

ANALITYKA MEDYCZNA, rok II

IMMUNOLOGIA

ĆWICZENIA LABORATORYJNE

dr Magdalena Frydrychowicz

mgr Małgorzata Łagiedo

dr Mariusz Kaczmarek

POZNAŃ 2018/2019

Ćwiczenie 1

Ocena jakościowa reakcji antygen – przeciwciało.

Przebieg ćwiczeń:

Studenci w części praktycznej zajęć wykonują preparaty żelowe oraz uczestniczą w prezentacji wybranych technik jakościowej oceny reakcji antygen-przeciwciało.

Zagadnienia:

antygeny, hapteny, antygenowość, immunogenność, epitop, powinowactwo, awidność, przeciwciała, monoklonalność, poliklonalność, monowalentność, poliwalentność, precypitacja, krzywa precypitacji, obszar ekwiwalentny, warunki reakcji precypitacji, metody oparte o zjawisko precypitacji, immunoelektroforezy, immunofiksacja, złożone techniki serologiczne, immunoblotting, dotting, testy immunochromatograficzne, immunoprecypitacja, aglutynacja, warunki reakcji aglutynacji, metody oparte o zjawisko aglutynacji

1. Metody oparte o zjawisko precypitacji:

- **podwójna dyfuzja w agarze (PDA)** - metoda Ouchterlony'ego, immunodyfuzja.

Do wyciętych w żelu agarozowym studzienek nanosi się badane surowice i roztwory przeciwciał, które dyfundują w nośniku. W miejscu spotkania obu składników badanego układu tworzą się łuki precypitacyjne.

- **immunoelektroforeza prosta (IM-EL)** – metoda umożliwia ocenę białek zawartych w surowicy, łączy elektroforezę i immunodyfuzję.

W pierwszym etapie mieszaninę białek zawartą w surowicy, umieszczoną w żelu agarozowym rozdziela się przy pomocy prądu elektrycznego. Następnie wycina się w żelu równoległy do kierunku migracji białek rowek, który wypełnia się odpowiednimi przeciwciałami. Dyfundujące w żelu składniki układu (badane białka i przeciwciała) tworzą łuki precypitacyjne o charakterystycznym kształcie i wielkości.

2. Złożone techniki serologiczne:

- **immunoblotting**

Poszukiwane przeciwciała zawarte w badanych surowicach wykrywane są przy pomocy immobilizowanych na nitrocelulozie białek antygeny. W skład systemu detekcyjnego wchodzi także antyglobulinowy koniugat wyznakowany enzymem (np. peroksydaza chrzanowa lub alkaliczna fosfataza). Dodanie substratu dla odpowiedniego enzymu powoduje powstanie nierozpuszczalnego w wodzie produktu widocznego, jako barwny prążek na nitrocelulozie.

Preparatyka:

I. Podwójna dyfuzja w agarze (PDA)

1. Sprzęt i odczynniki:

- wypoziomowany stolik
- odtłuszczone w alkoholu płytki szklane 6 × 9 cm lub szkiełka podstawowe
- metalowa sztanca do PDA
- pipeta szklana 10 – 25 ml
- mikropipeta regulowana 10 – 200 µl
- 1 % agar lub agaroz w soli zbuforowanej pH 7,6 (PBS)
- łożnia wodna lub kuchenka mikrofalowa
- wilgotna komora
- próbki badanych antygenów i odpowiednie surowice odpornościowe (zwierzęce)

2. Materiał badany:

surowica pacjenta lub inny roztwór białka do analizy (min. ilość 50 µl, opt. ~1 ml)

3. Zasada metody:

Podczas 24 h inkubacji w komorze wilgotnej dochodzi do swobodnej dyfuzji białek próbki badanej i zastosowanych do identyfikacji przeciwciał zwierzęcych. W miejscu zetknięcia się obu składników układu dochodzi do powstania kompleksów immunologicznych, a następnie (w strefie ekwiwalencji, tzn. równowagi stężeń Ag-Ab) wytrącenia się precypitatu, który można analizować wizualnie

4. Wykonanie

- gorący agar wylać przy pomocy ogrzanej pipety na płytkę szklaną do uzyskania warstwy grubości ok. 1 mm,
- po zastygnięciu wyciąć studzienki w żelu przy pomocy sztancy,
- napełnić przeciwstawne studzienki roztworami antygenu i odpowiednio dobranych surowic odpornościowych lub seryjnymi rozcieńczeniami tej samej surowicy odpornościowej,
- umieścić płytkę w komorze wilgotnej w temperaturze pokojowej na 24 lub 48 h.

5. Ocena i interpretacja wyników:

PDA jest techniką jakościową; powstanie łuku precypitacyjnego świadczy o obecności poszukiwanego białka w próbce badanej; stosując podwójne rozcieńczenia analizowanej surowicy odpornościowej można określić jej miano (tzn. największe rozcieńczenie, przy którym powstaje widoczny w żelu precypitat).

II. Immunoelktroforeza prosta (IM-EL)

1. Sprzęt i odczynniki:

- wypoziomowany stolik
- odtłuszczone w alkoholu płytki szklane 6×9 cm lub szkiełka podstawowe
- metalowa sztanca do IM-EL
- pipeta szklana 10 – 25 ml
- mikropipeta regulowana 10 – 200 μ l
- 1 % agaroz w buforze weronalowym 0,01M pH 8,6
- łaźnia wodna lub kuchenka mikrofalowa
- aparat do elektroforezy
- zasilacz
- wilgotna komora
- wzorcowa surowica ludzka
- królicze przeciwciała przeciw ludzkim Ig GAM

2. Materiał badany:

- surowica ludzka (min. ilość 50 μ l, opt. ~ 1 ml)

3. Zasada metody:

etap I – elektroforeza: rozdział białek badanej surowicy w polu elektrycznym,

etap II – 24 h inkubacja: białka surowicy badanej i dodane po elektroforezie przeciwciała zwierzęce tworzą w pierwszej fazie kompleksy Ag-Ab, a następnie w strefie ekwiwalencji, prążki precypitatu.

4. Wykonanie:

- przygotować bufor weronalowy: weronal (184 g) + weronal sodu (10,3 g)
- rozpuścić w wodzie, doprowadzić pH do 8,6, uzupełnić do 1L objętości.
- gorący agar wylać na płytkę szklaną do uzyskania warstwy ~ 1 mm
- po zastygnięciu wyciąć studzienki w żelu i napełnić je próbkami badanych surowic (nierozcieńczonych); do jednej ze studzienek podać wzorcową surowicę ludzką;
- umieścić płytkę w aparacie do elektroforezy, połączyć żel na płytce z buforem w zbiornikach aparatu przy pomocy „kluczy” z bibuły Whatman 3,
- przeprowadzić elektroforezę w warunkach: 120 V; 0,1 A; 80 min; przewidywana wędrówka immunoglobulin w kierunku elektrody (–)
- po wyłączeniu z prądu płytkę wyjąć z aparatu, wyciąć rowki równoległe do przewidywanego rozdziału białek, usunąć z nich żel,
- wypełnić rowki odpowiednio dobranymi surowicami zwierzęcymi (po 50 μ l),
- umieścić płytkę w wilgotnej komorze w temperaturze pokojowej.

5. Ocena i interpretacja wyników:

- tworzące się w żelu łuki precypitacyjne oceniamy wizualnie po 24 h inkubacji odnosząc długość, grubość i kształt poszczególnych linii do linii uzyskanych z ludzką surowicą wzorcową; ocena ma charakter jakościowy
- poziom danej immunoglobuliny uważa się za prawidłowy („norma”) jeśli uzyskany w trakcie testu łuk precypitacyjny nie różni się zasadniczo od uzyskanego w tym samym teście łuku dla surowicy wzorcowej. W przeciwnym przypadku poziom ocenianej immunoglobuliny podaje się jako obniżony lub podwyższony („wzrost”, „spadek”). Białko monoklonalne uważa się za obecne jeśli wyraźnemu wzrostowi poziomu jednego z łańcuchów lekkich immunoglobulin towarzyszy istotny spadek poziomu drugiego łańcucha lekkiego (odpowiednio kappa lub lambda) i temu obrazowi towarzyszy wyraźna dysproporcja w poziomach łańcuchów ciężkich immunoglobulin (istotny wzrost poziomu jednej klasy immunoglobuliny przy jednoczesnym spadku poziomu pozostałych).

Ćwiczenie 2

Ocena ilościowa reakcji antygen-przeciwciała.

Zagadnienia:

elektroforeza rakiolkowa, immunodyfuzja wg Mancini, turbidymetria, nefelometria, metody wykorzystujące odczynniki znakowane, RIA, ELISA, wiarygodność metody diagnostycznej, przykłady zastosowania testów diagnostycznych

Metody oceny ilościowej:

- **Metoda nefelometryczna**

W trakcie ćwiczeń studenci oznaczają poziom przeciwciał IgM.

Preparatyka:

1. Sprzęt i odczynniki:

- pipety nastawne 1 – 1000 μ l
- kuwety z mieszadłem
- statyw do probówek
- zestaw MininephTM Human IgM firmy Binding Site

2. Materiał badany:

- surowica ludzka (min. ilość 50 μ l, opt. ~ 1 ml)

3. Zasada metody:

Opakowanie zawiera

- Ludzką surowicę anty-IgM,
- Kartę bezstykową,
- Bufor,
- Kontrolę dodatnią i ujemną.

4. Wykonanie:

<u>Odczynniki</u>	<u>Objętość</u>
Próbka (1/11)	40 μ l
MININEPH IgM Buffer	400 μ l
MININEPH Hu Surowica Anty-IgM	40 μ l

- Przeznaczone do badania próbki kontroli i surowicy należy rozcieńczyć w stosunku 1:11 w buforze do próbek (np. 400 μ l buforu + 40 μ l kontroli lub próbek).
- Przygotować kuwetę z mieszadłem.
- Na dnie kuwety umieścić 40 μ l rozcieńczonej surowicy lub kontroli.
- Wpisz numer badanej próby, potwierdź odpowiednie rozcieńczenie, umieść kuwetę w aparacie i dodaj 400 μ l buforu i 40 μ l surowicy anty-IgM.

Ćwiczenie 3

Ocena immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej.

Przebieg ćwiczeń:

Studenci w części praktycznej zajęć wykonują preparaty cytometryczne oraz uczestniczą w prezentacji obejmującej techniczne aspekty oceny immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej przy pomocy cytofluorometru przepływowego.

Zagadnienia:

pojęcie immunofenotypu, cytofluorymetria przepływowa, cytometr przepływowy, względna wielkość komórki, względna ziarnistość komórki, średnia intensywność fluorescencji, zjawisko fluorescencji, markery różnicowania, immunofenotyp krwi obwodowej

Ocena immunofenotypu:

- **immunofluorescencja bezpośrednia – oznaczanie z pełnej krwi obwodowej**
Określenie antygenów tzw. markerów różnicowania (ang. *cluster of differentiation*; CD) przy użyciu przeciwciał monoklonalnych, celem zróżnicowania komórek immunologicznie kompetentnych.

Preparatyka:

Immunofluorescencja bezpośrednia

1. Sprzęt i odczynniki:

- cytometr przepływowy
- zestaw regulowanych mikropipet 10 –1000 μ l
- probówki cytometryczne
- statyw do probówek
- tryskawka do PBS
- zlewka
- 10 \times stężony bufor lizujący
- roztwór PBS pH 7,4
- przeciwciała monoklonalne znakowane fluorochromem
- płyn lizujący
- woda destylowana

2. Materiał badany:

krew obwodowa pobrana do probówki z antykoagulantem EDTA (min. ilość 500 µl)

3. Zasada metody:

Określenie przy pomocy cytofluorymetru przepływowego zespołu charakterystycznych cech antygenowych komórki, które pozwalają zidentyfikować populacje komórek o istotnym znaczeniu diagnostycznym.

4. Wykonanie

- Do probówek wprowadzić po 2 µl odpowiednich przeciwciał.
- Następnie do każdej probówki dodać po 50 µl dokładnie wymieszanej krwi.
- Inkubować 15 – 20 min w temperaturze pokojowej chroniąc przed światłem.
- Do każdej probówki dodać po 500 µl roztworu buforu lizującego, rozcieńczonego wodą destylowaną 1 : 10 i dokładnie wymieszać.
- Inkubować 10 min w temperaturze pokojowej chroniąc przed światłem.
- Przerwać lizę dodając do probówki ~2 ml PBS z tryskawki.
- Wirować probówki 5 min z prędkością 1500 obr./min.
- Usunąć supernatant.
- Ponownie do probówki dodać PBS i wirować jak wyżej.
- Usunąć supernatant i zawiesić osad w 150 µl PBS, próbki gotowe do akwizycji.

5. Ocena i interpretacja wyników:

Ocenę wykonanych próbek przeprowadza się przy użyciu cytometru przepływowego stosując odpowiedni program komputerowy. W trakcie oceny immunofenotypowej określa się odsetek komórek wykazujących fluorescencję danego fluorochromu.

Ćwiczenie 4

Ocena czynnościowa komórek układu odpornościowego.

Przebieg ćwiczeń:

Studenci w części praktycznej zajęć przeprowadzają separację jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) w gradiencie gęstości, oceniają ich żywotność oraz uczestniczą w prezentacji wybranych technik służących separacji komórek i ocenie czynnościowej komórek układu odpornościowego.

Zagadnienia:

komórki immunologicznie czynne, komórki pomocnicze, metody izolacji komórek, testy czynnościowe, reakcje nadwrażliwości, testy skórne, metody oceny funkcji limfocytów, test transformacji blastycznej, metody oceny aktywacji komórek, mitogeny, testy cytotoksyczne, metody oceny wydzielania cytokin, metody oceny funkcji komórek żernych, ocena adhezji, ocena zdolności do chemotaksji, zaburzenia chemotaksji, ocena zdolności do fagocytozy, indeks fagocytny, zaburzenia fagocytozy, ocena zdolności do zabijania wewnątrzkomórkowego, wybuch tlenowy, zaburzenia wybuchu tlenowego, zaburzenia zabijania wewnątrzkomórkowego

1. Izolacja komórek na gradiencie i oznaczanie żywotności komórek.

– metoda izolacji w gradientach gęstości

Wykorzystuje różnice w wielkości i ciężarze właściwym poszczególnych komórek. Stosuje się mieszaniny rozdzielające: Ficoll (Percoll) – Isopaque (Uropolina) – [metoda Boyum'a], Gradisol (mieszanka Uropoliny i dekstranu) o różnej gęstości. Krew pobraną na antykoagulant i wymieszaną z PBS nawarstwia się na odpowiedni gradient i wiruje. Po wirowaniu komórki zbiera się powstałej interfazy.

– ocena żywotności izolowanych komórek

W celu oceny żywotności komórek wykorzystuje się np. roztwór błękitu trypanu. Dodanie tego barwnika pozwala ocenić przepuszczalność błony komórkowej. W teście martwe komórki barwią się na niebiesko. Oceniane komórki liczy się na kamerze pod mikroskopem świetlnym.

Preparatyka:

I. Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) w gradiencie gęstości

1. Sprzęt i odczynniki:

- probówki plastikowe 15 ml i 50 ml
- zestaw regulowanych mikropipet 10 – 1000 μ l
- Gradisol L (FICOLL o $d = 1,077 \text{ g/cm}^3$)
- Bufor PBS

2. Materiał badany:

1. krew obwodowa pobrana do probówki z antykoagulantem heparyną (min. ilość 500 μ l)

3. Zasada metody:

Na określoną objętość gradientu gęstości nawarstwia się rozcieńczoną PBS krew obwodową. Po odwirowaniu zbiera się interfazę bogatą w komórki limfoidalne. Na dnie probówki zbierają się erytrocyty i granulocyty, które przedostały się przez warstwę Ficollu.

4. Wykonanie

- Pobraną na heparynę krew rozcieńczyć w probówce 50 ml roztworem PBS w stosunku 1 : 3.
- Do probówki 15 ml wprowadzić Gradisol L i krew zawieszoną w PBS w stosunku 1 : 1 (3 : 1) tak aby zachować granicę faz.
- Wirować probówki w ciągu 20 min, w temperaturze 20°C, przy 2000 obr./min.
- Zebrać z interfazy pierścień komórek jednojądrzastych.
- Płukać dwa razy w PBS. Wirować w temperaturze 4°C przy 200 g.
- Komórki zawiesić w PBS.

5. Ocena i interpretacja wyników:

Ocenę izolacji PBMC przeprowadza się pod mikroskopem świetlnym.

II. Liczenie komórek na hemacytometrze oraz określenie żywotności komórek przy pomocy błękitu trypanu.

1. Sprzęt i odczynniki:

- hemacytometr (kamera do liczenia komórek, np. Burkera)
- zestaw regulowanych mikropipet 10 – 1000 μ l
- probówki plastikowe
- mikroskop świetlny
- błękit trypanu 0,05 %

2. Materiał badany:

- jednojądrzaste komórki krwi obwodowej izolowane w gradiencie gęstości

3. Zasada metody:

W wyniku barwienia błękitem trypanu komórki martwe wybarwiają się na niebiesko, do wnętrza komórek żywych barwnik nie wnika.

4. Wykonanie

- Zmieszać 10 μ l zawiesiny komórek z 10 μ l 0,05 % błękitu trypanu (stosunek 1 : 1).

- Nałożyć 10 μ l mieszaniny komórek i błękitu trypanu na hemacytometr pod szkiełko nakrywkowe.
- Umieścić kamerę do liczenia komórek pod mikroskopem świetlnym.
- Obliczyć ilość żywych (niewybarwionych) i martwych (niebieskich) komórek zawartych na powierzchni 1 mm². Powtórzyć liczenie dla 3 – 4 różnych pól i obliczyć średnią liczbę komórek na 1 mm².
- Po zakończeniu liczenia wyczyścić kamerę i szkiełko nakrywkowe wodą oraz 70% alkoholem, a następnie osuszyć.

5. Ocena i interpretacja wyników:

- Przeliczyć całkowitą liczbę żywych komórek wg wzoru:

$$\# \text{ żywych komórek} = \text{średnia} \# \text{ żywych komórek} \times \text{rozcieńczenie} \times 2 \times 10^5$$

$$(\text{np.} \# \text{ komórek} \times 10 \text{ ml} \times 2 \times 10\,000)$$

- Obliczyć % żywych komórek wg wzoru:

$$\frac{\# \text{ policzonych żywych komórek}}{\# \text{ policzonych wszystkich komórek}} \times 100 = \% \text{ żywych komórek}$$

Ćwiczenie 5

Metody immunomorfologiczne.

Przebieg ćwiczeń:

Studenci w części praktycznej zajęć wykonują preparaty mikroskopowe techniką immunofluorescencji pośredniej na skrawkach tkankowych z wątroby szczura, poznają zasadę oceny preparatów przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego oraz poznają metody zamrażania tkanek

Zagadnienia:

sposoby detekcji reakcji antygen-przeciwciało, reakcje immunoenzymatyczne, reakcja APAAP, reakcja ABC, reakcja LAB, reakcje z użyciem barwnika fluorescencyjnego, immunofluorescencja wielokolorowa, mikroskopia konfokalna, mikroskopia wielofotonowa, reakcje z użyciem metali ciężkich, mikroskopia elektronowa, technologia *ImageStream*

Reakcje z użyciem barwnika fluorescencyjnego:

– **zamrażanie materiału tkankowego**

Szybkie zamrażanie zapobiega powstawaniu niszczących strukturę tkanki dużych kryształów lodu.

– **reakcja pośredniej immunofluorescencji IMF**

Wykrywanie autoprzeciwciał w surowicy w chorobach autoimmunologicznych.

I. Zamrażanie materiału tkankowego.

1. Sprzęt i odczynniki:

- termos z cienkościennym naczynkiem metalowym
- pęseta
- worek foliowy
- mieszanina zamrażająca (suchy lód + aceton)
- płyn oziębiający (eter naftowy)
- płyn o dużej gęstości zamrażany razem z tkanką (tzw. Tissue-tek)

2. Materiał badany:

- blok tkankowy

3. Zasada metody:

Materiał tkankowy w trakcie reakcji immunomorfologicznych należy odpowiednio zamrozić. Zamrażanie powinno odbywać się jak najkrótszym czasie, aby zapobiec tworzeniu się w tkance kryształów lodu, które mogą uszkodzić fizycznie tkankę.

4. Wykonanie

- Zamrażany blok tkankowy zanurza się w mieszaninie zamrażającej przygotowanej wcześniej w termosie
- Po kilku-kilkunastu sekundach następuje wyraźne i trwałe zblednięcie tkanki, świadczące o zamrożeniu materiału.
- Zamrożony blok tkankowy, przy pomocy pęsety wyjmuje się z mieszaniny zamrażającej, umieszcza w opisanym woreczku foliowym i przechowuje w zamrażarce (opt. – 70°C).

II. **Oznaczanie autoprzeciwciał metodą immunofluorescencji pośredniej.**

1. Sprzęt i odczynniki:

- szkiełka z preparatami wątroby szczura (substrat antygenowy dla wykrywanych autoprzeciwciał)
- kriostat
- odtłuszczone w alkoholu szkiełka nakrywkowe
- pipety jednorazowe i regulowane
- probówki plastikowe
- statyw do probówek
- płuczka szklana
- komora wilgotna
- bufor PBS o pH 7,6
- przeciwciała królicze anty ludzkie IgG, A, M znakowane FITC
- surowica kontrolna
- 90 % buforowana gliceryna
- błękit Evansa

2. Materiał badany:

- surowica badana w ilości ~ 2 ml.

3. Zasada metody:

Autoprzeciwciała obecne w badanych surowicach przyłączają się w pierwszym etapie do substratu antygenowego (antygenów w skrawkach wątroby szczurzej) na szkiełkach podstawowych. W drugim etapie następuje detekcja autoprzeciwciał przy pomocy wyznakowanej fluoresceina antyglobuliny.

Wykonanie

- wyjąć szkiełka z antygenami z lodówki i doprowadzić je do temperatury pokojowej pod wentylatorem;
- przygotować rozcieńczenia badanych surowic w roztworze PBS (rozc. od 1 : 80);
- nałożyć po 25 μ l surowic (kontrolnych i badanych) a szkiełko ze skrawkami;
- inkubować 30 min, przepłukać w PBS-Tween, płukać w płuczce 3 \times 5 min;
- nałożyć 20 μ l anty-ludzkiej IgG, A, M/FITC na szkiełko;
- inkubować 30 min, przepłukać w PBS-Tween, płukać w płuczce 3 \times 5 min;
- zamknąć w glicerolu/PBS pod szkiełkiem nakrywkowym;

4. Ocena i interpretacja wyników:

Ocenę preparatów przeprowadza się pod mikroskopem fluorescencyjnym. Za reakcję dodatnią uznaje się obecność żółto-zielonej fluorescencji (w odpowiednim substracie komórkowym w zależności od rodzaju autoprzeciwi ciała).

LITERATURA:

1. Żeromski J. Immunologia dla studentów wydziału lekarskiego. Wyd. AM, Poznań 2008;
2. Żeromski J. Metody immunologiczne. Przewodnik do ćwiczeń z immunologii dla studentów Wydziału Lekarskiego. Wyd. AM, Poznań 1997;
3. Kałnik-Prastowska I. Immunochemia w biologii medycznej. Metody Laboratoryjne. PWN, Warszawa 2009;
4. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W. Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Podręcznik dla studentów medycyny. Elsevier Urban&Partner, Wrocław 2009
5. Luft S. Metody diagnostyki serologicznej w reumatologii. PWN, Warszawa 1996;
6. Roitt I., Brostoff J., Male D. Immunologia. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2008;
7. Gołąb J., Jakóbisiak M., Lasek W. Stokłosa T. Immunologia. PWN, Warszawa 2008;
8. Ptak W., Ptak M., Szczepanik M. Podstawy immunologii. PZWL, Warszawa 2009;
9. Zeman K. Zaburzenia odporności u dzieci. PZWL, Warszawa 2002;
10. Zabel M. Immunocytochemia. PWN, Warszawa 1999;
11. Zuba-Surma E.K., Kucia M., Ratajczak M.Z. Post. Biol. Kom. 2007; 34(2): 361- 376;