

ÚLOHA 8: Turbidimetrické stanovení protilátek třídy M (IgM)

Chemikálie a roztoky

1. Komerční lidské sérum s koncentrací IgM 2 g/l
2. Fyziologický roztok
3. Komerční kit pro stanovení IgM (reagent R1 a R2)

Vzorek: Komerční lidské sérum s neznámým množstvím IgM.


Přístroje a pomůcky

Spektrofotometr pro UV oblast schopný měřit při vlnové délce 340 nm.

Postup

1. Ze zásobního komerčního séra o známé koncentraci IgM si do dvojice připravíme řadu ředění pro kalibraci
 - a) do 1. zkumavky napipetujeme 10 μ l komerčního séra
 - b) do 2. - 3. zkumavky napipetujeme 5 μ l fyziologického roztoku
 - c) z 1. zkumavky přeneseme 5 μ l do 2. zkumavky, důkladně promícháme, poté přeneseme 5 μ l do 3. zkumavky

Označení zkumavky	1.	2.	3.
Fyziologický roztok		5 μ l	5 μ l
Vzorek	-	-	-
Antigen (sérum)	10 μ l	-	-



Ředění:	Konc.	2x	4x
Koncentrace:	2 g/l		
Celkový objem:	5 μ l	5 μ l	10 μ l

2. Smícháme antigen (řada ředění séra o známé koncentraci IgM a vzorek) s protilátkou (antisérum s anti-IgM) a reakčním puřrem
 - a) přímo na destičku napipetujeme do čtyř jamek po 160 μ l reagentu R1
 - b) poté přidáme do jamek 1,5 μ l připraveného standardu nebo vzorku
 - c) promícháme a 20 s počkáme
 - d) nakonec do všech jamek napipetujeme 40 μ l reagentu R2
3. Reakční směs v jamkách promícháme a mikrotitrační destičku inkubujeme minimálně 4 minuty, aby došlo k vytvoření imunokomplexů.
4. Po uplynutí dané doby ještě jednou promícháme a změříme absorbanci při vlnové délce 340 nm.

Hodnocení

Výstupem je série hodnot v tabulce, ve které jsou uvedeny hodnoty absorbance pro každou jamku. Absorbance je bezrozměrná veličina, která udává množství pohlceného světla. Získáte 3 hodnoty absorbancí pro sestavení kalibrační křivky a hodnotu pro vzorek. Vytvořte lineární kalibrační přímku se zobrazením rovnice regrese a hodnoty spolehlivosti. Pomocí této rovnice spočítejte koncentraci imunoglobulinů ve vzorku.

Výstup

- 1) Tabulka hodnot (koncentrace a absorbance) kalibračních sér a vzorku.
- 2) Bodový graf s proloženou lineární regresní křivkou, hodnotou spolehlivosti R a rovnicí regrese