

Imunochemické metody

2. část



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.

Imunochemické metody

- precipitační, neprecipitační metody

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



imunokomplex

Antigen - souhrn

ANTIGEN

- **struktura (buňka nebo její část, protein, DNA nebo nízkomolekulární látka), která prostřednictvím nekovalentních vazeb interaguje se specifickou protilátkou.**
- obsahují obvykle několik oblastí, na něž se váží jednotlivé protilátky; hovoříme o antigenních determinantách neboli **epitopech**

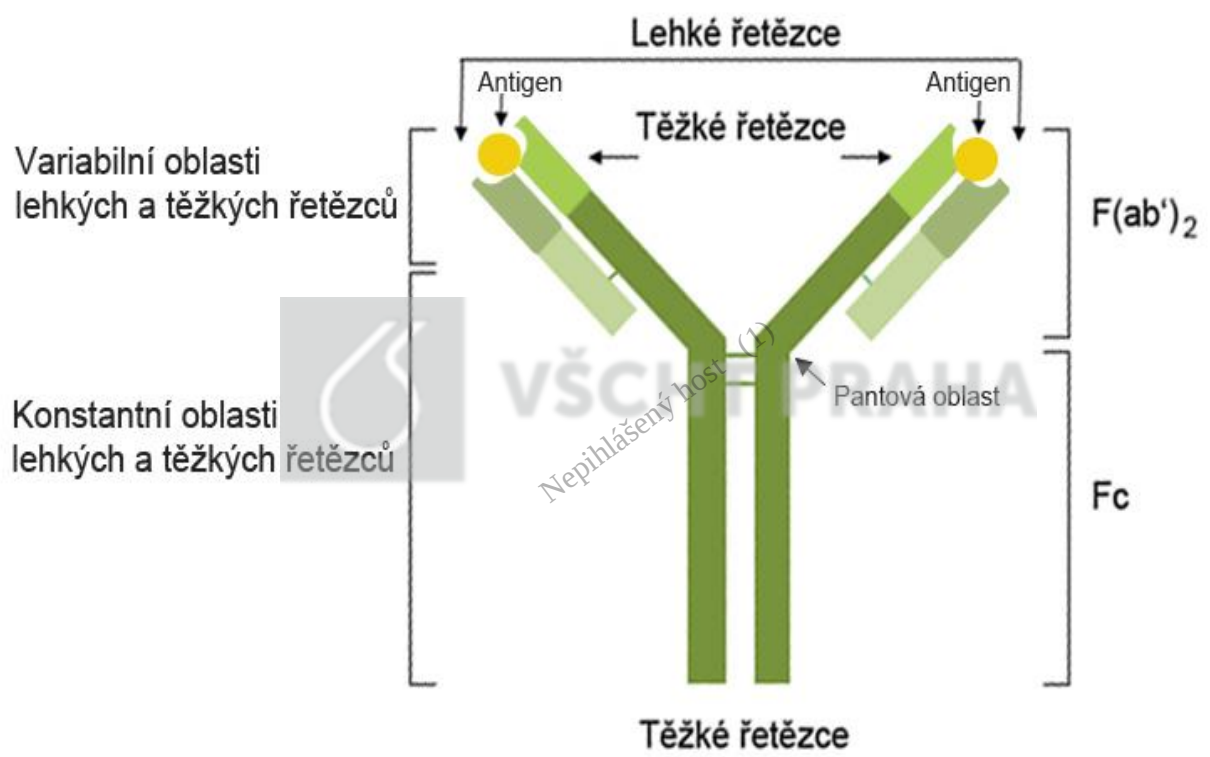
IMUNOGEN

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

HAPTEN

- **nízkomolekulární látky, 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).

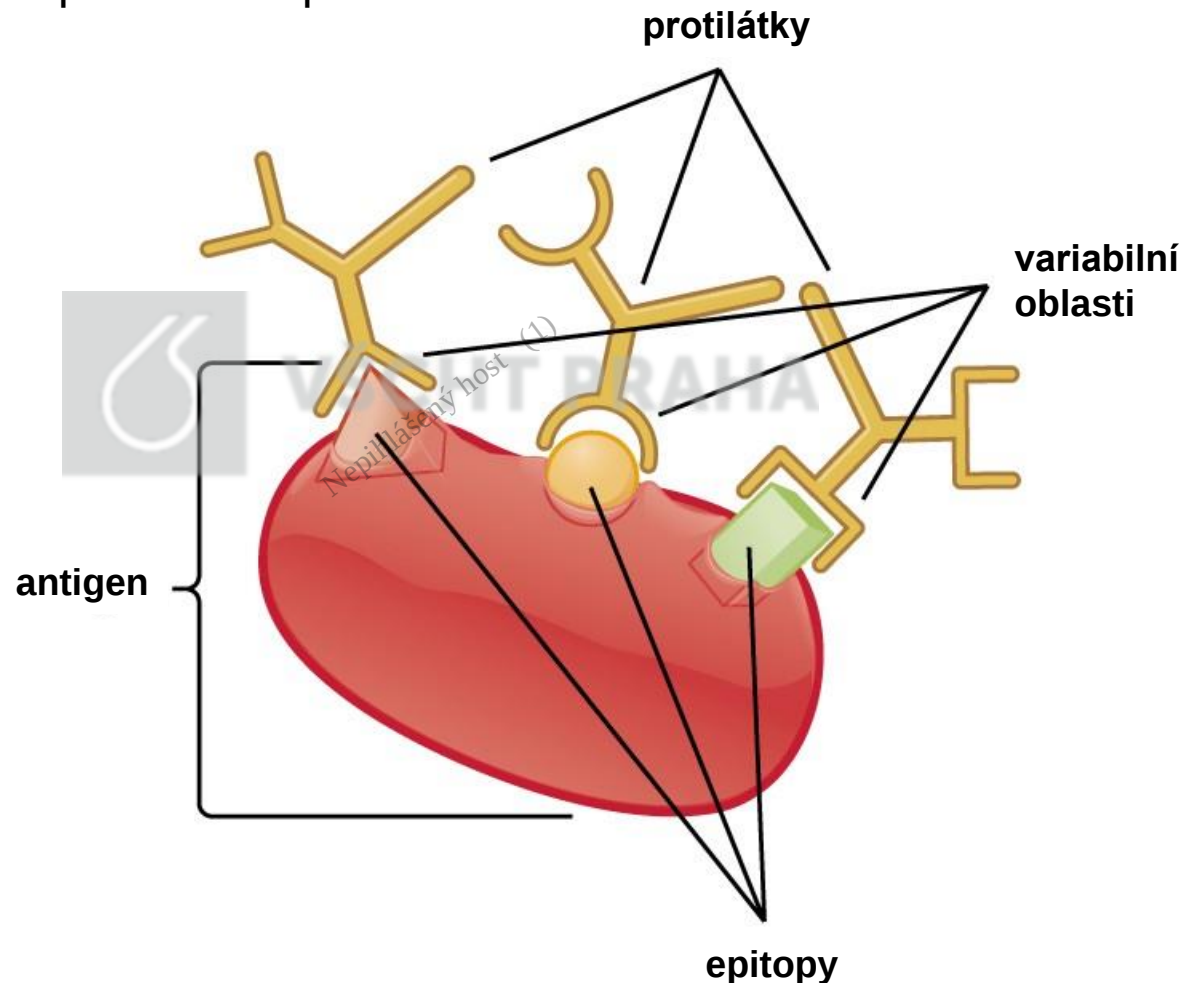
Protilátka - souhrn



<https://labguide.cz/protilatky/>

Protilátka - souhrn

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



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

Monoklonální protilátky

chemické individuum

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

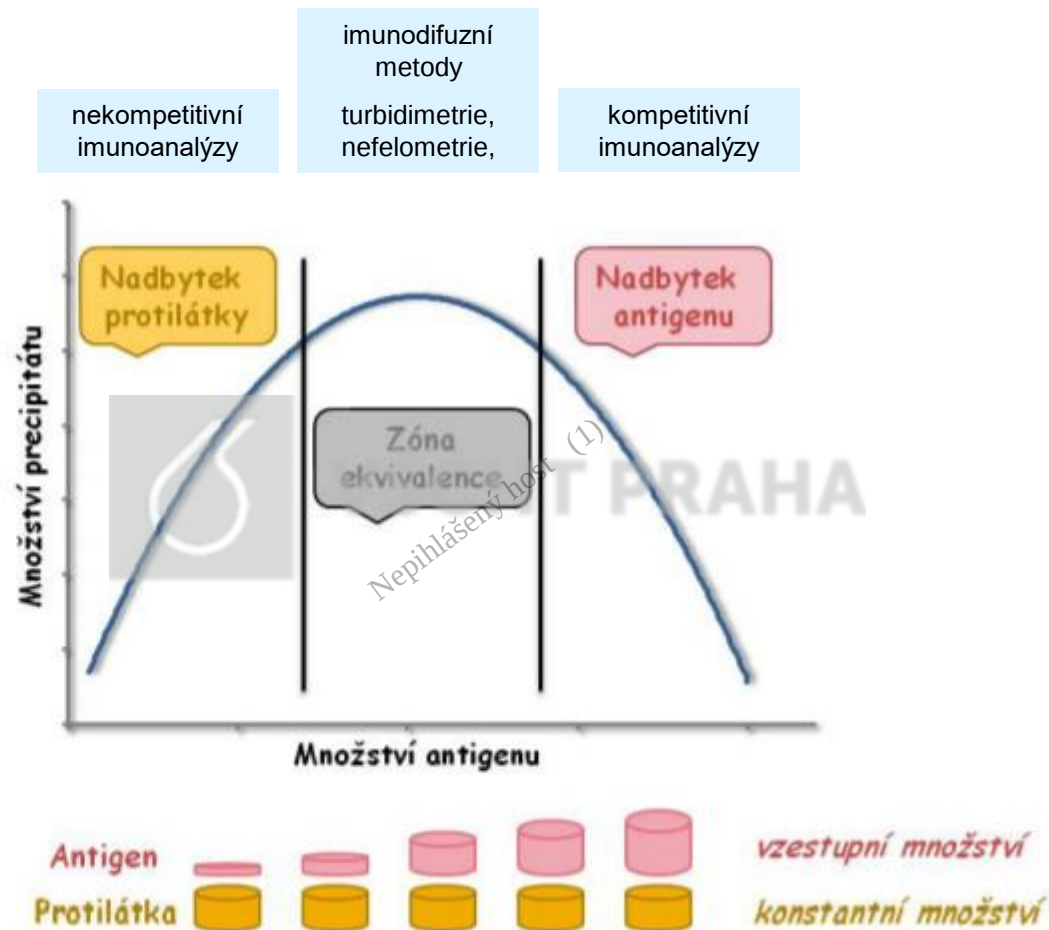
*důvod: vytvořeny pouze proti jednomu epitopu daného
antigenu*

Imunoprecipitace × aglutinace

- **rozpustné antigeny** a molekuly protilátky smíchány ve správných poměrech (tzv. zona ekvivalence) vytvářejí **tzv. precipitáty (sraženiny)**
- reakce antigen-protilátka, při které protilátky zesít'ují **nerozpustné antigeny**, což vede k viditelnému shlukování částic, nazýváme **aglutinace**

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“

Imunoprecipitace



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

Imunochemické metody

jsou rozděleny na základě vzniku:

precipitátu (aglutinátu) nebo rozpustného imunokomplexu



**PRECIPITAČNÍ
METODY**



**NEPRECIPITAČNÍ
METODY**

Imunochemické metody

jsou rozděleny na základě vzniku:

precipitátu (aglutinátu) nebo rozpustného imunokomplexu



VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)



**PRECIPITAČNÍ
METODY**

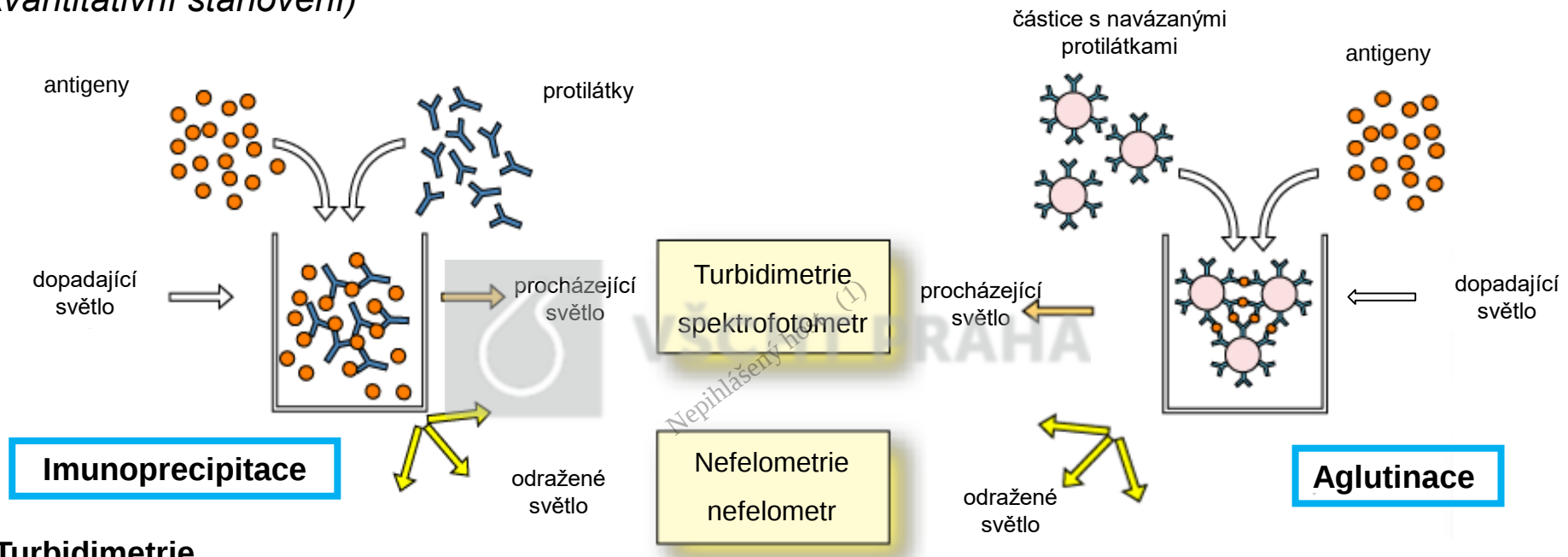
**NEPRECIPITAČNÍ
METODY**

V ROZTOKU

V GELU

Turbidimetrické a nefelometrické metody

vznik precipitátu/aglutinátu sledujeme prostřednictvím změn **optických vlastností roztoku** (*kvantitativní stanovení*)



Turbidimetrie

- pro koncentrovanější roztoky
- měří množství procházejícího světla (úbytek intenzity světla, které prošlo roztokem v kyvetě)
- detektor je v ose paprsku

Nefelometrie

- pro nižší koncentrace
- měří množství světla rozptýleného při průchodu paprsku (množství světla odraženého od vznikajících komplexů)
- detektor je ve směru kolmém na vstupující paprsek

Nefelometrie je 5-10x citlivější a nákladnější než turbidimetrie

PRECIPITAČNÍ METODY – V GELU

- založeno na difúzi 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 (1 - 1,5%)
- po odmytí volných imunoreaktantů se někdy imunoprecipitační linie barví (Commassie Brilliant blue G-250)

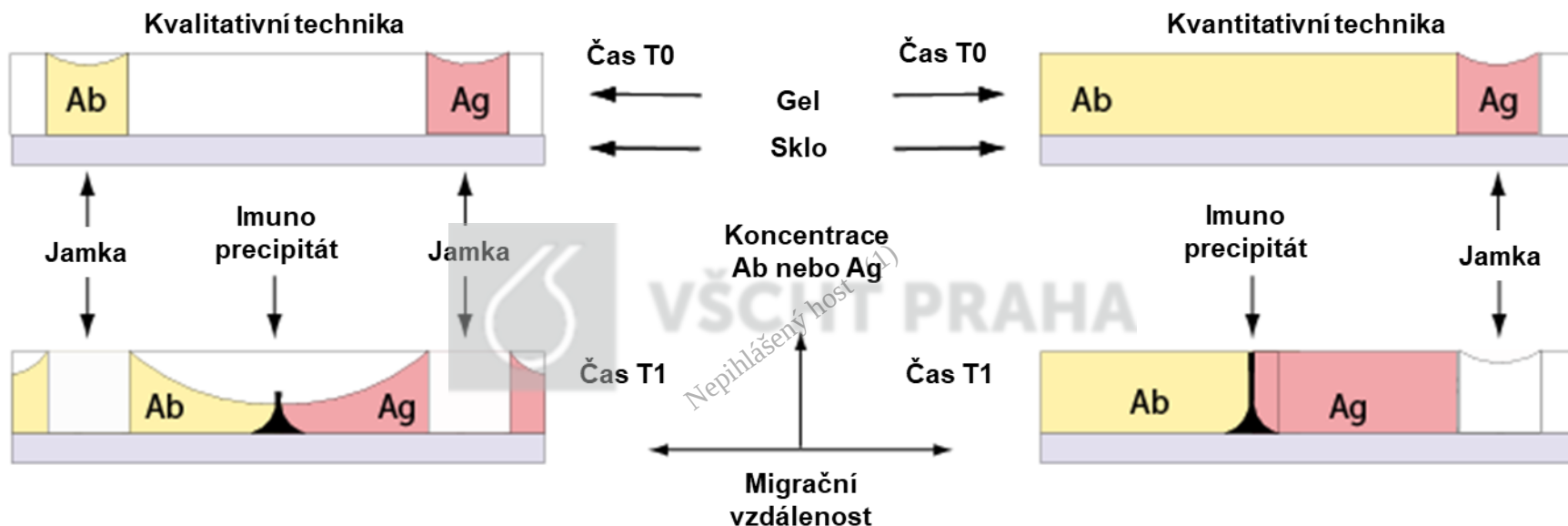
Dělení dle způsobu provedení:

- Jednoduchá radiální imunodifúze
- Dvojitá radiální imunodifúze
- Imunoelektroforéza

Využití:

- stanovení koncentrace antigenu nebo protilátky, porovnání antigenů, sledování čistoty antigenu

PRECIPITAČNÍ METODY – V GELU

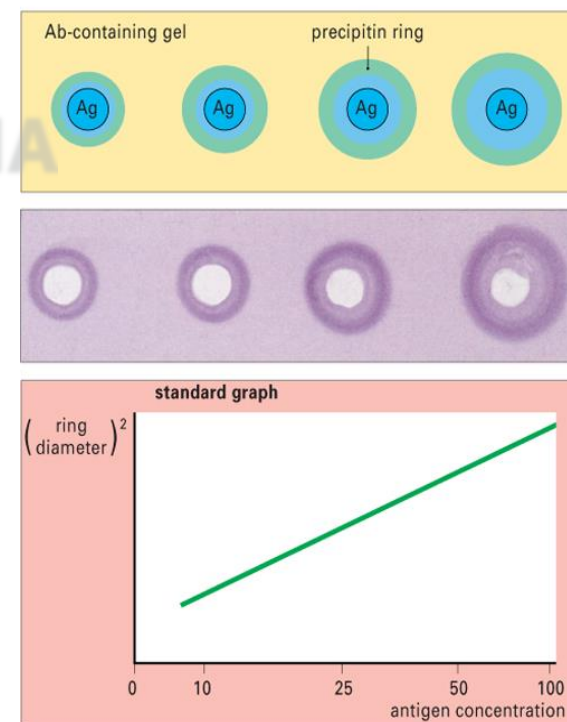
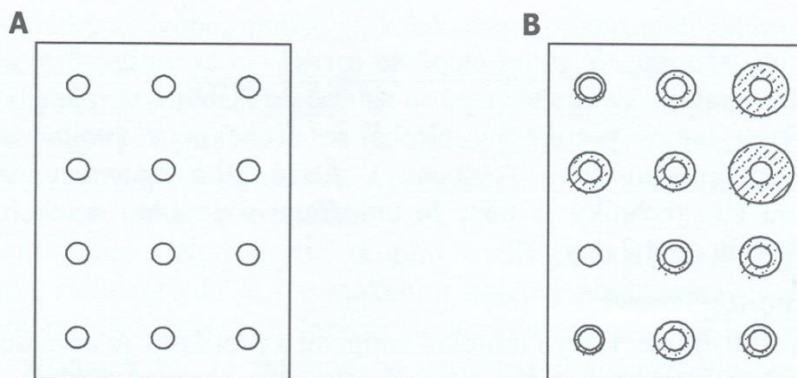


Využití:

- **stanovení koncentrace antigenu nebo protilátky**, porovnání antigenů, sledování čistoty antigenu

Jednoduchá radiální imunodifúze

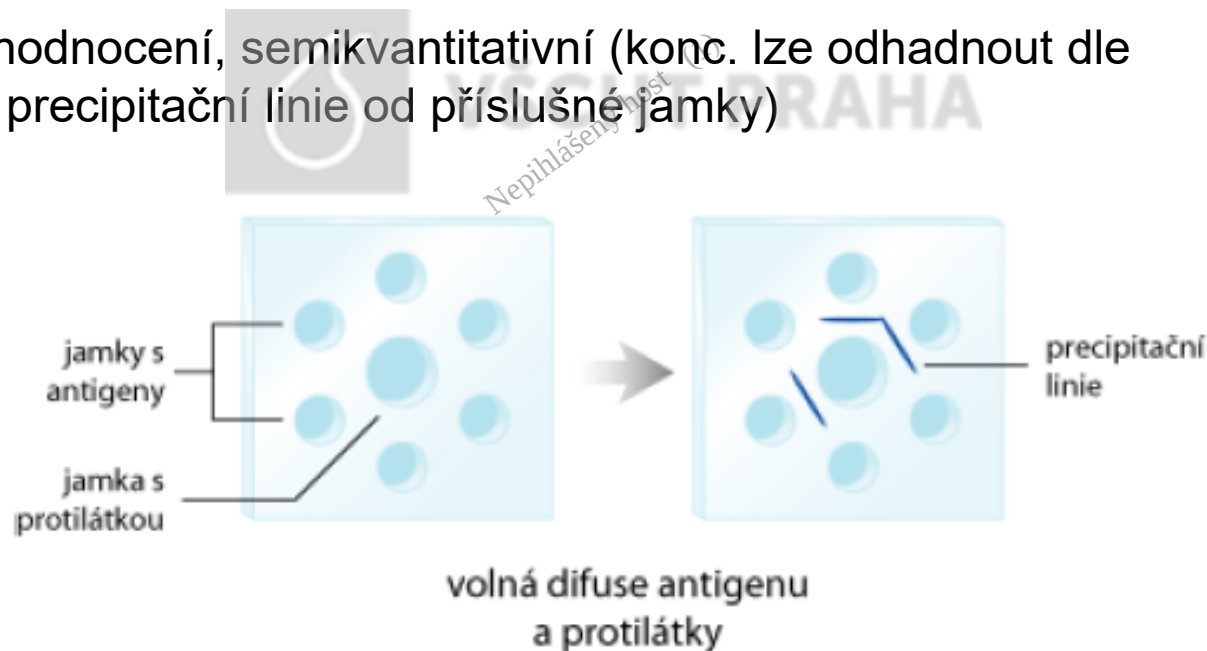
- koncentrační gradient jednoho z reaktantů (většinou Ag)
- druhý reaktant (většinou Ab) - rovnoměrně rozptýlen ve struktuře gelu
- výsledkem jsou ostře ohraničené kroužky precipitátu
- plocha prstence (nebo průměr) - úměrné koncentraci Ag
- podle koncentrace standardu – kalibrační přímka
- časová náročnost



© Elsevier. Male et al.: Immunology - www.studentconsult.com

Dvojitá radiální imunodifúze

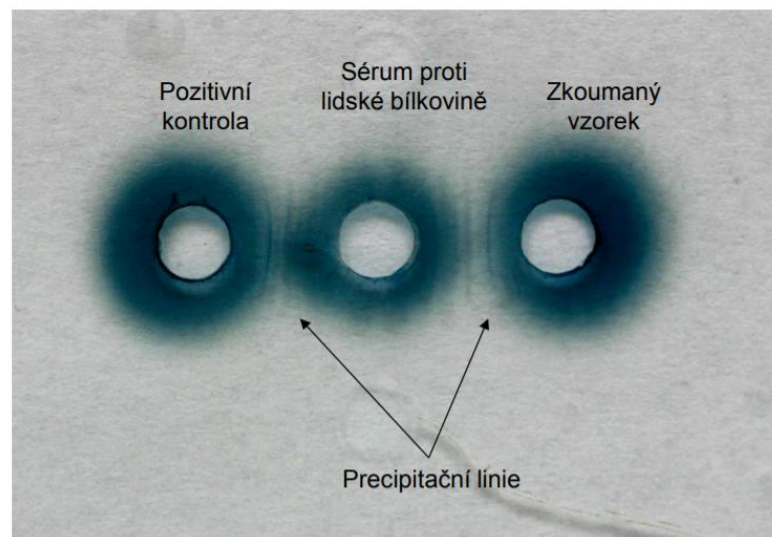
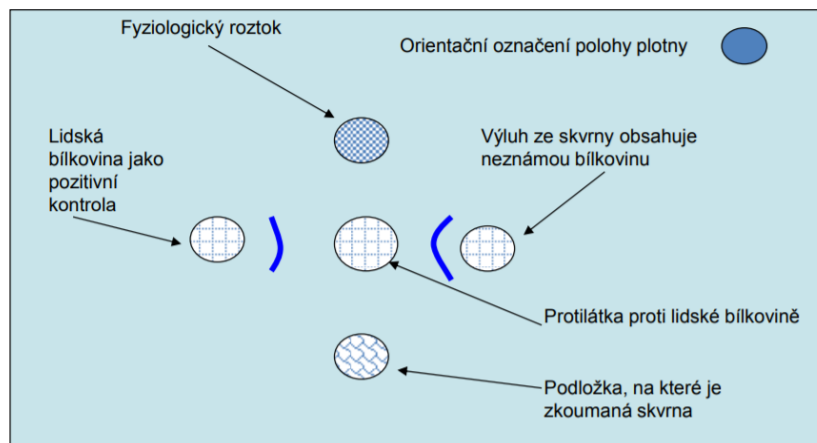
- testování více materiálů
- gradient vytváří jak Ag, tak Ab a dochází k protisměrné difúzi obou reaktantů (radiálně)
- v zóně ekvivalence – precipitační linie, která ukazuje na pozitivitu reakce
- kvalitativní hodnocení, semikvantitativní (konc. lze odhadnout dle vzdálenosti precipitační linie od příslušné jamky)



Dvojitá radiální imunodifúze

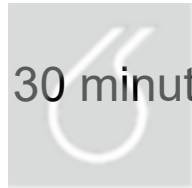
- testování více materiálů
- gradient vytváří jak Ag, tak Ab a dochází k protisměrné difúzi obou reaktantů (radiálně)
- v zóně ekvivalence – precipitační linie, která ukazuje na pozitivitu reakce
- kvalitativní hodnocení, semikvantitativní (konc. lze odhadnout dle vzdálenosti precipitační linie od příslušné jamky)

Příklad využití : Identifikace biologických stop (soudní lékařství) – důkaz lidské bílkoviny ve vzorku krve

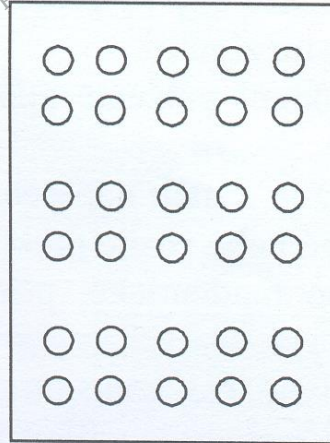


Protisměrná imunoelektroforéza (synereze)

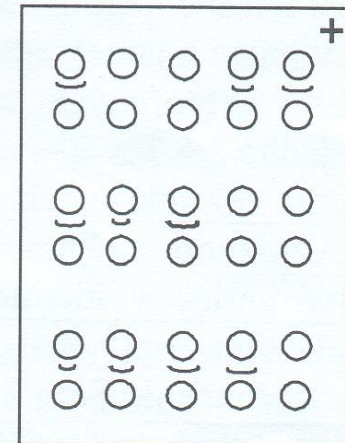
- obměna metody dvojité imunodifúze
- pohyb antigenu i protilátky urychlován elektrickým polem
- precipitační linie už za 30 minut



A

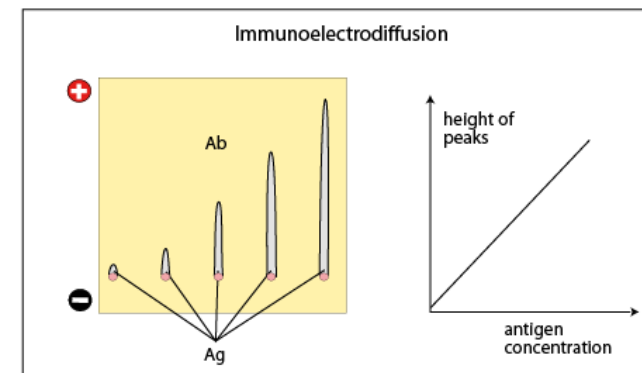
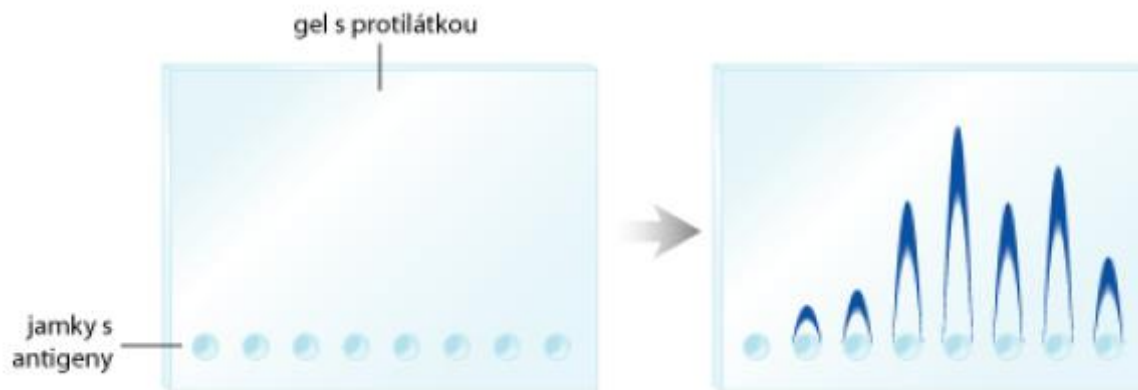


B



Elektroimunodifúze (raketková technika)

- protilátka je předem rozptýlena v agarosovém gelu
- roztok antigenu difunduje z vykrojených jamek
- proces je urychlený elektrickým polem
- tvorba precipitačních linií ve tvaru raket
- kvantitativní hodnocení: plocha vymezená precipitátem je úměrná koncentraci antigenu

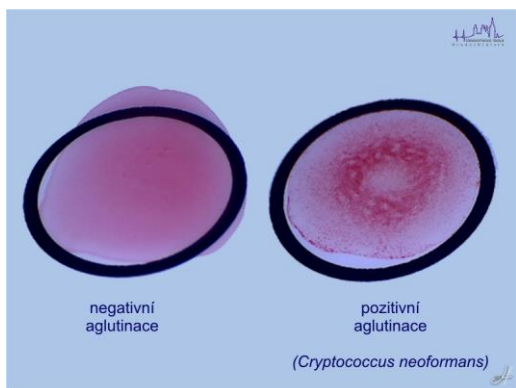


AGLUTINACE

- **Přímá** slouží k identifikaci korpuskulárních antigenů, které přirozeně nesou cílové epitopy (např. bakterií nebo červené krvinky (**hemaglutinace**))
- **Nepřímá** slouží k identifikaci rozpustného antigenu na povrchu vhodných nosičů (latex, dříve také červené krvinky)

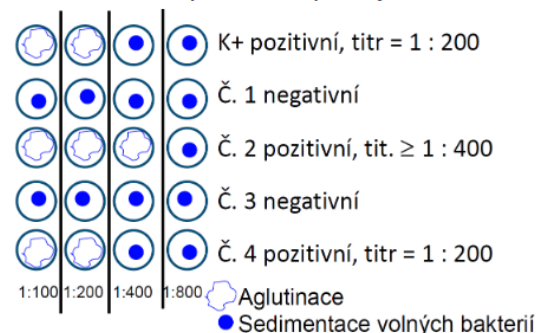
Vyhodnocení:

- Kvalitativní – vzniká/nevzniká precipitát
- Kvantitativní – stanovení nejvyššího ředění séra, kdy je stále patrná aglutinace (ředění séra nebo titr)



https://labmet.zshk.cz/media.aspx?id=SLM026&TB_iframe=true&height=750&width=820

Aglutinace na detekci protilátek proti yersiniím.



<https://adoc.pub/nepimy-prkaz-mikroorganismu-prkaz-viru-anaeroby-praktikum.html>

Přímá aglutinace a hemaglutinace

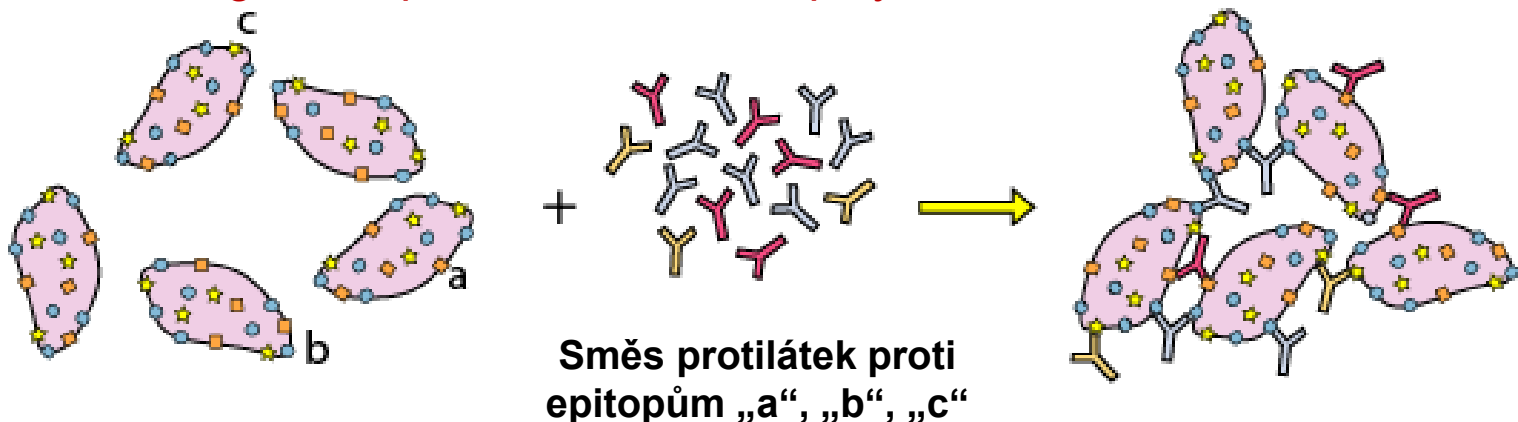
Princip: dochází k vazbě komplexu antigen-protilátka a jeho následné aglutinaci, kterou lze pozorovat pouhým okem nebo hodnotit speciálními přístroji

Příklad použití: protilátky, které se vytvoří v séru pacienta v průběhu onemocnění
(detekce konkrétních patogenů – bakteriální)



VŠCHT PRAHA
Nepřehlášený host (1)

Multi-antigenní « přírodní » částice / polyklonální Ab

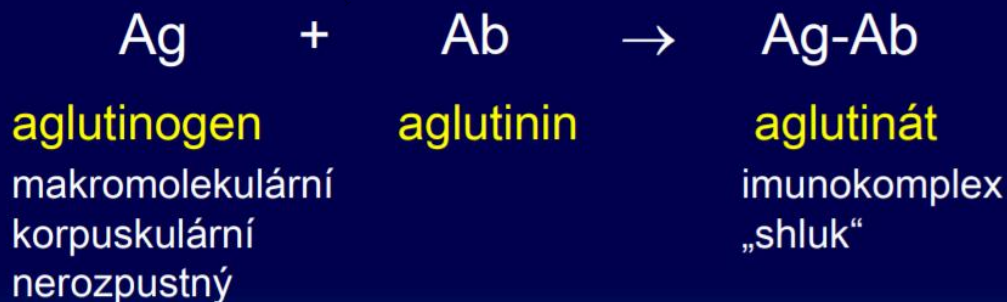


Přímá aglutinace a hemaglutinace

Princip: dochází k vazbě komplexu antigen-protilátka a jeho následné aglutinaci, kterou lze pozorovat pouhým okem nebo hodnotit speciálními přístroji

Příklad použití: protilátky, které se vytvoří v séru pacienta v průběhu onemocnění
(detekce konkrétních patogenů – bakteriální)

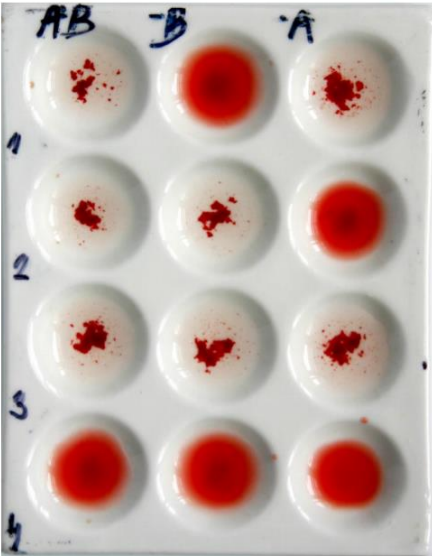
Aglutinace (shlukování)



- **hemaglutinin** je látka schopná vyvolat aglutinaci červených krvinek
- mezi hemaglutininy patří protilátky ABO, vyskytující se v systému krevních skupin

Hemagglutination

- Při přímé hemagglutinaci se protilátky (hemagglutinin) vážou na přirozené antigeny na povrchu erytrocytů a to způsobí jejich poškození a rozpad (hemolýza). Tento efekt by nastal, pokud bychom pacientovi při transfúzi podali neodpovídající krevní skupinu.



Výsledek

A

B

AB

0

red blood cells from individuals of type				
serum from individuals of type	AB	O	B	A
A Anti B antibodies	 agglutination	 no agglutination	 agglutination	 no agglutination
B Anti A antibodies	 agglutination	 no agglutination	 no agglutination	 agglutination
O Anti A + B antibodies	 agglutination	 no agglutination	 agglutination	 agglutination
AB no antibodies to A or B	 no agglutination	 no agglutination	 no agglutination	 no agglutination

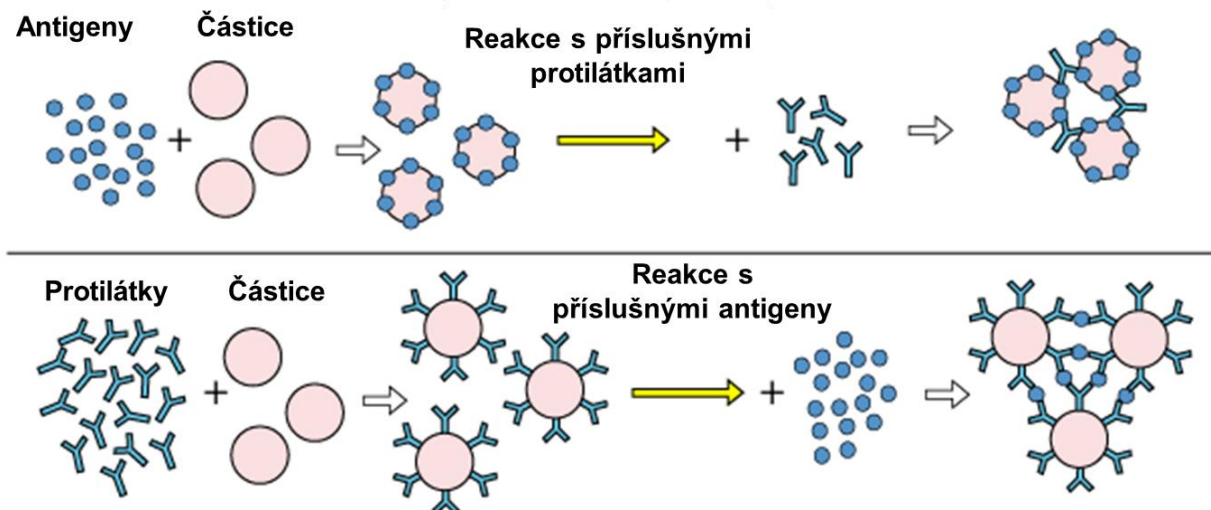
Pasivní (nepřímá) aglutinace na nosičích

Princip: využití nosičů – latexové částice (dříve červené krvinky)

- vazba antigenu a následně dochází k aglutinační reakci se specifickými protilátkami
- vazba protilátek na nosič a následně dochází k aglutinaci s antigeny

Příklad použití: detekce rozpustných antigenů v séru, detekce mikroorganismů, původce onemocnění, využití v potravinářství – falšování mléka, atd..

Multi-epitopické částice / polyklonální Ab



Imunochemické metody

jsou rozděleny na základě vzniku:

precipitátu (aglutinátu) nebo rozpustného imunokomplexu



**PRECIPITAČNÍ
METODY**



**NEPRECIPITAČNÍ
METODY**

VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

NEPRECIPITAČNÍ METODY

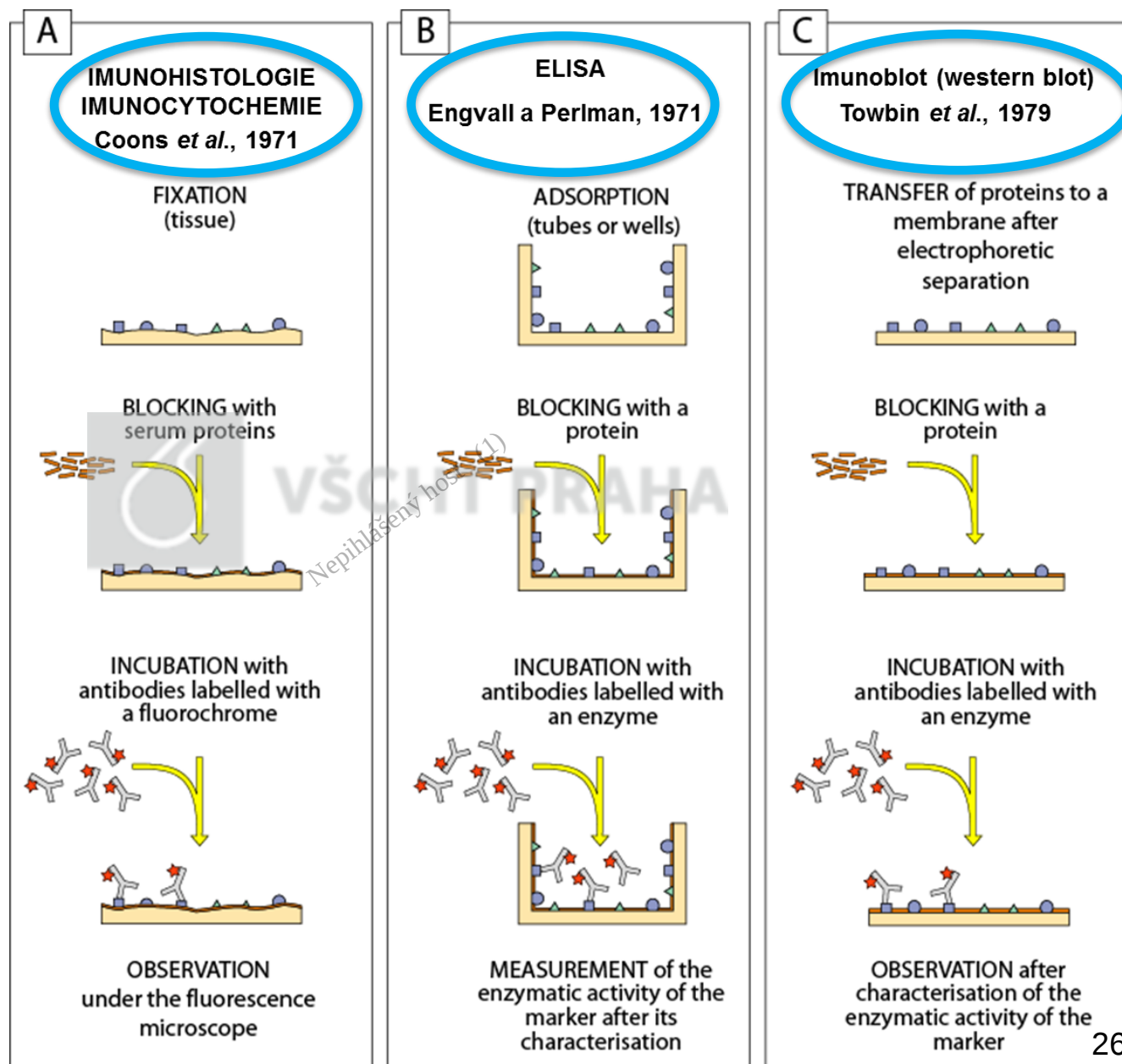
- SE ZNAČKOU

- radioimunoanalýza (**RIA**)
- enzymová imunoanalýza (**EIA**) – kompetitivní, nekompetitivní, heterogenní, homogenní, **ELISA** (Enzymová munoanalýza na pevné fázi – Enzyme linked immunosorbent assay), **imunoblot**
- fluorescenční imunoanalýza (**FIA**), chemiluminiscenční imunoanalýza (**CIA**)
- lateral flow immunoassay (**LFIA**) – imunochromatografická metoda, značka – barevná částice (latex, uhlík, zlato)
- průtoková cytometrie

- BEZ ZNAČKY

- imunoafinitní chromatografie
- imunosenzory

3 klíčové metody



NEPRECIPITAČNÍ METODY – se značkou



<https://www.rndsystems.com/products/secondary-antibodies>

PRIMÁRNÍ protilátka

váže se přímo na cílový
analyt



Přímá
imunodetekce



SEKUNDÁRNÍ protilátka

váže se na protilátku, která
je již navázaná na cílový
antigen



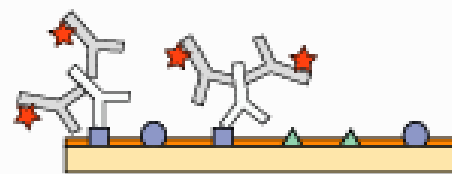
Nepřímá
imunodetekce

NEPRECIPITAČNÍ METODY – se značkou



**Přímá
imunodetekce**

- Zaznamenaný signál je dán značkou vázanou na antigen nebo protilátku specifickou proti antigenu
- Dražší metoda, může dojít k inaktivace protilátky navázáním značky
- Rychlejší metoda, snížení pravděpodobnosti na nespecifické interakce



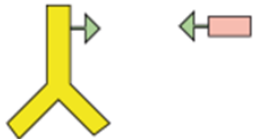
**Nepřímá
imunodetekce**

- Zaznamenaný signál není od antigenu nebo protilátky proti antigenu.
- Použití druhé (sekundární) protilátky specifické proti primární protilátce, respektive proti imunoglobulinům organismu, ve kterém byla protilátka připravena
- Zesílení signálu, levnější metoda přípravy protilátky – známé postupy („**univerzální značka**“)
- Delší metoda – více kroků, zvyšuje se pravděpodobnost nespecifických interakcí

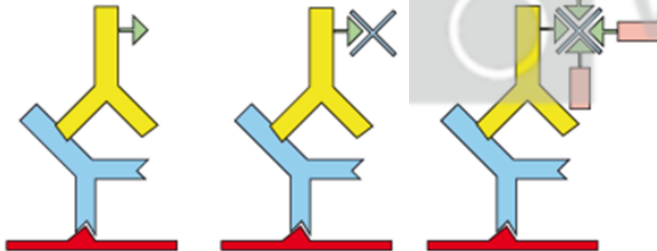
System Biotin-streptavidin

- Zesílení signálu

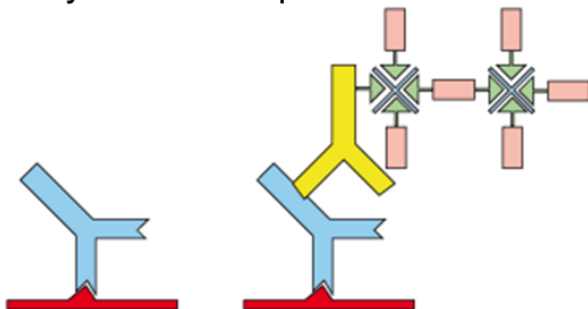
1 Biotinylace protilátky a enzymu



2 Streptavidinový můstek



3 Vytvoření komplexu



Streptavidin: protein o hmotnosti 60 kDa ze *Streptomyces avidii*

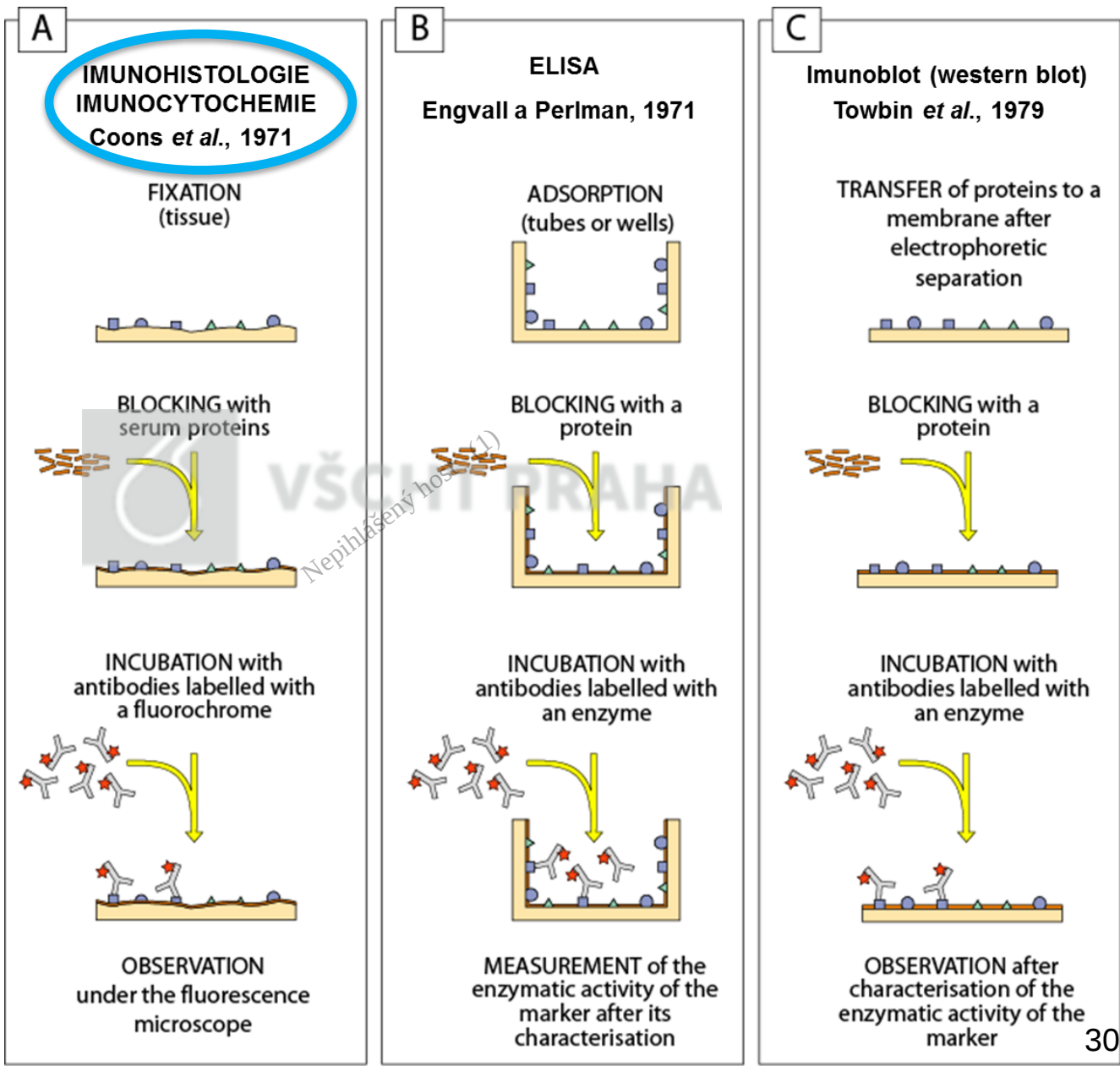


Biotin: vitamin s aviditou ke streptavidinu



Enzym: (alkalická fosfatasa, peroxidasa,...)

3 klíčové metody



IMUNOHISTOCHEMIE, IMUNOCYTOCHEMIE, IMUNOFLOURESCENCE

Imunohistochemie je metoda detekce specifických cílových antigenů (proteinů) v řezech tkáně pomocí protilátek.

Imunocytochemie využívá podobné techniky pro lokalizaci buněčných proteinů v buněčných preparátech.

Imunofluorescence je účinnou metodou pro vizualizaci proteinů exprimovaných přímo v tkáních. Metoda kombinuje imunologii a fluorescenční molekuly a tím lokalizuje proteiny v definovaných morfologických strukturách

- užitečné nástroje, které poskytují přehled o genové expresi, prostorových vztazích a identifikaci biomarkerů v širokém spektru aplikací
- využití: základní výzkum, hodnocení normálních a chorobných stavů v lidských a zvířecích tkáních a hodnocení patologie rostlin.





1

2

1) Fixace buněk/tkáně:

- zastavení buněčných pochodů, uchování přirozeného tvaru, ochrana před degradací
- methanol, formaldehyd, para-formaldehyd, aceton, mrazová fixace ...

2) Odmaskování antigenu - permeabilizace:

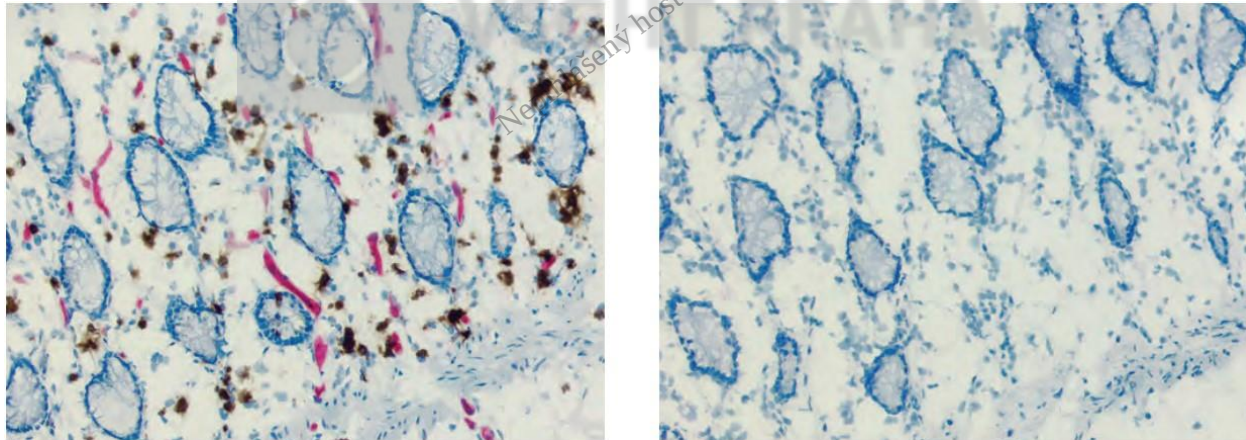
- vytvoření póru v membráně pro průchod protilátek
- Triton X-100, saponin, ...



3

3) Blokování:

- minimalizace pozadí vznikající aktivitou endogenních enzymů, biotinu, nespecifických interakcí protilátek, a nespecifických vazeb tkáňových prvků (nabitě částice, makromolekuly, Fc receptory) s detekčními činidly
- BSA, kasein, sérum,...



Aktivita endogenní alkalické fosfatasy (AP) a peroxidasy (HRP) v řezu zmrzlé tkáně střeva fixované acetonem zobrazená pomocí Vector® Red AP substrátu (purpurová) a ImmPACT™ DAB HRP substrátu (hnědá), (vlevo). Stejně substráty použité v tkáních ošetřených roztokem BLOXALL™ (vpravo). Blokovací roztok BLOXALL™ zcela eliminuje aktivitu obou endogenních enzymů

<https://www.baria.cz/blokovani-signalu-na-pozadi/>

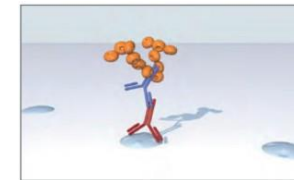


4) Inkubace s protilátkami:

- přímá imunodetekce
- nepřímá imunodetekce (nejpoužívanější)

4

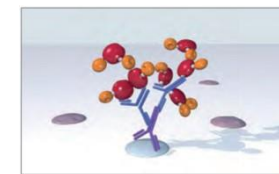
→ **sekundární protilátky konjugované s enzymem** (AP, HRP)



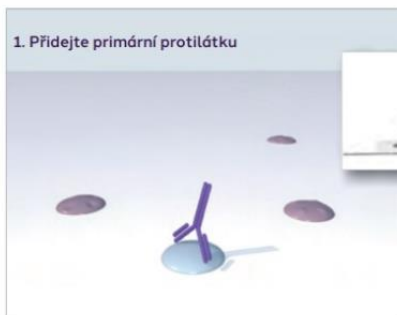
jednokrokové

→ **biotinylované sekundární protilátky**

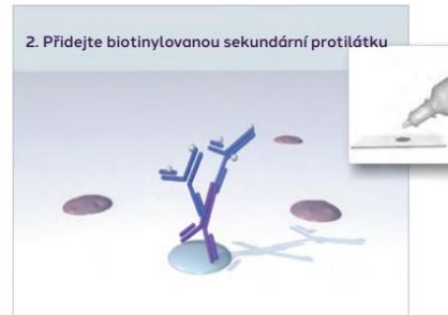
→ **enzymové konjugáty avidinu a streptavidinu**



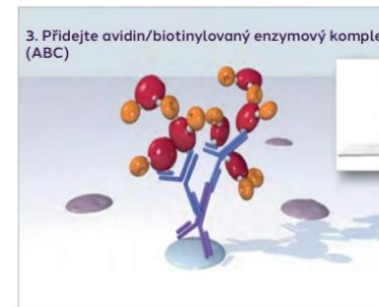
dvoukrokové,
na bázi biotinu



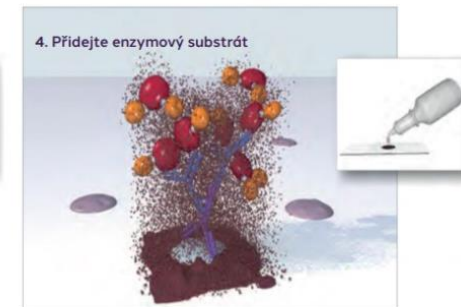
1. Přidejte primární protilátku



2. Přidejte biotinylovanou sekundární protilátku



3. Přidejte avidin/biotinylovaný enzymový komplex (ABC)



4. Přidejte enzymový substrát

VECTASTAIN® ABC Systémy

→ **protilátka značené „značkou neviditelnou v normálním světle“**

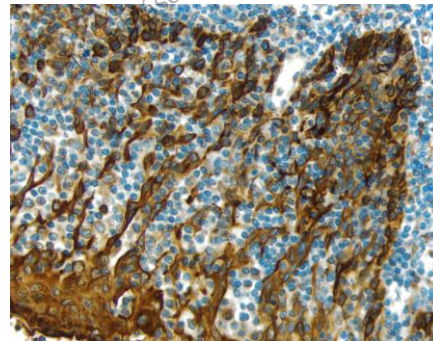


5

6

5) Kontrastní barvivo:

- zavádí barvu do specifických buněčných struktur, aby poskytla kontrast k barevnému enzymovému substrátu
- pomáhá při vizualizaci a cílové lokalizaci, usnadňuje interpretaci morfologie a buněčných struktur uvnitř řezu tkáně
- jádrové kontrastní barvivo – modré (hematoxylin), zelené nebo červené



<https://eshop.baria.cz/z1416368-hematoxylin-500ml>

6) Montovací médium:

- v případě imunofluorescenčního barvení se používají montovací média, která snižují vysvěcování fluoroforů (značka na protilátce)
- např. kanadský balzám, glycerinová želatina, sirup z arabské gummy, glycerin



7)Vizualizace - Mikroskopie a zobrazování

- cílový antigen, vázaný detekční protilátkou, se vizualizuje za použití buď chromogenní nebo fluorescenční detekce
- při chromogenní detekci je detekční protilátka konjugována s enzymem (křenová peroxidáza nebo alkalická fosfatáza)

enzym katalyzuje konverzi příslušného chromogenu na barevnou sraženinu v místě antigenu

sraženina může být vizualizována pomocí **světelné mikroskopie**

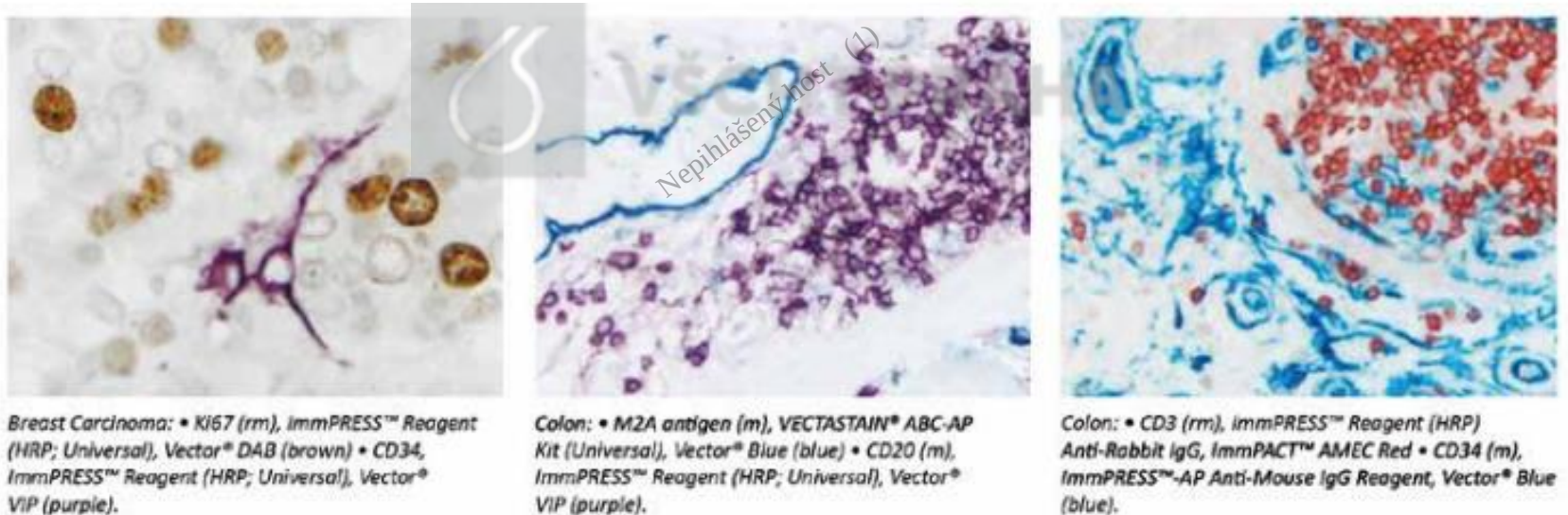
- některé chromogeny mohou být vizualizovány za použití elektronové, fluorescenční mikroskopie nebo mikroskopie temného pole

je-li detekční protilátka konjugována s fluoroforem, lze cílový antigen vizualizovat pomocí **fluorescenční mikroskopie**

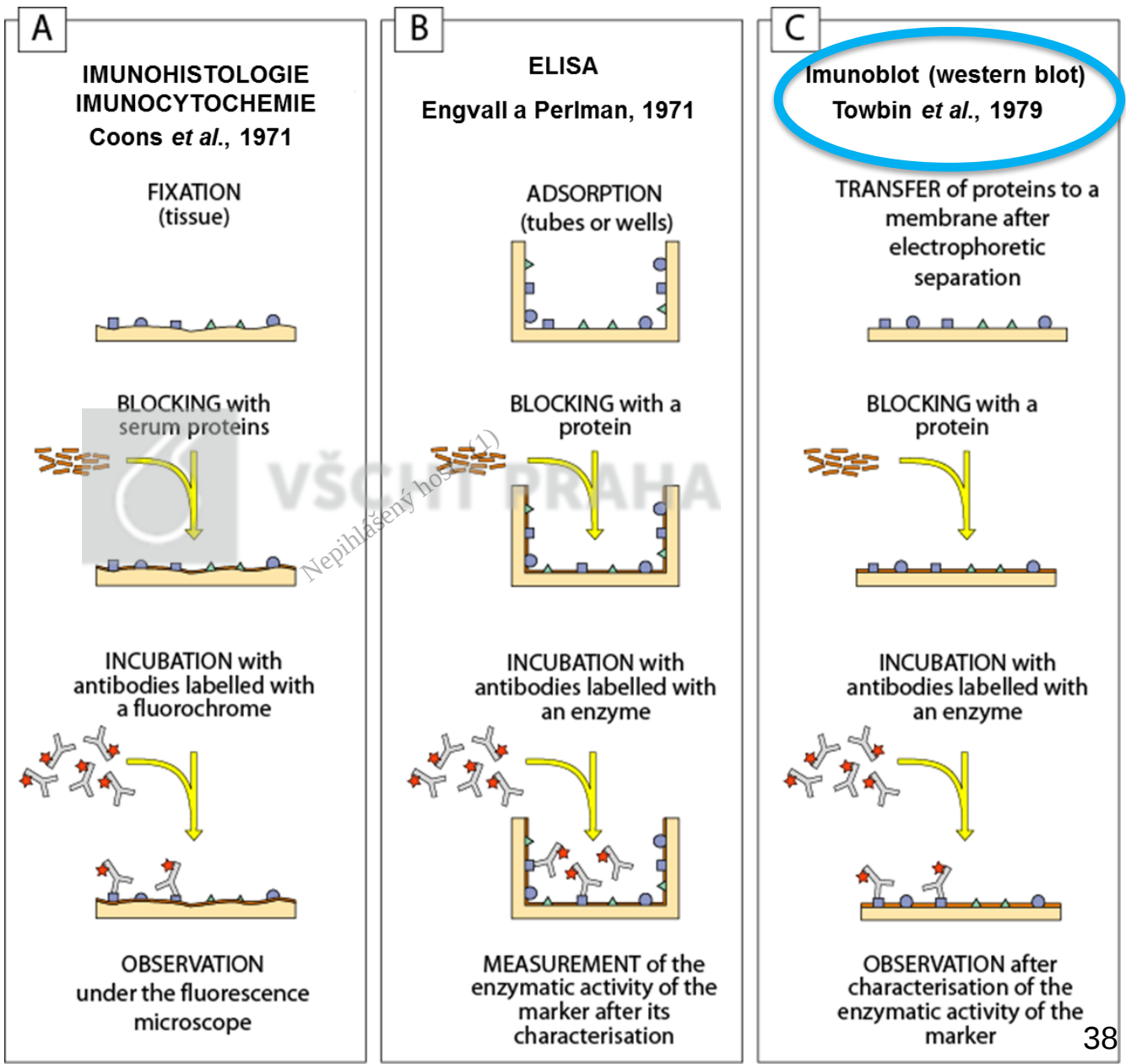


7)Vizualizace - Mikroskopie a zobrazování

- značení více antigenů



3 klíčové metody



Blotování - přenos

- **Nukleové kyseliny**

- Southern blot - přenos DNA na membránu a následné stanovení přidáním próby
vyvinuta Edwinem Southernem – názvy zbylých metod jsou slovní hříčka..
- Northern blot (obdoba Southern blotu, ale pro RNA)

- **Proteiny**

- Western blot (česky také imunoblot) a následné stanovení (protilátky, ponceau S)
- Eastern blot – slouží k analýze posttranslačních modifikací proteinů (rozšíření western blotu)

Výhoda imunoblotu

- vyšší dostupnost bílkovin pro následnou detekci – nejčastěji imunochemickou
- „zakoncentrování“ bílkovin na membráně – zvýšení citlivosti detekce
- v elektroforetickém gelu toto není možné

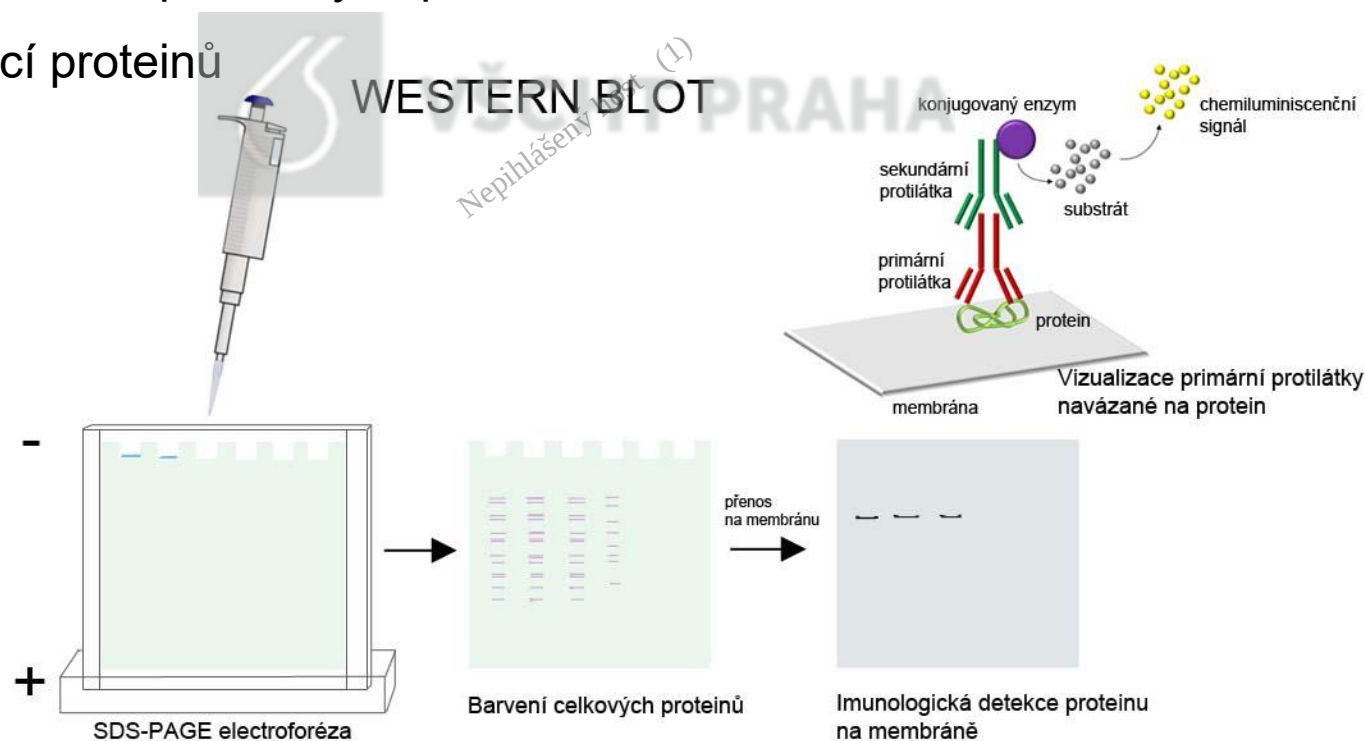
Towbinova metoda (1979)

- metoda používaná pro kvalitativní nebo semikvantitativní detekci určitého proteinu ve vzorku
- tvořena třemi základními kroky:

1 elektroforetickou separací proteinů (SDS-PAGE)

2 přenosem separovaných proteinů

3 detekcí proteinů



2 přenos separovaných proteinů

kapilární přenos (zátěžový)

- gel položen na porézní podložku a vrstvu filtračního papíru
- na povrchu gelu umístěna membrána, jedna vrstva vlhkého a několik vrstev suchého filtračního papíru
- celá sestava je zatížena; suchý filtrační papír nasává kapilárními silami přenosový pufr, unášeny jsou i bílkoviny z gelu na membránu



Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi

elektropřenos

- elektropřenos je nejúčinnější a nejrychlejší postup přenosu bílkovin
- podle provedení rozlišujeme tzv. "tankový" a "polosuchý" (semi-dry) způsob
- blotovacích jednotek může být mezi elektrodami umístěno několik
- nutné je umístit blotovací membránu při dané polaritě napájecího napětí a daném pH přenosového pufru na správnou stranu gelu, záměna znamená ztrátu bílkovin



Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi

2 přenos separovaných proteinů

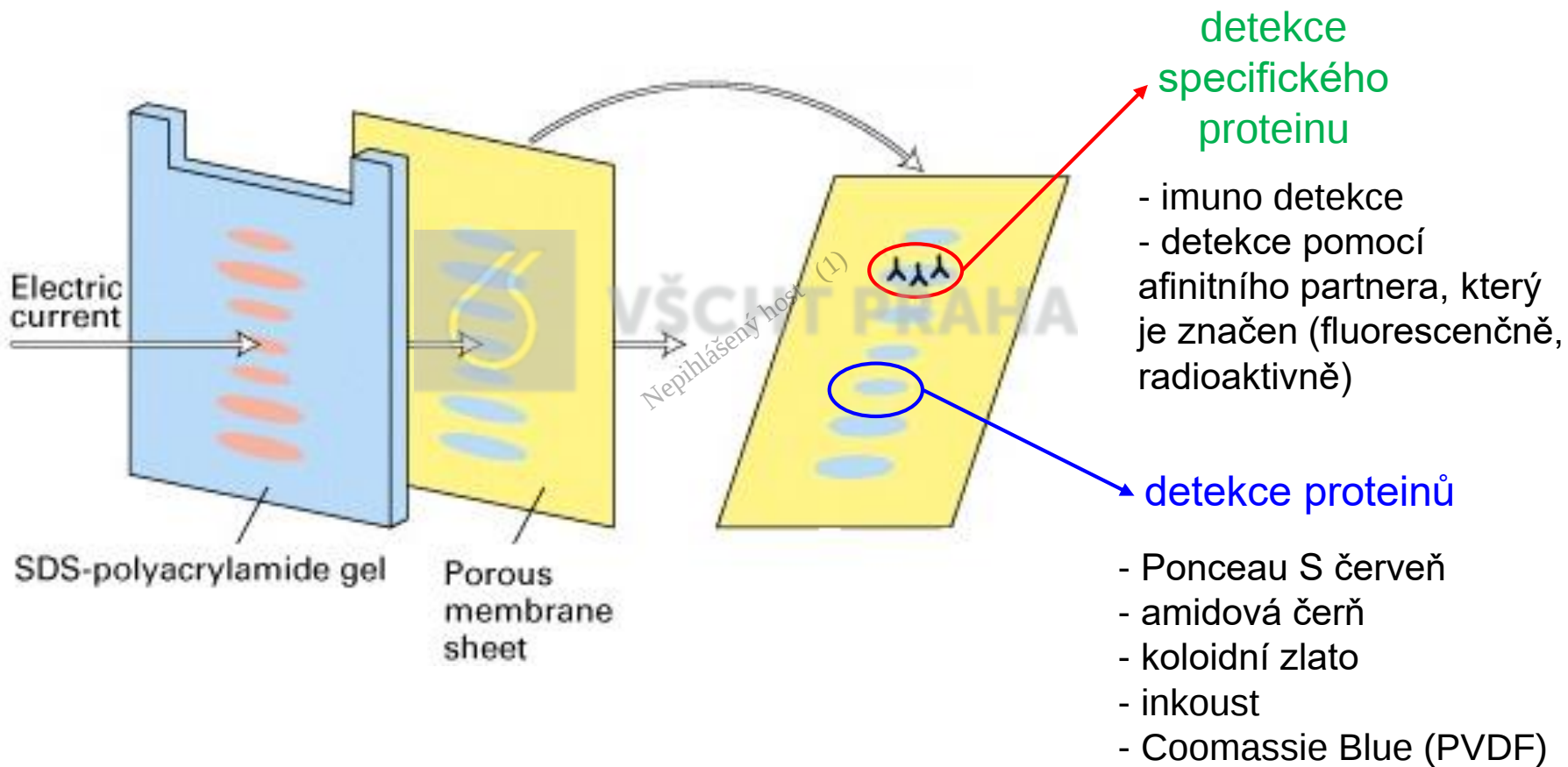
Používané membrány

- **nitrocelulosa** – nejběžnější (různé velikosti pórů – 0,2; 0,45 μm – dle velikosti přenášených bílkovin)
- **polyvinilidendifluorid (PVDF)** – vysoká vazebná kapacita, hydrofóbní
- **nylon** – pozitivně nabitá membrána, vysoká vazebná kapacita vysokomolekulárních látek (nukleové kyseliny, bílkoviny)



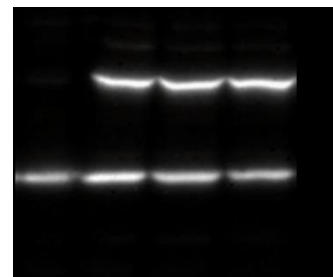
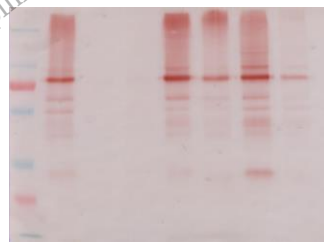
Mini Trans-Blot® Cell

3 detekce proteinů na membráně

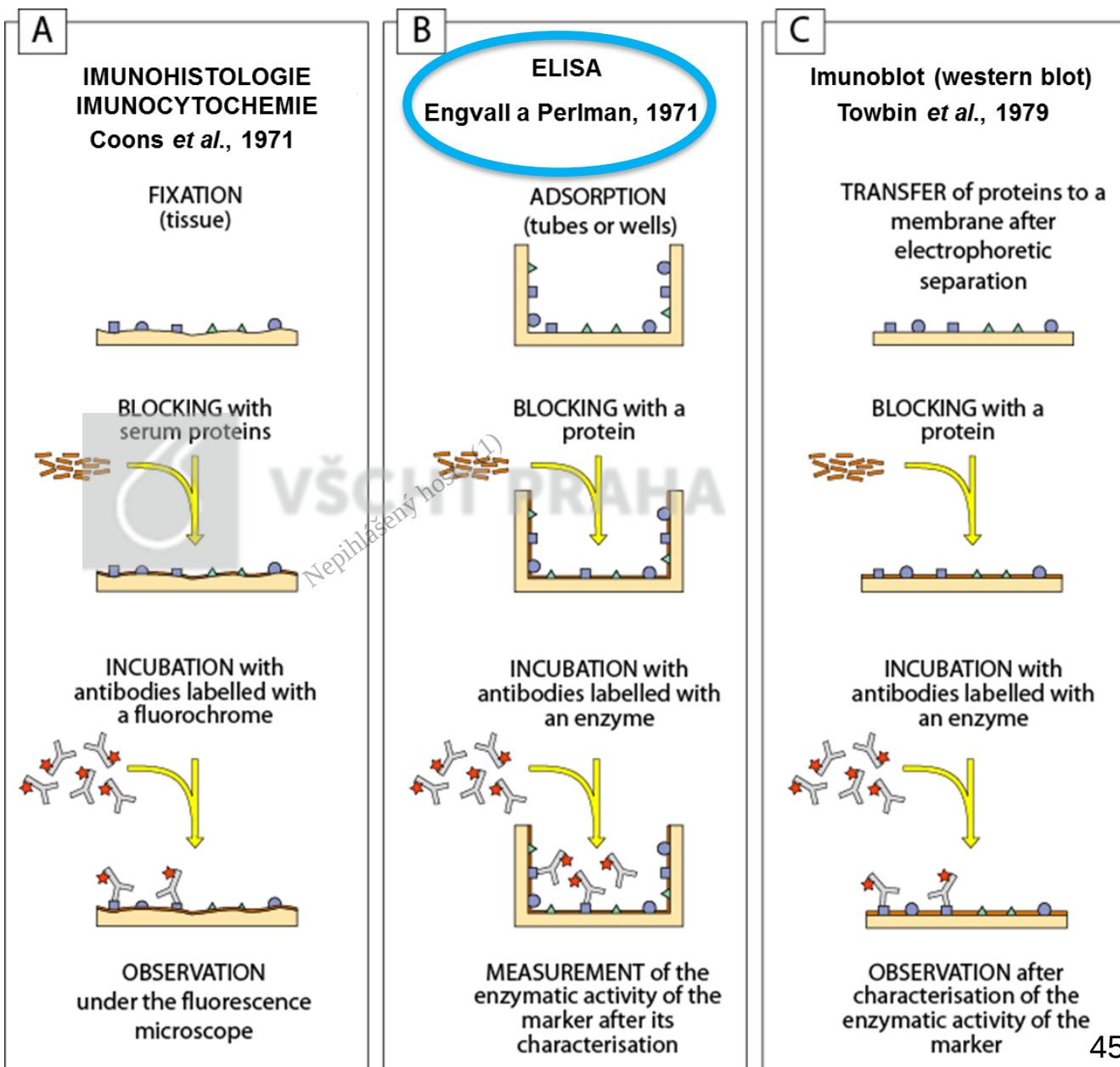


3 detekce proteinů na membráně

- Blokování (sycení) volných vazebných míst na membráně
 - BSA, odtučněné mléko
- Vazba protilátek
 - Primární
 - Sekundární (zvýšení citlivosti)
 - Konjugace se značkou (enzymová (peroxidasa, alkalická fosfatasa), fluorescenční, radioaktivní)
- Detekce
 - Chromogenní substrát
 - Chemiluminiscenční substrát



3 klíčové metody



NEPRECIPITAČNÍ METODY

RŮZNÉ FORMÁTY

- heterogenní, homogenní
- kompetitivní, nekompetitivní

ENZYMOVÁ IMUNOANALÝZA (EIA)

PŘÍKLADY

Western blot (imunoblot)

ELISA (Enzymová munoanalýza na pevné fázi; Enzyme linked immunosorbent assay)

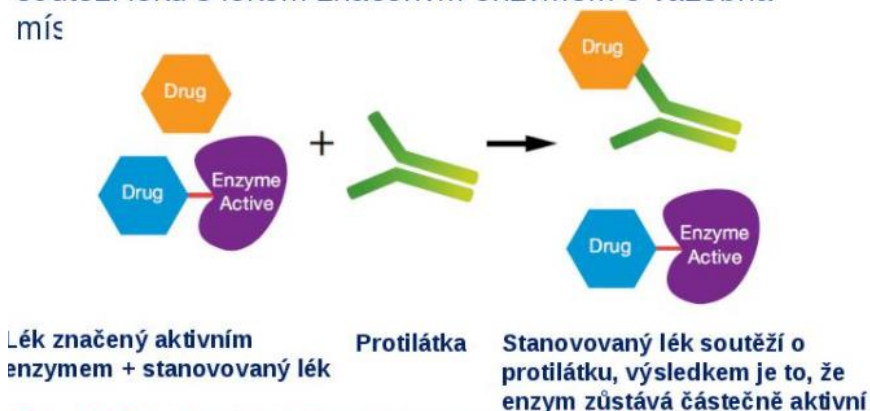
EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique)

Test založen na **kompetici** mezi látkou ve vzorku a látkou značenou enzymem **glukoso-6-fosfát dehydrogenázou** (G6PDH) o vazebná místa na protilátce



Vazbou protilátky na značený antigen dochází k inaktivaci enzymu

Po přidání vzorku obsahujícím stanovovaný lék dochází k soutěži léku s lékem značeným enzymem o vazebná místa



Čím větší je koncentrace stanovovaného léku ve vzorku, tím větší je stanovovaná aktivita enzymu

ELISA (Enzymová imunoanalýza na pevné fázi)

(Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Koncept byl vyvinut a poprvé popsán dvěma švédskými vědci: **Peter Perlmann** a **Eva Engvall** na Stockholmské univerzitě v roce **1971**



Eva Engvall



Peter Perlmann

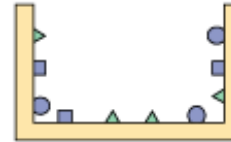
- zlatý standard pro titrační a detekční metody
- použití **96-jamkové** mikrotitrační destičky
- velké množství komerčně dostupných **kitů a souprav**
- spousta komerčně dostupných činidel (**sekundární Ab**)
- **automatizace** - materiál a přístroje jsou přizpůsobeny pro formát 96-jamkové destičky (multikanálové pipety, robotické stanice, promývačky, detekční systémy, ...)
- **univerzální** a **levný** materiál (polystyren)





1 – Adsorbce antigenu nebo protilátky

Adsorbce
(zkumavky nebo jamky)

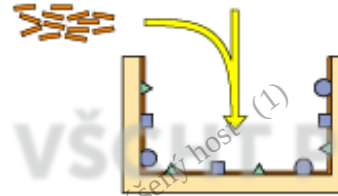


- Pro proteiny: 0,1 to 10 $\mu\text{g/ml}$
- Přes noc ve 4 °C nebo 2h při laboratorní teplotě, nebo 1h při 37 °C

Promytí

2 – Saturace

Blokace proteinem



- Promytí PBS + Tween 20 (0,1%)
- K saturaci volných vazebných míst
- BSA, mléko, želatina,...

Promytí

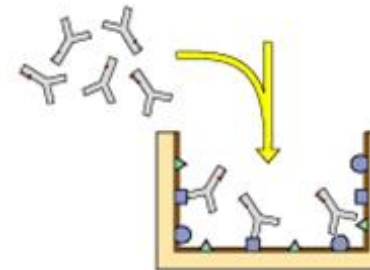
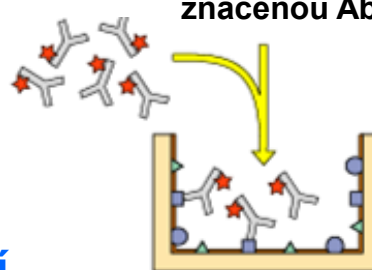
3 – Inkubace

přímá

nepřímá

INKUBACE s
enzymaticky
značenou Ab

INKUBACE s
neznačenou Ab



Promytí

Možné enzymy

Peroxidasa

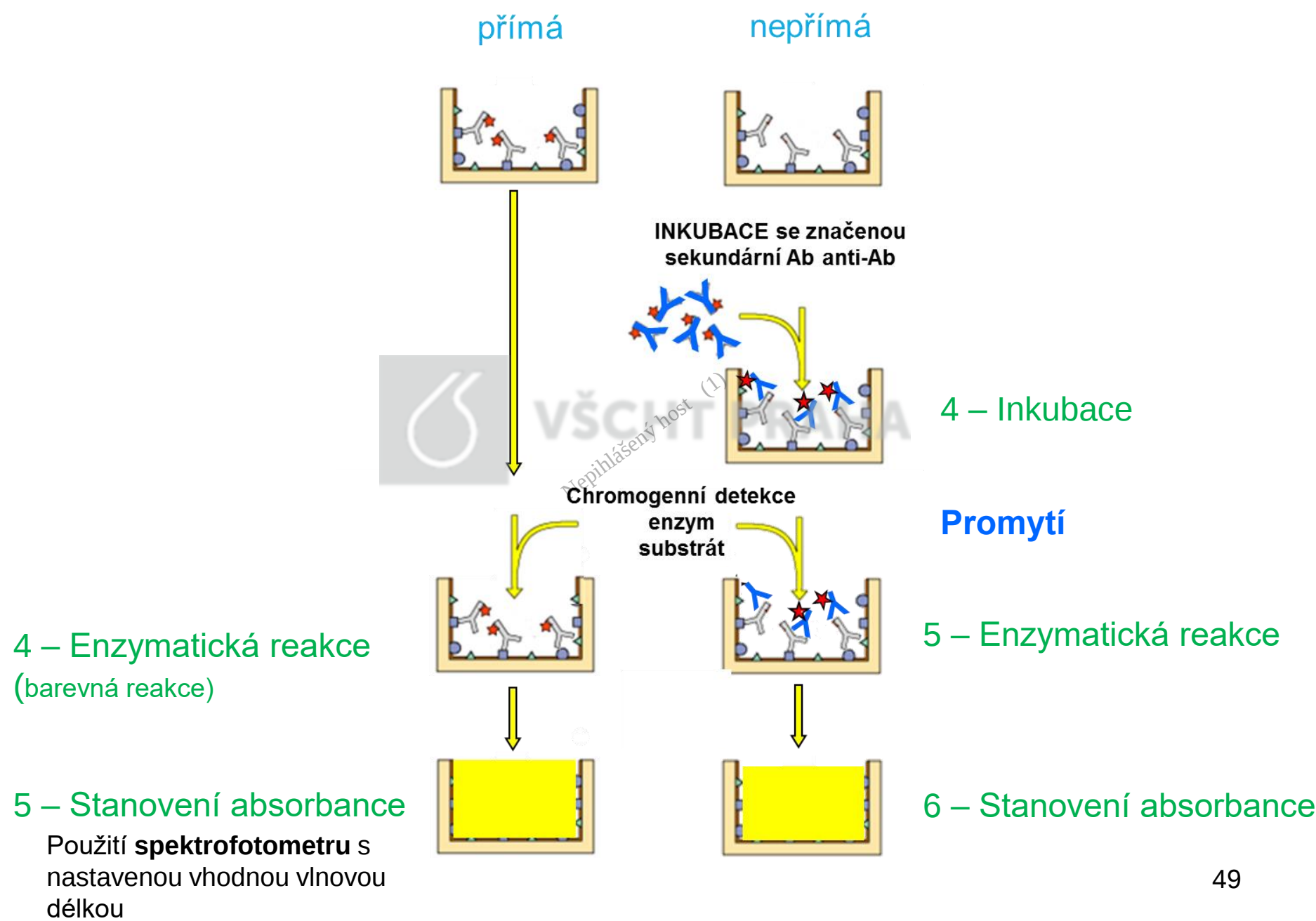
Alkalická fosfatasa

β -galaktosidasa

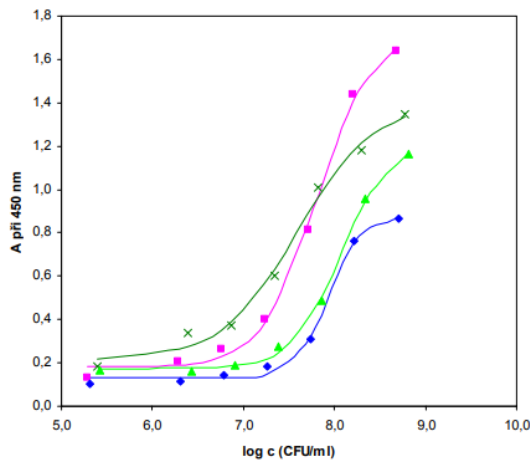
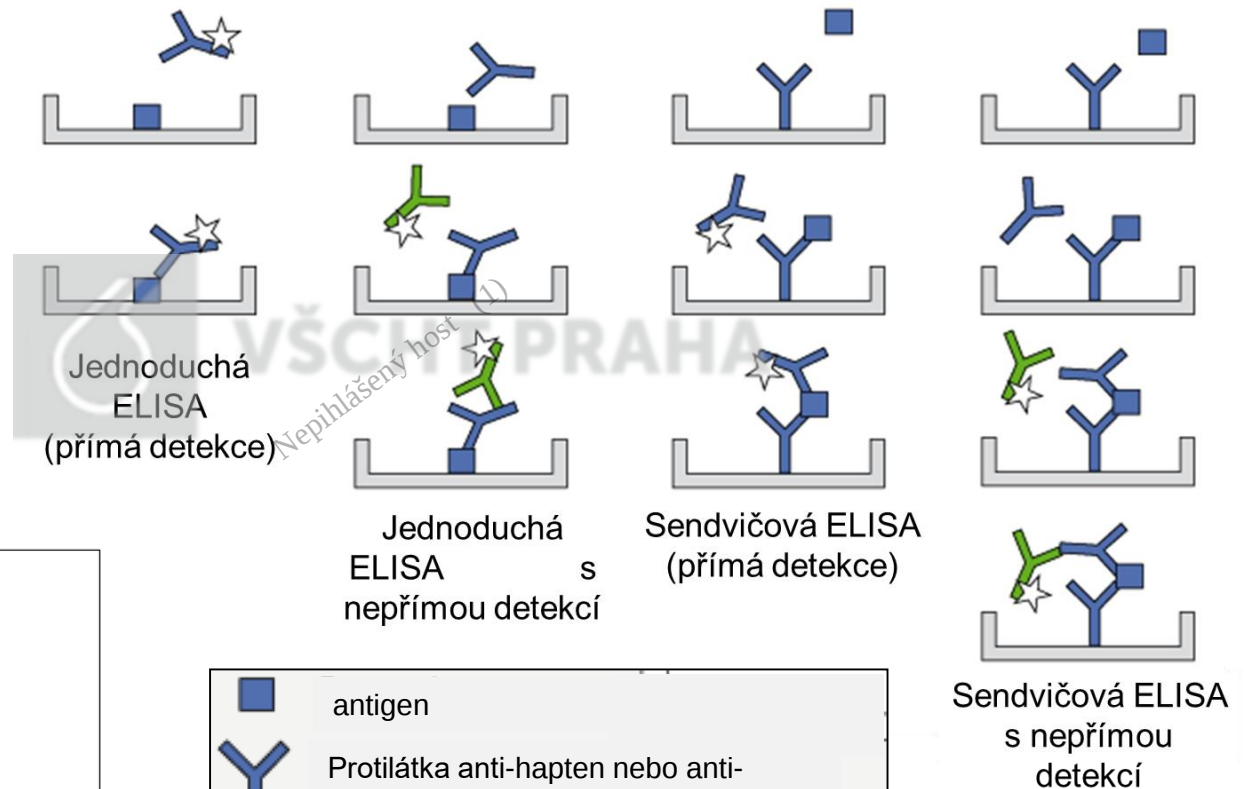
Acetylcholinesterasa

Glukosaoxidasa

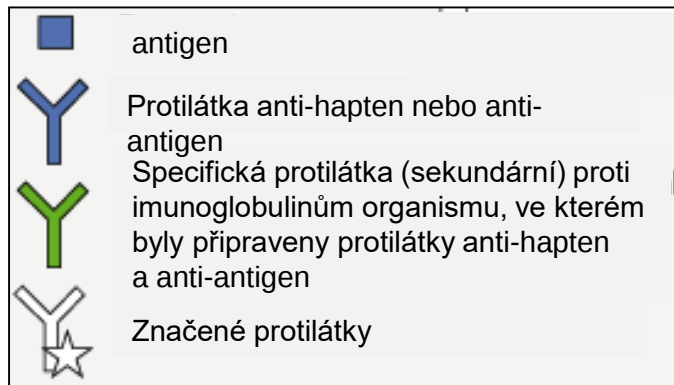
ELISA – všeobecné základy



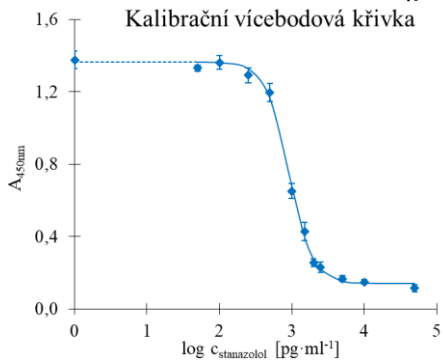
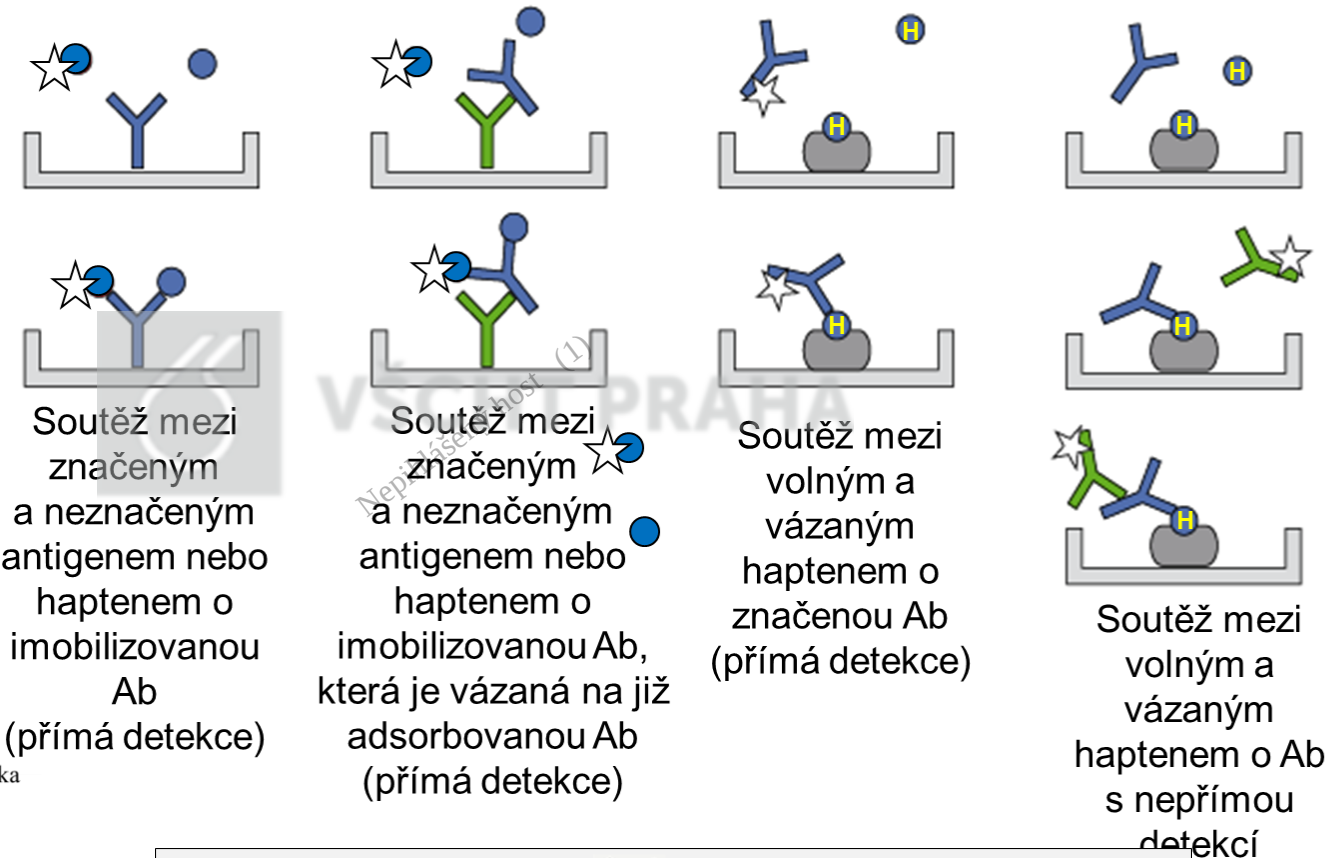
Formáty nekompetitivní ELISA



Obr. : Kalibrační křivky pro stanovení *L. monocytogenes* 88/049 za použití jednotlivých protilátek v přímé sendvičové ELISA.

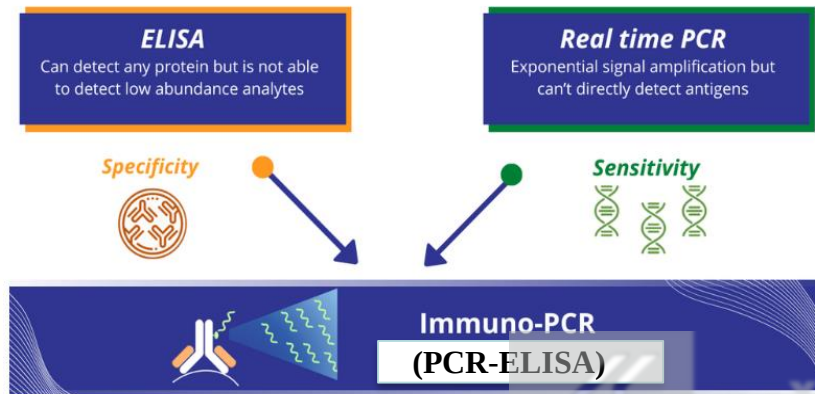


Formáty kompetitivní ELISA



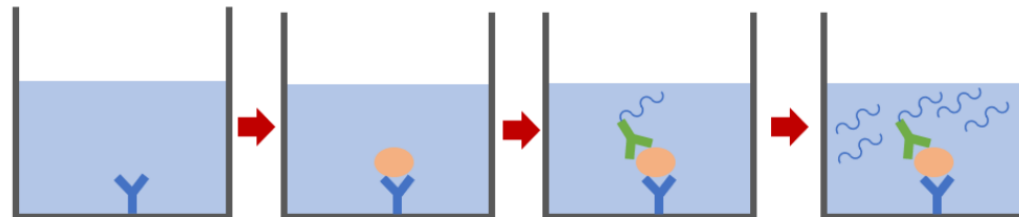
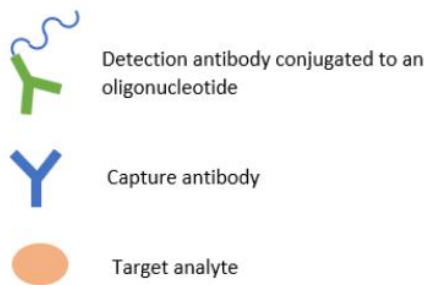
	Volný haptén nebo antigen		Protilátka anti-haptén nebo anti-antigen
	Značený haptén nebo antigen		Specifická protilátka (sekundární) proti imunoglobulinům organismu, ve kterém byly připraveny protilátky anti-haptén a anti-antigen
	Imobilizovaný haptén na nosič (protein)		Značené protilátky

PCR-ELISA využití konjugátu protilátky s oligonukleotidem



- poskytuje exponenciální zesílení signálu
- vysoce citlivý – dokáže detekovat malá množství analytu (pg – fg)
- 100-1000 × citlivější než ELISA
- méně inkubačních kroků zlepšuje reprodukovatelnost testu
- vyžaduje pouze malé objemy vzorků
- kompatibilní s komplexními vzorky

Princip:



Radioimunoanalýza (RIA)

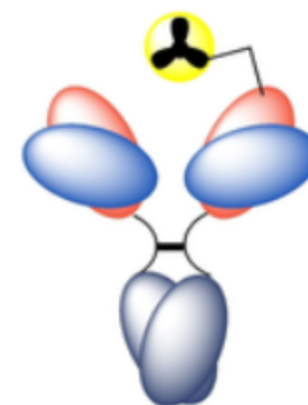
- v r. 1959 byla zveřejněna průkopnická práce S. A. Bersona a R. S. Yalow (Quantitative aspects between insulin and insulin-binding antibody, *J. Clin. Invest.*, 1959) S využitím radioaktivně značeného analogu insulinu (izotop jodu ^{131}I) – později udělena Nobelova cena.
- pokračováním práce a publikací výsledků výzkumu (Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.*, 1960; 39:1157-75), byl položen základ kvantitativních analytických metod, založených na interakci antigen-protilátka, které se nazývají imunoanalytické metody = imunoanalýzy.
- velké množství variant
- citlivá a levná metoda
- dnes nahrazována neizotopovými imunoanalytickými metodami



S. A. Bersona a R. S. Yalow

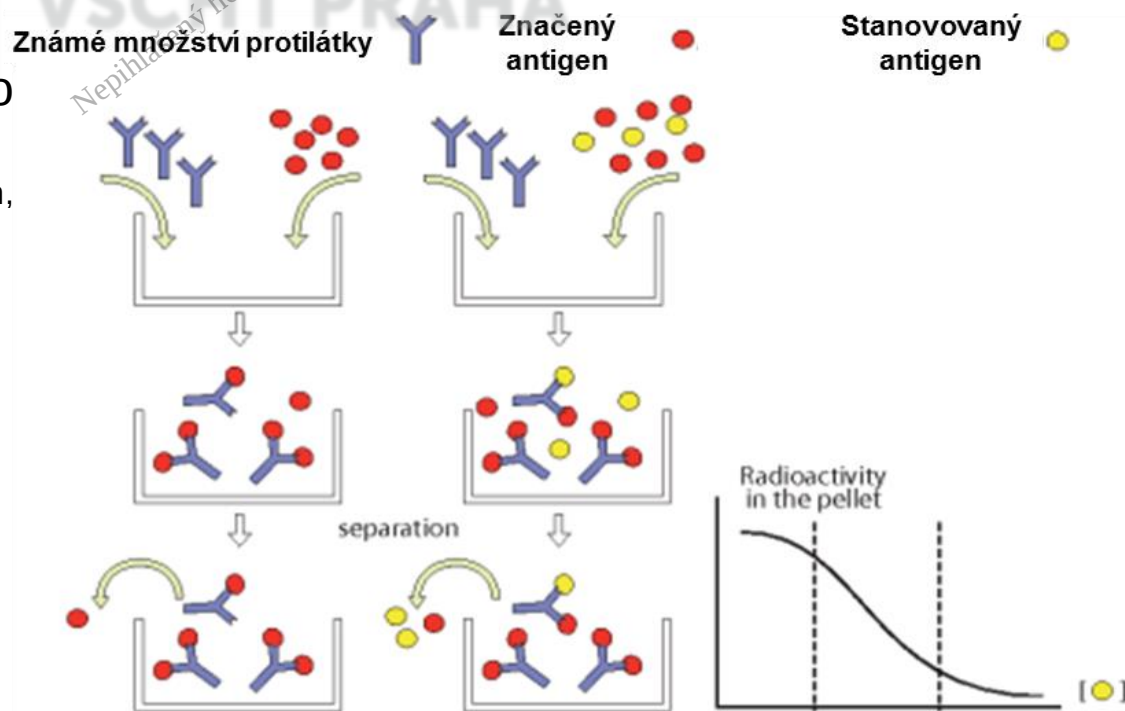
Radioimunoanalýza (RIA)

- termínem **RIA** se v užším smyslu rozumí **kompetitivní radioimunoanalýza** v heterogenním uspořádání
- nekompetitivní modifikace na sendvičovém principu se nazývá **imunoradiometrická analýza**, Immunoradiometric Assay, **IRMA**
- radioimunoanalýza může kompletně probíhat v **kapalné fázi** (RIA) nebo s **použitím pevné fáze** (RIA, IRMA)



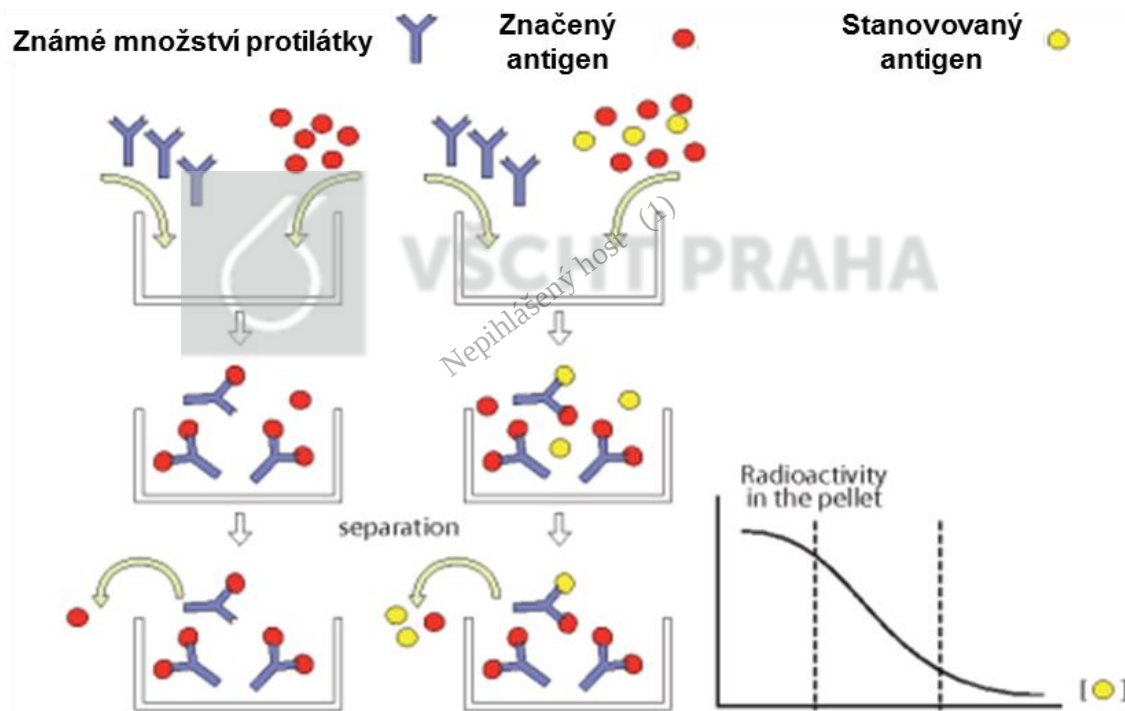
Kompetitivní heterogenní RIA v kapalně fázi

- "soutěží" stanovovaný antigen (např. ze séra), s antigenem značeným o vazbu na omezené množství vazebných míst specifických protilátek
- vznikají komplexy:
[antigen séra + protilátka] a [značený antigen + protilátka]
- po ukončené imunoreakci zůstávají v roztoku přítomny ještě nezreagované molekuly značeného antigenu
- je možno měřit jak komplex [značený antigen + protilátka], tak zůstávající značený antigen
- Druhou složku je nutno předem odstranit
 - srážením (např. polyethylenglykolem, acetonem, trichloroctovou kyselinou)
 - koprecipitací pomocí druhé protilátky
 - adsorpcí na vhodný sorbent (aktivní uhlí)
 - + následnou centrifugací
- ^{125}I je gama-zářič, měříme radioaktivitu detektorem gama-záření



Kompetitivní heterogenní RIA v kapalně fázi

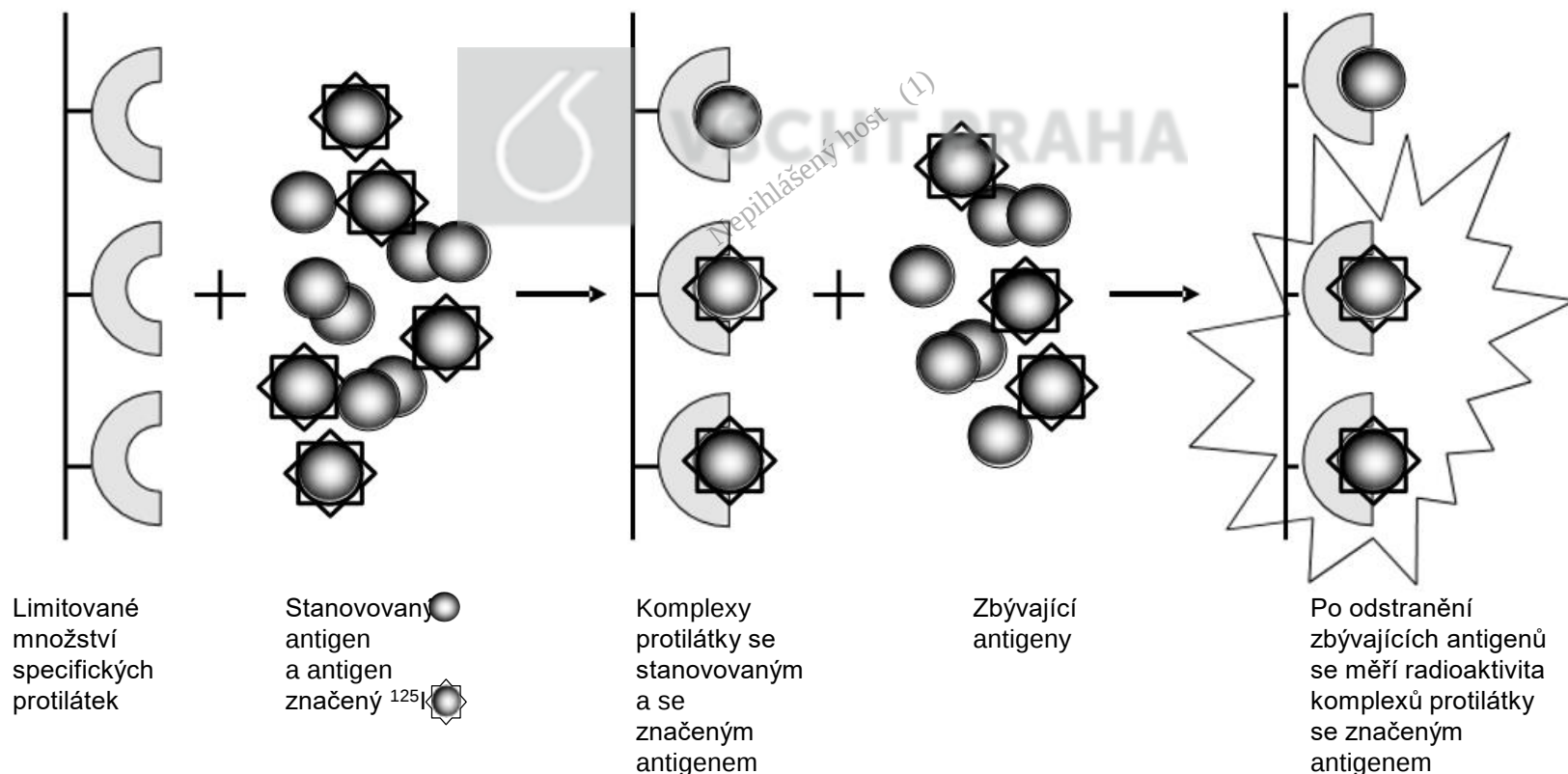
- Jestliže se měří komplex [značený antigen + protilátka], což je častější případ, je mezi velikostí naměřeného signálu a koncentrací antigenu ve vzorku nepřímá závislost.



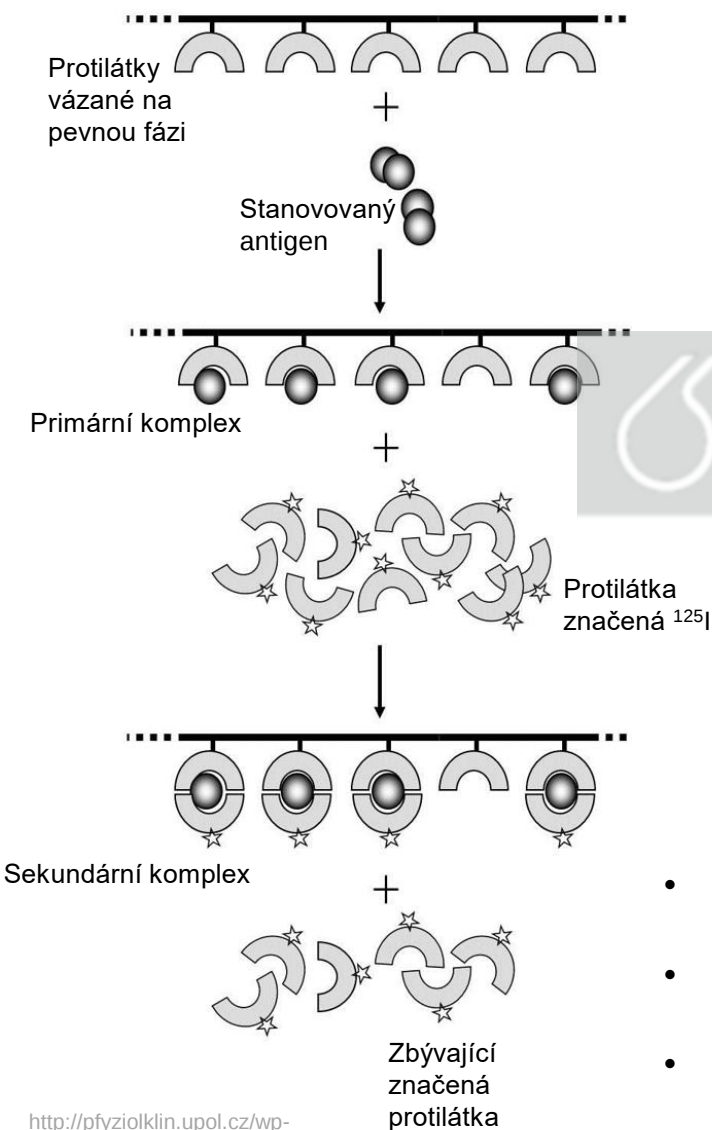
- Když se měří radioaktivita zbývajícího značeného antigenu, je mezi velikostí signálu a koncentrací antigenu přímá závislost.

Kompetitivní heterogenní RIA v pevné fázi

- protilátka vázána na různé typy materiálů – imunosorbentů (částice celulózy, polyakrylamidu, dextranu (Sephadexu), nebo vnitřní stěny zkumavek a mikrotitračních destiček z plastických hmot, nebo také feromagnetické částice)
- imunokomplexy se potom nemusejí oddělovat srážením, ale pouhou centrifugací nebo s využitím magnetického pole



Nekompetitivní imunoradiometrická analýza (IRMA)



na pevnou fázi, např. na stěnu zkumavek nebo mikrotitračních destiček, je navázána specifická protilátka proti stanovovanému antigenu

přidáním vyšetřovaného vzorku.

vznik primárního komplexu [vázaná protilátka + stanovovaný antigen]

po vypláchnutí zbytku vzorku se přidá nadbytek značené protilátky proti stejnému antigenu

vznik většího sekundárního komplexu [vázaná protilátka + stanovovaný antigen + značená protilátka]

- Po odstranění zbývajících značených protilátek se měří radioaktivita sekundárního komplexu.
- Čím více je stanovovaného antigenu ve vzorku, tím více se vytvoří sekundárního imunního komplexu, který se měří.
- Mezi velikostí naměřeného signálu a koncentrací stanovovaného antigenu ve vzorku je přímá závislost.

Nekompetitivní imunoradiometrická analýza (IRMA)

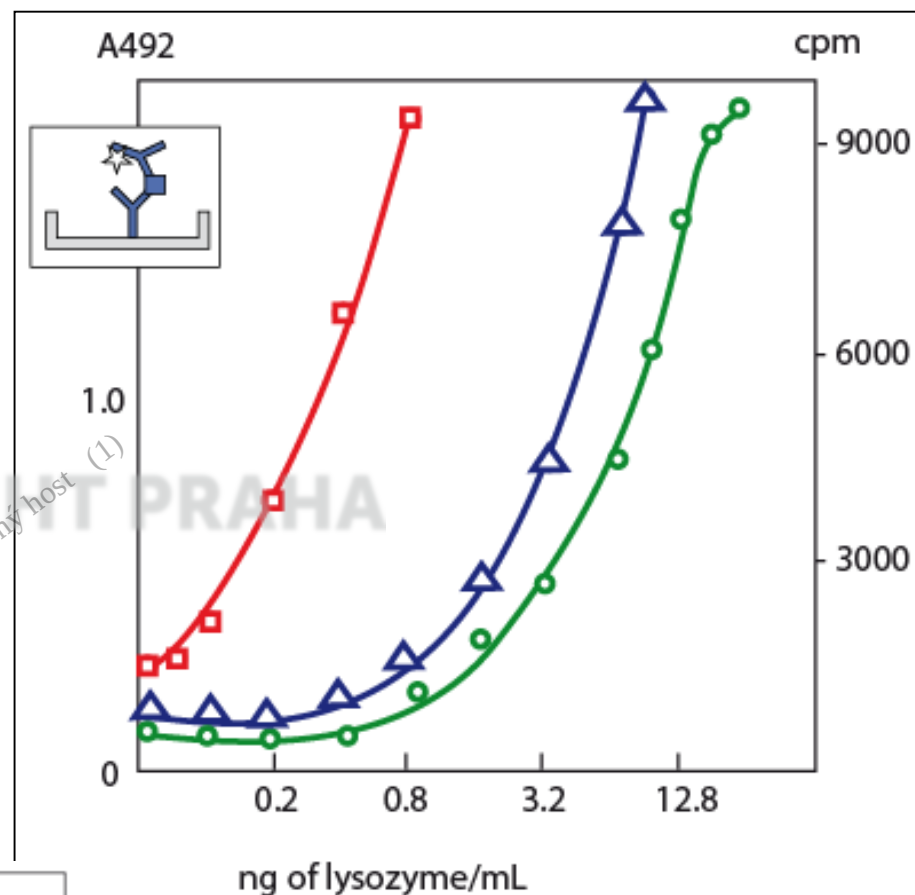
- Pro tuto techniku se s výhodou používají monoklonální protilátky s vyšší specifitou.
- Předností IRMA je jednoduchost provedení, vysoká citlivost a možnost automatizace.
- Jak vyplývá z popsaného principu, metoda se používá pro stanovení větších a velkých molekul, které musí obsahovat alespoň 2 dostatečně stericky vzdálené antigenní determinanty.

Porovnání citlivosti RIA a ELISA

Příklad: titrace stejného Ag lysozymu z kuřecího vejce se stejnou polyklonální Ab v sendvičovém formátu



Nepřehlášený host (1)



—□— IgG-biotin

—△— IgG-¹²⁵I

—○— IgG-peroxidase

A492: absorbance at 492 nm for peroxidase label (□ ○)

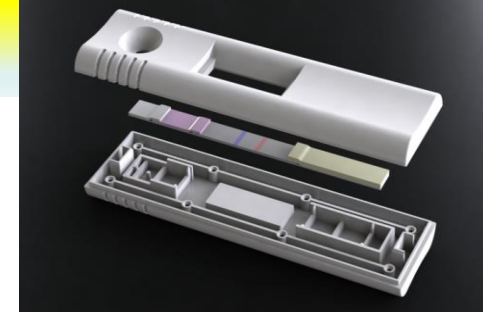
cpm: counts per minute for ¹²⁵I label (△)

Kalibrační křivka lysozymu z kuřecího vejce za použití
různého značení protilátek při sendvičové ELISA

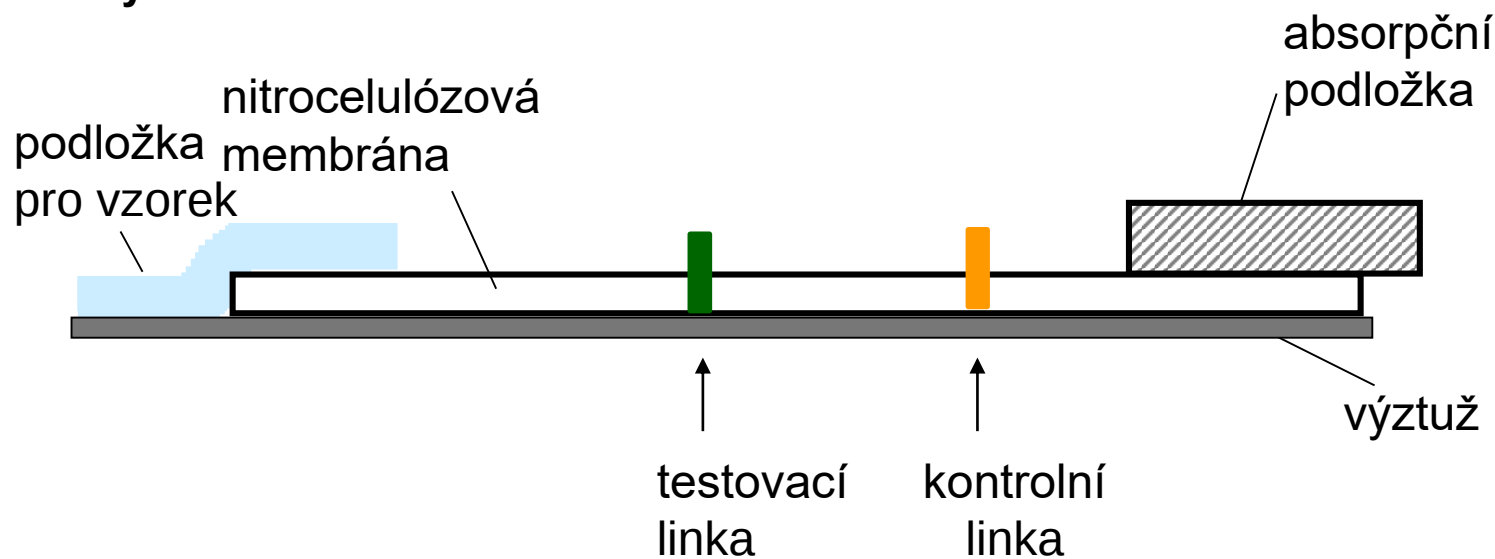
From Rauch P, Hochel I, Vodrazka I, Rumlova Z, Kas J, Guesdon JL (1989). Comparison of Hen Egg Lysozyme Immunoassays on Different labels. Agr. Food Immunol. 1: 65-70.

Imunochromatografický test (ICT, LFIA)

- v současnosti obrovský hit
- jeden z imunoreaktantů je vázán na částice – uhlíkaté, zlaté, křemičité
- jiný imunoreaktant vázán na membráně
- kombinace chromatografického principu + vznik imunokomplexu
- výsledek je rozlišitelný okem
- velmi jednoduché a rychlé provedení
- **multianalytová detekce**



Zdroj: DCN Diagnostics: Lateral Flow Assay Development; <https://cz.pinterest.com>; únor 2019



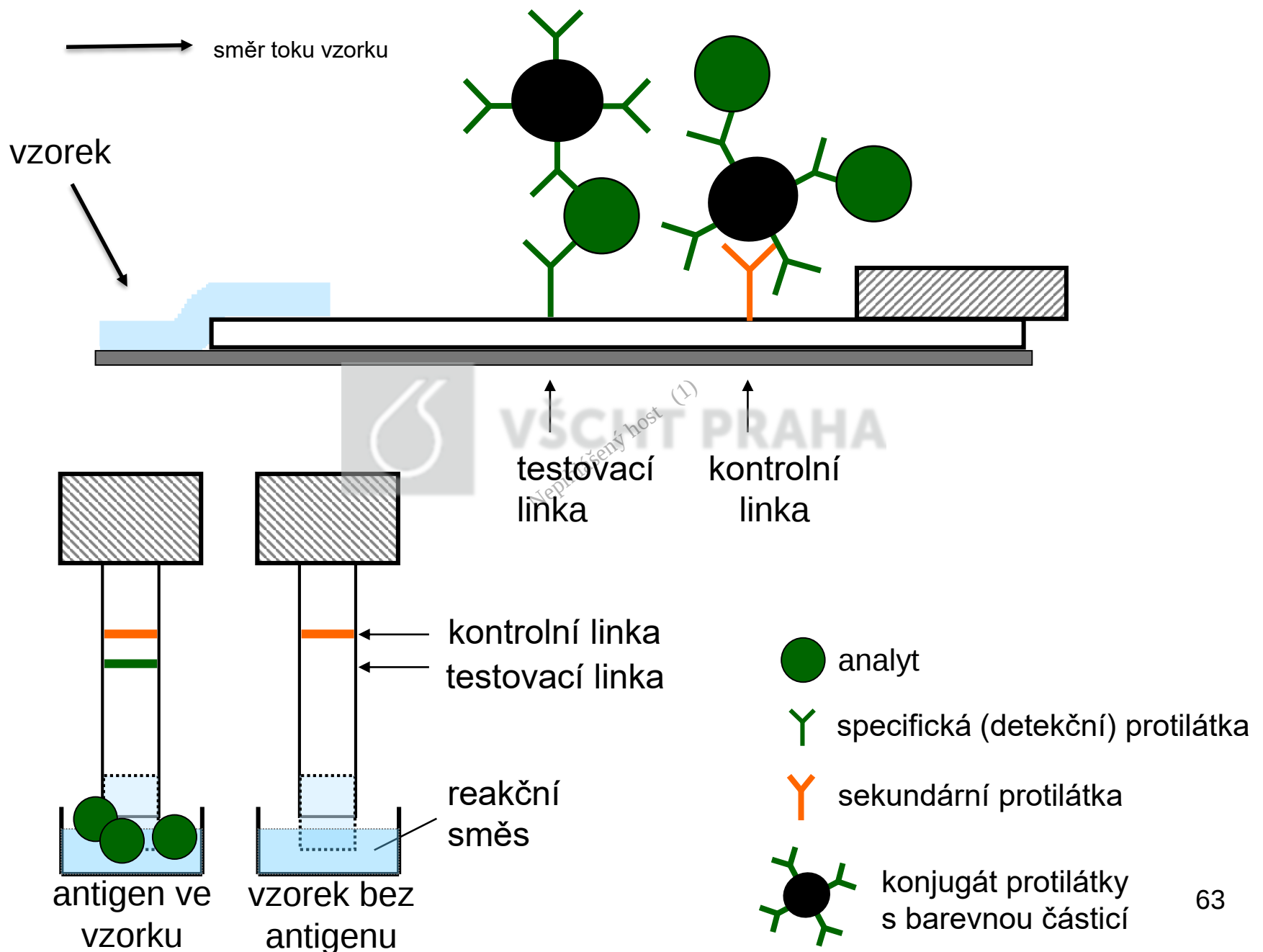
různá uspořádání

otevřené/uzavřené (testovací proužek, krabička)



sendvičové/ kompetitivní

IMUNOCHROMATOGRAFICKÉ TESTY - Sendvičové uspořádání

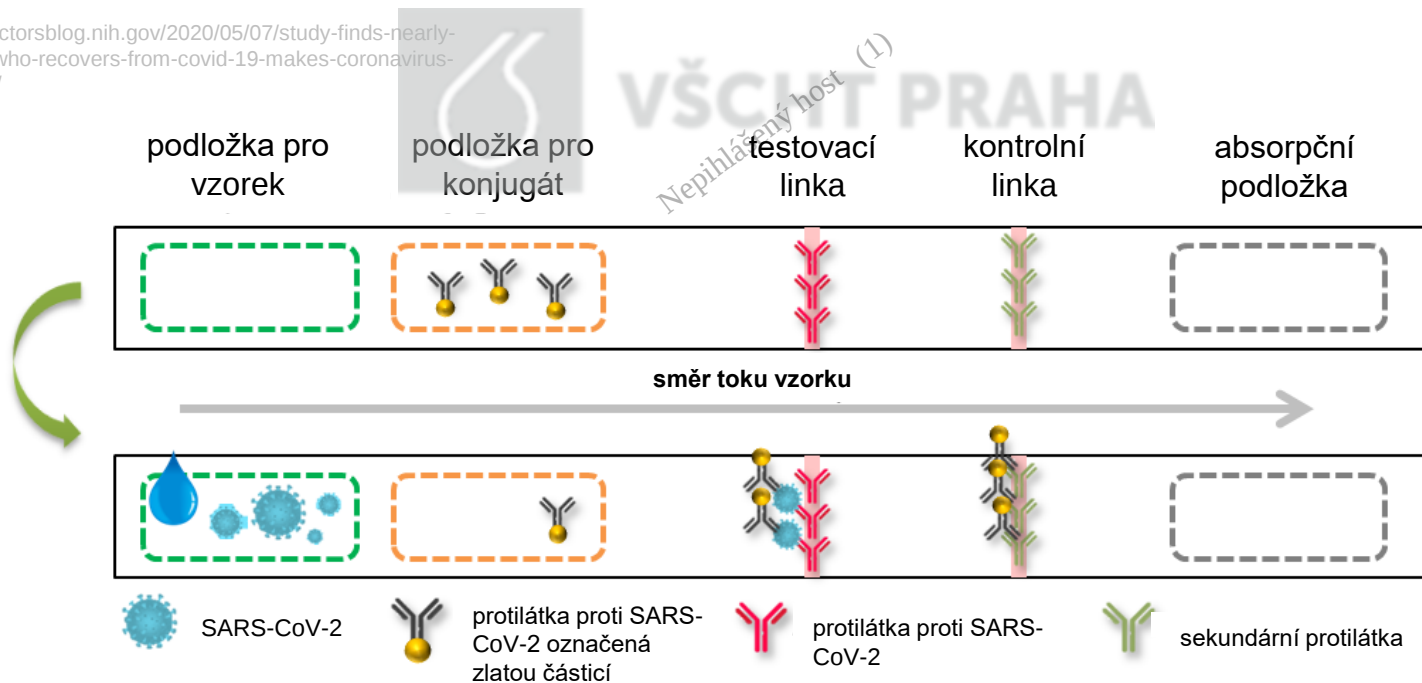


vhodný k detekci antigenů s více epitopy (mikroorganismy, viry, hCG (*těhoteský test*),)



COVID-19AgTest (antigenní test)

<https://directorsblog.nih.gov/2020/05/07/study-finds-nearly-everyone-who-recovers-from-covid-19-makes-coronavirus-antibodies/>



<https://www.novatin.com/produkty/antigenni-test-covid-19-ag-humasis/>

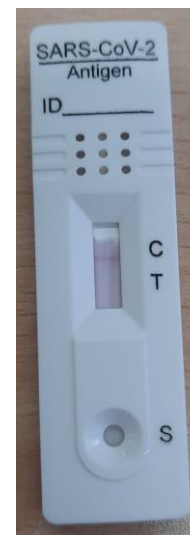
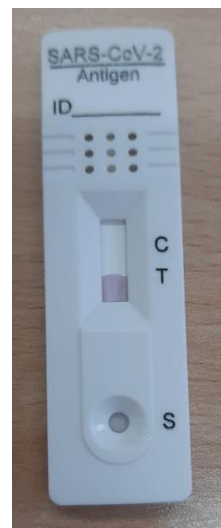
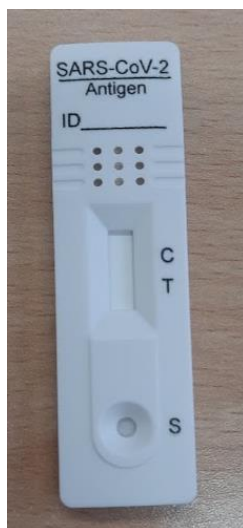
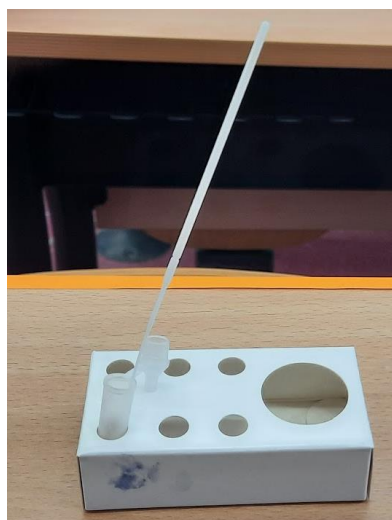
IMUNOCHROMATOGRAFICKÉ TESTY - Sendvičové uspořádání

vhodný k detekci antigenů s více epitopy (mikroorganismy, viry, hCG (*těhoteský test*),)



COVID-19AgTest (antigenní test)

<https://directorsblog.nih.gov/2020/05/07/study-finds-nearly-everyone-who-recovers-from-covid-19-makes-coronavirus-antibodies/>



vhodný k detekci antigenů s více epitopy (mikroorganismy, viry, hCG (*těhoteský test*),)



<https://directorsblog.nih.gov/2020/05/07/study-finds-nearly-everyone-who-recovers-from-covid-19-makes-coronavirus-antibodies/>

COVID-19AgTest (antigenní test)

[INTERPRETACE VÝSLEDKŮ]

Negativní

Pokud se v oblasti testovacího proužku (T) neobjeví žádná barevná čára a v oblasti kontrolního proužku (C) je barevná čára přítomna, pak je výsledek testu negativní.



Pozitivní

Pokud se v oblasti testovacího proužku (T) objeví barevná čára a v oblasti kontrolního proužku (C) také, pak je výsledek testu pozitivní.



Neplatný

Pokud se v oblasti kontrolního proužku (C) neobjeví žádná barevná čára, je výsledek neplatný.



<https://www.novatin.com/produkty/antigenni-test-covid-19-ag-humasis/>

IMUNOCHROMATOGRAFICKÉ TESTY - Sendvičové uspořádání

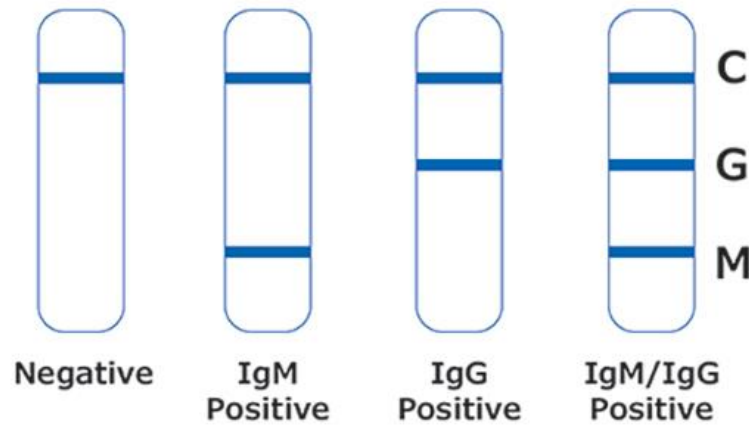
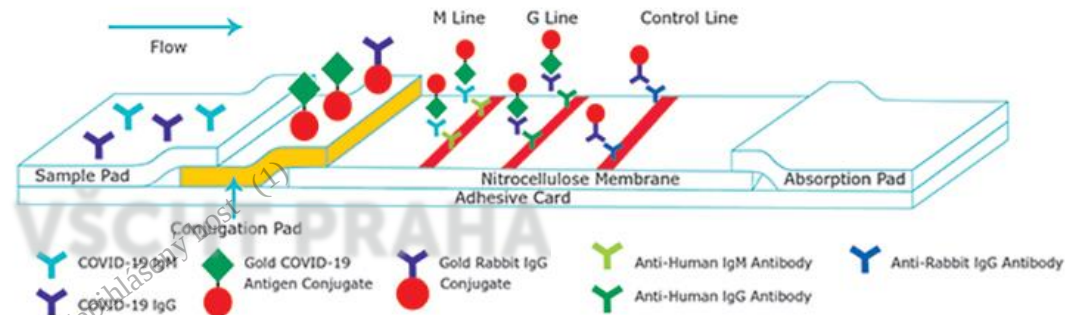
vhodný k detekci antigenů s více epitopy (mikroorganismy, viry, hCG (*těhoteský test*),)



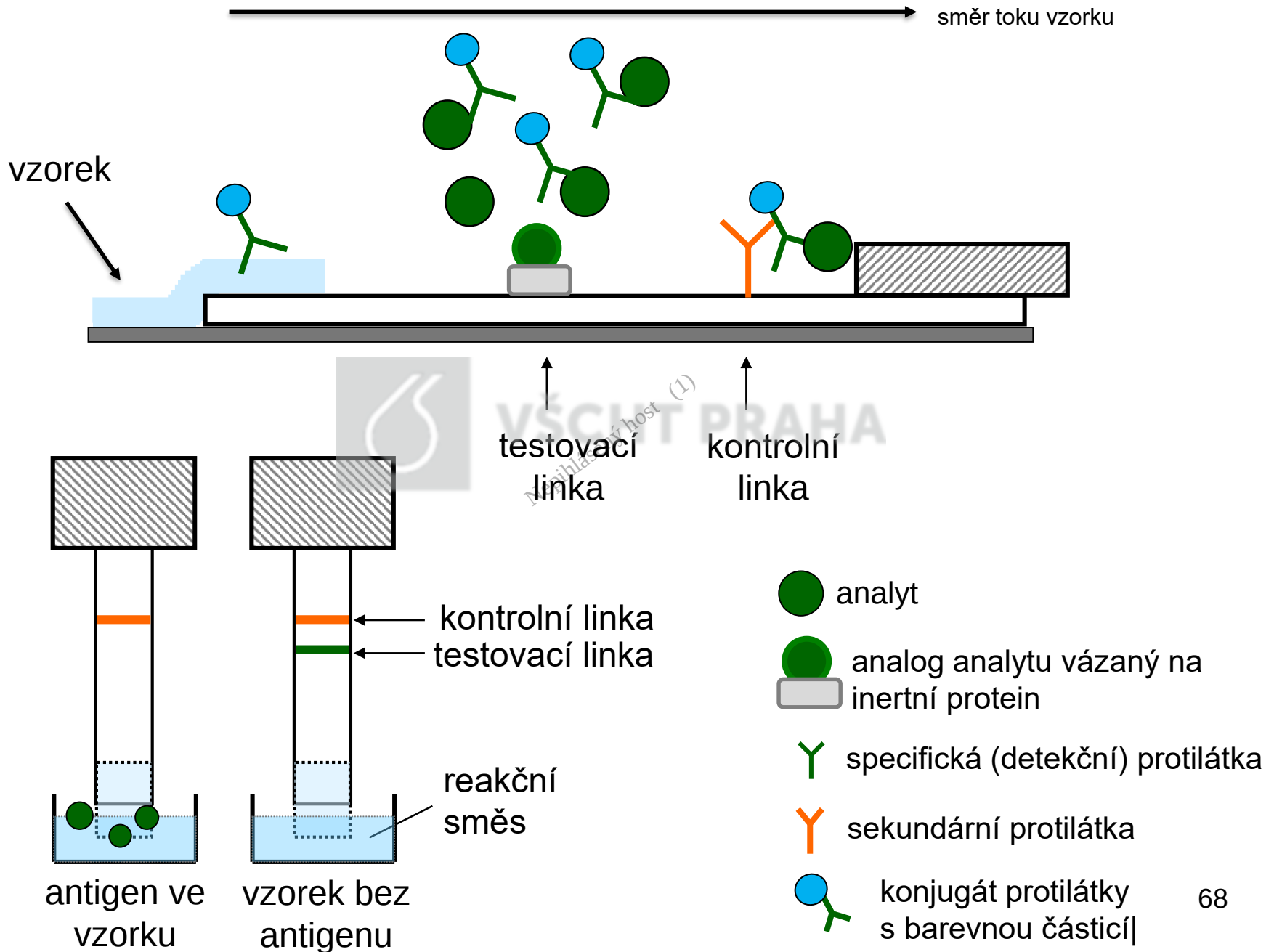
<https://www.senetic.cz/product/SARS-COV-2-DB-TEST>

MULTITEST

COVID-19 RychloTest (IgM, IgA, IgG)



IMUNOCHROMATOGRAFICKÉ TESTY - Kompetitivní uspořádání



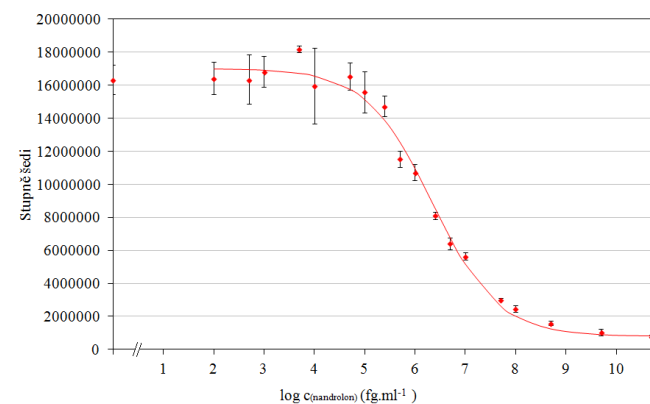
IMUNOCHROMATOGRAFICKÉ TESTY - Kompetitivní uspořádání

semikvantitativní metoda



Obr. Kalibrační řada nandrolonu.

Zleva doprava rostoucí koncentrace nandrolonu: A – negativní kontrola; B – 100 fg.ml⁻¹; C – 500 fg.ml⁻¹; D – 1 pg.ml⁻¹; E – 5 pg.ml⁻¹; F – 10 pg.ml⁻¹; G – 50 pg.ml⁻¹; H – 100 pg.ml⁻¹; I – 250 pg.ml⁻¹; J – 500 pg.ml⁻¹; K – 1 ng.ml⁻¹; L – 2,5 ng.ml⁻¹; M – 5 ng.ml⁻¹; N – 10 ng.ml⁻¹; O – 50 ng.ml⁻¹; P – 100 ng.ml⁻¹; Q – 0,5 µg.ml⁻¹; R – 5 µg.ml⁻¹; S – 50 µg.ml⁻¹.



https://www.amdnext.com/stainless-steel-blade-sterile-size-21-50-bx-3-bx-cs-not-available-for-sale-in-canada.html#.W3_4qc4za70

Imunochemické metody

jsou rozděleny na základě vzniku:

precipitátu (aglutinátu) nebo rozpustného imunokomplexu



**PRECIPITAČNÍ
METODY**



**NEPRECIPITAČNÍ
METODY**

DALŠÍ FORMÁTY

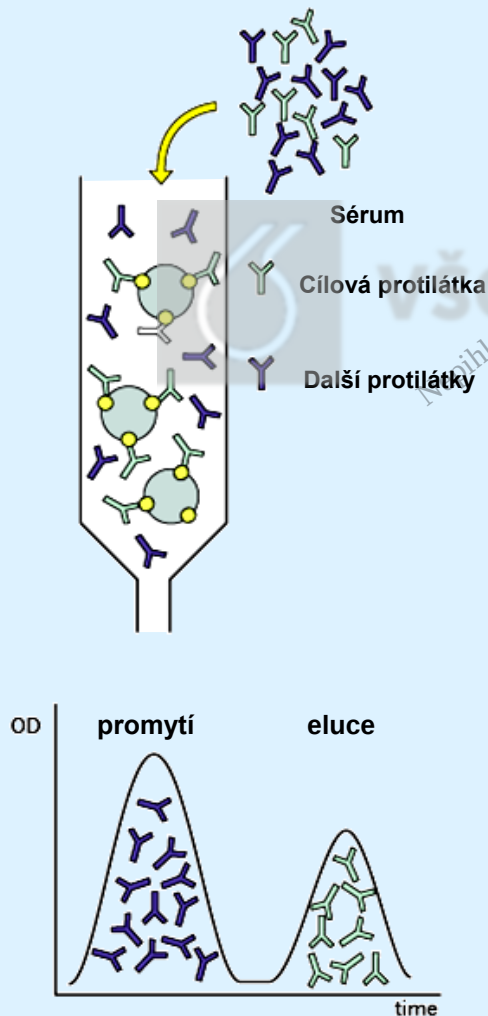
Purifikace protilátek

Hlavní krok

Kovalentní vazba
Ag na pevnou fázi

Specifická
purifikace třídy
IgG

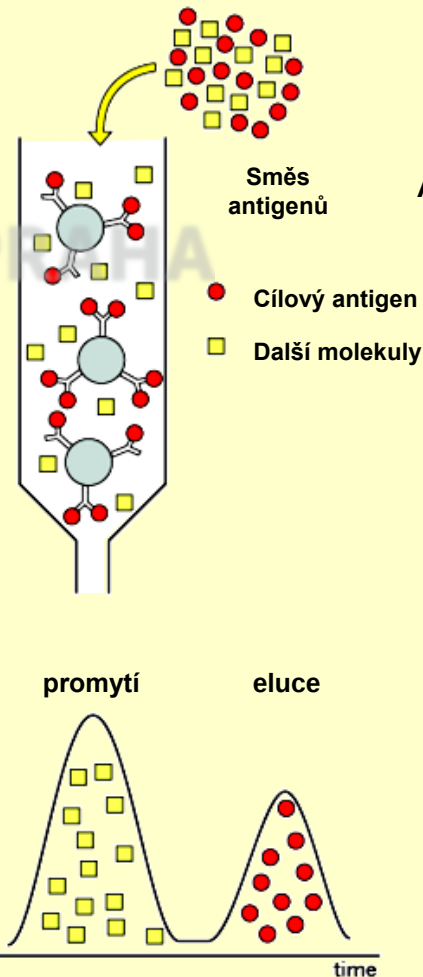
→ Protein A
(*Staphylococcus*)
nebo Protein G
(*streptococcus*)



Purifikace antigenu

Hlavní krok

Kovalentní vazba
Ab na pevnou fázi



NEPRECIPITAČNÍ METODY – PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

- molekulárně biologická metoda, která umožňuje identifikovat a kvantifikovat různé znaky v buňce během jejího průchodu laserovým paprskem
- UNIVERSÁLNÍ (použití závisí jen na protilátce)

- princip je založen na detekci fluorescenčního signálu

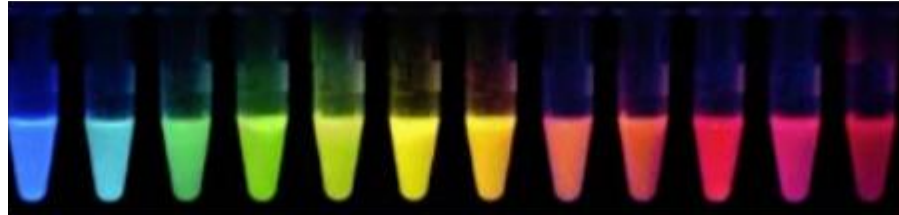
Buňka sama fluoreskuje málokdy, proto využíváme fluorescenčně značené protilátky pro sledování požadovaných znaků.



- pro analýzu musí být buňky v suspenzi ← tzv. nosná kapalina
(celé tkáně se musí rozrušit a uvolnit jednotlivé buňky do suspenze s nosnou kapalinou)

Postup

1. **Značení** buněk (povrchové znaky) pomocí monoklonálních **protilátek s fluorescenčními značkami**



až 40 barev

<https://pdfs.semanticscholar.org/914f/370f0c7edbeaf36a73d1c55fd7915cb2a002.pdf>

možnost multi-parametrického měření (1)



VŠCHT PRAHA

Nepihlášenny host (1)

Postup

1. **Značení buněk** (povrchové znaky) pomocí monoklonálních **protilátek s fluorescenčními značkami**
2. **Vlastní měření**
 - buňky protékají speciální celou konstruovanou tak, aby v daný okamžik protékala celou právě jedna buňka z analyzované suspenze
 - buňka je ozářena sadou laserů o specifických vlnových délkách a sleduje se vyzářená fluorescence

Fluidní systém

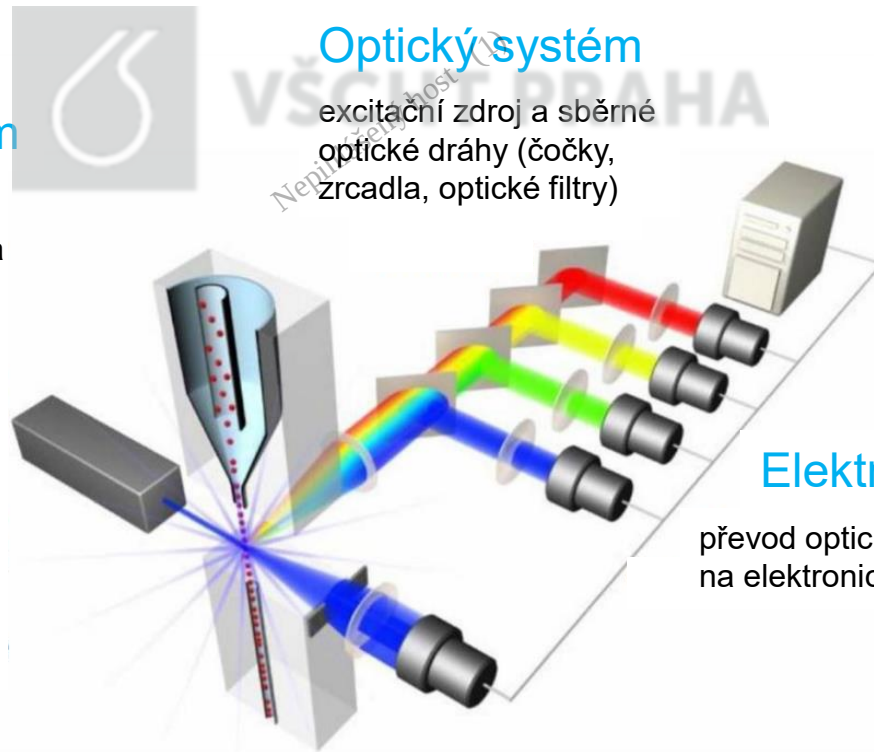
buňky v suspenzi
proudí za sebou a
protínají laserový
paprsek →
rozptylují světlo a
emitují
fluorescenci

Optický systém

excitační zdroj a sběrné
optické dráhy (čočky,
zrcadla, optické filtry)

Elektronický systém

převod optických signálů
na elektronické



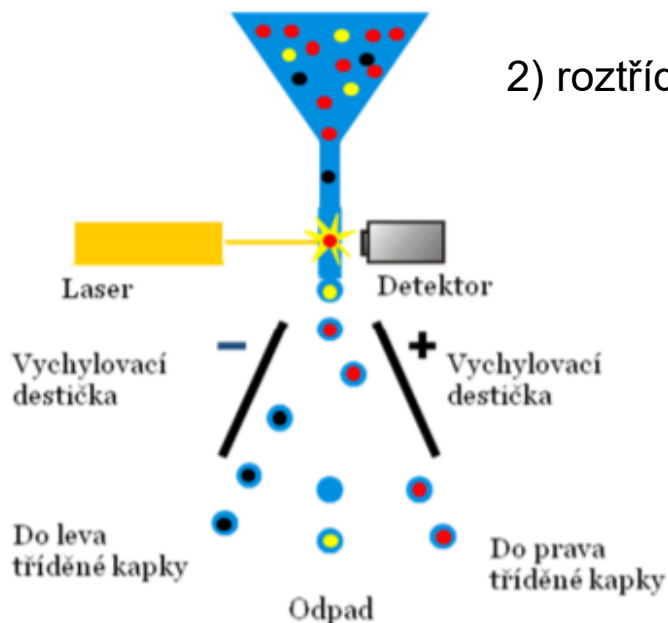
Postup

1. Značení buněk (povrchové znaky) pomocí monoklonálních protilátek s fluorescenčními značkami

2. Vlastní měření

- buňky protékají speciální celou konstruovanou tak, aby v daný okamžik protékala celou právě jedna buňka z analyzované suspenze
- buňka je ozářena sadou laserů o specifických vlnových délkách a sleduje se vyzářená fluorescence
- dva přístupy využití: 1) imunofenotypizace - typizace jakékoliv buňky (např. leukemické buňky nebo buňky nakažené virem HIV)

2) roztřídění buněk podle sledovaných znaků (např. podle míry syntézy DNA, RNA, intenzity buněčného cyklu a apoptózy)



Znázornění principu sortingu buněk. Ke kladně a záporně vychylovací destičce se přitahují opačně nabitě buňky a odpad propadává středem. Pozitivní, či negativní náboj buňky získají po průchodu laserem.

Postup

1. **Značení buněk** (povrchové znaky) pomocí monoklonálních **protilátek s fluorescenčními značkami**

2. Vlastní měření

- buňky protékají speciální celou konstruovanou tak, aby v daný okamžik protékala celou právě jedna buňka z analyzované suspenze
 - buňka je ozářena sadou laserů o specifických vlnových délkách a sleduje se vyzářená fluorescence
 - dva přístupy využití: 1) imunofenotypizace - typizace jakékoliv buňky (např. leukemické buňky nebo buňky nakažené virem HIV)
2) roztřídění buněk podle sledovaných znaků (např. podle míry syntézy DNA, RNA, intenzity buněčného cyklu a apoptózy)
 - u každé buňky zaznamenávají detektory 2 optické parametry (**Side scatter -SSc**, „odražené“ světlo a **Forward scatter – FSc**, vyjadřující rozptyl do velmi malého dopředného úhlu) a nejméně 2 parametry vyjadřující fluorescenci na různých vlnových délkách
- Přímý rozptyl (FSc) → velikost
Boční rozptyl (SSc) → granulosita*

Postup

1. Značení buněk (povrchové znaky) pomocí monoklonálních protilátek s fluorescenčními značkami

2. Vlastní měření

- buňky protékají speciální celou konstruovanou tak, aby v daný okamžik protékala celou právě jedna buňka z analyzované suspenze
- buňka je ozářena sadou laserů o specifických vlnových délkách a sleduje se vyzářená fluorescence
- dva přístupy využití: 1) imunofenotypizace - typizace jakékoliv buňky (např. leukemické buňky nebo buňky nakažené virem HIV)
2) roztřídění buněk podle sledovaných znaků (např. podle míry syntézy DNA, RNA, intenzity buněčného cyklu a apoptózy)

3. Analýza dat

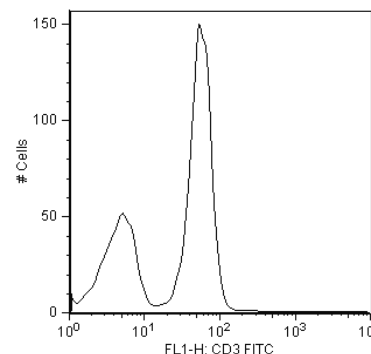
- výstupem z měření je mnohorozměrný graf, do kterého se zanesou intenzity každého ze sledovaných znaků
- statistickou analýzou se poté roztřídí jednotlivé buňky do skupin podle intenzity jednotlivých znaků
- na základě těchto skupin lze určit jednotlivé populace a jejich zastoupení ve vzorku

NEPRECIPITAČNÍ METODY – PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Postup

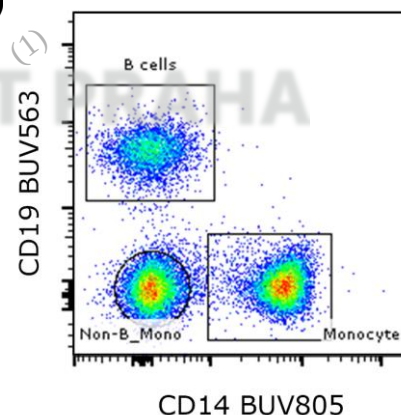
Způsoby zobrazení dat

- histogram znázorňující jeden parametr
- dvojrozměrné grafy (např. bodový (dot-plot))
- trojrozměrné se rutinně nepoužívají



Histogram znázorňující jeden parametr (CD3)

Jiřina Bartůňková, Milan Paulík a kolektiv: Vyšetřovací metody v imunologii. Grada Publishing, a.s., 2011



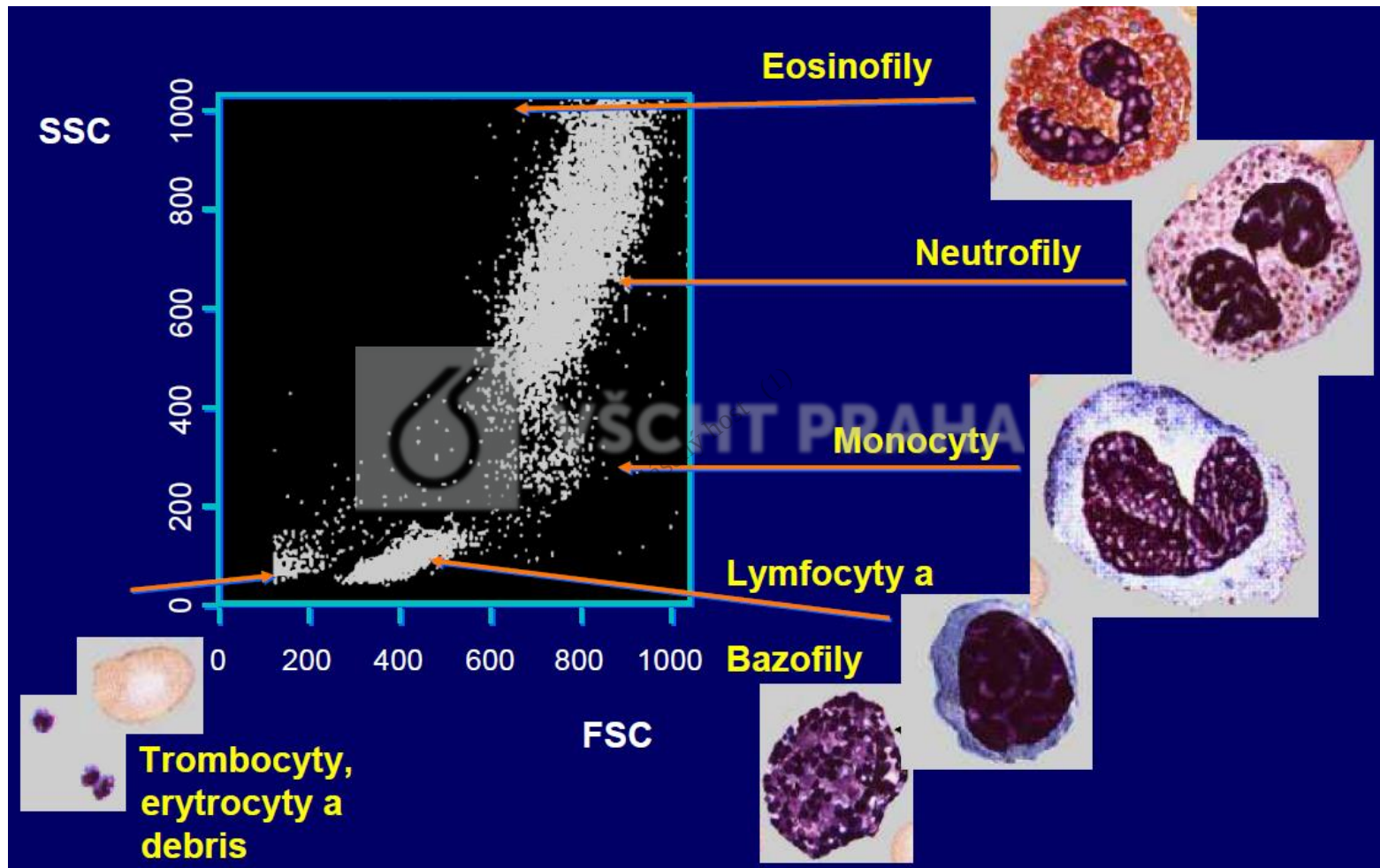
Vysokoparametrická fenotypizace lidské krve

<https://www.bdbiosciences.com/en-us/instruments/research-instruments/research-cell-analyzers/facsymphony>

3. Analýza dat

- výstupem z měření je mnohorozměrný graf, do kterého se zanesou intenzity každého ze sledovaných znaků
- statistickou analýzou se poté roztrídí jednotlivé buňky do skupin podle intenzity jednotlivých znaků
- na základě těchto skupin lze určit jednotlivé populace a jejich zastoupení ve vzorku

NEPRECIPITAČNÍ METODY – PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE



Šandová, P. přednáška Vybrané imunologické metody, laboratoř ÚKBLD a 1. LF UK VFN

Použití imunochemických metod

- Alergologie
 - Diagnostika, titrace mediátorů, imunomonitorování a specifické imunoterapie
 - ELISA, EIA, RIA,
- Bakteriologie
 - Identifikace patogenů a bakteriálních antigenů patogenů
 - aglutinace, ELISA, imunofluorescence
- Biochemie
 - Titrace sérových proteinů: imunoglobuliny, složky komplementu, detekce hormonů, cytokinů, vitamínů, léků v séru..
 - ELISA, EIA, RIA, nefelometrie, turbidimetrie
- Imunohematologie
 - Určení krevních skupin a antigenů erytrocytů
 - aglutinace

Použití imunochemických metod

- Immunologie
 - Titrace auto-protilátek, určení HLA typu, určení lymfocytů, kontroly vakcinace
 - Průtoková cytometrie (FACS), ELISA, RIA, imunofluorescence
- Mykologie
 - Identifikace hub v moči a/nebo krvi, detekce protilátek specifických pro houby
 - Aglutinace, imunofluorescence, elektrosynereze, imunoelektroforéza
- Nádorové markery
 - Identifikace antigenů v krvi
 - RIA, ELISA
- Parazitologie
 - Diagnostika a detekce parazitů ve stolici a krvi, detekce protilátek specifických pro parazity
 - Aglutinace, imunofluorescence, elektrosynereze, imunoelektroforéza, ELISA

Použití imunochemických metod

- Virologie
 - Detekce virů v krvi, v sekretech z nosu, krku, průdušek, stolice a ve vzorcích biopsie, Detekce protilátek specifických pro viry
 - ELISA, western blot, imunofluorescence
- Výzkum
 - Časté použití imunochemických metod ve výzkumu
 - Nejčastější: western blot, ELISA, EIA, RIA, imunofluorescence