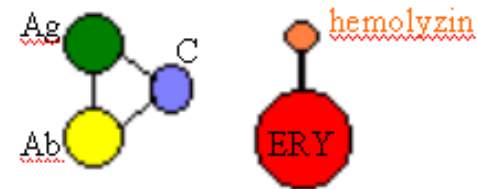


# Komplementové metody

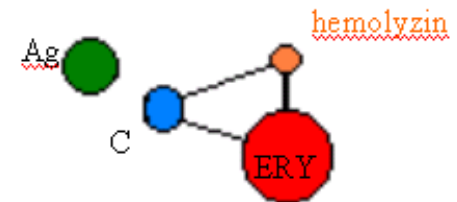
metody využívající faktu aktivace komplementového systému komplexem – antigen-protilátka, KFR

- **Složky reakce:** Ab, Ag, C, ERY, hemolyzin
- Ab- **vyšetřované sérum**
  - chceme v něm **prokázat protilátku / komplement** v séru je tepelně inaktivován /
- **známý specifický Ag**
  - jsou-li v séru Ab, vytvoří se **imunokomplex IK**

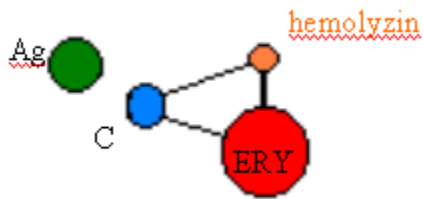


- **KOMPLEMENT** - zdrojem nejčastěji sérum morčete (**váže se na IK a aktivuje protilátku**)

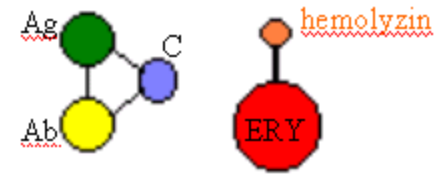
**hemolytický komplex: komplex Ag /beraní ERY/ a protilátky ~ EMBOCEPTORu /hemolyzinu/, získaného imunizací králičího séra beraními erytrocyty**



→ aby došlo k hemolýze je nutná **spoluúčast KOMPLEMENTU** a inkubace 30 minut při 30 °C



**KFR**



- průběh reakce:
- \* **POZITIVNÍ** ~ ve vyšetřovaném séru *je Ab*
- protilátka v séru vytvoří **komplex s Ag** – na něj se **naváže komplement**. Po přidání hemolytického systému **nezbývá** již komplement **do 2. části reakce**
- → **k hemolýze NEDOJDE:**
- \* **NEGATIVNÍ** ~ ve vyšetřovaném séru *není Ab*
- v 1. fázi reakce se **nevytvoří IK** – **komplement se nevyváže** a zbývá do 2. fáze reakce, kdy **aktivuje hemolyzin**
- **DOJDE k hemolýze:**

# KFR

- velmi ***záleží na množství komplementu – každý vzorek se musí titrovat***, aby bylo množství komplementu konstantní
- ***použití:***
  - ***diagnostika*** příjice /*syphilis*/, bruceózy, pasteurely
  - ***ve virologii*** průkaz protilátek téměř všech virových nákaz
  - ***typizace neznámých Ag*** nově izolovaných virů
  - ***průkaz protiorgánových Ab***

# Vyšetření komplementového systému

- a) Stanovují se hladiny jednotlivých složek K v séru – za pomoci antisér, většinou proti C3, C4, C1q
- b) Celková aktivita komplementové kaskády-se provádí testem **CH50** – (50% hemolýza způsobená komplementem), stupeň hemolýzy závisí na množství přidaného K, nepřímá úměra, hemolýza - spektrofotometrie

**Využití:** K detekci poruch nedostatečného mn. Nebo defektů složek K systému

Reakční směs:

2% nálev krvinek, Ab(hemolyzin), C komerční (vyšetřované sérum)

Výsledek: lýze buněk, vyčerení

## Principy metodik

Ag+Ag=IK, CIK, DIK

**1.** Využívající fyz – chem vlastností – CIK- největší makromolekuly séra mohou být precipitovány pomocí PEG (polyetylénglykol). Precipitát je úměrný mn. cirkulujících CIK

# Vyšetření cirkulujících a deponovaných IK

- **Principy metodik**
- Ag+Ag=IK, CIK, DIK
- **1.** Využívající fyz – chem vlastností – CIK- největší makromolekuly séra mohou být precipitovány pomocí PEG (polyetylénglykol). Precipitát je úměrný mn. cirkulujících CIK

# Vyšetření CIK

- 2. CIK na sebe váží C1 – C3 složky K. V první fázi se odstraní nenavázaný C1q. V druhé fázi se stanoví koncentrace C1q, jež odráží i hladinu CIK (totéž pro C3, C4)
- 3. průkaz vazbou na buňky, které exprimují receptor pro Fc fragment IgG. Lze využít trombocyty, Žírné b., fygocyty
- *Využití:* Pro monitoring jakýchkoliv zánětlivých procesů. Pro diagnostiku imunokomplexových chorob je důležitější průkaz IK deponovaných v tkáních. To se provádí po **bioptickém odběru** vzorku z tkáně (kůže, svaly, ledviny) pomocí přímé fluorescence se prokazuje uložení IgG

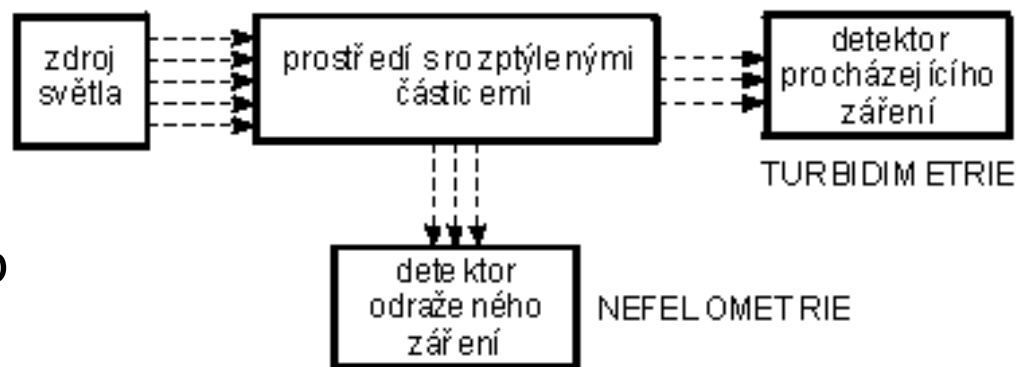
# Zákalové reakce

*metoda probíhající v roztoku*

**Princip:** při reakci Ag a Ab vzniká zákal-precipitát, jehož intenzita je při konstantním množství mn. Ab úměrná koncentraci vyšetřovaného Ag

**\*NEFELOMETRIE** – rozptyl

monochrom. světla měřeného pod úhlem, měří se intenzita záblesků světla odraženého od IK (Tyndal. efekt), výbojka nebo laser



**TURBIDIMETRIE** – úbytek monochrom. světla o 320nm při průchodu vzorkem v kyvetě měřeného ve stejné rovině

Výhoda: možnost automatizace, rychlost provedení, přesnost, ale vyšší cena, dioda, méně přesná

**Využití:** Stanovení c Ig, hlavních sérových proteinů, stanovení sérových bílk.(složky C, proteiny akut. fáze (CRP – stand. 2mg/l, transferin, alfa2 – makroglobulin)

**Úskalí:** V prec. křivce je třeba vymezit oblasti:

a) zóna využitelná pro měření, tj oblast nadbytku Ab

b) **Kritický bod, oblast ekvivalence**, zde leží nejvyšší konc. Ag, kterou lze ještě měřit

c) oblast za krit. bodem, zde nelze měřit

Dva režimy stanovení

a) **End point** – měří se v prostředí polyetylénglykolu

b) **Rate** kynetický systém – měří se kineticky , v krátkých časových intervalech



# *Imunoblotting*

- **SOUTHERN BLOTTING**

- vyvinut v r. 1970, k detekci DNA, molekuly DNA se přenášejí z agarózového gelu na membránu k nalezení části sekvence DNA či konkrétního genu v genomu

- **NORTHERN BLOTTING**

- slouží k detekci RNA
- přenos nám umožňuje zjistit přítomnost, nepřítomnost a relativní množství specifických RNA sekvencí

- **WESTERN BLOTTING**

- slouží k detekci bílkovin
- touto metodou dokážeme najít jednu bílkovinu v množství jiných, přičemž určit i délku daného proteinu
- je závislá na použití velmi kvalitních Ab zaměřených na vybranou bílkovinu

**Podstatou blottingu:** izolovaná látka (obvykle separovaná) se přenáší na membránu.

## Podle typu přenosu se bloty liší:

- **Difúzní blotting:** v přenosovém pufru
- **Vakuový blotting:** přenos pomocí vakua
- **Kapilární blotting:** přenos kapilárními silami přes filtrační papír
- **Tankový elektroblotting:** k přenosu využito el. pole (2-3l pufru), na boku nádoby - elektrody
- **„Semi dry“ blotting:** využití plošných elektrod (100 ml)
- **Kapkovací dot blotting:** bílkoviny nejsou rozseparovány – imobilizace jednotlivých vzorků

## Používané membrány:

- **Nylonová** – elektrostatická interakce
- **PVDF** (polyvinylen difluoridová) – hydrofilní interakce
- **Nitrocelulosová** – hydrofilní interakce

## WESTERN BLOT

3 kroky:

1. **SDS PAGE** (gradientová elektroforéza)
2. **BLOTTING**
3. **IMUNODETEKCE**

# SDS PAGE

Nejpoužívanější metodou je PAGE – SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti **SDS** (sodium dodecyl sulphate). Umožňuje následné určení relativních molekulových hmotností jednotlivých proteinových frakcí.

Polyakrylamidové gely se připravují kopolymerací polymerů – **akrylamidu** a ***N,N'*-metylen-bis-akrylamidu** (BISu).

Polymerací akrylamidu vznikají dlouhé řetězce polymerů, zařazení BISu způsobuje zesílení „můstky“, které vznikají z bifunkčních zbytků BISu.

Vytvořená polyakrylamidová matice nese elektrický náboj a je chemicky dost inertní. Pro stanovení  $M_r$  se používá SDS detergent.

- **SDS – sodium dodecylsulfát** – TENZID, váže se v poměru 1,4 g SDS/ 1 g bílkoviny  
→ udílí bílkovinám **UNIFORMNÍ** náboj, její vlastní náboj pozbude významu a dělení může probíhat podle velikosti molekul.

**Molekula určitého proteinu postupuje v gelu až do momentu, kdy velikost pórů je menší než velikost molekuly a ta se v tomto místě gelu „zasekne“.**

**Použitím směsi standardních bílkovin se známou  $M_r$  a po sestrojení kalibrační křivky je možné vypočítat  $M_r$  jednotlivých frakcí**

- **WESTERN BLOTTING**

Blotovacím zařízením pro semi-dry blotting přeneseme rozdělené proteiny pomocí el. proudu.

- Sestavíme blotovací zařízení pro semi-dry blotting
- Na grafitovou elektrodu umístíme filtr. Papíry navlhčené transferovým pufrem, pak nitrocelulózovou membránu, gel s proteiny a další navhčené filtr. Papíry
- Přiložíme elektrody a zapojíme ke zdroji

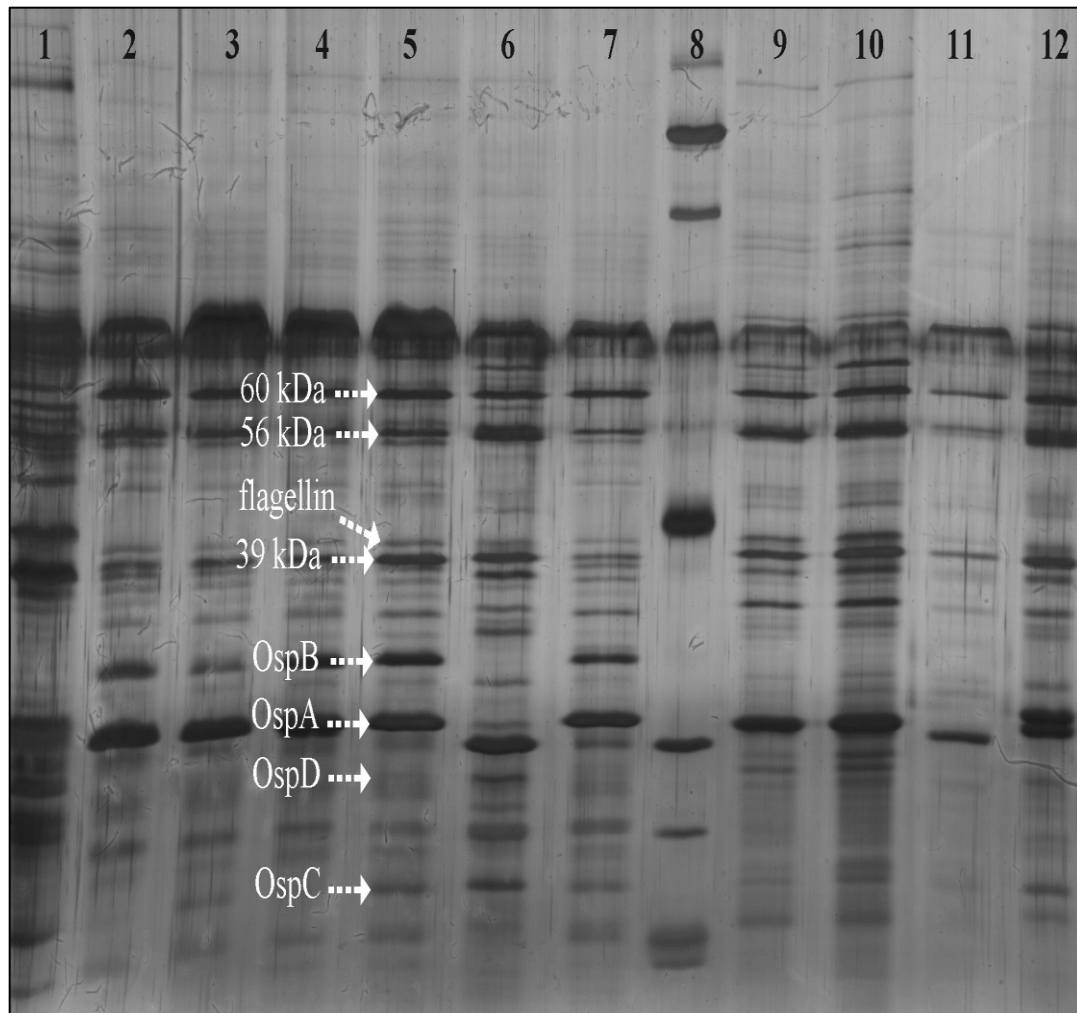
# WB

- **IMUNODETEKCE**

- Z membrány odřízneme sjezd s proteinovými standardy a obarvíme amidočerní, propláchneme v prom. roztoku
- Inkubace s primární protilátkou v blokov. roztoku
- a následně se sekundární protilátkou v blokovacím roztoku.
- Promyjeme a vložíme do substrátového roztoku, dokud se neobjeví bandy (barví se proteiny)
- Vyvolávání ukončíme namočením membrán do vodovodní vody,

# Výsledky PAGE analýzy

## SDS-gradient PAGE proteinový profil



8. standard

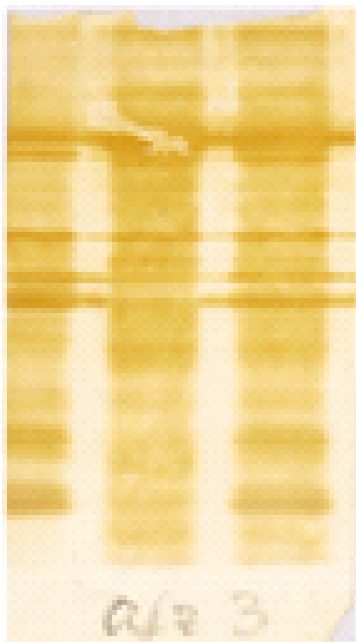
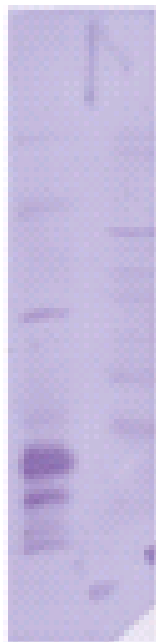
Vyhodnocení  
Denzitometricky  
**Legenda:**

**Z gelu se mohou rozeznat typické rozdíly mezi**

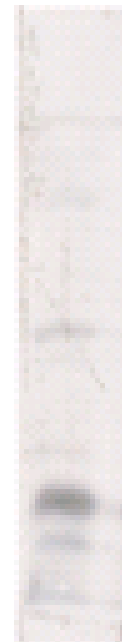
- *B. afzelii* a *B. garinii* (linie 5, Linie 6)
- spirochetou (linie **1**) izolovanou z larvy *Culex (C.) pipiens pipiens* a *B. afzelii* (linie 2) izolovaná z imaga *Culex (C.) pipiens molestus*

# WB

standard



standard



$M_r$  (kDa)

66

45

31

14,4

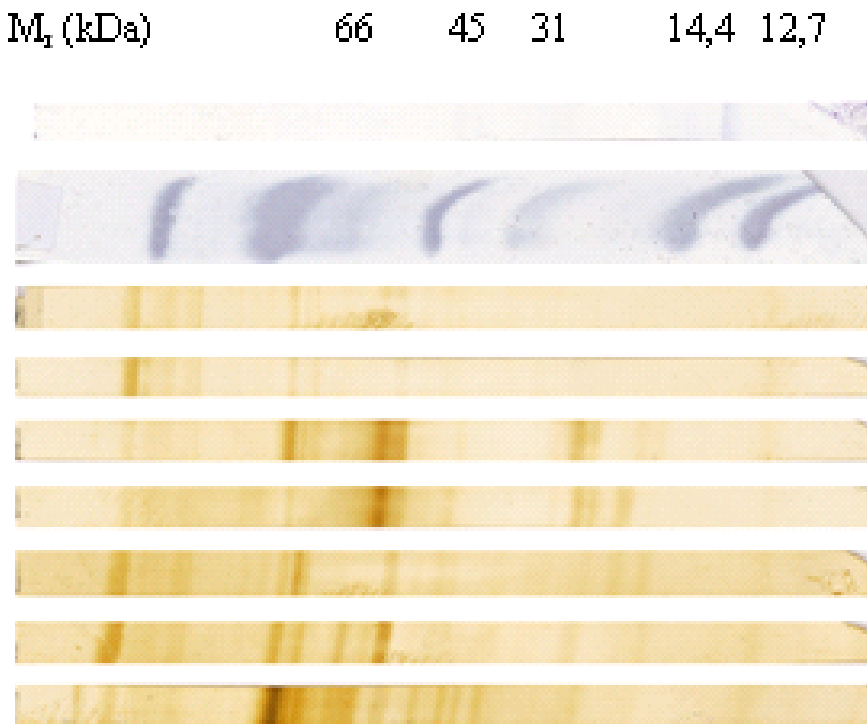
12,7

Nitrocelulózová membrána s rozděleným antigenem *B. afzelii*, směs, *B. garinii*  
metodou **SDS PAGE**

Po obou stranách membrán jsou zachyceny standardy, podle kterých byly odečítány molekulové hmotnosti neznámých vzorků sér.

# WB

Na každé části membrány jsou postupně nanášeny antigeny *B. afzelii*, *B. garinii* a směs obou antigenů. Text na spodní části membrány reprezentuje antigen, který byl použit při imunizaci pokusného jedince. Po jedné straně membrány je zachycen standard, podle kterého byly odečítány molekulové hmotnosti vzorků sér.



Nitrocelulózová membrána s antigenem *B. garinii*, *afzelii*, směs



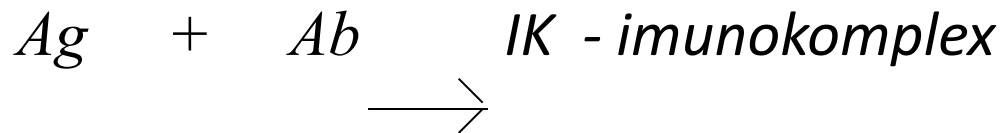
- **Úskalí:**

1. akrylamid je jedovatý
2. dostatečné napětí při blottingu
3. vlhké prostředí v pufru, aby gel nevyschl
4. gel pořádně zatuhnout a bez bublin
5. elfo od – k +, gel na – , membr. na +

# Imunochemické metody

- Je to praktická realizace poznatků imunologie, radiochemie, enzymologie a fotometrie a dalších.
- Vznik imunochemických diagnostických metod:  
V průběhu 70-80tých let s rozvojem klinické imunologie, virologie, farmakologie a dalších oborů
- Zvýšily se nároky na rychlost a kvalitu požadovaných laboratorních vyšetření. Klade se důraz na vysokou citlivost, specifitu a možnost automatizace.
- Do té doby sloužily k detekci Ag a Ab klasické metody: KFR, neutralizace Ag pomocí specifické Ab, světelná či elektronová mikroskopie, prostá či elektroforetická imunodifuze, které byly nahrazeny imunochemickými metodami: FIA, RIA, EIA a další

**- stanovení Ag či Ab v histologických preparátech, tělních tekutinách, a jiných vzorcích, Imunoeseje, reakce třetí generace základem je reakce:**



-jeden z reaktantů nese značku a tím je vizualizován výsledek. Detekční systém tak zvyšuje citlivost reakce a umožňuje modifikace, které prostou precipitací reakce nejsou dosažitelné.

**Druhy reakcí:**

- enzym EIA, EMIT enzyme multiplied immunoassay technique
- geneticky upravený enzym CEDIA
- radioizotop RIA
- fluorescenční látka FIA
- chemiluminiscenční látka LIA, CL

- **Antigeny Ag** – makromolekuly (polymery: proteiny, polypeptidy...)
  - navozují specifickou imunitní odpověď
  - specificky reagují s protilátkami
  - haptén – nízkomolekulární látka (léčiva, drogy) navázána na
    - vysokomolekulární nosič
- **Protilátky Ab** – bílkoviny (glykoproteiny) tělních tekutin
  - vykazují specifickou vazebnou schopnost vůči antigenu, na jehož
    - podnět se vytvořily, mohou být cíleně připravené
  - jen proti **jedné chemické skupině**
  - **která je společná pro více strukturně chemicky příbuzných látek**

# *Imunochemické metody*

- ***Heterogenní imunometody*** – oddělení volných molekul značených reaktantů (Ag, Ab, H, Abs) od značeného reaktantu vázaného v imunokomplexu, intenzita značené reakce se nemění, stanovení makromolekulárních látek (radioimunometody, ELISA) – vysoká citlivost
- ***Homogenní imunometody*** – bez separace frakcí, intenzita značené reakce se mění, stanovení nízkomolekulárních látek, jsou jednodušší, rychlejší, lze je automatizovat (enzymová, fluorescenční a chemiluminiscenční imunoanalýza)