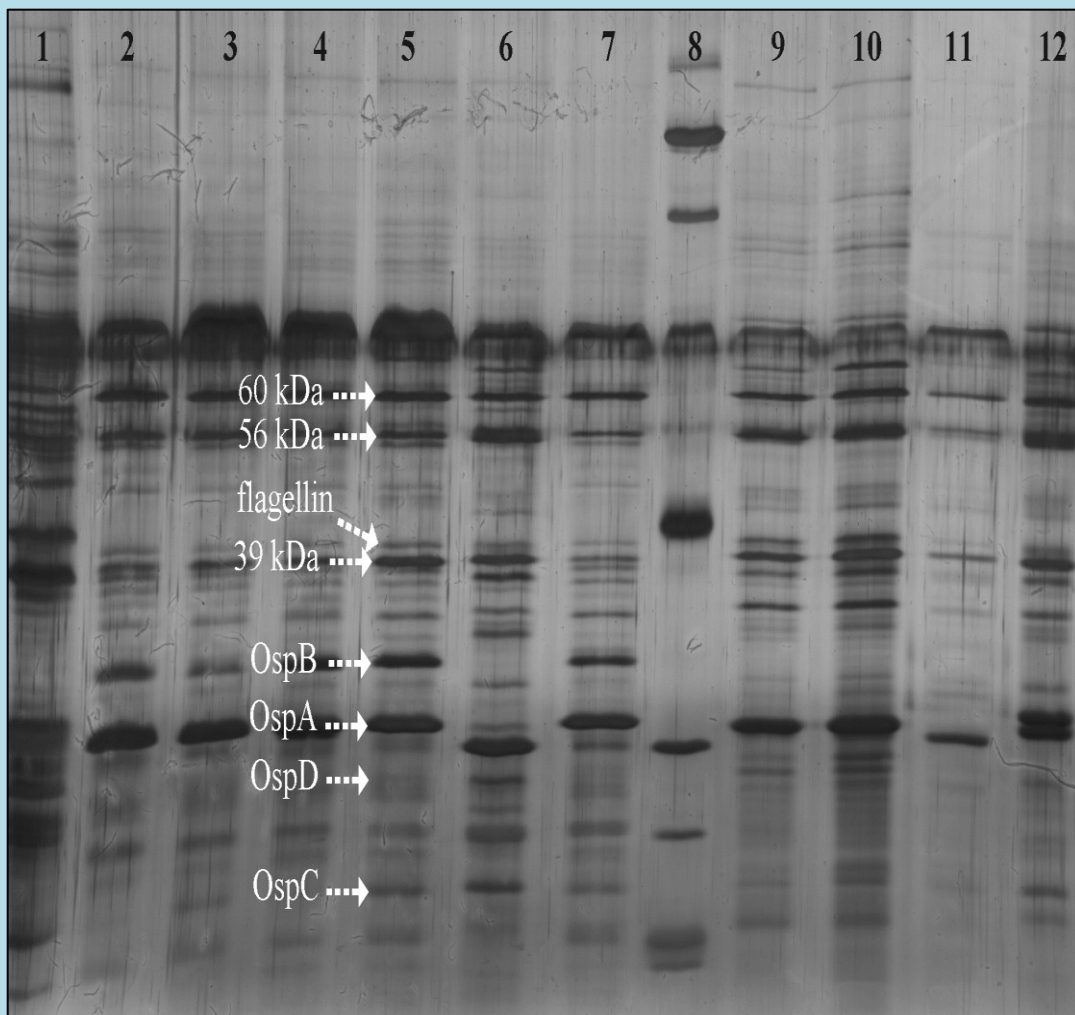
- Z membrány odřízneme sjezd s proteinovými standardy a obarvíme amidočerní, propláchneme v prom. roztoku
- Inkubace s primární protilátkou v blokovacím roztoku
- a následně se sekundární protilátkou v blokovacím roztoku.
- Promyjeme a vložíme do substrátového roztoku, dokud se neobjeví bandy (barví se proteiny)
- Vyvolávání ukončíme namočením membrán do vody



- Příklad IgM a IgG WB, vyznačené jsou pruhy doporučené k hodnocení, P – pozitivní kontrola, N – negativní kontrola, (C – kalibrační kontrola), IgM (1,2) – vzorky, IgG (1 – 8) – vzorky (Upraveno dle Johnson, 2011).

Výsledky PAGE analýzy

SDS-gradient PAGE proteinový profil



8. standard

Vyhodnocení
Denzitometricky
Legenda:

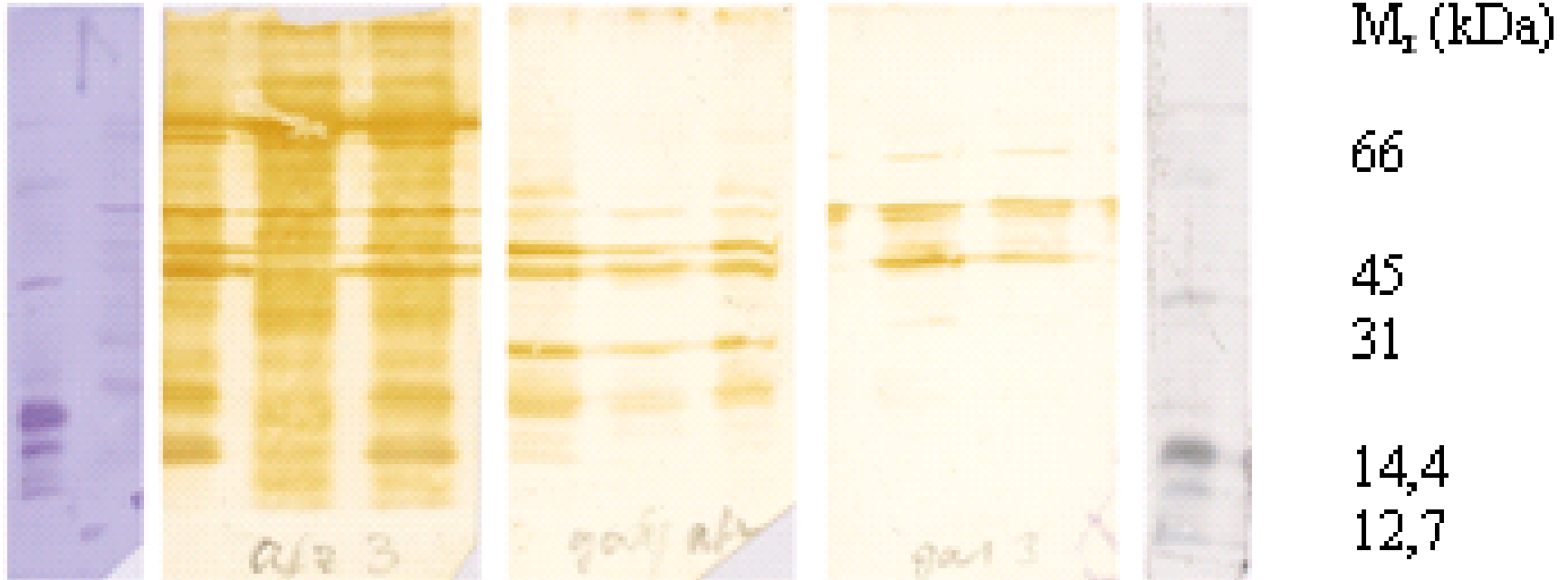
Z gelu se mohou rozeznat typické rozdíly mezi

- *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

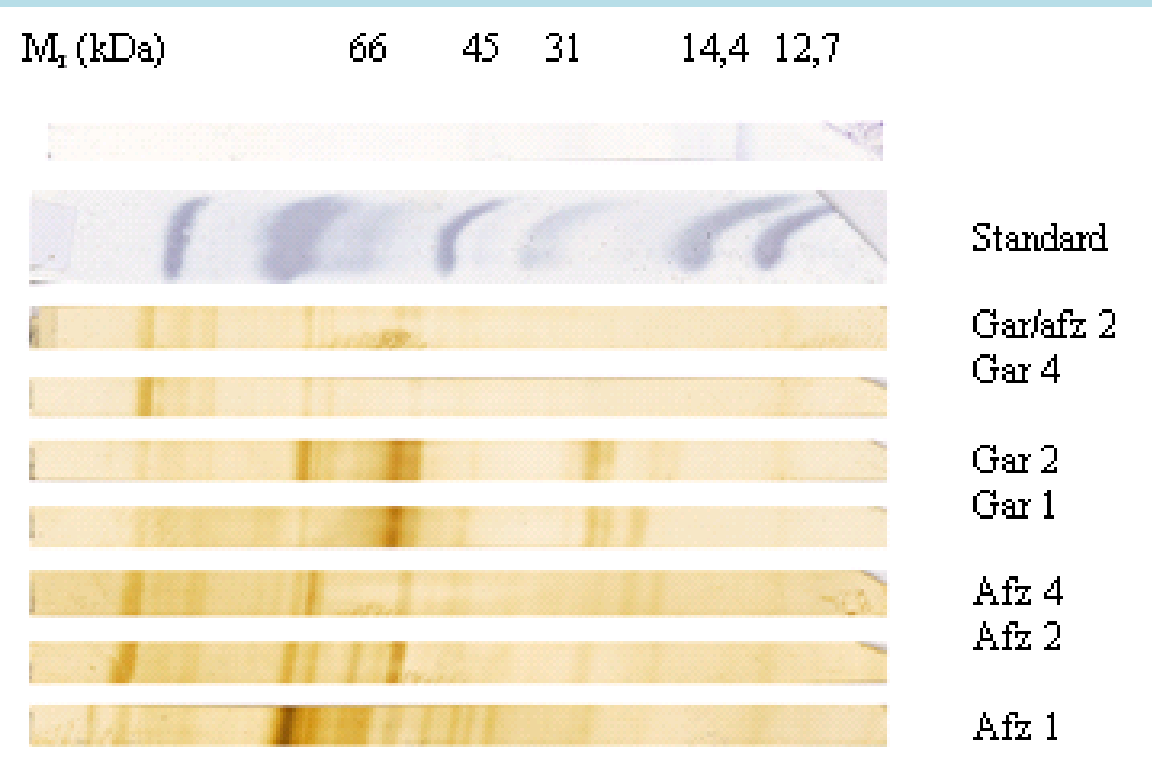


Nitrocelulózová membrána s rozděleným antigenem *B. afzelii*, směs, *B. garinii* metodou **SDS PAGE**

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

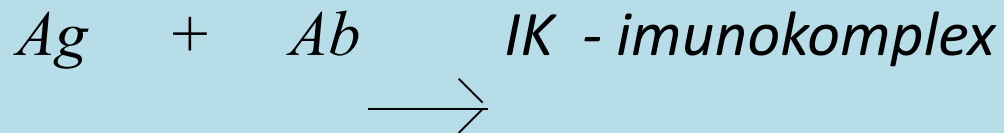
- **Úskalí:**

1. akrylamid je jedovatý
2. dostatečné napětí při blottingu
3. vlhké prostředí v pufro, 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

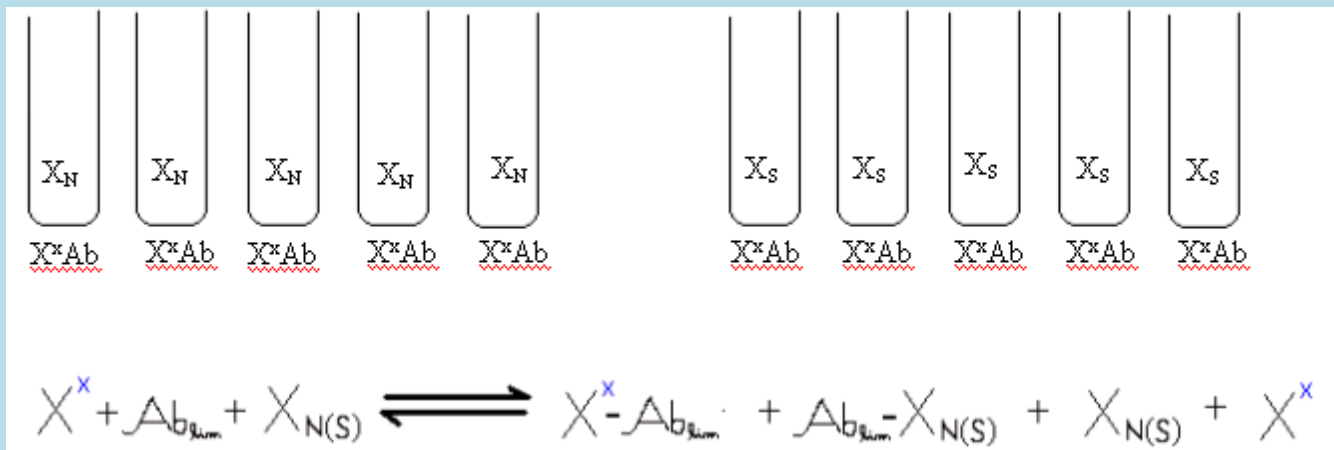
- **Antigeny Ag** – makromolekuly (polymery: proteiny, polypeptidy...)
 - navozují specifickou imunitní odpověď
 - specificky reagují s protilátkami
 - haptén – nízkomolekulární látka (léčiva, drogy) navázána na
 - vysokomolekulární nosič
- **Protilátky Ab** – bílkoviny (glykoproteiny) tělních tekutin
 - 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: ^3H , ^{14}C , ^{125}I , ^{131}I
- - označený Ag → **Xx**
- **vlastní reakce:**
- - 4 složky:



Xx.....značený Ag

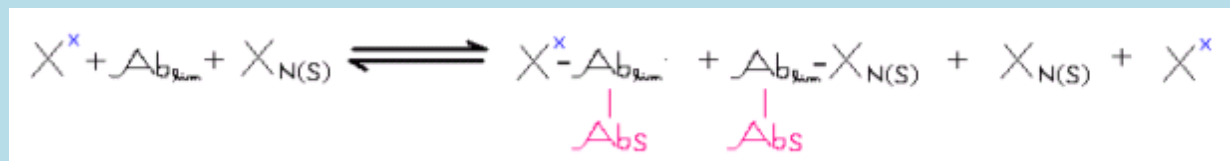
Ab lim 60%.....protilátka ze zvířete /je limitováno ~ známo její množství/

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



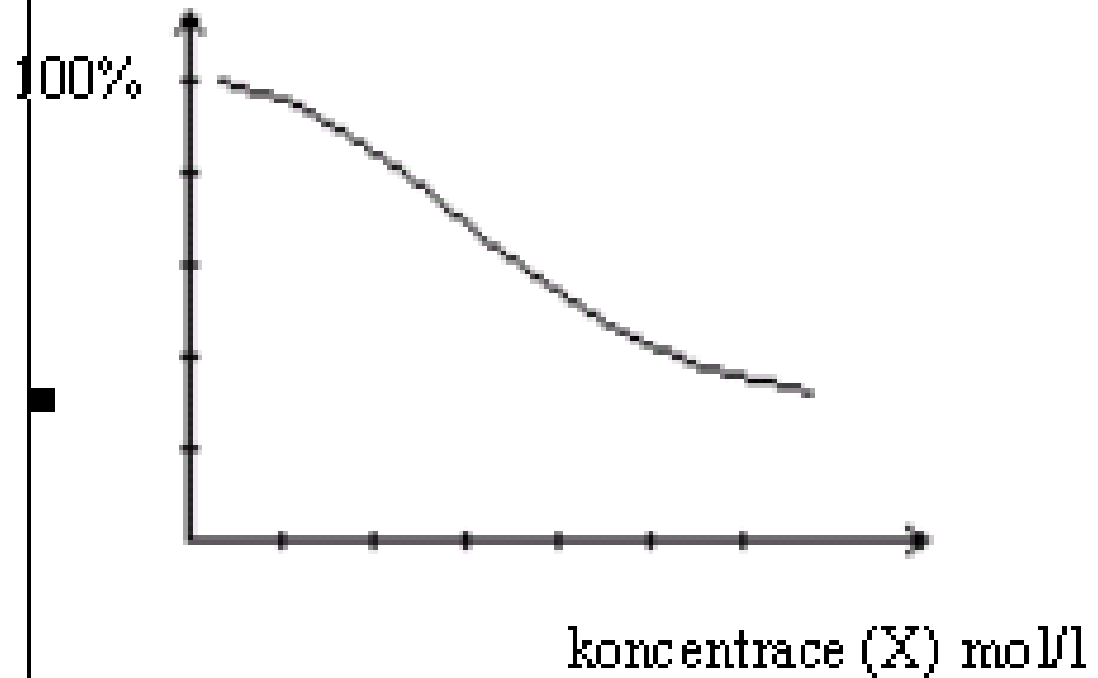
- **izolace IK** -imunochemicky – Abs, **fyzikálně** - filtrace, centrifugace...
molekulární metody – elektroforéza, chromatografie ...

vyhodnocení:

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

Vyhodnocení:

% X^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, 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 IgE) 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 alerģendiagnostice: 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

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

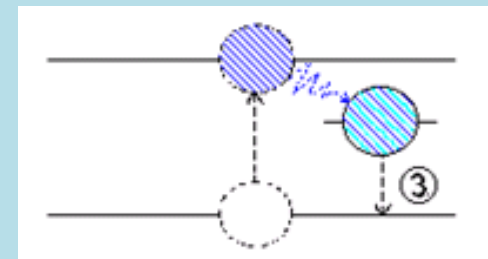
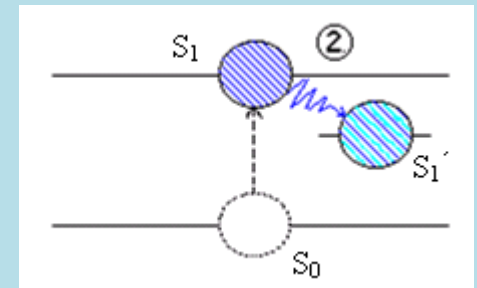
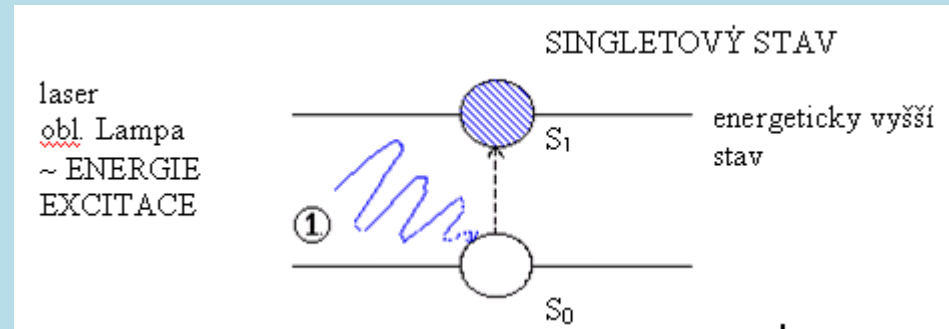
3. FÁZE → EMISE

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

energie EXCITAČNÍ se NErovná EMISNÍ !!!

$$E_{ex} > E_{em} \quad h \cdot (c/\lambda_{ex}) > h \cdot (c/\lambda_{em})$$

⇒ $\lambda_{ex} < \lambda_{em}$ ⇒ vl. délka excitační je menší než emisní



- 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 FIA

- 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
- $\text{AgF, HF} + \text{Ab} \rightarrow$ 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
- $\text{Ag} + \text{Ab} + \text{AbSF} \rightarrow$ 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, β buňkám pankreatu, bazální membráně glomerulů, slinným žlázám a pod)