

Vybrané imunochemické metody

Praktické cvičení z lékařské biochemie - návod

Všeobecné lékařství

Lenka Fialová



2024/2025

ÚLOHA 1 – STANOVENÍ CÍRKULUJÍCÍCH IMUNOKOMPLEXŮ	3
ÚLOHA 2 – IMUNOPRECIPITAČNÍ KŘIVKA LIDSKÉHO ALBUMINU A STANOVENÍ KONCENTRACE ALBUMINU IMUNOTURBIDIMETRICKY - VYHODNOCENÍ	3
ÚLOHA 3 – STANOVENÍ SPECIFICKÝCH PROTILÁTEK POMOCÍ ELISA METODY	5
ÚLOHA 4 – VYHODNOCENÍ JEDNODUCHÉ RADIÁLNÍ IMUNODIFÚZE PRO STANOVENÍ CELKOVÝCH IGG A IGM	10
ÚLOHA 5 – STANOVENÍ KREVNÍ SKUPINY HEMAGLUTINAČNÍ ZKOUŠKOU	10
ÚLOHA 6 – STANOVENÍ KONCENTRACE C-REAKTIVNÍHO PROTEINU V SÉRU POMOCÍ TURBIDIMETRICKÉHO POCT TESTU – DEMONSTRACE	10
ÚLOHA 7 – STANOVENÍ SPECIFICKÝCH PROTILÁTEK POMOCÍ IMUNOBLOTU	12

Úloha 1 – Stanovení cirkulujících imunokomplexů

Reagencie:

a) Roztok A (pufr bez PEG):

550 ml 1,24% kyselina boritá
450 ml 1,9% boraxu
1000 ml čištěné vody

b) Roztok B (pufr s PEG):

41,66 g PEG 6000
1000 ml roztoku A

c) Neznámý vzorek séra č. 1 – infekční materiál

Pracovní postup:

Při práci používejte rukavice. Sérum promíchejte na vortexu.
Do 4 zkumavek připravte následující reakční směsi:

Odměřit v ml:	Zkumavka 1 Roztok A pufr bez PEG	Zkumavka 2 Roztok B pufr s PEG	Zkumavka 3 slepá zkouška (Roztok A - pufr bez PEG)	Zkumavka 4 slepá zkouška (p - pufr s PEG)
Sérum	0,03	0,03		
Roztok A	1,0		1,0	
Roztok B		1,0		1,0

Reakční směsi promíchejte a inkubujte 60 minut při laboratorní teplotě (21–25 °C).

Po inkubaci znovu promíchejte na vortexu a pak změřte absorbanci při 450 nm vždy proti odpovídajícímu slepému vzorku (reakční směs ve zkumavce 1 proti roztoku ve zkumavce 3, reakční směs ve zkumavce 2 proti roztoku ve zkumavce 4).

Úloha 2 – Imunoprecipitační křivka lidského albuminu a stanovení koncentrace albuminu imunoturbidimetricky - vyhodnocení

U této úlohy budete provádět pouze vyhodnocení výsledků, které jsou uvedeny v protokolu. Pro představu je uveden celý postup provedení úlohy.

Reagencie:

- d) Zásobní roztok lidského albuminu 1000 mg/l
e) Ředěné beraní antisérum proti lidskému albuminu
f) Fosfátový pufr a 0,9 % NaCl, pH 7,2 0,01 mol/l
g) 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 pufrům 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
7	0,2	0,2 (ze zkum. 5)	15,63

b) Vlastní imunoprecipitační reakce

Roztoky ředěného albuminu pipetujeme do nových zkumavek 1–7 (čísla zkumavek odpovídají číslům zkumavek v tab. 1, v nichž jsou jednotlivá ředění albuminu). Do dalších dvou zkumavek 8–9 pipetujeme neředěný neznámý vzorek a tentýž vzorek, který naředíme fosfátovým pufrům 1 + 1 (0,1 ml neředěného vzorku a 0,1 ml pufru). Zkumavka 10 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 Albumin 15,63 mg/l	Zkum. 8 Vzorek neřed.	Zkum. 9 Vzorek řed.	Zkum. 10 Slepá zkouška
Albumin naředěný	0,1	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	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.

Vyhodnocení:

- Z dodaných hodnot absorbancí ředěného standardního roztoku 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 ředěných vzorků je nutno násobit ředěním. Porovnejte výsledky získané u neředěného a ředěného neznámého vzorku po vynásobení ředěním a vysvětlete.

Úloha 3 – Stanovení specifických protilátek pomocí ELISA metody

Reagencie:

- ELISA strip (proužek) s navázaným antigenem (8 jamek) (strip je zasazen do rámečku)
- pozitivní kontrola
- negativní kontrola
- cut-off kontrola
- neznámý vzorek séra č. 1 (infekční materiál)
- neznámý vzorek séra č. 2 (infekční materiál)
- ředicí roztok vzorků
- promývací roztok
- konjugát anti-Ig/značený peroxidasou
- substrátový roztok (TMB – 3',3'',5',5'' tetramethylbenzidin a peroxid vodíku) 
- zastavovací (stop) roztok (kyselina sírová 0,2 mol/l) 

Pracovní postup:

Při práci používejte rukavice.

Ředění neznámých vzorků

Každý vzorek budeme vyšetřovat naředěný ředícím roztokem tímto způsobem: 1 díl vzorku + 100 dílů ředícího roztoku. Ředění provádíme v mikrozkušavkách (viz tabulka 3).

Tabulka 3

	Mikrozkušavka 1	Mikrokušavka 2
Ředící roztok	1,0 ml	1,0 ml
Vzorek 1	0,010 ml	–
Vzorek 2	–	0,010 ml

Obsah v mikrozkušavkách promícháváme na vortexu.

Vlastní provedení ELISA metody (obrázky viz Příloha)

1. Nanášení vzorků a kontrol

Podle rozpisu vzorků v tabulce 4 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 4

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

Proužek 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.

2. Odstranění nenavázaných složek séra

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

3. Přidání konjugátu

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

Během této inkubace se na imunokomplexy na dně jamek, vytvořených v kroku 1, naváže druhá protilátka proti lidskému imunoglobulinu značená peroxidázou.

4. Odstranění nenavázaných molekul konjugátu

Po této inkubaci opět promýváme podobně jako v bodě 2. Tentokrát se odstraňuje přebytečný nenavázaný konjugát.

5. Přidání substrátu

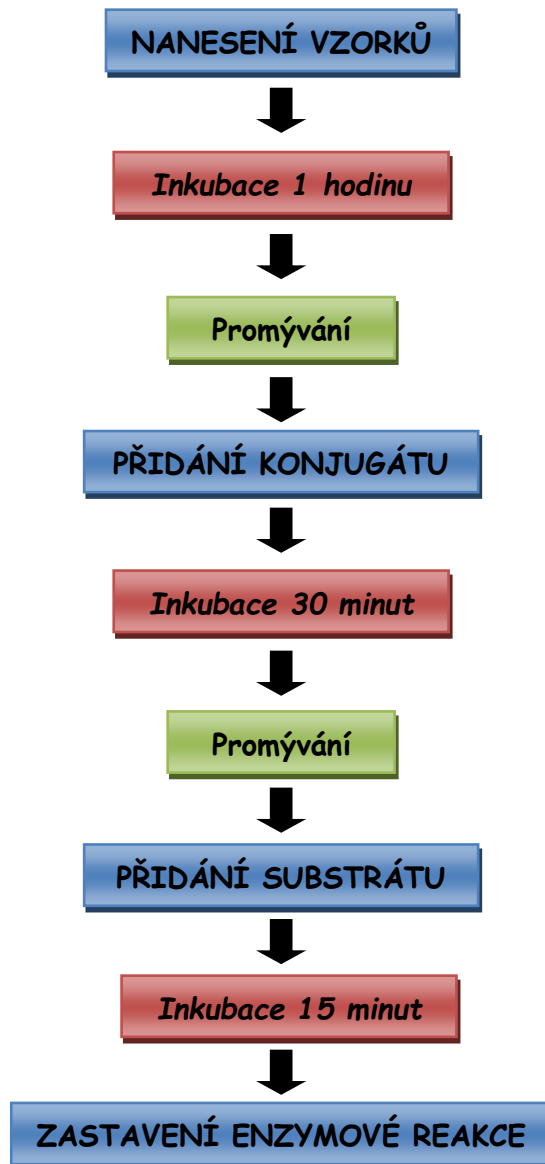
Do všech jamek přidáme 0,1 ml **substrátového roztoku**, proužek přiklopíme víčkem a inkubujeme cca 15 minut při **laboratorní teplotě v temnu**.

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.

6. 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



7. Měření

Měření absorbancí v jamkách provádíme pomocí speciálního spektrofotometru s vertikálním paprskem při vlnové délce 450 nm. Měření provede laborantka.

Od hodnot absorbancí vzorků a kontrol odečteme hodnoty slepého vzorku. Po odečtení absorbance slepého vzorku zapíšeme vypočtené hodnoty do tabulky a u vzorků, které byly zpracovávány v dubletu, vypočteme průměrné hodnoty.

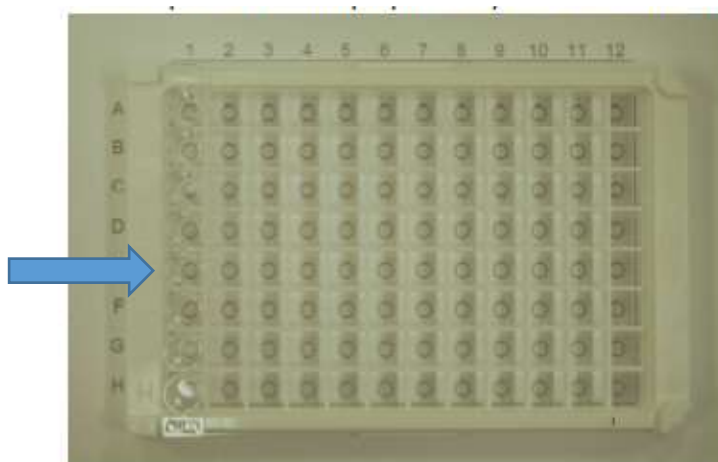
Výpočet a interpretace výsledků

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

- 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.

Příloha Provedení ELISA metody (autor přílohy Mgr. Libuše Nosková)

- strip v rámečku připravený k nanášení vzorků



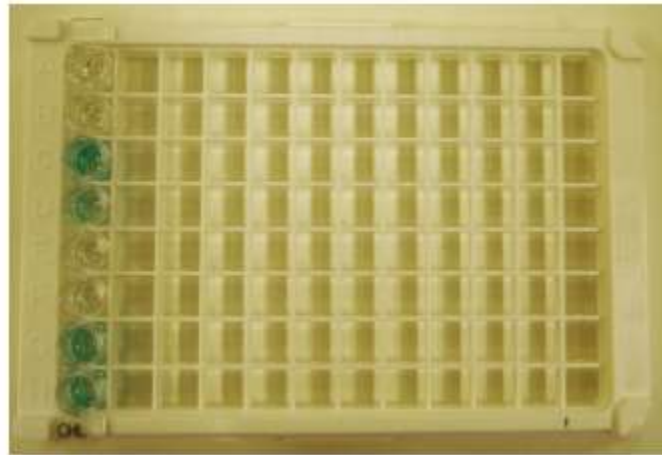
- podle tabulky 4 byly naneseny vzorky do příslušných jamek, následuje inkubace



- po promývacích krocích je na všechny jamky nanesen konjugát (pro lepší vizualizaci je roztok obarven, barvy se mohou lišit v závislosti na použité soupravě – žlutá, modrá, fialová)



- po odstranění nenavázaných molekul konjugátu je nanesen substrát pro enzymatickou reakci katalyzovanou peroxidasou v místě navázaného konjugátu



- enzymová reakce je zastavena a vzorky jsou připraveny ke spektrofotometrickému vyhodnocení



- změření absorbance jednotlivých jamek při 450 nm a následné vyhodnocení



Úloha 4 – Vyhodnocení jednoduché radiální imunodifúze pro stanovení celkových IgG a IgM

Pracovní postup:

a) Sestrojení kalibrační křivky

Změřte průměry precipitátů standardních roztoků označených $S_1 - S_8$ pomocí speciálního měřítka a odečtěte druhou mocninu – d^2 . Doplňte d^2 standardů do tabulky (viz protokol).

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

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.

Úloha 5 – Stanovení krevní skupiny hemaglutinační zkouškou


Pracovní postup:

1. Dezinfikujte bříško prstu, ze kterého se bude provádět odběr. Zpravidla se odebírá kapilární krev z bříška 3. nebo 4. prstu, u praváků z levé ruky.
2. Sterilní jehlou proved'te vpich do bříška prstu a naneste 2 kapky krve poblíž středu podložního skla.
3. Ke stranám podložního skla kápněte vlevo kapku protilátky anti-A, vpravo anti-B.
4. Špičkou promíchejte krev s každou z protilátek, asi po 1 minutě odečtěte výsledek.
5. Zastavte další kapilární krvácení přiložením buničiny s dezinfekcí.

Úloha 6 – Stanovení koncentrace C-reaktivního proteinu v séru pomocí turbidimetrického POCT testu – demonstrace

Reagencie a pomůcky:

1. přístroj QuikRead
2. programová karta
3. činidlo (obsahuje latexové částice s protilátkami proti CRP;

stabilizátor: azid sodný )

4. odběrové kapiláry a píсты
5. kyvety naplněné pufrem
6. pero a sterilní jehly pro odběr kapilární krve
7. dezinfekce a čtverečky buničiny
8. nádoby na biologický odpad



Pracovní postup:

1. Zapněte turbidimetr QuikRead. Start a automatický test přístroje trvá asi 2 minuty, poté se na displeji zobrazí „Načtěte kartu“. Protáhněte magnetickou kartu šěrbinou (magnetickým proužkem dolů a k sobě; lhostejno, jakým směrem). Na displeji se objeví „Připraven k měření – CRP“.

Odběr vzorku kapilární krve

2. Do odběrového pera vložte sterilní jehlu. Její kryt otočte a sejměte. Nasad'te kryt pera, nastavte hloubku vpichu (obvykle č. 3). Pero natáhněte vytažením zadní části (ozve se klapnutí).



3. Dezinfikujte bříško prstu. Pravákům se krev obvykle odebírá ze strany 3. či 4. prstu levé ruky.
4. Připravte si odběrovou kapiláru: do konce označeného modrým pruhem zasuňte černý píst až k bílé hydrofobní zátku.



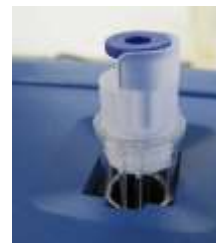
5. Proveďte vpich perem. První kapku krve setřete, pak odebírejte kapilární krev do kapiláry až po bílou zátku. Krev vzlíná kapilárními silami, s pístem není třeba hýbat. Odběr lze usnadnit kompresí prstu.
6. Zastavte další kapilární krvácení přiložením buničiny s dezinfekcí.

Příprava vzorku k měření

7. Sejměte krycí fólii z kyvetu. Ponořte kapiláru do pufru v kyvetě a stiskněte píst až na doraz. Krev se vytlačí do kapiláry, bílá zátku v kapiláře zůstane.



8. Kyvetu uzavřete patronou s činidlem – NEMAČkejte modrou část patrony.
9. Pufr s krví jemně zamíchejte. Kyvetu neobracejte dnem vzhůru. Počkejte, až bude vzorek zcela čirý – proběhne hemolýza.
10. Kyvetu vložte do turbidimetru. Výstupky na kyvetě zapadnou do „kolejniček“ v prostoru pro kyvetu. Na displeji se objeví „Měření blanku“ a začne se odpočítávat čas (40 s).




Měření

11. Na displeji se objeví „Přidejte činidlo“. Ponechejte kyvetu v přístroji a stiskněte modrou část patrony s činidlem.
12. Okamžitě vyjměte kyvetu, otočte ji několikrát dnem vzhůru a obsah razantně protřepejte.
13. Jakmile se na přístroji objeví „Vložte kyvetu“, vraťte kyvetu do přístroje. Prodlení v tomto kroku vede ke zrušení měření!
14. Na displeji se objeví „Probíhá měření“. Po dvou minutách se na displeji zobrazí koncentrace CRP ve vzorku v mg/l.

15. Uzavřenou kyvetu a použitou odběrovou kapiláru s pístem vyhodíte do určené nádoby na biologický odpad. Jehlu z odběrového pera vyhodíte do nádoby na ostrý biologický odpad.

Úloha 7 – Stanovení specifických protilátek pomocí imunoblotu (viz [video](#), úloha se neprovádí prakticky)

Reagencie:

- a) testovací proužky s imobilizovanými antigeny
- b) promývací roztok (fosfátový pufr, NaCl, KCl, mléčný prášek, konzervační látky)
- c) naředěný konjugát králičích 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 (infekční materiál)

Pracovní postup:

Při práci používejte rukavice.

a) Inkubace vzorků

Do žlábků pipetujeme 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 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 přikryjeme inkubační nádobku víčkem, spustíme třepačku a inkubujeme 3 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 pipetujeme do žlábků 2 ml naředěného **konjugátu**. Po přidání konjugátu přikryjeme inkubační nádobku víčkem a opět spustíme třepačku. Inkubujeme **35 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

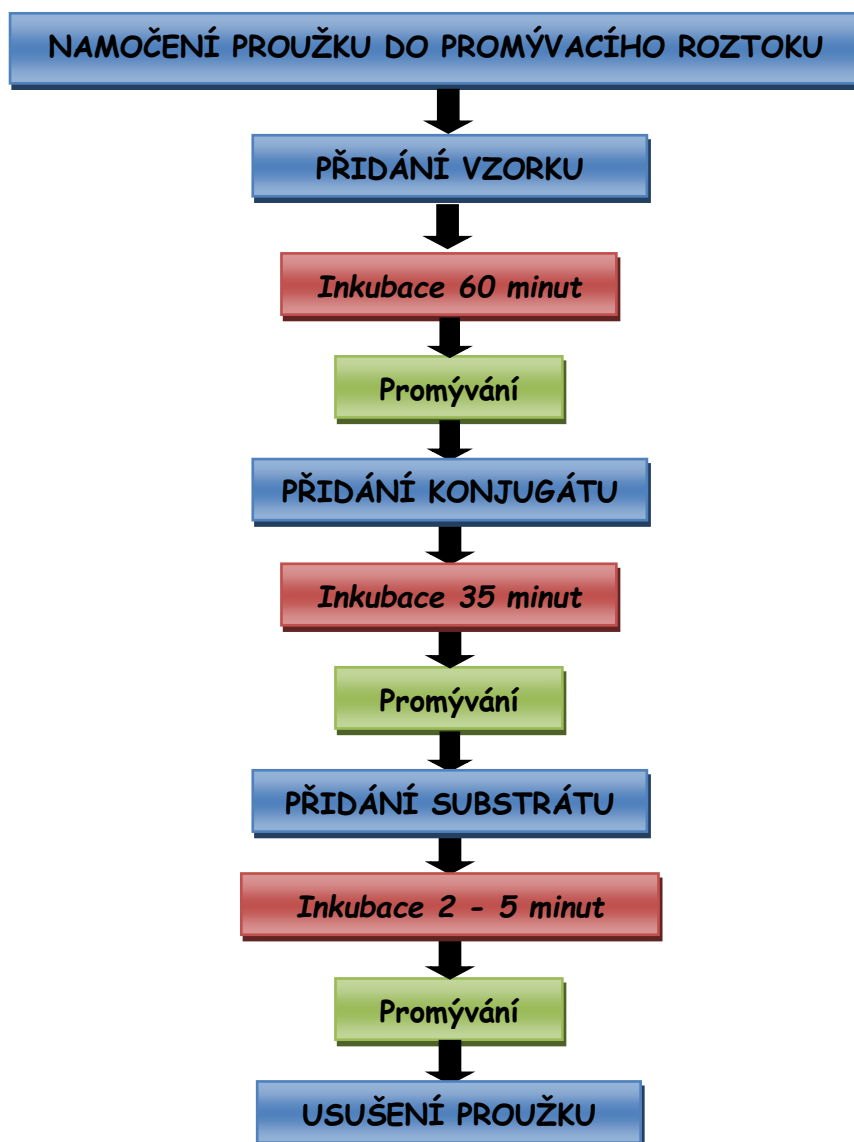
Po té, co bylo skončeno promývání a pečlivě odsáta poslední dávka promývacího roztoku, přidáme do žlábků 1,5 ml **substrátového roztoku**. Po přidání substrátového roztoku inkubujeme na třepačce cca **2 – 5 minut** při laboratorní teplotě. Během inkubace můžeme pozorovat vybarvování linií v místě pozitivních a cut-off kontrol (viz schéma proužku na str. 14). Jakmile je viditelná linie cut-off kontroly, zastavíme reakci.

f) Zastavení reakce

Pasteurovo pipetou odsajeme substrátový roztok a podobně jako v bodě b promyjeme 2× nebo 3× (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.

Příklad rozložení kontrol a antigenů na proužku

