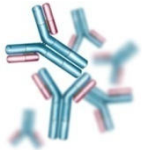


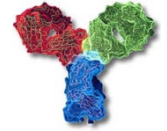
# Úvod do imunoanalýzy

## Reakce antigenu a protilátky *in vitro*

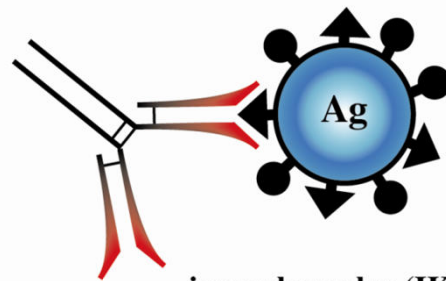
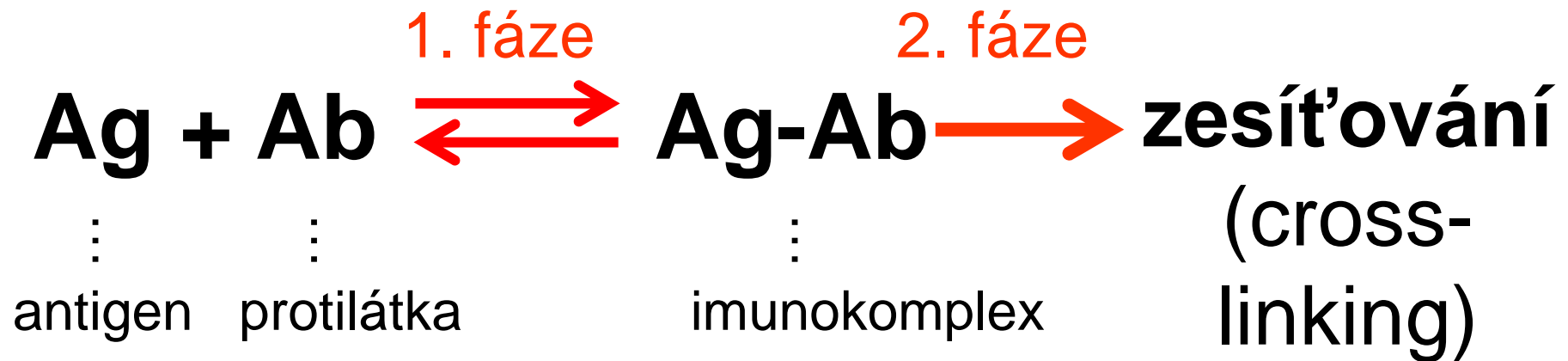




# Imunochemická reakce

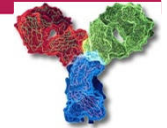
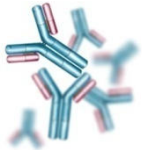


Imunochemie je obor, ve kterém jsou studovány fyzikální a chemické interakce antigenů a protilátek

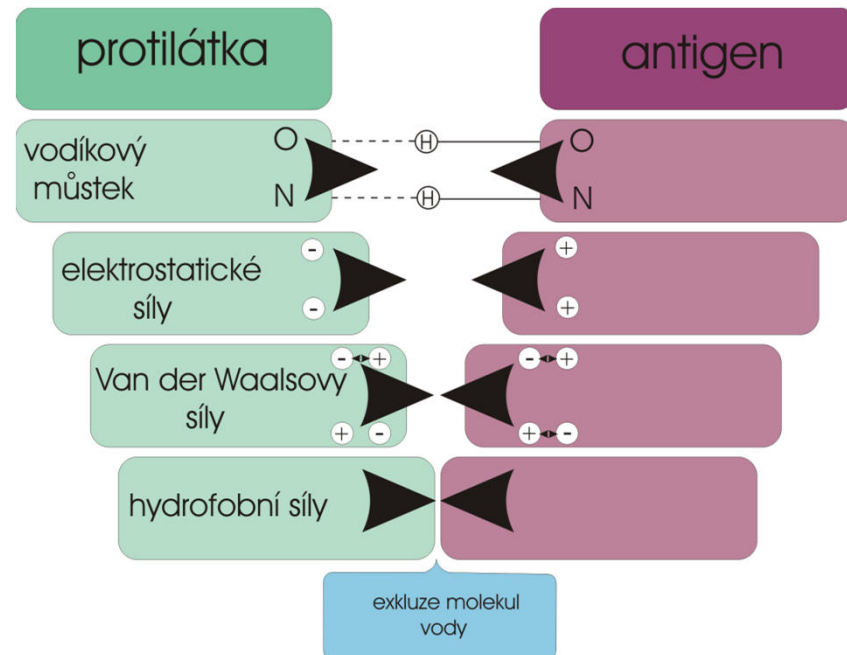


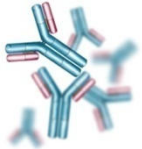
imunokomplex (IK)





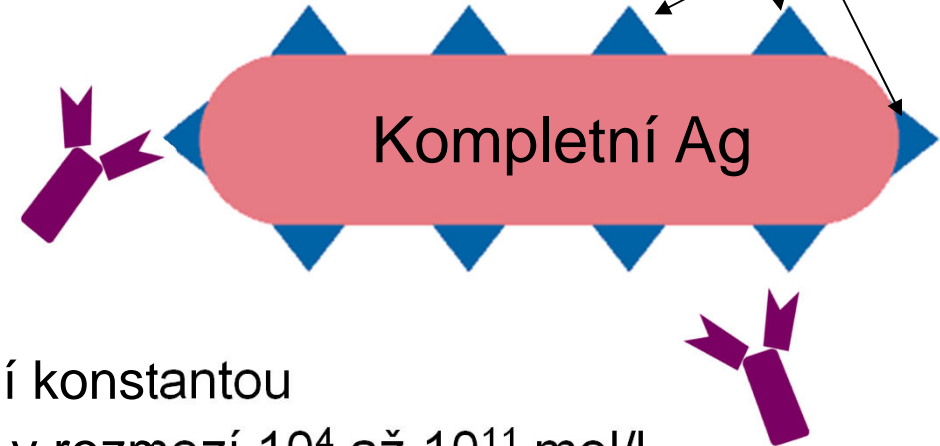
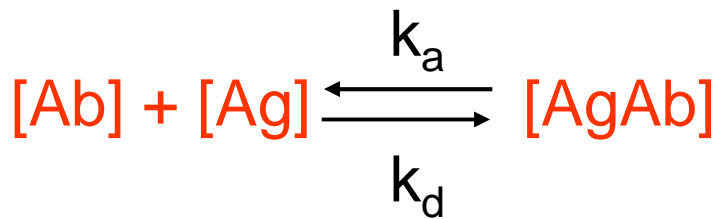
# Imunochemická reakce





# První fáze reakce

jednotlivé  
epitopy



**Rovnovážný stav** je definován afinitní konstantou

• je charakterizován efektivností vazby v rozmezí  $10^4$  až  $10^{11}$  mol/l

$$\frac{k_a}{k_d} = K_A = \frac{[AbAg]}{[Ab][Ag]}$$

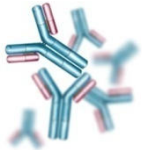
Ka asociační konstanta  
Kd disociační konstanta

Termodynamicky (odvození z Guldbergova a Waagova zákona):

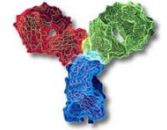
• chemická afinita  $A^0 = -\Delta G^0$

•  $R$  plynová konstanta,  $T$  teplota [K]





# První fáze reakce



**AFINITA** protilátky = síla vazby Ag (haptenu) a Ab

**AVIDITA**

- síla vazeb mezi di- a polyvalentní protilátkou a komplexním antigenem s více determinantami

**Valence**

- počet vazebných míst Ab

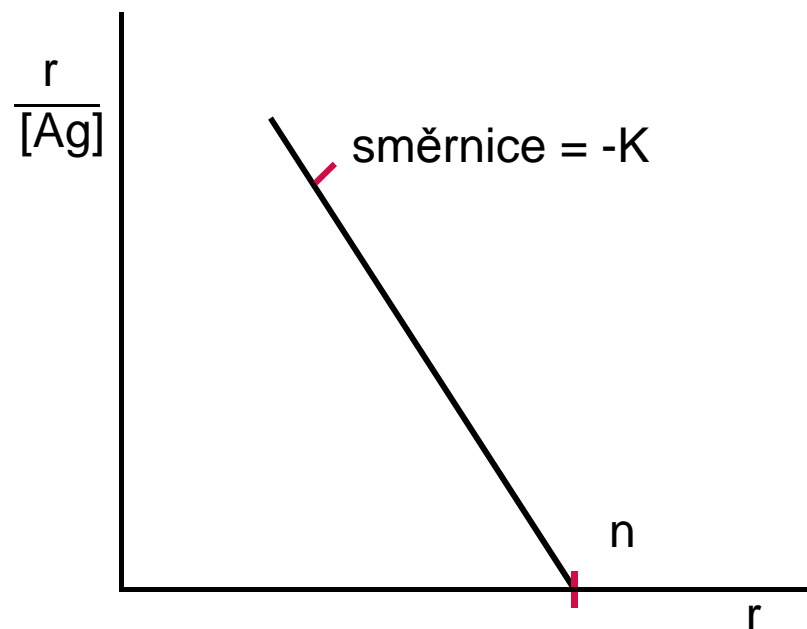
# Výpočet K

- experimentálně: Scatchard (Langmuir)

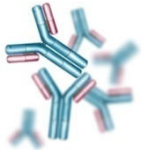
$$\frac{[AbAg]}{[Ab]} = r = \frac{nK[Ag]}{1 + K[Ag]}$$

$$\frac{r}{[Ag]} = nK - rK$$

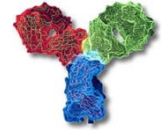
$r$  moly Ag vázaného 1 molem protilátky  
 $[Ag]$  mol. koncentrace volného Ag  
 $n$  valence protilátky



- Laboratorně: měření množství volného a vázaného Ag v rovnovážném stavu při několika koncentracích Ag



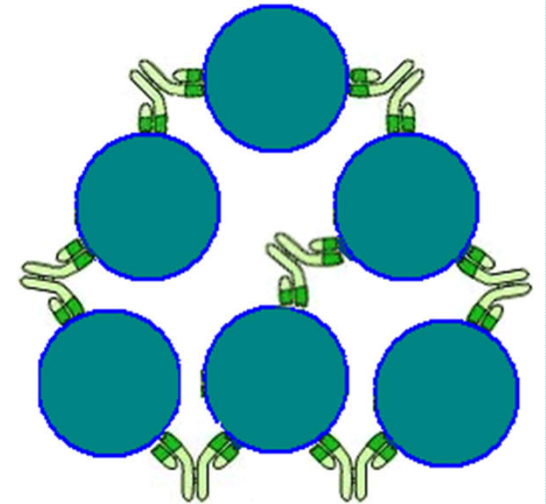
# Druhá fáze reakce

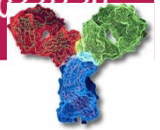
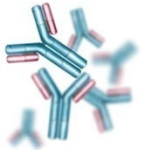


1.vznik IK (první fáze) je rychlá reakce

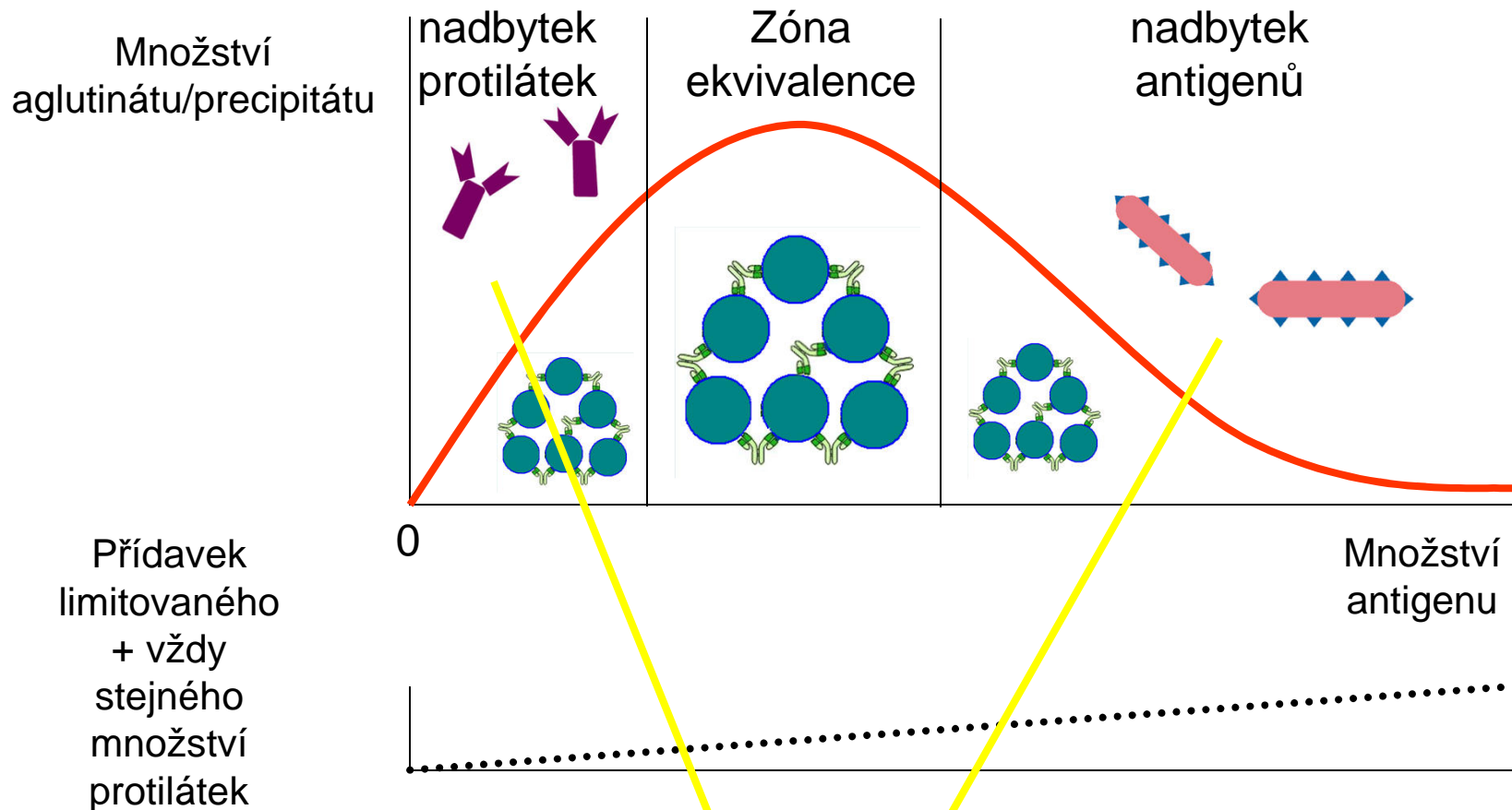
2.zesíťování (druhá fáze)

- reakce je pomalá
- podmínka: Ab musí být alespoň bivalentní



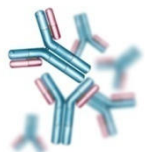


# Průběh imunochemické reakce



Přídavek limitovaného + vždy stejného množství protilátek





# Rozvolnění imunokomplexu

- Extrémní hodnoty pH (stabilní je v pH 4-9)
- Roztok močoviny, thiokyanát amonný (= chaotropní ionty)
- Vysoká koncentrace solí
- Teplota (optimální je 37°C)



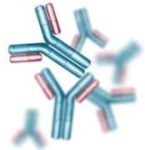
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Univerzita  
Pardubice

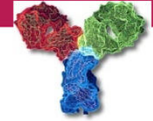
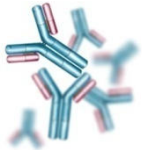
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



# Typy protilátek

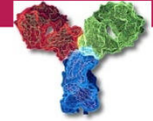
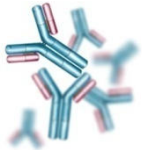
- Polyklonální – v antisérech
- Monoklonální – produkty hybridomů



# Polyklonální protilátky

- imunní séra, tzv. antiséra
- Imunizace: injekčně podávaný antigen

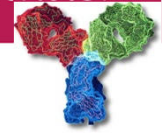
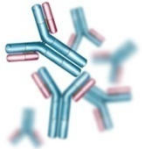




# Polyklonální protilátky

- Polyklonální protilátky tvoří heterogenní skupinu
- Rozdíly ve specifitě protilátek:
  - monospecifické – jedna specifita
  - polyspecifické – více specifit
- liší se v třídě a podtřídě

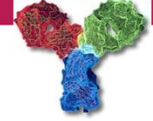
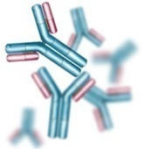




# Polyklonální protilátky

- Xenoantisérum
  - protilátky vytvořené z jiného biologického druhu
  - např. králičí antisérum proti kuřecímu ovalbuminu
- Aloantisérum
  - shodný biologický druh
  - např. imunizace při neshodě Rh antigenů na lidských červených krvinkách

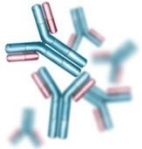




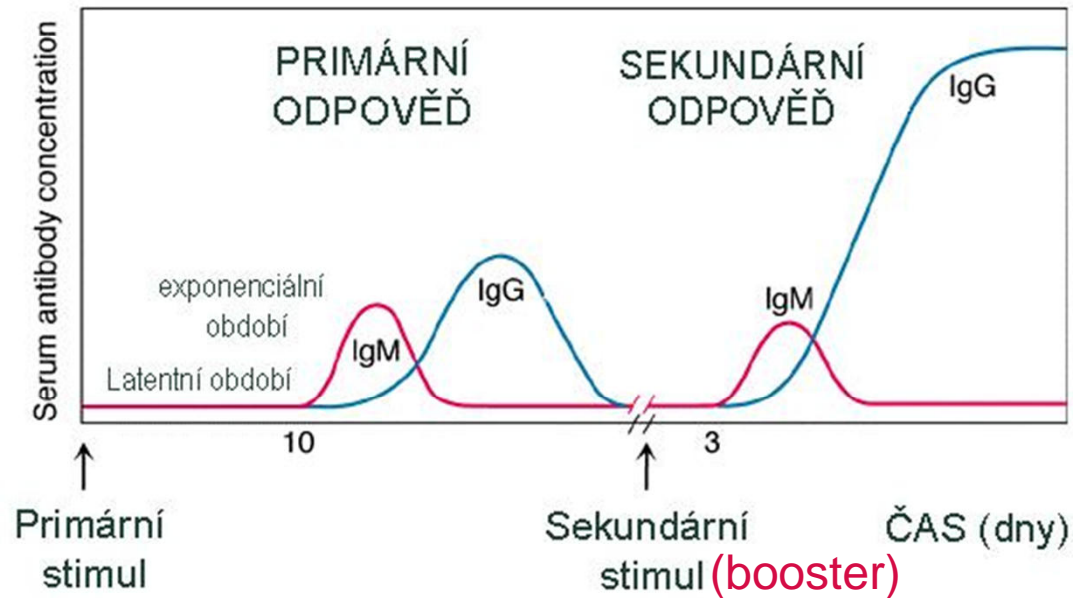
# Příprava polyklonálních protilátek

Adjuvans snižuje rychlost vylučování antigenu a současně podněcuje fagocytózu






# Polyklonální protilátky: typy imunitních odpovědí



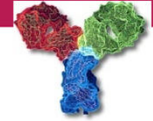


# Časové schéma imunizace

- 
- První stimul
    - subkutánní injekce v kompletním F (10-100 mg antigenu, čistý)
  - Druhý stimul
    - intramuskulární injekce v inkompletním F (po 2-4 týdnech)
  - Vykrvení (bleeding) 7 – 15 dní po poslední injekci
  - Stanovení **titru** protilátek



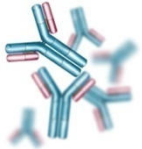
# Stanovení TITRU séra, protilátek



Metody ke stanovení:

- Precipitační, aglutinační (sérologické)
- Immunodifúzní
- Imunoelektroforetické
- Immunoblotting
- Imunoenzymové (EIA)
- imunoradioizotopové (RIA)
- imunofluorescenční (FIA)

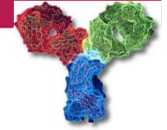




# Metody pro purifikaci protilátek

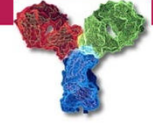
- Protein-nespecifické metody
- precipitace neutrálními solemi
- chromatografická frakcionace
- etanolová frakcionace
- enzymové štěpení
- Protein-specifické metody
- chromatografie na molekulových sítích spojená s iontoměničovou chromatografií
- imunoafinitní chromatografie





# Monoklonální protilátky

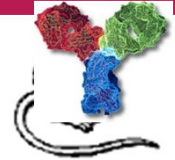
- jsou produktem jednoho buněčného klonu
- totožné protilátky jednoho izotypu (IgG, IgM, IgA) a jedné specifity (tj. mají stejnou i variabilní část)



# Použití monoklonálních protilátek

- v imunochemických metodách k detekci solubilních látek
- k detekci membránových molekul (CD znaky)
- experimentálně

# Hybridomová technika

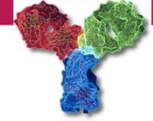


Teorie zavedena r.1975 Köhler a Milstein

- Nobelova cena r.1984

**Myší hybridní buňka** vzniká fúzí **myelomové** a **plazmatické** buňky





# Buňky pro hybridom

## Vlastnosti plazmatické buňky

- buňka izolovaná ze sleziny imunizovaných myší

## Vlastnosti myelomové buňky:

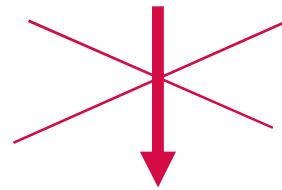
- odvozená ze slezinných plazmocytů myší
- je schopná růst a dělit se *in vivo*, *in vitro*
- neprodukuje protilátky



# De novo syntéza nukleotidů ... a princip hybridomu

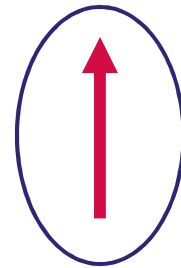
Přímá cesta:

sacharidy + aminokyseliny



aminopterinový blok

**NUKLEOTIDY**



HGPRT a TK nutné

Náhradní cesta:

dusíkaté báze (tymidin, hypoxantin) + nukleosidy

# Vznik hybridomu, selekce

- Fúze myelomové a plazmatické bb probíhá v HAT médiu v přítomnosti 35-50% PEG
- Selekční HAT médium



