Imunochemické metody
1. část

Nepihlášený host (1)

Tato přednáška je autorským dílem, které je chráněno autorským právem VŠCHT Praha.
Některé části přednášky vycházejí z autorských děl třetích osob, která VŠCHT Praha užívá pro účely výuky svých studentů na základě zákonné licence.
Obsah této přednášky je určen výlučně pro výuku studentů VŠCHT Praha.
Obsah přednášky nesmí být rozmnožován, zaznamenáván, napodobován, publikován ani jinak rozšiřován bez písemného souhlasu majitele autorských práv.
Autorské právo neporušuje ten student VŠCHT Praha, který výlučně pro svou osobní potřebu zhotoví záznam či napodobeninu díla nebo užije dílo jiným způsobem, který dle zákona autorské právo neporušuje.

© VŠCHT Praha 2022

Imunochemické metody
- teoretická část, základní pojmy

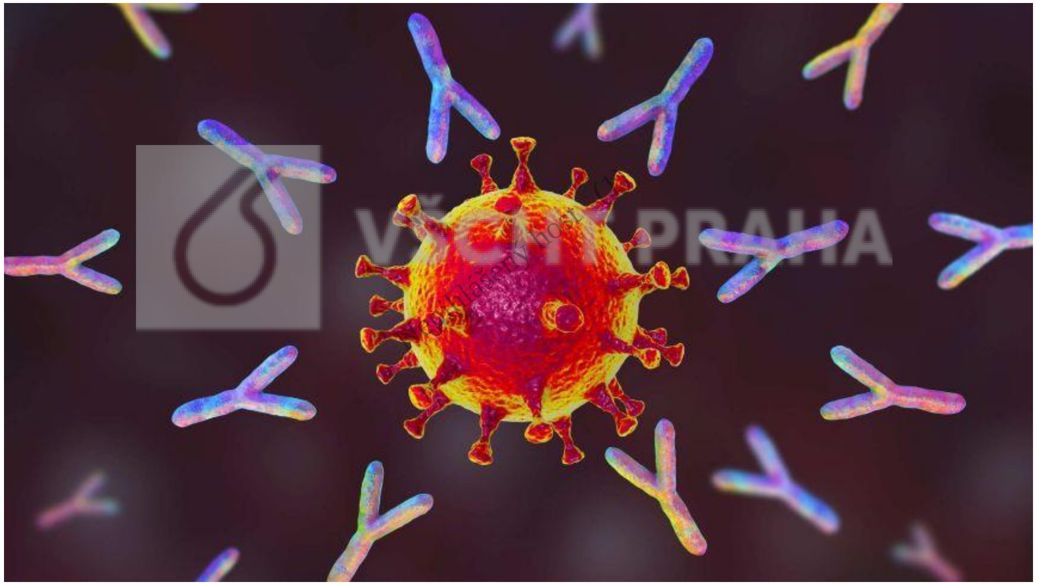
založeny na specifické interakci ***protilátky*** (*in vitro* produkt imunitního systému obratlovců) a ***antigenu***

↓

IMUNOKOMPLEX

VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

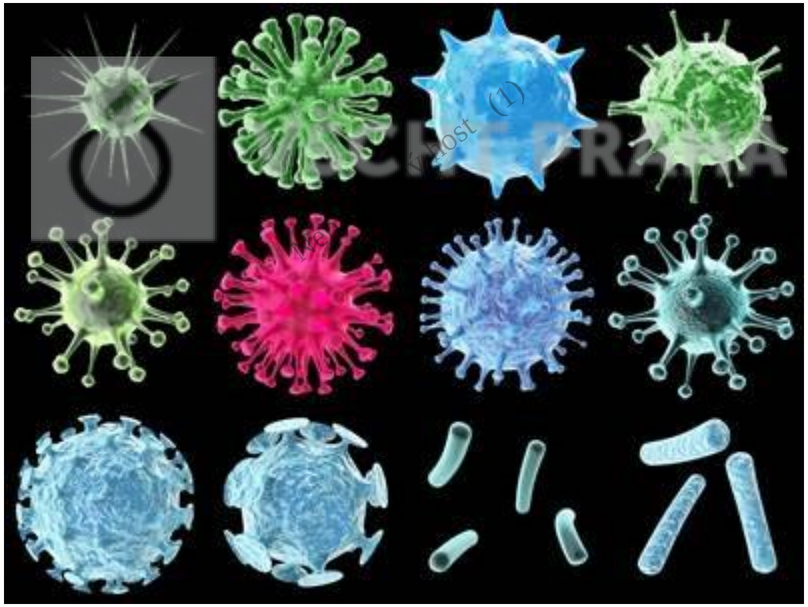
Imunochemické metody
-antigen, protilátka



https://www.abc.net.au/news/health/2020-08-31/antibody-treatments-explained-covid-19-coronavirus/12607778

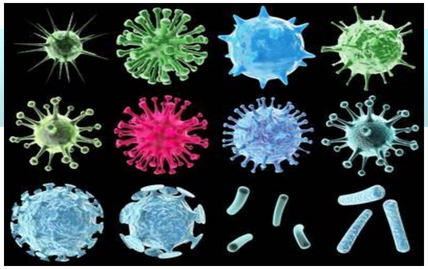
SARS-CoV-2 virus

ANTIGEN



https://www.biocompare.com/

Antigen × Epitop



https://www.biocompare.com/

ANTIGEN

DEFINICE:

Struktura *(buňka nebo její část, protein, DNA nebo nízkomolekulární látka)*, **která prostřednictvím nekovalentních vazeb interaguje se specifickou protilátkou (SPECIFICKÝM PRODUKTEM IMUNITNÍHO SYSTÉMU).**

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

CIZÍ antigeny
(Heteroantigen, exoantigen)
není součástí organismu

příklad: bakterie, viry, …

VLASTNÍ antigeny
(Autoantigen)
vlastní buňky a molekuly

VIDEO: https://www.youtube.com/watch?v=TYz6TmI_WLQ

Antigen × Epitop

Chemická struktura antigenu: velké molekuly proteinů
polysacharidy
glykoproteiny, nukleoproteiny

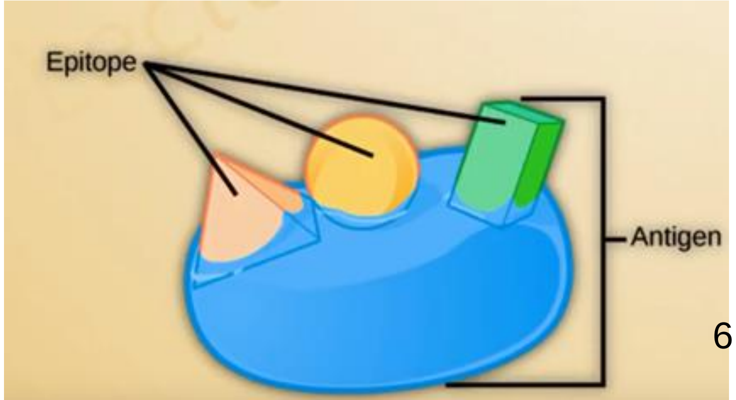
Příklad: ***protein*** *–protilátka se neváže na celou molekulu proteinu*
ALE
pouze na část proteinu, který je tvořen několika aminokyselinami

= EPITOP (antigenní determinanta)

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

DEFINICE: *Epitopy jsou oblasti nebo místa na antigenu, které jsou rozpoznávány imunitním systémem (ve výsledku se vážou na specifické protilátky).*

- každý antigen obsahuje několik epitopů
- sekvenční, konformační epitop



https://www.youtube.com/watch?v=TYz6TmI_WLQ

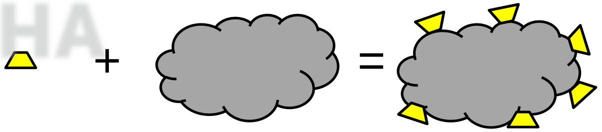
Kompletní antigen × Nekompletní antigen

Imunogen = kompletní antigen

Struktura, kterou organismus rozpoznává jako cizí a reaguje na její přítomnost tím, že **proti ní syntetizuje specifické protilátky.**

VŠCHT PRAHA
Nepihlasený host (1)

Hapten = nekompletní antigen



Nízkomolekulární látky,

které **nevyvolají v organizmu tvorbu protilátek**,

ale jsou **schopny se specificky vázat** na protilátky.

ALE jsou-li kovalentně navázány na vysokomolekulární nosič a vpraveny do organismu, jsou schopny vyvolat imunitní odpověď (tvorbu protilátek).

→ nosič je imunogenní
→ hapten je epitopem

Vlastnosti dobrého imunogenu

1. Cizorodost

Čím více je molekula cizí pro organizmus, tím větší je její imunogenicita.

2. Velikost

Čím větší je molekulová hmotnost, tím vyšší je imunogenicita.
(velikost molekuly >10 kDa)

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

3. Komplexita (chemická i strukturní)

Molekuly složité povahy („chemicky pestré“) jsou více imunogenní.

4. Degradovatelnost

Vysoce stabilní a nerozložitelné látky nejsou imunogenní.

výborné – korpuskulární organismy (mikroorganismy – bakterie, atd..)
dobré – bílkoviny, glykolipidy
špatné – nukleové kyseliny, polysacharidy, malé molekuly (<5 kDa)

VIDEO: https://www.youtube.com/watch?v=_8klM011790

Antigen - souhrn

ANTIGEN

- **struktura (buňka nebo její část, protein, DNA nebo nízkomolekulární látka), která prostřednictvím nekovalentních vazeb interaguje se specifickou protilátkou.** Antigeny obsahují obvykle několik oblastí, na něž se váží jednotlivé protilátky; hovoříme o antigenních determinantách neboli epitopech. Antigen, který vyvolává v organismu tvorbu protilátek, se nazývá imunogen.

IMUNOGEN

- **struktura, kterou organismus rozpoznává jako cizí a reaguje na její přítomnost tím, že proti ní syntetizuje specifické protilátky.** Jako imunogenny působí především v organismu cizí buňky, nadmolekulové komplexy (viry) a bílkoviny, ale i bílkoviny jiného jedince téhož biologického druhu; proto je při transplantacích nutno imunitní systém tlumit tzv. imunosupresivy. Nízkomolekulární látky působí jako imunogeny pouze jsou-li připojeny na vysokomolekulární nosič (hapteny). Organismus vyrábí protilátky i proti některým strukturám jemu vlastním; tento typ protilátek může způsobit některá vážná onemocnění (autoimunitní choroby).

HAPTEN

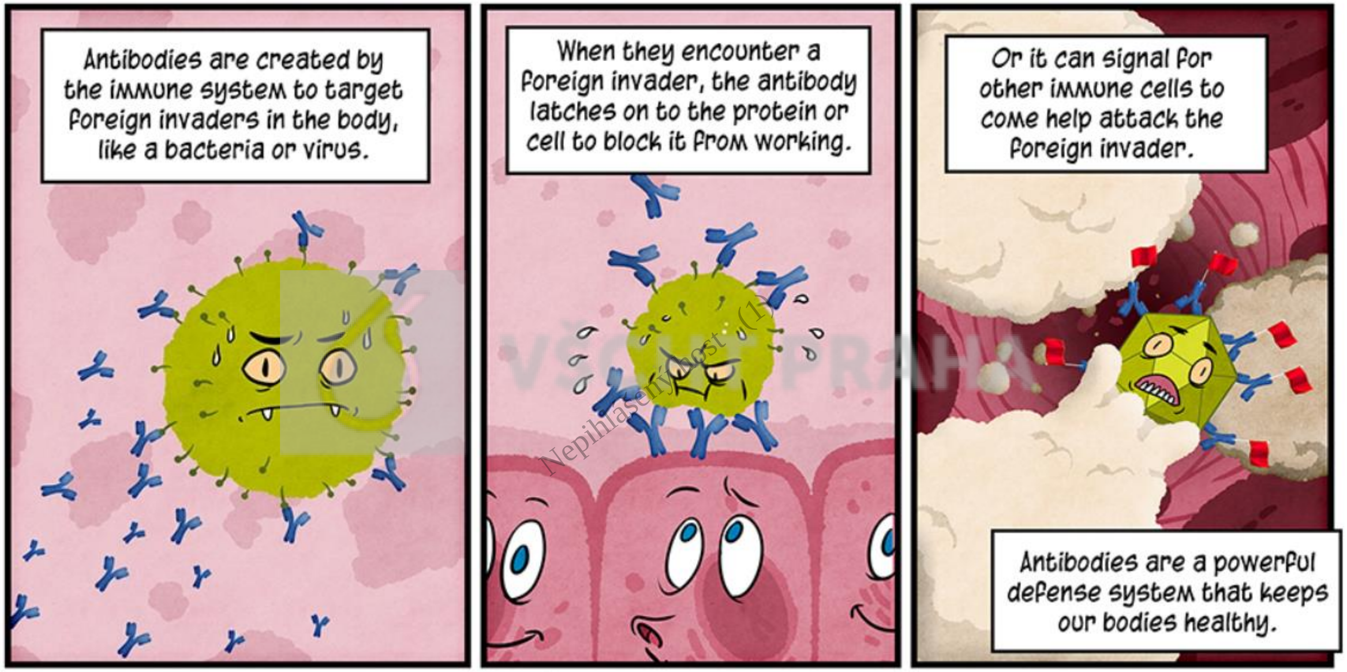
- **nízkomolekulární látky** (dinitrofenol, pyridoxin apod.), které samy **nejsou imunogenní** (nevyvolávají tvorbu protilátek), ale jsou-li kovalentně navázány na vysokomolekulární nosič (zpravidla bílkovinu) a vpraveny do organismu, jsou schopny vyvolat imunitní odpověď (tvorbu protilátek). Takto vzniklé protilátky pak hapten váží i v případě, že je volný. Protilátek proti haptenům se využívá zejména v klinické biochemii pro stanovení celé řady nízkomolekulárních látek (hormony štítné žlázy, léčiva apod.).

VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host

PROTILÁTKA

https://www.biocompare.com/

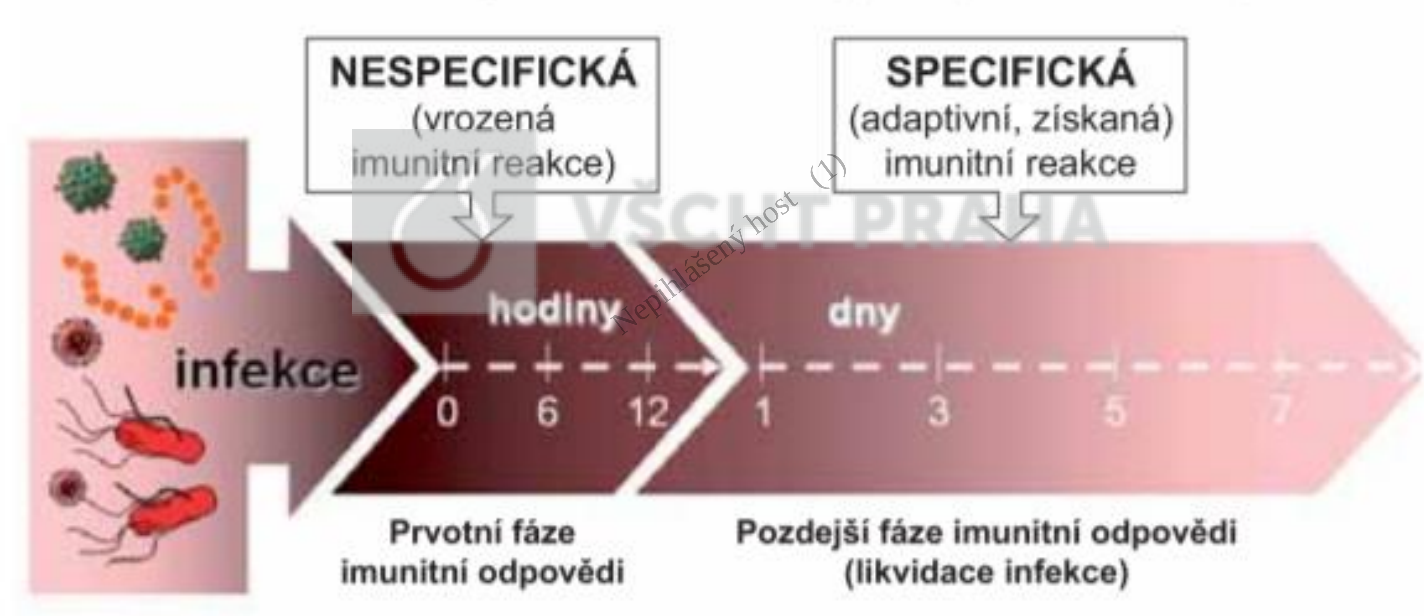
in vitro produkt imunitního systému obratlovců



https://www.gene.com/stories/the-antibody

Protilátky jsou silný obranný systém, který udržuje naše tělo zdravé.

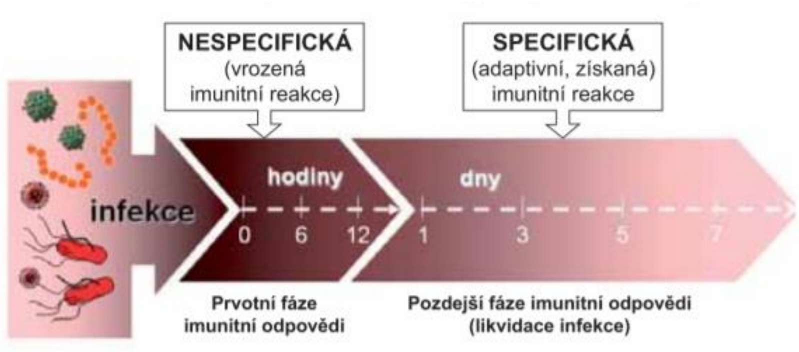
Časová posloupnost vrozených (nespecifických) a adaptivních (specifických) obranných reakcí organismu.



VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Zdroje obrázků: Vrána A., Fellnerová I., Vránová J.: Imunologie a imunomodulační terapie. CZ.1.07/2.3.00/09.0219, http://cit.vfu.cz/fyziolmed; https://www.damynakole.cz/2017/09/znate-imunomodulatory-jejich-cas-prave-prichazi/

Imunitní systém



	VROZENÝ	ZÍSKANÝ
Příklady	„bariéry“ (kůže, povrch sliznice) peristaltika kyselé pH ……..	**PROTILÁTKY** T-lymfocyty B-lymfocyty ……….
Čas potřebný k reakci	ihned (vrozená obrana hostitele)	několik hodin/dní
Specifita	nespecifická odpověď – likvidace všech cizích struktur	specifický např. k mikroorganismům nebo proteinům, proti kterým byl vytvořen

Zdroje obrázků: Vrána A., Fellnerová I., Vránová J.: Imunologie a imunomodulační terapie. CZ.1.07/2.3.00/09.0219, http://cit.vfu.cz/fyziolmed; https://www.damynakole.cz/2017/09/znate-imunomodulatory-jejich-cas-prave-prichazi/

Imunitní systém

Buňky a molekuly imunitního systému

	VROZENÝ	ZÍSKANÝ
BUŇKY	MYELOIDNÍ LINIE •Makrofágy •Dendritické buňky •Neutrofily •Eosinofily •Basofily •Žírné buňky •…	LYMFOIDNÍ LINIE • B lymfocyty • T lymfocyty • NK buňky • …
MOLEKULY (rozpustné a membránové = receptory)	• Enzymy • Anti-mikrobiální peptidy • Produkty odvozené kyslíky • Komplement (9 sérových proteinů) • Toll Like Receptors (TLR) • Interferony • …	• Protilátky • Cytokiny • Chemokiny • Receptory protilátek • Receptory cytokinů • Receptory chemokinů • …

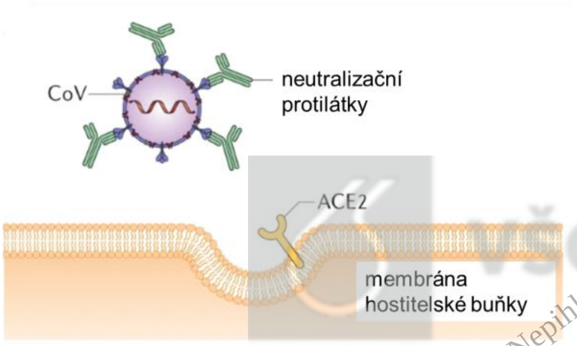
VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Protilátka - funkce

obrana proti bakteriím, virům, parazitům, toxinům

Hlavní mechanismy působení protilátek v organismu:

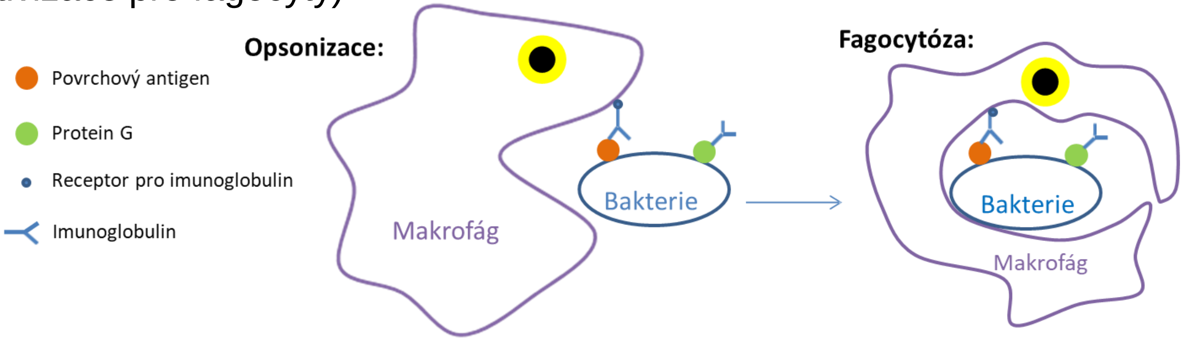
- **neutralizace** (navázání protilátky na „kritické“ epitopy nutné pro adhezi mikroorganismů k buňkám nebo proniknutí do nich)



Protilátky se váží RBD doménu odpovědnou za vazbu viru na receptor buněk hostitele → zabrání vazbě viru na svůj vstupní receptor ACE2.

Iwasaki, A., Yang, Y. The potential danger of suboptimal antibody responses in COVID-19. *Nat Rev Immunol* **20,** 339–341 (2020). https://doi.org/10.1038/s41577-020-0321-6

- **opsonizace** (navázání protilátky a určitých složek komplementu – označení mikroorganismu a atraktivizace pro fagocyty)



- **aktivace komplementu**

Protilátky = Imunoglobuliny (Ig)

- patří do skupiny glykoproteinů známých jako globuliny a hrají hlavní roli v imunitním systému
- specificky váží antigen, na jehož podnět byly vytvořeny

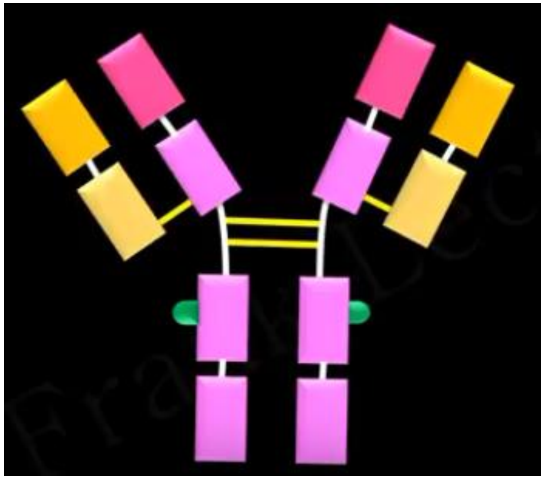
VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

- volné (sekretované)
- produkt plazmatických buněk (terminálního diferenciačního stadia B lymfocytů)

- základní struktura všech protilátek je stejná (tvar písmena Y).

VIDEO: https://www.youtube.com/watch?v=NHtl8HnhsqE&t=117s

Základní struktura protilátky



https://www.youtube.com/watch?v=NHtl8HnhsqE&t=117s

- čtyři polypeptidové řetězce
  - dva identické těžké řetězce (**H řetězce**)
  - dva identické lehké řetězce (**L řetězce**)

- každý ***řetězec L*** je spojen ***s řetězcem H*** **disulfidovou vazbou**

- ***H řetězce*** jsou navzájem spojeny dvěma disulfidovými vazbami ve střední oblasti.

- střední oblast – PANTOVÁ („hinge“, otočná) oblast – má značnou flexibilitu

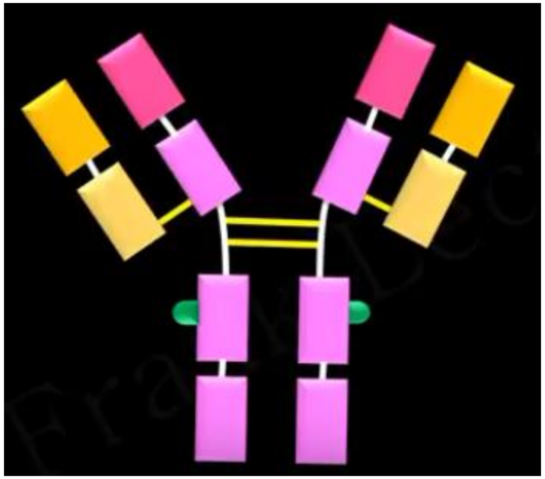
- oblast ***Fc, F(ab)***$_2$

- ke každému těžkému polypeptidovému řetězci jsou připojeny krátké **sacharidové řetězce**

VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host

Protilátka

Základní struktura protilátky



https://www.youtube.com/watch?v=NHtl8HnhsqE&t=117s

- čtyři polypeptidové řetězce

  - dva identické těžké řetězce (**H řetězce**)

  okolo 50-70 kDa

  440 aminokyselin

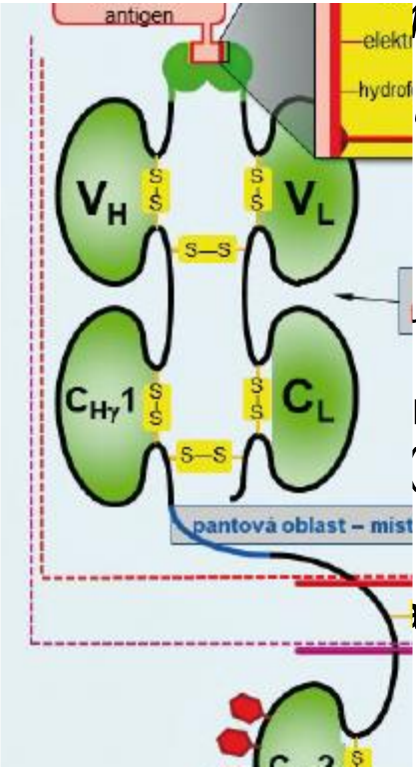
  ů savčích imunoglobulinových těžkých řetězců (α, δ, ε, γ, μ)

  (gama), IgM (mu), IgA (alfa), IgD (delta), IgE (epsilon)

  ují další třídy Ig**Y** (ptáci, obratlovci), Ig**W** (paryby), Ig**X** (obojživelníci)

  na protilátek používaných v imunochemických metodách jsou (Mr = cca 150 000 Da)

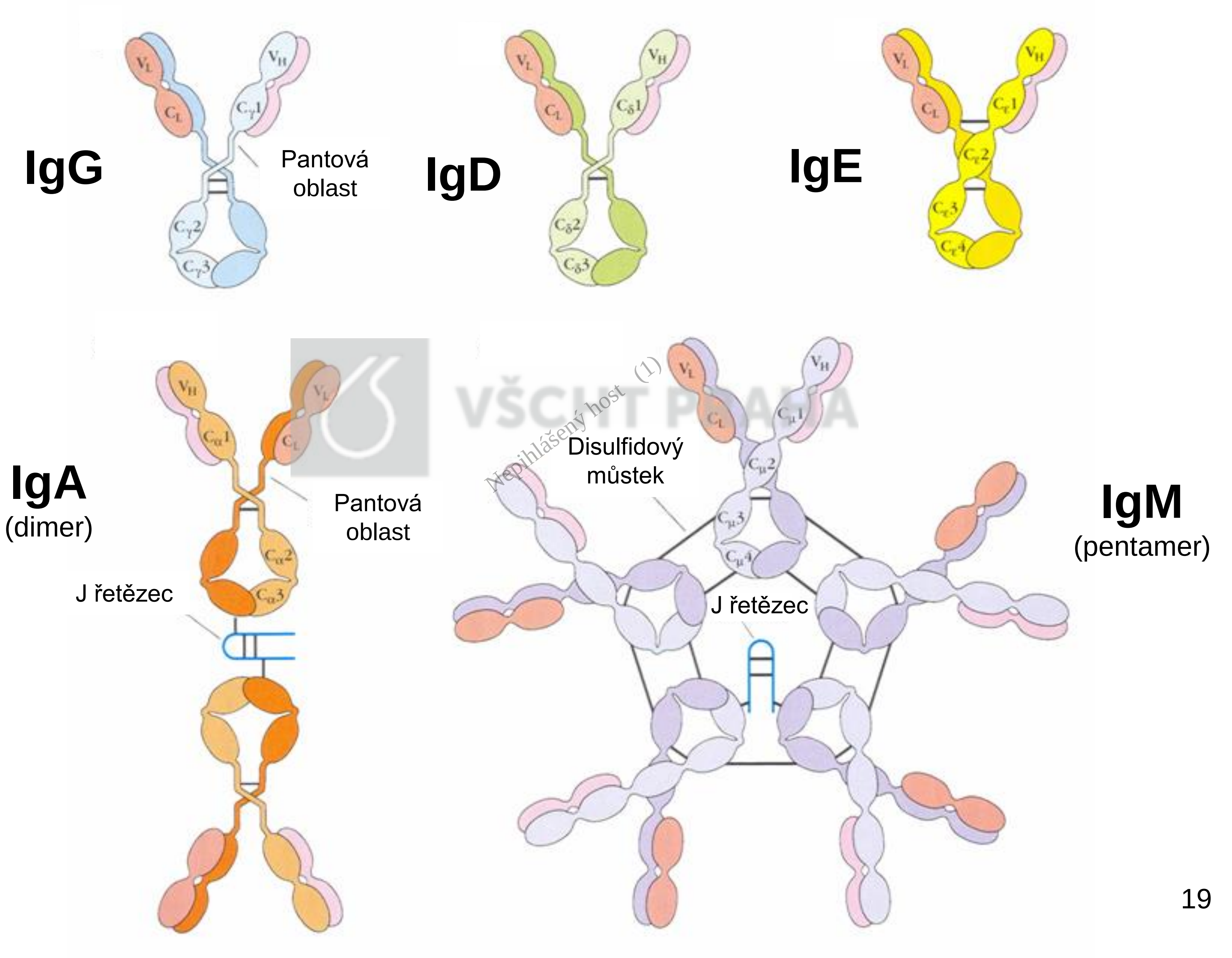
  abilní a konstantní části řetězce



Jílek, P. Imunologie, Grada, 2019.

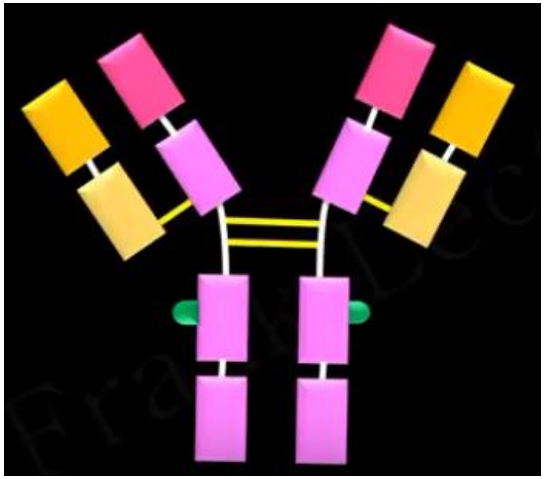
VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

Protilátka – TŘÍDY PROTILÁTEK



VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Základní struktura protilátky



https://www.youtube.com/watch?v=NHtl8HnhsqE&t=117s

- čtyři polypeptidové řetězce

  - dva identické těžké řetězce (**H řetězce**)

    okolo 50-70 kDa

    okolo 440 aminokyselin

    pět typů savčích imunoglobulinových těžkých řetězců (α, δ, ε, γ, μ)

  - dva identické lehké řetězce (**L řetězce**)

    okolo 25 kDa

    okolo 220 aminokyselin

    dva typy savčích imunoglobulinových lehkých řetězců (kappa, lambda)

- **variabilní a konstantní části řetězce**

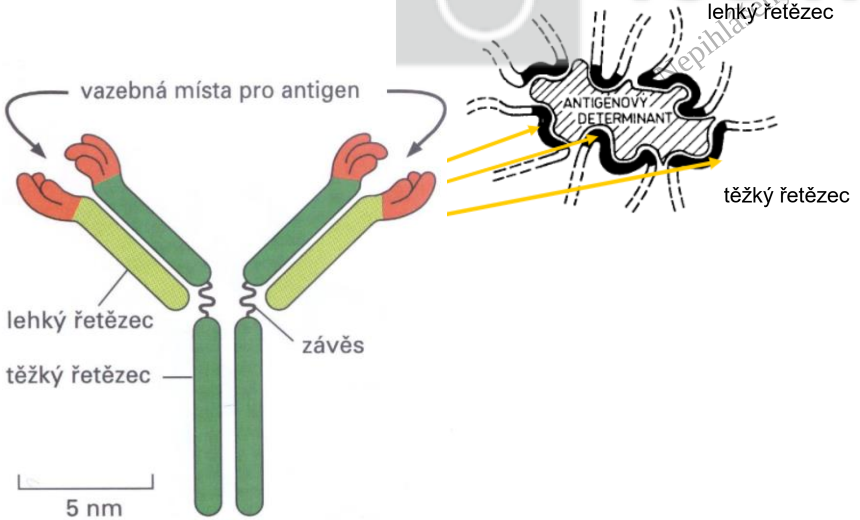
VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

Základní struktura protilátky

aminokyseliny N-terminální oblasti lehkých i těžkých řetězců

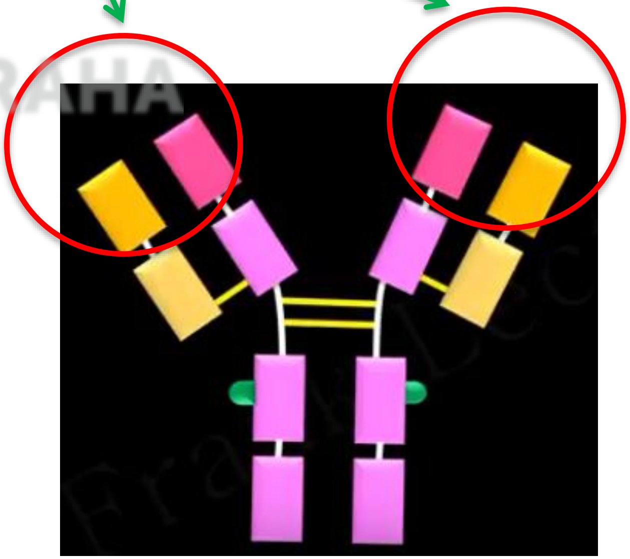
= vazebné místo pro antigen (paratop)

Hypervariabilní úseky L a H řetězce



dutina nebo vypouklina mezi hypervariabilními úseky L a H je vazebné místo protilátky

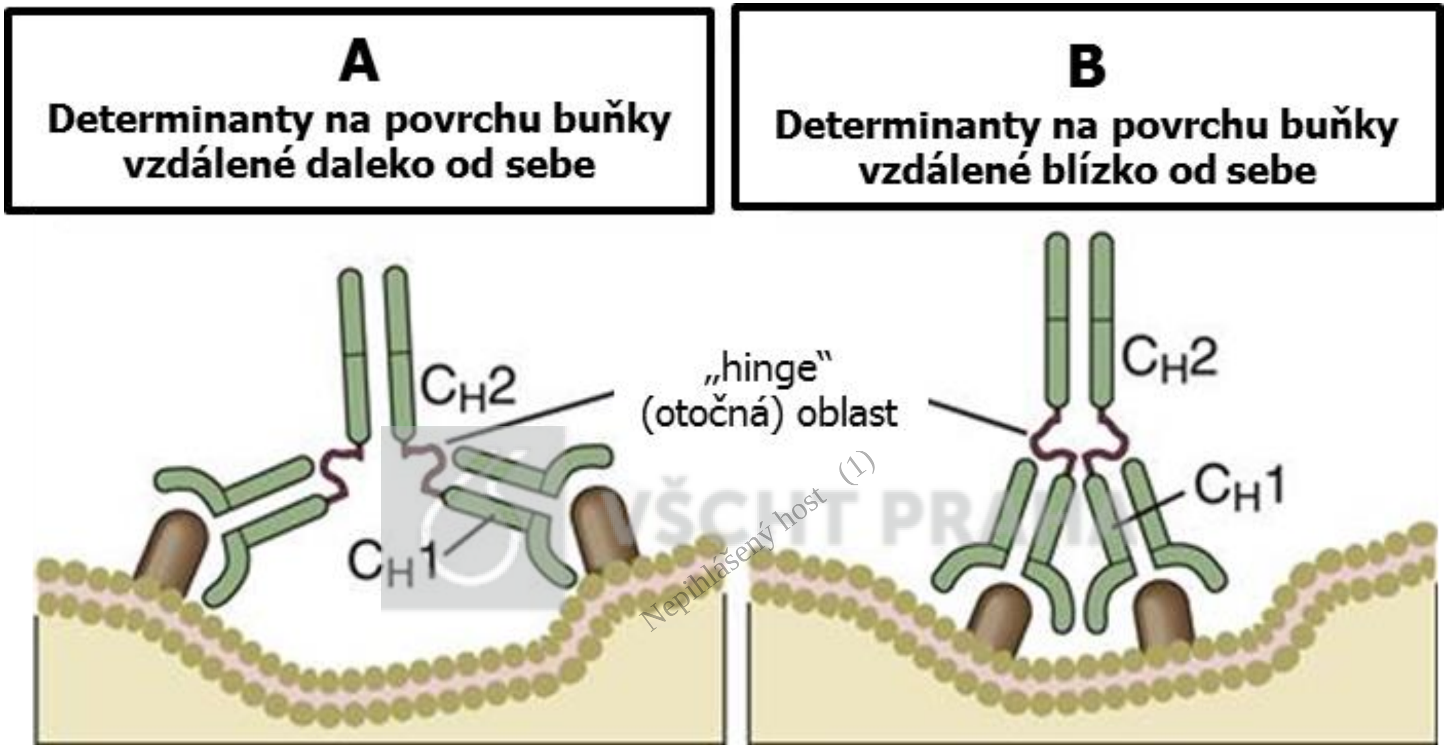
https://docplayer.cz/70478883-Protilatky-imunoglobuliny.html



https://www.youtube.com/watch?v=NHtl8HnhsqE&t=117s

VŠCHT PRAHA
nepihlašený host (1)

Protilátka



VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

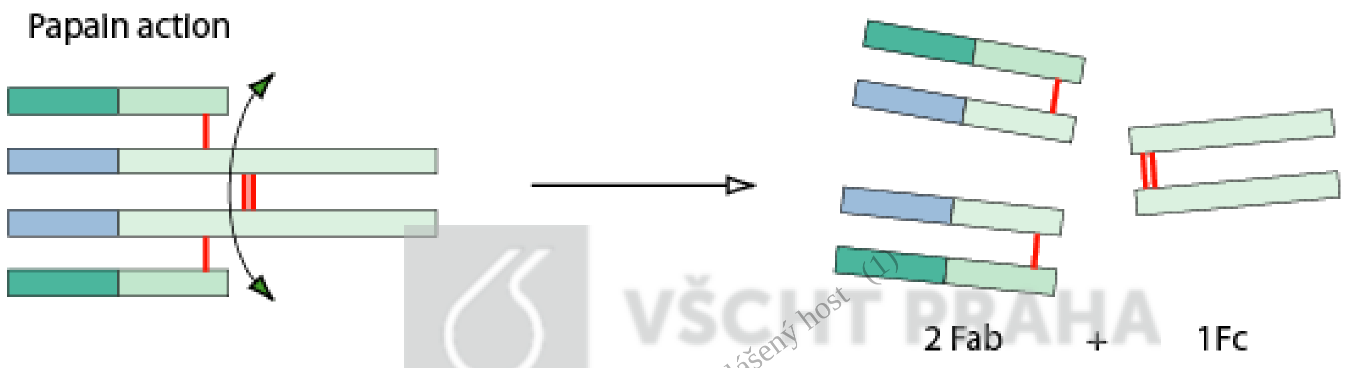
Ukázka flexibility molekuly protilátky - dvě místa vázající antigen se mohou současně vázat na dvě determinanty oddělené různými vzdálenostmi (převzato a upraveno od Flaherty, 2012).

A)molekula protilátky je znázorněna při vazbě na daleko od sebe vzdálené determinanty na povrchu buňky;
B) stejná protilátka je vázána na dvě determinanty, které jsou blízko sebe.

Protilátka

Enzymatická fragmentace IgG

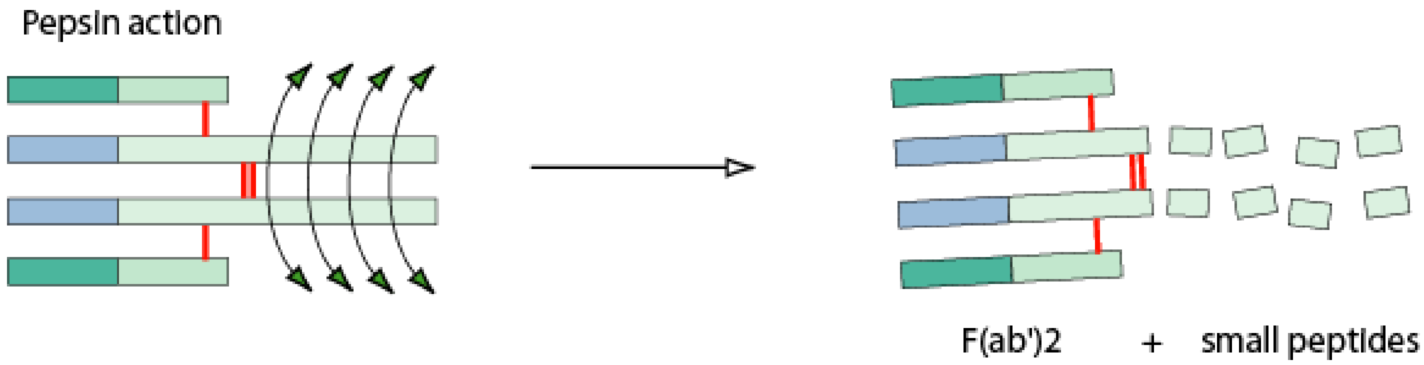
Papain (rostlinný proteolytický enzym - papája)



Daussant J. :& Desvaux F.X.: VŠCHT Praha, 2007.

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Pepsin (zvířecí proteolytický enzym)



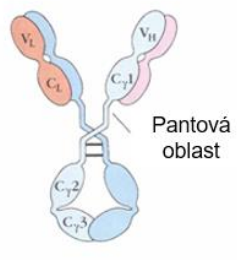
Daussant J. :& Desvaux F.X.: VŠCHT Praha, 2007.

Protilátka – TŘÍDY PROTILÁTEK

Podle stavby konstantní části těžkého řetězce a zastoupení sacharidů dělení:

•IgG

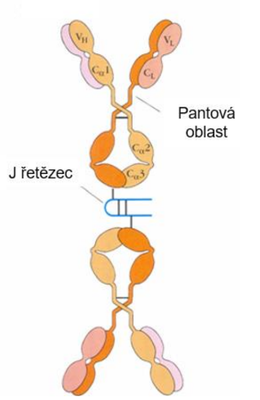
- 2–3 % sacharidů, **75 % všech Ig v séru**
- 4 podtřídy (IgG1–4), které se vzájemně liší svými vlastnostmi, vazbou na komplement a časem, po který jsou aktivní
- pouze jako monomery (150 kDa)
- **sekundární imunitní reakce** – opakované setkání s antigenem
- neutralizace toxinů, opsonizace, aktivace komplementu



VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

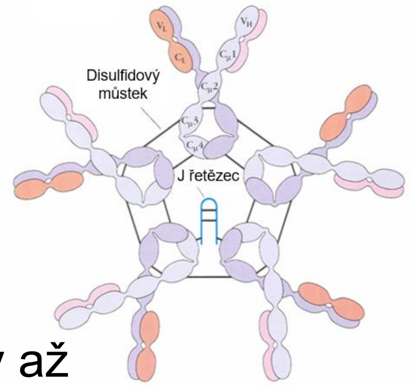
•IgA

- 5–8 % sacharidů, **slizniční protilátky**
- monomery (v séru; opsonizace) nebo dimery spojené J-řetězcem (ve sliznicích; ochrana sliznic před mikroorganismy)
- Monomer (160 kDa) a dimer (350 kDa)
- IgA nemá schopnost aktivovat komplement



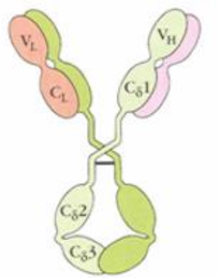
Protilátka – TŘÍDY PROTILÁTEK

- **IgM**
  - 12 % sacharidů, 10 % všech protilátek v séru
  - lokalizace také na povrchu B buněk
  - pentamer (cca 950 kDa), jednotlivé podjednotky spojeny do kruhu cystinovými můstky a J řetězcem
  - receptor pro antigen, aktivace komplementu
  - **vytvářeny jako první Ig** (pozitivní průkaz IgM proti antigenu poukazuje na **akutní infekci**)
  - vhodný pro aglutinace – IgM váže hodně antigenů (teoreticky až 10, obvykle cca 5) a proto snadno tvoří aglutináty



VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

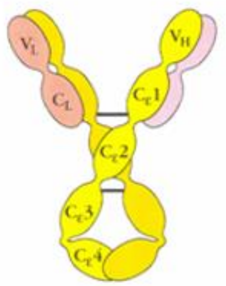
- **IgD**
  - 9–14 % sacharidů, zastoupen relativně málo, nízké koncentrace v séru
  - monomer (180 kDa)
  - slabá afinita k antigenům
  - lokalizován také na povrchu B-buněk (receptor pro antigen)



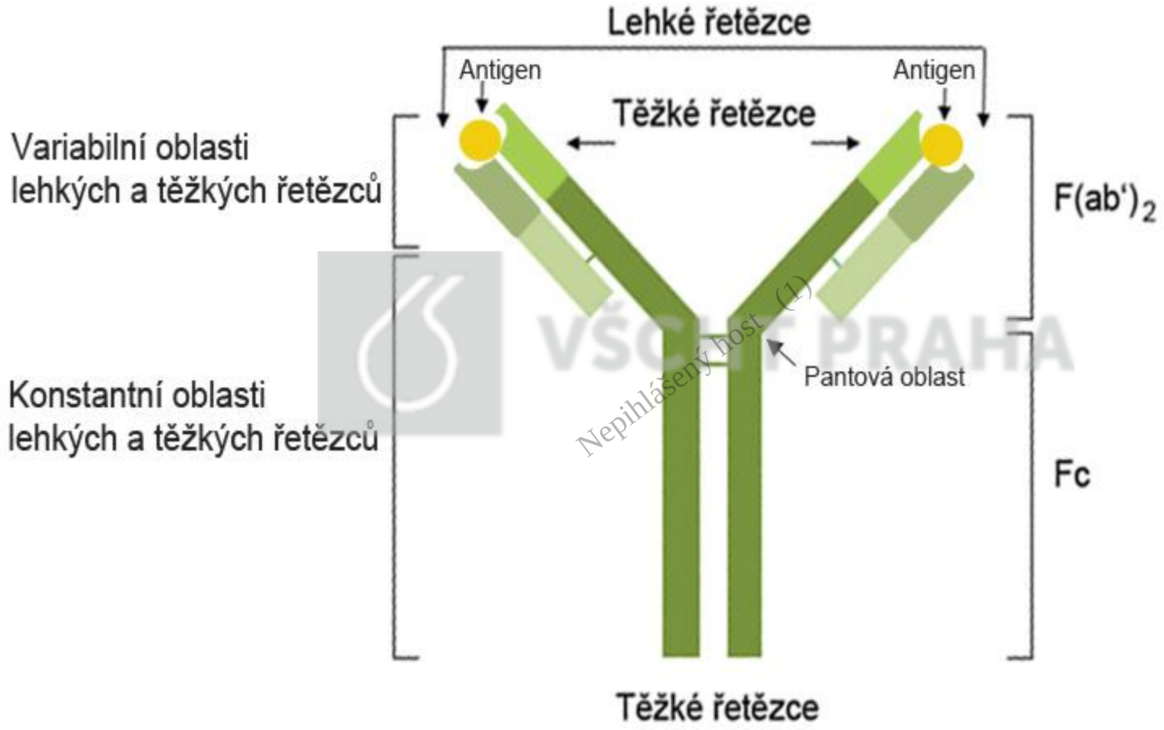
Protilátka – TŘÍDY PROTILÁTEK

- **IgE**
  - 12 % sacharidů, nejnižší sérová koncentrace (u zdravých jedinců)
  - monomer (190 kDa)
  - výskyt: slezina, mandle, mukózní membrána plic a GIT
  - funkce: ochrana proti parazitům na sliznicích (stimuluje procesy k vypuzení - *mediátory, vazodilatace, vykašlání, vykýchání, zvýšení peristaltiky střev, průjem*)
  - **hlavní příčina alergických reakcí** (uvolňuje mediátory zánětu (histamin, serotonin, prostaglandiny, leukotrieny))

VŠCHT PRAHA
Nepihlašený host (1)



Protilátka - souhrn

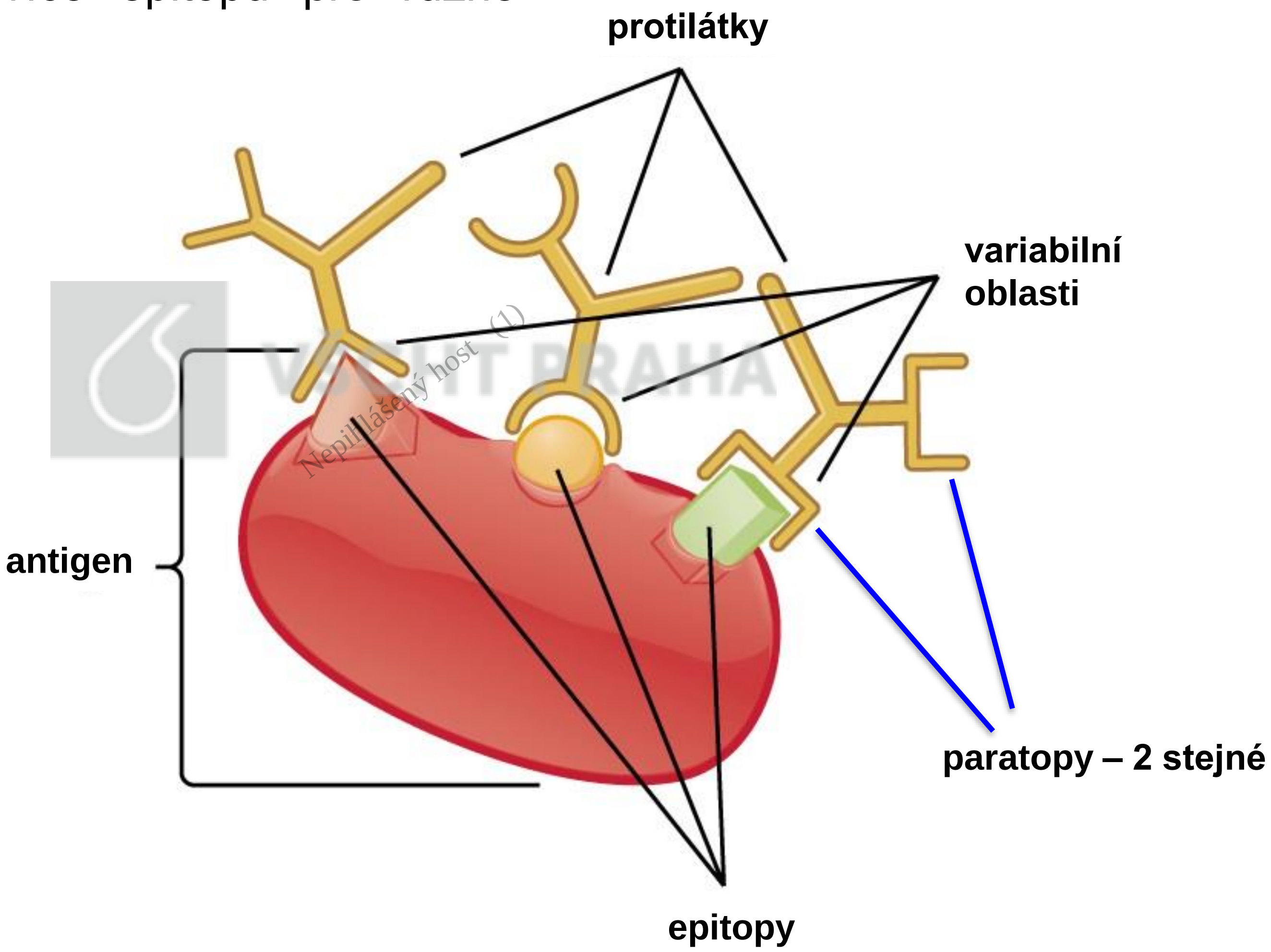


https://labguide.cz/protilatky/

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Protilátka - souhrn

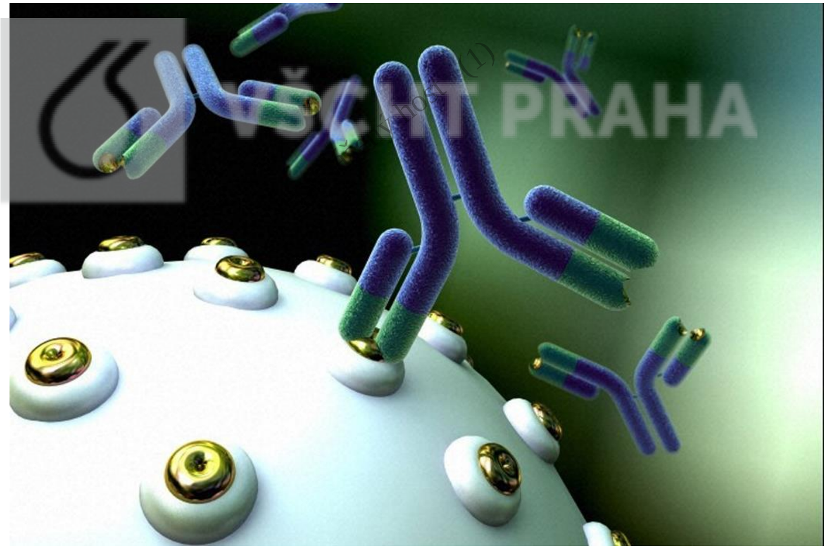
Protilátka se váže **paratopem** na specifickou oblast na antigenu zvaném **epitop**. Jeden antigen může mít více epitopů pro různé specifické protilátky.



VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/polyclonal-and-monoclonal-antibody-production/

IMUNOKOMPLEX



Anna Tanczos, Wellcome Images.

VIDEO: https://www.youtube.com/watch?v=E6bWCz2Mq6A

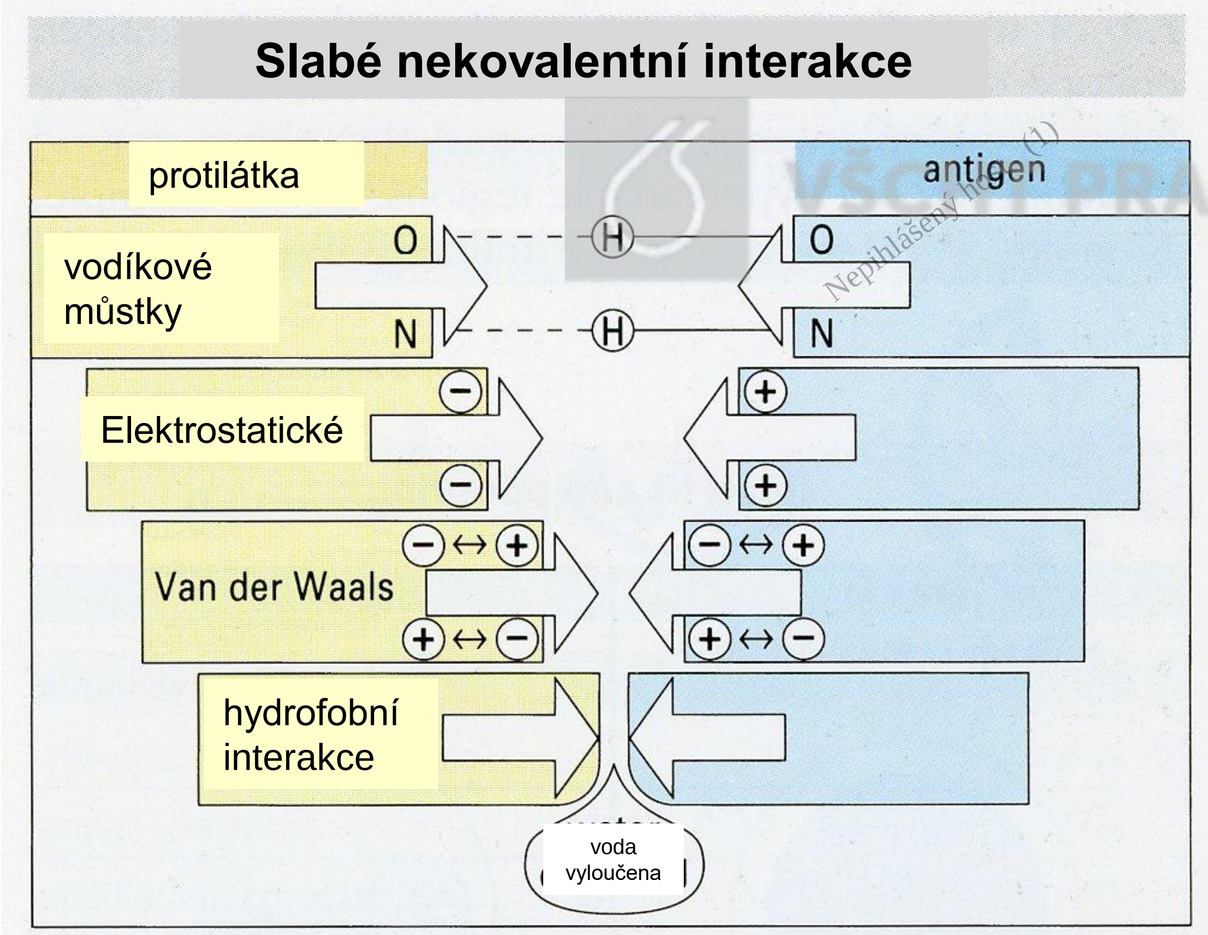
Fyzikálně-chemický základ reakce antigenu a protilátky

Interakce:
- Specifická
- Reversibilní → rovnovážná reakce
- Zahrnuje paratop (Ab) a epitop (Ag)
- Nekovalentní, součet slabých vazebných interakcí

Síla interakce je popsána afinitní konstantou

$$Ab + Ag \rightleftharpoons AbAg$$

$$K = \frac{[AbAg]}{[Ab][Ag]}$$



Sdílení vodíku mezi dvěma elektronegativními atomy

Mezi dvěma opačně nabitými skupinami

Interakce mezi elektronovými oblaky (oscilační dipóly)

Mezi dvěma nepolárními hydrofobními skupinami, které vylučují vodu

Afinita, Avidita

síla, s jakou se protilátka váže na antigenní determinanty (epitopy)

Afinita

Síla interakce mezi *jedním vazebným místem protilátky* (monovalentní paratop) *a jedním epitopem*. Jedná se o kvantitativní měřítko vazebné síly.

Nepihlášený host (1)

Avidita

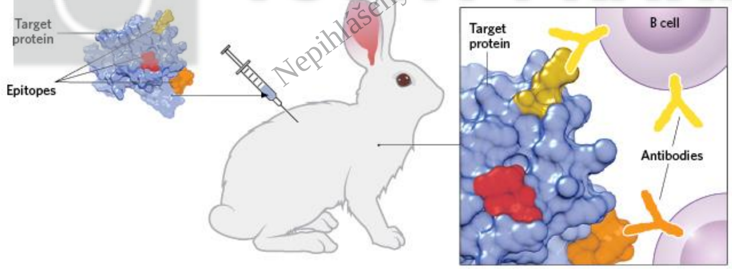
Celková síla vazby vyplývající z interakcí mezi *více vazebnými místy protilátky* (polyvalentní Ab) a *množstvím epitopů*.

Avidita vzrůstá s afinitou jednoho vazebného místa pro jeden antigen a s počtem simultánně se uplatňujících vazebných míst.

Pentamer IgM může mít nízkou afinitu k antigenu, ale 10 vazebných míst zaručuje vysokou aviditu.

PRODUKCE PROTILÁTEK

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)



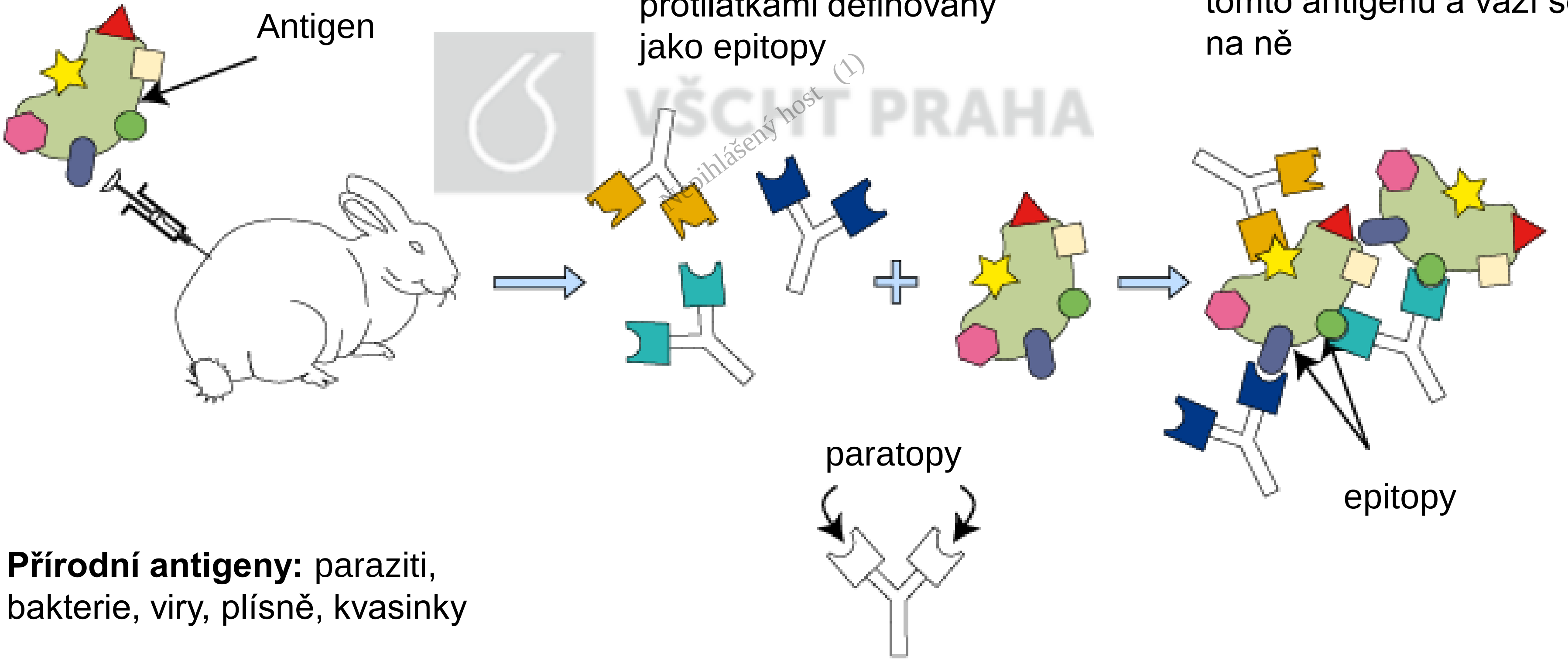
https://www.youtube.com/watch?v=_65_8BX8L-k

Imunizace kompletním antigenem

1. Imunizace zvířete antigenem s různými strukturními motivy…

2. ... vede k produkci souboru protilátek namířených proti některým z těchto motivů, které jsou těmito protilátkami definovány jako epitopy

3. Tyto protilátky, pokud jsou smíchány s původním antigenem, rozpoznávají epitopy na tomto antigenu a váží se na ně



Přírodní antigeny: paraziti, bakterie, viry, plísně, kvasinky

VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

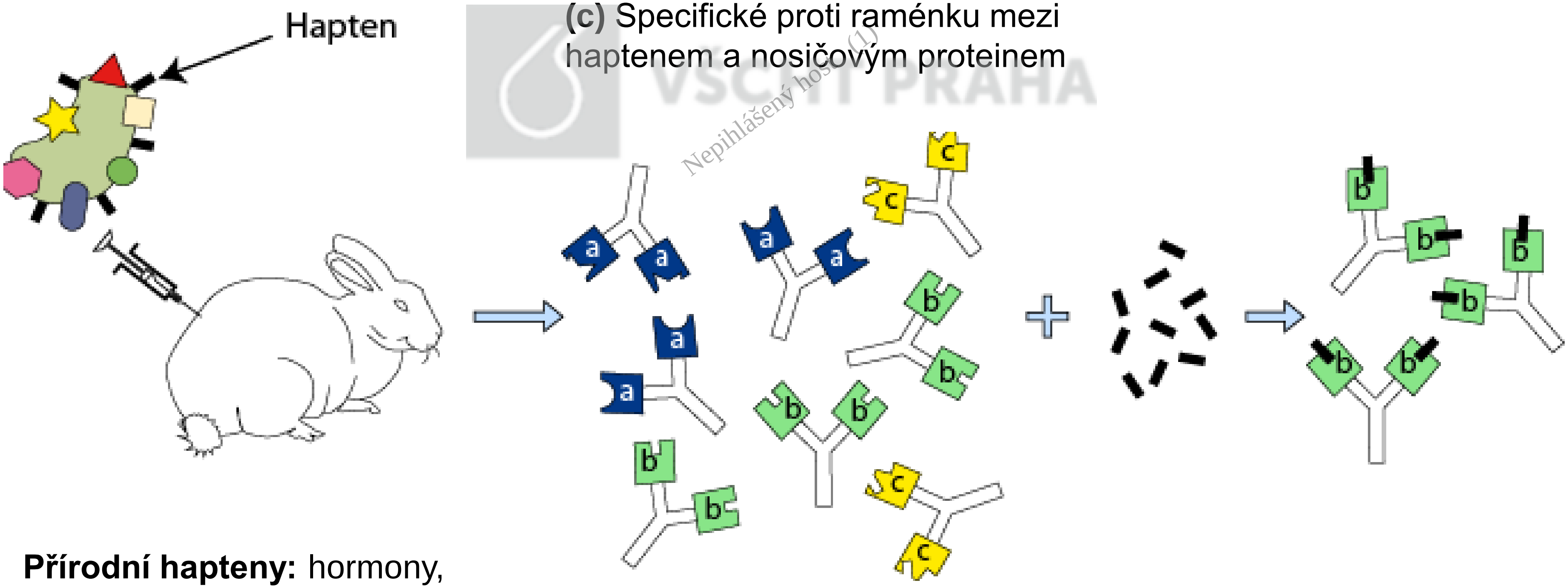
ZDORJE: Daussant 07: INTRODUCTION TO IMMUNOCHEMICAL TECHNIQUES FOR MEDICAL DIAGNOSIS, FOOD QUALITY CONTROL AND ENVIRONMENTAL TESTING

Imunizace nekompletním antigenem

❶ Hapten (neimunogenní) musí být nejprve navázán na nosičový protein (imunogenní)

❷ Imunizace s tímto novým antigenem vede k produkci 3 typů protilátek:
(a) Specifické proti místům (epitopům) na nosičovém proteinu
(b) Specifické proti haptenu
(c) Specifické proti raménku mezi haptenem a nosičovým proteinem

❸ volný hapten se váže na jedno z vazebných míst na protilátce, která se vytvořila proti haptenu



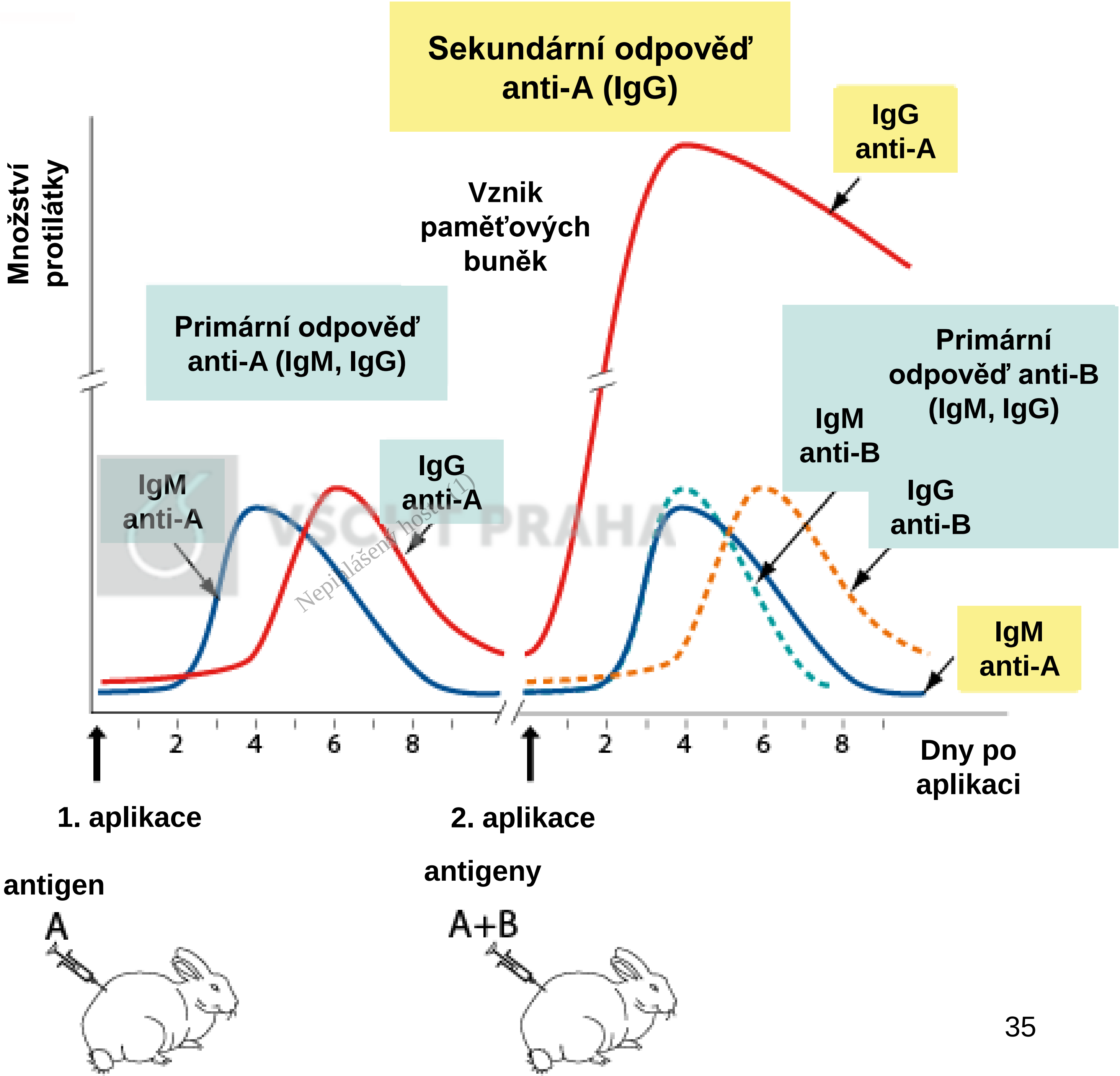
VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Přírodní hapteny: hormony, toxiny, pesticidy, nízkomolekulární peptidy

ZDORJE: Daussant 07: INTRODUCTION TO IMMUNOCHEMICAL TECHNIQUES FOR MEDICAL DIAGNOSIS, FOOD QUALITY CONTROL AND ENVIRONMENTAL TESTING

Kinetika imunitní odpovědi

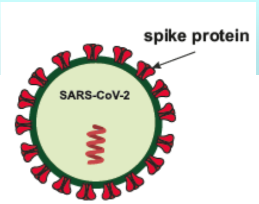
- Primární a sekundární imunitní odpověď



Nepihlášený host (1)

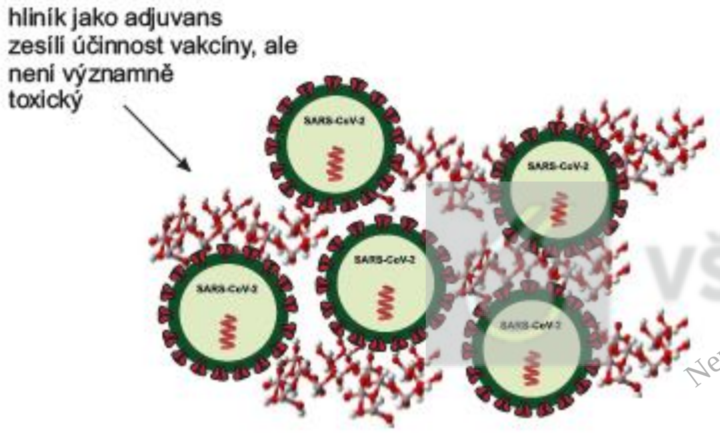
ZDORJE: Daussant 07: INTRODUCTION TO IMMUNOCHEMICAL TECHNIQUES FOR MEDICAL DIAGNOSIS, FOOD QUALITY CONTROL AND ENVIRONMENTAL TESTING

Produkce protilátek

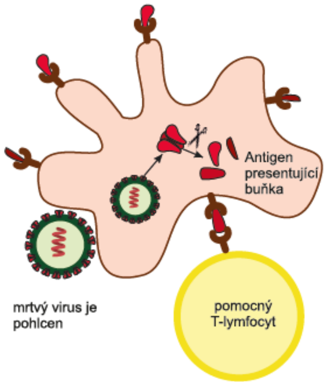


RŮZNÉ PŘÍSTUPY PRO PŘÍPRAVU VAKCÍN

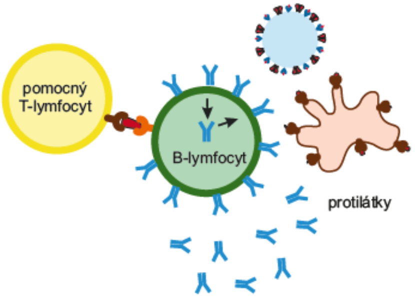
1. Namnožení a umrtvení viru



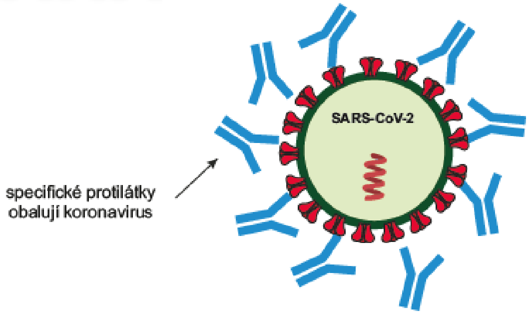
2. Rozpoznání patogenu



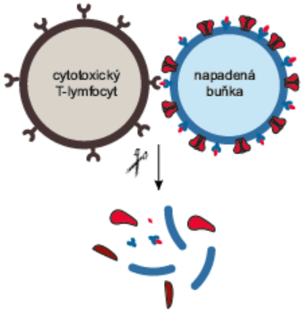
3. Tvorba protilátek



4. Obrana proti viru

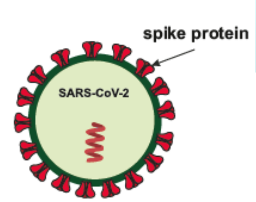


5. Zneškodnění napadených buněk



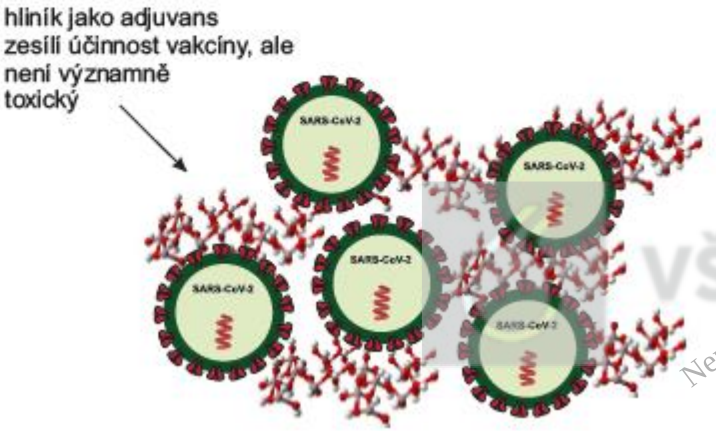
VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Produkce protilátek

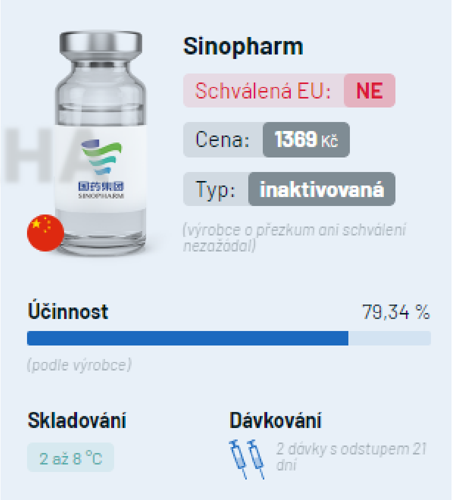


RŮZNÉ PŘÍSTUPY PRO PŘÍPRAVU VAKCÍN

1. Namnožení a umrtvení viru

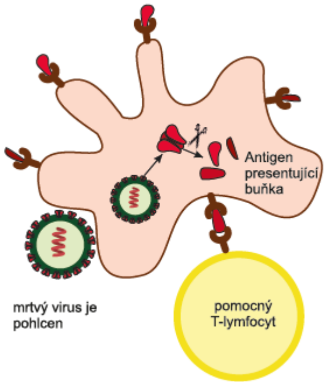


VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

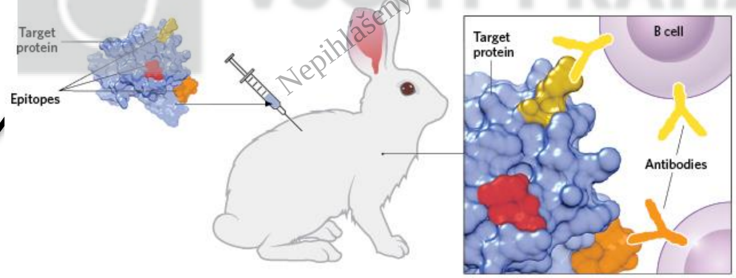


https://zpravy.aktualne.cz/zahranici/devet-koronavirovych-vakcin-v-prehlednem-srovnani/r~7955250e81ad11eba22aac1f6b220ee8/; 25.4.2021

2. Rozpoznání patogenu



PRODUKCE PROTILÁTEK



https://www.youtube.com/watch?v=_65_8BX8L-k

Polyklonální protilátky

Monoklonální protilátky

Rekombinantní protilátky

VIDEO: https://www.youtube.com/watch?v=_65_8BX8L-k

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Produkce protilátek

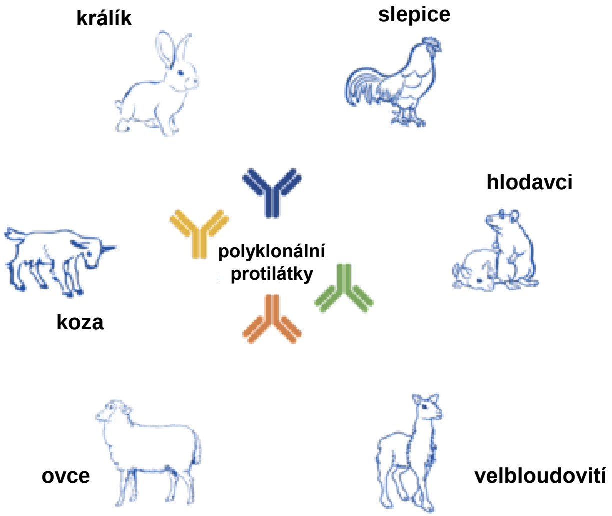
Polyklonální protilátky

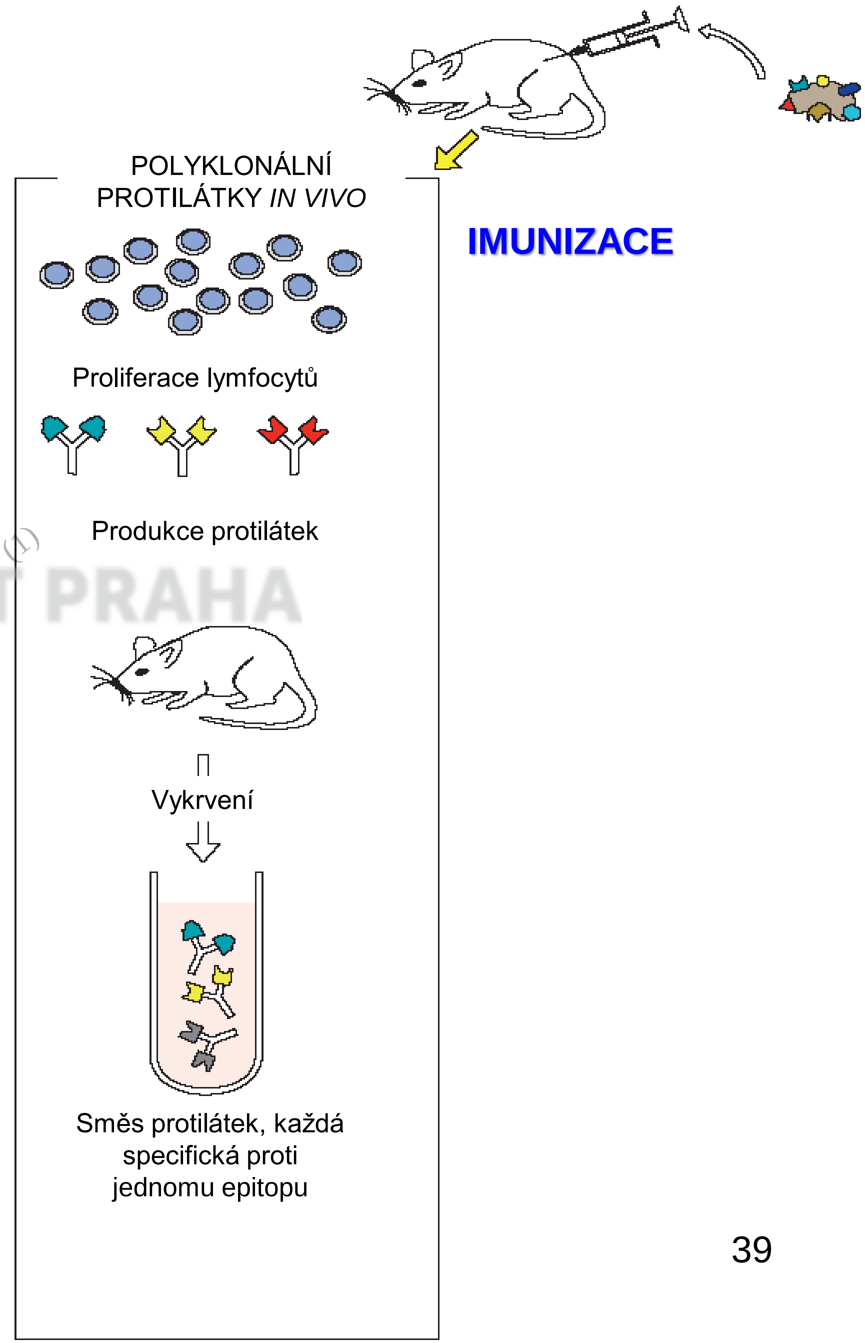
z více klonů B buněk

heterogenní směs protilátek, z nichž každá rozpoznává odlišný epitop na stejném antigenu

antisérum (protilátky ve zvířecím séru)

VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)





ZDORJE: https://www.proteogenix.science/scientific-corner/antibody-production/polyclonal-antibody-production-processes/; Daussant 07: INTRODUCTION TO IMMUNOCHEMICAL TECHNIQUES FOR MEDICAL DIAGNOSIS, FOOD QUALITY CONTROL AND ENVIRONMENTAL TESTING

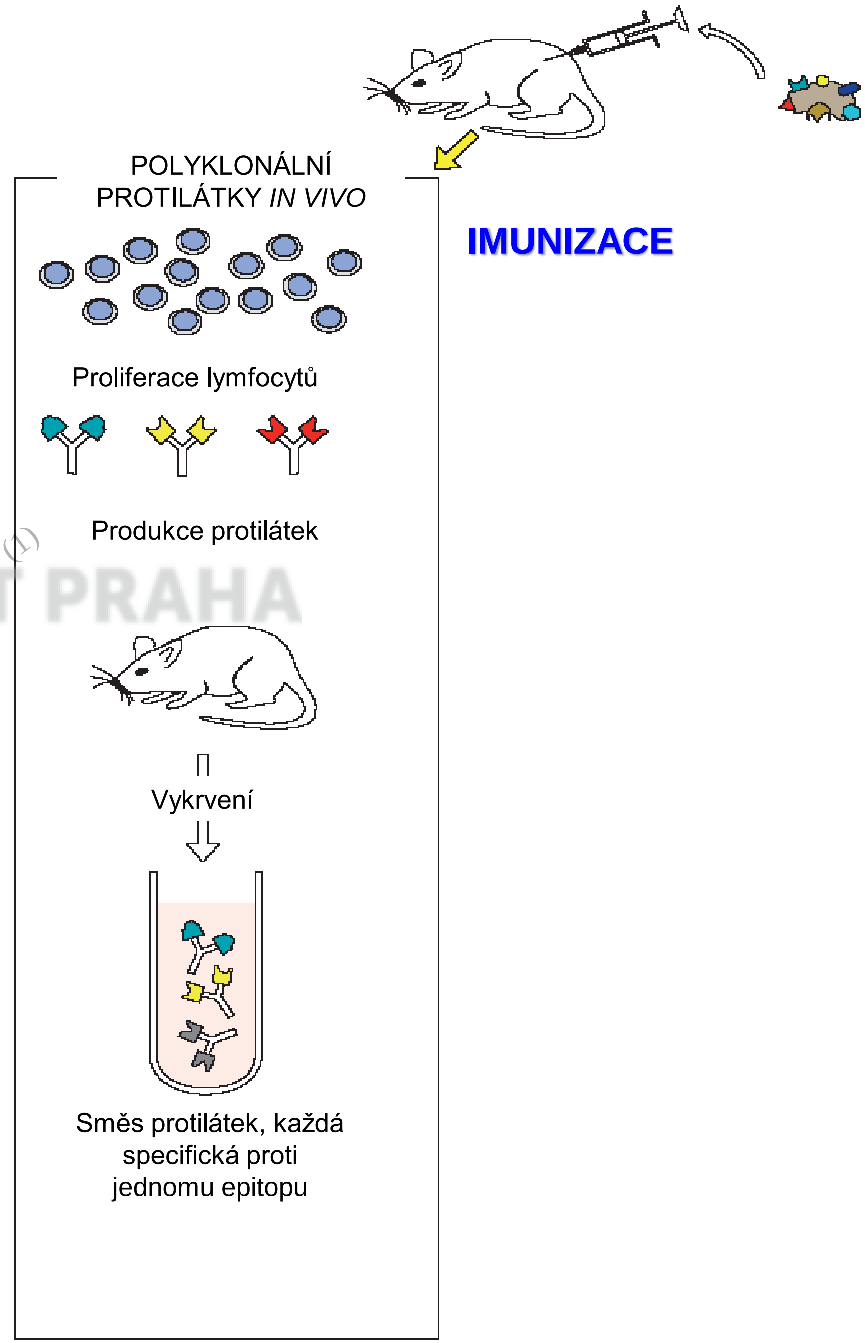
Produkce protilátek

Polyklonální protilátky

Nevýhody imunizace

- požadovaná protilátka je přítomna v nízké koncentraci
- snížená specificita a citlivost
- izolace požadované protilátky je nákladná, časově náročná a méně účinná
- křížové reakce

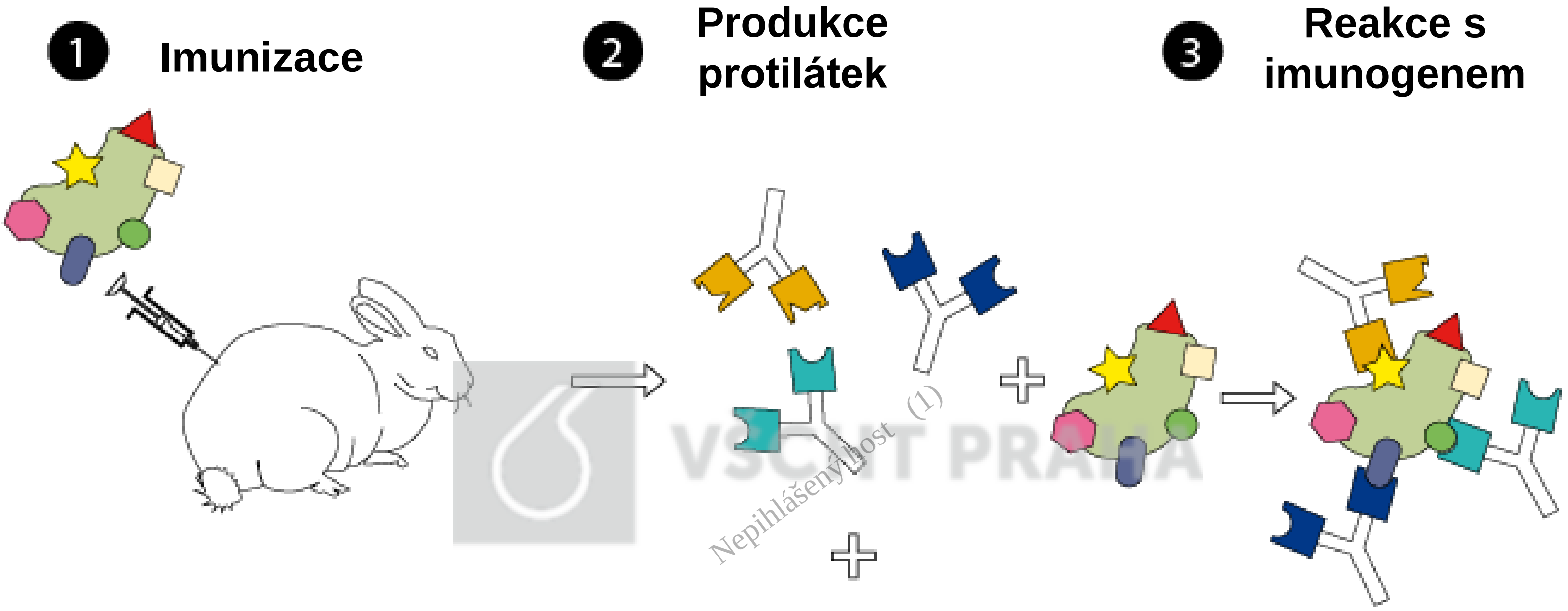
?

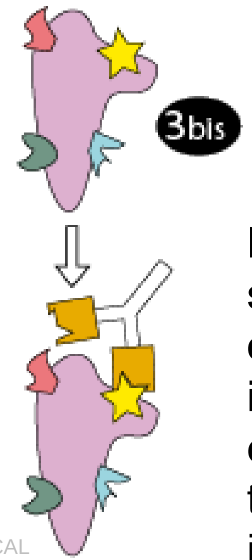


VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

ZDORJE: https://www.nature.com/news/reproducibility-crisis-blame-it-on-the-antibodies-1.17586; Daussant 07: INTRODUCTION TO IMMUNOCHEMICAL TECHNIQUES FOR MEDICAL DIAGNOSI FOOD QUALITY CONTROL AND ENVIRONMENTAL TESTING

Křížové reakce





VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Reakce s dalším antigenem

Pokud jsou protilátky smíseny s antigenem, který je odlišný od imunizačního, ale nese identické nebo podobné epitopy, mohou tyto protilátky také reagovat za vzniku imunokomplexu

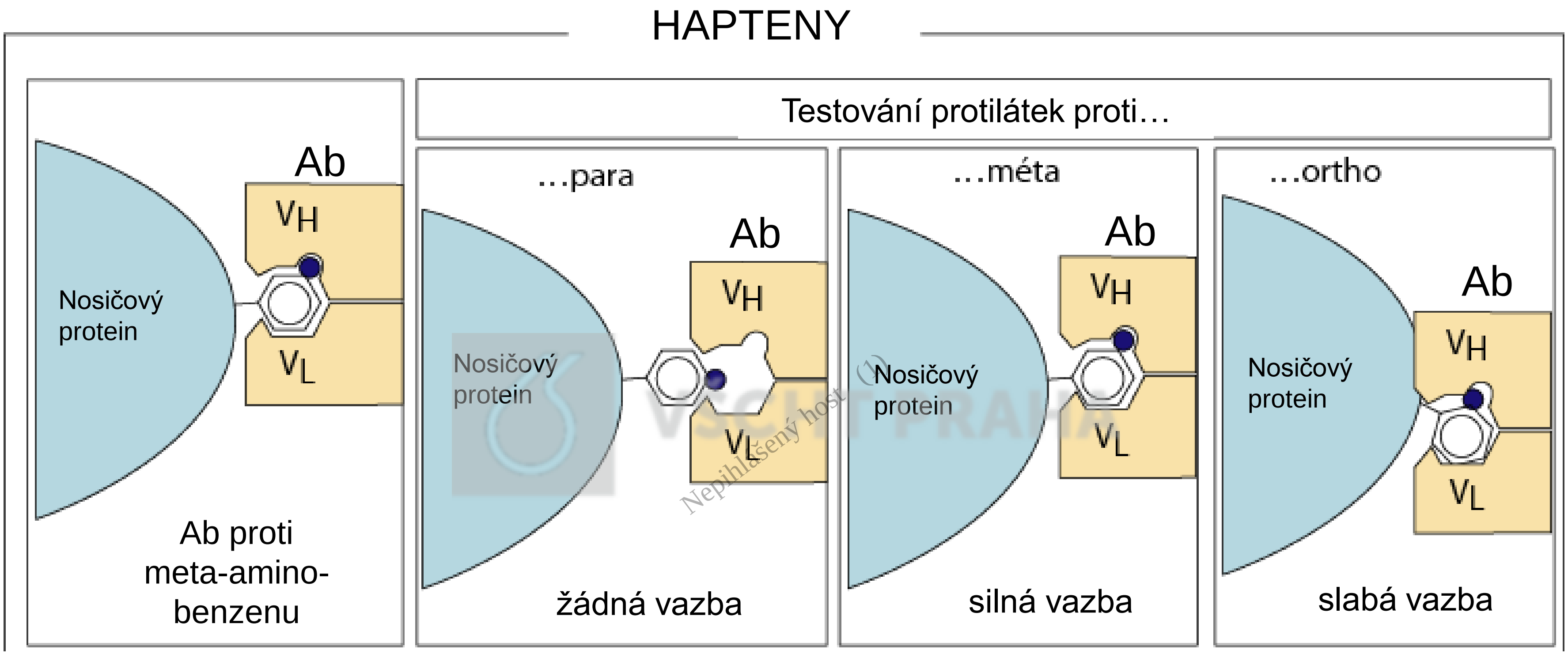
Křížová (zkřížená) reakce:
Reakce protilátky se složkou, která není imunogen.

ZDORJE: Daussant 07: INTRODUCTION TO IMMUNOCHEMICAL TECHNIQUES FOR MEDICAL DIAGNOSIS, FOOD QUALITY CONTROL AND ENVIRONMENTAL TESTING

Produkce protilátek

Křížové reakce

Schopnost protilátky reagovat s podobnými epitopy na různých antigenech.



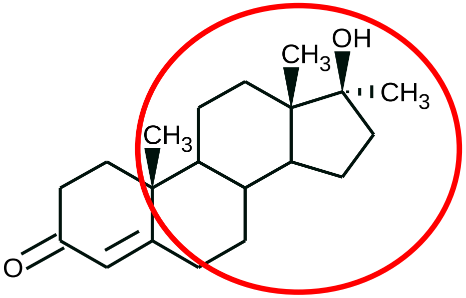
multianalytové metody

ZDORJE: Daussant 07: INTRODUCTION TO IMMUNOCHEMICAL TECHNIQUES FOR MEDICAL DIAGNOSIS, FOOD QUALITY CONTROL AND ENVIRONMENTAL TESTING

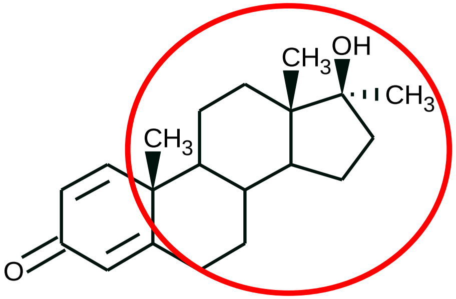
Křížové reakce – příklad využití

multianalytová imunochemická metoda pro detekci anabolických androgenních steroidů, užívaných orálně

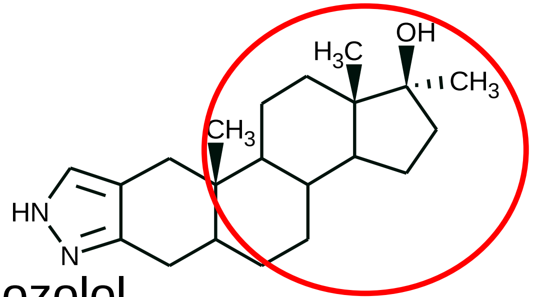
http://www.sportovnilisty.cz/doping-ve-sportu-je-tak-stary-jako-sama-historie-sportu-2/



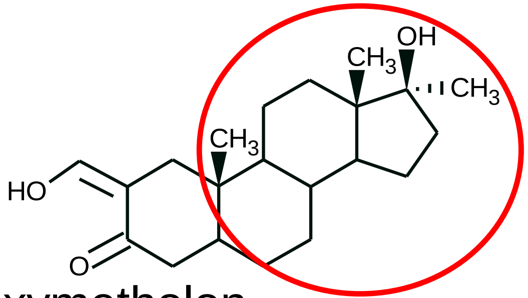
methyltestosteron



methandienon

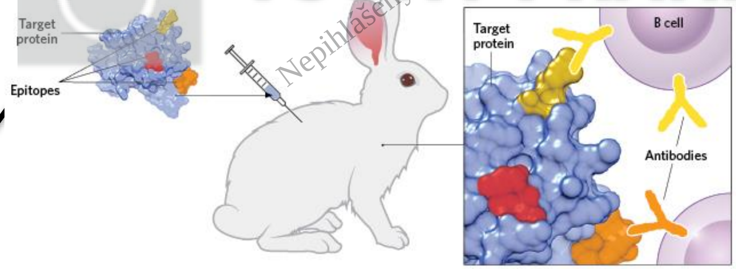


stanozolol



oxymetholon

PRODUKCE PROTILÁTEK



VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

https://www.youtube.com/watch?v=_65_8BX8L-k

Polyklonální protilátky

Monoklonální protilátky

Rekombinantní protilátky

VIDEO: https://www.youtube.com/watch?v=8iyrbv1JauY

Monoklonální protilátky

jeden klon B buněk

↓

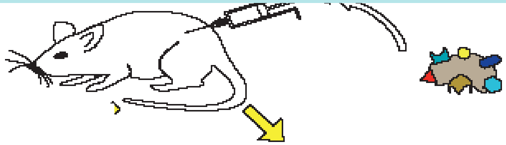
homogenní protilátky, rozpoznávající stejný epitop na stejném antigenu se stejnou specifitou

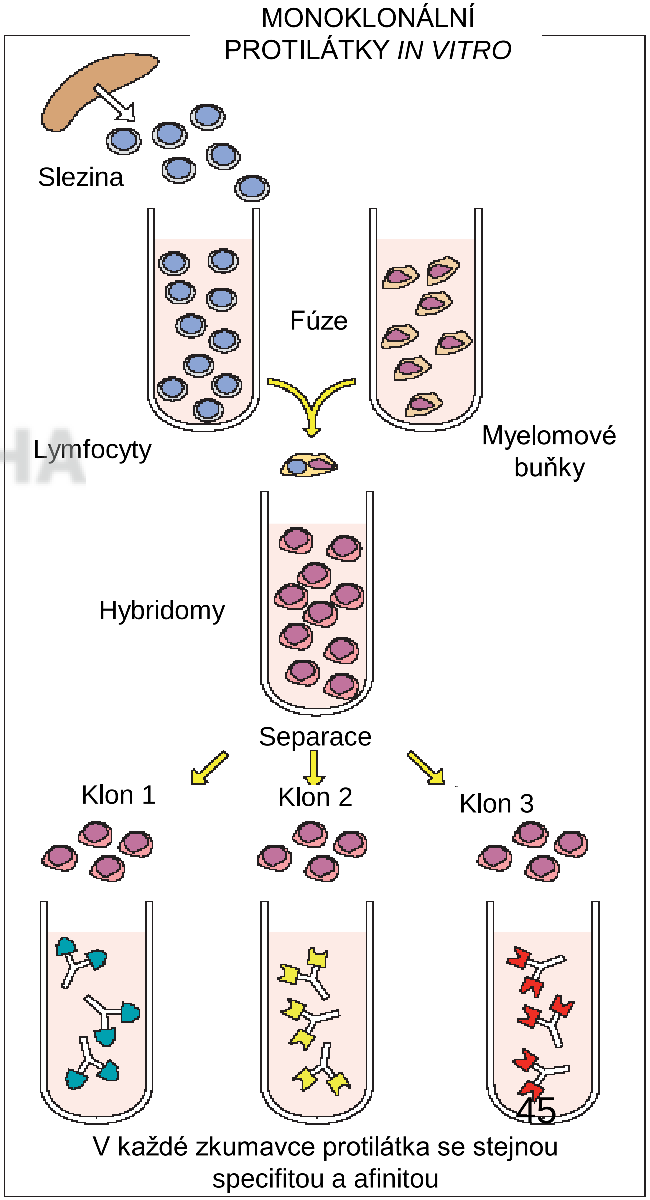
METODA: Hybridomová technologie

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

1. Imunizace → aktivace B lymfocytů (slezina)
2. Fúze buněk (aktivované B-lymfocyty fúzují s myelomovými buňkami) → hybridomy
3. Selekce hybridomů pomocí HAT média
4. Isolace hybridomů
5. Klonování a propagace
6. Charakterizace a skladování ← výhoda

➡ monoklonální protilátky v ascitické tekutině nebo supernatantu tkáňové kultury





Produkce protilátek

PURIFIKACE PROTILÁTEK

- polyklonální PL z antiséra
- monoklonální z ascitické tekutiny nebo supernatantu tkáňové kultury

Proteinová A/G purifikace

- využívá protein A (z baktérie *Staphylococcus aureus*) nebo protein G (z baktérií *Streptococcus*), které vykazují silnou afinitu k Fc oblasti protilátek

! při purifikaci polyklonálních protilátek ze séra dochází k odstranění proteinů séra, nicméně nespecifické imunoglobulinové frakce zůstávají zachovány →stále mohou vykazovat nežádoucí křížovou reaktivitu!

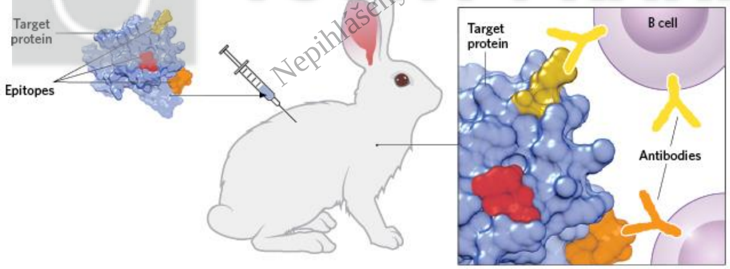
VŠCHT PRAHA
nepihlášený host

Purifikace pomocí antigenu

- isoluje specifické proteiny na základě reversibilní interakce mezi proteiny a specifickým ligandem navázaným na chromatografickou matrix
- využívaná afinita specifického imunoglobulinu vůči antigenu, proti kterému byla vyvinuta
- odstranění nespecifických imunoglobulinových frakcí

PRODUKCE PROTILÁTEK

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)



https://www.youtube.com/watch?v=_65_8BX8L-k

Polyklonální protilátky

Monoklonální protilátky

Rekombinantní protilátky

Rekombinantní protilátky

Příprava: izolace genů kódujících PI ⇨ klonování ⇨ exprese

dostupné komerční soupravy

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Výhoda:

•Rychlost (týdny)

•Kvalita (protilátky specifické proti jednomu epitopu, stejná afinita a specifita, vyšší hustota vaz. míst, možnost modifikace specifity a afinity fragmentu protilátky, lze napojit gen protilátky ke genu proteinu s vhodnou funkcí (enzym))

•Velikost (příprava pouze V_H nebo V_L)

Produkce protilátek - souhrn

Polyklonální protilátky

směs protilátek

liší se jak afinitou, tak specifitou k jednotlivým epitopům daného antigenu

důvod : více epitopů na molekule imunogenu, složitost imunitního systému, různé reakce jednotlivců

čas přípravy: od jednoho do několika měsíců

levná příprava, některé protilátky komerčně dostupné

Monoklonální protilátky

chemické individuum

všechny protilátky mají identickou primární strukturu (stejná afinita i specifita)

důvod: vytvořeny pouze proti jednomu epitopu daného antigenu

čas přípravy: několik měsíců

drahá a laboratorně náročná příprava, některé protilátky komerčně dostupné

Výhoda: hybridomy lze zamrazit a skladovat několik let

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host

IMUNOPRECIPITACE

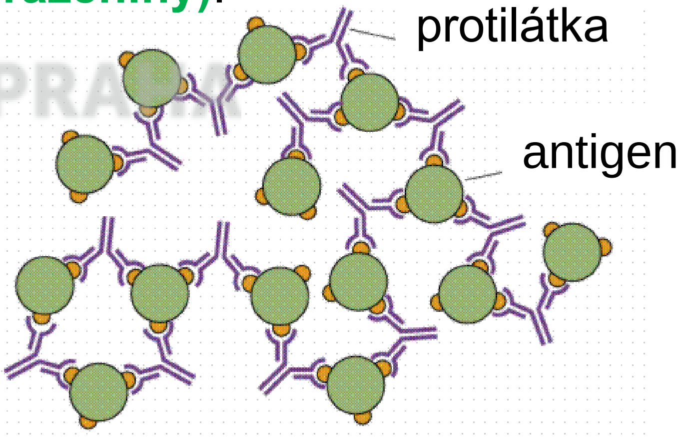
VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Imunoprecipitace

„sekundární jev při vzniku imunokomplexu“

Když jsou **rozpustné antigeny** a molekuly protilátky smíchány ve správných poměrech v přítomnosti elektrolytů při vhodné teplotě a pH, vytvářejí **viditelné, obrovské, nerozpustné komplexy** podobné mřížce nazývané **precipitáty (sraženiny)**.

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)



https://www.tes.com/lessons/fEVfpSpH3mkNBw/immunology-basics

× Aglutinace

Reakce antigen-protilátka, při které protilátky zesíťují **nerozpustné antigeny**, což vede k viditelnému shlukování částic.

VIDEO: https://www.youtube.com/watch?v=Ew15yHuqzmY

Imunoprecipitace

„sekundární jev při vzniku imunokomplexu“

Když jsou **rozpustné antigeny** a molekuly protilátky smíchány ve správných poměrech v přítomnosti elektrolytů při vhodné teplotě a pH, vytvářejí **viditelné, obrovské, nerozpustné komplexy** podobné mřížce nazývané **precipitáty (sraženiny)**.

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Aglutinace (shlukování)

Ag	+	Ab	→	Ag-Ab
aglutinogen		aglutinin		aglutinát
makromolekulární korpuskulární nerozpustný				imunokomplex „shluk“

Precipitace (srážení)

Ag	+	Ab	→	Ag-Ab
precipitogen		precipitin		precipitát
nízkomolekulární nekorpuskulární rozpustný				imunokomplex „sraženina“

× Aglutinace

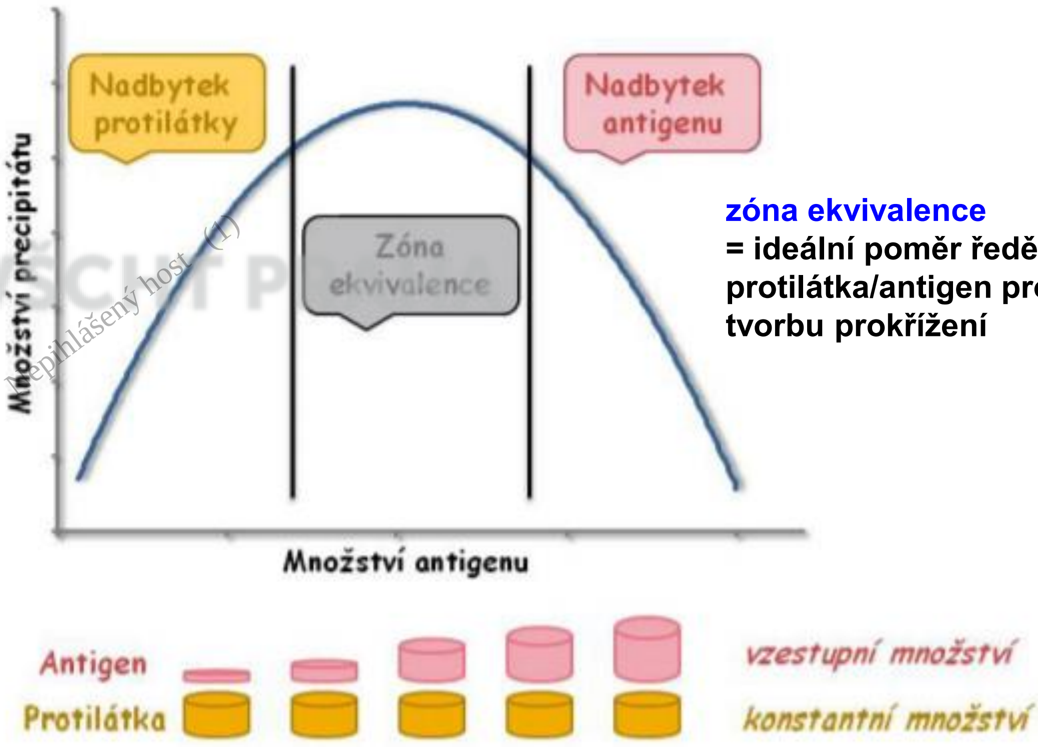
Reakce antigen-protilátka, při které protilátky zesíťují **nerozpustné antigeny**, což vede k viditelnému shlukování částic.

Imunoprecipitace

Precipitační křivka = grafické znázornění imunoprecipitace

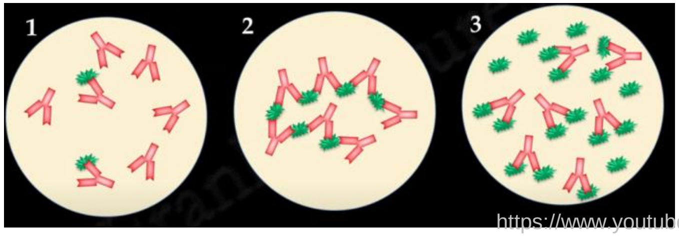
nekompetitivní imunoanalýzy	imunodifuzní metody turbidimetrie, nefelometrie,	kompetitivní imunoanalýzy

- rozpustný imunokomplex vzniká vždy (M_r 160 000 – 1 500 000 Da)
- **imunoprecipitát vzniká pouze při určitém poměru Ag a PI** (1:1); výrazně větší rozměry než imunokomplex (v roztoku či gelu)
- obvyklý Ag (každá determinanta jedinečná) tvoří precipitát pouze polyklonální PI
- monoklonální PI precipitují s Ag obsahujícím více stejných determinant
- hapteny netvoří precipitát vůbec, protože není dostatek místa na dvě vazebná místa



https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/1153/Imunochemie%20201314teorie.pdf

zóna ekvivalence
= ideální poměr ředění protilátka/antigen pro tvorbu prokřížení

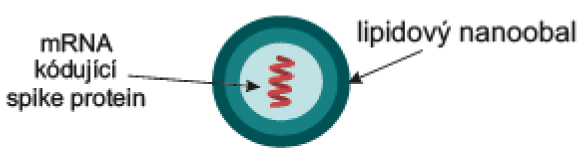


https://www.youtube.com/watch?v=Ew15yHuqzmY

VŠCHT PRAHA
nepřihlášený host (1)

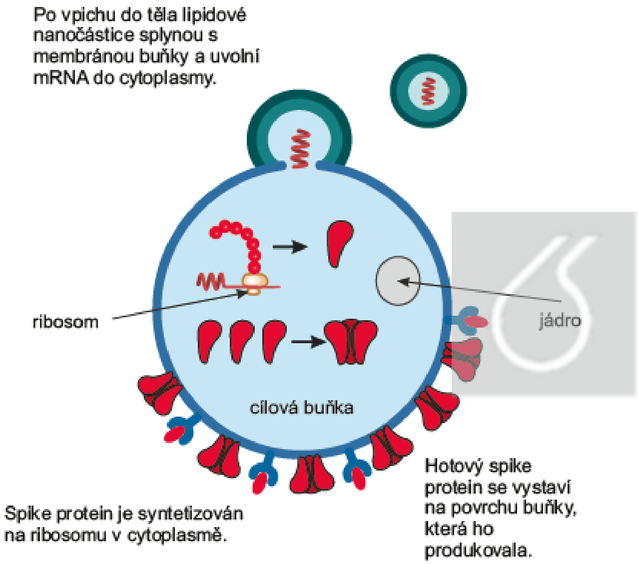
Nepihlášený host (1)

Produkce protilátek

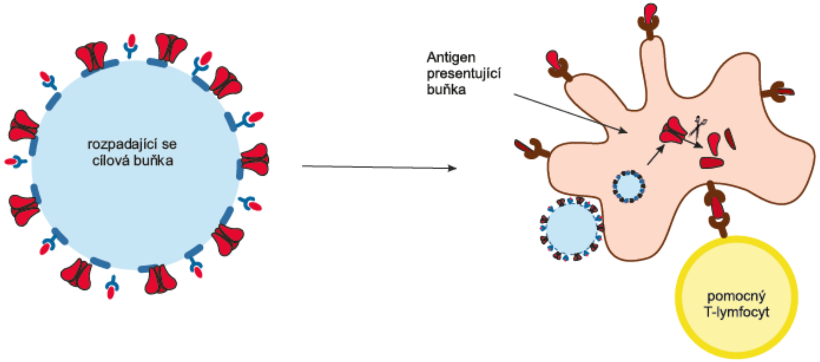


RŮZNÉ PŘÍSTUPY PRO PŘÍPRAVU VAKCÍN

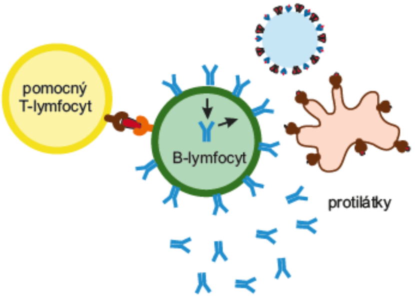
1. Interakce vakcíny s buňkou



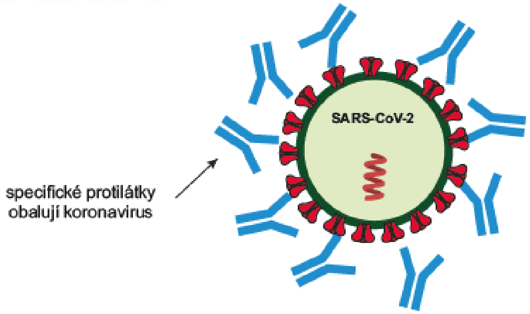
2. Rozpoznání antigenu



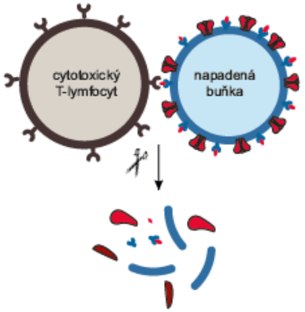
3. Tvorba protilátek



4. Obrana proti viru

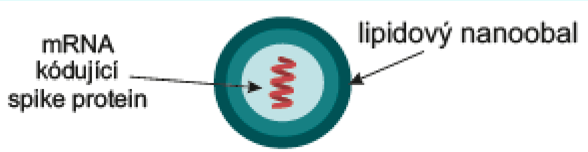


5. Zneškodnění napadených buněk



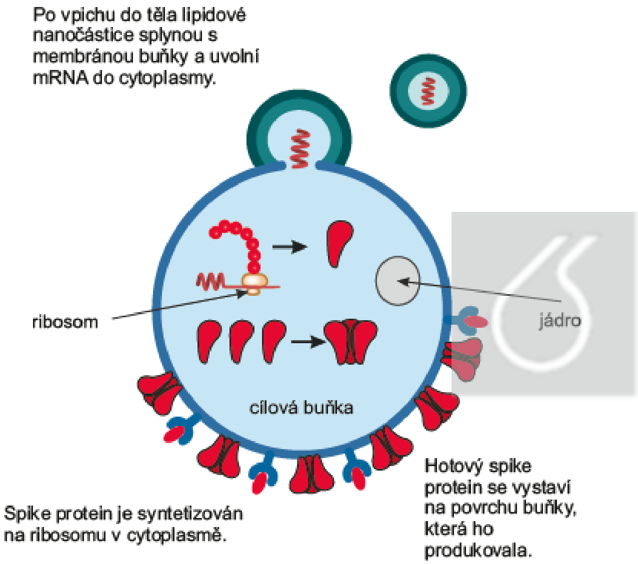
VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

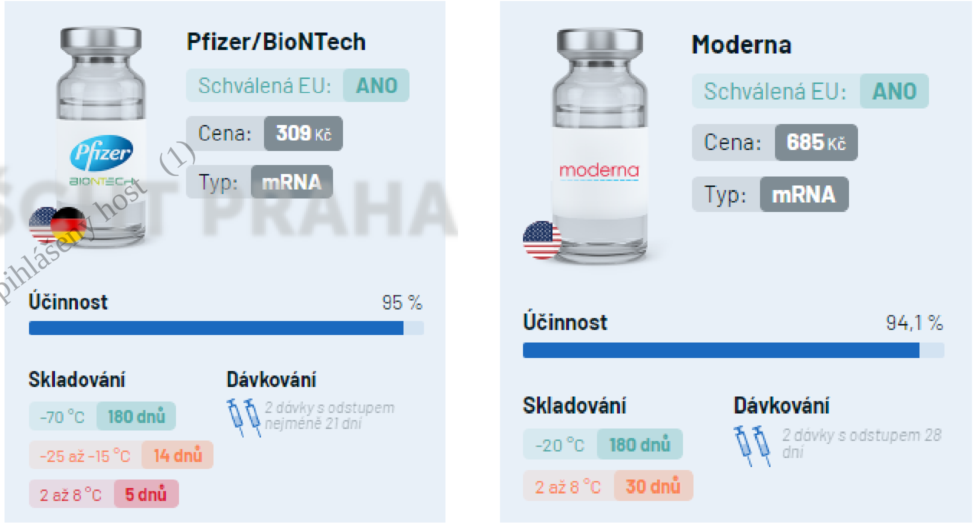
Produkce protilátek



RŮZNÉ PŘÍSTUPY PRO PŘÍPRAVU VAKCÍN

1. Interakce vakcíny s buňkou

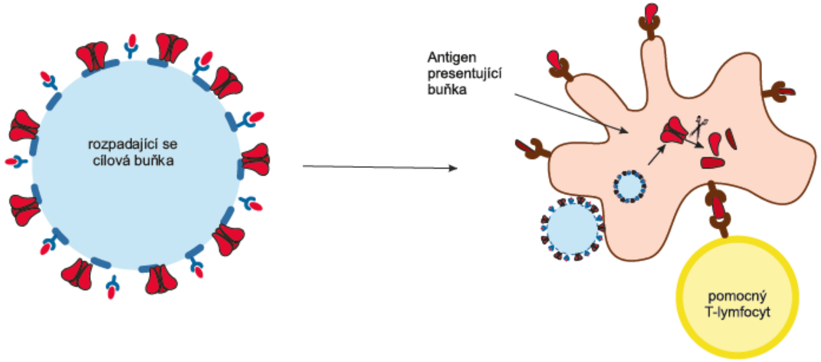




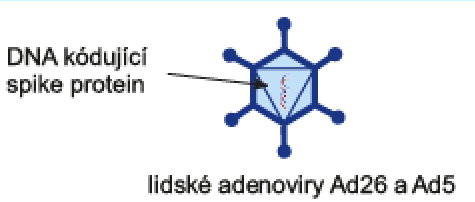
https://zpravy.aktualne.cz/zahranici/devet-koronavirovych-vakcin-v-prehlednem-srovnani/r~7955250e81ad11eba22aac1f6b220ee8/; 25.4.2021

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

2. Rozpoznání antigenu

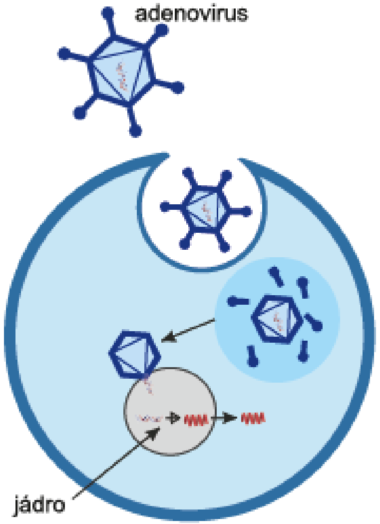


Produkce protilátek



RŮZNÉ PŘÍSTUPY PRO PŘÍPRAVU VAKCÍN

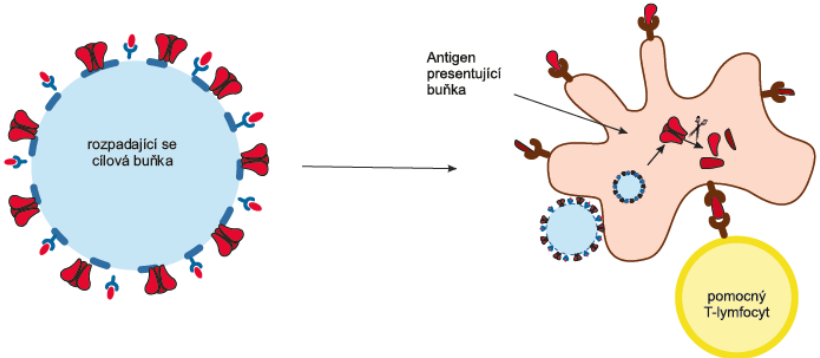
1. Interakce vakcíny s buňkou



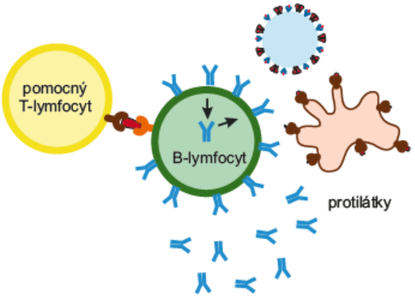
Adenovirus je v této vakcíně využíván jako dopravní prostředek pro transport cílového genu do hostitelské buňky (v tomto případě jde o gen kódující spike protein). Do DNA adenoviru je vložen gen kódující spike protein. Navíc je adenovirus upraven tak, aby sám o sobě nezpůsoboval žádná onemocnění a v organismu se dále nemnožil. DNA do něho vložená se tedy musí v jádře, které adenoviry napadají, nejprve přepsat do mRNA a pak podle ní může vytvořit obalový spike protein.
Hotový protein je vystaven na povrchu buňky.

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

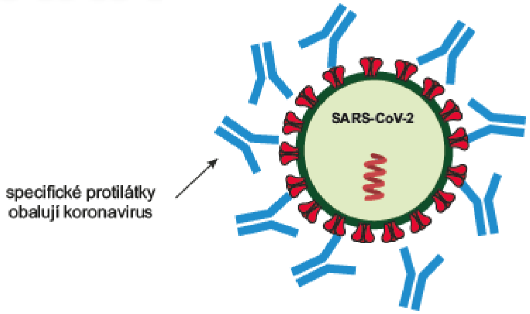
2. Rozpoznání antigenu



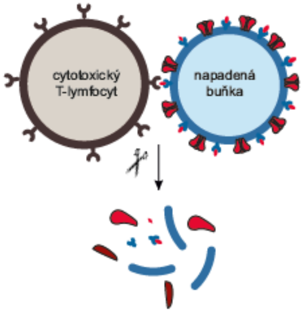
3. Tvorba protilátek



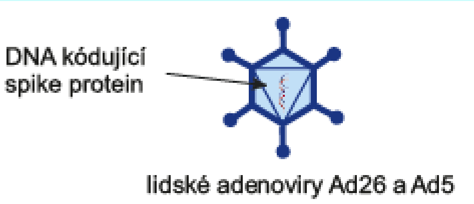
4. Obrana proti viru



5. Zneškodnění napadených buněk

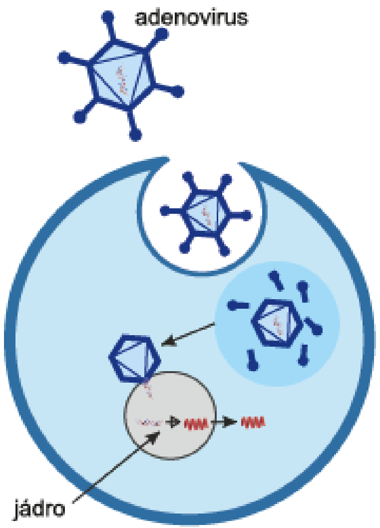


Produkce protilátek



RŮZNÉ PŘÍSTUPY PRO PŘÍPRAVU VAKCÍN

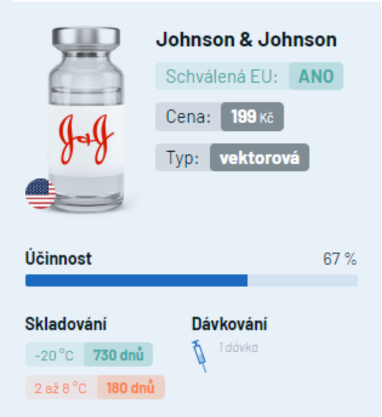
1. Interakce vakcíny s buňkou

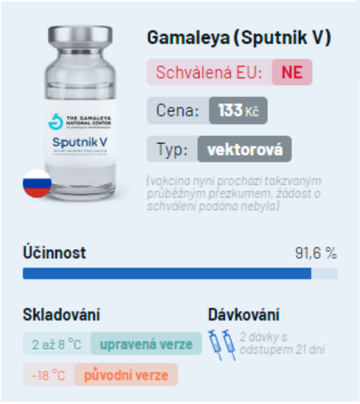


Adenovirus je v této vakcíně využíván jako dopravní prostředek pro transport cílového genu do hostitelské buňky (v tomto případě jde o gen kódující spike protein). Do DNA adenoviru je vložen gen kódující spike protein. Navíc je adenovirus upraven tak, aby sám o sobě nezpůsoboval žádná onemocnění a v organismu se dále nemnožil. DNA do něho vložená se tedy musí v jádře, které adenoviry napadají, nejprve přepsat do mRNA a pak podle ní může vytvořit obalový spike protein.

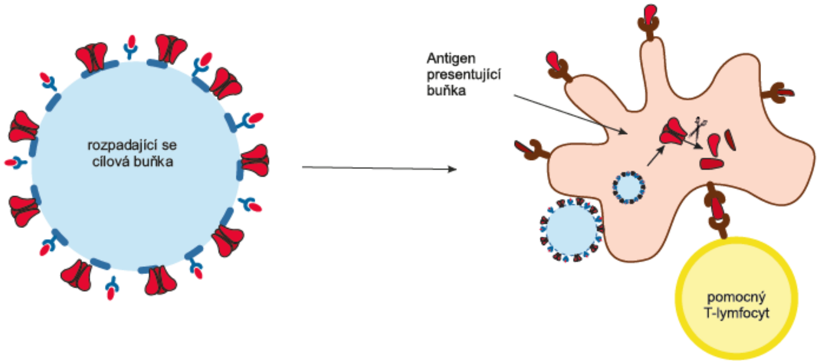
Hotový protein je vystaven na povrchu buňky.

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)





2. Rozpoznání antigenu



https://zpravy.aktualne.cz/zahranici/devet-koronavirovych-vakcin-v-prehlednem-srovnani/r~7955250e81ad11eba22aac1f6b220ee8/; 25.4.2021