

## Praktické cvičenie 8

### Nové metódy v imunológii

#### ELISA, Western blot

### IMUNOANALYTICKÉ METÓDY

Imunoanalytické metódy sa využívajú v modernej bioanalytike, **umožňujú stanovovať aj nízke koncentrácie antigénov alebo protilátok**, ktoré sa zvyčajne nedajú stanoviť klasickými sérologickými metódami. Môžu sa využiť tiež na stanovenie malých množstiev **rôznych hormónov, cytokínov, nádorových markerov a pod.**

**Princíp:** pracujú na princípe rozpoznania a dokázania antigénu alebo protilátky v tekutej vzorke pomocou väzby medzi antigénom a protilátkou na princípe „kľúč-zámka“. Spoločným znakom imunoanalytických metód je, **že na vizualizáciu prebehnutej reakcie medzi antigénom a protilátkou sa musí použiť „sekundárna“ protilátka, ktorá je značená rôznymi značkami:**

- enzýmom (enzýmová imunoanalýza),
- rádioizotopom (rádioimunoanalýza),
- luminoformom (luminiscenčná imunoanalýza) alebo
- fluorochrómom (fluorescenčná imunoanalýza).

Imunoanalýzy sa delia na homogénne a heterogénne. Pri heterogénnych je potrebné oddeliť naviazané reakčné látky od nenaviazaných zložiek reakcie. To sa zabezpečí pomocou premývania premývacím roztokom medzi jednotlivými krokmi reakcie.

#### 4.2.1 Enzýmová imunoanalýza – EIA

Jednou z najčastejšie používaných metód v imunologických a klinických laboratóriách je enzýmová imunoanalýza, ktorou je možné stanoviť aj veľmi nízke koncentrácie antigénov alebo protilátok (všeobecne povedané analytov) v tekutej vzorke. Enzýmová imunoanalýza (EIA – Enzyme ImmunoAssay) je metóda, pri ktorej sa používa vo fáze vizualizácie enzýmová reakcia.

EIA metódy sa rozdeľujú na heterogénne a homogénne.

- o **Homogénne metódy** nevyžadujú separáciu voľnej a viazanej frakcie analytu.
- o **Heterogénne metódy** vyžadujú separáciu voľnej a viazanej frakcie analytu.

Heterogénne EIA môžu byť **kompetitívne** (so značenou protilátkou alebo so značeným antigénom) alebo **nekompetitívne** (so značenou protilátkou).

### ***ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)***

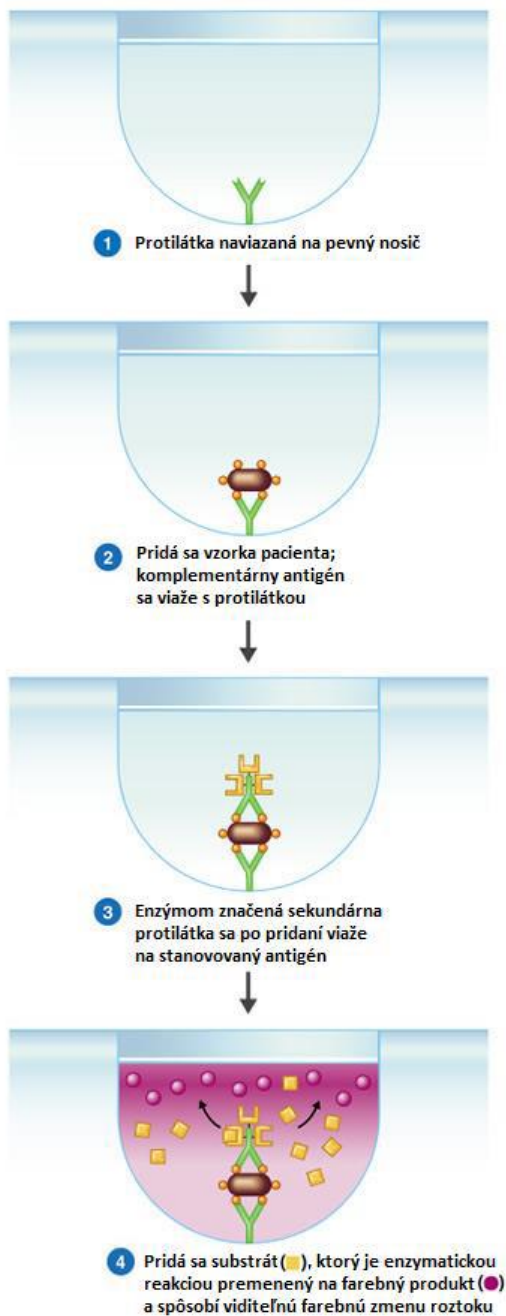
**V praxi sa veľmi často používa ELISA.** Je špeciálnym druhom EIA. Môže byť heterogénna nekompetitívna – tzv. sendvič alebo môže byť heterogénna kompetitívna. Na úspešné prevedenie sendvičovej metódy je potrebný antigén, ktorý má na svojom povrchu odlišné epitopy, najmenej pre dve odlišné protilátky. V súčasnej dobe je väčšina metód postavená na heterogénnej kompetitívnej EIA so značenou protilátkou.

**ELISA je enzýmová imunoanalýza na pevnej fáze.** Znamená to, že jedna z reagujúcich látok (buď známy antigén, alebo známa protilátka) je naviazaná na pevnú fázu (nosič). Ako **nosič** sa najčastejšie používajú jamky mikrotitračnej doštičky. **Samotná reakcia prebieha v niekoľkých krokoch, medzi ktorými sa premývaním odstraňujú z reakčnej zmesi nenaviazané látky.** ELISA na dôkaz protilátok

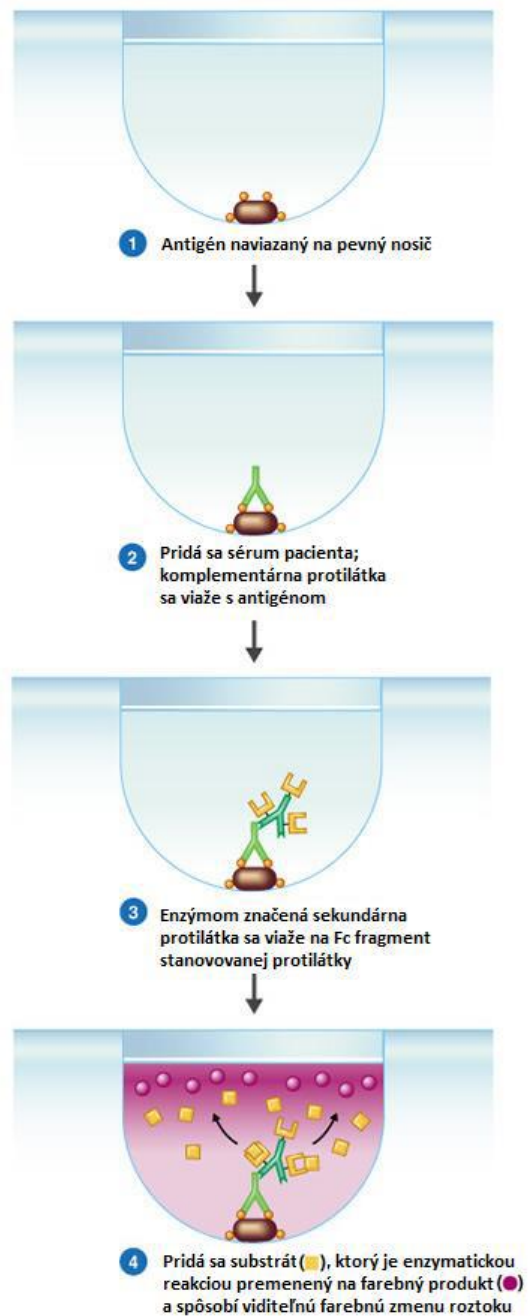
**Pri dôkaze protilátok (obrázok 61b) je na stenu jamiek mikrotitračnej doštičky naviazaný známy antigén.**

**Postup:** do jamiek mikrotitračnej doštičky sa aplikujú vzorky, v ktorých sa stanovuje prítomnosť špecifických protilátok. Na antigén sa po pridaní vyšetrovanej vzorky naviažu stanovované špecifické protilátky (ak sa vo vzorke nachádzali). Premytím sa odstránia nadbytočné nenaviazané protilátky. V ďalšom kroku sa pridá enzýmom značená sekundárna protilátka proti ľudskému imunoglobulínu (konjugát), ktorá je namierená proti Fc fragmentu stanovovanej protilátky. Po ďalšom premytí sa pridá bezfarebný substrát, ktorý je v pozitívnom prípade štiepený enzýmom naviazaným na sekundárnu protilátku a vzniká farebný produkt.

**Výsledok:** Intenzita výsledného zafarbenia sa meria spektrofotometricky a je úmerná koncentrácii stanovovanej protilátky.



a) Stanovenie antigénu metódou ELISA



b) Stanovenie protilátky metódou ELISA

© 2013 Pearson Education, Inc.

ELISA na dôkaz antigénov

**Pri dôkaze antigénov je na stenu jamiek mikrotitračnej doštičky naviazaná známa protilátka.**

**Postup:** do jamiek sa pridávajú vzorky, v ktorých sa stanovuje prítomnosť antigénu. Potrebné je však, aby antigén mal aspoň dva odlišné epitopy. Na protilátku fixovanú k stene jamky

mikrotitračnej doštičky sa naviaže stanovovaný antigén, na ktorý sa v ďalšom kroku naviaže enzýmom značená protilátka proti vyšetrovanému antigénu. Pridá sa bezfarebný substrát, ktorý sa v pozitívnom prípade enzymaticky katalyzovanou reakciou zmení na farebný produkt.

**Výsledok:** Intenzita výsledného zafarbenia roztoku sa meria spektrofotometricky a je úmerná koncentrácii dokazovaného antigénu vo vzorke.

Využitie ELISA

ELISA súpravy sú v súčasnosti dostupné nielen pre klinickú diagnostiku v laboratóriách, ale aj pre domáce použitie. S obľubou sú využívané napr. tehotenské testy, ktoré registrujú prítomnosť tehotenského hormónu hCG v moči tehotnej ženy.

## **IMUNOBLOTOVACIE TECHNIKY – IMUNOBLOT**

Blotovacie metódy **kombinujú elektroforézu a imunoanalýzu**. Uskutočňujú sa v rôznych modifikáciách.

Môžu sa využiť na:

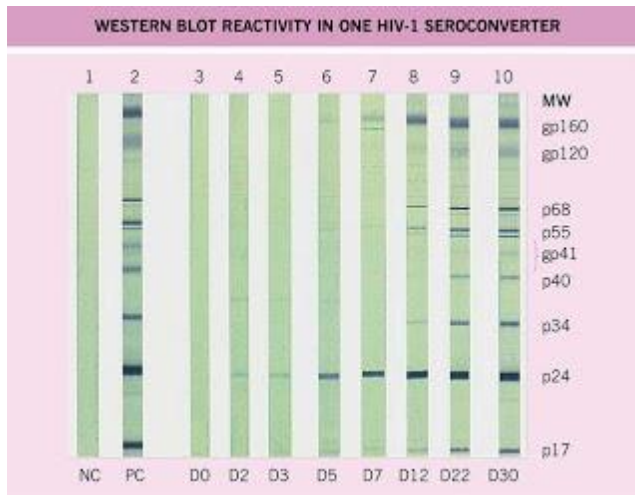
- analýzu DNA (Southern blot),
- analýzu RNA (Northern blot),
- analýzu proteínov (Western blot),
- analýzu posttranslačných úprav (Eastern blot).

Najčastejšie sa používa imunoblot Western blot a imunodot.

### **4.3.1 Western blot**

**Princíp Western blotu** spočíva v tom, že skúmaná zmes proteínových antigénov je rozdelená elektroforézou v géli a následne prenesená na pevný nosič (napr. nitrocelulóзовú membránu). V ďalšej fáze dochádza k vlastnej imunoanalýze.

**Postup:** imunoblot sa ponorí do vzorky pacientovho séra, v ktorom sa majú dokázať protilátky. Po inkubácii a premytí sa miesta s naviazanými protilátkami vizualizujú pomocou značenej sekundárnej protilátky proti ľudskému imunoglobulínu (značená je napr. enzýmom). **Výsledok:** v pozitívnom prípade sa na imunoblote objaví tmavý prúžok na mieste, ktoré zodpovedá určitému antigénu, proti ktorému vyšetrovaná vzorka obsahovala príslušnú protilátku.



Western blot na dôkaz HIV-1