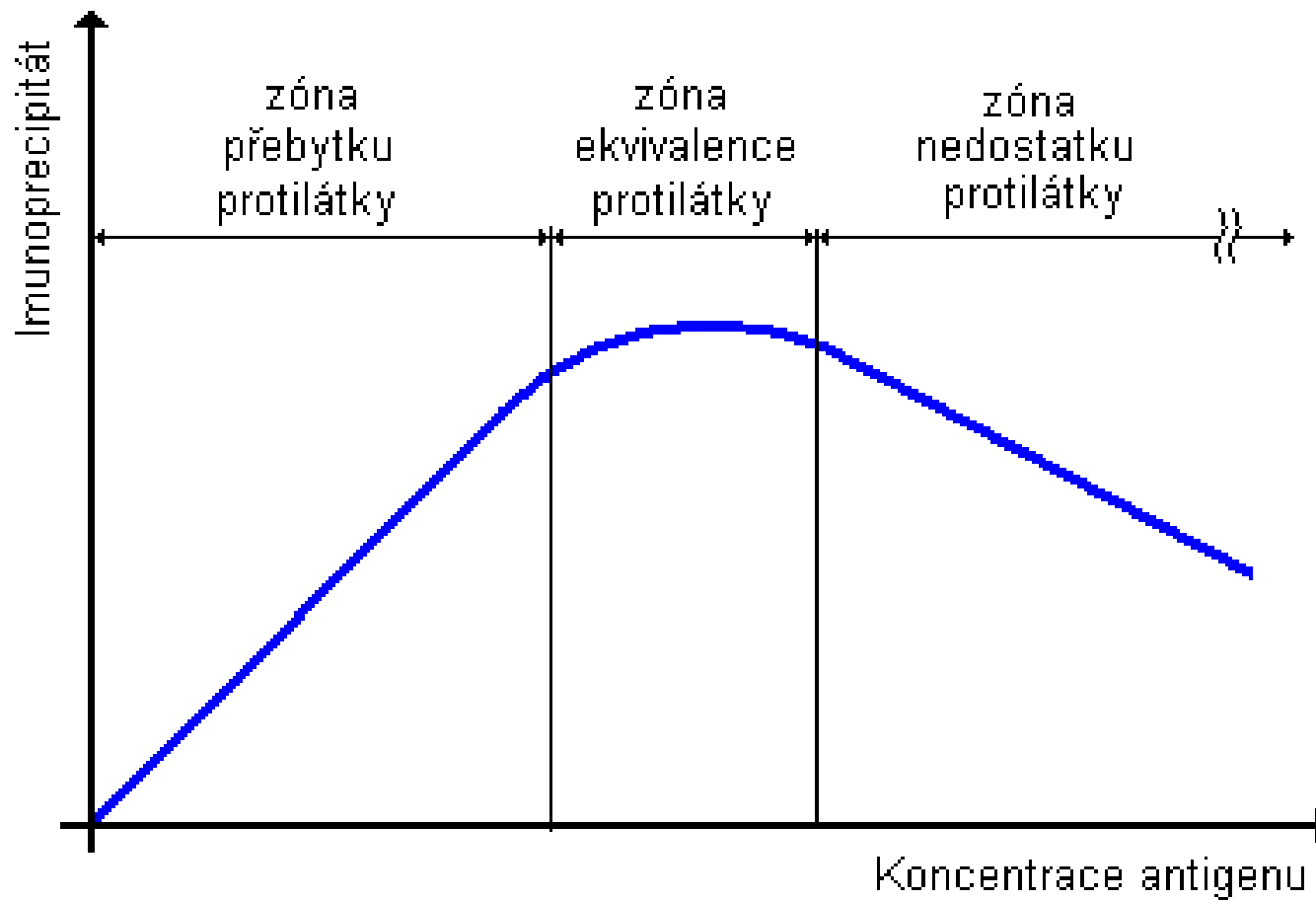


Imunochemické metody

Jaromír Šrámek, 5108
1. LF UK
2006/07

Obecné principy



Rozdělení metod

- **imunoprecipitační metody**
 - při reakci vzniká precipitát
 - např. aglutinační reakce, imunodifúze, imunoelektroforéza
- **neprecipitační metody**
 - při reakci nevznikají imunokomplexy, neprecipitují
 - např. imunoturbidimetrie, ELISA, RIA
- **ostatní metody**
 - reakce Ag s Ab využita jiným způsobem
 - imunosenzory, mikroarray, (imunoafinitní chromatografie)

Rozdělení metod

- **metody I. generace**
 - většinou kvalitativní nebo semikvantitativní
 - některé „techniky v roztoku“ – precipitační reakce, aglutinační reakce, CFR
- **metody II. generace**
 - kvantitativně i složité směsi Ag
 - imunodifúze, imunoelektroforéza

Rozdělení metod

- **metody III. generace**

- velmi citlivé metody, stanoví Ag, Ab i hapteny
- imunoanalýzy (např. RIA, ELISA, FIA), imunoturbidimetrie, imunonefelometrie, imunofluorimetrie, popř. jejich kombinace
- mikroarray

- **metody IV. generace**

- kontinuálně měří Ag, Ab nebo hapteny
- imunosenzory

Techniky v roztoku

- **I. generace** imunochemických metod
 - precipitační metody
 - aglutinační metody
 - komplement fixační reakce
- **III. generace** imunochemických metod
 - imunonefelometrie
 - imunoturbidimetrie

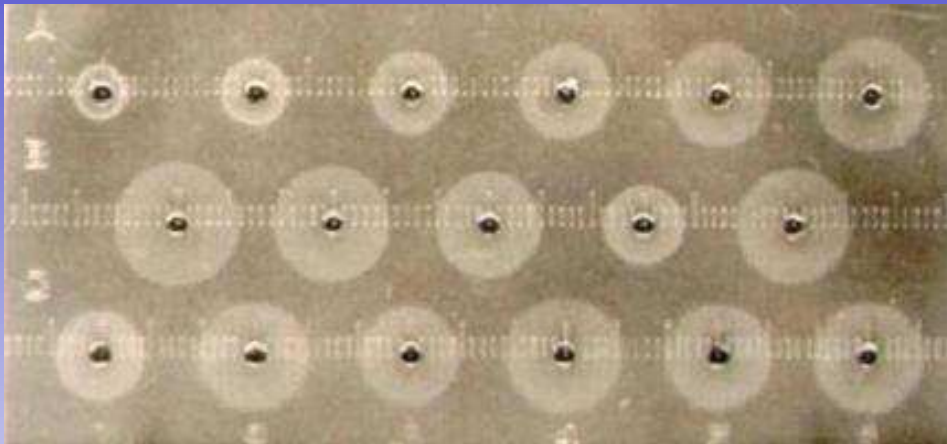
Techniky v roztoku

- **precipitační reakce**
 - stanovení krevních skupin
- **latexová aglutinace**
 - rychlé kvalitativní stanovení „u lůžka“
 - Ag nebo Ab imobilizován na latexových kuličkách
- **imunoturbidimetrie**
 - přesné kvantitativní stanovení
 - lze použít i běžný spektrometr

Imunodifúzní metody

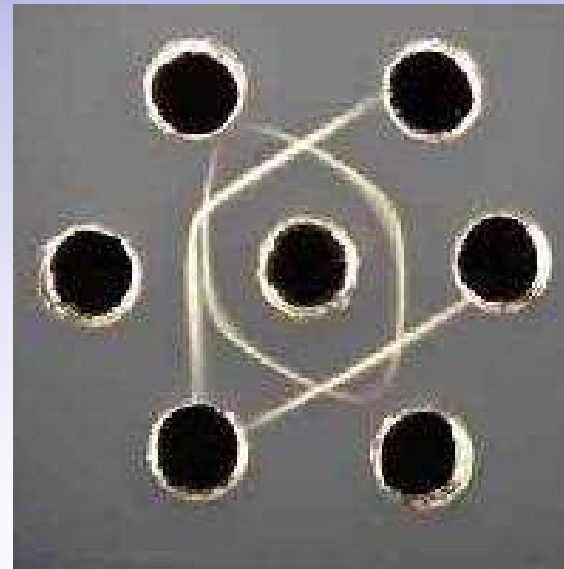
- imunoprecipitace probíhá v gelu
- difunduje jedna nebo obě složky reakce
- kvalitativní i kvantitativní metody
- použití výjimečné (např. soudní lékařství)
- teoreticky možná automatizace, prakticky obtížná realizace

Imunodifúzní metody



jednoduchá radiální
imunodifúze

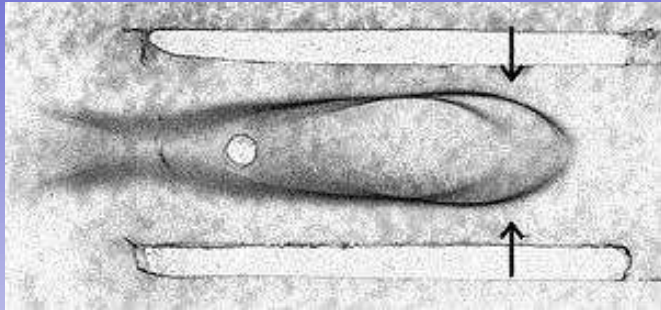
dvojitá radiální
imunodifúze



Imunoelektroforéza

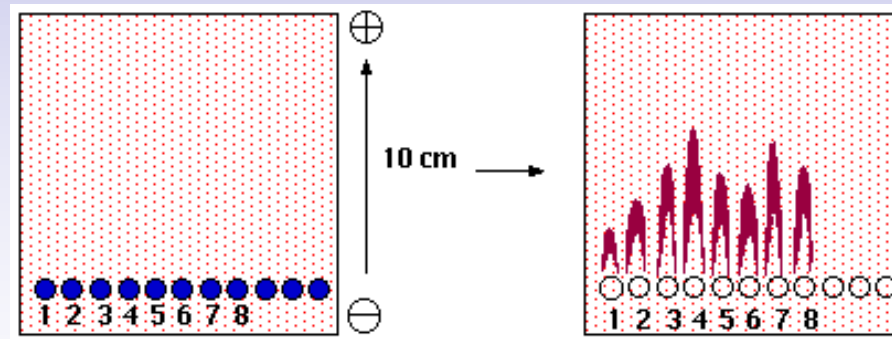
- kombinace imunodifúze a elektroforézy
- rychlejší než imunodifúzní metody
- méně citlivé a pracnější než imunoanalýzy
- rozlišujeme:
 - klasickou imunoelektroforézu (*kvalitativní*)
 - raketovou imunoelektroforézu (*kvantitativní*)
 - protisměrnou imunoelektroforézu (*kvalitativní*)
 - dvourozměrnou imunoelektroforézu (*kvantitativní*)

Imunoelektroforéza

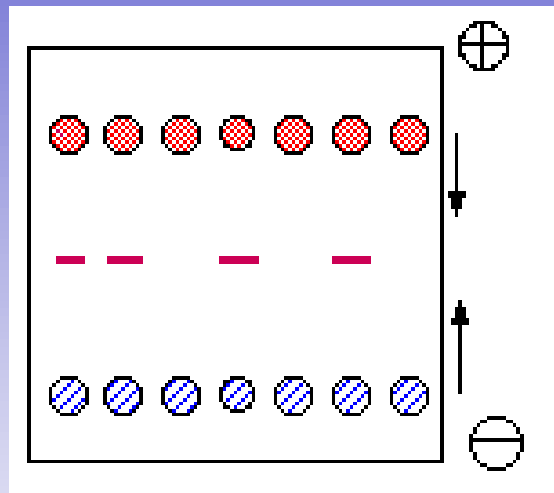


imunoelektroforéza dle
Grabarové a Williamsové

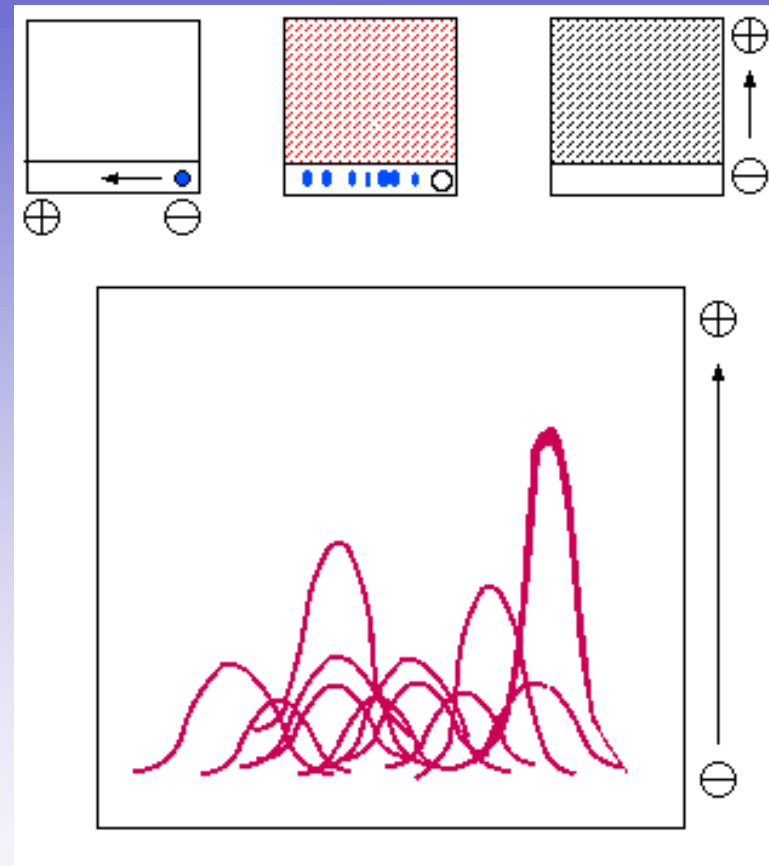
raketová
imunoelektroforéza



Imunoelektroforéza



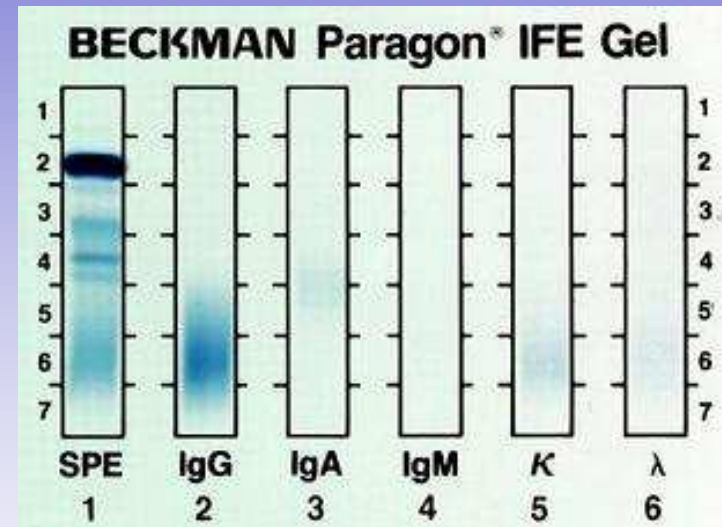
protisměrná imunoelektroforéza



dvourozměrná imunoelektroforéza

Imunoblotting

- otisk (**Western blottig**) proteinů z gelu za pevný podklad
 - přiložením ss. napětí
 - difúzí
 - kapilárním tlakem
 - vakuem
- **výhody otisku:**
 - zabrání se nespecifickým interakcím
 - snadnější detekce proteinu




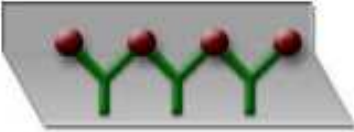



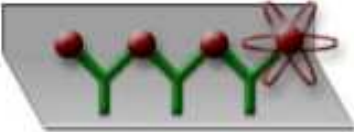

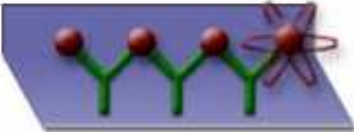

Radioimunoizotopové metody

- **RIA** – RadioImmunoAssay
 - radioizotopem značený antigen/hapten
- **IRMA** – ImmunoRadioMetric Assay
 - radioizotopem značené protilátky
- **EPRIA** – Enzyme Potentiated RIA
 - protilátka s navázaným enzymem, ten uvolňuje radioizotop z přidaného substrátu

RIA

- velmi citlivá metoda
- postup:
 - $Ab + Ag + Ag^*$ v jedné směsi
 - separace imunokomplexů
 - měření aktivity, nepřímo úměrná množství Ag
- podle separace imunokomplexů
 - solid phase radioimmunoassay
 - sekundární precipitační protilátky
 - elektroforéza
 - ionexová chromatografie
 - precipitace přidáním solí
- varianta se značenou protilátkou - **IRMA**

RIA

| | | |
|--|--|--|
| <p>REAGENCIE: <i>Ab specifická pro haptenu</i> (povlékající jamku) <i>Neznámý vzorek</i> <i>Proběhne imunoreakce</i> <i>Odmytí nenavázaného substrátu</i></p>  | <p>POZITIVNÍ VZOREK <i>vysoká hladina haptenu</i></p>  | <p>NEGATIVNÍ VZOREK <i>nízká hladina haptenu</i></p>  |
| <p>REAGENCIE: <i>haptenu značený ¹²⁵I</i></p>  <p><i>Proběhne imunoreakce</i> <i>Odmytí nenavázaného radioaktivního substrátu</i></p> |   |  |
| <p>PROCEDURA: <i>Měření aktivity gama záření</i></p> <p>ZÁVĚR: <i>Změřená aktivita je nepřímě</i> <i>úměrná koncentraci haptenu</i> <i>ve zkoumaném vzorku</i></p> |  |  |

RIA

- **výhody**
 - vysoká citlivost
 - levnější (*ve výsledku*)
- **nevýhody**
 - nutnost separace
 - práce s radioaktivním materiálem

EPRIA

- Enzyme Potentiated RIA
- velmi citlivá metoda (až 100x než RIA)
- protilátka je značena enzymem (*glutamátdekarboxyláza*)
- k separovanému imunokomplexu se přidá kys.glutamová s ^{14}C v pozici 1
- měří se aktivita uvolněného $^{14}\text{CO}_2$
- drahý provoz

EIA

- protilátky nebo antigeny značené enzymem
- výhody (vs. RIA)
 - stálejší reagensie
 - menší zdravotní riziko
- rozdělení
 - **homogenní** aktivita enzymu v imunokomplexu se mění
 - **heterogenní** aktivita enzymu v imunokomplexu se nemění

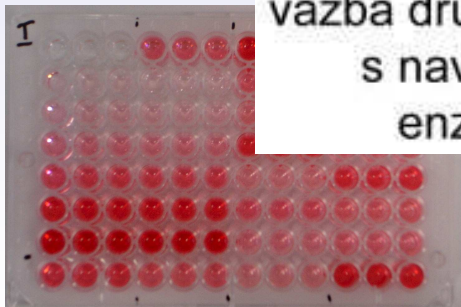
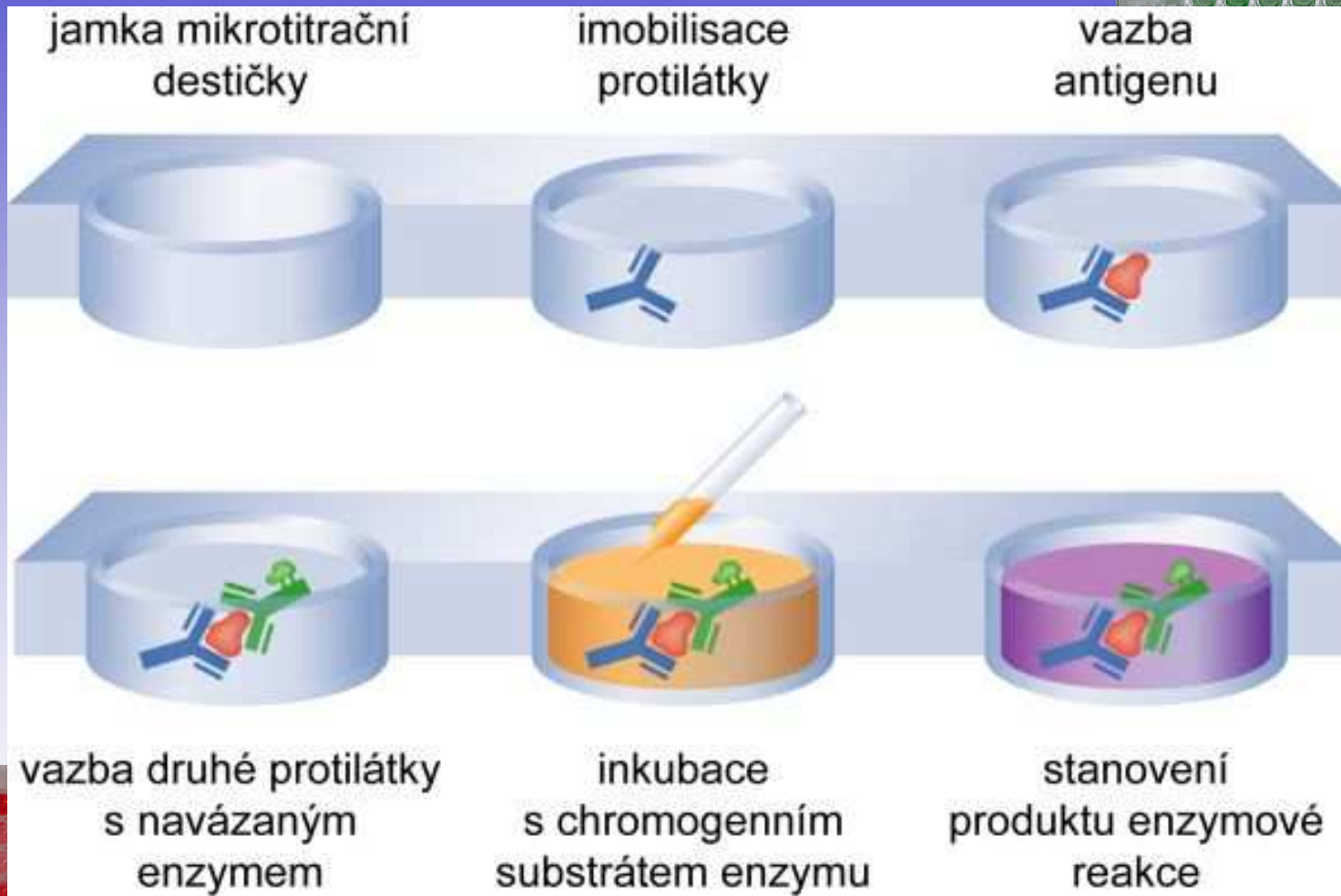
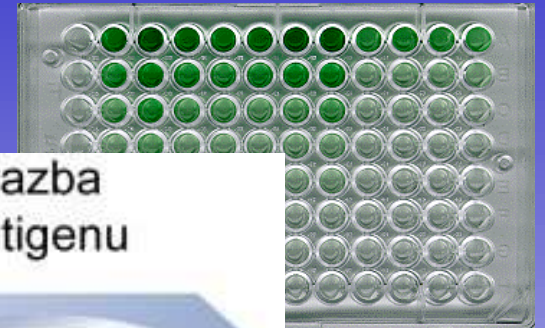
Homogenní EIA - EMIT

- Enzyme Multiplied Immunoassay Technique
- haptenu je navázán na enzym (lyzozym, malátdehydrogenáza, glukóza-6-fosfátdehydrogenáza)
- protilátky kompetují o haptenu
- po vzniku imunokomplexu dochází k měřitelné změně aktivity enzymu
 - **snížení** – obvyklé, blokáda vazebného místa, konf. změna
 - **zvýšení** – jen tyroxin, konformační změna
- použití – stanovení koncentrace nízkomolekulárních látek (haptenu)
 - **léky** – antibiotika, cytostatika, digoxin
 - **hormony** – T3, T4, kortizol

ELISA

- Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
- několik modifikací:
 - kompetitivní ELISA pro Ag a hapteny
 - sendvičová nekompetitivní ELISA pro Ag
 - nepřímá ELISA pro Ag
 - sendvičová nekompetitivní ELISA pro Ab

ELISA



ELISA

- odečítat lze pohledem (kvalitativně) nebo čtečkou (fotometrie)
- metodu lze dobře automatizovat
- obvykle lze kombinovat reagensie a přístroje různých výrobců, nebývá doporučováno

FIA

- Fluorescence ImmunoAssay
- metody využívají toho, že některé látky po ozáření absorbují energii a se zpožděním jí část vyzáří
- **Stokesův posun** = rozdíl mezi vlnovou délkou pohlceného a vyzářeného záření

Heterogenní FIA

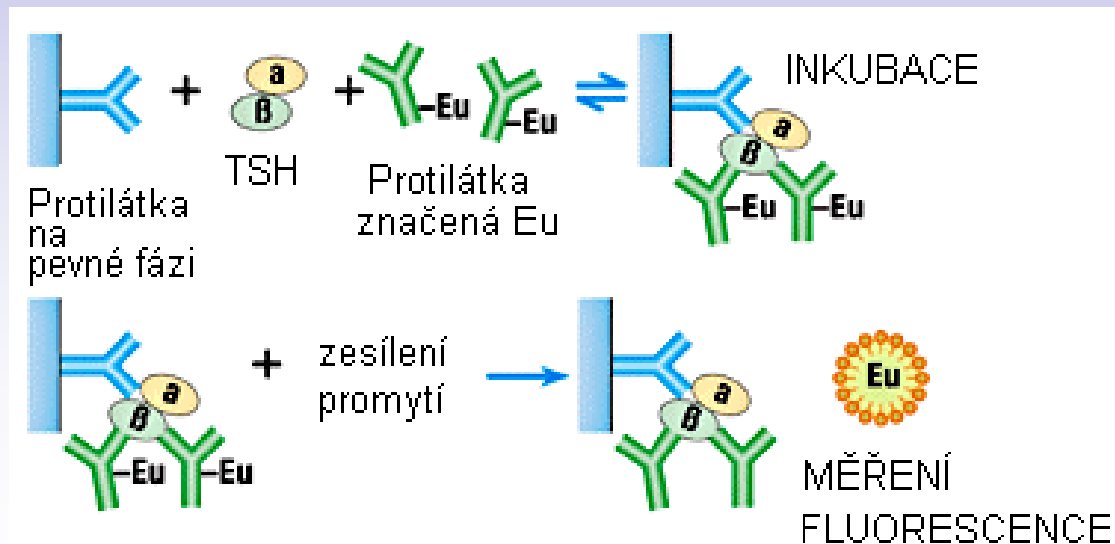
- **SepFIA** = Separační FIA
 - značený antigen
- **IFMA** = ImmunoFluoroMetric Assay
 - značené protilátky
- **MEIA** = Microparticle Enzyme IA
 - mikročástice s protilátkou, na které se váže Ag
 - druhá protilátka s alkalickou fosfatázou
 - po separaci fosfatáza štěpí substrát (4-metylumbelliferylfosfát) na produkt s vyšší fluorescencí

Homogenní FIA

- jednoduché uspořádání je málo citlivé a použitelné jen na hapteny
- modifikace zvyšují přesnost i citlivost
 - **DELFIA**
 - **FPIA**

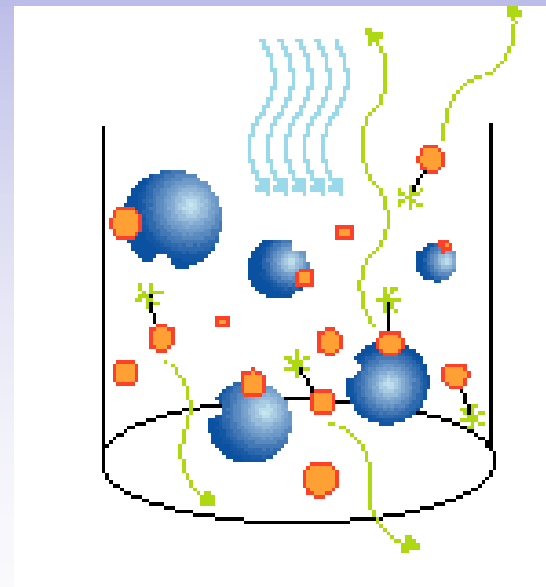
DEL \overline{F} IA

- Dissociation-Enhanced Lanthanide FluoroImmunoassay
- po vzniku imunokomplexu se ligand mění na látku s dlouhou fluorescencí



FPIA

- měření fluorescence v polarizovaném světle
- jen pro malé molekuly
- Ruthenium
- zpoždění



LIA (CLIA)

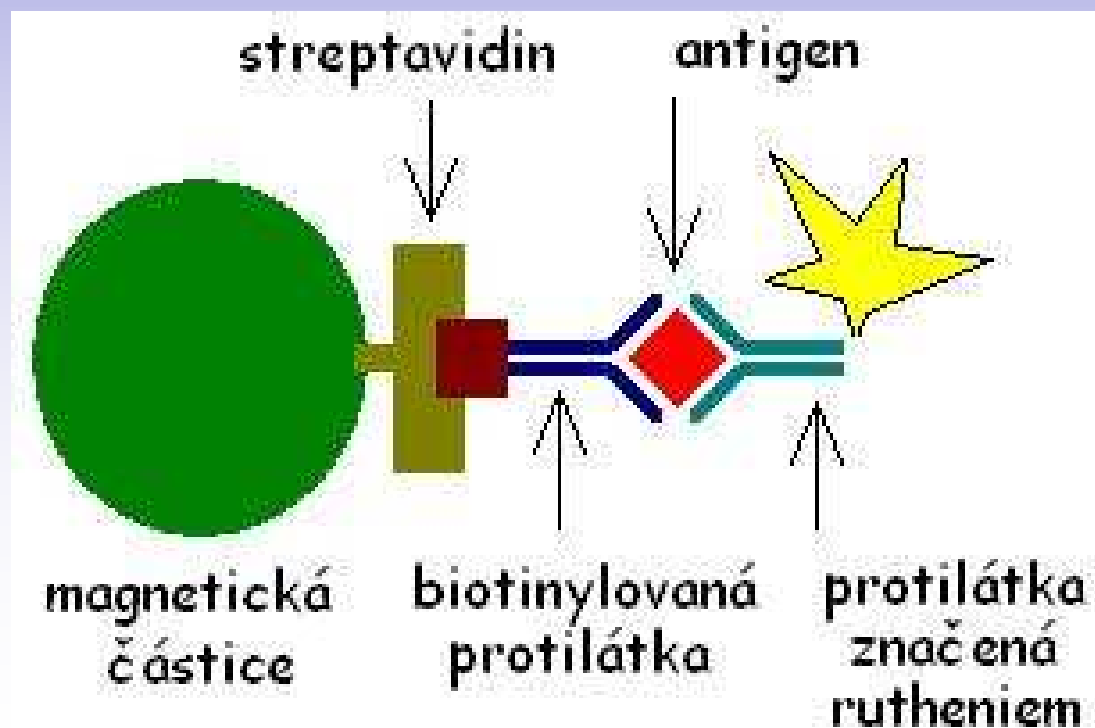
- ChemiLumminiscence ImmunoAssay
- luminiscenční značka – chemiluminofor
 - **spotřebovává se** - např. luminol, izoluminol
 - **nespotřebovává se** - např. luciferáza
- citlivost srovnatelná s RIA
- **modifikace:**
 - **luminiscence zesílená enzymem**
 - **elektroluminiscence (ECLIA)**

Luminiscence zesílená enzymem

- heterogenní metoda
- značení alkalickou fosfatázou
- inkubace s adamantyldioxetan fosfátem

Elektroluminiscence (ECLIA)

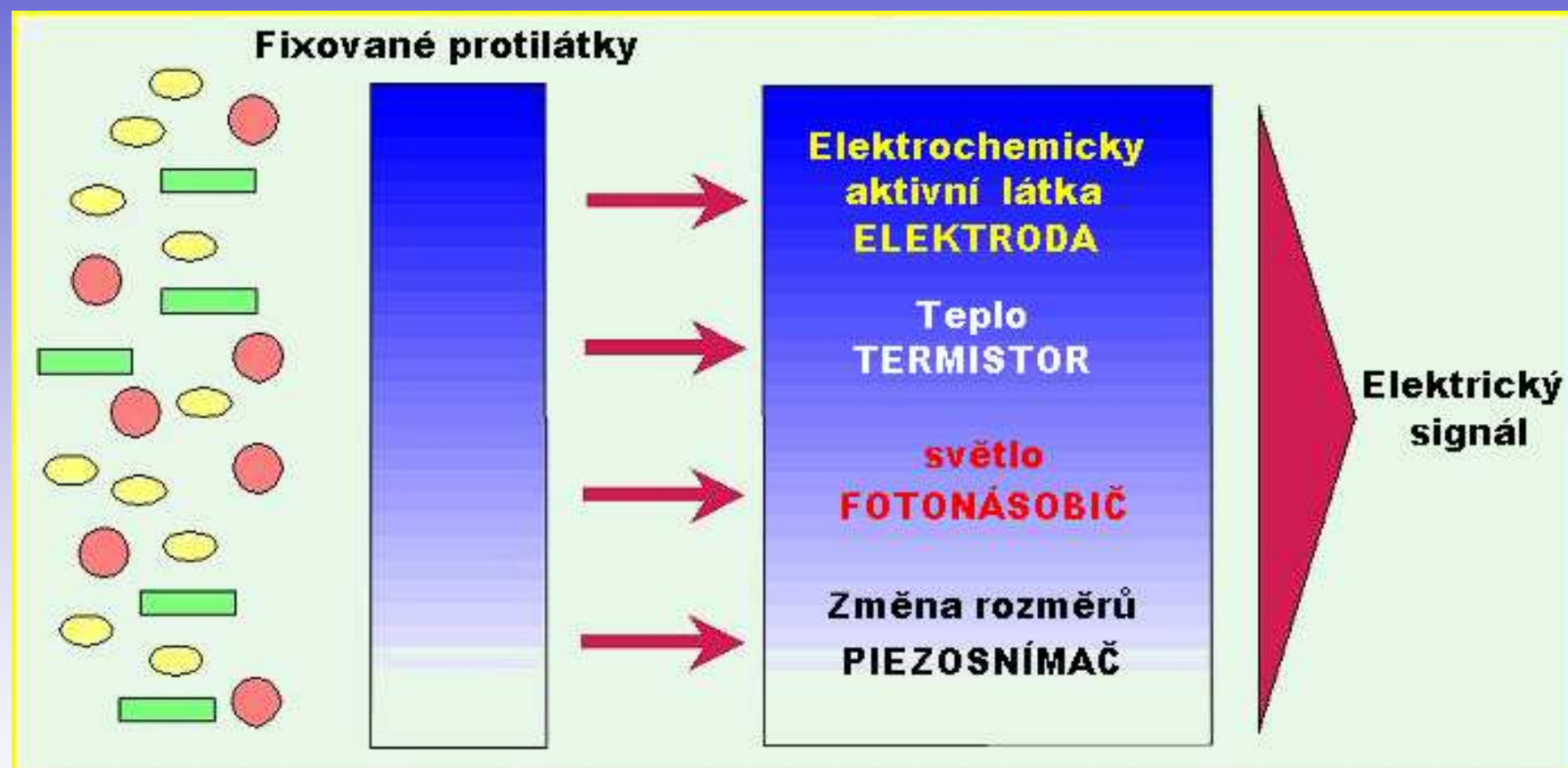
- homogenní metoda
- chemiluminiscence je iniciována elektricky
- **tripropylamin (TPA)** - přenašeč e^- na Ru



Imunosenzory

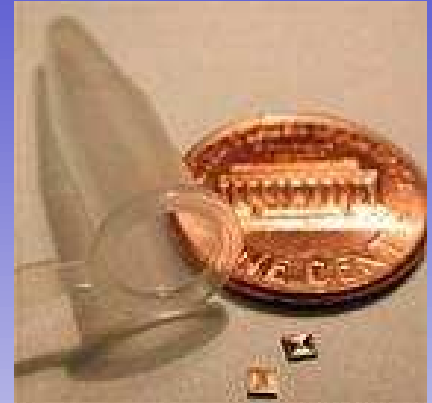
- **biosenzor** je zařízení, které převádí fyzikální nebo chemický signál na signál elektrický a jehož součástí je biologický materiál
- podle IUPAC je třeba rozlišovat
 - **biopróby** – na jedno použití
 - **bioanalytické systémy** – vyžadují dodatečné operace
 - **biosenzory** – automatické kontinuální měření
- **imunosenzor** je senzor s protilátkou

Imunosenzory



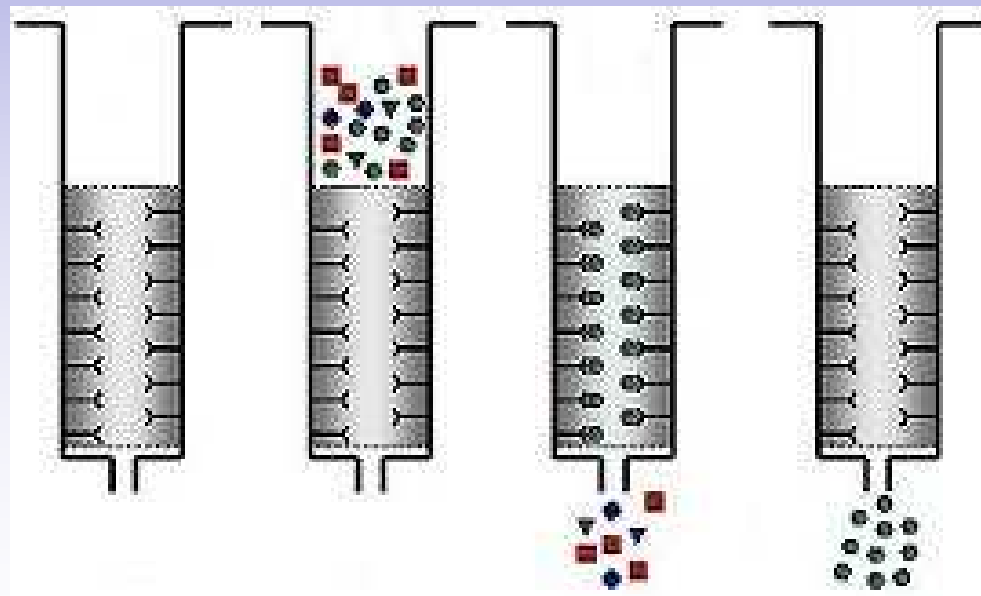
Imunosenzory

- praktické využití imunosenzorů
 - čidlo pro kontinuální měření
 - mikroarray
- výhody
 - selektivita
 - rychlá odezva
 - potenciálně levné
- nevýhody
 - nutnost zajistit optimální podmínky
 - existují „senzorické jedy“



Imunoafinitní chromatografie

- separační metoda založená na specifické afinitě protilátek, která umožňuje podle uspořádání izolovat konkrétní antigen nebo protilátku



Shrnutí – precipitační metody

| Metoda | Citlivost | Přesnost | Doba | A |
|--|---------------------|---------------|-------------------|-----|
| klasické techniky v roztoku ¹⁾ | nízká | K | sekundy hodiny | + |
| imuno turbidimetrie ²⁾ | 1 mg/l 0,05 mg/l | 5,9% 19,9% | hodiny | +++ |
| radiální imunodifúze ³⁾ | 20 µg/l | 8% | dny | - |
| dvojrozměrná imuno elektroforéza ¹⁾ | 1,0-1 mg/l | K | hodiny | - |

A = automatizovatelnost ^{1) dle Ferenčíka}

K = kvalitativní metoda <sup>2) CRP, klasická / latex asistovaná turbidimetrie
uvedena kombinovaná celková nejistota měření</sup>

^{3) IgG v likvoru}

Shrnutí – neprecipitační metody

| Metoda | Citlivost | Přesnost | Doba | A |
|-------------------------------|--------------|------------------|--------|-----|
| otisk (Western blotting) | až 50 pg | K | rychle | +/- |
| RIA ¹⁾ | 2 pmol/l | 8-12% | den | ++ |
| EPRIA | až 100 x RIA | nejsou informace | den | +++ |
| ELISA ²⁾ | cca 0,5 µg/l | 20% | hodiny | +++ |
| heterogenní FIA ³⁾ | < 1 µmol/l | 4% | hodiny | +++ |

A = automatizovatelnost

K = kvalitativní metoda

¹⁾ *angiotenzin II*

²⁾ *kit **Benzonase**® ELISA*

³⁾ *IgG v likvoru*

Shrnutí - fluorescenční a luminiscenční metody

| Metoda | Citlivost | Přesnost | Doba | A |
|---|-----------|------------|---------------|-----|
| FPIA ¹⁾ | 0,7 ng/l | 1,3-2% | Desítky minut | +++ |
| DELFI A ²⁾ | 0,5 ng/l | 6,9 % | Desítky minut | +++ |
| MEIA ³⁾ | 0,4 pg/l | 2,3 – 5,7% | Desítky minut | +++ |
| Luminiscence zesílená enzymem ⁴⁾ | 5 pg/l | 6-10% | Desítky minut | +++ |
| ECLIA ³⁾ | 0,6 pg/l | 2,5 – 3,8% | Desítky minut | +++ |

A = automatizovatelnost

1) kys.valproová

3) AFP

38

2) Apo D

4) ACTH

Shrnutí – zhodnocení metod

| | |
|------------------------|------------------------------|
| Nejcitlivější | fluorometrické metody |
| Nejpřesnější | FPIA, ECLIA |
| Nejrychlejší | otisk, aglutinace |
| Nejpoužívanější | fluorometrické metody |
| Nejnadějnější | imunosenzory |



Děkuji za pozornost

Dotazy?