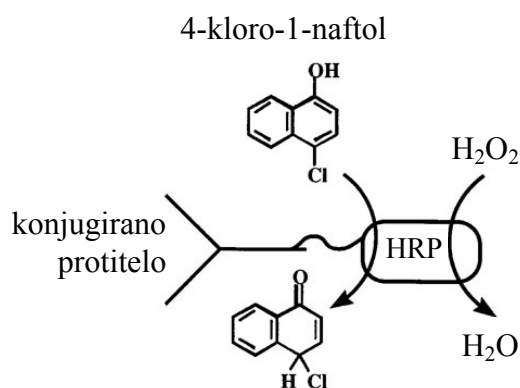


Imunološke metode - Določanje govejih IgG v siru

(Teorija je v skriptih na straneh 75 – 77.)

Namen vaje: Spoznati imunološke metode in osnovna pravila pri delu s protitelesi na primeru uporabe točkovnega prenosa, s katerim boste določili prisotnost govejih IgG v kozjih in ovčjih silih.

Uvod: Zaradi nižje cene kravjega mleka proizvajalci ovčjega in kozjega sira in dobavitelji mleka mešajo ovčje ali kozje mleko s kravjim mlekom. Kontrola avtentičnosti ovčjega in kozjega mleka je zato potrebna tako zaradi kontrole surovin kot tudi za zaščito potrošnika, saj mora biti deklaracija na proizvodu v skladu z njegovo kvaliteto. Dodatek kravjega mleka pri proizvodnji ovčjega sira lahko ugotovimo s pomočjo protiteles, ki specifično vežejo goveje IgG. Prisotnost govejih IgG bomo v vzorcih iz različnih vrst sirov določali z metodo imenovano točkovni prenos (dot blot). Na nitrocelulozno membrano bomo najprej vezali proteine iz vzorca in blokirali prosta mesta na membrani z jajčnim albuminom. Nato bomo dodali protitelesa, ki reagirajo z govejimi IgG in so konjugirana z encimom peroksidazo (horseradish peroxidase – HRP). Peroksidaza katalizira oksidacijo 4-kloro-1-naftola do vijoličasto obarvanega produkta (Slika 1).



Slika 1: Oksidacija 4-kloro-1-naftola, ki jo katalizira encim peroksidaza (HRP) v prisotnosti vodikovega peroksida (H_2O_2). Peroksidaza je vezana na protitelo.

Potek dela:

1. NA VAJO PRINESI KOŠČEK SIRA IN DEKLARACIJO, ČE JE SIR KUPLJEN! Če je možno, prinesi tvoj najljubši kozji ali ovčji sir, kravjega pa lahko uporabimo za kontrolo.
2. Priprava vzorca: 3 g sira zatehtaj v centrifugirko in homogeniziraj s stekleno palčko v 5 mL 0,15 M NaCl. Centrifugiraj 10 minut pri 2000 vrt./min.
3. Na nitrocelulozni membrani s kemičnim svinčnikom označi štiri mesta v razdalji najmanj 1,5 cm.
4. Pod oznake previdno, da ne poškoduješ membrane, odpipetiraj po 5 μ L pozitivne kontrole, negativne kontrole in dvakrat po 5 μ L vzorca, pripravljenega iz sira. Membrano posuši na zraku (približno 5 minut).
5. Membrano potopi v 5% raztopino jajčnega albumina in stresaj 30 minut.
6. Membrano prenesi v raztopino, ki vsebuje konjugirano protitelo, in stresaj 15 minut.
7. Membrano trikrat sperj z deionizirano vodo.
8. Membrano potopi v raztopino barvnega reagenta, ki mu tik pred uporabo dodaj 5 μ L H_2O_2 . Med stresanjem počakaj, da se membrana na mestu, kjer se nahaja antigen, vijoličasto obarva (približno 10 minut).
9. Raztopino barvnega reagenta odlij, membrano trikrat sperj z destilirano vodo in jo posuši na zraku.

Rezultat:

1. Nariši shemo poskusa.

2. Na označen prostor prilepi posušeno membrano ali preriši rezultat z membrane.



Odgovori na vprašanja:

1. Ali je vzorec sira..... vseboval goveje IgG?.....
2. Komentiraj rezultat.

3. Zakaj smo naredili negativno in zakaj pozitivno kontrolo?

4. Ali bi test izboljšali, če bi na membrano najprej vezali protitelo proti govejim IgG, nato dodali vzorec in nato še enkrat protitelo proti govejim IgG, tokrat konjugirano s peroksidazo?
Razloži.