Návod k praktickým cvičením z lékařské biochemie

Téma: Vybrané imunochemické metody

1. Úloha 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. Do 4 zkumavek připravte následující reakční směsi:

Odměřit v ml:	**Zkumavka 1** pufr bez PEG	**Zkumavka 2** pufr s PEG	**Zkumavka 3** slepá zkouška (pufr bez PEG)	**Zkumavka 4** slepá zkouška (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).

2. Úloha Imunoprecipitační křivka lidského albuminu a stanovení koncentrace albuminu imunoturbidimetricky

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 pufrem 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 pufrem 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:

a) Z dodaných hodnot absorbancí ředěného standardního roztoku albuminu a odpovídajících koncentrací sestrojte precipitační křivku a popište ji.

b) 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.

3. Úloha Stanovení specifických protilátek pomocí ELISA metody

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 (infekční materiál)
f) neznámý vzorek séra č. 2 (infekční materiál)
g) ředicí roztok vzorků
h) promývací roztok
i) konjugát anti-Ig/značený peroxidasou

j) substrátový roztok (TMB – 3´,3´´,5´,5´´ tetramethylbenzidin a peroxid vodíku)

k) 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 mikrozkumavkách (viz tabulka 3).

Tabulka 3

	Mikrozkumavka 1	**Mikrokumavka 2**
Ředící roztok	1,0 ml	1,0 ml
Vzorek 1	0,010 ml	–
Vzorek 2	–	0,010 ml

Obsah v mikrozkumavkách 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

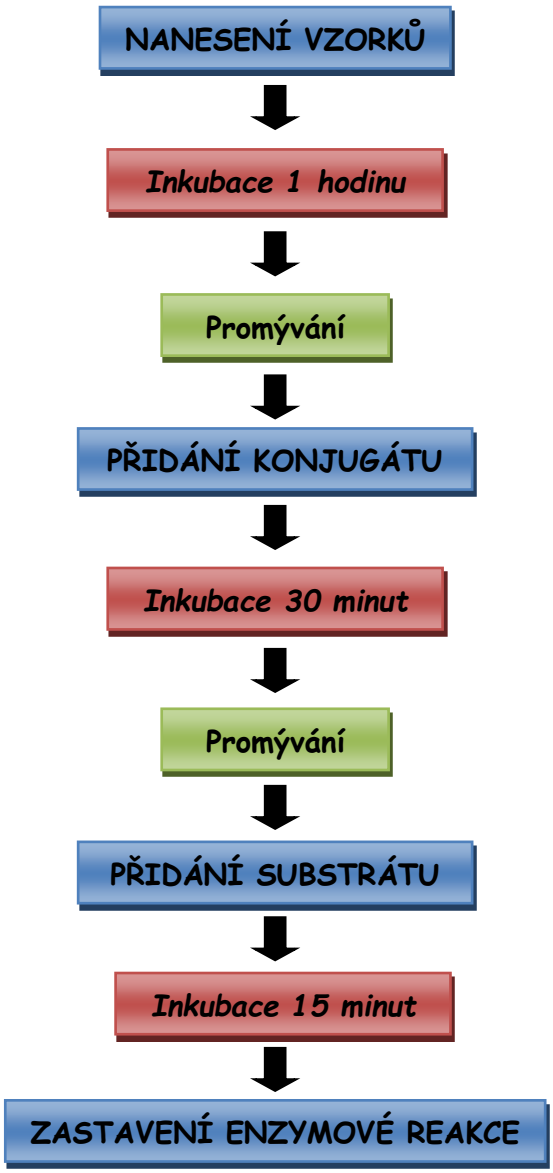
Do všech jamek přidáme 0,1 ml ***substrátového roztoku***, proužek přiklopíme víčkem a inkubujeme cca 15 minut při ***laboratorní teplotě v temnu.***

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.

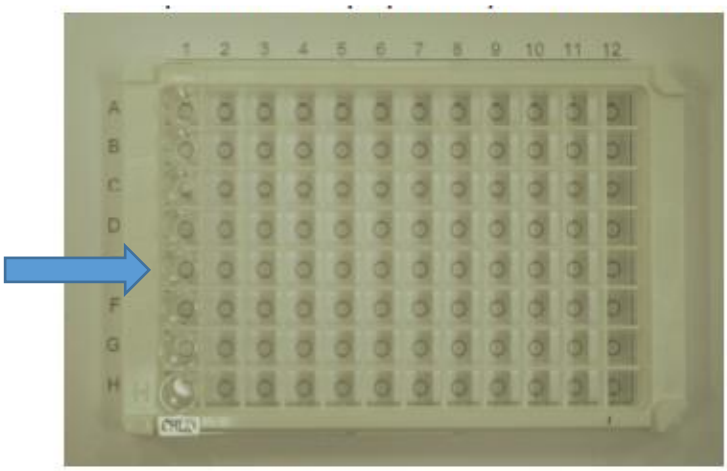
Výpočet a interpretace výsledků

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 ± 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)

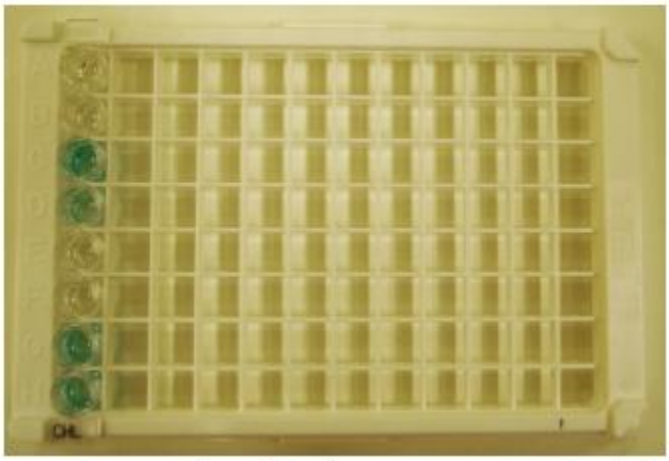
- strip v rámečku připravený k nanášení vzorků



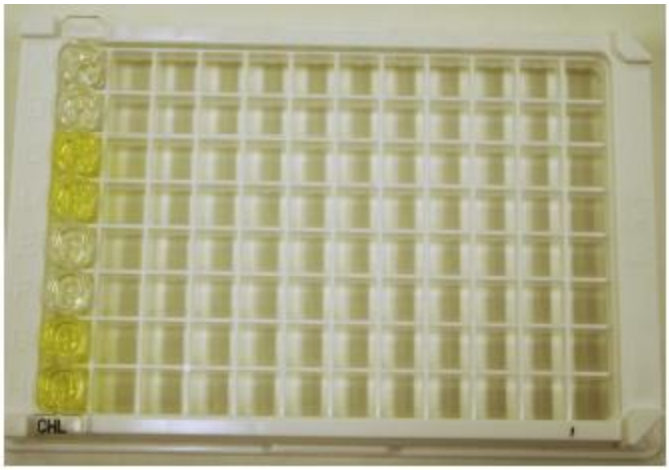
- podle tabulky 4 byly naneseny vzorky do příslušných jamek, následuje inkubace

- 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)

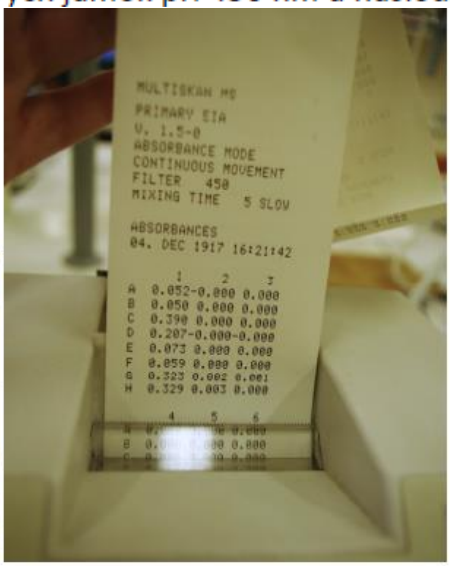
- po odstranění nenavázaných molekul konjugátu je nanesen substrát pro enzymatickou reakci katalyzovanou peroxidasou v místě navázaného konjugátu



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



- změření absorbance jednotlivých jamek při 450 nm a následné vyhodnocení



4. Úloha 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.

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

K promývacímu roztoku ve žlábku 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 žlábku 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 žlábku 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

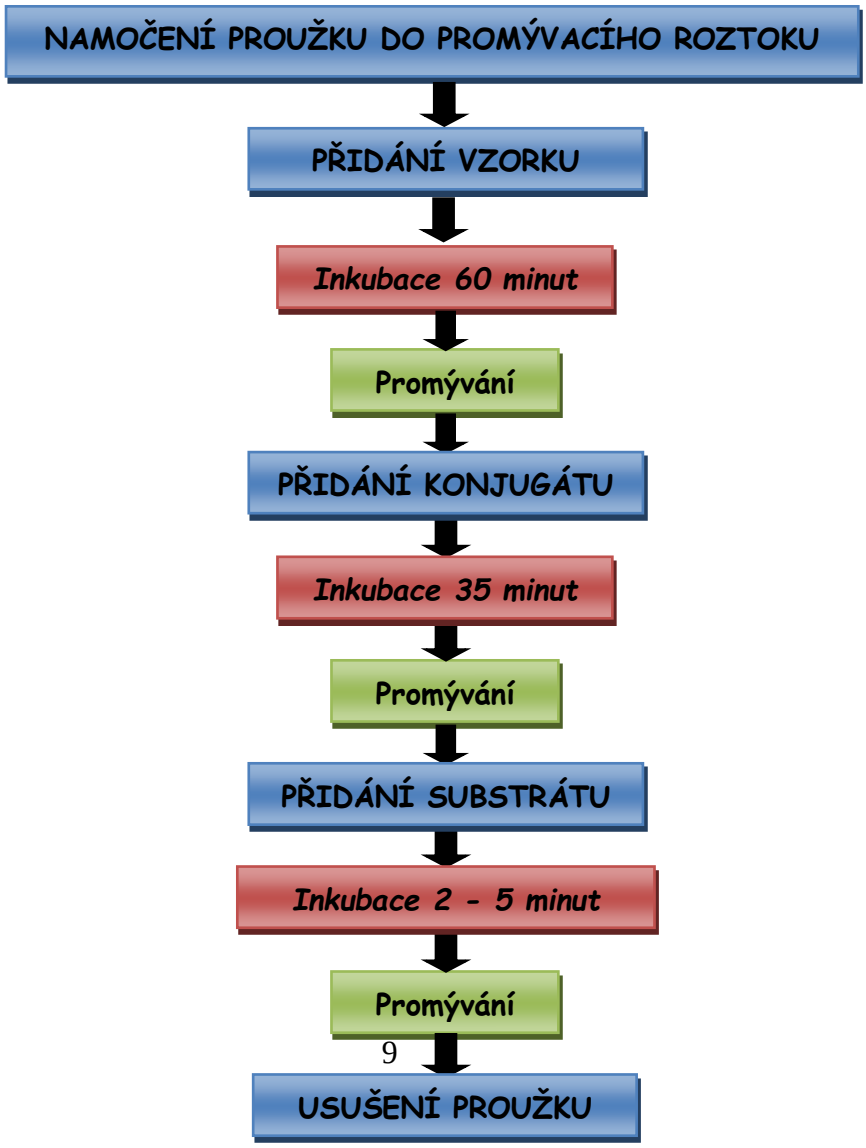
Po té, co bylo skončeno promývání a pečlivě odsáta poslední dávka promývacího roztoku, přidáme do žlábku 1,5 ml ***substrátového roztoku***. Po přidání substrátového roztoku inkubujeme na třepačce cca ***2 – 5 minut*** při laboratorní teplotě. Během inkubace můžeme pozorovat vybarvování linií v místě pozitivních a cut-off kontrol (viz schéma proužku na str. 10). Jakmile je viditelná linie cut-off kontroly, zastavíme reakci.

f) Zastavení reakce

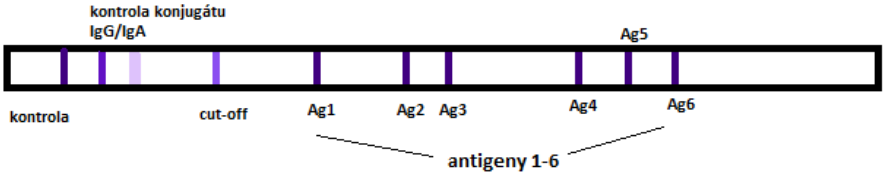
Pasteurovo pipetou odsajeme substrátový roztok a podobně jako v bodě b promyjeme 2× nebo 3× (podle časových možností), ale tentokrát k promytí použijeme deionizovanou vodu.

Po skončení promytí opatrně vyjmeme proužek ze žlábku 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 reagencie 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