

Úloha č. 4

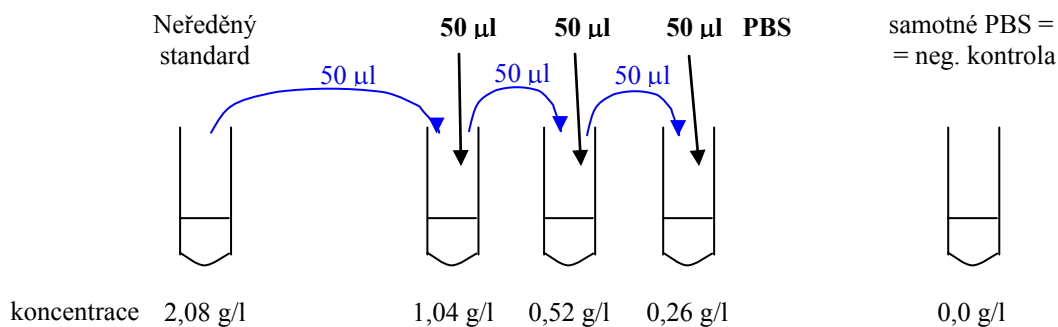
Stanovení koncentrace IgA v lidském séru metodou RID
(precipitační reakce - jednoduchá radiální imunodifúze dle Manciniové)Teorie:

Kvantitativní zjištění hladiny mnohých antigenů je možno provést pomocí jednoduché radiální imunodifúze (metodika podle Manciniové). Principem je difúze antigenu z jedné jamky gelem s konstantním obsahem rozpuštěné protilátky. Po ustálení rovnovážného stavu dochází v místě ideálního poměru mezi antigenem a protilátkou ke vzniku precipitační linie tvaru prstence okolo centrální jamky.

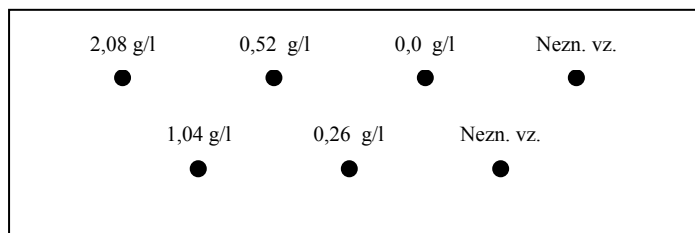
Pomocí RID je možno stanovit koncentrace mnohých bílkovinných součástí séra - metodika se dříve používala při měření hladin celkového IgG, IgA, IgM, složek komplementu nebo různých proteinů akutní fáze. Většina těchto vyšetření je však v dnešní době automatizována a provádí se na principu nefelometrie. V naší laboratoři metodou RID ale stále měříme koncentrace C2, C5 složek komplementu a revmatoidní faktor.

Provedení:

- Navážit 0,048 g agarózy, přidat 4 ml PBS (pro gel velikosti podložního sklíčka 7,5 x 2,5 cm) a rozvařit cca 30 min.
- Zchladit ve vodní lázni o teplotě 50 °C po dobu 10 min.
- K vytemperovanému roztoku agarózy přidat vytemperovaných 265 µl antiséra anti-IgA (také na 50 °C), dobře promíchat a rozlít na skleněnou desku.
- Nechat ztuhnout, pak dát do lednice cca na 1 hodinu.
- Naředit standardní vzorek roztokem PBS na jednotlivé koncentrace – viz schéma:



- Naředit vyšetřovaná séra 1:2 roztokem PBS, např.: 20 µl PBS + 20 µl séra.
- Vykrojit v agaróze pomocí jehly jamky podle šablony.
- Do jamek napipetovat 5 µl jednotlivých ředění standardního vzorku a vyšetřovaných sér – viz schéma:



- Inkubace ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě 48 hodin.
- Odečíst velikost precipitačních prstenců pomocí speciálního pravítka SEVAC a interpolací z kalibrační křivky (přímky) vypočítat koncentrace IgA ve vyšetřovaných vzorcích.

Výsledek:

Druhá mocnina průměru precipitačního kruhu (pravítkem SEVAC odečítám rovnou tuto hodnotu) je přímo úměrná koncentraci antigenu.

Ref. rozmezí nad 13 roků: 0,82 g/l – 4,53 g/l