

Analýza proteinů

- udržování onkotického tlaku
- transport minerálů, hormonů, lipidů, katabolitů (prealbumin, Alb, ceruloplasmin, transferin, apoproteiny...)
- obrana proti infekci (imunoglobuliny)
- hemokoagulace a fibrinolysa (koagulační faktory a faktory rozpouštějící thromby)
- enzymy a inhibitory enzymů (cholinesterasa, ceruloplasmin, inhibitory proteas)

Stanovení bílkovin

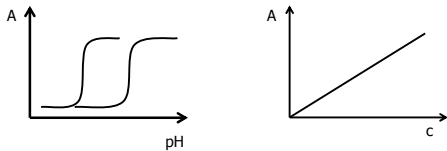
CELKOVÁ KONCENTRACE

– (málo stavů ovlivňuje koncentraci všech bílkovin – dehydratace, převedení, malnutrice, většinou zvýšení či snížení jedné nebo několika málo bílkovin)

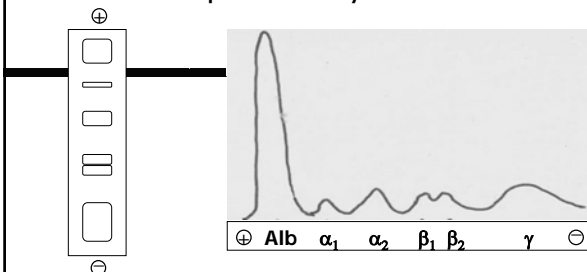
■ biuretova metoda

■ bílkovinová chyba indikátoru

bromkresolový purpur (BCP) – specifický pro albumin
bromkresolová zeleň (BCG)



Elektroforéza plazmatických bílkovin



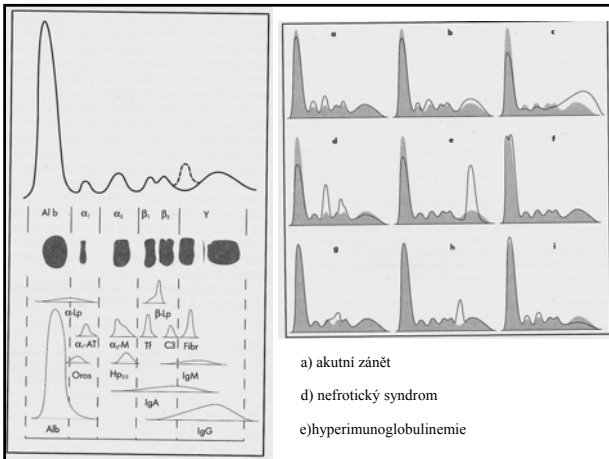
prealbumin, albumin

α_1 -globuliny: α_1 -antitrypsin, α_1 -fetoprotein, α_1 -lipoprotein

α_2 -globuliny: α_2 -makroglobulin, haptoglobin, ceruloplasmin, feritin

β -globuliny: transferin, C-reaktivní protein, β -lipoprotein, fibrinogen

γ -globuliny (hl. IgG, IgA, IgM)



Specifické stanovení jednotlivých bílkovin - imunochemie

Antigen – látka vyvolávající imunitní odpověď

Vlastnosti – imunogenost }
specifičnost } **antigenost**

Faktory ovlivňující vyvolání imunitní odpovědi

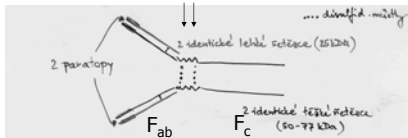
- chemická povaha
- velikost
- (neúplný antigen = haptén)
- komplexita
- valence
- konformace, přístupnost
- cizorodost
- genetická příbuznost

epitop = antigenní determinanta

Protilátky (Ab) - imunoglobuliny

- proteiny vážící specificky antigen
- produkovány B lymfocyty (humorální imunita)
- v lidském těle cca 10 000 různých Ig (~ 20% plasm. bílkovin)
- glykoproteiny (4 - 18% sacharidy)

odlišnosti: specifita
AA sekvence
migrace v el. poli
funkce

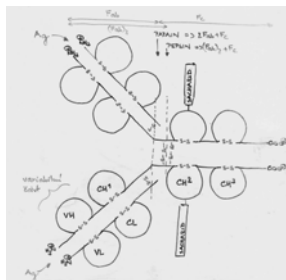


pepsin: $(F_{ab})_2 + F_c$

papain: $2F_{ab} + F_c$

Protilátky (Ab) - imunoglobuliny

- IgG: 75% sérových Ig, monomer, prochází placentou
- IgM: 10% sérových Ig, pentamer, inicializuje imunitní odpověď
- IgA: 15% sérových Ig, mono a dimer, hl. imunoglobulin sekretů (proti lokálním infekcím)
- IgE: nízké koncentrace, snadná vazba na buňky, alergie
- IgD: stopová množství, monomer, fce ???



Reakce antigen -protilátka

vazebné síly: elektrostatické, vodíkové, van der Waalsovy, hydrofobní interakce $\Rightarrow \Rightarrow$

imunokomplex je stabilní v rozmezí pH 4-9
možnosti disociace: vysoké nebo nízké pH
močovina, chaotropní látky

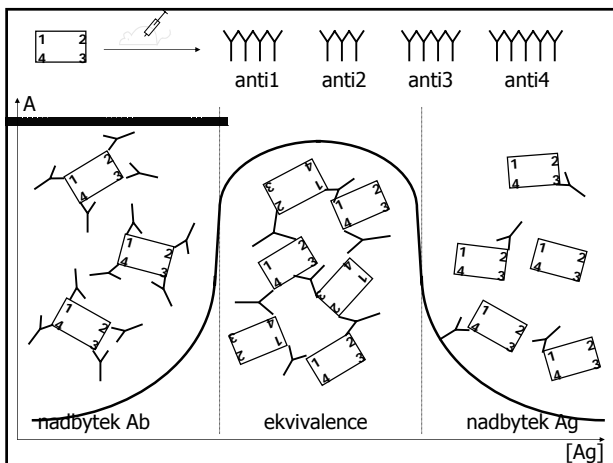
Základní pojmy:

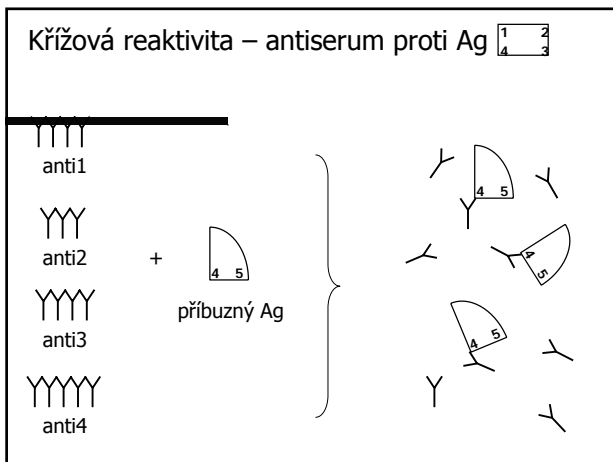
AFINITA: „míra vazebné síly mezi jednou antigenní determinantou a protilátkou“

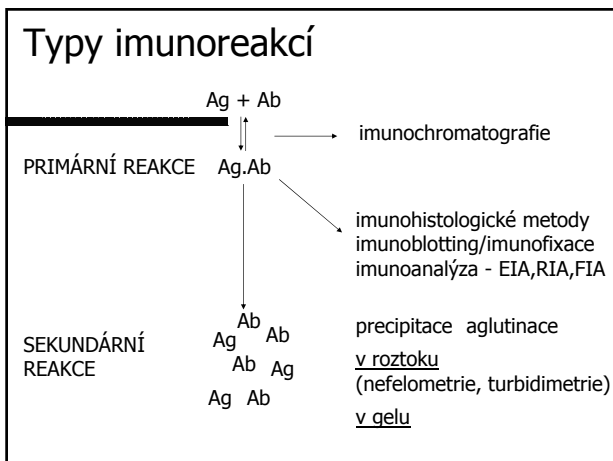
AVIDITA: „míra stability komplexu“

SEKUNDÁRNÍ PROJEV INTERAKCE Ag.Ab = PRECIPITACE

KŘÍŽOVÁ REAKTIVITA







„Indicator-labelled“ imunoassay

Indikátor – navázán na Ag nebo Ab
indukuje reakci Ag.Ab
enzym, fluorescenční sonda, radioaktivní značka, ...

vlastnosti značky: levná
vysoce purifikovaná
specifická reaktivita
(bez interferencí jinak ⇨ citlivost ⇨ pozadí)
detekce μ-ng/ml

E: peroxidasa, alkalická fosfatasa, glukosaoxidasa, G6PD, ..

R: ^{125}I , ^3H , ^{14}C

F: fluorescein-isothiokyanát (FITC)

biotin-avidin

koloidní zlato, kov + elektroluminiscence

E + zesilovací systémy: chemiluminiscence, ...

EIA, RIA, FIA, ...

- malá spotřeba reagensů
- rychlost stanovení
- vysoká citlivost
- reprodukovatelnost
- možnost stanovení velkého počtu vzorků najednou

homogenní – detekce vzniku komplexu přímo v roztoku

heterogenní – nutná separace vzniklého komplexu
pro závěrečná měření

přímé – značená primární protilátka či antigen

nepřímé – využití sekundární protilátky pro detekci

Homogenní EIA

reakce Ag.Ab způsobuje změnu v katalytické aktivitě enzymu
vázaného na antigen – především pro stanovení haptenu

↑) GENTAMICIN

T4

E

... HAPTEN

E

Ab

snížení katalytické aktivity

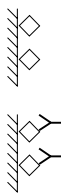
znovuobnovení katalytické aktivity

Heterogenní EIA – ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

1. jednoduchá

přímá

nepřímá



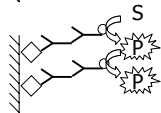
1. vazba různého množství antigenu ve vzorku



2. vazba std množství Ab (*rabbit anti Ag*)



(3. vazba druhé protilátky) (*swine anti rabbit Ig*)



4. detekce „navázané“ enzymové aktivity

2. dvojitá sendvičová ELISA

přímá

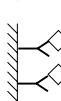
nepřímá



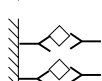
1. Std. množství Ab (*rabbit anti Ag*)



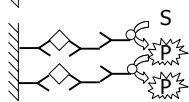
2. Vzorek (Ag)



3. vazba std množství Ab (*rabbit anti Ag*)



(4. vazba druhé protilátky) (*swine anti rabbit Ig*)



4. detekce „navázané“ enzymové aktivity

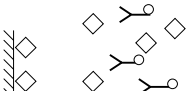
3. kompetitivní ELISA – „nepřímá detekce antigenu“



1. std. množství Ab (Ag)



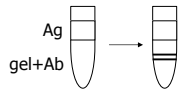
2. Vzorek (Ag) + std. množství značeného Ag (Ab)



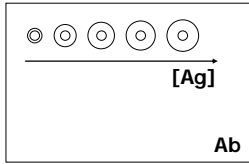
4. detekce „navázané“ enzymové aktivity

Imunodifúzní metody

Jednoduchá imunodifúze (Oudin 1946)



Jednoduchá radiální imunodifúze

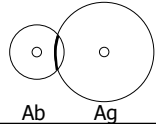


48 – 72 h : [Ag] ~ d
6 – 24 h : [Ag] ~ log d

citlivost 0.02 mg/ml

Kvantifikace IgG, IgM, IgA, IgD, albumin, ...

Dvojitá radiální imunodifúze (Ouchterlony 1949)



Pouze kvalitativní důkaz přítomnosti Ag
REAKCE IDENTITY
Mr...zakřivení precipitační obloučku
koncentrace ... vzdálenost od jamky

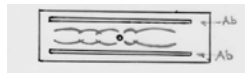
Imunodifúzní metody

Klasická imunoelektroforéza

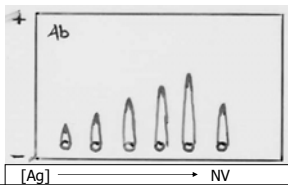
1. elektroforéza bílkovin krevního séra



2. imunodifúze



Raketová imunoelektroforéza

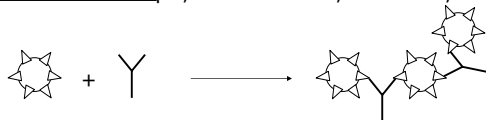


Kvantifikace Ag

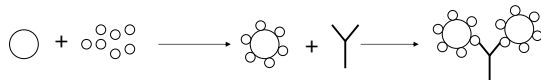
Aglutinační metody (IgM >> IgG)

Přímá aglutinace – detekce antigenů na povrchu Ery, mikrobů, ...

stanovení krevních skupin, infekce Brucella, Salmonella, ...



Nepřímá aglutinace – Ag vázány na nosič – latex, Ery, ...



Inhibice aglutinace – detekce a kvantifikace Ag

