

Vybrané imunochemické metody

Praktické cvičení z lékařské biochemie

Všeobecné lékařství

Lenka Fialová

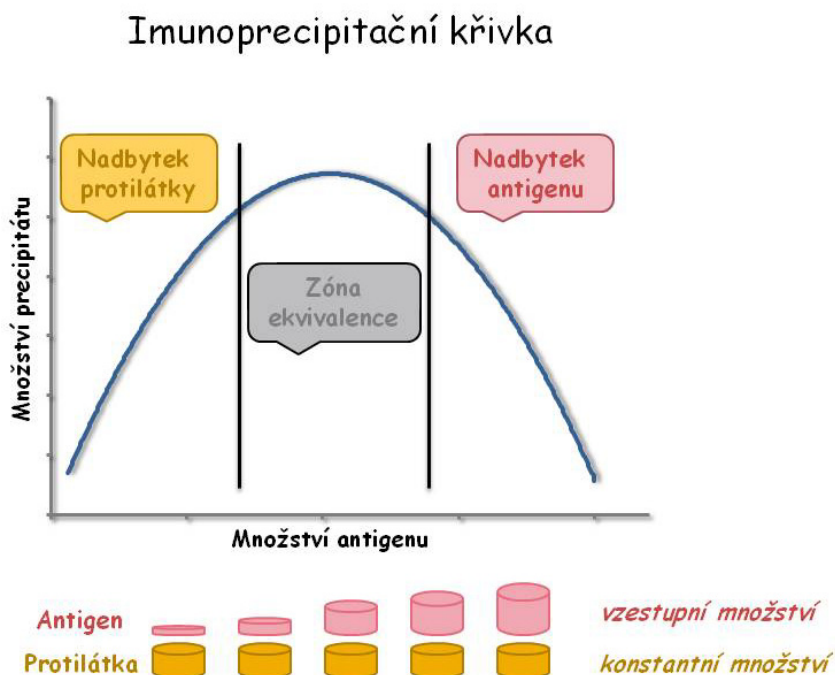


Úloha 1 – Imunoprecipitační křivka lidského albuminu a stanovení koncentrace albuminu imunoturbidimetricky

Princip:

Imunoprecipitační křivka vyjadřuje množství vytvořeného imunoprecipitátu *při různém množství solubilního antigenu a stejném množství odpovídající protilátky*. Získáme ji, jestliže do řady zkumavek, ve kterých je konstantní množství protilátky, budeme přidávat antigen ve vzestupné koncentraci (obr. 1).

Obr. 1



Po inkubaci, během níž probíhá reakce antigenu s příslušnou protilátkou, změříme v jednotlivých zkumavkách vzniklý imunoprecipitát. Podstatou imunoprecipitátu je prostorová mřížka, která se vytváří propojením epitopů antigenu s jimi odpovídajícími paratopy protilátek. Když dosáhne určité velikosti, ztrácí rozpustnost a precipituje v roztoku.

Podmínkou imunoprecipitace *je reakce antigenu s více epitopy* (polyvalentní antigen) s protilátkami, které s těmito epitopy reagují. Pokud tato podmínka není splněna, imunoprecipitace se neuskuteční. Proto hapteny, které jsou vybaveny pouze jedním epitopem, nemohou precipitovat. Podobně monoklonální protilátky, které jsou namířeny pouze proti jednomu epitopu, nejsou vhodné pro imunoprecipitační reakce.

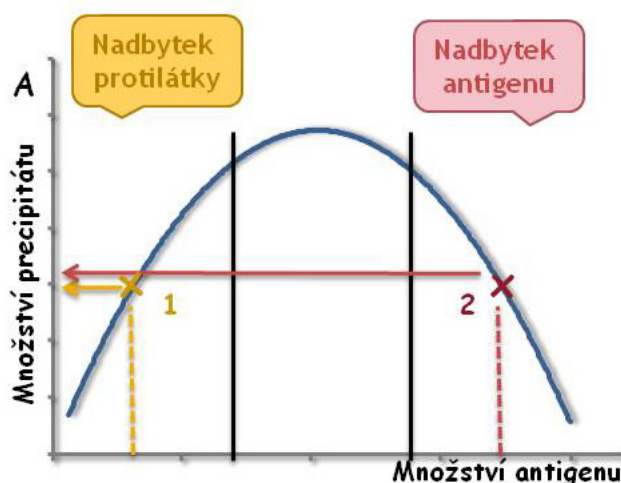
V naší úloze použijeme k sestrojení imunoprecipitační křivky lidský albumin a beraní protilátku proti němu. Albumin je významná bílkovina přítomná v plazmě ve vysoké koncentraci.

Při našem pokusu budeme pracovat s takovými koncentracemi albuminu, které pokryjí všechny oblasti precipitační křivky – oblast nadbytku protilátky, oblast ekvivalence i oblast nadbytku antigenu. Zákal, který vzniká při reakci albuminu s protilátkou proti němu, lze hodnotit imunoturbidimetricky. Pomocí běžného spektrofotometru můžeme *měřit intenzitu světla, které prošlo zakaleným roztokem v přímém směru*.

Pro stanovení koncentrace albuminu v neznámém vzorku použijeme jako kalibrační křivku lineární, vzestupnou část precipitační křivky (oblast nadbytku protilátky). V této oblasti je koncentrace antigenu přímo úměrná množství vzniklého precipitátu. Je zapotřebí zdůraznit,

že pokud chceme imunoprecipitaci v roztoku použít pro stanovení koncentrace nějaké látky, je nezbytné, aby v reakční směsi byl **nadbytek protilátky**. Pokud by tato podmínka nebyla zachována, dostávali bychom při vysokých koncentracích antigenu falešně nízké hodnoty. Vzorek je zapotřebí naředit tak, aby se koncentrace snížila na hodnotu, kdy bude splněna podmínka nadbytku protilátky, a výsledek potom vynásobit zředěním. Na obr. 2 máme uveden příklad.

Obr. 2 Hodnocení imunoturbidimetrie



Stejnou hodnotu absorbance může poskytnout **vzorek 1** s koncentrací stanovované látky, která leží v **oblasti nadbytku protilátky**, ale i **vzorek 2** s vysokou hodnotou stanovovaného analytu, která leží v **oblasti nadbytku antigenu**. U vzorku 2 bychom za těchto podmínek získali nesprávně nízkou hodnotu absorbance.

Imunoturbidimetrické metody jsou široce využívány ke stanovení různých analytů v biologických tekutinách (např. různé plazmatické bílkoviny).

Úloha 2 – Vyhodnocení jednoduché radiální imunodifúze pro stanovení celkových IgG a IgM

Princip metody:

Antigen (v našem případě lidský IgG nebo IgM), který je nanesen do kruhového startu, radiálně difunduje v agarózovém gelu obsahujícím specifickou (zvířecí) protilátku. Při reakci antigenu se specifickou protilátkou se vytváří precipitační prstenec, jehož plocha je úměrná množství antigenu.

Referenční hodnoty: IgG: 8 – 18 g/l IgM: 0,6 – 1,8 g/l

Úloha 3 – Stanovení specifických protilátek pomocí ELISA metody

Princip metody:

Metody enzymové imunoanalýzy (EIA) představují velkou skupinu imunoanalytických metod, které využívají jako **značku enzym**. Jednou z EIA metod je tzv. **ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)**. Je pro ni typické, že buď antigen, nebo protilátka jsou pevně zakotveny na pevné fázi, kterou může být povrch jamek mikrotitračních stripů. ELISA metody dělíme **na kompetitivní a nekompetitivní** (sendvičové). Mohou být použity **pro stanovení antigenů nebo protilátek**.

Naše modelová souprava ELISA je příkladem **sendvičové enzymové imunoanalýzy** určené ke stanovení specifických protilátek, jako jsou např. protilátky proti nejrozličnějším infekčním agens (baktérie, viry a další), autoprotilátky namířené proti vlastním strukturám nebo IgE protilátky proti jednotlivým alergenům.

V soupravě je na povrch jamek mikrotitračních proužků (tzv. stripů) navázán specifický antigen (Ag), kterým může být např. virový antigen nebo alergen. V neznámých vzorcích, které přidáváme do jamek, budeme vyšetřovat přítomnost protilátek proti tomuto antigenu. Pokud vzorky obsahují protilátky proti danému antigenu, navážou se na něj a vytvoří s ním imunokomplexy (obr. 3, první krok).

Po promytí nenavázaných složek vzorku se imunokomplexy detekují konjugátem zvířecí protilátky proti lidské protilátce (antiimunoglobulin – anti-Ig) s enzymem peroxidázou. Vznikne „sendvič“ tvořený antigenem zakotveným na stěně jamky – lidskou specifickou protilátkou – konjugátem (obr. 3, druhý krok). Konjugáty, které se nenavázaly, musí být odstraněny promytím.

Množství navázaných značených protilátek se zviditelní enzymovou reakcí, katalyzovanou peroxidázou. Po odstranění nenavázaných molekul konjugátu promytím přidáme substrát, který je pomocí peroxidázy přeměněn na barevný produkt. Enzymová reakce se zastavuje přidáním kyseliny (stop roztok). Podle intenzity zbarvení hodnotíme přítomnost či nepřítomnost protilátek v testovaných vzorcích. (obr. 3, třetí krok). Intenzitu zbarvení je možno hodnotit kvalitativně nebo kvantitativně.

Reakční podmínky nekompetitivní ELISA metody

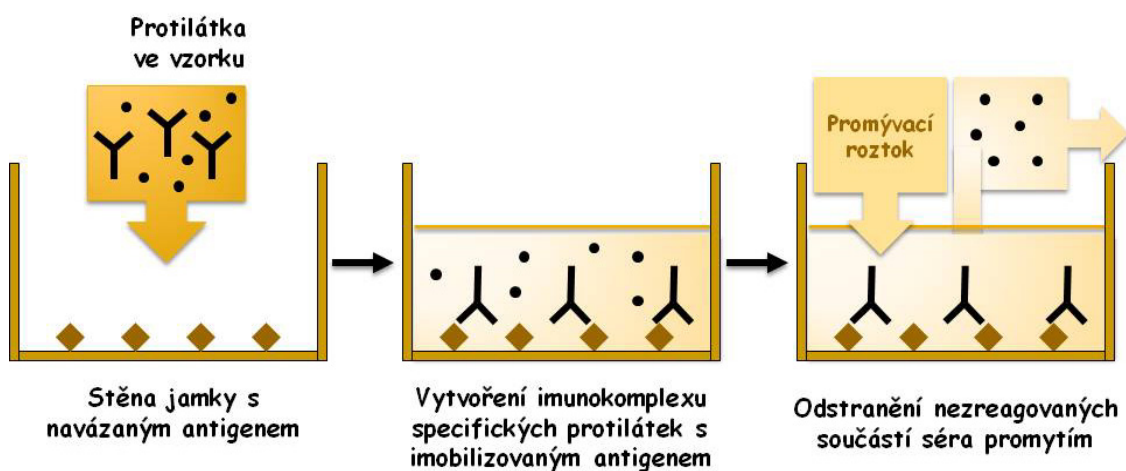
Pro nekompetitivní metodu ELISA pro stanovení protilátek platí, že množství antigenu navázaného na stěnu destičky musí být v nadbytku vzhledem k očekávanému množství protilátek. V případě nedostatečného množství antigenu by se některé protilátky v testovaných vzorcích neměly na co navázat a během promývání by byly odstraněny. Výsledek koncentrace protilátek ve vzorku by pak byl nesprávně (falešně) nižší. Podobně i množství přidávaného konjugátu musí být v nadbytku. Důsledkem jeho nedostatku by byl opět falešně nižší výsledek, neboť by nebyla splněna podmínka, že na všechny imunokomplexy tvořené antigenem a protilátkou ze vzorku, se naváže konjugát.

Vysvětlení některých pojmů

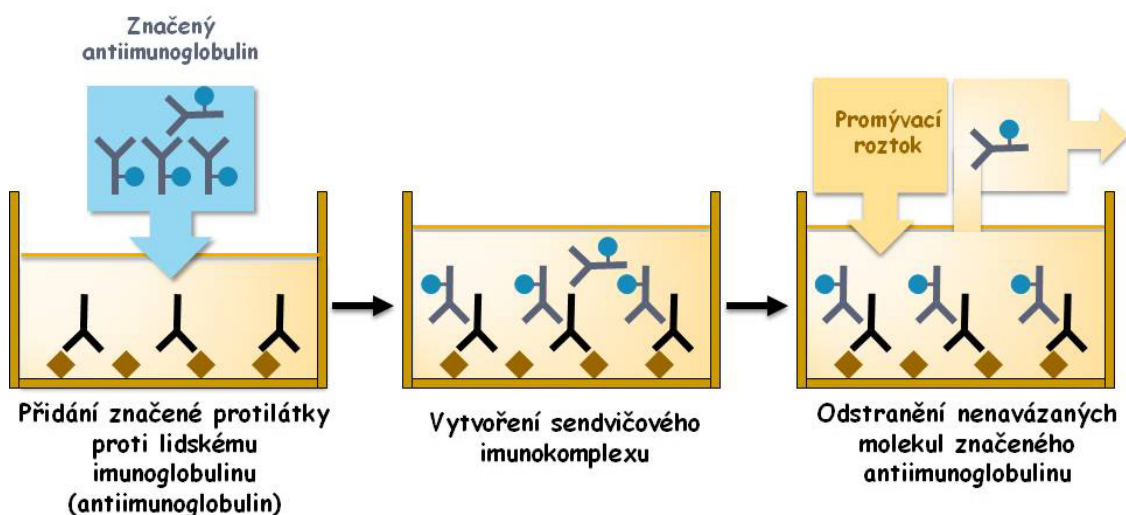
1. **Promývání:** mezi jednotlivými kroky provádění testu ELISA je zapotřebí odstranit z jamek nenavázané složky séra (první krok) nebo protilátek značených enzymem (druhý krok). Provádí se naplněním jamek promývacím roztokem, který je pak odstraňován. Tento postup se několikrát opakuje. Pokud by nebyly vymyty protilátky značené enzymem, bylo by zbarvení ve všech jamkách stejné bez ohledu na množství specifických protilátek ve vzorcích.
2. **Konjugát:** je označení pro spojení dvou či více látek pomocí chemické či jiné reakce. V EIA metodách se konjuguje obvykle zvířecí protilátka proti lidskému imunoglobulinu (anti-Ig) nebo antigen s enzymem, který umožňuje detekci imunokomplexů. V naší ELISA metodě je jako konjugát používán anti-Ig s peroxidázou (anti-Ig/Px).
3. **Substrátový roztok:** liší se podle enzymu, který je součástí konjugátu. Pro peroxidázu je používán derivát benzidinu tetrametylbenzidin, který je v redukovaném stavu bezbarvý. Oxidací peroxidem vodíku v přítomnosti peroxidázy se mění na barevný produkt (obr. 4). Pokud v jamkách není navázaný peroxidázový konjugát, nedojde k barevné přeměně tetrametylbenzidinu a obsah jamek se nezbarví.
4. **Zastavovací (stop) roztok** je slabý roztok kyseliny, kterým se po určité době zastavuje enzymová reakce. Zároveň dojde ke změně barvy z modré na žlutou, která je měřitelná na spektrofotometru při vlnové délce 450 nm. V případě pozitivních vzorků je žluté zbarvení viditelné i okem.

Obr. 3 Provedení nekompetitivní metody ELISA na stanovení protilátek

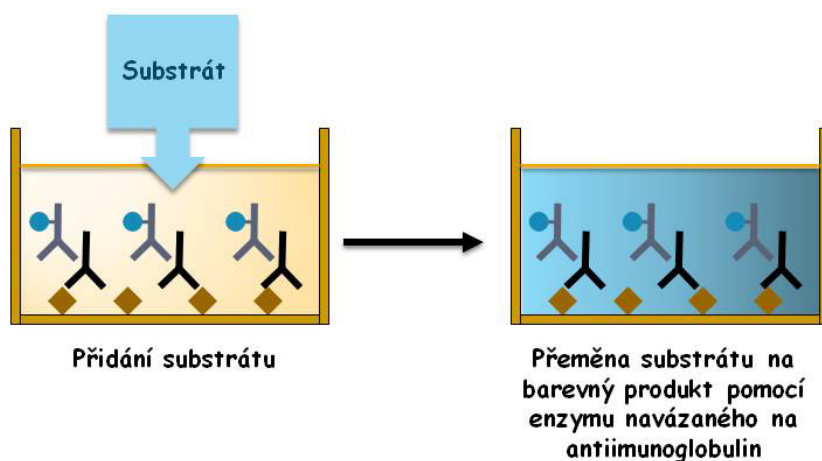
První krok: navázání specifických protilátek ze vzorku na antigen zakotvený na stěně jamky



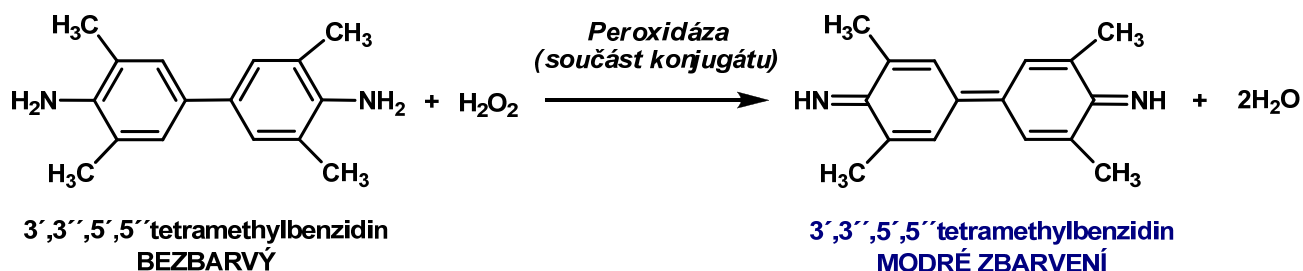
Druhý krok: přidání konjugátu (enzymem značeného antiimunoglobulinu) k imunokomplexům zakotveným na stěně jamky a vytvoření „sendviče“



Třetí krok: vizualizace množství navázaných konjugátů pomocí enzymové reakce



Obr. 4 Podstata chemické reakce katalyzované peroxidázou konjugátu



Hodnocení metody

Kontrola správnosti provedení metody ELISA

V jamkách *se slepých vzorkem* by *se nemělo vyvinout viditelné zbarvení*, neboť místo vzorku je použit ředící roztok, který neobsahuje žádné protilátky. Konjugát, který se nemá na co navázat, je odstraněn při promývání. Slabě žluté zbarvení může být způsobeno přítomností zbytku konjugátu, který byl nedostatečně vymyt.

Hodnocení vzorků

Pokud jsou v testovaných vzorcích přítomny protilátky proti antigenu navázanému na stěnu jamek, zbarví se obsah jamek po přidání stop roztoku žlutě. Intenzitu žlutého zbarvení je možno hodnotit *kvalitativně nebo kvantitativně*.

a. Kvalitativní hodnocení

Při tomto způsobu hodnotíme vzorky na pozitivní a negativní. K tomu je zapotřebí znát hranici mezi negativitou a pozitivitou. Podklady pro rozlišení na pozitivní a negativní vzorky dodává obvykle výrobce. V naší ELISA metodě se zpracovává tzv. cut-off kontrolní vzorek, jehož absorbance představuje hraniční hodnotu mezi pozitivními a negativními vzorky. Konkrétní postup při interpretaci výsledků je uveden v návodu k úloze.

Jinou možností pro posouzení míry *pozitivity* vzorku je použití ředění neboli titrace vzorku. Při nízkém ředění jsou všechny jamky s pozitivními vzorky silně zbarveny. Při vyšším ředění zůstanou silně pozitivní vzorky dále intenzivně zbarveny, zatímco u slabě pozitivních vzorků intenzita žlutého zbarvení slábne. *Negativní* vzorky neobsahují specifické protilátky a nenavázaný konjugát je promýváním odstraněn. Jamky se tedy nezbarví. Rovněž protilátky proti jiným antigenům přítomné ve vzorcích se na antigen nezachytí a jsou v dalším kroku také vymyty.

b. Kvantitativní hodnocení

Pokud chceme množství protilátek hodnotit kvantitativně, je zapotřebí společně se vzorky zpracovávat i standardní roztoky v několika ředěních. Intenzita zbarvení v jamkách je v určitém koncentračním rozmezí úměrná množství protilátek přítomných ve vzorku.

Intenzitu zbarvení hodnotíme měřením absorbance pomocí speciálního spektrofotometru s vertikálním paprskem. Hodnoty absorbancí standardních roztoků se použijí pro sestavení kalibrační křivky. Z kalibrační křivky potom odečteme koncentrace protilátek v neznámých vzorcích.

Úloha 4 – Stanovení specifických protilátek pomocí imunoblotu

Princip metody

Imunoblotové metody kombinují elektroforézu s imunochemickými reakcemi. Nejprve je elektroforézou na polyakrylamidovém gelu rozdělena směs bílkovin. V dalším kroku označovaném jako blotování jsou separované bílkoviny přeneseny na nitrocelulózovou nebo polyvinylidenfluoridovou membránu, kde jsou fixovány. Přenos se děje buď prostou difúzí, nebo za pomoci elektrického proudu.

Zjednodušenou variantou imunoblotu je **imunodot**. Na rozdíl od imunoblotové techniky, u níž je prvním krokem elektroforetické rozdělení proteinů (antigenů), u dot blotu jsou na membránu antigeny nanášeny přímo ve formě proužků nebo skvrn bez předchozí elektroforetické separace. Používají se buď čisté nativní antigeny, nebo antigeny připravené rekombinantní technologií.

Nosiče s již rozdělenými nebo navázanými jednotlivými antigeny určené pro vyšetření přítomnosti některých specifických protilátek v biologickém materiálu jsou komerčně dostupné. To podstatným způsobem zkrátí čas potřebný pro provedení analýzy v klinicko-biochemické nebo imunologické laboratoři. Zpracování vzorku se omezí pouze na inkubaci proužku s vyšetřovaným biologickým materiálem a následnou vizualizaci navázaných protilátek.

Průkaz specifických protilátek v testovaném vzorku s použitím proužků s antigeny zahrnuje několik kroků (obr. 5):

1. Proužek je ponořen do inkubačního roztoku, kde je zvlhčen a poté je k němu přidán **vyšetřovaný vzorek**. Pokud jsou ve vzorku přítomné specifické protilátky, navážou se během inkubace na příslušné antigeny imobilizované na proužku. Nenavázané složky vzorku se odstraní promytím.
2. V dalším kroku se přidá **zvířecí protilátka proti lidskému imunoglobulinu značená enzymem** (konjugát)¹. Zvířecí protilátka se naváže na lidský imunoglobulin a vznikne sendvičový imunokomplex tvořený antigenem na proužku, lidskou protilátkou a konjugátem. Promytí odstraní nenavázané molekuly konjugátu.
3. Následuje **přidání substrátu**, který je přeměňován enzymem konjugátu na produkt. V místech proužku, kde se při imunochemických reakcích navázaly protilátky ze vzorku, se objeví barevné linie. Ty jsou důkazem přítomnosti specifických protilátek proti daným antigenům ve vyšetřovaném vzorku.
4. Nakonec se proužek usuší a vyhodnotí se viditelné linie.

Hodnocení

Hodnocení se provádí obvykle vizuálně, popř. pomocí denzitometru. Posuzuje se intenzita zbarvení jednotlivých linií a počet zbarvených linií. Detaily v hodnocení jsou u jednotlivých souprav odlišné a jsou popsány v návodu k dané soupravě.

Využití

Imunoblotové a imunodotové techniky se využívají v klinické praxi **pro semikvantitativní stanovení specifických protilátek** proti různým infekčním agens (např. *Borrelia*, *Helicobacter pylori*, *Treponema pallidum*) a dále na stanovení autoprotilátek namířených proti antigenům vlastního organismu u autoimunitních onemocnění. Výhodou těchto metod je možnost stanovit **větší počet protilátek proti různým antigenům** během jednoho vyšetření. Podle reaktivity konjugátu lze stanovovat jednotlivé třídy imunoglobulinů – IgG, IgM, IgA.

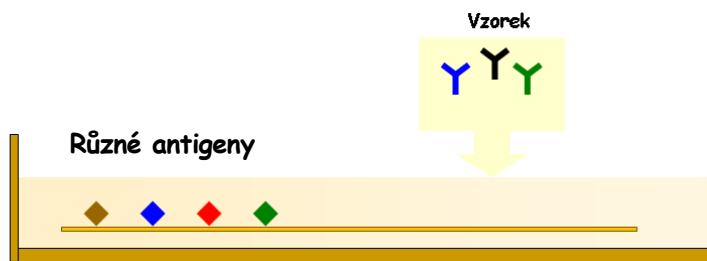
Je možná i varianta, kdy jsou na membráně imobilizovány protilátky. V tomto případě se pomocí specifických protilátek stanovují ve vzorku antigeny.

¹ Kromě enzymů mohou být v konjugátech se zvířecí protilátkou použity i jiné značky.

Obr. 5 Stanovení specifických protilátek pomocí imunoblotu

První krok: navázání specifických protilátek obsažených ve vzorku na antigeny zakotvené v membráně proužku

Navlhčení proužku s navázanými antigeny v inkubačním roztoku a přidání vzorku



Vytvoření imunokomplexů tvořených specifickými protilátkami obsažených ve vzorku s antigeny navázanými na membráně proužku

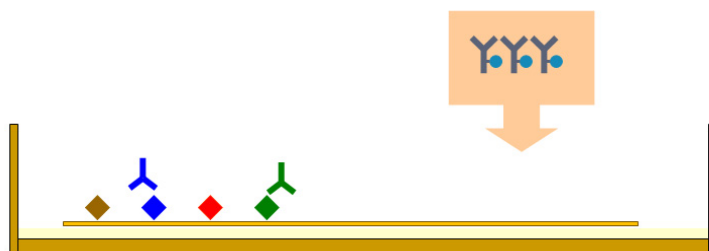


Odstranění nenavázaných složek vzorku promytím



Druhý krok: vytvoření sendvičových imunokomplexů s konjugáty protilátek proti lidským imunoglobulinům

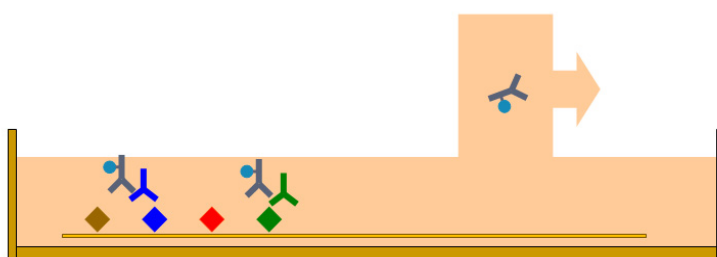
Přidání konjugátu (enzymem značené zvířecí protilátky proti lidským imunoglobulinům)



Navázání konjugátu na již vytvořené imunokomplexy na membráně proužku

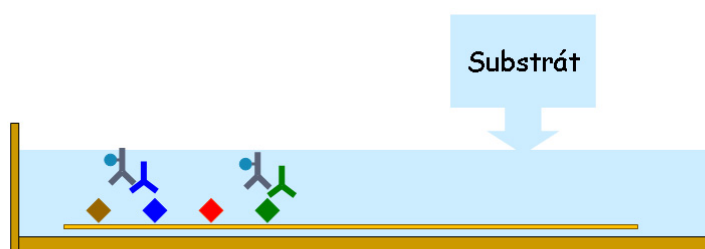


Odstranění nenavázaných molekul konjugátu promytím



Třetí krok: vizualizace přítomnosti specifických protilátek

Přidání substrátu



Enzymová reakce a vybarvení
proužků v místech, kde se
navázaly specifické protilátky



Čtvrtý krok: usušení proužku



Použitá literatura:

Bartůňková J., Poulík M.: Vyšetřovací metody v imunologii. Grada Praha 2005.

Ferenčík M.: Imunochémia. Alfa, Bratislava, 1989

Kaplan, L.A., Pesce A.J.: Clinical Chemistry, 3rd edition, Mosby 1996

Krejsek, J., Kopecký, O.: Klinická imunologie. Nucleus HK, 2004

Příbalový leták k soupravě ELISA-VIDITEST EDUCO-Diagnostic

Příbalový leták soupravy recomLine Campylobacter IgG/IgA ALL DIAG (český návod LABOSERV s.r.o.)