

Vaja: Radialna imunodifuzija – kvantitativno določanje komponent komplekta C3c, C4 v serumskih vzorcih

Princip vaje:

Radialna imunodifuzija je kvantitativna tehnika, ki temelji na osnovni imunski reakciji med protitelesi in topnimi antigeni. Ob vezavi protitelesa z antigenom v optimalnem koncentracijskem razmerju (t.i. cona ekvivalence) se v gelu tvori precipitat. Nastanejo veliki, netopni in s prostim očesom vidni imunski kompleksi. Odnos med premerom (oz. površino) precipitacijskega obroča in koncentracijo analita je v začetnih fazah inkubacije logaritemski, po daljšem času pa je odvisnost premosorazmerna.

Na vaji boste z radialno imunodifuzijo določili koncentracijo komponent komplekta C3c in C4 v vzorcih seruma in kontrolnih vzorcih. Proteini iz vzorca reagirajo s specifičnimi protitelesi proti komponentam komplekta, ki so bila predhodno primešana agaroznemu gelu. Vzorce nanašamo v vdolbinice na plošči. Med inkubacijo poteka difuzija iz vdolbinic v gel, kjer se nato tvori precipitat. Glede na premer obroča se iz tabele referenčnih vrednosti priloženih testu odčita koncentracija komponente komplekta v vzorcu.

Razdelitev dela:

Delo poteka v skupinah po tri študente na ploščo. Skupina treh študentov s C3 ploščo in skupina študentov s C4 ploščo si deli set vzorcev (serumov). Vsak od študentov nanese pozitivno in negativno kontrolo ter dva vzorca.

Reagenti in pribor:

- NOR Partigen C3c, NOR Partigen C4 plošče (Siemens)
- N/T Protein Control SL/H (Siemens)
- kalibrirno ravnilo (Bio Rad) in temna podlaga
- povečevalno steklo
- pipeta (5 μ L)

Izvedba vaje:

1. Ogrej ploščo z gelom na sobno temperaturo (cca 5 min), prav tako tudi vzorce.
2. Nanesi 5 μ L vzorca in kontrole v prazno vdolbinico na plošči.
3. Pokrij ploščo. Po 18 urah do dvodnevni inkubaciji na sobni temperaturi (15-25 °C) izmeri premer precipitacijskih obročev. (Na vajah bomo gel shranili v hladilnik za 1 teden.)
4. Rezultat odčitaj s pomočjo povečevalnega stekla, kalibrirnega ravnila in s pomočjo uporabe tabele referenčnih vrednosti za C3c oz C4 podaj rezultat vzorcev in kontrol v g/L.

Poročilo vaje:

1. Zapišite odčitane vrednosti premera in koncentracij posamezne komponente komplementa v svojih vzorcih oz. kontrolah. Od skupine, ki je delala drugo ploščo (druga komponenta komplementa) vendar isti vzorec pridobite podatke o koncentracijah komponente komplementa.
2. Komentirajte določene koncentracije obeh komponent komplementa in morebitno odstopanja vrednosti kontrole od predvidene vrednosti. Opredelite, kateri so možni vzroki za odstopanje vrednosti.
3. Kakšen je klinični pomen zvišanih oz. znižanih vrednosti komponent komplementa?

C3c ali C4 plošča (obkroži)	premer (mm)	koncentracija (g/L)	
		C3c	C4