



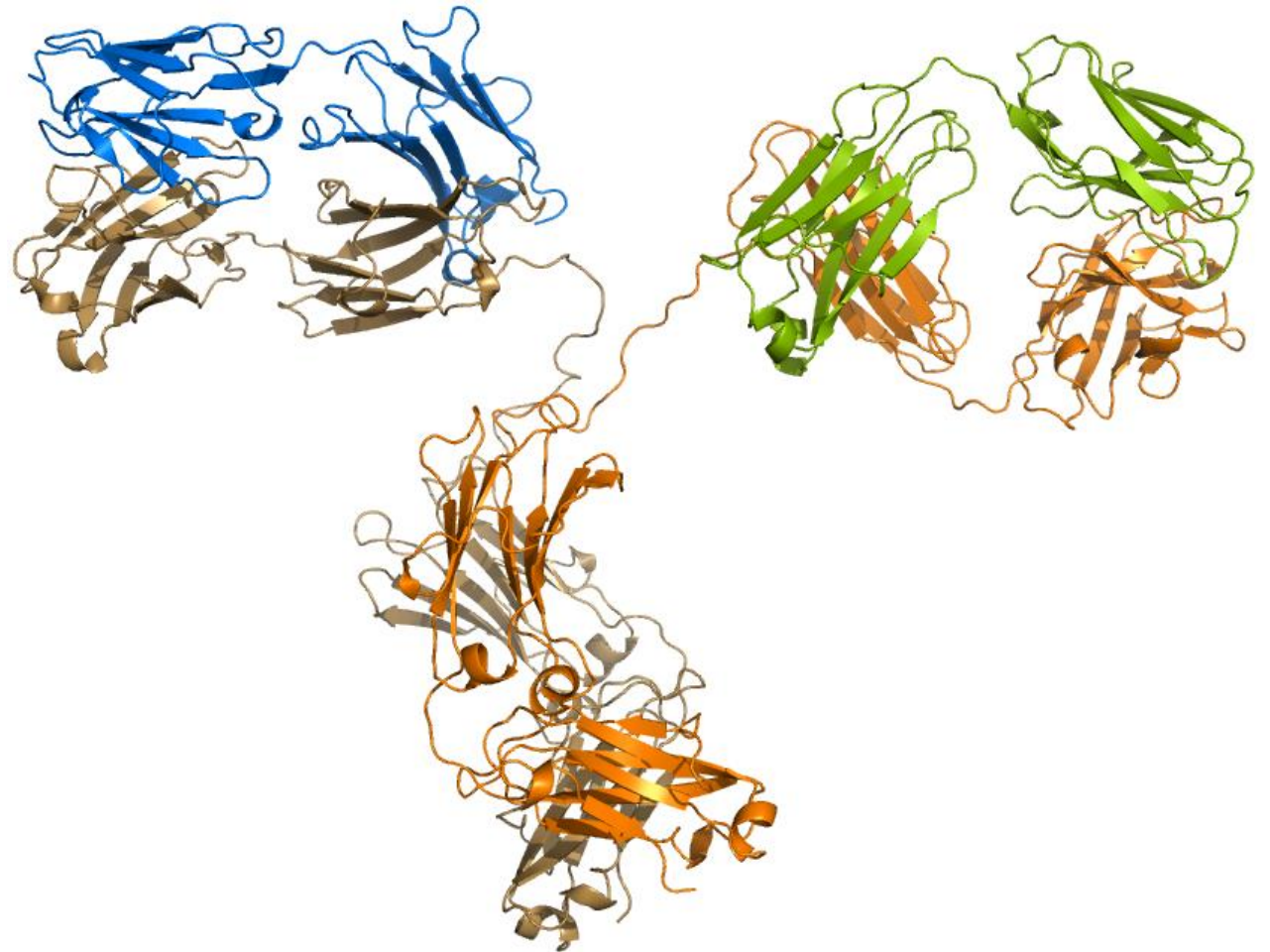
6.VAJA – IMUNOLOŠKE METODE

MARINA KLEMENČIČ



6.VAJA – IMUNOLOŠKE METODE

- **PROTITELESA** so glikoproteini, ki nastanejo kot odziv telesa na prisotnost tujka.
- Tujek, proti kateremu molekule imunskega odziva tvorijo protitelesa, imenujemo **ANTIGENI**.
- Antigeni so lahko proteini, sladkorji, lipidi, nukleinske kisline in tudi manjše molekule (npr. penicilin).



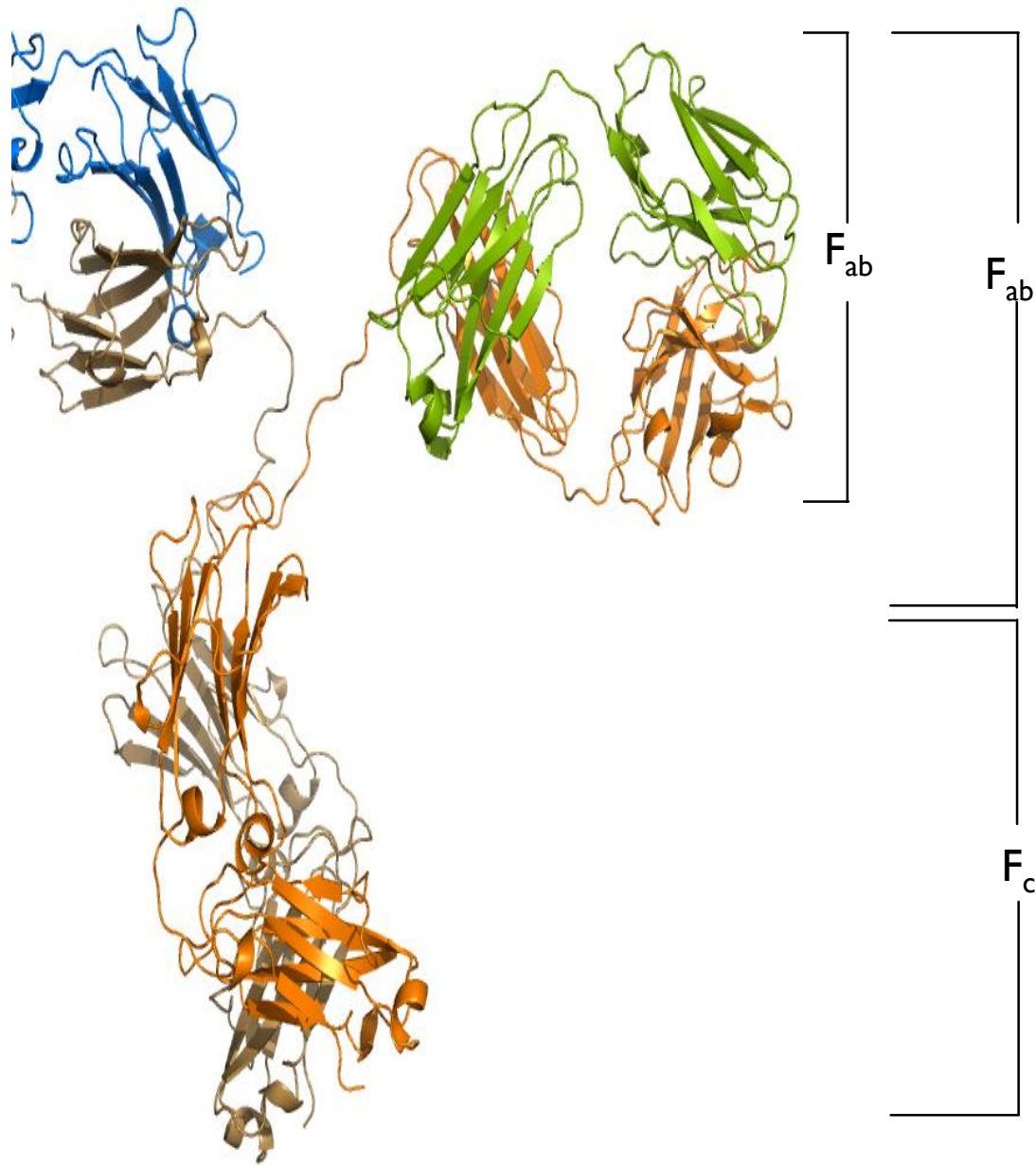
- So glikoproteini iz naddružine imunoglobulinov.

- Fragmenta F_{ab} in F_c sestavljajo protitelo oblike črke Y.

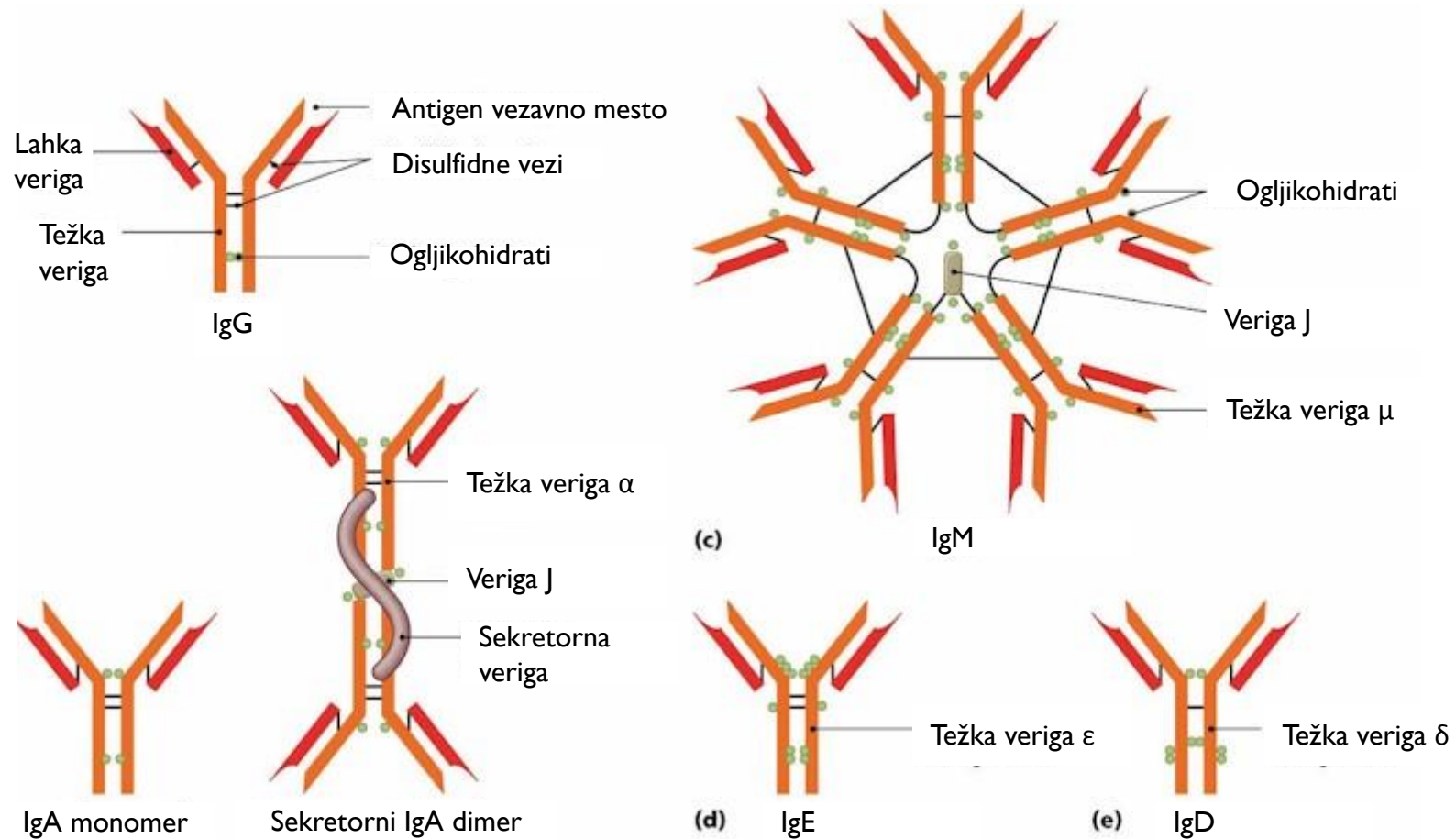
- Sestavljeni iz dveh identičnih težkih in dveh identičnih lahkih verig, ki jih povezujejo disulfidne vezi (označene z rumeno).

- **Konstantne** (C_H1 , C_H2 , C_H3 , C_L) in **variabilne** (V_H , V_L) domene.

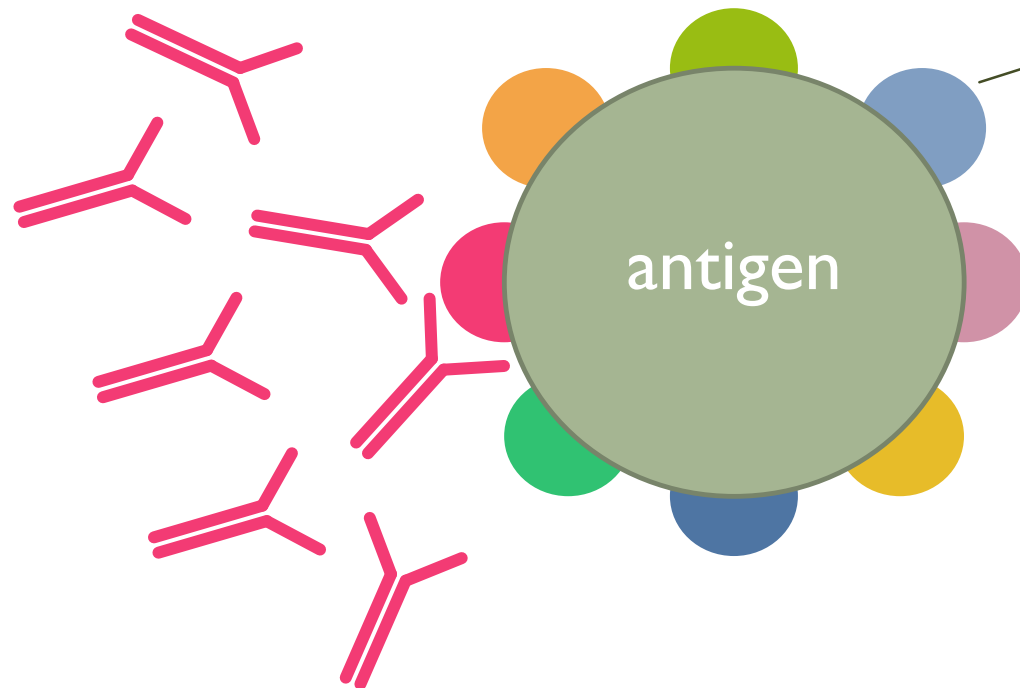
- Variabilni domeni težke in lahke verige (V_H in V_L) z šestimi hipervariabilnimi zankami tvorita vbočeno vezavno mesto za **antigen**.



IZOTIPI (RAZREDI) PROTITELES



Protitelesa se sintetizirajo v **limfocitih**, ki so celice imunskega sistema. Vsak limfocit je zmožen izdelovati **le eno vrsto protiteles** in vsako prepozna **le eno antigensko determinanto** = en **epitop**). Taka protitelesa imenujemo **monoklonska protitelesa** (pridobljena iz ene celične linije).



Mesto na antigenu, kamor se veže protitelo = **epitop**.
Velike molekule imajo več različnih epitopov.

Antigeni, s katerimi se srečuje naše telo, večinoma vsebujejo **več epitopov** in jih spozna **več različnih limfocitov**. Zaradi tega nastane več različnih protiteles, ki spoznajo različne epitope istega antigena. Taki mešanici protiteles rečemo **poliklonska** protitelesa.



Vsako posamezno protitelo še vedno prepozna samo en specifičen epitop!

Za protitelesa je značilno, da se z **veliko afiniteto** vežejo samo na tiste antigene, proti katerim so bila ustvarjena. Vezava je **STROGO SPECIFIČNA**.

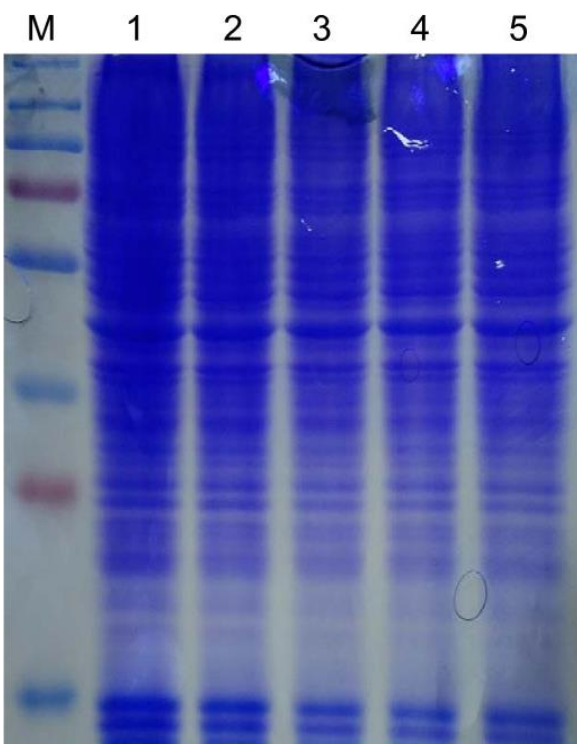
Zaradi tega protitelesa uporabljamo pri vseh tehnikah, kjer želimo specifično interakcijo med protitelesom in preiskovanim antigenom.

1. **Detekcija po prenosu Western**
2. **Afinitetna kromatografija**
3. **Točkovni prenos / črtovni prenos**
4. **Fluorescenčna mikroskopija**
5. **ELISA**

I. DETEKCIJA PO PRENOSU WESTERN

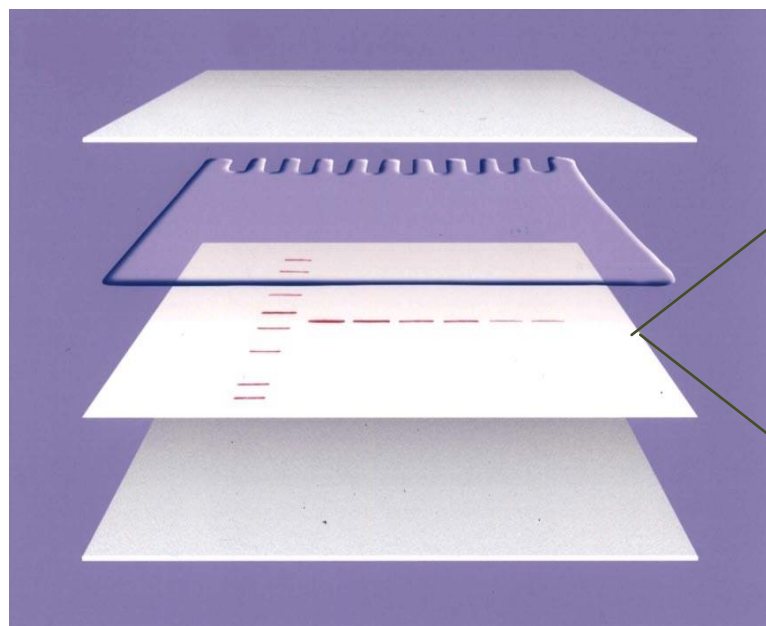
Včasih nas zanima, ali se v mešanici proteinov nahaja iskan protein. Zaradi tega proteine najprej ločimo na NaDS PAGE po velikosti. Barvanje s Commassie Brilliant Blue pobarva vse proteine nespecifično!

Če pa izvajamo detekcijo specifično, pa bodo vidni samo tisti proteini, proti katerim imamo ustvarjena protitelesa. Vendar pa je za detekcijo s protitelesi gel NaDS neprimeren, zaradi česar moramo najprej izvesti prenos.



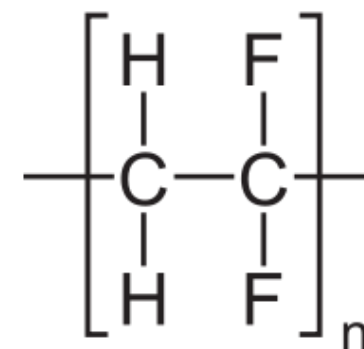
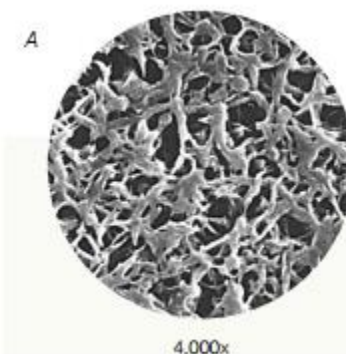
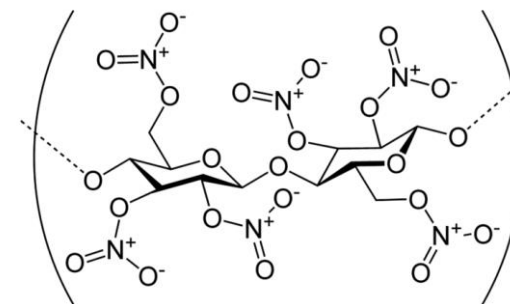
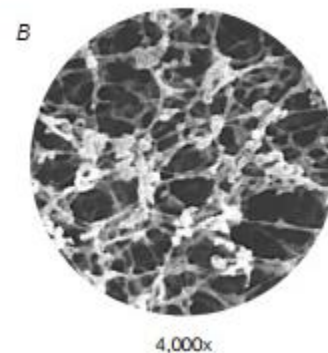
MEMBRANE

Najpogosteje uporabljamo 2 vrsti membran: nitrocelulozno in PVDF (polivinilidendifluorid).

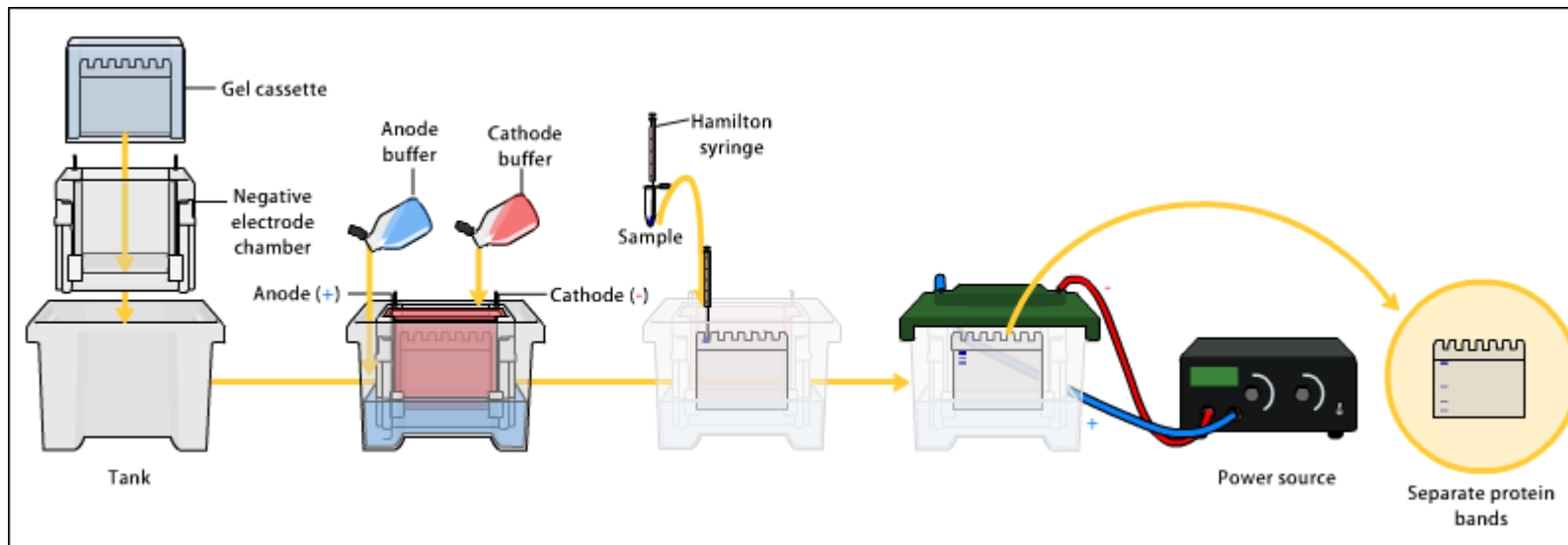
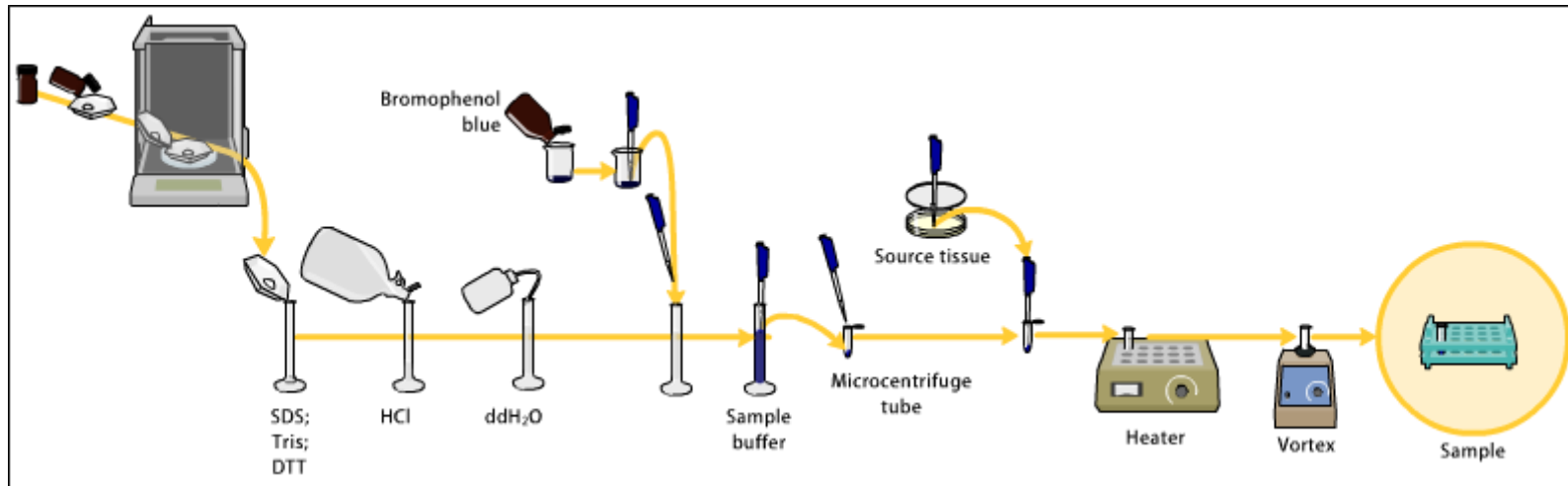


nitroceluloza

PVDF

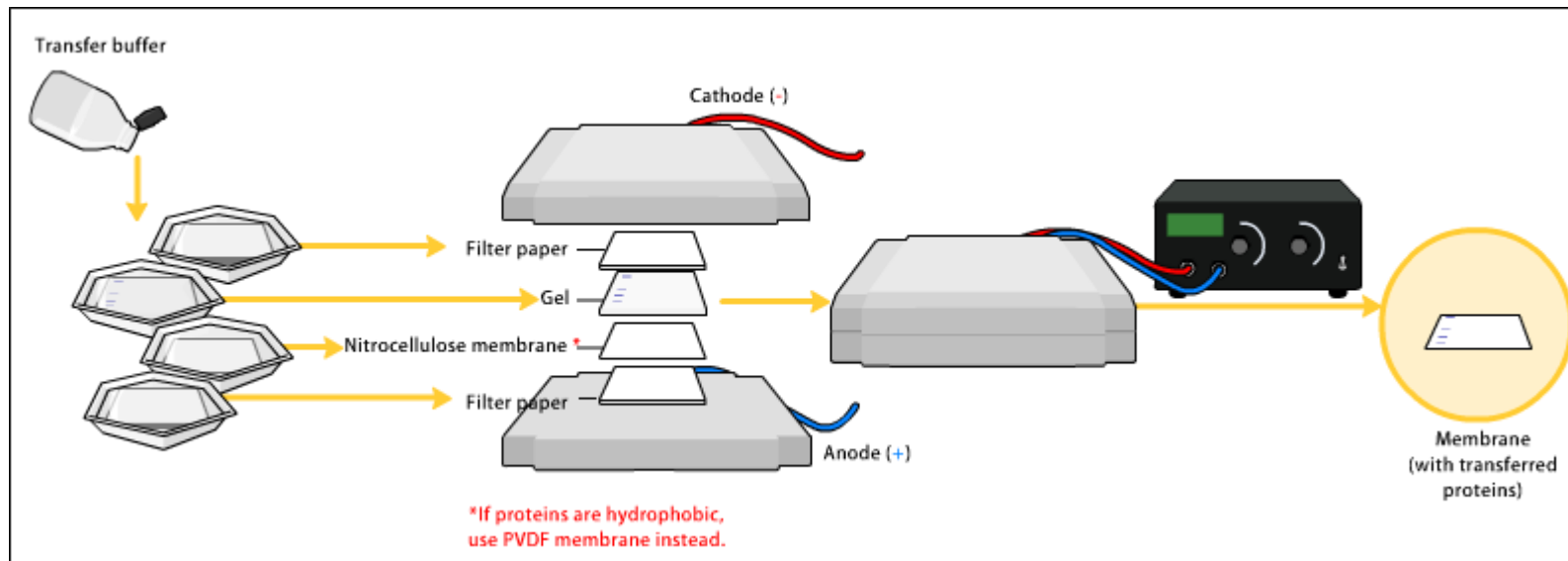


Priprava vzorca se za potrebe prenosa Western od navadnega SDS-PAGE ne razlikuje. Enako dodamo v vzorec NaDS in barvilo (za opazovanje poteka fronte) ter po želji /potrebi reducent, vzorce nanesemo v gel in izvedemo elektroforezo.



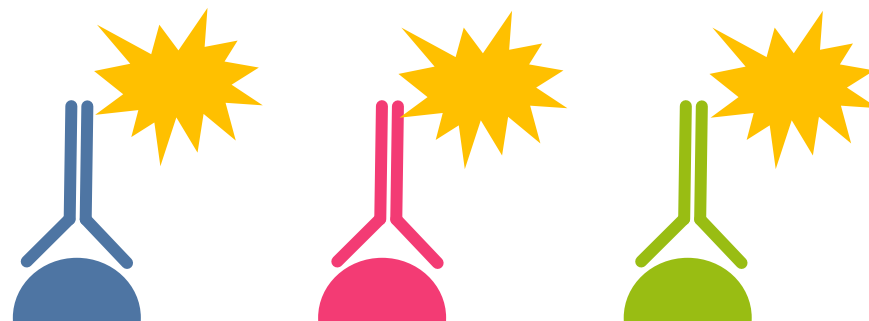
Po končani elektroforezi pa gela ne barvamo, temveč izvedemo prenos na membrano. Prenos zaradi negativno nabitih proteinov poteka s pomočjo električnega toka.

Gel namreč položimo na membrano, oba vpnemo med filter papir in elektrode, ter priključimo na napetost. Proteini bodo potovali proti pozitivno nabiti anodi, torej na membrano. Paziti moramo, da pustimo elektroforezo teči ravno zadosten čas, saj v nasprotnem primeru proteine prenesemo čez membrano na filter papir. Po elektroforezi imamo sedaj proteine, ki so bili prej na gelu, na membrani in tako pripravljene za detekcijo s protitelesi.



NEPOSREDNA IN POSREDNA DETEKCIJA

Neposredna detekcija omogoča detekcijo antigenov z eno vrsto protiteles. Ta protitelesa morajo biti **konjugirana**, t.j. na svoji površini imajo kovalentno vezan encim, preko katerega zaznamo prisotnost antigena. Ko uporabljamo protitelesa, ki se vežejo neposredno na antigen, govorimo o **primarnih** protitelesih. Spodaj je narisana slika poliklonskih primarnih konjugiranih protiteles.



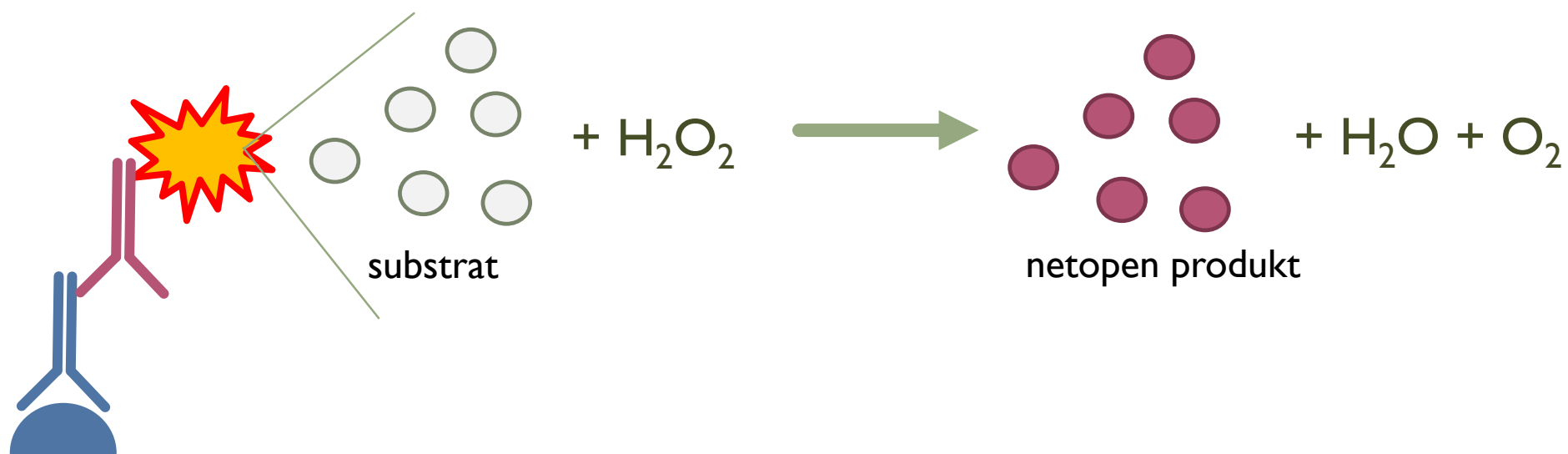
NEPOSREDNA IN POSREDNA DETEKCIJA

Posredna detekcija zahteva detekcijo antigenov z dvema različnima vrstama protiteles. Najprej na antigen vežemo **primarna** protitelesa, detekcijo pa izvedemo z dodatkom **sekundarnih** protiteles, usmerjenih proti primarnim protitelesom. V tem primeru so konjugirana samo sekundarna protitelesa.



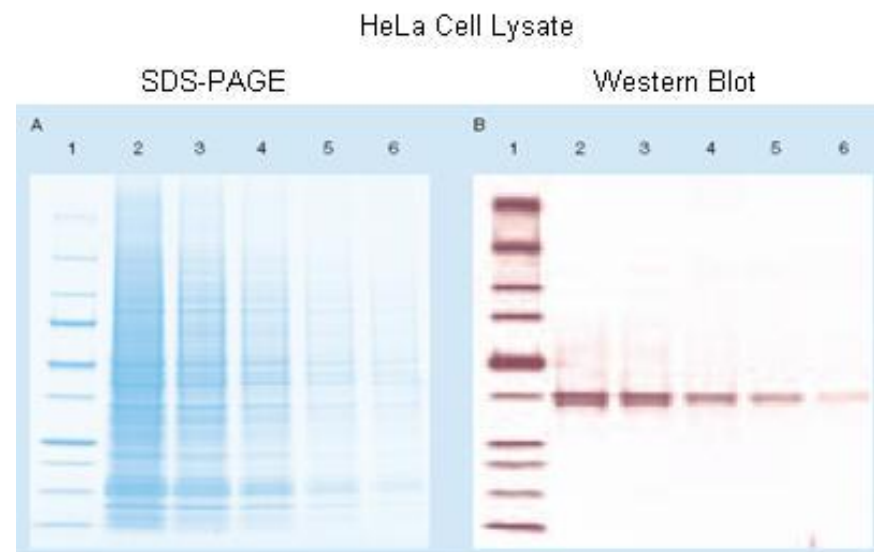
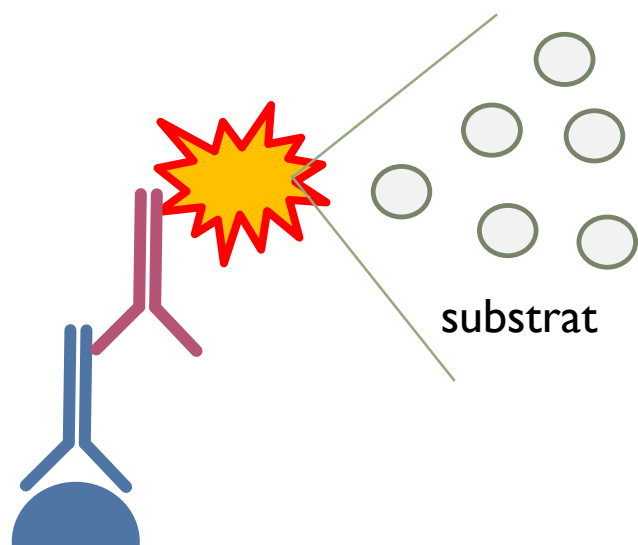
NEPOSREDNA IN POSREDNA DETEKCIJA

Encim, ki je najpogosteje konjugiran na protitelesih je **hrenova peroksidaza** (angl. *horseradish peroxidase*, HRP), ki katalizira razpad H_2O_2 v kisik in vodo, reakcija pa je lahko sklopljena še s pretvorbo neobarvanega substrata v netopen, obarvan produkt.



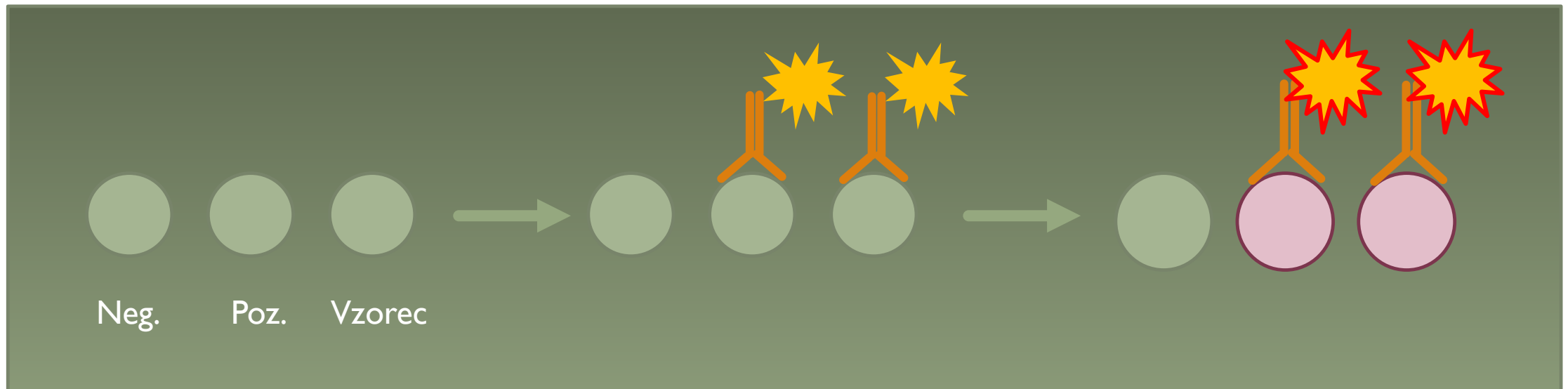
NEPOSREDNA IN POSREDNA DETEKCIJA

Encim, ki je najpogosteje konjugiran na protitelesih je **hrenova peroksidaza** (angl. *horseradish peroxidase*, HRP), ki katalizira razpad H_2O_2 v kisik in vodo, reakcija pa je lahko sklopljena še s pretvorbo neobarvanega substrata v netopen, obarvan produkt.



II. TOČKOVNI NANOS ALI DOT BLOT

Včasih nas ne zanima, kako velik je določen protein, temveč samo **kvalitativna** analiza, ali določen vzorec vsebuje iskan protein ali ne. V tem primeru ne izvajamo ločitve proteinov po velikosti, temveč vzorce **nanesimo (nakapljamo) na membrano** in izvedemo detekcijo. Le-ta je lahko posredna ali neposredna, odvisno od količine proteina, razpoložljivih protiteles ipd.



BLOKIRANJE MEMBRAN

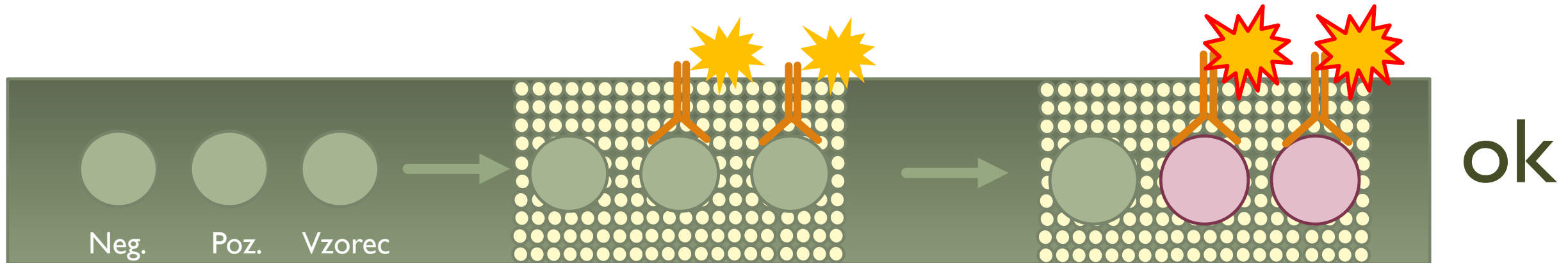
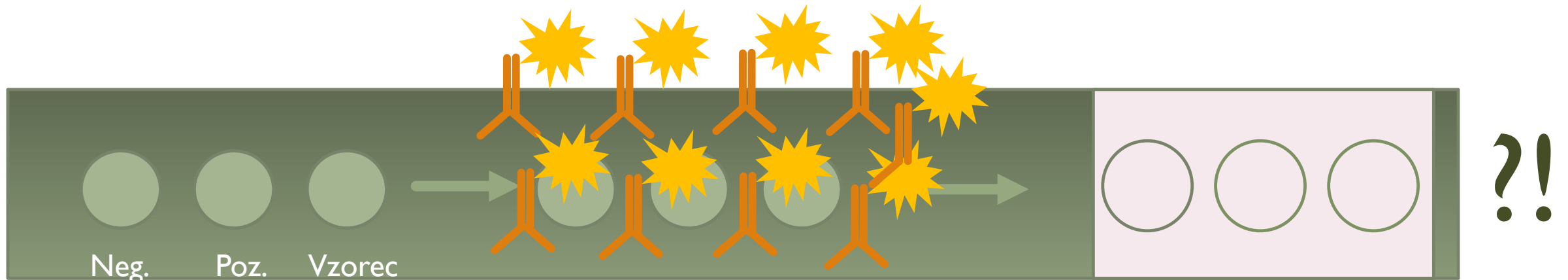
Včasih nas ne zanima, kako velik je določen protein, temveč samo **kvalitativna** analiza, ali določen vzorec vsebuje iskan protein ali ne. V tem primeru ne izvajamo ločitve proteinov po velikosti, temveč vzorce **nanesemo (nakapljamo) na membrano** in izvedemo detekcijo. Le-ta je lahko posredna ali neposredna, odvisno od količine proteina, razpoložljivih protiteles ipd.

Proteini se na membrane vežejo predvsem preko **močnih nekovalentnih** interakcij. Tudi protitelesa bi se ob nanosu vezala na membrano nespecifično, kar bi dalo lažno pozitiven rezultat. Zaradi tega je potrebno vsakokrat, preden na membrano nanesemo protitelesa (detekcija po prenosu Western, točkovni nanos) **membrano blokirati**. S tem preprečimo **nespecifično vezavi protiteles na membrano**.

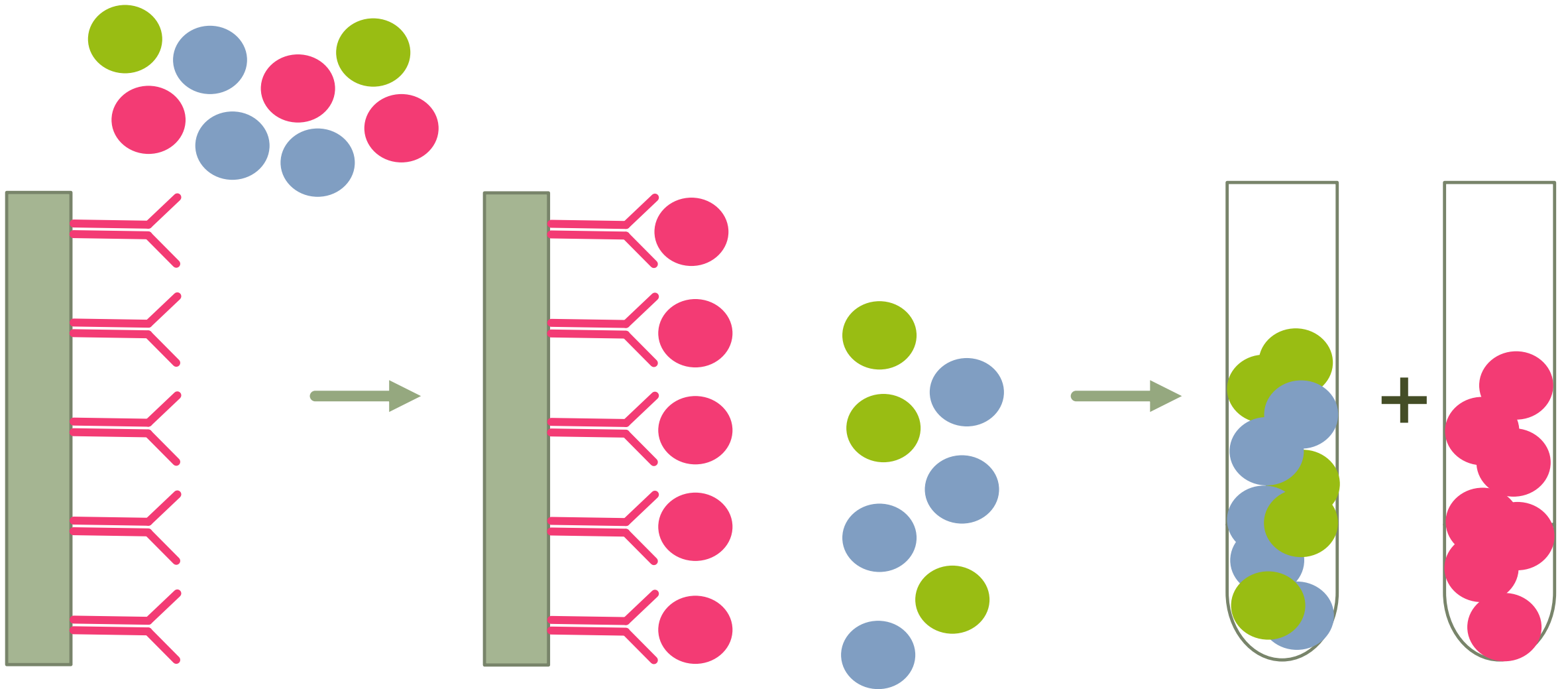
Za blokiranje se ponavadi uporablja redčeno mleko v prahu ali redčen jajčni albumin.

Vsekakor moramo biti pri uporabi sredstva za blokiranje prepričani, da ne vsebuje proteinov, s katerimi bi lahko reagirala uporabljena protitelesa.

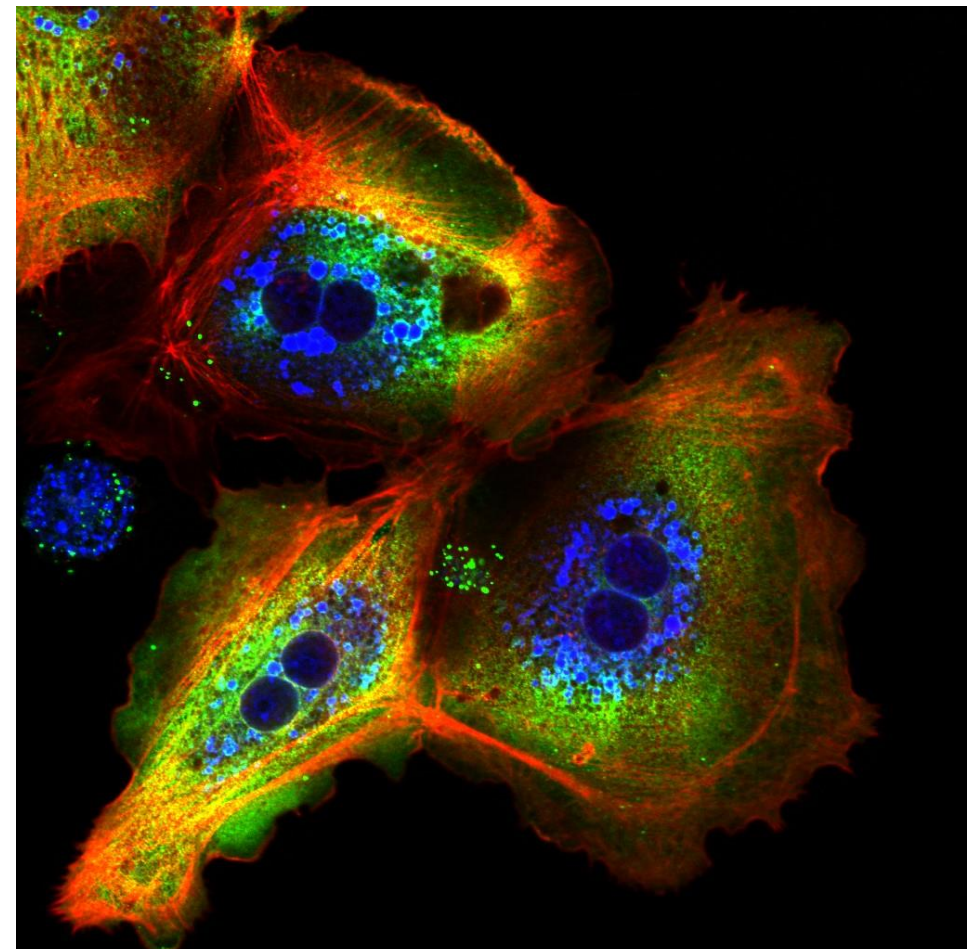
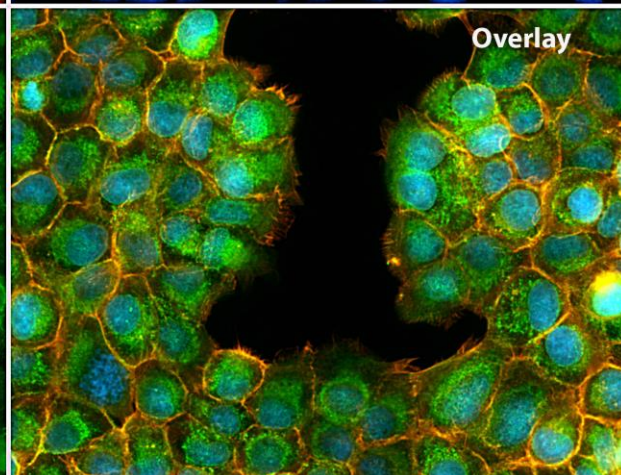
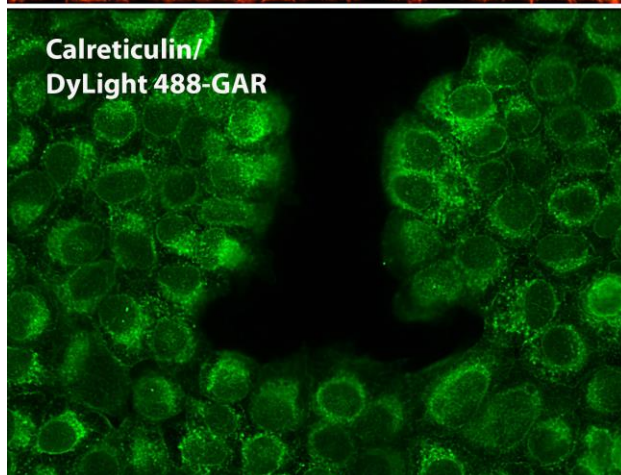
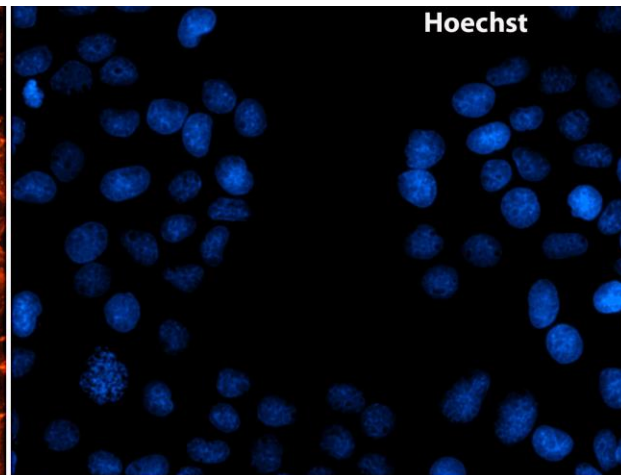
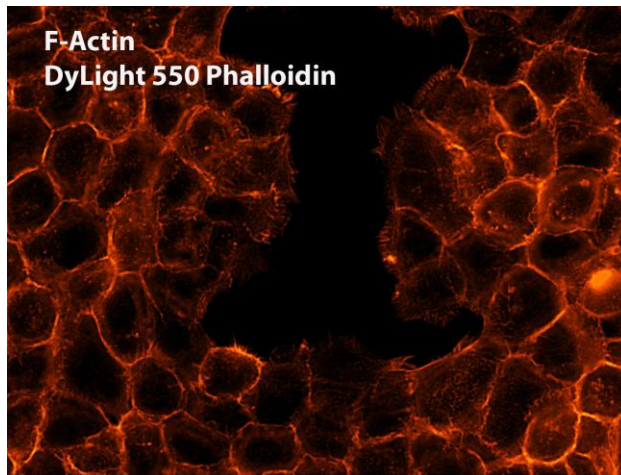
BLOKIRANJE MEMBRAN



III. AFINITETNA KROMATOGRAFIJA



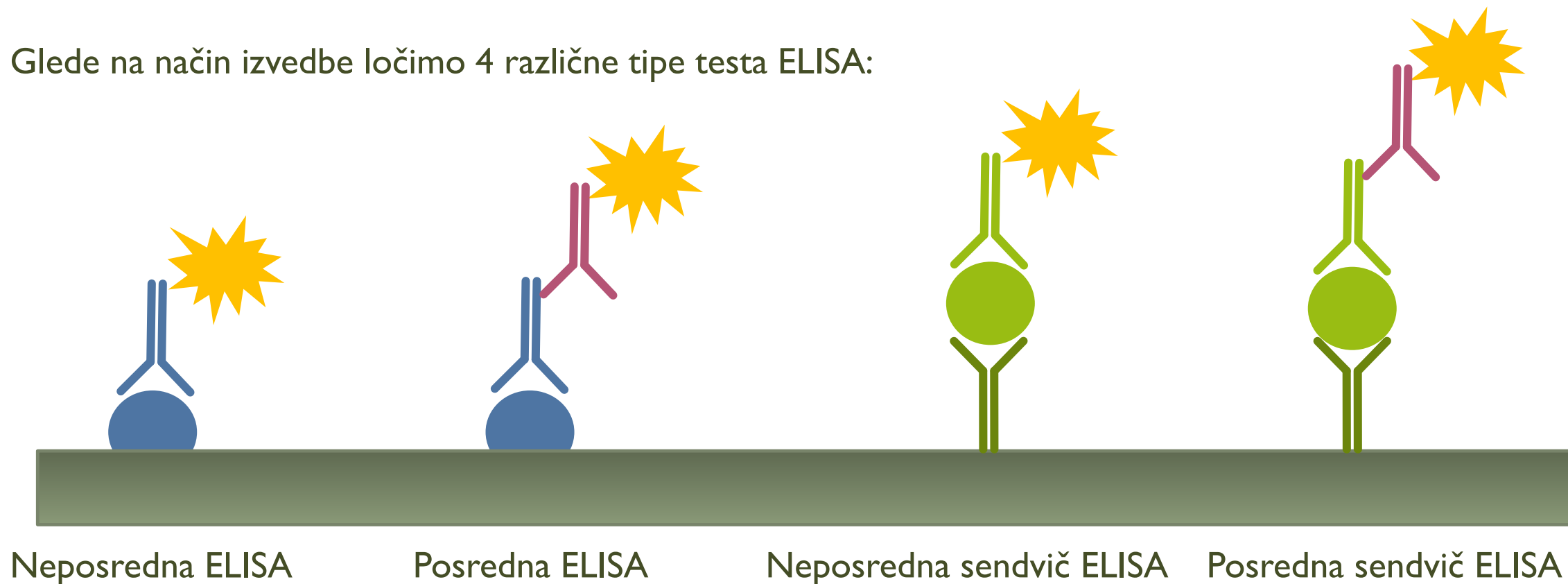
IV. FLUORESCENTNA MIKROSKOPIJA (IMUNOFLUORESCENCA)



V. ELISA

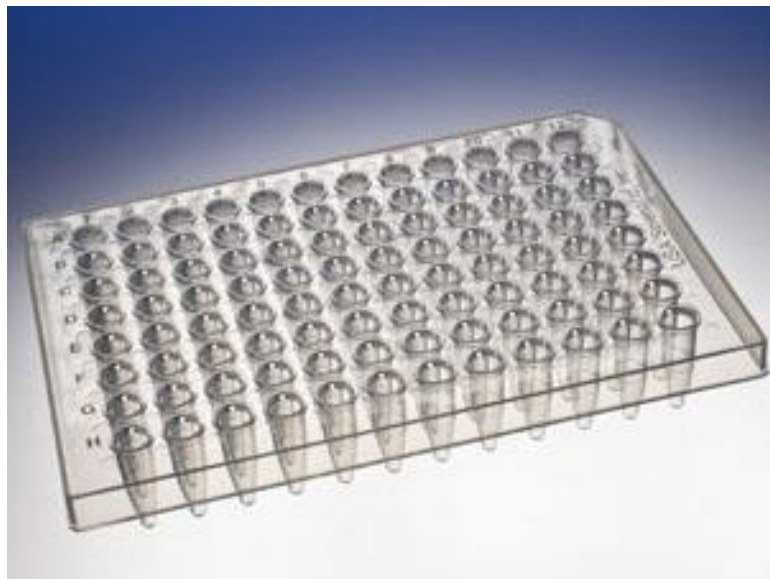
Encimskoimunski test (angl. *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*, ELISA) je ena najpogosteje uporabljenih metod tako za **kvantitativno** kot tudi **kvalitativno** določevanje antigenov ali protiteles v vzorcu.

Glede na način izvedbe ločimo 4 različne tipe testa ELISA:



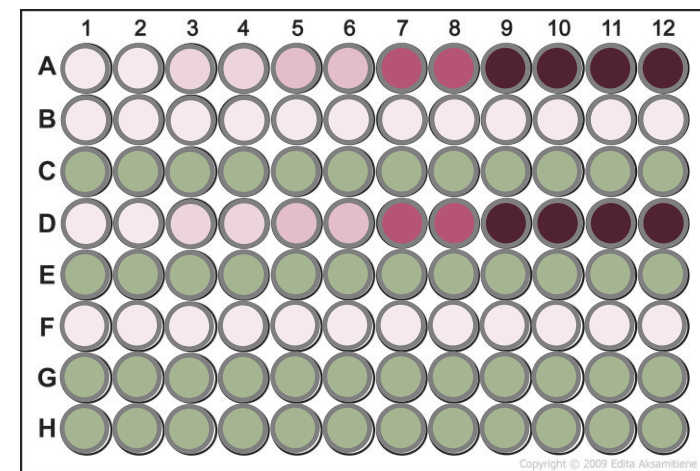
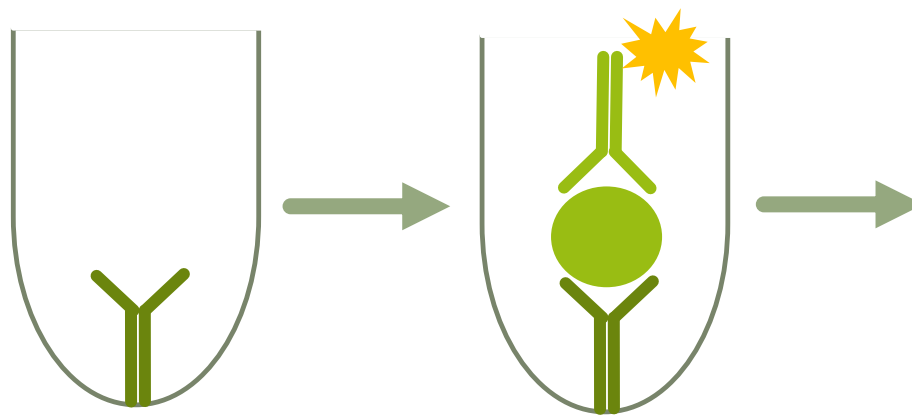
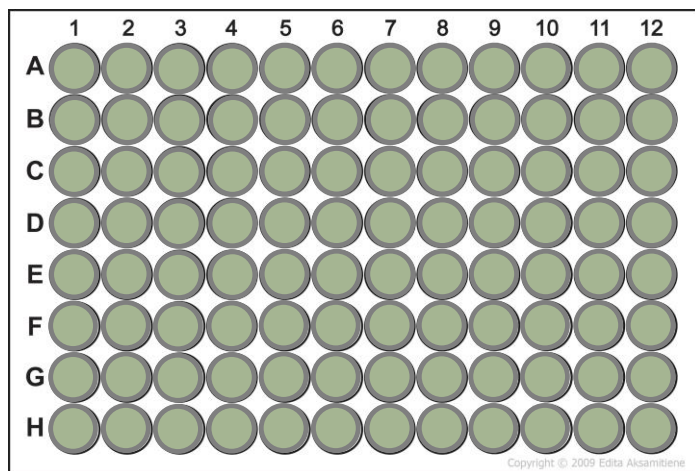
V. ELISA

ELISA je idejno precej podobna točkovnemu nanosu, le da se ponavadi izvaja v mikrotitrskih ploščicah, kar pomeni, da so vsi proteini kot tudi reagenti v raztopini in ne imobilizirani na membrani. Nanos vzorcev, dodajanje protiteles in drugih reagentov, ter odčitavanje rezultatov v diagnostiki potekajo avtomatizirano.



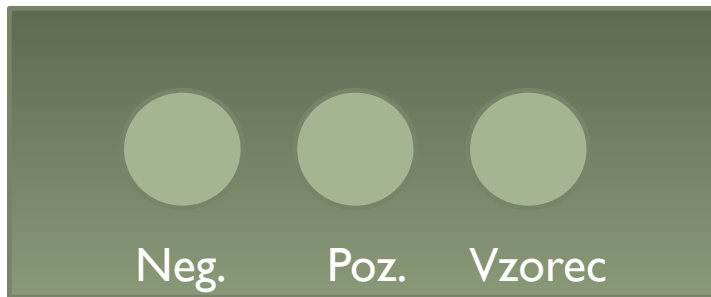
V. ELISA

ELISA je idejno precej podobna točkovnemu nanosu, le da se ponavadi izvaja v mikrotitrskih ploščicah, kar pomeni, da so vsi proteini kot tudi reagenti v raztopini in ne imobilizirani na membrani. Nanos vzorcev, dodajanje protiteles in drugih reagentov, ter odčitavanje rezultatov v diagnostiki potekajo avtomatizirano.

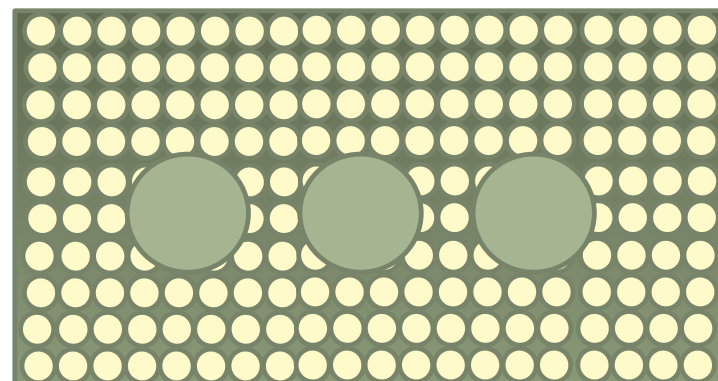
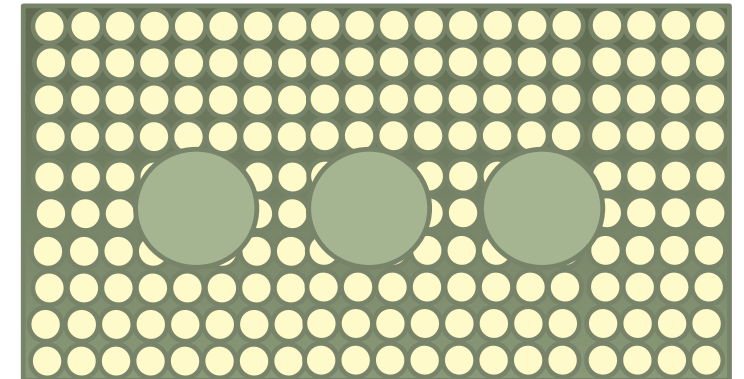


NAMEN IN POTEK VAJE – TOČKOVNI NANOS

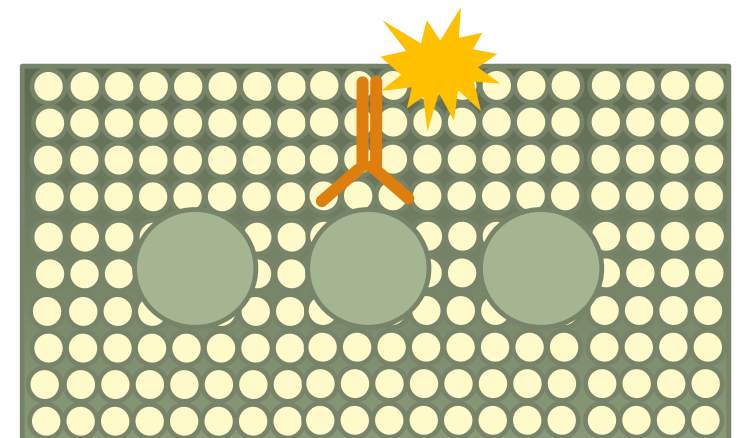
Ugotavljanje prisotnosti kravjega mleka (prisotnost govejih IgG) v deklariranih kozjih in/ali ovčjih sirih.



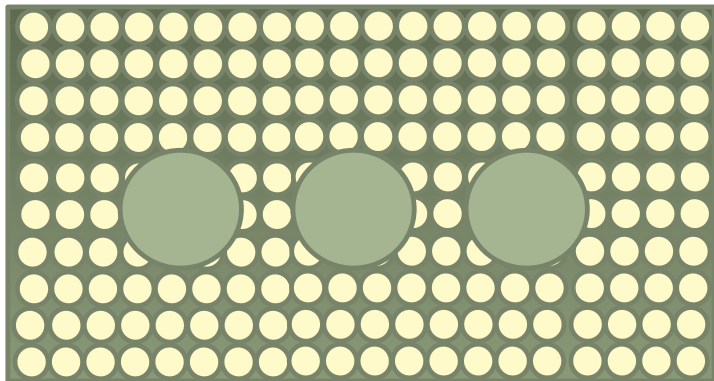
Blokiranje membrane



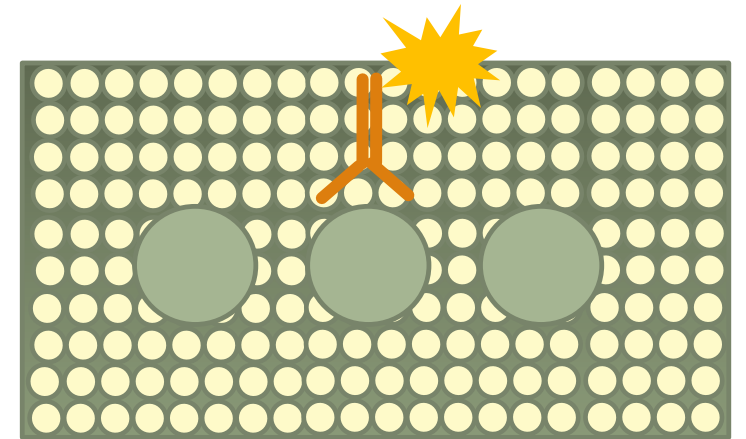
Dodatek konjugiranih primarnih protiteles



NAMEN IN POTEK VAJE – TOČKOVNI NANOS



Dodatek konjugiranih primarnih protiteles



Dodatek H_2O_2 in substrata

