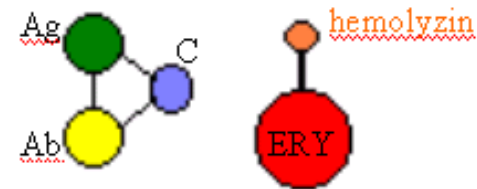


# Komplementové metody

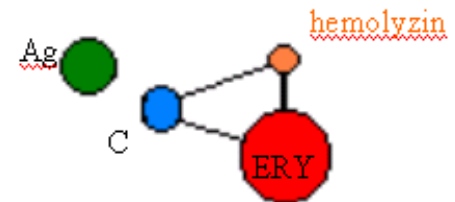
metody využívající faktu aktivace komplementového systému komplexem – antigen-protilátka, KFR

- **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**

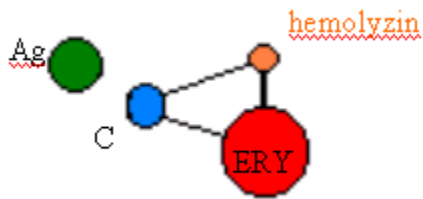


- **KOMPLEMENT** - zdrojem nejčastěji sérum morčete (**váže se na IK a aktivuje protilátku**)

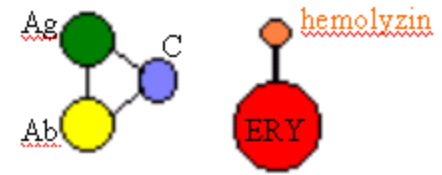
**hemolytický komplex: komplex Ag /beraní ERY/ a protilátky ~ EMBOCEPTORu /hemolyzinu/, získaného imunizací králičího séra beraními erytrocyty**



→ 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, vyčrešení

## 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

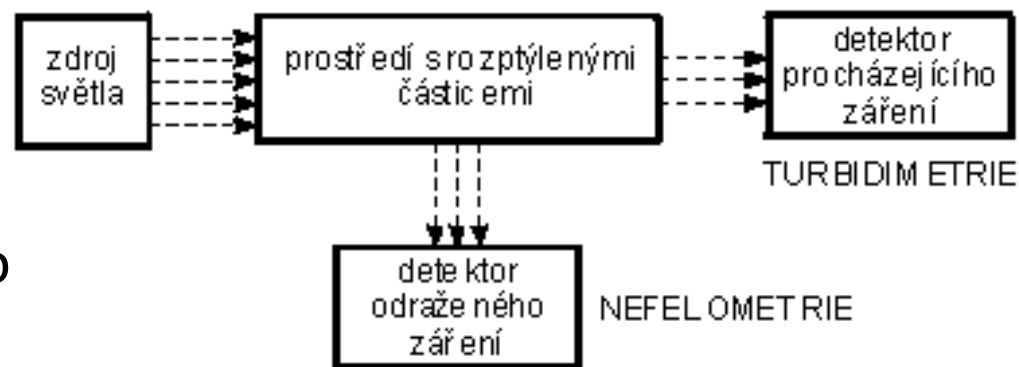
# Zákalové reakce

*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 Mr a po sestrojení kalibrační křivky je možné vypočítat Mr 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,