

PŘÍPRAVA PROTILÁTEK



Vznik protilátek

setkání antigenu s antigen citlivými buňkami IS

Tvorba protilátek

- ❖ přirozená (během vývoje jedince)
- ❖ umělá (očkování, imunizace)

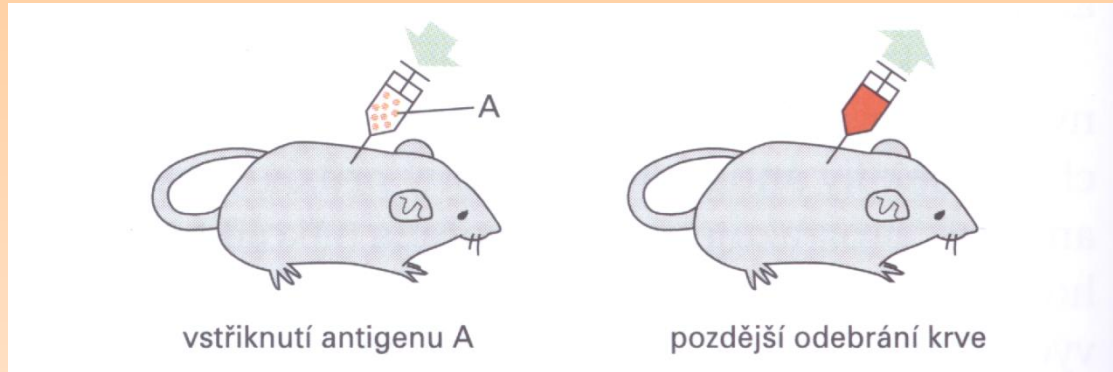
Význam tvorby protilátek

- ✓ pro člověka
 - ochrana před nemocemi
- ✓ pro zvířata:
 - ochrana před nemocemi
 - získání protilátek



Příprava imunitních sér

- ✓ pro laboratorní účely (králíci, myši apod.)



- ✓ výroba sér (koně, prasata, kozy)



Protilátky v antiséru

- | | |
|------------------|--|
| ✓ monospecifické | přítomen jeden
jednoduchý antigen |
| ✓ polyspecifické | použit komplexní antigen,
směs antigenů |

Schopnost tvořit protilátky

je geneticky podmíněna: druhově i individuálně

Význam při výběru vhodného zvířete pro imunizaci
znát původ a druh antigenu

u živočišného antigenu použít zvíře:

- ✓ fylogeneticky, co nejvzdálenější druh
- ✓ stejný druh, ale chybí mu příslušný antigen
- ✓ zvířata geneticky různorodá – imunizovat větší počet

Výsledek imunizace závisí:

- ✓ **způsob aplikace**
- ✓ **charakteru antigenu**
- ✓ **dávka antigenu**
- ✓ **forma antigenu**

Místo aplikace

- ✓ intravenózně
- ✓ intraperitoneálně
- ✓ intradermálně
- ✓ subkutánně
- ✓ intramuskulárně

**Intradermální + subkutánní
+ intramuskulární**
antigen se vychytává
v nejbližších lymfatických
uzlinách
nejvyšší imunitní odpověď

Intravenózně + intraperitoneálně
antigen se vychytává z krevního
oběhu v játrech a ve slezině
stimuluje lymfatické tkáně
maximální imunitní odpověď
je ve slezině



Počet dávek

- ✓ **Jedna dávka** **protilátky s nízkým titrem
(primární odpověď)**
- ✓ **Více dávek** **v různých časových intervalech
(několik měsíců až půl roku)
různá imunizační schémata
hyperimunní séra
(vysoký titr protilátek)**

Při opakované imunizaci se musí počítat s možností anafylaktického šoku.

Charakter antigenu pro imunizace

✓ **Korpuskulární**

cizí erythrocyty, mikroorganismy, jiné buňky
imunizace přímo (15 % suspenze ve fyziologickém roztoku)
0,2 - 0,5 ml na 1 kg živé váhy
4 - 5 dávek v dvoudenních intervalech
titr 7 - 10 dní po poslední dávce

✓ **Biologická kapalina**

krevní sérum
antigeny v 5 % koncentraci (zahustit)

✓ **Tkáňové a orgánové** (lipidy mohou maskovat antigeny)

rozbít tkáň

- ultrazvukem
- vícenásobné rozmrazování
- homogenizátorem
- extrakcí odstranit lipidový podíl

Problémy při imunizaci

✓ **autoimunizační proces**

podávané antigeny jsou shodné s antigeny zvířete
autoimunitní procesy mohou:

- poškodit některé orgány zvířete
- mohou způsobit smrt

✓ **imunologická tolerance**

některý živočišný druh není schopen odpovídat
na určitý antigen

je třeba vybrat jiný živočišný druh

-malá nebo vysoká dávka antigenu (antigen-polysacharid)
(u proteinových antigenů lze imunizovat v širokém
koncentračním rozsahu)

Příprava specifického séra

- ❑ připravit antigen v absolutní čistotě (složitě, nákladné)
- ❑ postupné vysycování polyspecifických sér jednotlivými antigeny, až zůstane jen Ab proti požadovanému antigenu

Vysycování polyspecifických sér

- ✓ přidávají se k antiséru postupně jednotlivé antigeny, vysrážené protilátky se centrifugují
- ✓ imobilizované antigeny
- ✓ IgA novorozenců nemají (imunizace králíků IgA)

Rozpustné antigeny:

slabší odpověď

Imunizace je delší a musí se vícekrát opakovat

Pro zvýšení imunogennosti se přidávají adjuvantní látky.

Adjuvantní látky

- ✓ zvyšují afinitu antigenu k buňkám lymf. systému
- ✓ chrání antigen před degradací (prodlužují dobu působení)
- ✓ aktivují mechanismy zápalové reakce (poskytuje amplifikační látky podílející se na intenzitě imunitní odpovědi)

Adjuvantní látka

- ✓ anorganický nosič
 Al(OH)_3 , AlPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Be(OH)_2
- ✓ Liposomy (váčky vázané na membránu mající na povrchu antigeny)
- ✓ ISCOMS (imunitu stimulující komplexy)
lipidové nosiče ve formě micel saponátové látky, které ve svém nitru obsahují virové proteiny

Princip:

minerální nosič adsorbuje antigen na svůj povrch a tím zpomalí degradaci a vyloučení z organismu

Koncentrace minerálního nosiče

0,1 % v 1 ml 2 - 5 mg proteinu

Freudovo adjuvans

Nejpoužívanější adjuvantní látka

- ✓ minerální olej s emulgátorem
- ✓ usmrcené mykobakterie

(Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium butyricum, Mycobacterium smegmatis, Corynebacterium parvum..)

- Freudovo adjuvans **kompletní** (s mykobakteriemi)
- Freudovo adjuvans **nekompletní** (bez mykobakterií)

Příprava Freudova adjuvans

Parafinový olej

**Bayol F nebo 55
n-hexadekan**

Emulgátor

**lanolin
Aquaphore
Arlacel A
glycerolmonooleát**

Nekompletní FA:

3 - 4 díly oleje + 1 díl emulgátoru

Kompletní FA.

**Přidají se 1 - 2 mg vysušených a
usmrcených mykobakterií na 1 ml**

NA IMUNIZACI:

**FA : (1 až 5 % antigenu)
(pH= 7,2 -7,4)
1 : 1 až 1:2**

Imunizace

Antigen + Nekompletní FA:

**subkutálně
intramuskulárně**

Antigen + Kompletní FA:

intramuskulárně

Délka imunizace

✓ **Krátkodobá**

třídenní intervaly

celková délka 2-3 týdny

✓ **Déletrvající**

každý druhý až třetí týden

několik měsíců

(minimálně 4 až 5 dávek)

1. dávka se navíc kombinuje

s intravenózním nebo

intraperitoneálním podáním

čistého antigenu

(nebo adsorbovaném v minerálním nosiči)

Freudovo adjuvans

toxické

SRN –zakázané

na imunizaci lidí se nepoužívá

humální medicína typ hydroxidu hlinitého

získání FA:

komerčně přístupné

fa Difco

Jednotné imunizační schéma neexistuje

Dynamika tvorby protilátek

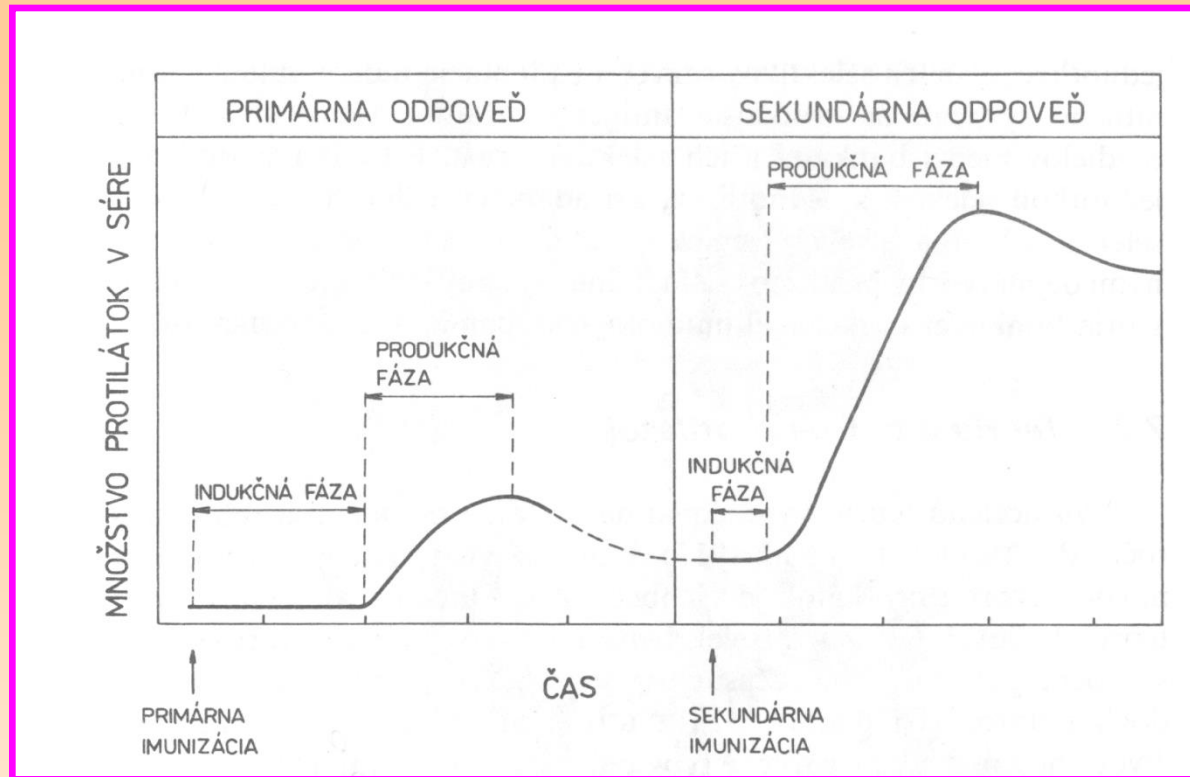
✓ **Primární odpověď** první kontakt hostitele s určitým antigenem
určitá LATENTNÍ (indukční) fáze

která je závislá:

- vlastnostech antigenu
- formě imunizace
- citlivosti metody pro stanovení Ig

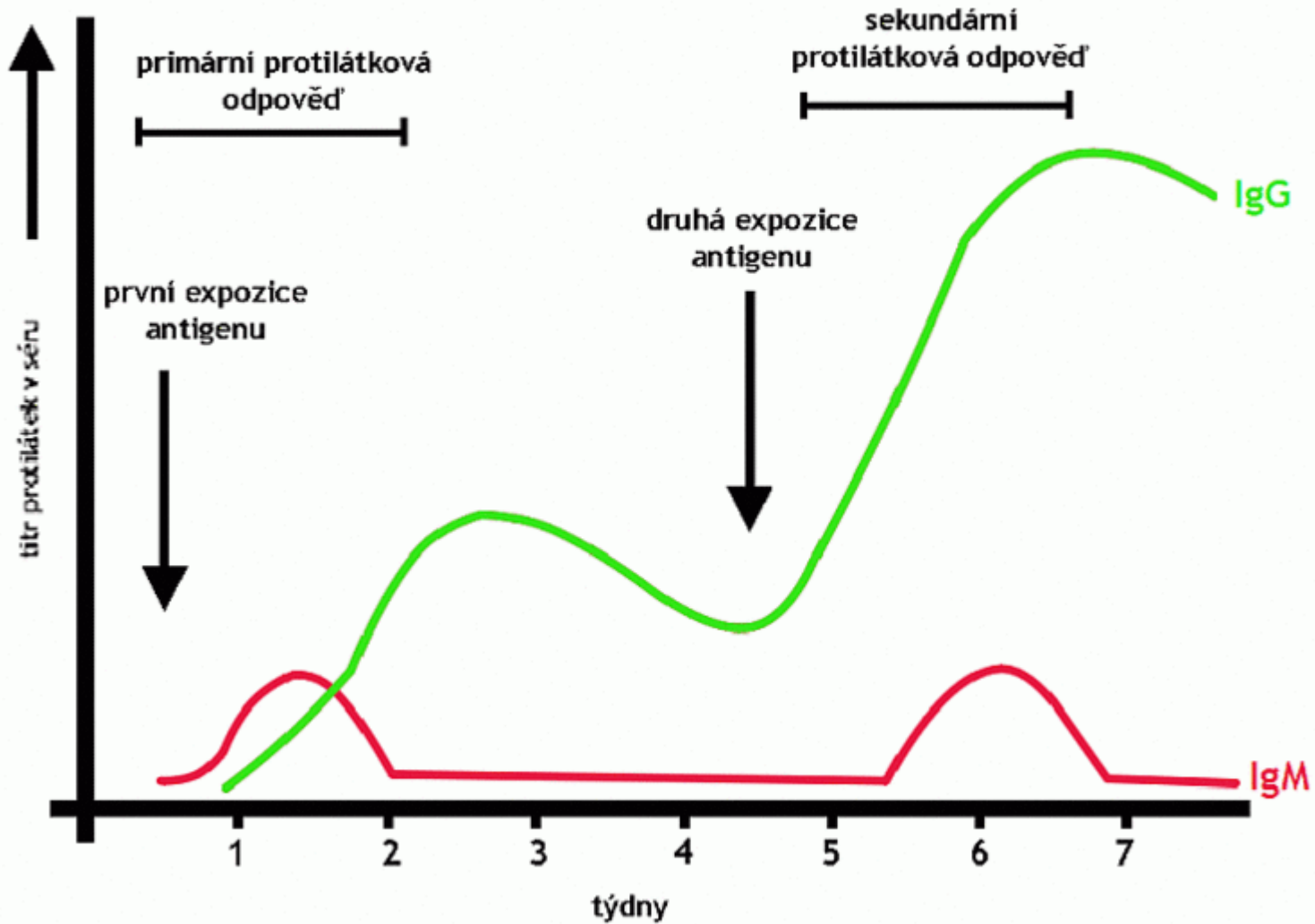
✓ **Sekundární odpověď** organismus se setká s antigenem podruhé
provokační (*anglicky booster*)
indukční fáze je kratší
imunitní odpověď je silnější

Příčina: imunitní systém si už pamatuje a pohotověji reaguje.
Nejprve se vytvoří IgM (u sekundární odpovědi),
ale brzy je vystřídají IgG.



Indukční fáze doba od podání antigenu a objevení se protilátek

Produkční fáze v organismu lze dokázat přítomnost protilátek, výkonných lymfocytů nebo jejich produktů.



Imunizační schéma přípravy protilátek proti rostlinným aminoxidasam

Týden	Antigen	Freundovo adjuvans	Místo vpichu
0.	1 mg/250 μ l	250 μ l kompletní	Intramuskulárně
1.	1 mg/250 μ l	250 μ l kompletní	Intramuskulárně
4.	0,5 mg/250 μ l	250 μ l nekompletní	Intradermálně
10 dní od poslední	imunizace odběr krve		
6.	0,5 mg/250 μ l	250 μ l nekompletní	Intradermálně
10.	0,5 mg/250 μ l	250 μ l nekompletní	Intradermálně

Získání krevního séra = antiséra

Odběr krve

- ❖ z ucha – malé množství, malé zvíře (titr protilátek)
- ❖ ze žíly – větší zvířata (více antiséra)
- ❖ vykrvení – zabití a získání veškeré krve.

Další postup

- ✓ krev se nechá srazit v odběrové nádobě (1/2 hod)
- ✓ sraženou krev (krevní koláč + sérum) nalijeme na porcelánovou fritu umístěnou ve větší kádince a necháme přes noc v ledničce volně odkapávat krevní sérum
- ✓ krevní sérum centrifugace při 3000 g

Uchovávání a skladování antisér

- ✓ skladování při -80°C několik let
- ✓ bakteriostatická látka
mertiolát (0,005 %) nebo azid sodný (0,05%)
- ✓ inaktivace komplementu při 56°C po dobu
10 - 20 minut

Purifikace protilátek

Izolace ze séra (zřídka z jiných tělových tekutin)

- ✓ patří mezi nejméně zásadité globuliny krevního séra
- ✓ při elektroforéze se pohybují ve frakci γ

Heterogenní skupina makromolekul, která se liší:

- ✓ elektrickým nábojem
- ✓ relativní molekulovou hmotností
- ✓ biologickou aktivitou

Metody purifikace

✓ **Nespecifické**

klasické biochemické metody

✓ **Specifické**

**imunoafinitní chromatografie
imunoadsorpce**

Nespecifické metody

Izolují se imunoglobuliny určité třídy nebo podtřídy (heterogenní směs molekul s různou specifitou vazebných míst)

Specifické metody

Používá se jeden antigen k izolaci, což umožňuje izolaci polyklonálních protilátek z úzce vymezenou specifitou.

Nespecifické metody

- ✓ **frakční precipitace**
- ✓ **zónová elektroforéza**
- ✓ **chromatografie na ionexech**
- ✓ **gelová filtrační chromatografie**
- ✓ **hydrofóbní chromatografie**
- ✓ **ultracentrifugace**

Precipitace

- ✓ síran amonný (33%)
- ✓ síran sodný (18%)

rozpuštěnost proteinů je závislá na velikosti solvatačních obalů, které vznikají na základě elektrostatických sil mezi elektricky nabitými částmi proteinové molekuly a dipóly vody
přidání neutrální soli do roztoku proteinu, sníží tloušťku solvatačního obalu, a tím se sníží rozpustnost proteinu

Postup:

- srážení
- centrifugace
- rozpuštění v PBS
- dialýza nebo gelová filtrace

Postup lze jednou nebo 2x opakovat.

IgG lidské nebo králičí poměrně čisté preparáty.

Všechny Ig:

síranem amonným na 45 - 50%

IgM:

síranem amonným na 50 až 60 %

pH 7,3

Srážení organickými látkami:

- ✓ **rivanol (3-etoxy-6,9-diaminoakridinlaktát)**
- ✓ **kyselina kaprylová**
- ✓ **polyetylénglykol (6000) 7 % IgM, při 14 % IgG a IgA**

Srážení organickými rozpouštědly:

**COHNOVA FRAKCIONACE ethanolem IgG -čistý
přísná kontrola teploty (za chladu)**

Elektroforetické metody

Separaci látek nesoucích elektrický náboj

✓ ionty

✓ amfolyty (mají kladné i záporné náboje)

Ig = amfolyty

Působení elektrického pole:

pohyb molekul podle:

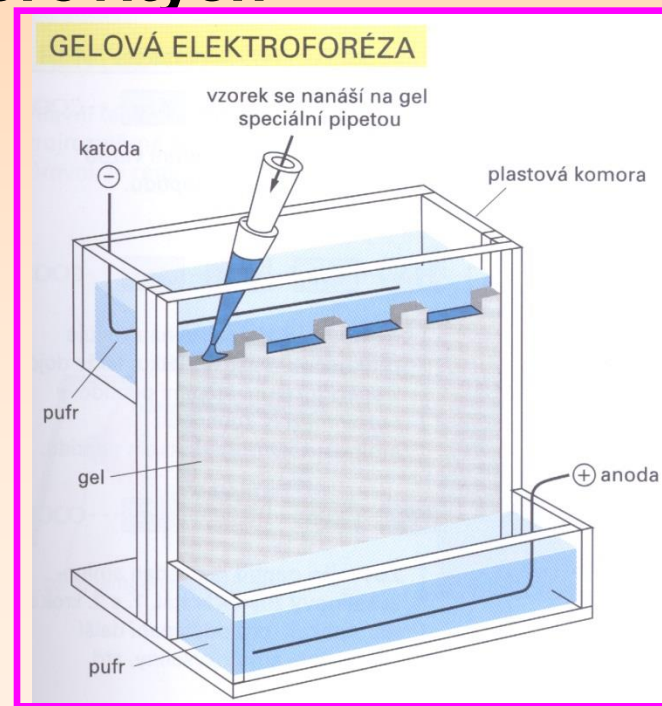
- velikosti náboje
- tvaru molekuly
- velikosti molekuly

velikost náboje ovlivňuje:

- stupeň ionizace
- pH
- iontová síla prostředí

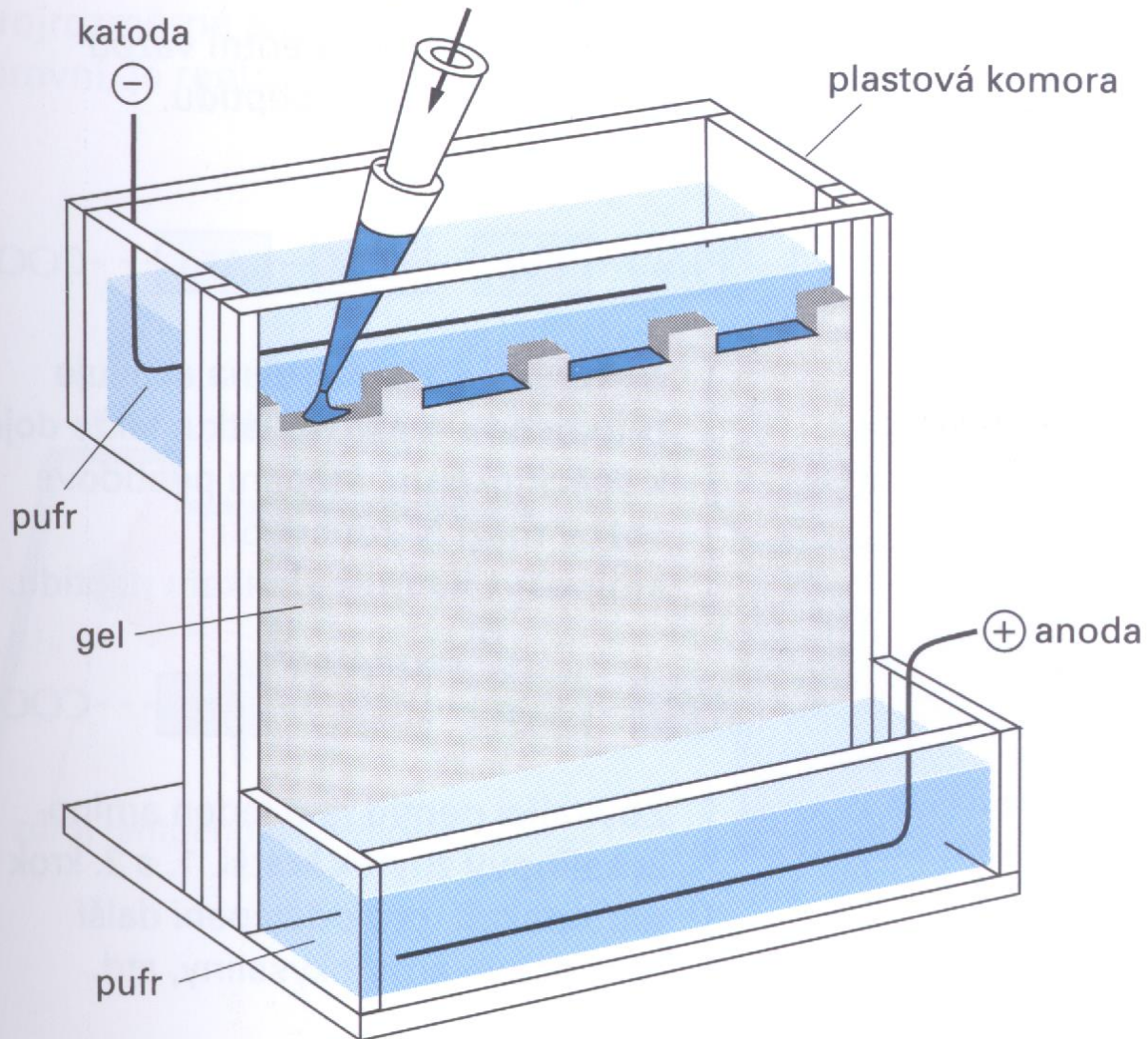
Elektroforéza

- ✓ **volná** volný elektrolyt, frakce nejsou od sebe odděleny, nákladné zařízení)
Tiselius, Kabát elektroforéza krevního séra
- ✓ **zónová** elektroforéza probíhá v pórovitých nosičích, které jsou navlhčené elektrolytem)



GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

vzorek se nanáší na gel
speciální pipetou



Elektrolyty:

- určitá koncentrace solí
- pH
- iontová síla
- vodivost
- viskozita
- dielektrická konstanta

Hlavní funkce elektrolytu:

- ✓ udržovat konstantní pH
- ✓ vést proud
- ✓ roztok elektrolytu je vodič 2. třídy, při průchodu proudem klade odpor (převrácená hodnota vodivosti) při průchodu proudem vzniká **teplo**
 - snížení iontové síly
 - snížení potenciál. spádu
 - chlazení LEDNICE

Vyhodnocení elektroforézy

Barvení (na bílkoviny)

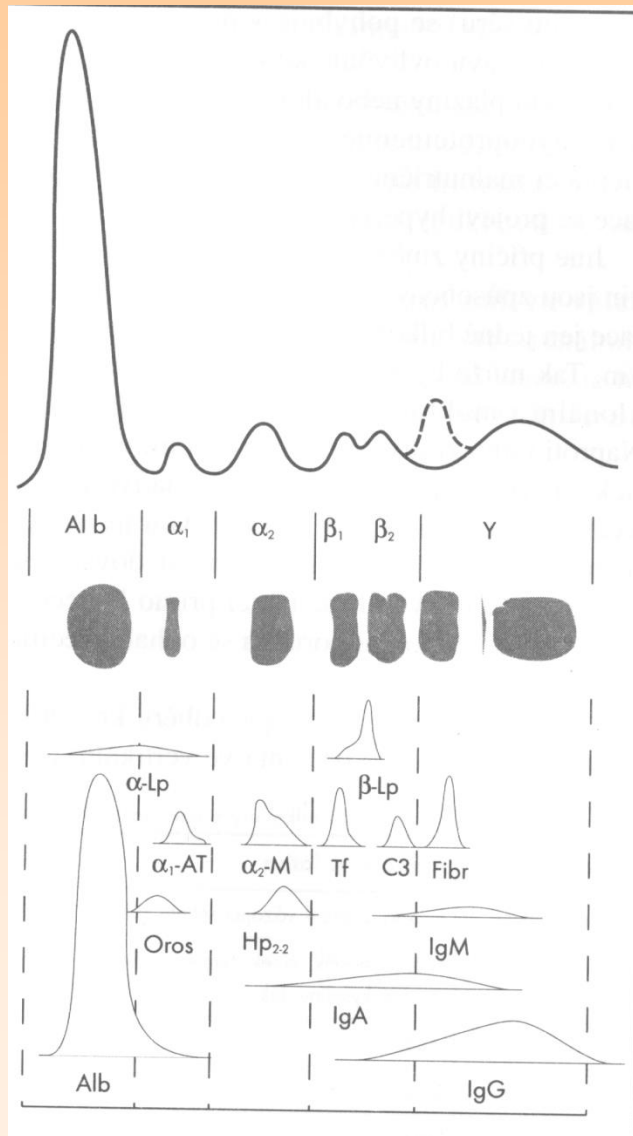
- amidočern B
- Coomassie Brilliant Blue R250
- Ponceau S
- Nigrosin WS

Elektroforéza Ig -využití

- důkaz přítomnosti
- určení změn hodnot
- preparativní izolace jednotlivých tříd ve velkém množství

Proteiny lidského séra se na agarózovém gelu mohou dělit až na 9 frakcí. Imunoglobuliny se nacházejí ve dvou γ -globulinových frakcích.

Elektroforéza krevního séra



Elektroforéza v agarozovém gelu

Albumin	50 - 62 %
α_1-globulin	3 - 6 %
α_2-globulin	7 - 13 %
β-globulin	9 - 15 %
γ-globulin	14 - 22 %

Preparativní elektroforéza

- Nosič:**
- škrob (dříve)
 - Pevikon (kopolymér polyvinylchloridu a polyvinylacetátu)
 - agarózový gel

Tloušťka: 0,5 - 1,5 cm umožňuje frakcionovat velké množství vzorku

Rozdělení: molekul, které jsou stejně velké, ale liší se nábojem

Příklad: α_2 -makroglobulin a IgM
gelová chromatografie na Sephadexu G-200 eluce
v jednom píku
preparativní elektroforéza šance pro rozdělení

SDS elektroforéza

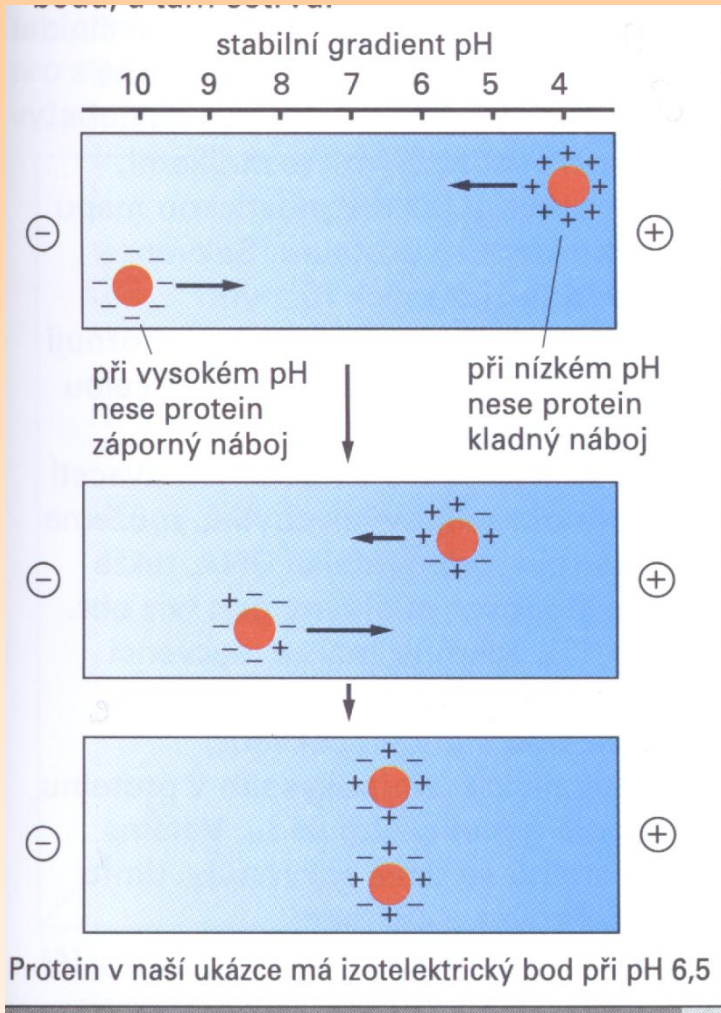
Ke směsi proteinů se přidá SDS (*dodecylsírán sodný*), naváže se na všechny peptidové vazby a zásadité skupiny proteinů, tím všechny proteiny získají stejný záporný náboj a pak se při elektroforéze pohybují **jen na základě velikosti molekul**.

Většinou se provádí v polyakrylamidovém gelu

Použití:

- určení molekulových hmotností pomocí standardních proteinů
- rozdělení lehkých a těžkých řetězců Ig po hydrolýze

Izoelektrická fokusace



Elektroforéza v prostředí gradientu pH. Látky se rozdělují podle izoelektrických bodů (pI).

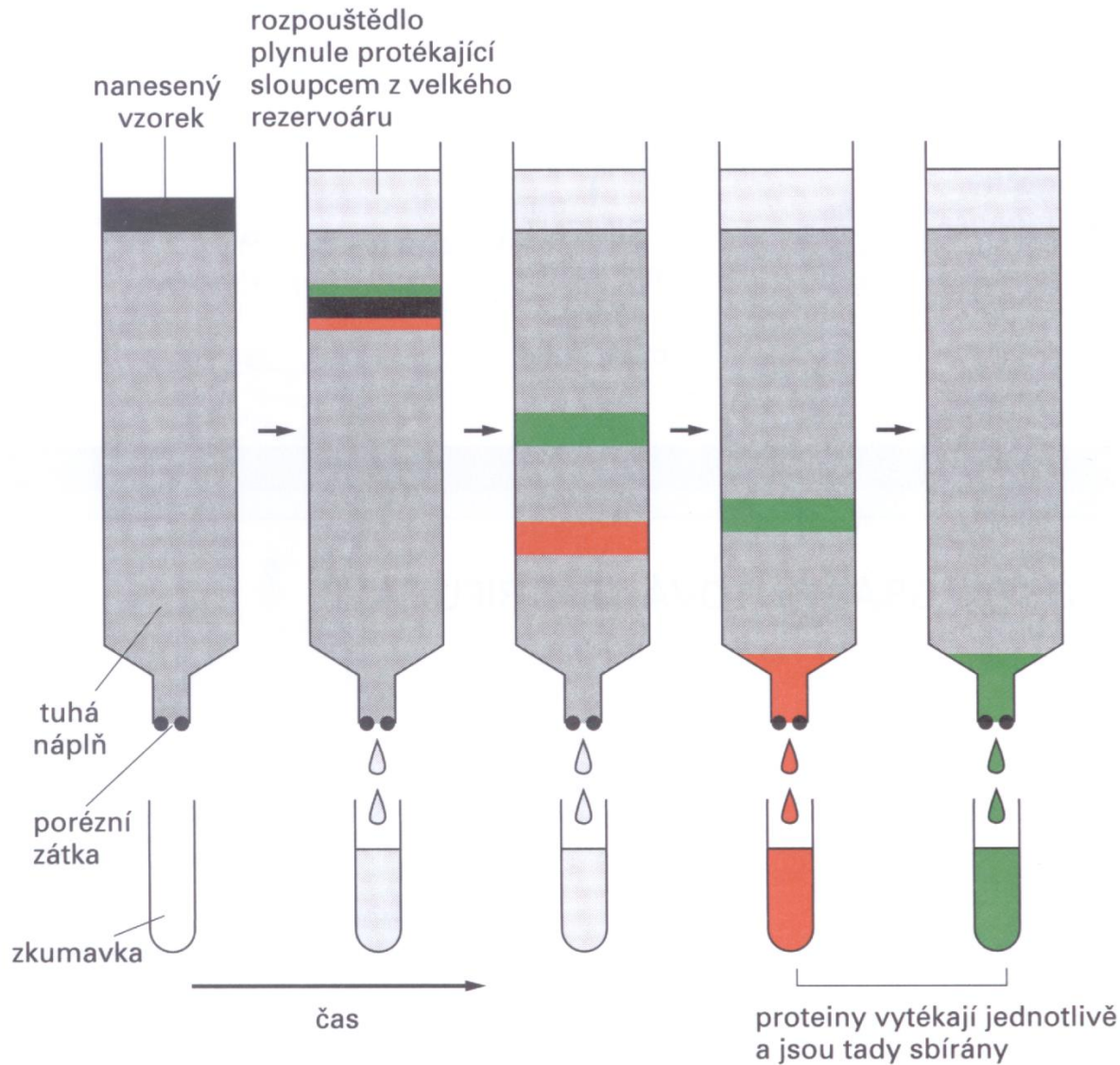
Imunoglobuliny se v elektrickém poli pohybují podle náboje až na místo, kde $\text{pH} = \text{pI}$.

Náboj má nulovou hodnotu a tam zůstávají stát.

IEF fokusace patří mezi metody s největší rozlišovací schopností
Gradient pH se tvoří pomocí amfolytů (komerčně dostupné)

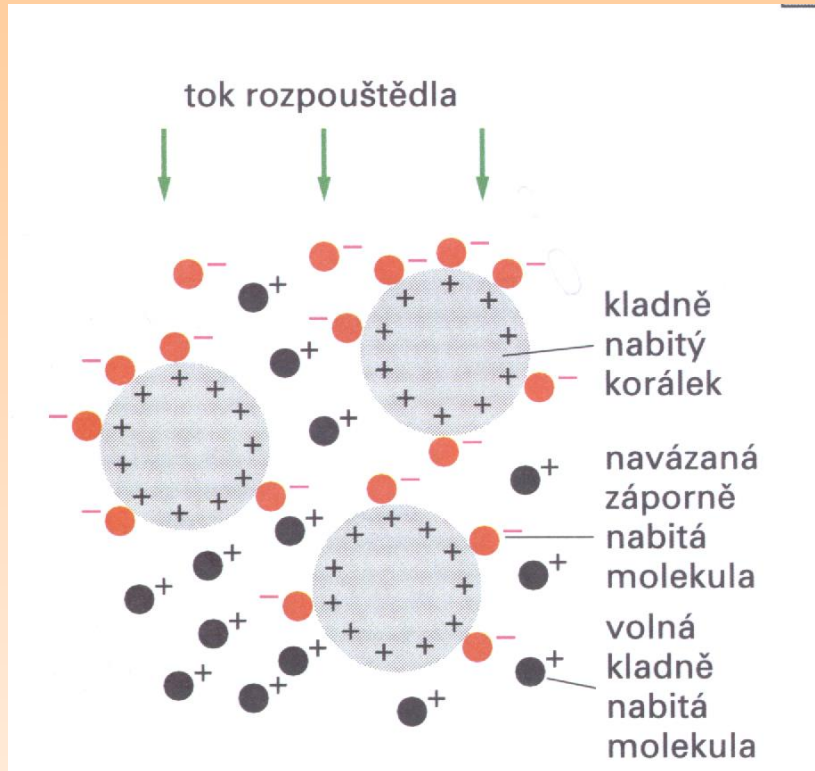
Nosič - polyakrylamid

Chromatografie



- Ionexová
- Gelová
- Hydrofobní
- Afinitní

Ionexová chromatografie



Ionex = měniče iontů chemicky inertní matrice s kovalentně navázanými skupinami atomů, které nesou elektrický náboj s volně měnitelnými ionty. Na matrici pevně navázané skupiny +, pak měnitelné - jedná se o ANEX obráceně: KATEX

- Ionexový nosič** - polysacharidy (celulosa, dextran, agarosa)
- syntetické živice
- některé polymery (polyakrylamid, polystyrén, hydroxyethylmetakrylát)

Funkční skupiny na nosiči

- Katexy**
- hydroxylové
 - fenolické
 - karboxylové
 - síranové

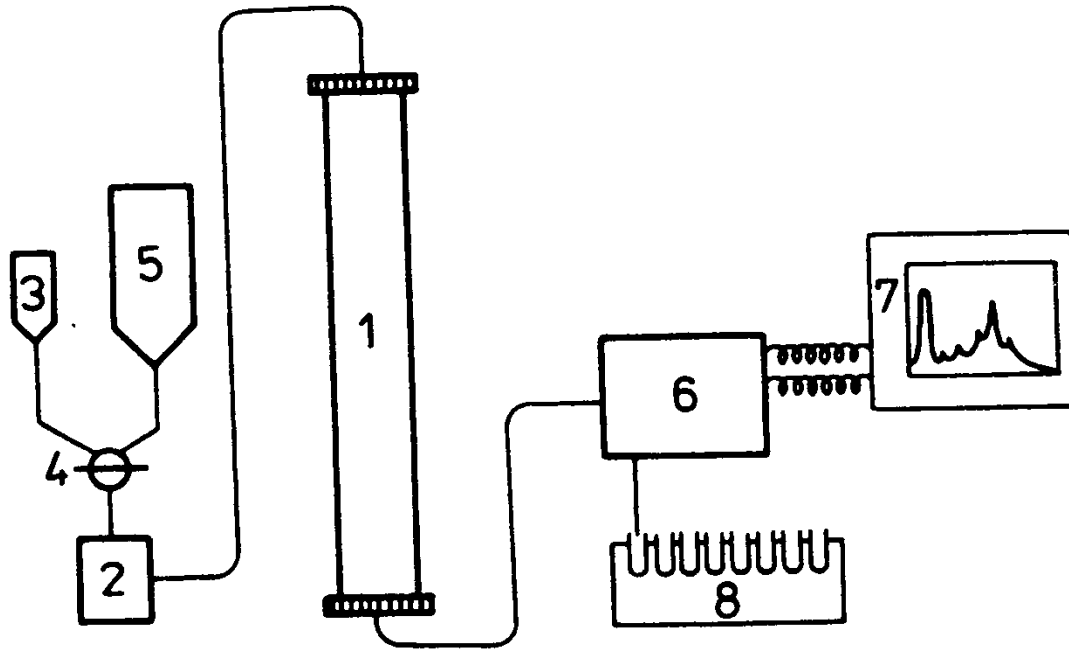
- Anexy**
- alifatické aminoskup.
 - aromatické aminoskup.

- Silný ionex**
- síranové skupiny
 - kvartérní aminoskupiny

- Střední a slabý ionex** - ostatní skupiny

Aktivace ionexu aktivuje se zředěnou kyselinou a hydroxidem tzv. „dostat se do cyklu“
naváže se vhodný ion: anex = Cl⁻ katex = Na⁺

Izolace imunoglobulinů

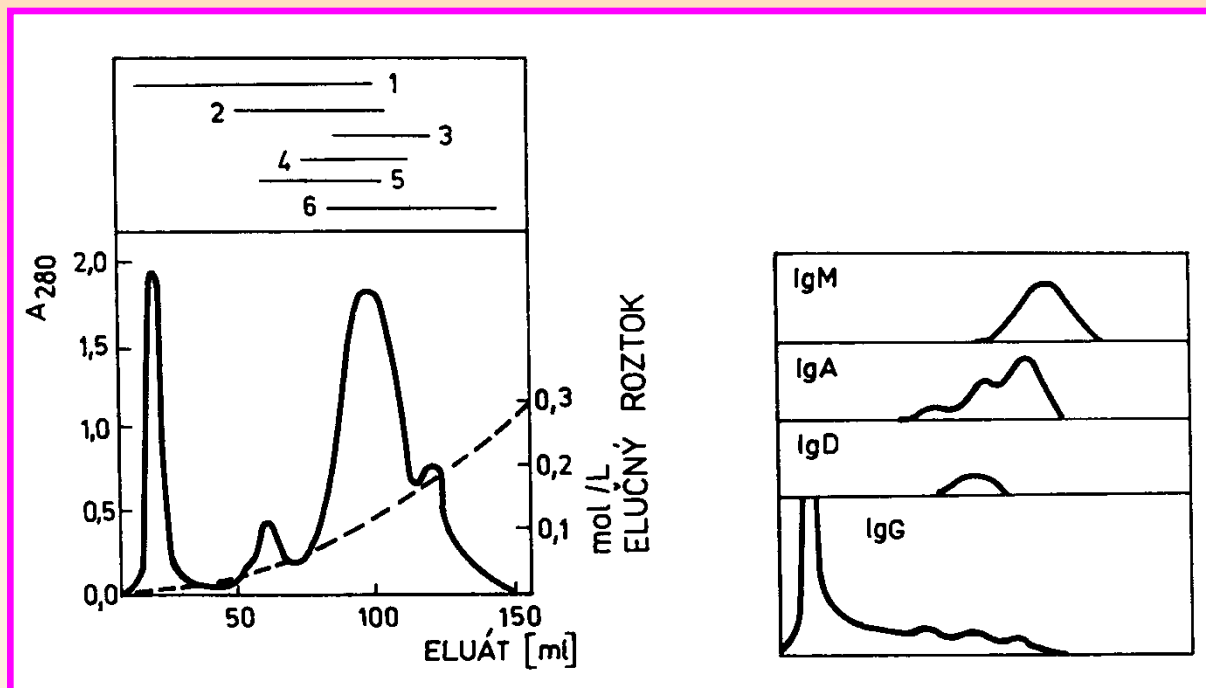


DEAE-celulosa
DEAE-Sephadex
vhodné pro izolaci IgG

Lidské sérum se dialyzuje proti 0,01 M K-Pi pH 8,0 precipitát se centrifuguje a supernatant se aplikuje na kolonu DEAE-celulosy, která se ekvilibrovala stejným pufrem. Sérové bílkoviny se eluují gradientem 0,015 až 0,3 M K-P_i pH 8

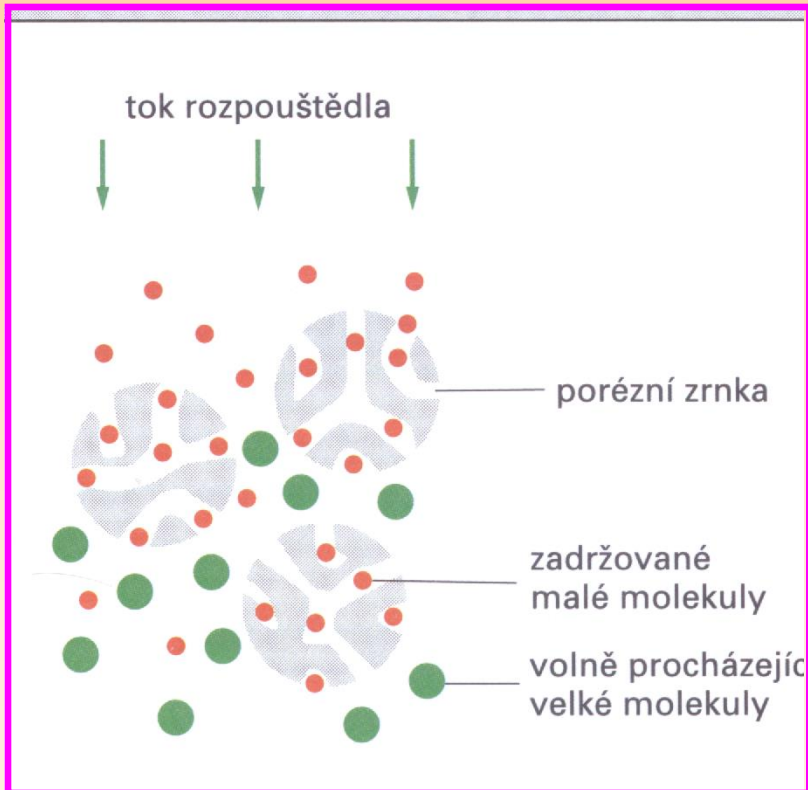
0,02 M :

1. vrchol	čistý IgG
2. vrchol	β-globuliny a α-globuliny
3. vrchol	albumin



Gelová filtrační chromatografie

Používají se pórovité gely, kdy se látky rozdělují podle velikosti molekul.



Nosiče:

Sephadex (dextran)
Sepharosa (agarosa)
Bio-Gel P
(polyakrylamid)
Spheron
Ultrogel

Gelová chromatografie lidského séra

Sephadex G-200 (Mr 5 000 - 600 000)

3 vrcholy:

- 1. IgM a α_2 -makroglobulin, nějaké lipoproteiny**
- 2. IgA a IgG**
- 3. Albumin a sérové proteiny**

Pokud molekuly IgG agregují na diméry, nedosáhne se uspokojivé rozdělení prvních dvou vrcholů

Využití gelové chromatografie:

- stanovení Mr**
- měření množství komplexů**
- určení přítomnosti fragmentů makromolekul (Fc a Fab)**

Hydrofóbní chromatografie

Látky se rozdělují na základě interakce hydrofobních skupin s hydrofobními skupinami chromatografického nosiče.

Síla interakce

- iontová síla prostředí
- charakter iontů (SO_4^{2-} PO_4^{3-} NH_4^+)
- teplota
- pH

Proteiny se váží na hydrofobní sorbent v okolí pl

Nosič: matrice agarosa na ní navázané: **oktyl-
fenyl-**

Použití: Na hydrofobní sloupec se nanese vzorek s vysokou iontovou silou a pH blízké pl proteinu, který se má izolovat. Po navázání vzorku a promytí balastních složek, se protein uvolní z vazby snížením iontové síly, záměnou za ion s nižší vysolovací schopností, snížením polárnosti elučního roztoku.

Izolace lidského IgA hydrobní chromatografií

Na kolonu Phenyl-Sepharose CL 4B se nanese lidské sérum v 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, adsorbuje se hlavně IgA. Ostatní sérové proteiny se nezachytí. Adsorbovaný IgA se z kolony vymyje 0,8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Získá se poměrně čistý preparát IgA.

Specifické metody

Základ: biospecifická vazba dvou látek:

enzym - substrát

enzym - inhibitor

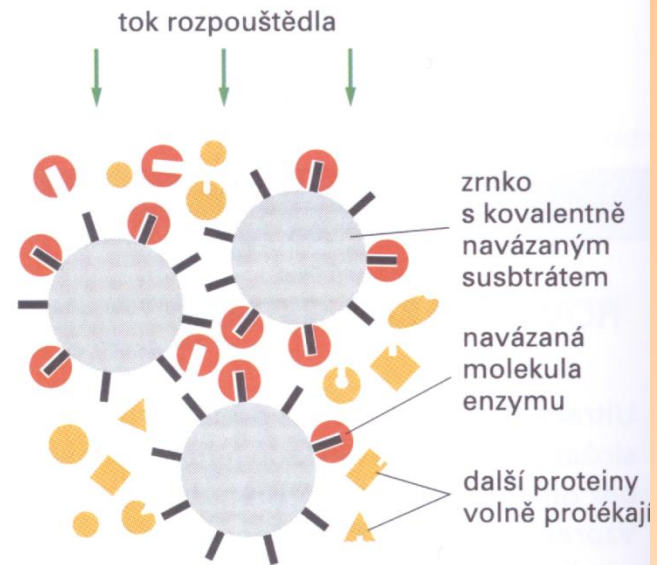
polynukleotid-komplementární úsek DNA nebo RNA

antigen (haptén) - protilátka

vazba (imobilizace) jednoho z dvojice na pevný nosič.

Když se imobilizovaný člen dostane do kontaktu z různými látkami, budou se vázat jen molekuly druhého členu dvojice.

PRINCIP IMUNOAFINITNÍ CHROMATOGRAFIE



PROTILÁTKAMI LZE PŘEČIŠŤOVAT MOLEKULY

IMUNOPRECIPITACE



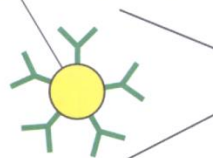
směs molekul



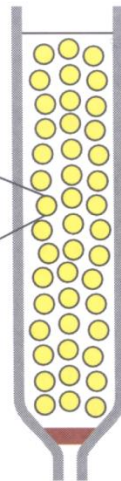
agregát molekul A s anti-A-protilátkou lze separovat centrifugací

IMUNOAFINITNÍ SLOUPCOVÁ CHROMATOGRAFIE

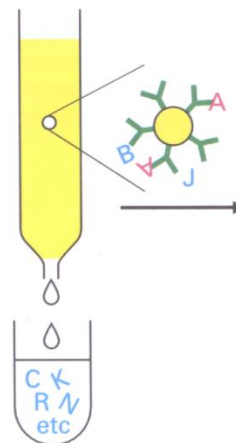
korálek potažený anti-A-protilátkami



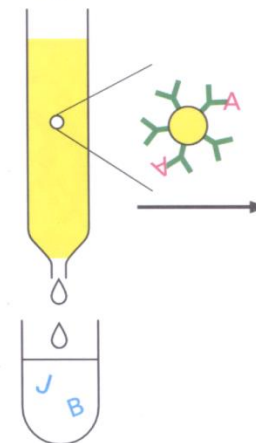
kolona naplněná takovými korálky



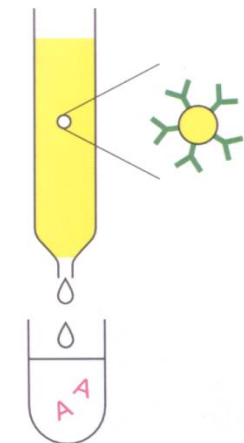
antigen A a nežádoucí molekuly



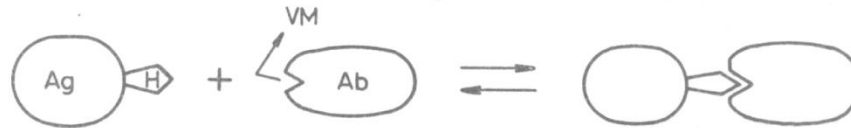
promytí



eluce antigenu A



DVE ZLOŽKY REAGUJÚCE IMUNOŠPECIFICKOU VÄZBOU

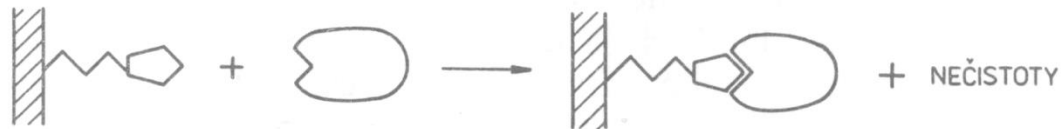


IMOBILIZÁCIA LIGANDU



Mústky:
1,6-diaminohexan
k. 6-aminokapronová

ŠPECIFICKÁ VÄZBA DRUHEJ ZLOŽKY (ADSORPCIA)



VYMYTIE NEČISTÔT

UVOLNENIE NADVIAZANEJ ZLOŽKY (DESORPCIA)



Obr. 72. Princíp imunoafinitnej chromatografie

Ag — kompletný antigén, H — haptén (determinant), Ab — protilátka, VM — väzbové miesto, N — nosič, L — ligand, M — mostík (ramienko)

Imunosorpce

- ❖ **Ligand = antigen (izoluje protilátka)**
- ❖ **Ligand = protilátka (izoluje antigen)**
- ❖ **Nosič s navázaným ligandem = imunosorbent**

Nosiče

- ✓ **polyakrylamidové**
- ✓ **polymetakrylové**
- ✓ **dextranové (Sepharose 4B nebo 6B)**

Vazba antigenu nebo protilátky na nosič kovalentní

Provedení:

- ✓ Nosič s kovalentně navázaným ligandem se vloží do kolonky, nechá se protékat protilátka nebo antigen, malá průtoková rychlost.
- ✓ Kolona se propláchne tlumivým roztokem.
- ✓ Následuje eluce.

Nespecifická eluce:

Používají se roztoky kyselin, tlumivé roztoky s kyselým pH a vysokou iontovou silou rychle odstranit dialýzou

Specifická eluce:

Navázaná protilátka se vytěsňuje vysokou koncentrací volného ligandu (haptén, antigen) v elučním roztoku.

Výhoda:

izolace specifických protilátek proti požadovanému ligandu a ne heterogenní populaci molekul určité třídy imunoglobulinů s různými protilátkovými aktivitami.

Požadavky na nosič -imunoabsorbent:

- dobré průtokové vlastnosti
- odolnost vůči chemickým a mechanickým vlivům
- nesmí mít gelově filtrační účinek
- nesmí mít ionexový charakter
- nesmí mít adsorpční charakter
- musí mít dost aktivních skupin pro vazbu antigenu nebo Ig
- částice nosiče musí mít trvanlivý tvar

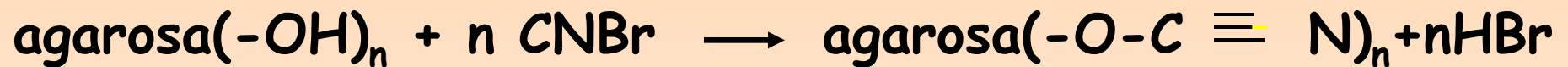
Vazba ligandu na nosič se uskutečňuje:

- ✓ fyzikální adsopcí (nepravé imunoadsorbenty)
- ✓ zapolymerování afinantu (ligandu) do gelu
- ✓ křížová vazba pomocí glutaraldehydu a jiných látek
- ✓ kovalentní vazba (pravý imunoadsorbenť)

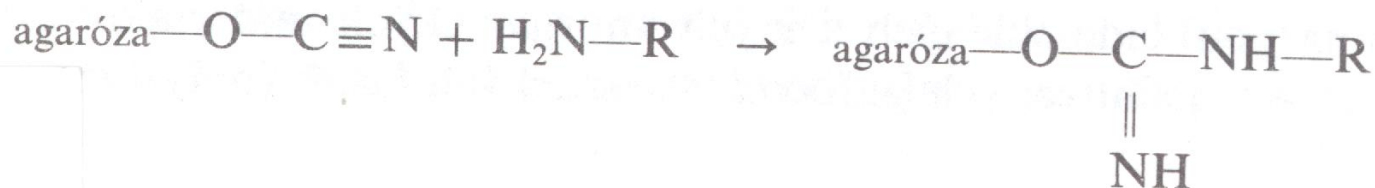
V praxi poslední dvě.

AGAROVÉ IMUNOADSORBENTY

Agarosa má velký počet málo reaktivních alkoholových skupin, musí se před vazbou ligandu aktivovat pomocí bromkyanu (CNBr)



derivát agarosy reakce s aminem (proteínovým antigenem nebo protilátkou) prostřednictvím volné koncové aminoskupiny nebo ϵ -aminoskupiny lysinu v jejich molekulách



Komerčne dostupné imunosorbenty

Niektoré adsorbenty pre imunoafinitnú chromatografiu

Nosič	Funkčná skupina nosiča	Funkčná skupina ligandu	Produkt
Agaróza	$—O—C\equiv N$	$—NH_2$	CNBr-activated Sepharose 4B ^①
Agaróza	<i>N</i> -hydroxysukcínimidový ester	$—NH_2$	Affi-Gel 10, Affi-Gel 15 ^①
Agaróza	$—NH(CH_2)_5-COOH$	$—NH_2$	Activated CH-Sepharose 4B ^①
Agaróza	$—NH(CH_2)_5-COOH$	$—NH_2$	CH-Sepharose 4B, ECH-Sepharose 4B ^②
Agaróza	$—COOH$	$—NH_2$	Affi-Gel 202, CM Bio-Gel A ^②
Agaróza	$—NH_2$	$—COOH$	Affi-Gel 102 ^②
Agaróza	$—NH(CH_2)_6—NH_2$	$—COOH$	AH-Sepharose 4B, EAH-Sepharose 4B ^②
Polyakrylamid	$—NH_2$	$—COOH$	Aminoethyl Bio-Gel P-2 ^② Aminoethyl Bio-Gel P-150 ^②
Agaróza	$—DEAE$ a Cibacron Blue F3GA	viaže všetky sérové proteíny, okrem IgG a transferínu	DEAE Affi-Gel Blue ^③
Agaróza	$—CM$ a Cibacron Blue F3GA	viaže, albumín, sérové proteázy a komplement	CM Affi-Gel Blue ^④

① Ligand sa viaže na adsorbent spontánne.

② Na väzbu ligandu treba použiť karbdiimidovú metódu.

③ Vhodný na izoláciu IgG zo séra jedнокrokovou operáciou, pričom IgG neobsahuje nijaké proteázy.

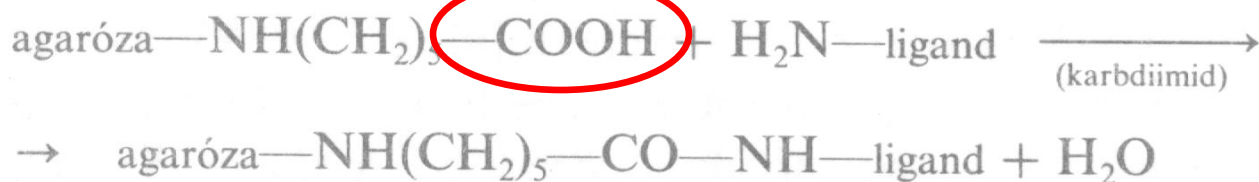
④ Vhodný na prípravu globulínovej frakcie čistej od albumínu a proteáz.

PŘÍPRAVA IMUNOADSORBENTU z CNBr-aktivované Sepharosy:

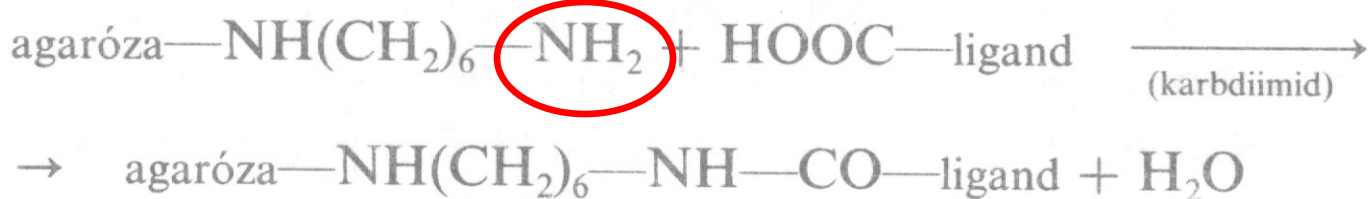
Pracovní postup nadviazania ligandu na CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia)

Stupeň	Uskutočnenie
Navážiť potrebné množstvo Sepharosy aktivovanej CNBr Napučanie gélu Premyť na sklenenom filtri Rozpustiť ligand v tlmivom roztoku Premiešavať roztok ligandu so suspenziou gélu (opatrne miešať, nepoužiť magnetické miešadlo) Zablokovať nezreagované voľné hydroxylové skupiny nosiča Vymytie nezreagovaného ligandu a blokujúceho amínu	1 g suchého prášku napučí na 3,5 ml gélu 15 min v 1 mol/L HCl použiť 1 mol/L HCl — asi 200 ml na 1 g suchej Sepharosy 0,1 mol/L NaHCO ₃ tlmivý roztok, pH 8,3, obsahujúci 0,5 mol/L NaCl 2 h pri laboratórnej teplote alebo cez noc pri 4 °C preniesť gél do tlmivého roztoku s blokujúcou látkou — napr. 1 mol/L etanolamín, pH 9,0 alebo Tris-HCl tlmivý roztok, pH 8,0 aspoň 5 × striedavo premyť 0,1 mol/L acétátovým tlmivým roztokom, pH 4,0, obsahujúcim 1 mol/l NaCl a borátovým tlmivým roztokom, pH 8,0, taktiež obsahujúcim 1 mol/L NaCl

CH-Sepharose 4B má volné karboxylové skupiny a v přítomnosti karbodiimidu váže ligandy, které mají volné primární aminoskupiny:



AH-Sepharose 4B má volné -NH_2 , proto bude vázat ligandy s karboxylovými skupinami:



Vhodné použít karbodiimid rozpustný ve vodě, vytváří močovinu, která je také rozpustná ve vodě.

Další imunosorbenty

Glutaraldehydové sorbenty

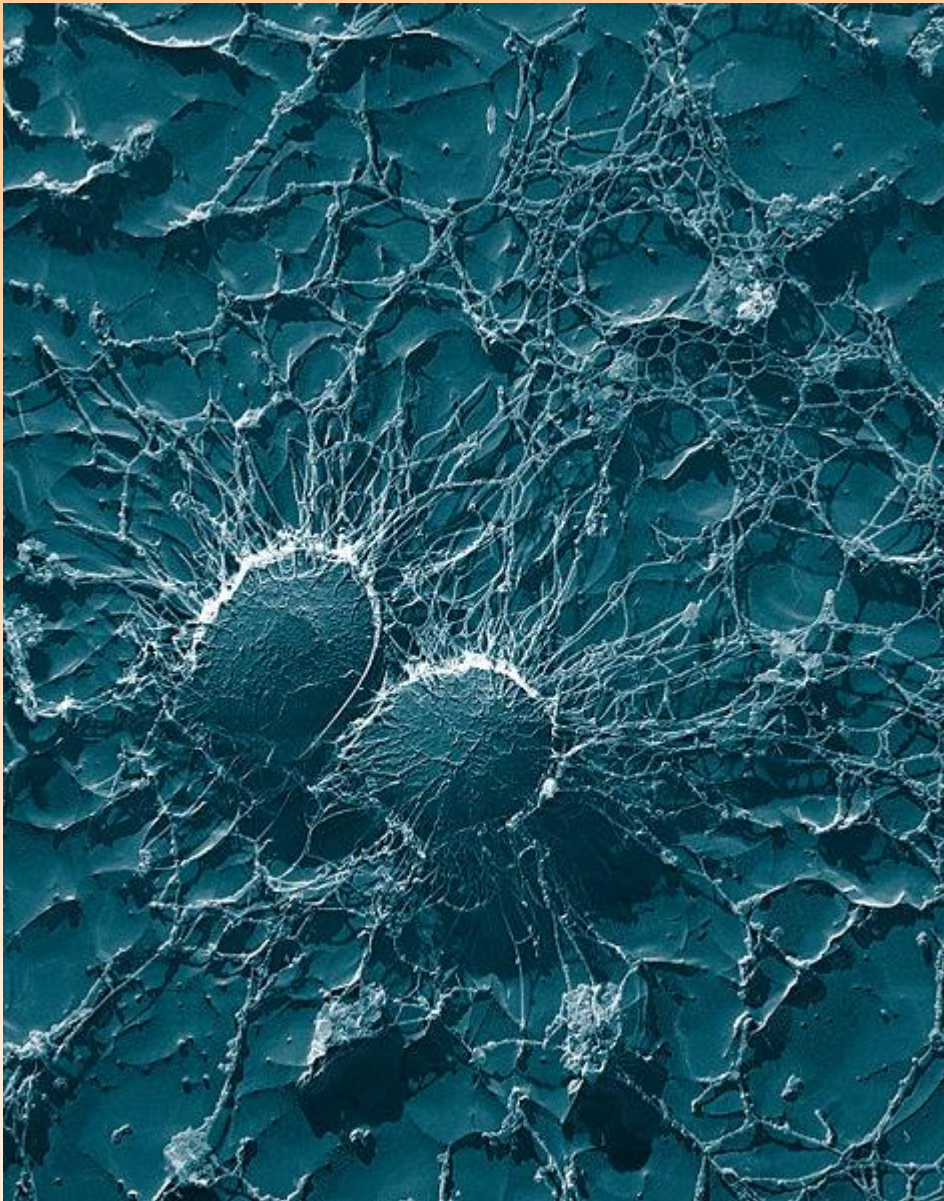
- ✓ Podstatou není kovalentní vazba, ale imobilizace ve formě polyméru.
- ✓ V přítomnosti glutaraldehydu polymerují a stávají se nerozpustnými proteiny s volnými α -aminoskupinami a ϵ -aminoskupinami (když se pH roztoku blíží jejich pI).
- ✓ Imobilizované proteiny jsou stabilní i v prostředí močoviny nebo dodecylsulfátu sodného.
- ✓ Glutaraldehydový polymer se zhomogenizuje a použije se jako náplň do skleněné kolony.
Lze přimíchat inertní nosič (Sephadex G-25).

Protein A

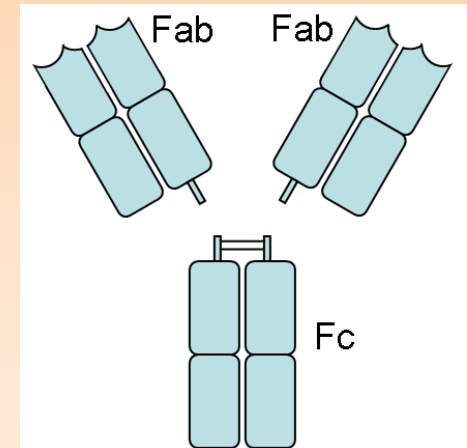
pseudoimunoabsorbent



- ✓ Protein A má Mr 41 000, je navázaný v peptidoglykanové vrstvě buněčné stěny všech plazmově koagulozových pozitivních stafylokoků.
- ✓ Specificky se váže s částí Fc.
- ✓ Jedna molekula proteinu A váže 2 molekuly IgG, vznikají pseudoimunokomplexy.
(protože se na vazbě nepodílí vazebné místo IgG)
- ✓ Reaguje s živočišnými IgG ale také (slaběji) s IgA a IgM.



Staphylococcus aureus



Kolonka s pseudoimunosorbentem:

**Navázání proteinu A na Sepharosu
(komerční: Protein A-Sepharose CL-4B fa Pharmacia)**

**Lidské IgG jen s IgG1, IgG2 a IgG4 se zachytí,
ostatní do eluátu (PBS)**

1 ml gelu váže 20 mg IgG

**eluce: 0,1 M glycin-HCl s pH 2,4 nebo
 0,5 M kyselina octová**

95 % IgG přítomného v séru

Kombinace:

ionex DEAE-celulosa + Protein A - Sepharose CL-4B

izolace IgG3