

Úloha1:

Stanovení lidského sérového transferinu imunoturbidimetry

Ke stanovení transferinu použijete předpřipravené roztoky z komerčního kit IMU-LA-TEST fy Pliva-Lachema. Stanovení transferinu touto imunoturbidimetrickou metodou je založeno na reakci transferinu se specifickou kozí protilátkou proti lidskému transferinu. Vznikající imunokomplexy způsobují růst zákalu, který je přímo úměrný koncentraci transferinu a lze jej měřit při 340 nm.

Činidla:

Roztok 1: 35 mM imidazolový pufr pH 7, 4 % PEG, 150 mM NaCl

Roztok 2: 2 % kozí antisérum proti lidskému transferinu v 50 mM HEPES pH 7.4, 9 mM EDTA

Kalibrační roztok: krevní sérum obsahující certifikovanou koncentraci lidského transferinu o koncentraci 7g/l.

Pracovní postup:

V 5 mikrozkušavkách si připravte nejdříve standardy transferinu pro vyhotovení kalibrační křivky postupným ředěním zásobního roztoku 1:1 fyziologickým roztokem.

Do jamek mikrotitrační destičky postupně pipetujte 250 μ l roztoku 1 a 2 μ l vzorku (neznámý vzorek, standardy). Jako blank místo vzorku použijte 2 μ l destilované vody.

Promíchejte a inkubujte 5 min při 37 °C.

Odečtěte absorbanci při 340 nm (**A1**).

Do všech použitých jamek přidejte 70 μ l roztoku protilátky. Promíchejte a inkubujte při 37 °C 5 min. Poté odečtěte absorbanci při 340 nm (**A2**).

Vyhodnocení:

Z rozdílů absorbancí A2-A1 vypočítejte přírůstek zákalu v jednotlivých jamkách. Od hodnot jednotlivých vzorků odečtěte hodnotu naměřenou pro blank.

Z kalibrační křivky vyhodnoťte obsah transferinu ve Vašem neznámém vzorku.

Úloha 2:

Stanovení lidského sérového transferinu pomocí jednoduché ELISA metody

Ke stanovení lidského sérového transferinu je možno využít i několik možností enzymoimunoanalýzy. V této úloze se zaměříme na nejjednodušší verzi ELISA, využívající přímé adsorpce transferinu na polystyrenovou mikrotitrační destičku a jeho následnou specifickou detekci.

Roztoky:

TBS:	50 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7.4
potahovací pufr:	50 mM uhličitanový pufr, pH 9.6
blokovací roztok:	3 % BSA v TBS
protilátky:	1: 2 000 prasečí proti lidskému transferinu 1: 10 000 králičí proti prasečímu antiseru značené křenovou peroxidasou vždy v blokovacím roztoku
barvicí roztok:	Sigma Fast OPD (<i>o</i> -fenylendiamin), připravit roztok dle firemního návodu 30 % H ₂ SO ₄

Pracovní postup:

Všechny následné kroky provádějte na inkubované třepačce při 200 rpm.

Do mikrotitrační destičky pipetujte vždy **100 µl transferinu** v uhličitanovém pufru o různé koncentraci (5 – 100 µg/ml). Jako blank použijte uhličitanový pufr. Neznámý vzorek (lidské krevní sérum) nařeďte 100x.

Všechny vzorky stanovujte v tripletech.

Inkubujte misku 1 hod při 37 °C nebo přes noc při 4 °C.

Odstraňte inkubační roztok a blokujte nevysycená místa přidáním **100µl 3 % BSA v TBS**.

Inkubujte misku 1 hod při 37 °C.

Odstraňte kapalinu a jamky důkladně promyjte TBS puftrem 3 x 3 minuty pomocí intenzivního třepání.

Do jamek přidejte **100µl prasečí protilátky** proti lidskému transferinu a inkubujte 30 – 60 min při 37 °C.

Odstraňte kapalinu a jamky důkladně promyjte TBS puftrem 3 x 3 minuty pomocí intenzivního třepání.

Do jamek přidejte **100 μ l králičí protilátku** proti prasečímu antiséru a inkubujte 30 – 60 min při 37 °C.

Odstraňte kapalinu a jamky důkladně promyjte TBS pufrem 3 x 3 minuty pomocí intenzivního třepání.

Přidejte 200 μ l **OPD substrátu** do každé jamky a nechte 30 min inkubovat při 37 °C.

Odečtěte absorbanci v jednotlivých jamkách při 450 nm. V případě, že není možno odečíst hodnoty absorbance ihned, zastavte enzymovou reakci přidáním 50 μ l 3M kyseliny sírové a následně odečtěte absorbanci při 492 nm.

Vyhodnocení:

Naměřené hodnoty ze tří měření zprůměrujte a sestrojte kalibrační křivku závislosti absorbance na vstupní koncentraci transferinu. Odečtěte koncentraci Vašeho neznámého vzorku.

Úloha 3:

Imunoblotting bílkovin krevního séra

Proteiny krevního séra (se zaměřením na lidský sérový transferin) budou imunochemicky detegovány po jejich přenosu (blotting) na nitroceluloseovou membránu. Specifické barvení bude možno porovnat s nespecifickým barvením všech bílkovin.

Úloha navazuje na úlohy dělení bílkovin podle velikosti v elektrickém poli pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE).

I.ELEKTROFORÉZA

vlastní provedení viz úlohy SDS PAGE.

používané vzorky (naředěné na konc. 1 mg/ml):

lidské sérum (obsahuje lidský transferin) :	Exa
koňské sérum (negativní kontrola):	RU sérum
standard lidského transferinu	hTrf
standard hovězího transferinu	bTrf

Na elektroforézu naneste vzorky v tomto pořadí:

sérum				standard				sérum	standard
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Exa 20 µl	Exa 5 µl	Repro 20 µl	Repro 5 µl	hTrf 20 µl	hTrf 5 µl	bTrf 20 µl	bTrf 5 µl	Exa 20 µl	lidský transferin 20 µl
lidské		koňské		lidský		hovězí			

Vzorky 1-8 budou barveny imunochemicky, vzorky 9 a 10 nespecificky na celkovou bílkovinu.

II. BLOTTING

Roztoky:

přenosový pufr: 15.6 mM Tris/120 mM glycin

TBS: 50 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7.4

blokovací roztok: 4% netučné sušené mléko v TBS

protilátky: 1: 500 prasečí proti lidskému transferinu

1: 2 000 králičí proti prasečímu antiseru značené křenovou peroxidasou
vždy v blokovacím roztoku

barvicí roztok: 4-chloro-1-naftol 3 mg/ml v methanolu (stabilní 1-2 týdny v chladu)

A. Příprava elektroforetické aparatury

Nitrocelulosovou membránu a gel po elektroforéze ponechte ekvilibrovat 15 minut v přenosovém pufru.

Do elektroforetické nádoby vložte blotovací modul a nalijte do ni 400 ml přenosového pufru.

Do nádoby vložte vychlazenou chladicí jednotku.

B. Sestavení blotovací jednotky

V Petriho misce otevřete blotovací kazetu šedou stranou dolů a položte na ni houbu. Na její povrch položte filtrační papír nasycený přenosovým pufrům.

Na filtrační papír nalijte malé množství přenosového pufru a položte na něj gel, tak aby mezi papírem a gelem nezůstaly vzduchové bubliny.

Na povrch gelu nalijte malé množství přenosového pufru a z jedné strany na něho pomalu pokládejte nitrocelulosovou membránu, tak aby mezi gelem a membránou nezůstaly vzduchové bubliny. Přebytek pufru a případné bubliny odstraňte vytlačení skleněnou tyčinkou.

Na povrch nitrocelulosové membrány nalijte malé množství přenosového pufru a položte na ni filtrační papír nasáklý v přenosovém pufru. Přebytek pufru a případné bubliny odstraňte vytlačení skleněnou tyčinkou.

Na filtrační papír položte houbu a uzavřete blotovací kazetu.

C. Blotting

Vsuňte blotovací jednotku do blotovacího modulu umístěného v elektroforetické nádobce, a to šedou stranou k šedé straně modulu.

Nádobku umístěte na elektromagnetickou míchačku, uzavřete ji víkem a elektrody připojte ke zdroji.

Blotting ponechte probíhat 2 hodiny za konstantního napětí 100 V.

III. IMUNODETEKCE

A. Blokování membrány

Vypněte zdroj napětí, otevřete blotovací aparaturu, vyjměte z ní blotovací jednotku. Otevřete blotovací kazetu, odstraňte houbu a filtrační papír a nitroceluloseovou membránu přeneste do blokovacího roztoku. Membránu ponechte v blokovacím roztoku 15 minut za občasného promíchání při 37 °C.

B. Inkubace s první protilátkou

Ponechte inkubovat membránu v blokovacím roztoku obsahujícím první protilátku zředěnou v poměru 1 : 500 a to po dobu 1 hodiny případně přes noc při laboratorní teplotě. Na membráně nesmí zůstat vzduchové bubliny, které by bránily kontaktu epítopy - protilátka.

C. Promytí a blokování membrány

Slijte roztok první protilátky a membránu opláchněte pufrem 3x 10 minut. Membránu ponechte v blokovacím roztoku 15 minut za občasného promíchání při 37 °C.

D. Inkubace s druhou protilátkou

Ponechte membránu inkubovat v blokovacím roztoku obsahujícím druhou protilátku zředěnou v poměru 1 : 2 000 a to po dobu jedné hodiny případně přes noc při laboratorní teplotě.

F. Promytí membrány

Slijte roztok druhé protilátky a membránu opláchněte pufrem 3x 10 minut.

G. Detekce aktivity křenové peroxidasy

Připravte detekční směs :

- 5 ml roztoku methanolického roztoku 4-chloro-1-naftolu
(3 mg/ml methanolu)
- 20 µl 30 % peroxidu vodíku
- doplňte pufrem na 30 ml

Ponořte membránu do detekční směsi a ponechte vyvíjet modré zbarvení po dobu 5 - 30 minut.

IV. Barvení na bílkovinu

NC membránu promyjte několikrát destilovanou vodou a vložte ji do roztoku Ponceau S asi na 5 minut. Pozadí odbarvěte několikanásobným propíráním v 3% kyselině octové.