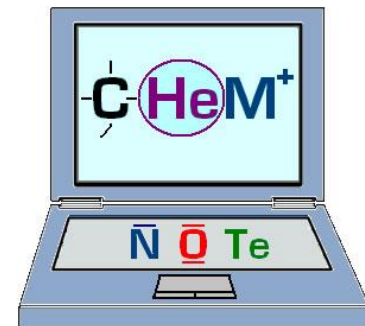




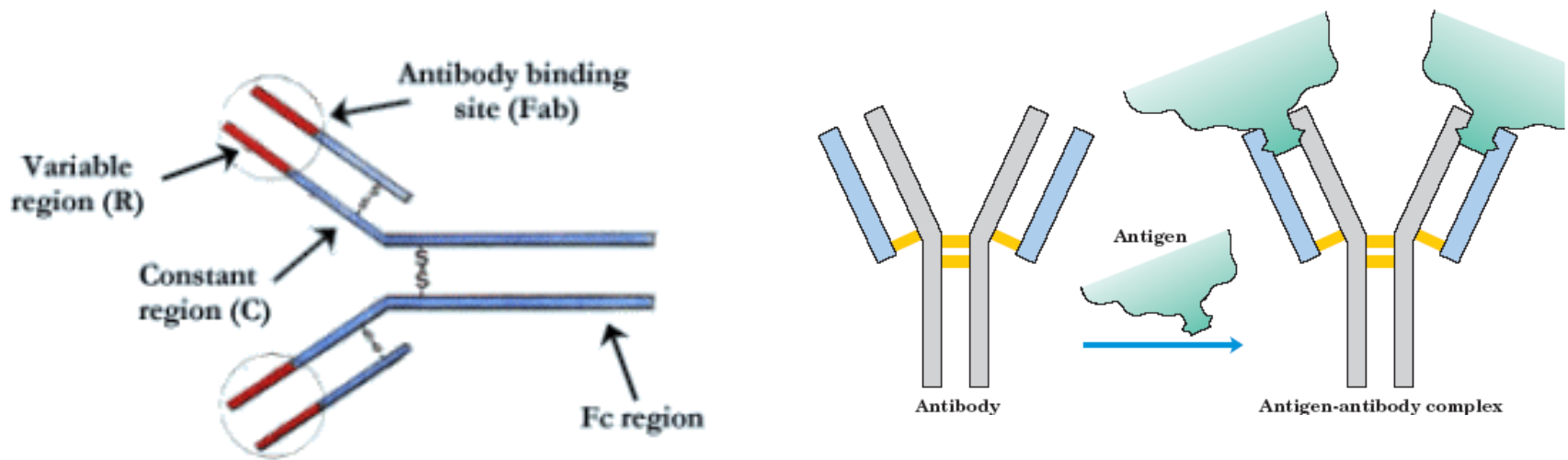
Evropský sociální fond
Praha & EU: Investujeme do vaší budoucnosti



IMUNOCHEMICKÉ METODY

ZÁKLADNÍ TERMÍNY

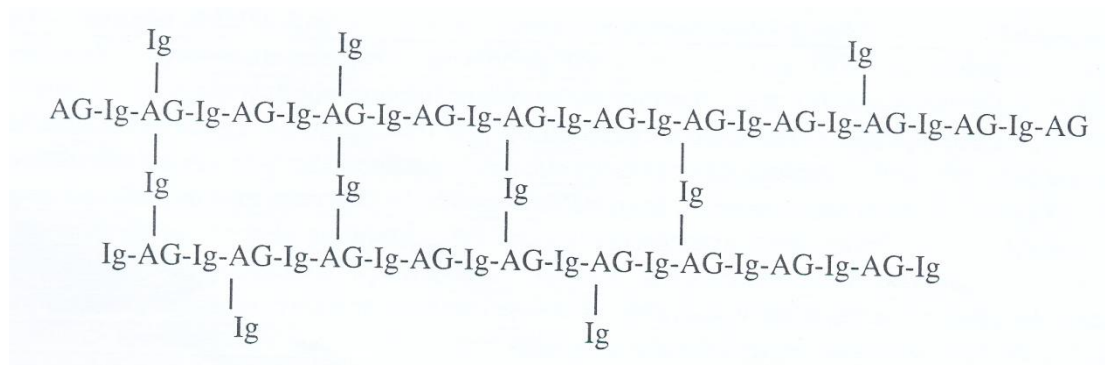
- **antigen** – jakákoli látka, se kterou specificky reaguje protilátka
- **imunogen** – látka schopná vyvolat v organismu obratlovce obrannou reakci imunitního systému, jejíž součástí je produkce protilátek aktivovanými lymfocyty
- Σ imunogen má vždy vlastnosti antigenu, zatímco ne všechny antigeny vyvolávají tvorbu protilátek
- imunogenita antigenů – mnoho faktorů
 - velikost molekuly
 - chemická pestrost molekuly
 - požadavek „cizosti“ cílovému organismu
 - dobré - bílkoviny, glykolipidy
 - špatné - nukleové kyseliny, polysacharidy, malé molekuly (<5 kDa)
- **determinanta** – menší oblast makromolekuly imunogenu, která je rozpoznávána imunitním systémem
- **hapten** – “nepravý antigen” – některé nízkomolekulární sloučeniny, proti kterým lze vytvořit protilátky (nutná vazba na nosič)
- **protilátka (imunoglobulin)** – bílkovina (glykoprotein) krevního séra, která specificky váže antigen, na jehož podnět byly organismem vytvořeny
 - děleny dle fyz-chem, biol. vlastností do 5 tříd: IgM, IgA, IgG, IgD, IgE
 - většina protilátek používaných v imunotechnikách jsou IgG (Mr 150 000)
2 těžké + 2 lehké řetězce, spojené SS můstky, char. tvar písmene Y



- **polyklonální protilátky** – NEHOMOGENNÍ směs protilátek různé afinity a specifiity, vytvořené v organismu po vpravení cizorodého imunogenu
 - celá řada determinant na antigenu + složitost imunitního systému (více lymfotických mateř. buněk na jednu determinantu) + individuální odlišná reakce každého jedince
- **monoklonální protilátky** – chemické individuum, všechny molekuly naprosto identické, se stejnou afinitou i specifitou (fúze slezinných buněk imunizovaného zvířete s nádorovými buňkami – vznik hybridomové linie)

imunochemické metody - podstatou je interakce antigen-protilátka *in vitro* za tvorby imunokomplexu **antigen – protilátka – antigen** (dvojvazná protilátka)

- dovolují stanovovat protilátky nebo naopak antigeny
- vysoká specifita interakce, vysoká citlivost
- dělení založeno na tom, zda vzniká precipitát či pouze imunokomplex



imunochemické metody

1) imunoprecipitační metody

1.1) imunoprecipitace a aglutinace v roztoku

1.2) imunoprecipitace v gelu

1.2.1) dvojité imunodifuze

1.2.2) jednoduchá imunodifuze

2) neprecipitační imunometody

ELISA

nekompetitivní

kompetitivní

přímá

nepřímá

1) IMUNOPRECIPITAČNÍ METODY

- využití sekundárního jevu imunoprecipitace (vznik imunokomplexu způsobí precipitaci z roztoku)
- rozpustný imunokomplex je tvořen při jakémkoli poměru koncentrací antigenů a protilátek v roztoku, obvykle má Mr 160 000 – 1 500 000
- imunoprecipitát (mnohem větší) se tvoří **jen při určitém poměru AG-Ig**
- **zóna ekvivalence** – oblast optimálních koncentrací pro tvorbu imunoprecipitátu
- s obvyklým antigenem (každé determinantní místo je jedinečné) budou precipitát tvořit jen polyklonální protilátky
- monoklonální protilátky mohou vytvářet precipitát (větvený řetězec) jen s antigenem, v němž je příslušná determinanta vícekrát
- hapteny nevytvářejí precipitát (malá molekula – málo místa pro vazbu dvou molekul protilátky)
- imunoprecipitace může probíhat buď v roztoku nebo v gelovém prostředí (imunodifuze)

1.1) IMUNOPRECIPITACE A AGLUTINACE V ROZTOKU

- z experimentálního hlediska nejjednodušší způsob sledování imunoreakce
- tvorba nerozpustného precipitátu z rozpustného AG a Ig
- lze sledovat změnou optických vlastností roztoku
- lze kvalitativně posuzovat přítomnost příslušného AG či Ig pouhým zrakem
- kvantitativní stanovení – nefelometrie, turbidimetrie, fluorimetrie (intenzita rozptýleného světla je závislá na koncentraci precipitátu v roztoku a ta je z urč. podmínek úměrná původní konc. sledovaného imunoreaktantu)
- aglutinace principiálně podobná imunoprecipitaci (rozpustná Ig, nerozpustný AG) – vzniká aglutinát
- antigen součástí povrchové struktury buněk, nebo může být účelově navázán na povrch nerozpustné částice
- charakteristické je, že AG se vyskytuje na jedné částici opakovaně mnohokrát – aglutinační reakci lze provést i s monoklonálními protilátkami

1.2) IMUNOPRECIPITACE V GELU

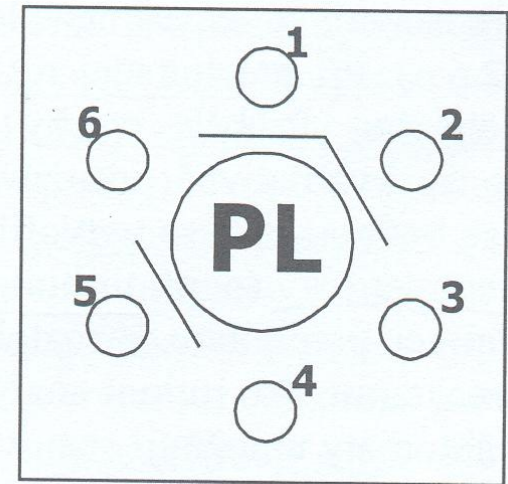
- založeno na difuzi obou nebo jednoho partnera imunoreakce gelovou vrstvou
- vznikají precipitační linie v místech, kde koncentrace reaktantů odpovídají zóně ekvivalence
- někdy se rychlost pohybu zvyšuje vložení elektrického pole
- agar, agarosa
- po odmytí volných imunoreaktantů se někdy imunoprecipitační linie barví
- dělení dle způsobu provedení

IMUNOPRECIPITACE V GELU – ROZDĚLENÍ METOD DLE PROVEDENÍ

- ***dvojitá imunodifuze***
 - do gelu difunduje AG i Ig
 - kvalitativní či semikvantitativní
 - dvojitá radiální imunodifuze
 - imunoelektroforéza
 - protisměrná imunoelektroforéza
- ***jednoduchá imunodifuze***
 - pohybuje se AG, Ig je v gelu homogenně rozptýlena
 - kvantitativní či semikvantitativní
 - jednoduchá radiální imunodifuze
 - elektroimunodifuze
 - dvourozměrná imunoelektroforéza

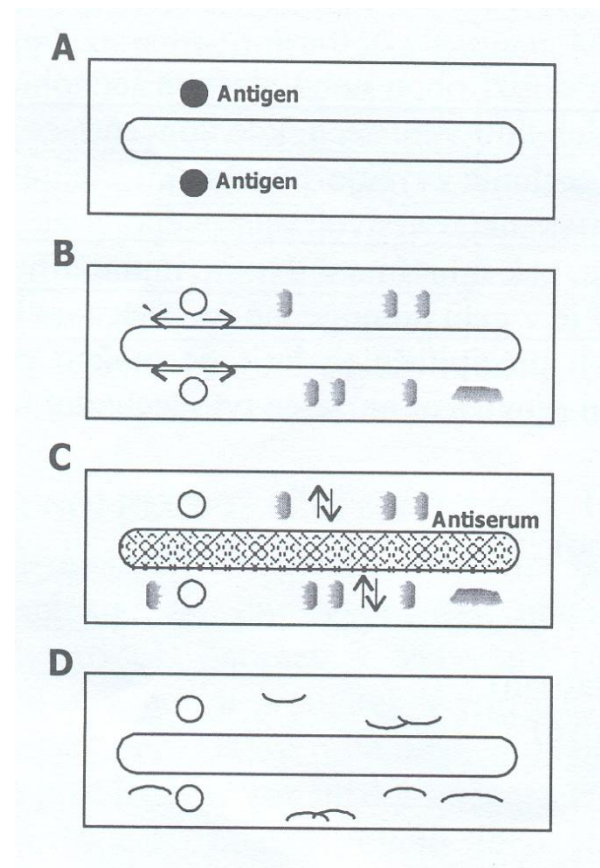
Dvojitá radiální imunodifuze

- AG se pipetuje do jedné a Ig do druhé kruhové jamky vytvořené v gelu
- oba reaktanty radiálně difundují do gelu, vytváří se gradient koncentrace
- po 16-36 hod se mezi oběma jamkami vytvoří charakteristická precipitační linie
- v praxi vhodně použít jednu konc. Ig a různé konc. AG do více jamek (abychom trefili zónu ekvivalence někde v tom gradientu a ne až v jamce (falešně negativní výsledek))
- kvalitativní hodnocení, semikvantitativní (konc. lze odhadnout dle vzdálenosti precipitační linie od příslušné jamky)



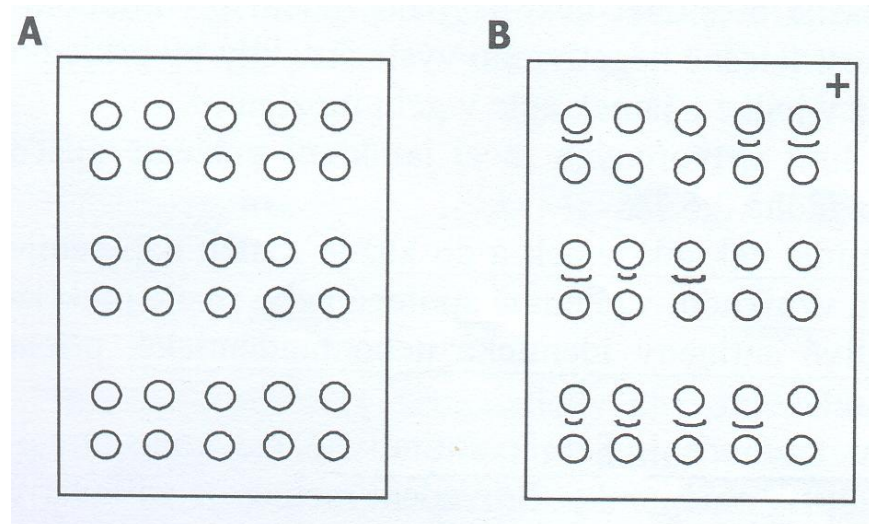
Imunoelektroforéza

- dvě etapy
 - nejprve se rozdělí směs antigenů v gelu elektroforézou dle náboje
 - pak se do žlábků podél rozdělených antigenů nanese směs protilátek
- dvojitá imunodifuze, vytvoří se precipitační linie
- opět časově náročná technika, ale umožňuje současnou detekci více antigenů



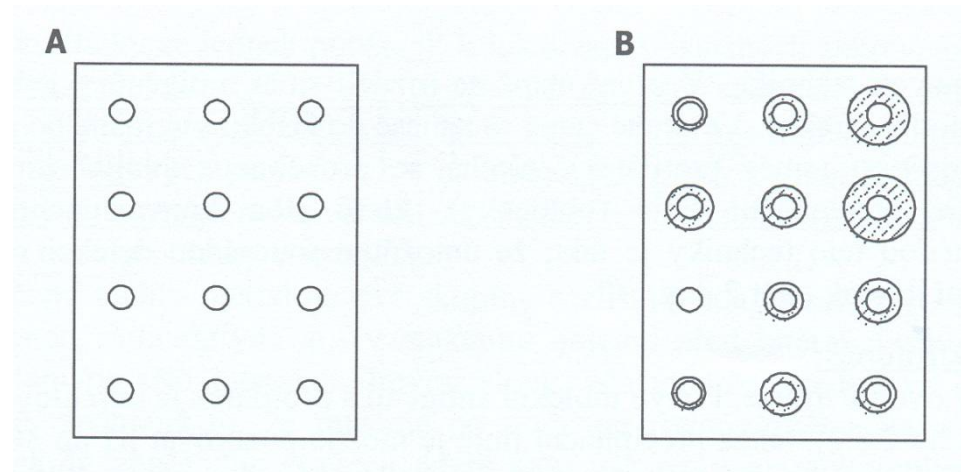
Protisměrná imunoelektroforéza

- obměna metody dvojité difuze, pohyb AG i Ig urychlován el. polem
- precipitační linie už za 30 min.
- problém s nábojem – pracuje se v pH 8,6, kde Ig mají + náboj => tato metoda použitelná jen pro antigeny nesoucí při pH 8,6 záporný náboj



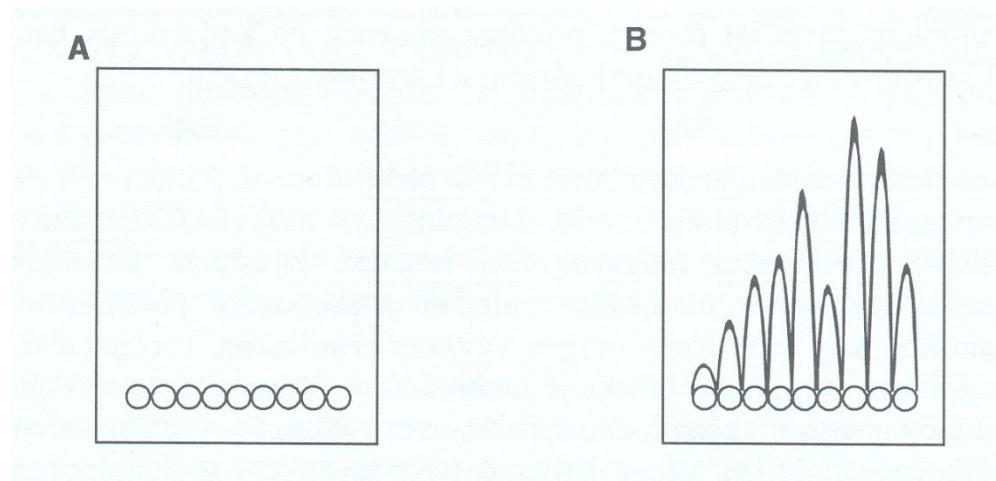
Jednoduchá radiální imunodifuze

- Ig přidáme do roztoku agarosy v pufru, roztok nalejeme na skleněnou desku
- roztok AG se nanáší do vykrojené jamky
- radiální difuze kolem jamky, precipitační prstenec v zóně ekvivalence
- obsah kruhu uvnitř prstence je přímo úměrný koncentraci AG, strmost kalibrační přímky lze ovlivnit koncentrací Ig v gelu



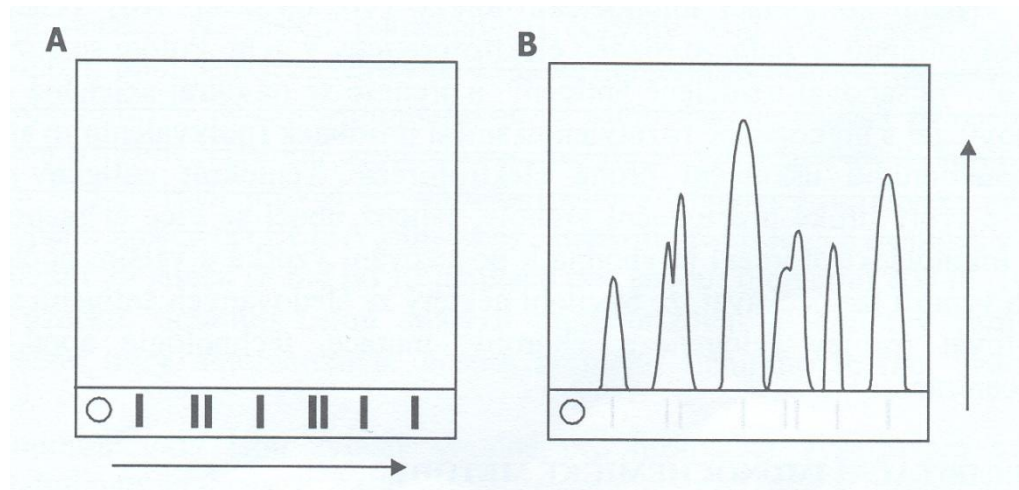
Elektroimunodifuze

- tzv. „raketková technika“
- podstatou je neustálé rozpouštění imunoprecipitátu přebytkem putujícího AG (hnaný el. polem) a tím posouvání precipitační linie ve směru elektromigrace AG až do okamžiku, kdy je všechn AG vyvázan protilátkou
- precipitátem vymezená plocha je úměrná koncentraci antigenu
- cca 30x citlivější než jednoduchá radiální imunodifuze, navíc rychlejší (cca 12 hod)
- problém u AG s velkou molekulovou hmotností nebo s katodickou pohyblivostí



Dvourozměrná imunoelektroforéza

- vlastně kombinace imunoelektroforézy a elektroimunodifuze
- nejprve rozdělíme elektroforeticky směs AG v gelu
- pruh s rozdělenými AG vyřízneme (bez detekce), přeneseme na okraj skleněné desky s agarosou obsahující homogeně rozptýlenou směs protilátek
- druhá elektroforéza ve směru kolmém na původní elektroforézu
- vhodná pro posuzování vzorků s více antigeny – semikvantitativní



2) NEPRECIPITAČNÍ IMUNOMETODY

- detekce nízkých koncentrací AG, které neumožňují vznik imunoprecipitátu
- citlivost stanovení komplexu AG-Ig lze zvýšit navázáním vhodné značky na jednoho z imunoreaktantů ještě před uskutečněním imunoreakce
- takovou vhodnou značkou může být enzym (enzymová imunoanalýza EIA), fluorescenční nebo chemiluminiscenční látka (fluorescenční imunoanalýza FIA), radionuklidy (radioimunoanalýza RIA)
- označené Ig lze použít buď k lokalizaci příslušných AG
 - na elektroforeogramech, resp. na jejich otištěných stopách na membráně (imunoblot)
 - v histologických preparátech a na buněčných stěnách (imunohistochemie, imunocytochemie)
- velmi pestrá škála variant používajících značku ke stanovení AG či Ig v roztoku
- dělení podle toho, zda je celkový signál značky (např. enzymová aktivita, fluorescence aj.) v reakčním objemu před interakcí AG-Ig shodný s celkovým signálem po této interakci (neboli zda interakce ovlivňuje celkovou intenzitu signálu značky)
- jednoznačně nejpoužívanější značkou jsou ENZYM – bezpečné, citlivé, jednoduché stanovení – měření změny absorbance (fluorescence, chemiluminiscence) reakčního roztoku, kterou způsobil vznikající produkt enzymové reakce
 - peroxidasa, alkalická fosfatasa

NEPRECIPITAČNÍ IMUNOMETODY - ROZDĚLENÍ

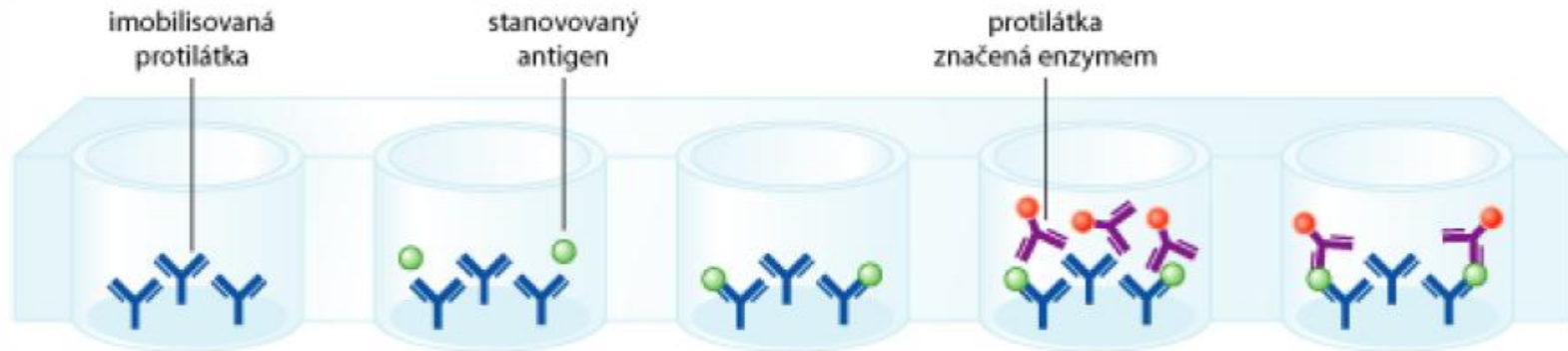
- **homogenní imunoanalýza** - navázání Ig na AG OVLIVNÍ intenzitu signálu, není důvod pro separaci, protože změna intenzity signálu může být monitorována v celém objemu reakce
 - jednodušší a rychlejší varianta, ale vhodné jen některé fluorescenční značky (velmi drahé), enzymová varianta velmi zřídka
- **heterogenní imunoanalýza** - interakce NEOVLIVŇUJE intenzitu signálu, po dosažení rovnovážného stavu imunoreakce musíme separovat molekuly značeného reagens, které jsou vázány v imunokomplexu od molekul značeného reagens, které zůstaly volně v roztoku, intenzitu signálu pak měříme v jedné z těchto frakcí
 - lze sestavit pro každou dvojici Ig-AG, proto daleko častěji používáno
 - problém separace řešen chromatograficky, srážením imunokomplexů, sorbcí haptenu apod., nejčastěji primární zakotvení neznačeného imunoreaktantu na pevnou fázi a po imunoreakci prostě volný značený imunoreaktant odlejeme

ELISA

- **Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay**
- hodnota koncentrace analytu se určuje z kalibrační křivky sestavené s pomocí standardů
- obrovská citlivost umožňuje stanovit analyt v množství 10^{-9} až 10^{-12} gramu
- nejčastější nosič je stěna jamky mikrotitračních destiček (polystyren) – větší soubor vzorků, miniaturizace analýzy, automatizace
- velmi vhodné pro screening stovek vzorků denně, málo vhodné pro ojedinělé případy (vždy potřeba kalibrace)
- dvě základní provedení
 - nekompetitivní
 - kompetitivní
 - přímé
 - nepřímé

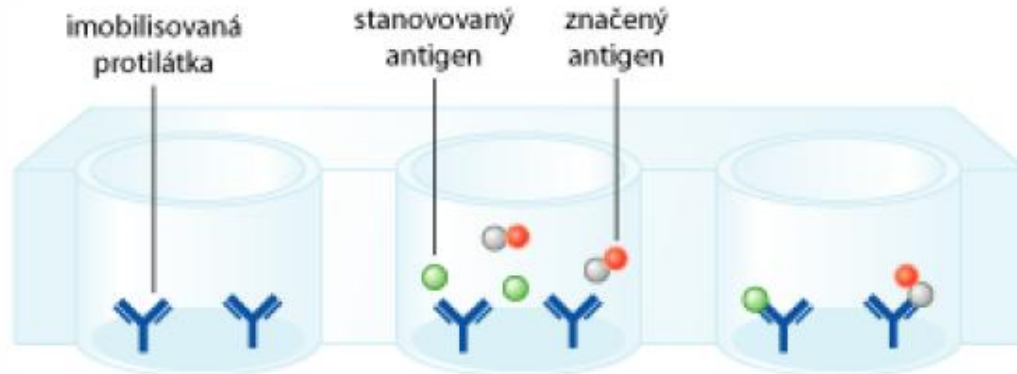
Nekompetitivní enzymová analýza (sendvičová)

- Ig zakotvená na pevný nosič interaguje s AG v analyzovaném vzorku
- po ustavení rovnováhy se systém promyje a na protilátkou zachycený AG se naváže další Ig (značená)
- po promytí se měří enzymová aktivita zachycená zprostředkovaně na pevné fázi
- lze pouze u AG, jejichž molekula umožňuje vazbu dvou a více molekul protilátek (nelze pro hapteny)



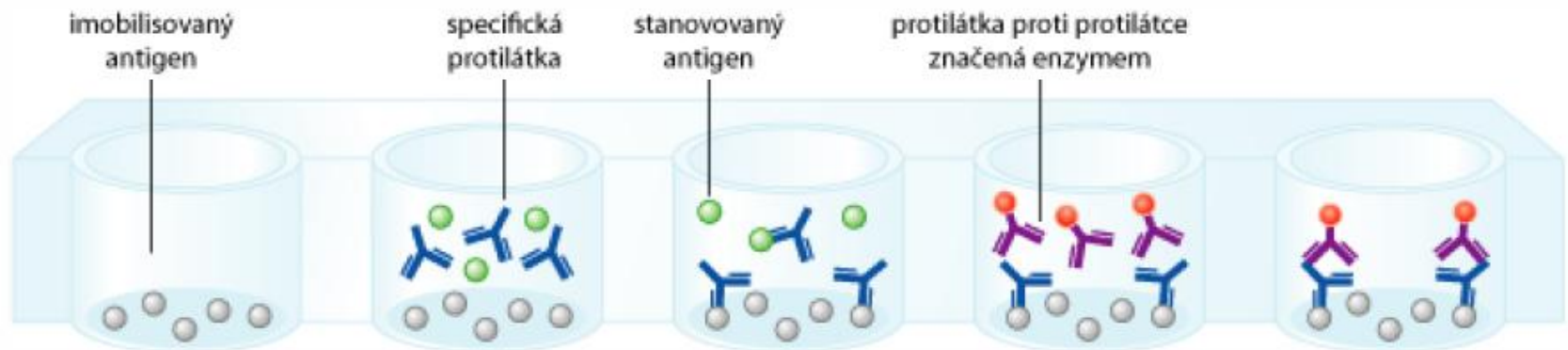
Přímá kompetitivní enzymová analýza

- Ig zakotvená na pevný nosič interaguje současně s AG ve vzorku a se značeným AG
- značený AG tedy soutěží (kompetuje) s neznačeným AG o omezené množství vazebných míst na protilátkách
- po ustavení rovnováhy se systém promyje a měří se aktivita zachycená na pevné fázi
- čím více AG obsahuje analyzovaný vzorek, tím nižší enz. aktivita bude naměřena
- vhodná metoda pro stanovení haptenu



Nepřímá kompetitivní enzymová analýza

- první část analýzy je kompetitivní – AG zakotvený na pevný nosič soutěží se stanovovaným nezakotveným AG ve vzorku o omezený počet vazebných míst na molekulách protilátky přidávané do systému v roztoku
- čím více AG v analyzovaném vzorku, tím méně Ig se naváže na zakotvený AG a naopak
- po ustavení rovnováhy a promytí se zjišťuje množství takto zprostředkovaně zakotvené protilátky v další fázi (nekompetitivní)
- používá se značená Ig proti protilátce aplikované v první části analýzy
- lze i pro hapteny
- výhodou proti přímé ELISA je universálnost použití značené protilátky při stanovení jakéhokoli analytu



DALŠÍ IMUNOCHEMICKÉ METODY

- imunoafinitní chromatografie – navázání Ig na nosič – vzniká imunosorbent vhodný pro izolaci příslušného AG vsádkově či na koloně
 - uvolnění specificky navázaného AG nespecificky (změna pH apod.) – po regeneraci lze kolonu použít znovu
- protilátkové elektrody – biosenzory – vazbou AG na imobilizovanou Ig se změní určitý fyzikální parametr materiálu, na němž je Ig ukotvena – převedeno na měřitelný signál