

Datum Jméno Kroužek

Návod a protokol k praktickým cvičením z lékařské biochemie

Téma: Vybrané imunochemické metody

1. Úloha Imunoprecipitační křivka lidského albuminu a stanovení koncentrace albuminu imunturbidimetry

Princip:

Reagencie:

- a) Zásobní roztok lidského albuminu 1000 mg/l
- b) Ředěné beraní antisérum proti lidskému albuminu
- c) Fosfátový pufr s 5 % PEG (polyethylenglykol) a 0,6 % NaCl, pH 7,2 0,01 mol/l
- d) Neznámý vzorek albuminu

Pracovní postup:

Při práci používejte rukavice.

a) Příprava ředění albuminu

Zásobní roztok lidského albuminu o koncentraci 1000 mg/l postupně ředíme 0,01 mol/l fosfátovým pufr s 5 % PEG geometrickou řadou (Tab. 1)

Tabulka 1

Číslo zkumavky	Pufr (ml)	Roztok albumin (ml)	Konečná koncentrace albuminu (mg/l)
1	-	0,4 (ze zásobního roztoku)	1000
2	0,2	0,2 (ze zkum. 1)	500
3	0,2	0,2 (ze zkum. 2)	250
4	0,2	0,2 (ze zkum. 3)	125
5	0,2	0,2 (ze zkum. 4)	62,5
6	0,2	0,2 (ze zkum. 5)	31,25

b) Vlastní imunoprecipitační reakce

Roztoky ředěného albuminu pipetujeme do nových zkumavek 1 – 6 (čísla zkumavek odpovídají číslům zkumavek v tab. 1, v nichž jsou jednotlivá ředění albuminu). Do dalších dvou zkumavek 7 – 8 pipetujeme neředěný neznámý vzorek a tentýž vzorek, který naředíme fosfátovým pufrům 1 + 1 (0,1 ml neředěného vzorku a 0,1 ml pufru). Zkumavka 9 slouží jako slepá zkouška. Potom do všech zkumavek přidáme ředěné antisérum proti lidskému albuminu podle tabulky 2.

Tabulka 2

Odměřit v ml	Zkum. 1 Albumin 1000 mg/l	Zkum. 2 Albumin 500 mg/l	Zkum. 3 Albumin 250 mg/l	Zkum. 4 Albumin 125 mg/l	Zkum. 5 Albumin 62,5 mg/l	Zkum. 6 Albumin 31,25 mg/l	Zkum. 7 Vzorek neřed.	Zkum. 8 Vzorek řed.	Zkum. 9 Slepá zkouška
Albumin naředěný	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	–	–	–
Vzorek	–	–	–	–	–	–	0,1	0,1	–
Pufr	–	–	–	–	–	–	–	–	0,1
Antisérum	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Obsah ve zkumavkách promícháme a necháme 20 minut inkubovat při pokojové teplotě. Po skončení inkubace změříme absorbanci jednotlivých ředění albuminu a vzorku proti slepé zkoušce v 1 cm kyvetě při vlnové délce 400 nm.

Výsledky:

Výsledky запиšte do tabulky 3.

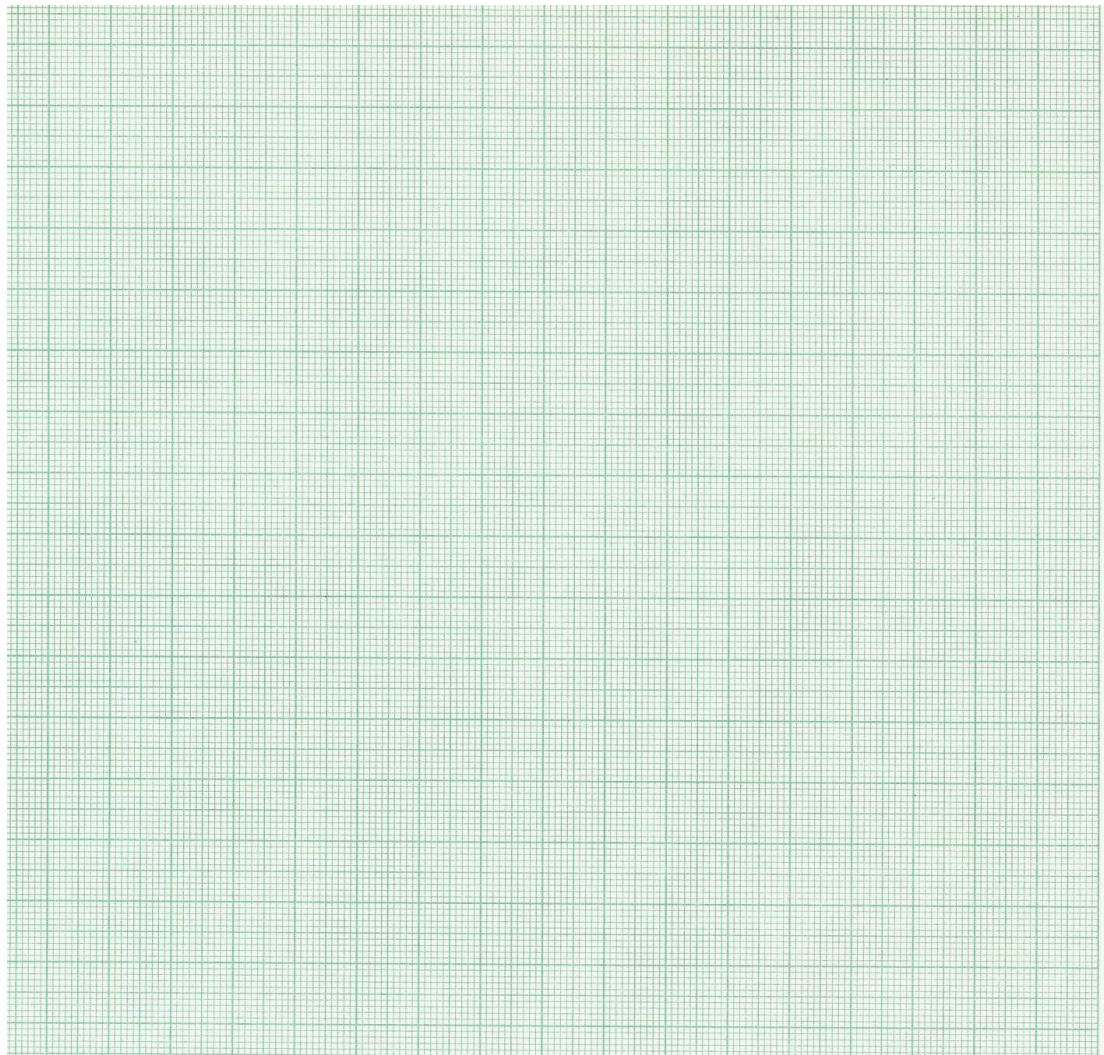
Tabulka 3

	Zkum. 1 Albumin 1000 mg/l	Zkum. 2 Albumin 500 mg/l	Zkum. 3 Albumin 250 mg/l	Zkum. 4 Albumin 125 mg/l	Zkum. 5 Albumin 62,5 mg/l	Zkum. 6 Albumin 31,25 mg/l	Zkum. 7 Vzorek neřed.	Zkum. 8 Vzorek řed.
A ₄₀₀								

Vyhodnocení:

- Z naměřených absorbancí ředěného albuminu a odpovídajících koncentrací sestrojte precipitační křivku a popište ji.
- Lineární vzestupnou část křivky použijte jako kalibrační křivku a odečtěte z ní koncentraci albuminu v neznámém vzorku. Hodnotu ředěného vzorku je nutno násobit dvěma. Porovnejte výsledky získané u ředěného a neředěného neznámého vzorku a vysvětlete.

Imunoprecipitační křivka lidského albuminu



Koncentrace neznámého vzorku:

Neředěný vzorek:

Ředěný vzorek:

Závěr a zhodnocení výsledků:

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

Princip:

Hodnocení:

a) Sestrojení kalibrační křivky

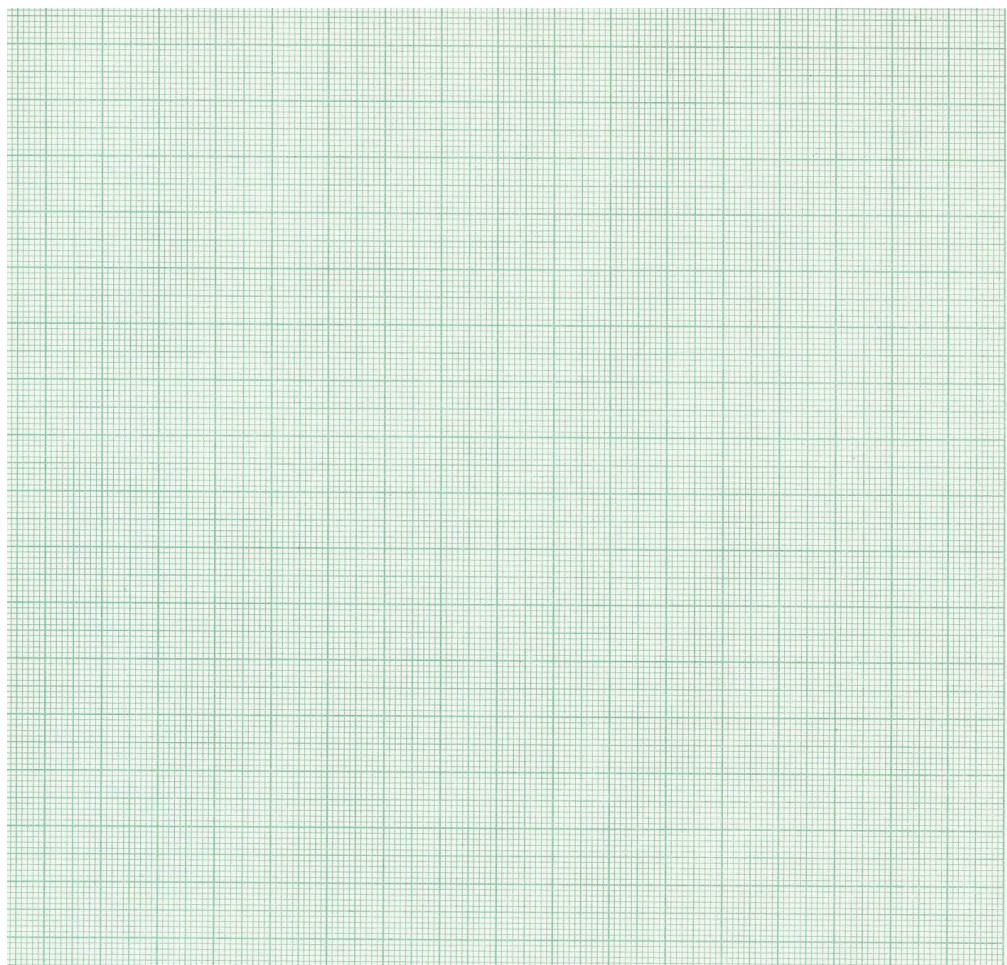
Změřte průměry precipitátů standardních roztoků označených $S_1 - S_8$ pomocí speciálního měřítka a odečtěte druhou mocninu – d^2 . Doplněte d^2 standardů do tabulky 4.

Tabulka 4

Číslo standardu	d^2 (mm ²)	Koncentrace standardů pro IgM (g/l)	Koncentrace standardů pro IgG (g/l)
1		1,8	18,0
2		1,6	16,2
3		1,4	14,4
4		1,2	12,6
5		1,0	10,8
6		0,8	9,0
7		0,6	7,2
8		0,4	5,4

Druhé mocniny průměrů standardů a jejich odpovídající koncentrace vyneste do grafu na milimetrový papír, d^2 na osu y a koncentraci na osu x.

Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace celkových Ig¹....



b) Určení koncentrace IgG nebo IgM v neznámých vzorcích

Změřte průměry prstenců 5 neznámých vzorků, odečtěte druhou mocninu a z kalibrační křivky odečtěte jejich koncentrace.

Koncentrace Ig¹.... v neznámých vzorcích

Výsledky запиšte do tabulky 5.

Tabulka 5

Vzorek	d ² (mm ²)	Koncentrace Ig ¹ (g/l)
1		
2		
3		
4		
5		

¹ Doplněte třídu Ig (uvedena na destičce)

3. Úloha Stanovení specifických protilátek pomocí ELISA metody

Princip:

Reagencie:

- a) ELISA strip (proužek) s navázaným antigenem (8 jamek) (strip je zasazen do rámečku)
- b) pozitivní kontrola
- c) negativní kontrola
- d) cut-off kontrola
- e) neznámý vzorek séra č. 1
- f) neznámý vzorek séra č. 2
- g) konjugát anti-Ig/značený peroxidasou
- h) promývací roztok
- i) ředící roztok vzorků
- j) substrátový roztok (TMB – 3',3'',5',5'' tetramethylbenzidin a peroxid vodíku)
- k) zastavovací (stop) roztok (kyselina sírová 0,2 mol/l) ŽÍRAVINA

Pracovní postup:

Při práci používejte rukavice.

Ředění vzorků a standardů

Ředění neznámých vzorků

Každý vzorek budeme vyšetřovat naředěný ředícím roztokem tímto způsobem: 1 díl vzorku + 100 dílů ředícího roztoku. Ředění provádíme v mikrozkušavkách, které označíme VZ1 a VZ2 (viz tabulka 6).

Tabulka 6

	Zkušavka 1	Zkušavka 2
Ředící roztok	1,0 ml	1,0 ml
VZ 1	0,010 ml	–
VZ 2	–	0,010 ml

Obsah v mikrozkušavkách promícháváme na vortexu.

Vlastní provedení ELISA metody

a) Nanášení vzorků a kontrol

Podle rozpisu vzorků v tabulce 7 přidáme na dno jednotlivých jamek mikrotitračního proužku vždy po 0,1 ml příslušných kontrol a vzorků. Do první jamky určené pro slepou zkoušku pipetujeme samotný ředící roztok. Neznámé vzorky pipetujeme do dvou jamek (v dubletu).

Tabulka 7

	Vzorek
A	Slepá zkouška
B	Negativní kontrola
C	Pozitivní kontrola
D	Cut-off kontrola
E	Vzorek 1
F	Vzorek 1
G	Vzorek 2
H	Vzorek 2

Strip v rámečku přiklopíme víčkem a necháme inkubovat **1 hodinu při teplotě 37 °C**.

Během této inkubace dochází k reakci protilátek ve vzorku s antigenem, kterým jsou potaženy jamky stripu.

b) Odstranění nenavázaných složek séra

Po skončení inkubace otočíme strip dnem vzhůru a mírným švihem vyklepneme obsah jamek do nádoby s chloraminem. Potom do každé jamky pipetujeme 0,3 ml **promývacího roztoku**. Opatrně stripem zatřepeme a obsah vyklepneme do nádoby s chloraminem. Promytí opakujeme celkem 3x. Nakonec převrácený strip osušíme přitisknutím na buničinu.

c) Přidání konjugátu

Do všech jamek přidáme po 0,1 ml **konjugátu (anti-Ig/Px)**, strip přiklopíme víčkem a poté **inkubujeme 30 minut při laboratorní teplotě**.

Během této inkubace se na imunokomplexy na dně jamek, vytvořených v kroku **a**, naváže druhá protilátka proti lidskému imunoglobulinu značená peroxidázou.

d) Odstranění nenavázaných molekul konjugátu

Po této inkubaci opět promýváme podobně jako v bodě **b**. Tentokrát se odstraňuje přebytečný nenavázaný konjugát.

e) Přidání substrátu

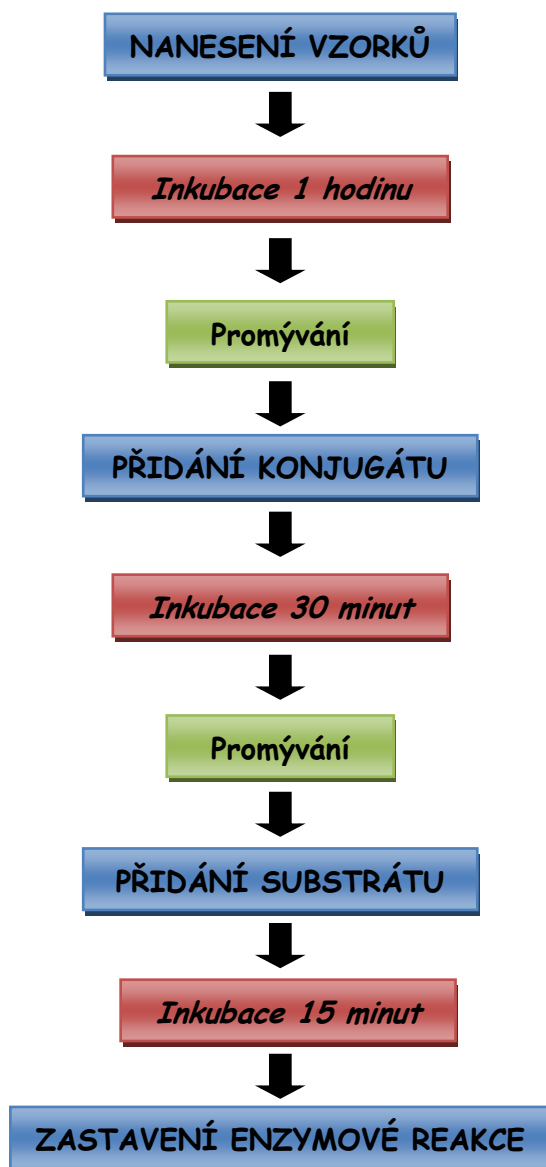
Do všech jamek přidáme 0,1 ml **substrátového roztoku**, strip přiklopíme víčkem a inkubujeme cca 15 minut při **laboratorní teplotě v temnu**.

Při tomto kroku probíhá přeměna substrátu na produkt pomocí peroxidázy, která je součástí konjugátu. Jamky, kde byly ve vzorcích přítomny protilátky proti navázanému antigenu, zmodrají.

f) Zastavení enzymové reakce

Do všech jamek přidáme 0,1 ml *zastavovacího roztoku*, který ukončí enzymovou reakci. Modré zbarvení v jamkách se změní na žluté.

Jednoduché schéma provedení ELISA metody



g) Měření

Měření absorbancí v jamkách provádíme pomocí speciálního spektrofotometru s vertikálním paprskem při vlnové délce 450 nm. Hodnoty absorbancí a průměrné hodnoty dubletů zapíšeme do tabulky 8.

Tabulka 8

	Absorbance v dubletu		$\bar{\varnothing} A_{450}$
	A_{450}	A_{450}	
Negativní kontrola		–	–
Pozitivní kontrola		–	–
Cut-off kontrola		–	–
Vzorek 1			
Vzorek 2			

Výpočet a interpretace výsledků

Hodnoty průměrných absorbancí vzorků porovnáme s hodnotami cut-off kontrolního vzorku, pomocí kterého určíme hranici positivity.

- Za **pozitivní** pokládáme vzorky, jejichž absorbance je vyšší o 10 % než je absorbance cut-off kontroly.
- Za **negativní** pokládáme vzorky, jejichž absorbance je nižší o 10 % než je absorbance cut-off kontroly.
- Vzorky, jejichž absorbance se pohybuje v rozmezí hodnoty absorbance cut-off kontroly $\pm 10\%$ nelze považovat za negativní ani pozitivní – oblast šedé zóny. Doporučuje se opakování vyšetření z nového vzorku odebraného za 2 až 4 týdny.

Rozhodněte, zda v neznámých vzorcích byly testované specifické protilátky přítomny (hodnocení pozitivní) nebo nepřítomny (hodnocení negativní).

Vzorek 1

Vzorek 2

Závěr:

4. Úloha Stanovení specifických protilátek pomocí imunoblotu

Princip:

Reagencie:

- a) testovací proužky s imobilizovanými antigeny
- b) promývací roztok (fosfátový pufr, NaCl, KCl, mléčný prášek, konzervační látky)
- c) naředěný konjugát králíčních protilátek proti lidským IgG značený peroxidasou (jako konzervans je přidán NaN_3 – jed a další konzervační látky)
- d) substrátový roztok (TMB – 3',3'',5',5'' tetramethylbenzidin a peroxid vodíku)
- e) neznámý vzorek séra

Pracovní postup:

Při práci používejte rukavice.

a) Inkubace vzorků

Do žlábků napipetujeme 2 ml promývacího roztoku. Ze zkumavky vyjmeme pomocí pinzety proužek a vložíme ho do žlábků s připraveným promývacím roztokem. Číslo proužku musí být orientováno vzhůru. Zkontrolujeme, aby testovací proužek byl zcela ponořen do promývacího roztoku.

K promývacímu roztoku ve žlábků přidáme 20 μl vzorku. Vzorek pipetujeme u konce proužku. Pak opatrně promícháme.

Podobně postupujeme i s přípravou ostatních proužků v dalších žlábkách. Po vložení všech proužků do jednotlivých žlábků a přidání sér přikryjeme inkubační misku víčkem a spustíme třepačku, která je nastavena na nejnižší rychlost. Za stálého třepání necháme inkubovat **60 minut při laboratorní teplotě**.

Během této inkubace dochází k navázání specifických protilátek ze vzorku (pokud jsou přítomny) na antigeny, které jsou imobilizovány na proužku.

b) Odstranění nenavázaných složek séra promytím

Po skončení inkubace zastavíme třepačku, sejmeme víčko a pomocí Pasteurovy pipety odsajeme promývací roztok s nenavázanými složkami séra. Obsah Pasteurovy pipety vypustíme do nádoby s chloraminem. Pracujeme opatrně, aby se při odsávání roztoku nepoškodil proužek.

Následuje promytí, při němž postupujeme následujícím způsobem. Do žlábků přidáme pomocí pipety 2 ml promývacího roztoku. Poté, co bude tento krok proveden ve všech žlábkách, přikryjeme inkubační nádobku víčkem, spustíme třepačku a inkubujeme 4 minuty. Pak promývací roztok opatrně odsajeme Pasteurovou pipetou. Tyto kroky (přidání promývacího roztoku, inkubace a odstranění promývacího roztoku) zopakujeme ještě 2x.

c) Přidání konjugátu

Po promytí napipetujeme do žlábků 2 ml naředěného **konjugátu**. Po přidání konjugátu do všech žlábků, přikryjeme inkubační nádobku víčkem a opět spustíme třepačku. Inkubuje **45 minut při laboratorní teplotě**.

Během inkubace se na imunokomplexy tvořené antigeny imobilizovanými na proužku a příslušnými specifickými protilátkami ze vzorku naváže druhá, tentokrát zvířecí protilátka proti lidskému Ig značená peroxidázou.

d) Odstranění nenavázaných molekul konjugátu promytím

Po této inkubaci postupujeme podobně jako v bodě **b**. Tentokrát se odstraňuje přebytečný nenavázaný konjugát.

e) Přidání substrátu

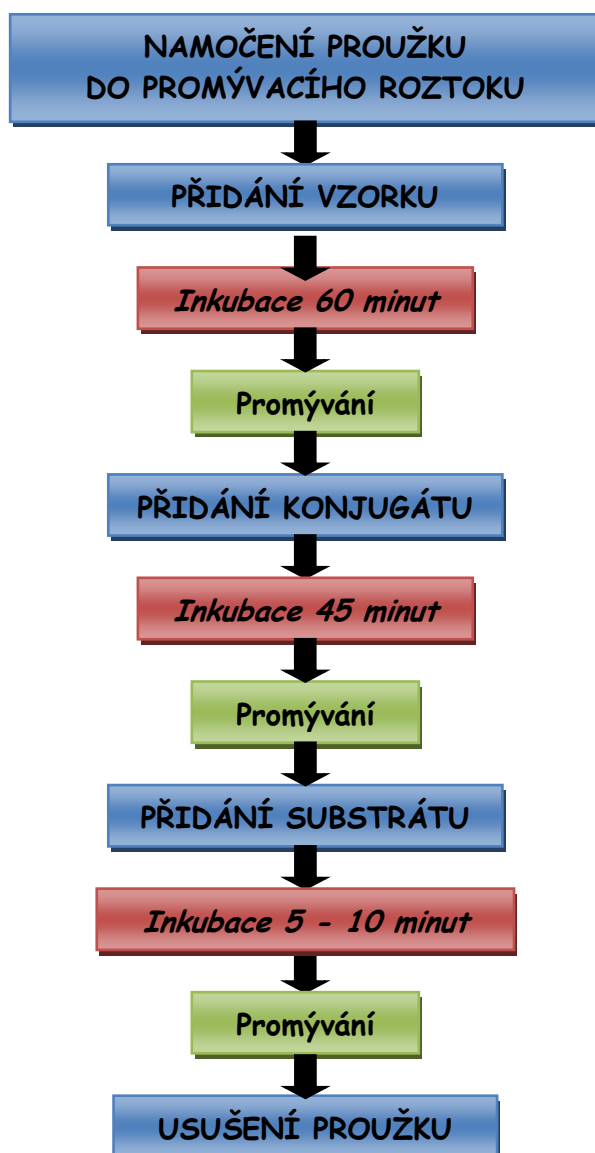
Po té, co bylo skončeno promývání a pečlivě odsáta poslední dávka promývacího roztoku, přidáme do žlábků 1,5 ml **substrátového roztoku**. Po přidání substrátového roztoku do všech žlábků spustíme třepačku a inkubujeme na třepačce **5 – 10 minut** při laboratorní teplotě. Během inkubace můžeme pozorovat vybarvování linií v místě pozitivních a cut-off kontrol (viz schéma proužku na str. 12). Jakmile je viditelná linie cut-off kontroly, zastavíme reakci.

f) Zastavení reakce

Pasteurovo pipetou odsajeme substrátový roztok a podobně jako v bodě **b** promyjeme 2x nebo 3x (podle časových možností), ale tentokrát k promytí použijeme deionizovanou vodu.

Po skončení promytí opatrně vyjmeme proužek ze žlábků a osušíme ho mezi dvěma vrstvami filtračního papíru.

Jednoduché schéma provedení imunoblotu



Vyhodnocení:

Test lze hodnotit pouze v případě, že jsou zřetelně vybarveny linie kontrol na jednom konci proužku. Jejich vybarvení potvrzuje, že použité reagentie ani proužek nebyly znehodnoceny a že test byl proveden správně. Intenzitu zbarvení linií v místech, kde byly na proužku imobilizovány antigeny, srovnáváme s vybarvením cut-off kontroly.

Rozložení kontrol a antigenů na proužku a místa, kde je možné očekávat vybarvení linií je zobrazeno na schématu:



Způsob hodnocení vybarvení linií je uveden v tabulce 9.

Tabulka 9

Proužky	Intenzita
Žádné zbarvení	-
Intenzita zbarvení slabší než u cut-off proužku	±
Intenzita zbarvení stejná jako u cut-off proužku	+
Intenzita silnější než u cut-off proužku	++
Velmi intenzivní zbarvení	+++

Do tabulky 9 vyplňte hodnocení intenzity zbarvení jednotlivých linií.

Tabulka 10

Antigen	Intenzita
Antigen 1	
Antigen 2	
Antigen 3	
Antigen 4	
Antigen 5	
Antigen 6	