

# Molekularno-biološke tehnike

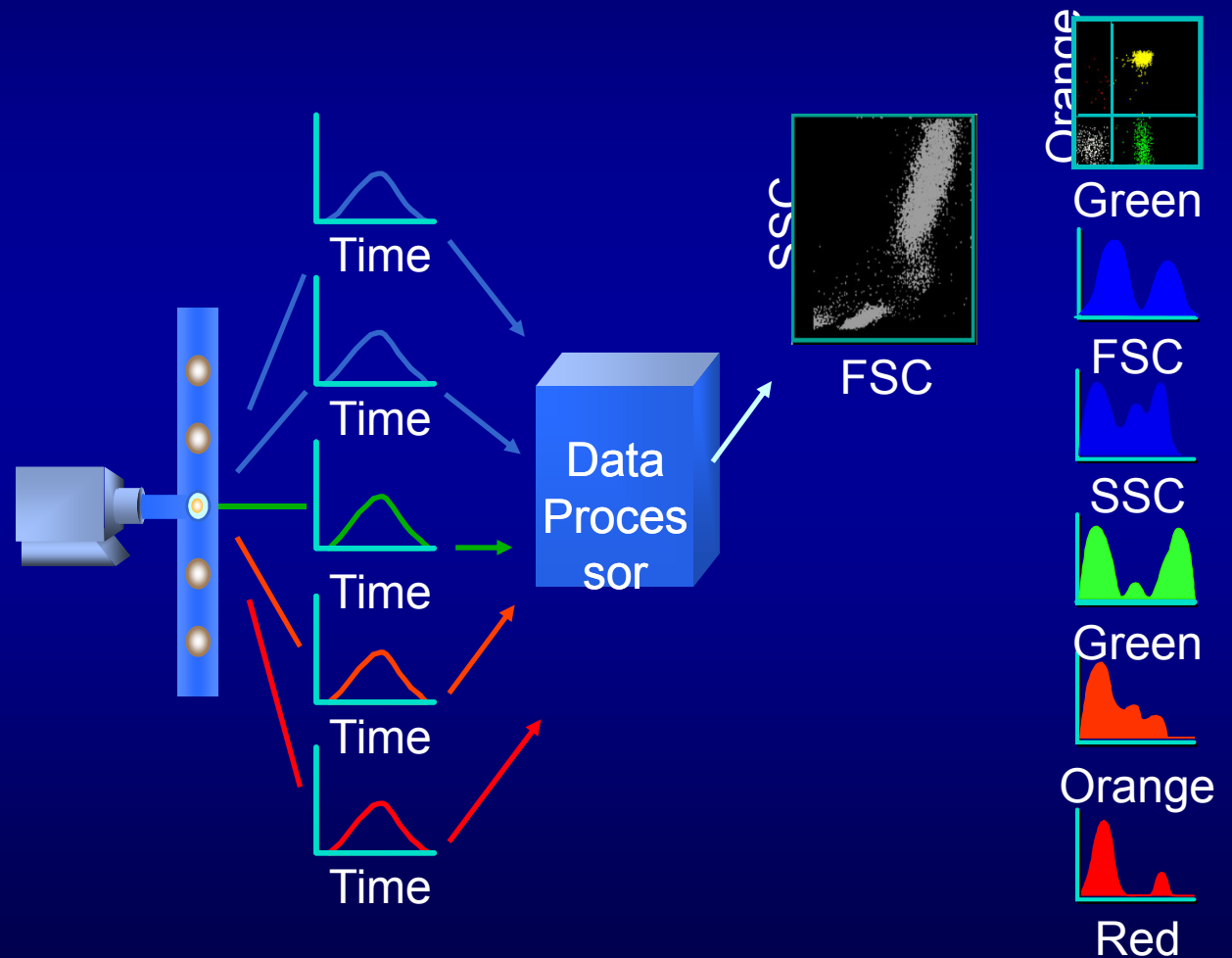
Osnovni principi

## Osnovni principi:

- ❖ metoda koja se koriste u analizi ćelija
- ❖ molekularno bioloških tehnika
- ❖ imunohemijskih metoda

# Šta je protočna citofluorimetrija?

- Istovremeno određivanje i merenje multiplih karakteristika pojedinačne ćelije
- Merenja se izvode po ćeliji sa uobičajenom brzinom od 500 do 4000 ćelija po sekundi



# Šta nam protočni citometar može reći o ćeliji?

- Njenu relativnu veličinu (rasipanje svetla unapred – engl. Forward Scatter—FSC)
- Njenu relativnu granuliranost ili unutrašnju složenost (rasipanje u stranu – engl. Side Scatter—SSC)
- Relativni intenzitet fluorescence date ćelije (FL1, FL2, FL3, FL4, i FL5)

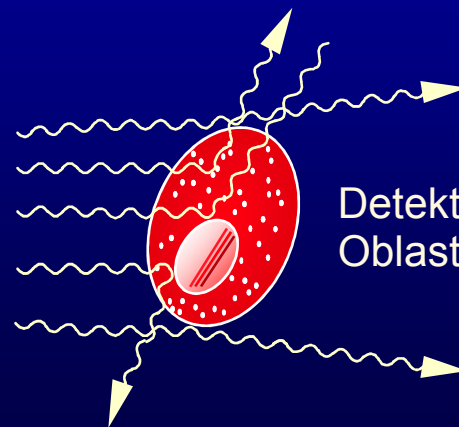
## **Rasipanje pod uglom (Side Scatter)**

Zavisi od granuliranosti ćelije i njene unutrašnje kompleksnosti

Registruje se pod uglom od  $90^\circ$  u odnosu na laserski zrak

Izvor fotona

Detektor rasipanja pod uglom kompleksnost ćelije

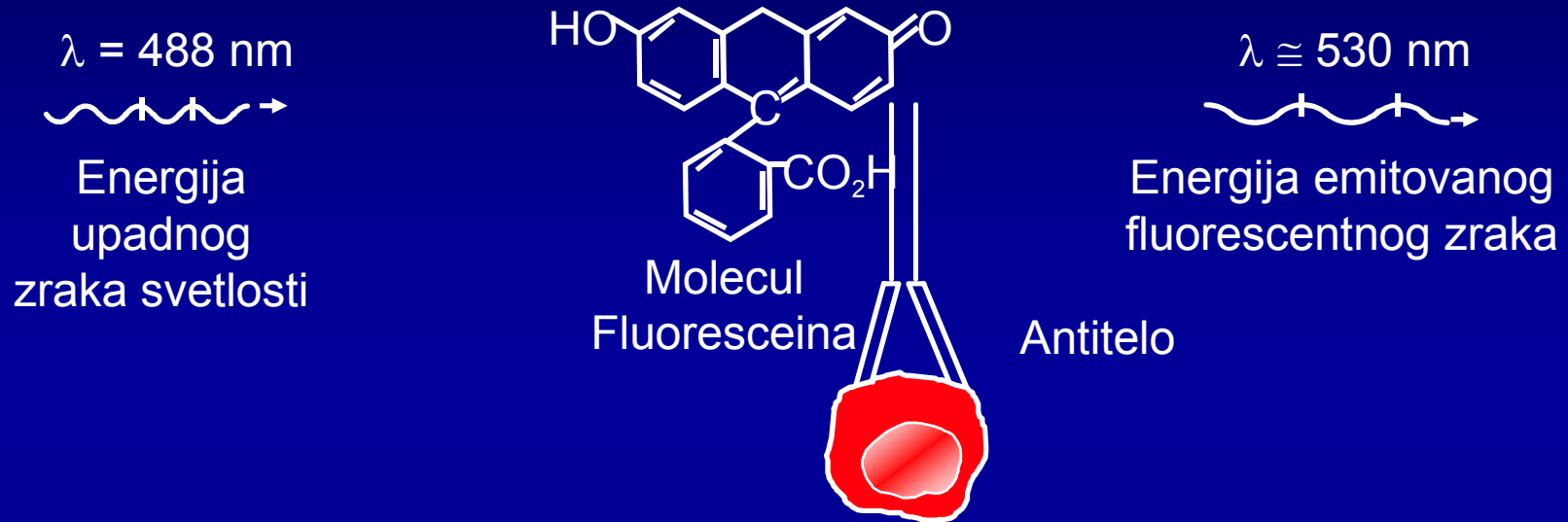


## **Rasipanje unapred (Forward Scatter)**

Zavisi od veličine ćelije

Registruje se duž ose upadnog zraka u smeru unapred

# Šta je fluorescencija?

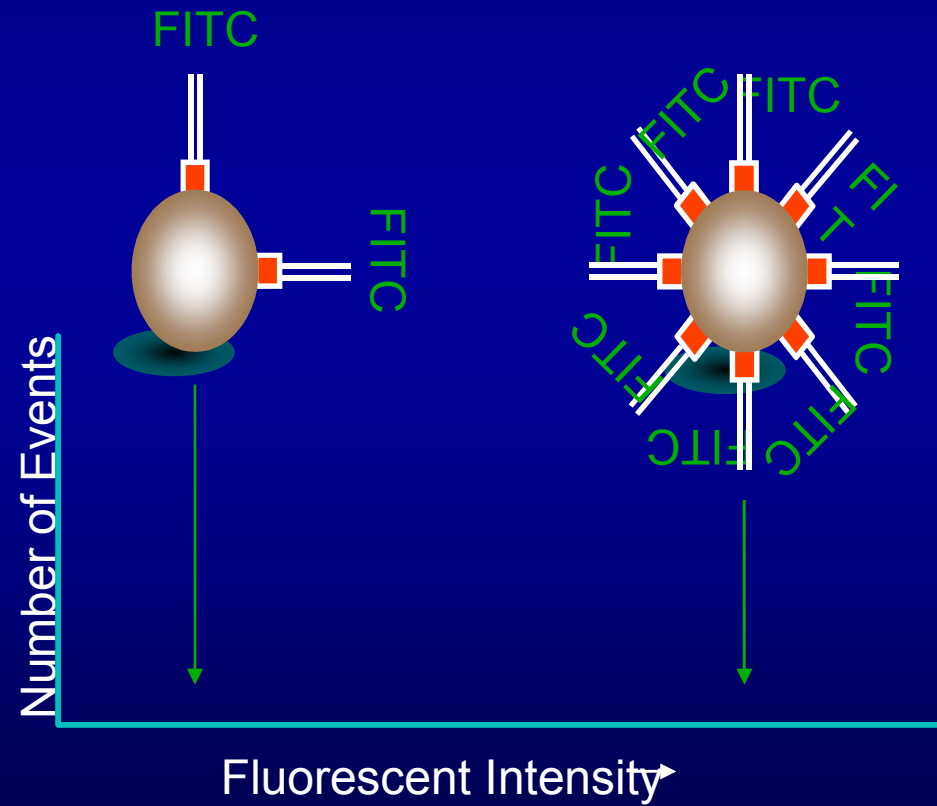
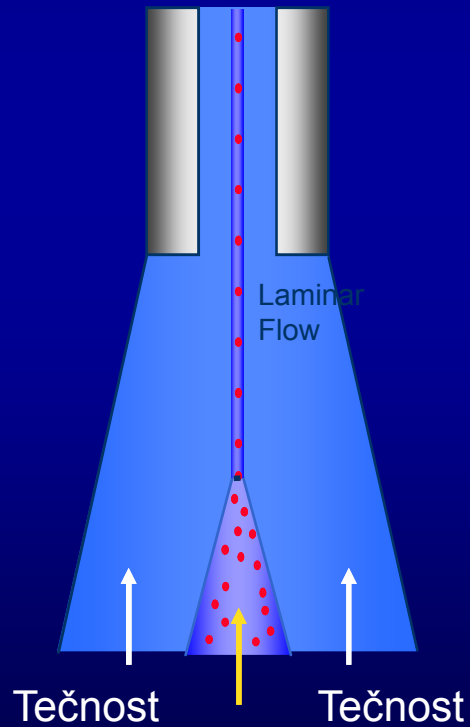


- Fluorohrom apsorbuje energiju od lasera
- Fluorohrom oslobađa apsorbovanu energiju:
  - Vibriranjem i rasipanjem toplote
  - Emisijom fotona duže talasne dužine

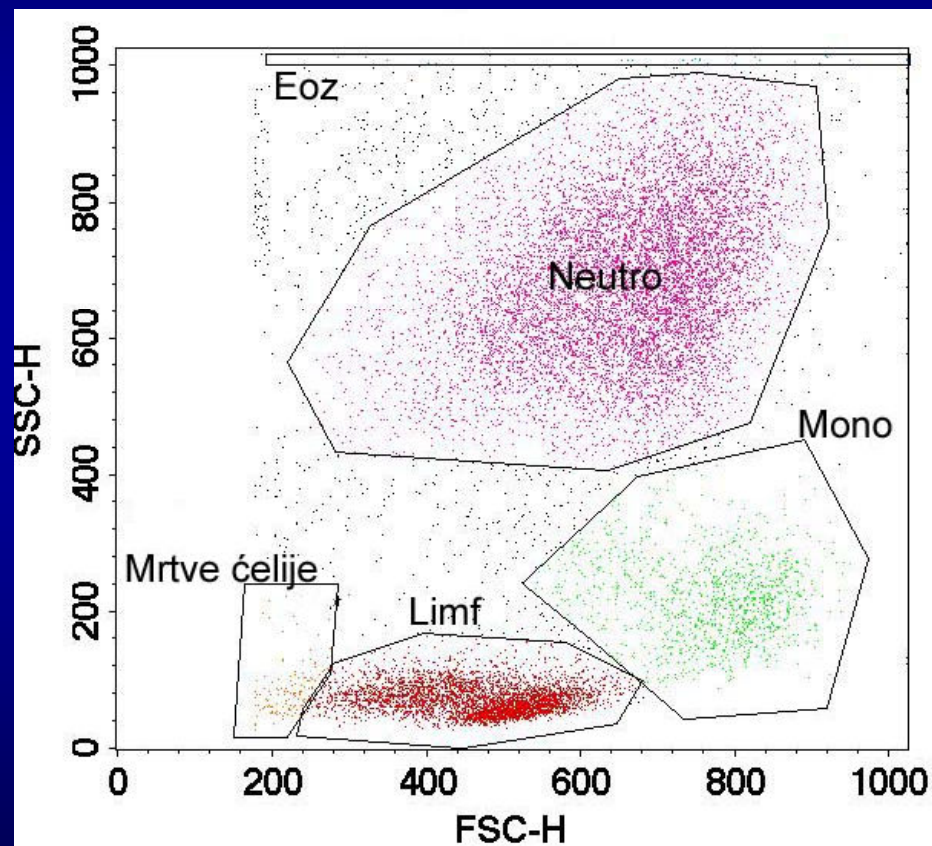
# Fluorescencia

Emitovani intenzitet fluorescence  $\propto$  veznim mestima

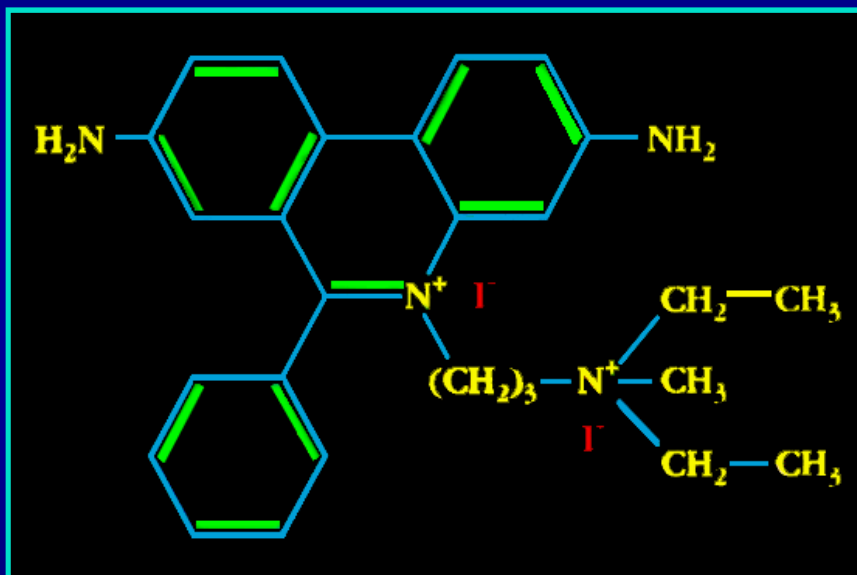
Laminarni tok tečnosti



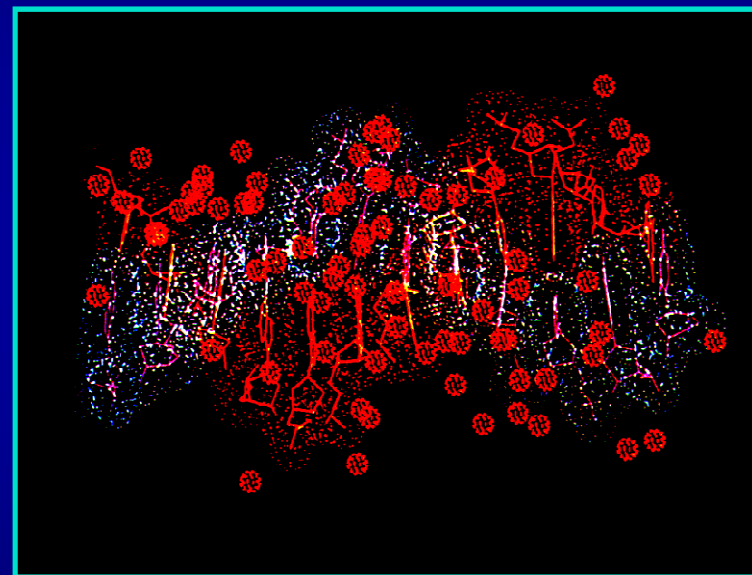
# Razdvajanje leukocita periferne krvi na subpopulacije na osnovu rasipanja svetlosti (FSc/SSc)



# Propidijum jodid



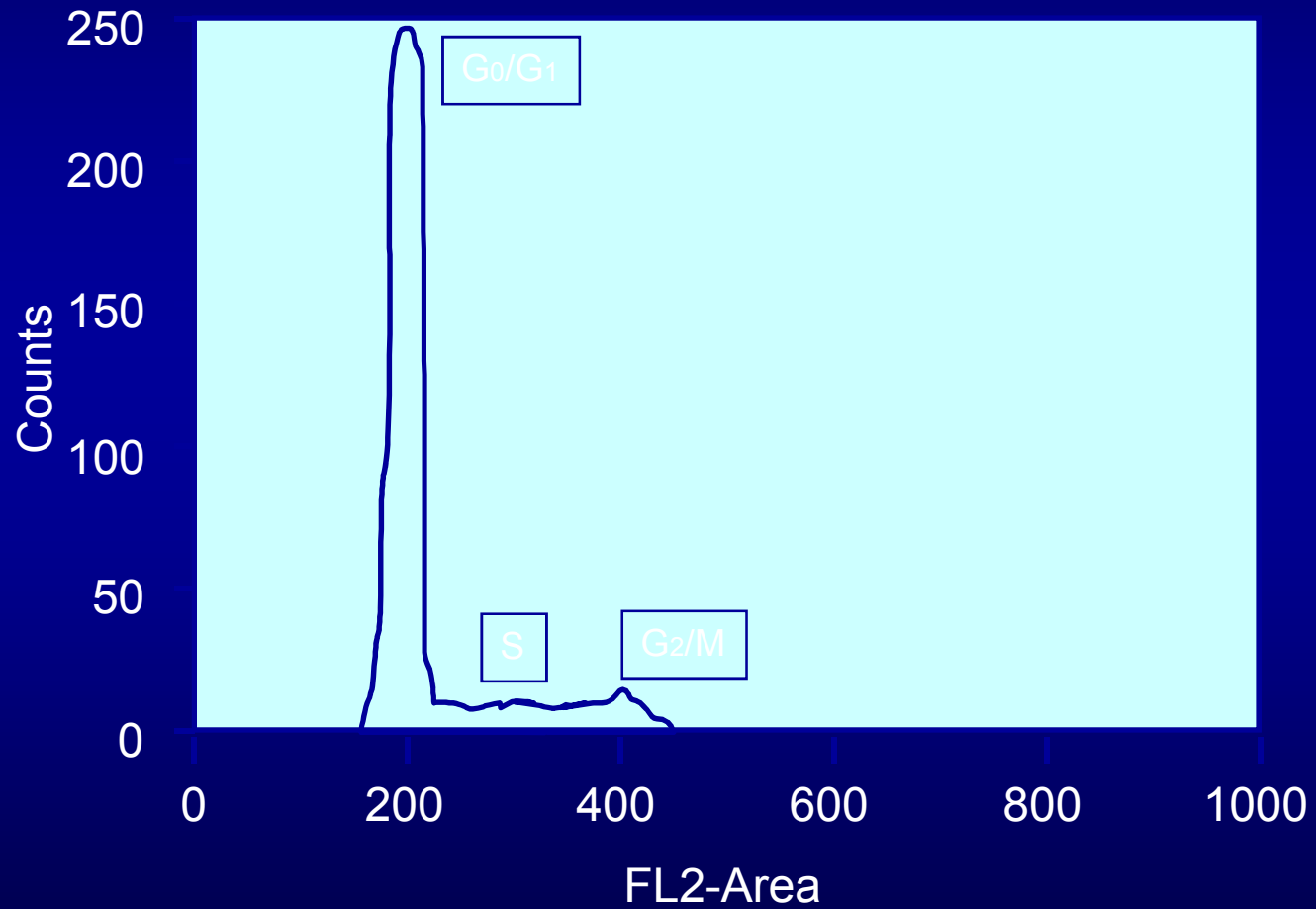
Struktura



Vežan za DNK



# DNK Histogram



# Primena protočne citometrije

- HIV imunofenotipizacija
- Apsolutan broj CD4 pozitivnih ćelija
- Imunofenotipizacija leukemija i limfoma
- Analiza ćelijskog ciklusa i analiza ploidijske tumora
- Određivanje broja retikulocita
- Određivanje unakrsne podudarnosti (transplantacija organa)
- Određivanje stem ćelija
- Određivanje funkcije Imunskog sistema
- Hematopoetične stem ćelije
- Studije multiple rezistencije na lekove (kancer)
- Kinetičke studije (ćelijska funkcija)
- Analiza trombocita (koronarna bolest)
- Detekcija mikroorganizama (bakterije, paraziti)
- FISH and Flow

Osnovni principi  
molekularno bioloških tehnika

Brz napredak molekularne biologije je uneo revolucionarne promene u laboratorijsku praksu.

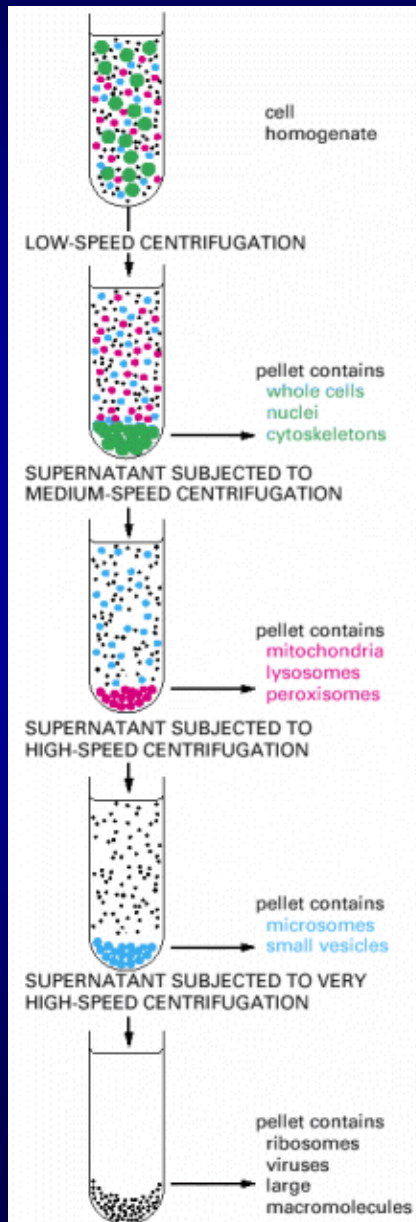
Mogućnosti primene ovih tehnika u dijagnostici i terapiji su velike.

Molekularno biološke tehnike su se najpre koristile isključivo u istraživanju, u svrhu ispitivanja funkcije pojedinih gena.

Danas se koriste za

- identifikovanje oštećenih gena koji se mogu dovesti u vezu sa pojavom bolesti ,
- u sudskoj medicini
- za dijagnostiku virusnih infekcija
- sintezu rekombinantnih preparata

# Dobijanje različitih uzoraka iz ćelija centrifugiranjem



**Mala brzina** (1000g, 10 min) – cele ćelije, jedra, citoskelet

**Srednja brzina** (20 000g, 20 min) – mitohondrije, lizozomi, peroksizomi

**Velika brzina** (80 000g, 1 sat), mikrozomi, male vezikule

**Veoma velika brzina** (150 000g, 3 sata) – ribozomi, virusi, veliki makromolekuli

# Rekombinantne DNK tehnike (analiza fragmenata DNK)

Rekombinantne DNK tehnike omogućavaju spajanje DNK sekvenci u nove kombinacije (rekombinantna DNK)

Nakon početne primene u istraživanju, danas se koristi za identifikaciju oštećenih gena i popravljjanje genetskih defekata.

Prvi korak podrazumeva izolaciju kompletne DNK (ili RNK), izolovanje fragmenata DNK (jednog ili više gena) koji sadrže varijabilne sekvence i to u dovoljnoj količini

# Principi ekstrakcije DNK/RNK

Priprema uzorka (ekstrakcija DNK/RNK) često ključni korak od kojeg zavisi validnost analize

Veliki broj različitih tehnika, komercijalni kitovi.

Opasnost od kontaminacije “stranim” nukleinskim kiselinama.

Princip ekstrakcije:

1. Liziranje ćelija
2. Precipitacija oslobođenih molekula nukleinskih kiselina (izopropanol, etanol)

Postoji veliki broj različitih protokola

Izbor protokola zavisi od:

- Vremena potrebnog za izdvajanje NK
- Dijagnostičke pouzdanosti
- Rizika od kontaminacije
- Prinosa ekstrahovane nukleinske kiseline



# Ekstrakcija DNK podrazumeva:

- Liziranje ćelija u rastvoru deterdženta uz enzimsku digestiju
- Ekstrakciju pomoću organskih rastvarača
- Precipitaciju alkoholom
- Rastvaranje izolovane DNK u vodi ili puferima kao i spektrofotometrijsko određivanje čistoće i količine izolovane DNK

# Ekstrakcija RNK

Veća osetljivost molekula RNK zahteva primenu posebnih protokola (posebno važna eliminacija ribonukleaza).

Metoda za ekstrakciju RNK mora da zadovolji dva kriterijuma:

1. Omogućava da se sačuva intaktna RNK
2. Dobijene RNK ne sadrže inhibitore reverzne transkriptaze.

# Tehnike

Tehnike za **izolovanje i amplifikaciju** gena i proučavanje i **manipulaciju** sekvencama DNK uključuju primenu:

- **restrikcionih enzima,**
- **vektora za kloniranje,**
- **lančanu reakciju umnožavanja (polymerase chain reaction - PCR),**
- **elektroforezu na gelu,**
- **imunoblot i**
- **pripremu obeleženih proba koje hibridizuju** za odgovarajuću ciljnu sekvencu DNK.

**Genska terapija** uključuje **izolovanje** normalnih gena i njihovo uključivanje u obolele ćelije tako da se eksprimiraju normalni geni, omogućavajući oboleloj ćeliji da se vrati u fiziološko stanje.

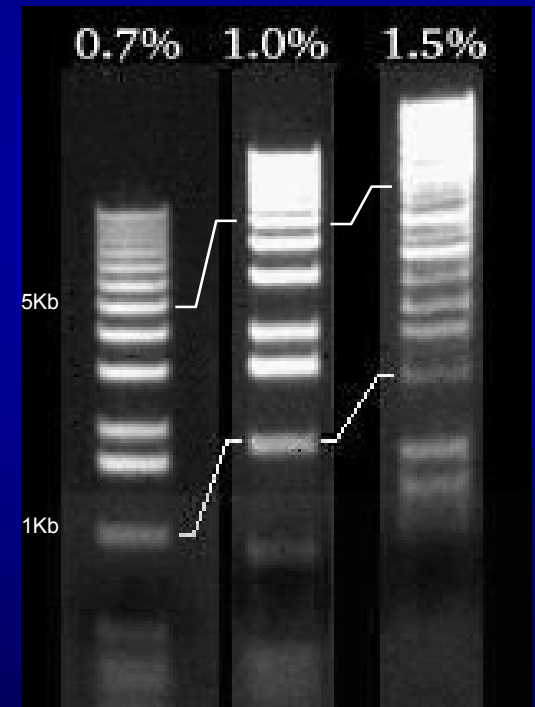
# Rekombinantna DNK tehnologija

Rekombinantne DNK tehnologija uključuje niz tehnika, od kojih su najvažnije:

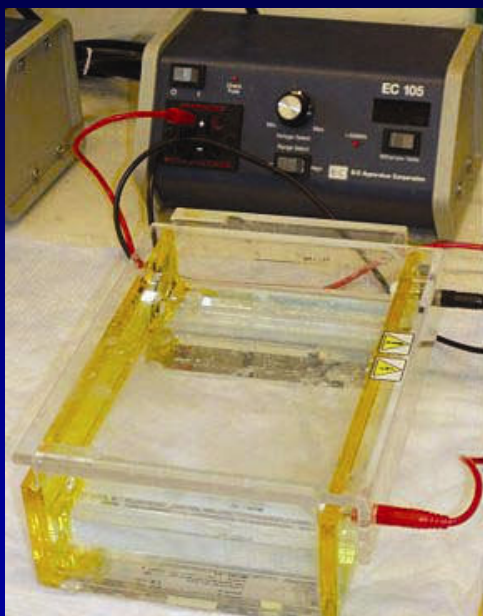
- 1. Prekidanje DNK** na specifičnim mestima restrikcionim nukleazama, što značajno olakšava izolaciju i manipulaciju pojedinačnim genima.
- 2. Kloniranje DNK** uz primenu vektora za kloniranje ili lančane reakcije umnožavanje (polymerase chain reaction –PCR), čime se pojedinačni molekul DNK ili deo DNK može umnožiti nekoliko biliona puta.
- 3. Hibridizacija** nukleinskih kiselina, što omogućava pronalaženje specifične sekvence DNK ili RNK sa velikom preciznošću i osetljivošću na osnovu sposobnosti da veže komplementarnu sekvencu.
- 4. Određivanje sekvence** svih nukleotida u fragmentu prečišćene DNK, što omogućava identifikaciju gena odakle se može odrediti sekvenca AK u proteinu koji taj fragment kodira.
- 5. Istovremeno praćenje nivoa ekspresije svakog gena u ćeliji**, korišćenjem mikročipova koji omogućavaju istovremeno odvijanje desetina hiljada reakcija hibridizacije

# Elektroforeza DNK na gelu agaroze

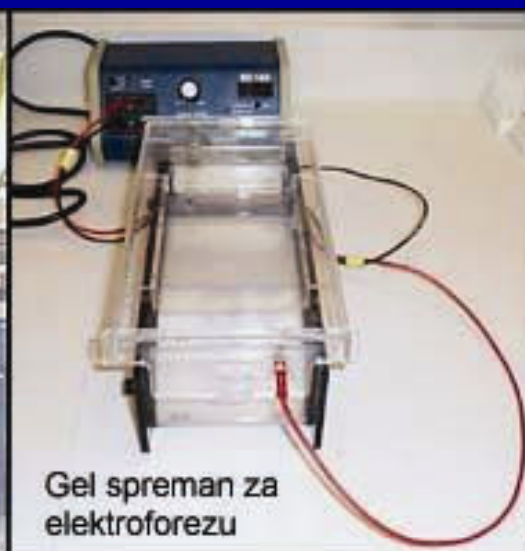
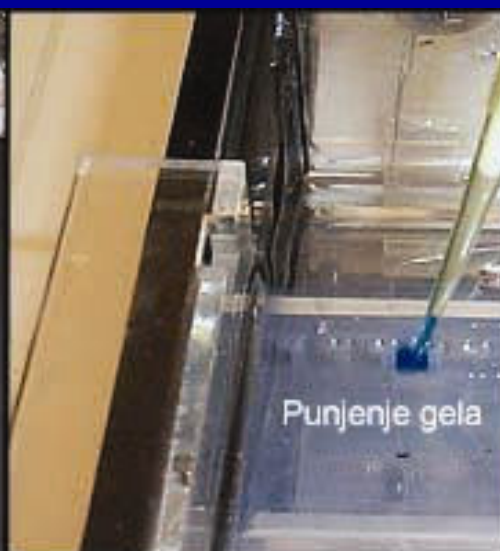
- Gel elektroforeza je metod koji se koristi za razdvajanje makromolekula (na osnovu njihove veličine/oblika i/ili naelektrisanja) na gelu kroz koji se propušta jednosmerna električna struja.
- Elektroforeza na gelu agaroze omogućava razdvajanje fragmenata u opsegu od 0.1-50Kb. Moć razdvajanja zavisi od veličine pora u gelu čija je veličina određena koncentracijom agaroze.



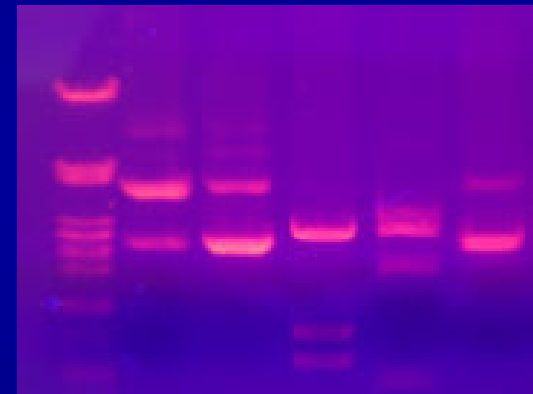
## Napajač i kadica za elektroforezu



## Elektroforeza na gelu agaroze



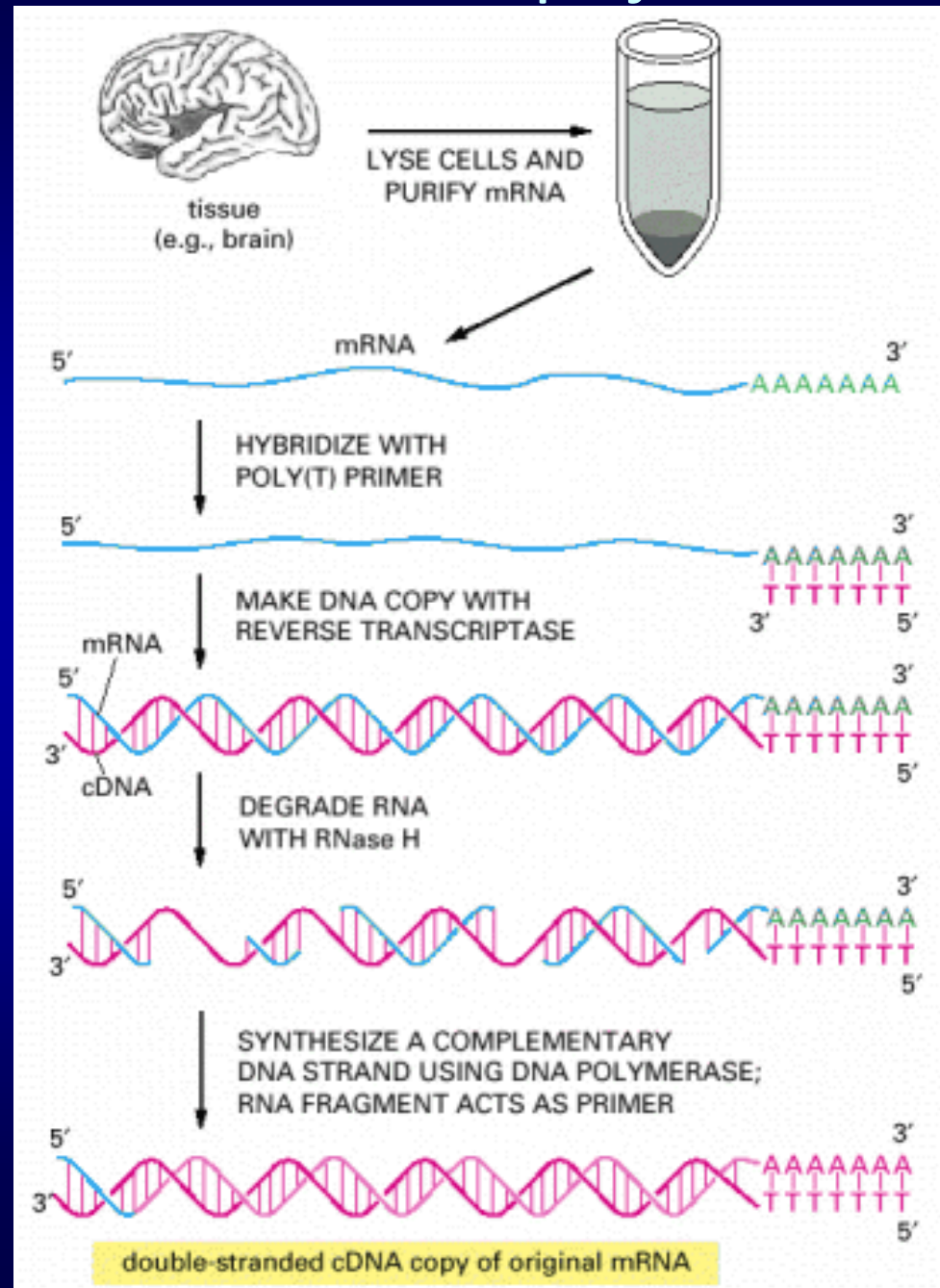
Nakon završetka elektroforeze DNK se vizualizuje pomoću određenih boja koje se interkaliraju u DNK. Najčešće se koristi etidijum bromid (ekscitacija na 302nm) a ređe SYBR green (ekscitacija na 365nm).



Gel agaroze nakon bojenja etidijum bromidom

# Dobijanje DNK reverznom transkripcijom

Ukoliko izolujemo iRNK, ona može biti matrica za enzim reverznu transkriptazu, koja sa njega kopiju DNK (cDNA). Ova DNK ne sadrži introne





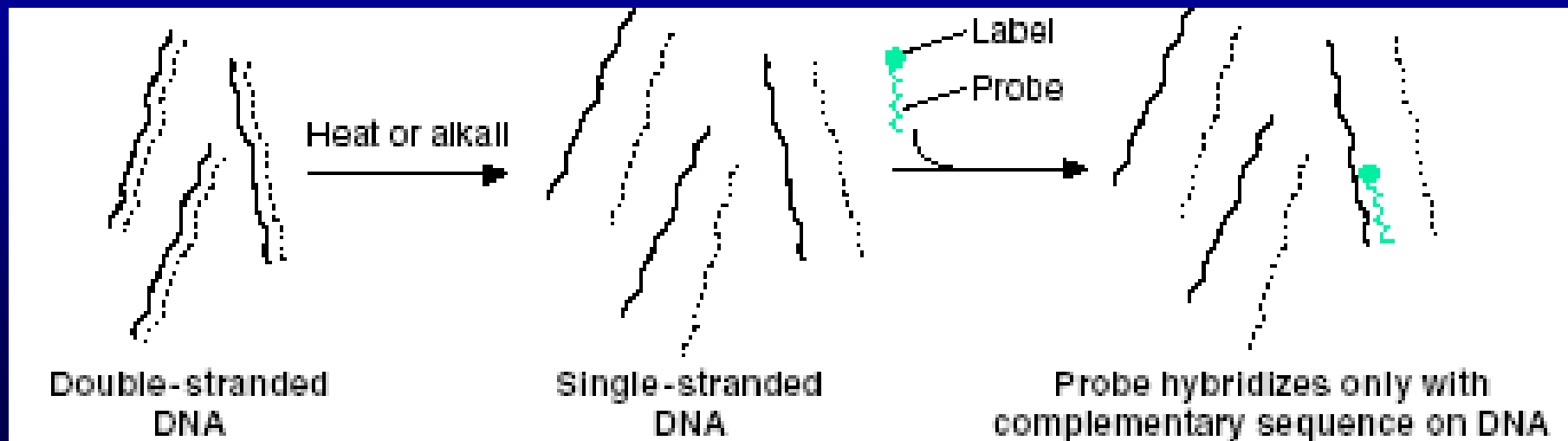
# Tehnike za identifikaciju sekvence DNK

## 1. Hibridizacija

Primena proba – jednolančane DNK ili RNK sekvence koje se vezuju za komplementarnu sekvencu na većem jednolančanom DNK ili RNK molekulu (hibridizacija).

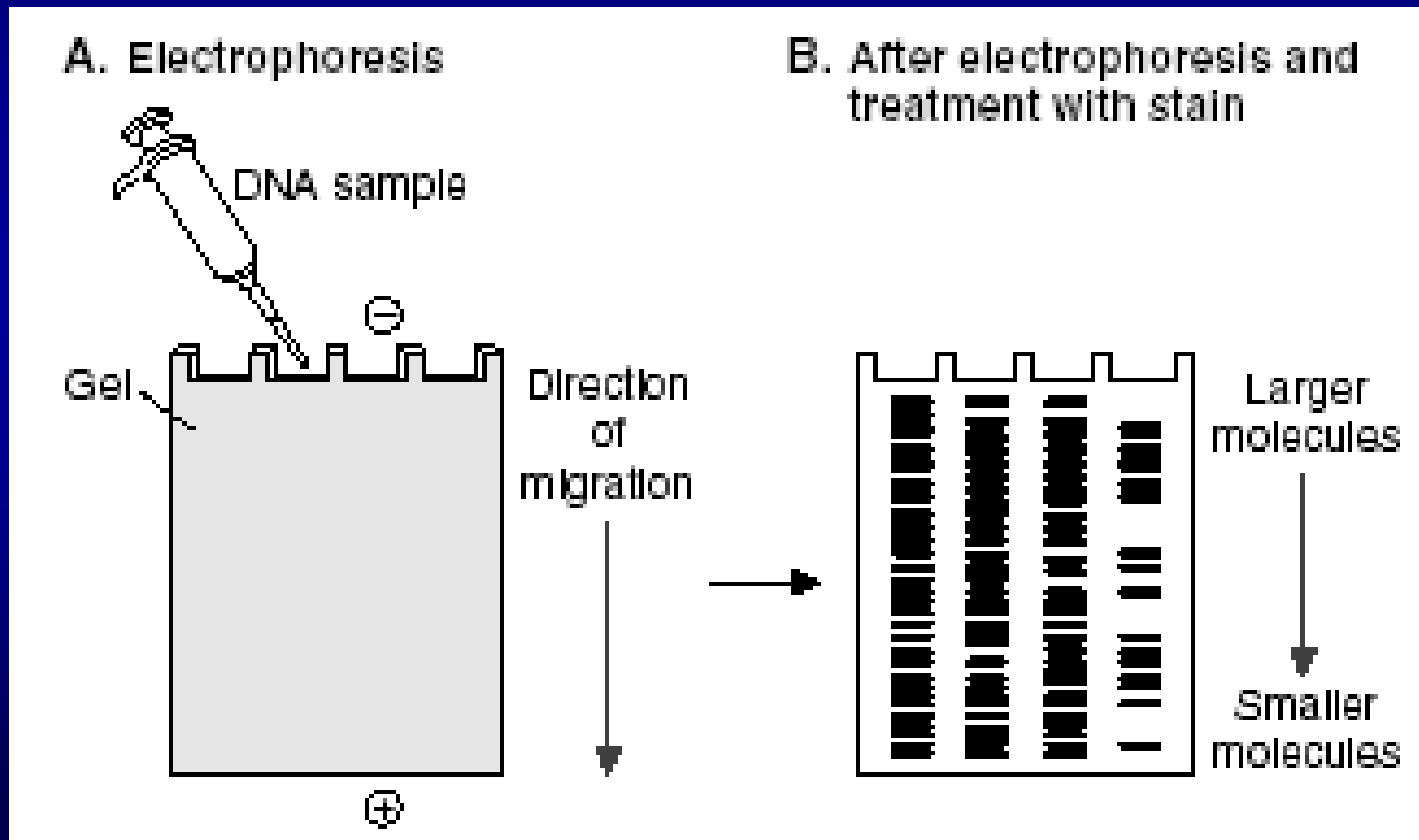
Proba može biti sačinjena od cDNK, fragmenata genomske DNK ili hemijski sintetisanih oligonukleotida

Proba je uvek obeležena (radioaktivnim fosforom, fluorohromom)

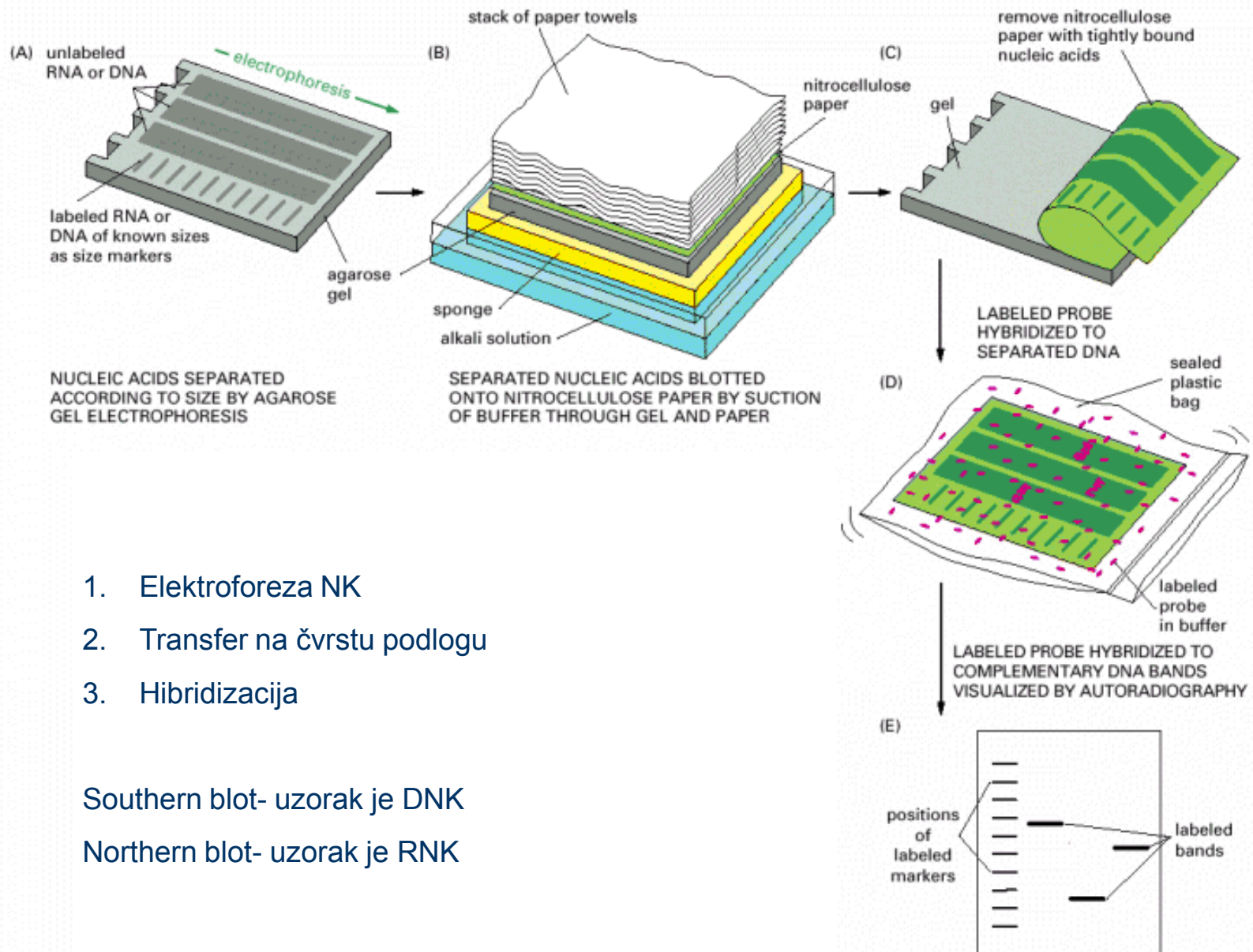


## 2. Elektroforeza na gelu

Molekuli (fragmenti) se razdvajaju u električnom polju na osnovu veličine. DNK se kreće ka pozitivnoj elektrodi



# 3. Detekcija specifičnih DNK sekvenci



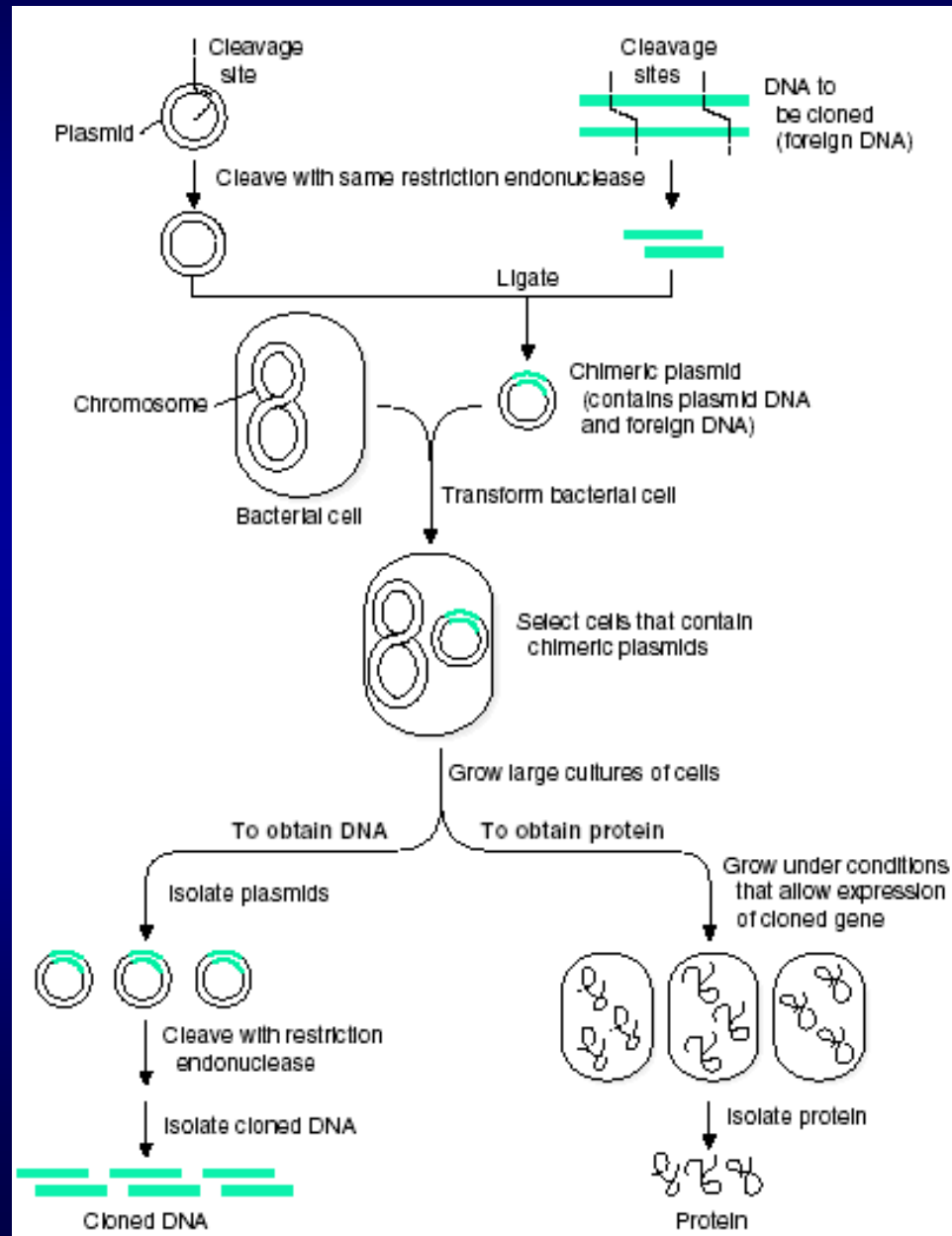
1. Elektroforeza NK
2. Transfer na čvrstu podlogu
3. Hibridizacija

Southern blot- uzorak je DNK

Northern blot- uzorak je RNK

# Tehnike za amplifikaciju sekvence DNK

## 1. kloniranje



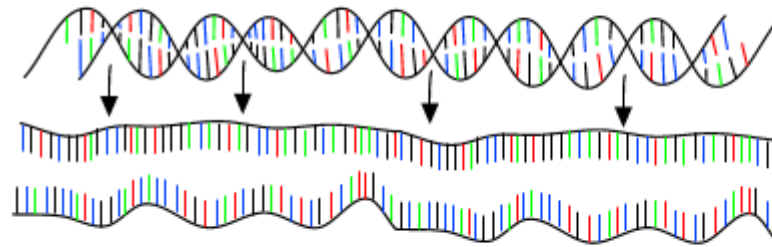
## 2. Reakcija lančanog umnožavanja (engl. polymerase chain reaction, PCR)

- Tehnika koja se koristi za enzimsko umnožavanje DNK fragmenata in vitro.
- Tokom umnožavanja DNK fragment se eksponencijalno umnožava tako da se od početnih nekoliko kopija dobija fragment koji je umnožen nekoliko miliona puta.
- Enzimi koji se koriste za umnožavanje su termostabilne DNK polimeraze koje kao gradivni materijal koriste dezoksinukleotid trifosfate (dNTP).
- Početak sinteze komplementarnog lanca je određen oligonukleotidom koji se vezuje za taj lanac a termostabilna DNK polimeraza ga zatim izdužuje ugrađujući nukleotide tako da se dobija komplementarni lanac DNK.

- Da bi se oligonukleotidi (prajmeri) vezali za komplementarne sekvence DNK molekula, neophodno je molekul DNK denaturisati, odnosno prevesti ga u jednolančani oblik. To se postiže zagrevanjem reakcione smeše i zbog toga je neophodno korišćenje termostabilnih polimeraza.
- Za uspešan PCR veoma je važan
  - sastav reakcione smeše (sadrži oligonukleotide, dNTP, DNK polimerazu, ciljne DNK sekvence koje se umnožavaju kao druge dodatke od kojih je najvažniji  $Mg^{2+}$ ) kao i
  - temperaturni ciklus kroz koji reakciona smeša prolazi i
  - broj njegovih ponavljanja.

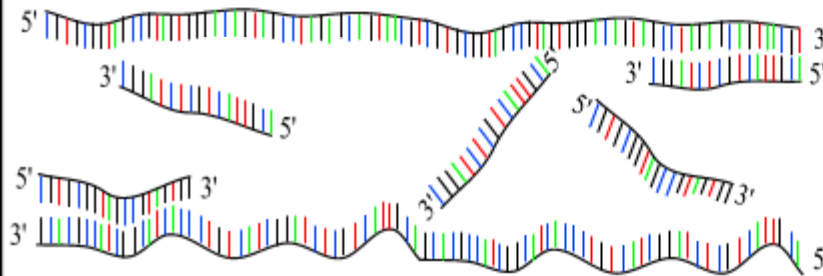
# PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

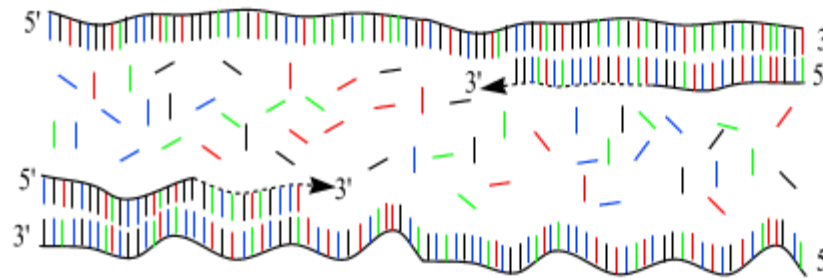
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



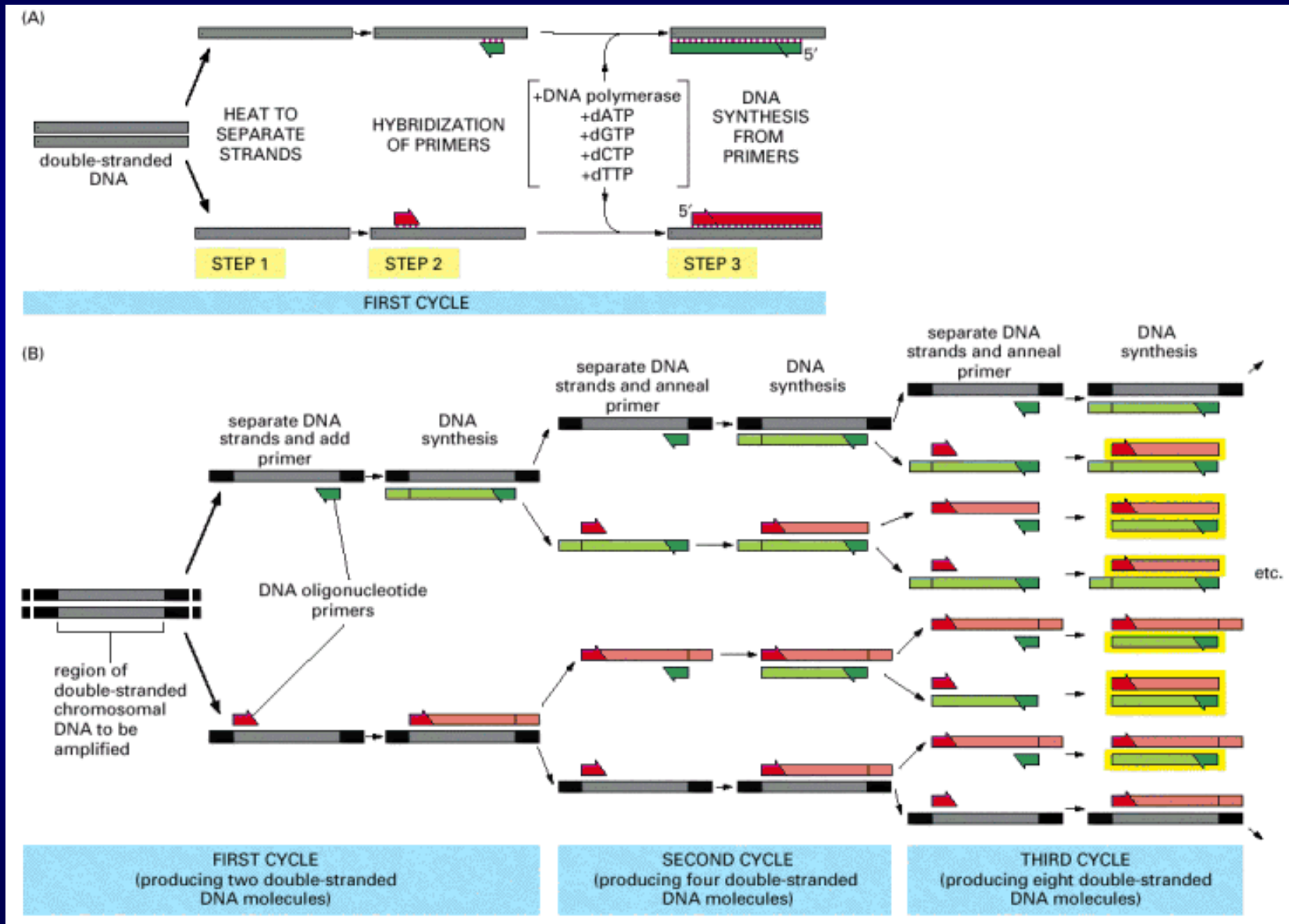
Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

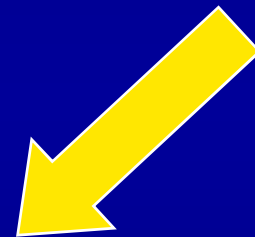
only dNTP's

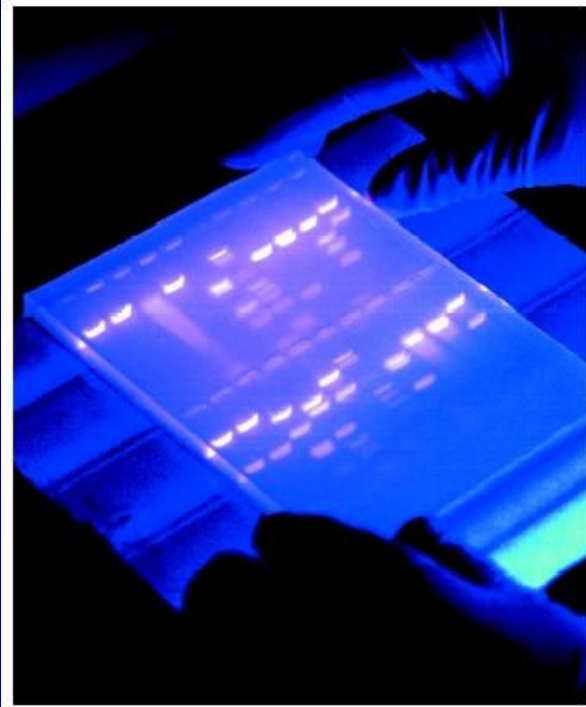
(Andy Vierstraete 1999)

# Lančana reakcija umnožavanja (PCR)

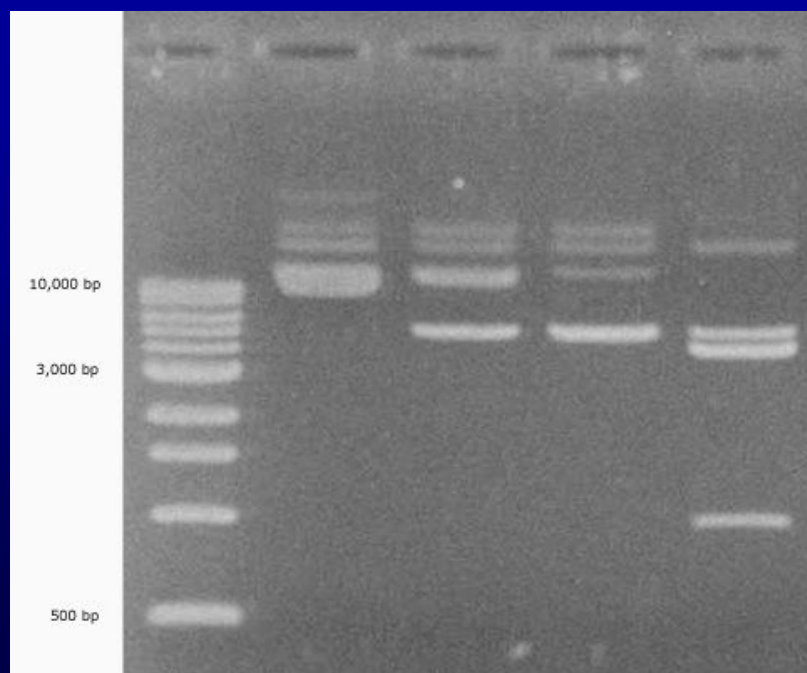
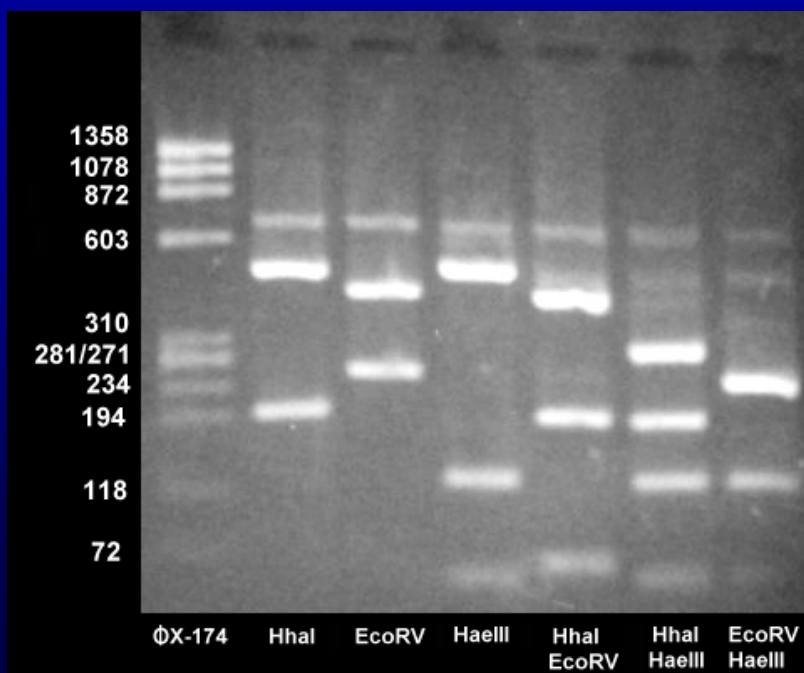








standard



# Pretraživanje baza podataka u cilju pronalazjenja sekvence željenog gena

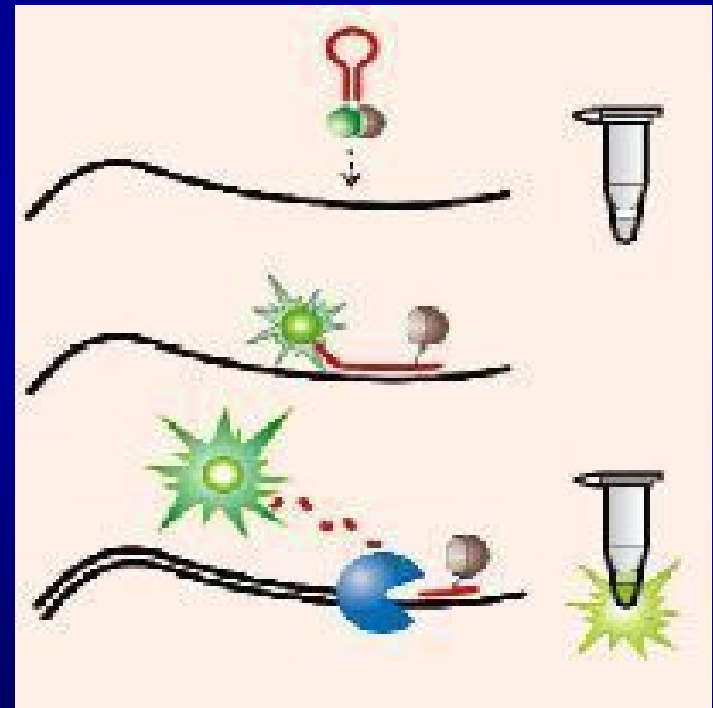
- Da bi umnožili određeni gen moramo da znamo njegovu sekvencu kako bi mogli da dizajniramo i/ili proverimo da li se i kako prajmeri vezuju za tu sekvencu.
- Najbolji način za pribavljanje sekvenci je sa sajta NIH baze  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Nucleotide&itool=toolbar>
- Prajmeri se mogu dizajnirati pomoću softvera koji imaju ugrađene algoritme za selekciju oligonukleotida prema zadatim kriterijumima.

# Real time PCR

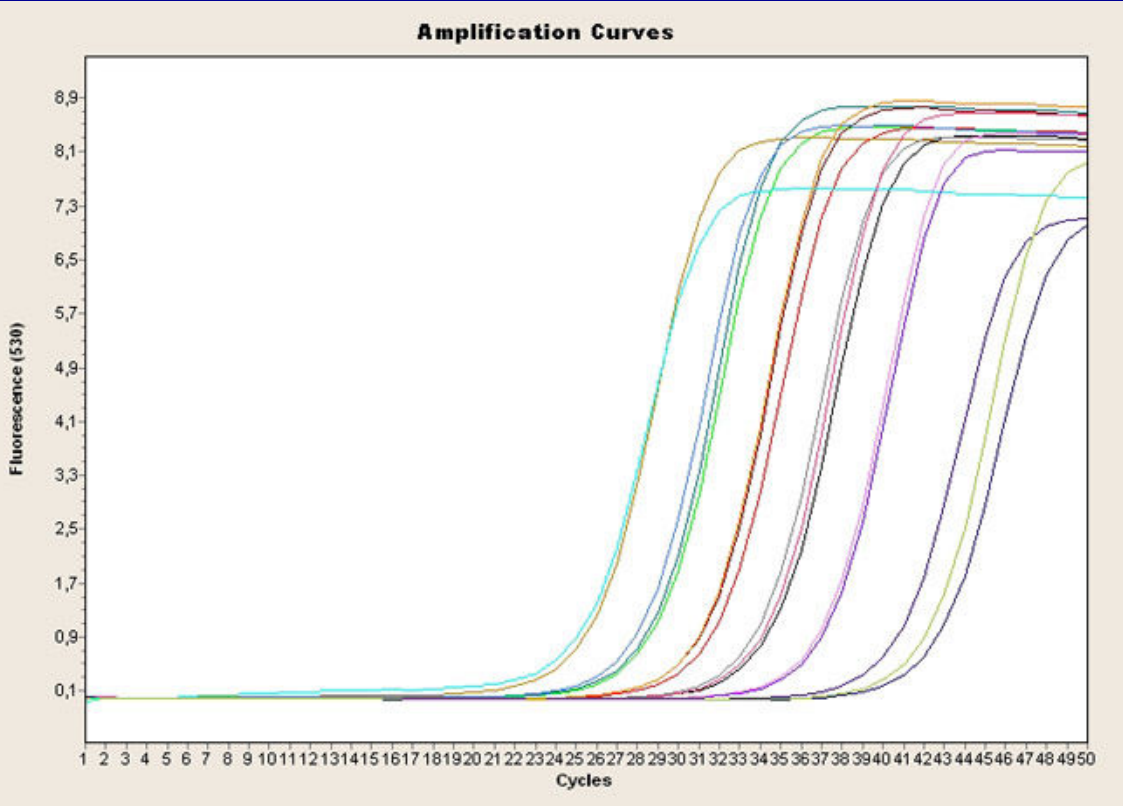
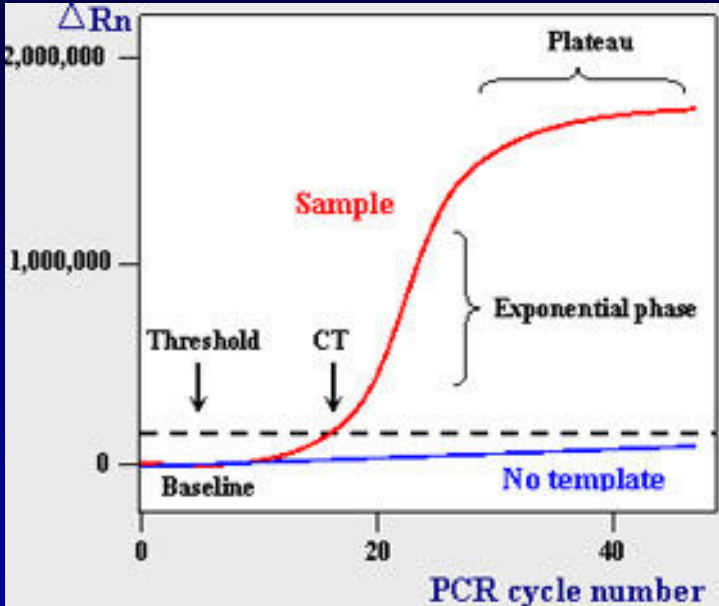
Real time PCR, ili kvantitativni PCR ili kinetski PCR je tehnika koja se bazira na PCR metodologiji koja se koristi za umnožavanje i simultanu kvantifikaciju ciljanog molekula DNK. Ona omogućava i detekciju i kvantifikaciju (kao apsolutan broj kopija ili relativnu količinu normalizovanu prema količini DNK na početku reakcije ili nekog house keeping gena) specifične sekvence uzorka DNK.

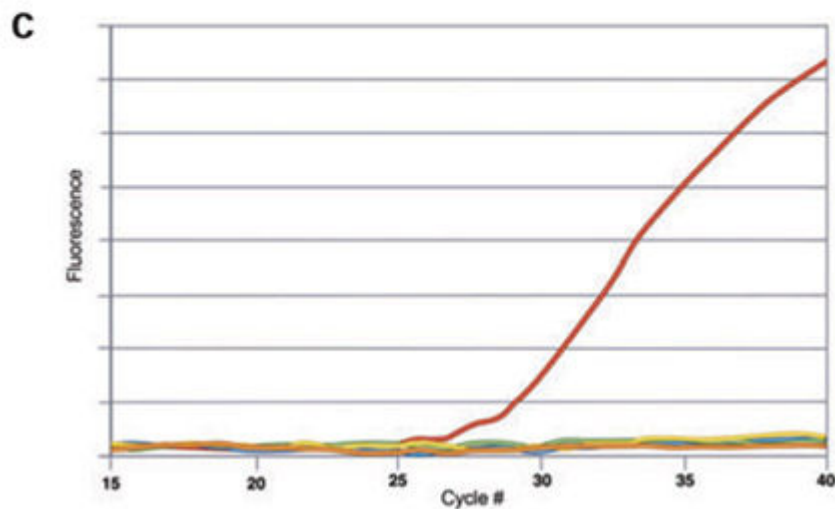
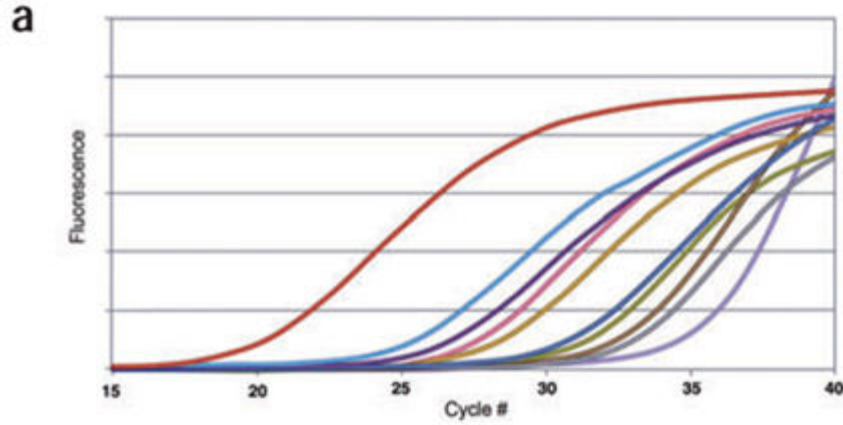
Postupak odgovara principima PCR-a sa razlikom što se amplifikacija DNK prati tokom vremena i kvantifikuje posle svakog ciklusa amplifikacije. Dva metoda koja se koriste za kvantifikaciju su upotreba fluorescentnih boja koje interkaliraju sa dvostrukim helksom DNK ili modifikovane oligonukleotidne probe koje emituju fluorescencu pošto se vežu za komplementarnu DNK.

Nekada se kombinuje sa reverznim PCR (RT PCR) (kvantifikacija relativne ekspresije gena u određenom vremenu).



# Real time PCR





Amplifikacione krive real time PCR-a

Gel-elektroforeza krajnjeg proizvoda umnožavanja dobijenog u analizi

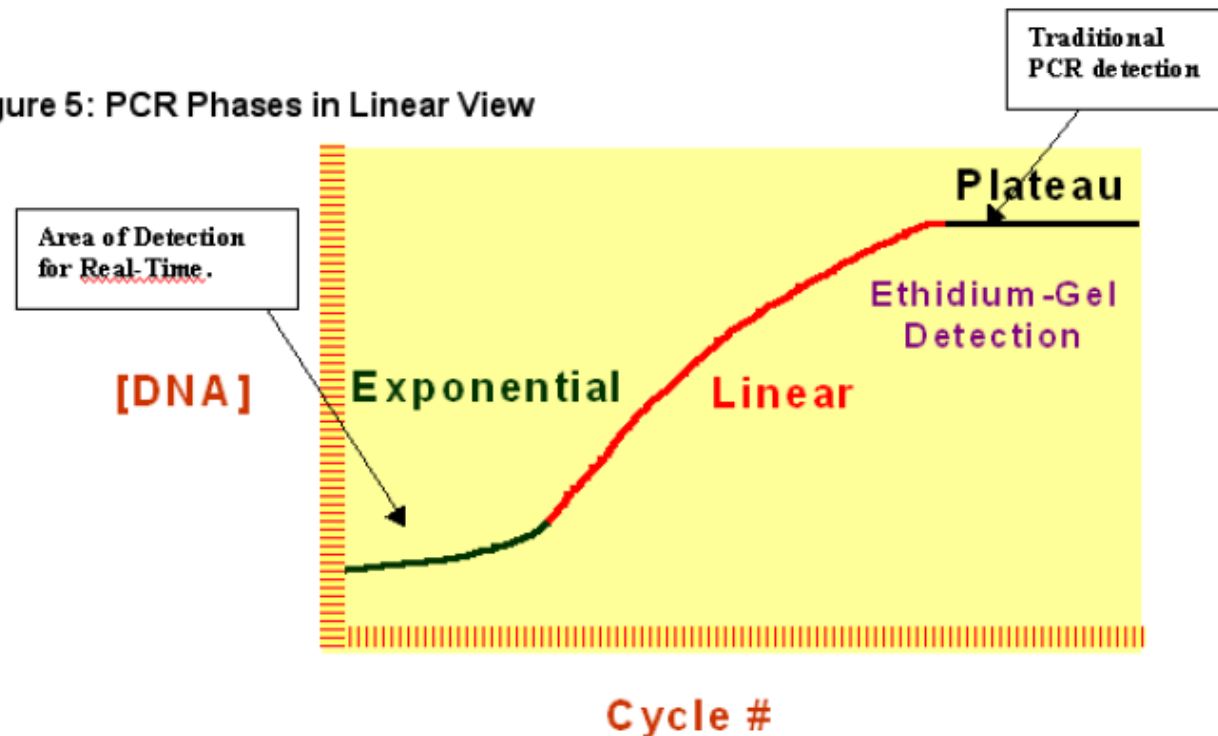
Specifičnost analize: proba korišćena u analizi emituje fluorescencu vezana za specifičnu ciljnu sekvencu dok nema emitovanja signala u slučaju nekomplementarnog povezivanja.

# PCR i real time PCR

Tradicionalni PCR detektuje krajnju tačku reakcije dok real time PCR detektuje ceo tok reakcije amplifikacije.

Real-Time proces omogućava detekciju tokom ranih faza amplifikacije a obezbeđuje i upoređivanje i razlikovanje veoma finih razlika u ekspresiji (tradicionalni PCR na agaroznom gelu- uočljiva razlika mora biti veoma velika).

Figure 5: PCR Phases in Linear View



# Primena u lečenju i prevenciji bolesti

Primena u proizvodnji vakcina (hepatitis B)

Dobijanje proteina koji se koriste u terapiji (insulin, hormon rasta, faktor VIII, tkivni aktivator plazminogena, eritropoetin, faktori rasta u hematologiji, rekombinantni interferoni)

Genetsko savetovanje

Genska terapija

Transgene životinje



# Klinička primena

**Polimorfizmi**, nasleđene razlike u redosledu baza u DNK, su vrlo brojni u ljudskoj populaciji, i mnoge alteracije u sekvenci DNK se povezuju sa različitim oboljenjima.

- Testovi na varijacije u sekvenci DNK su osetljiviji od većine drugih tehnika (npr. enzimskih eseja) i omogućavaju prepoznavanje oboljenja u ranijem stadijumu.
- Ovim testovima se takođe mogu identifikovati nosioci naslednih bolesti tako da im se može pružiti genetičko savetovanje.
- **DNK “fingerprinting”** (analiza razlika u sekvencama DNK) se može koristiti da bi se odredio stepen srodstva ili u identifikaciji.

- Nasledne bolesti predstavljaju fenotipske posledice oštećenih gena.
- Oštećenje gena može biti posledica novonastale mutacije ili, mnogo češće, nasleđivanjem od ranije prisutnih mutiranih genskih alela.
- Prvi korak u odgonetanju uzroka naslednog poremećaja je identifikacija gena koji je odgovoran, kao i proteina koji je njegov proizvod.

# Primeri oboljenja koja nastaju kao posledica genetskog oštećenja

Bolest	Molekulski (ćelijski) deficit	Incidenca
Anemija srpastih ćelija	Abnormalni hemoglobin	1/625 u sub-Saharskoj Africi
Cistična fibroza	Oštećenje kanala za hloride u epitelnim ćelijama	1/2500 u Evropi
Fenilketonurija	Deficit tirozin hidtoksilaze	1/10000 u Evropi
Tay-Sachs- ova bolest	Deficit heksozaminidaze – nagomilavanje sfingolipida	1/1000 u jevrejskoj populaciji u istočnoj Evropi

# Primeri oboljenja koja nastaju kao posledica genetskog oštećenja

Bolest	Molekulski (ćelijski) deficit	Incidenca
Hantingtonova bolest	Oštećenje hantingtina, što dovodi do nastajanja njegovih agregata	1/10000 u Evropi
Hiperholesterolemija	Deficit receptora za LDL	1/122 kod frankofonske populacije u Kanadi
Dišenova distrofija	Oštećenje sitoskeletnog proteina distrofina	1/3500 kod muškaraca
Hemofilija A	Deficit faktora VIII	1-1/10000 kod muškaraca

# Osnovni principi imunohemijskih metoda u laboratorijskoj dijagnostici

# IMUNOTESTOVI SA OBELEŽENIM ANTITELOM ILI ANTIGENOM

Antigen i antitelo mogu se koristiti za međusobnu detekciju i merenje primenom širokog spektra raznih imunotestova za koje je karakteristično da se merenje rezultata testa zasniva na upotrebi reagensa (antigena ili antitela) za koji je vezan odgovarajući obeleživač čija se količina može precizno meriti.

Koriste se različiti obeleživači, kao što su radioaktivni izotopi i enzimi. Radioaktivni izotopi (naročito  $^{125}\text{I}$ ) su već dugo u širokoj upotrebi, ali se sve manje koriste, pre svega zbog rizika po zdravlje i mogućeg radijacijskog oštećenja komponenata u testu.

Sve više se kao obeleživači koriste enzimi. Reč je o enzimima kao što su npr peroksidaza ili fosfataza, koji dejstvom na specifične supstrate daju obojene produkte razgradnje čija se količina može brzo i lako kolorimetrijski meriti. U poslednje vreme se u procesu obeležavanja enzimom sve više koristi sistem avidin-biotin. Avidin je glikoprotein koji se sa izuzetno visokim afinitetom vezuje za biotin (vitamin H). Zbog tako visokog afiniteta, avidin za koji je vezan enzim koristi se za veoma efikasno obeležavanje antitela za koje je vezan biotin.

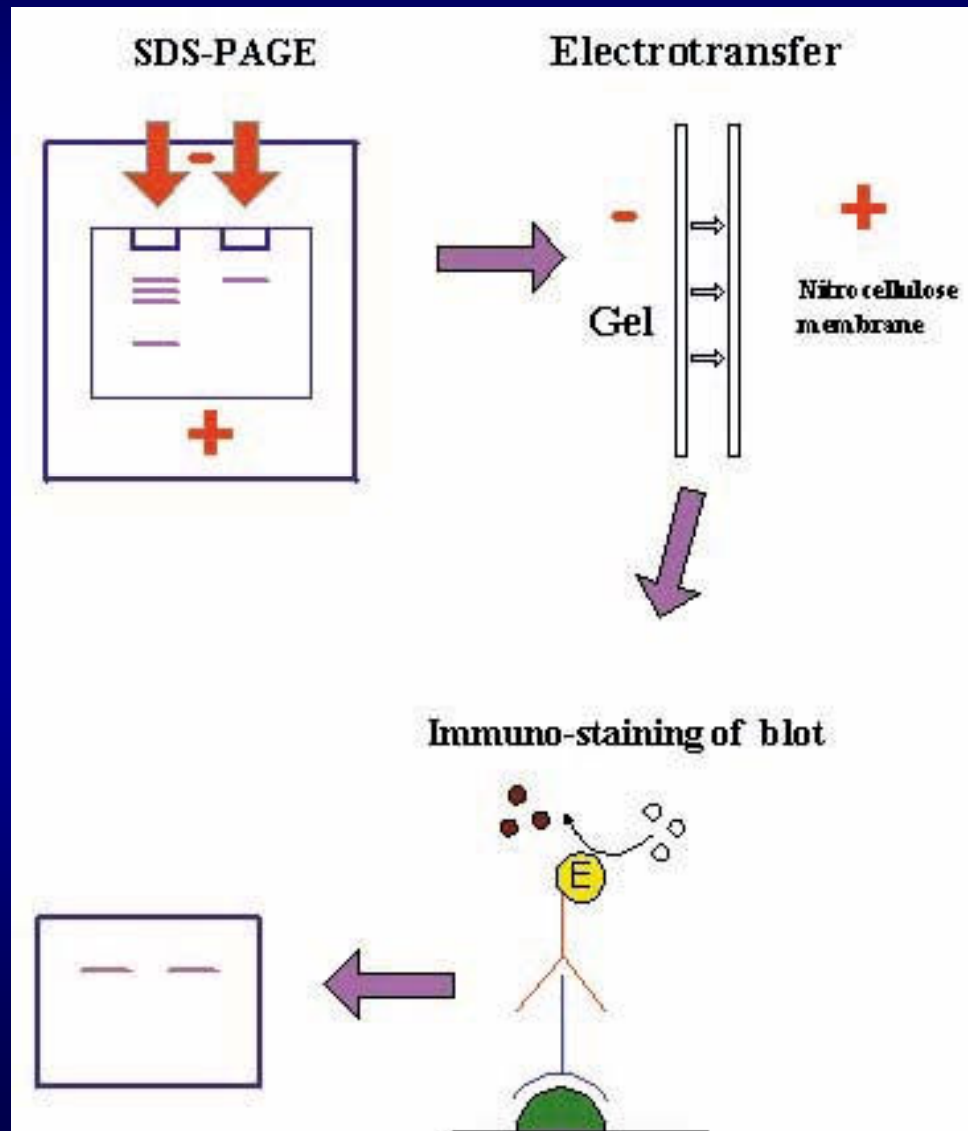
# KVALITATIVNE METODE

**Imunoelektroforeza**- omogućava razdvajanje i identifikaciju različitih proteina koji su prisutni u istom uzorku (mešavina Ag)

**Western Blot (Imunoblot)**- ispitivanje proteina razdvojenih elektroforezom

1. Elektroforeza
2. Transfer na nitroceluloznu/najlon membranu (elektroblot)
3. Inkubacija membrane sa primarnim At za protein od interesa
4. Inkubacija sa sekundarnim At koje je obeleženo enzimom/fluorohromom/luminiscentnim supstratom radi detekcije proteina

# Western Blot ili Immunoblot:





# Zašto analiza proteina?

## **DNK** - geni



- Oko 20,000 gena + regulatornih elementa
- Šta to govori o funkciji i interakciji
- Kako gen vrši funkciju?

## **RNK** - medijator informacije između gena i proteina



- Broj?
- Šta to govori o funkciji i Interakciji
- Kako taj medijator vrši funkciju?

## **PROTEIN** – krajni proizvod genske ekspresije

- Broj? → Sigurno preko 100,000 možda i 200,000
- Izoforme, post-translacione modifikacije, kovalentne i nekovalentne, reverzibilne i ireverzibilne (permenantne)

# Prednost analize proteina u poredjenju sa analizom DNK ili RNK

1. Manje manipulacije uzorkom pre analize
2. Nema potrebe za amplifikacijom početnog uzorka (mali rizik od kontaminacije)
3. Dobijeni podaci su na nivou supstrata, koji je obično predmet delovanja farmakoloških agenasa
4. U zavisnosti od primenjene tehnike, može se istovremeno analizirati od 1 do 20,000 proteina i njihovih modifikacija

# Uzorci:

Uopsteno, za analizu proteina se mogu koristiti tri vrste uzorka:

1. Eksperimentalni sistem ćelijske kulture
2. Mikrobiološki uzorak
3. Uzorak od pacijenta

# WESTERN BLOT

**Western Blot-** je tehnika koja se koristi za dokazivanje prisustva određenog proteina u uzorku a zasniva se na Ag-At reakciji (koriste se At specifična prema željenom proteinu koji predstavlja Ag) kao i kvantifikaciju proteina u uzorku (upotrebom odgovarajućih softverskih denzitometrijskih tehnika).

**Zajedničko ime za niz elektroforetskih procedura koje:**

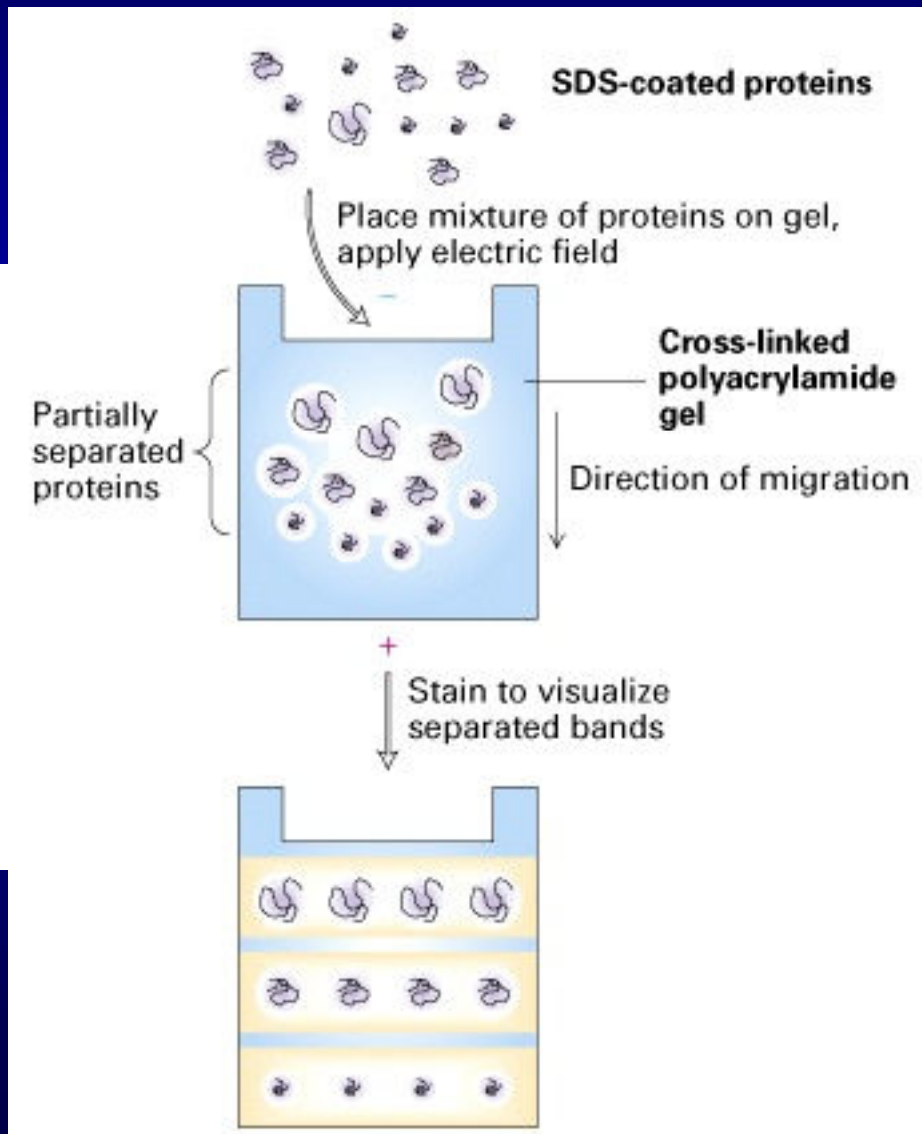
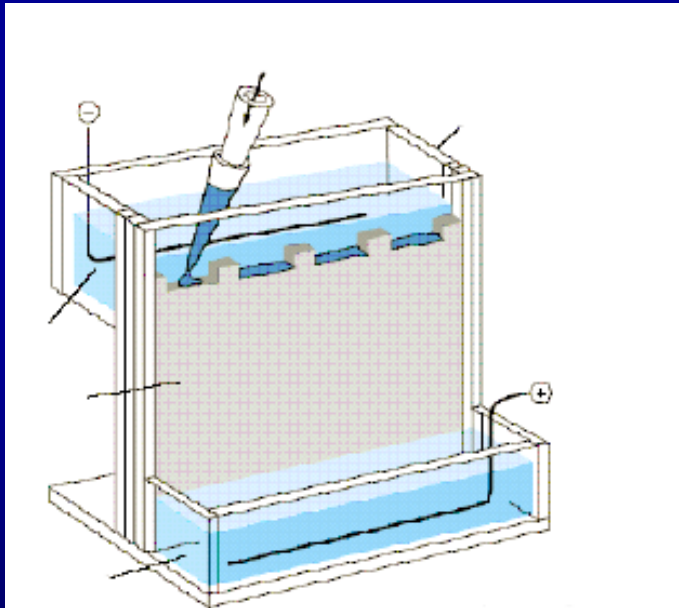
- vrše razdvajanje proteina po veličini
- posle razdvajanja omogućavaju identifikaciju poznatih i nepoznatih proteina od interesa
- omogućavaju kvantifikaciju poznatih proteina
- omogućavaju identifikaciju nepoznatih proteina

# Opšti principi izolacije proteina:

## Priprema Uzorka

- Liziranje ćelija – hipotoni pufer sa deterdžentom (NP40 ili Triton X-100)
- izdvajanje citoplazme centrifugiranjem
- merenje koncentracije proteina (Bradford ili Lowry Assay)
- rastvaranje proteina u puferu
- Zatim separacija proteina na akrilamidnom gelu

# Razdvajanje proteina: PoliAkrilamid Gel Elektroforeza (PAGE)



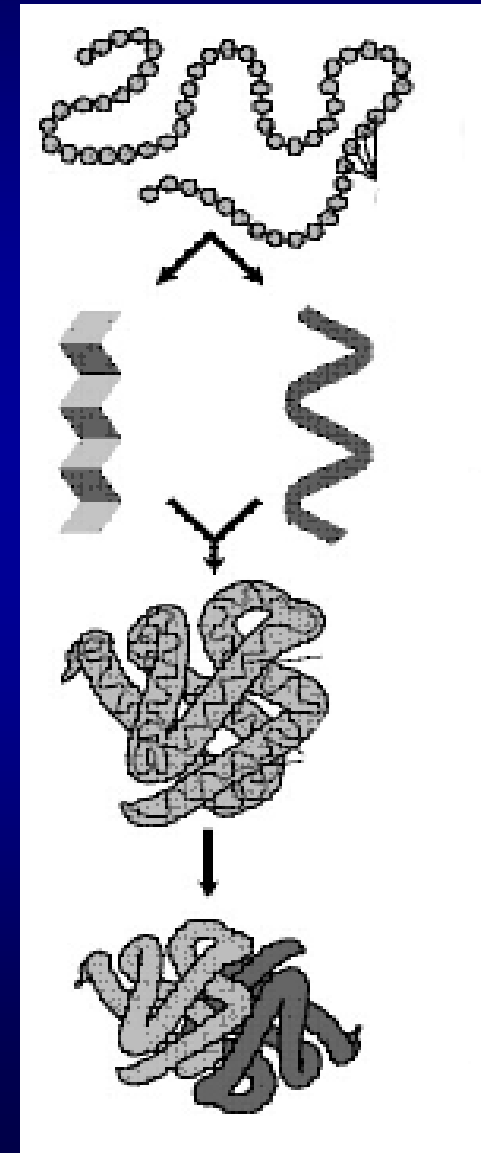
# SDS-PAGE: razdvajanje proteina po molekularnoj masi

**Primarna struktura:** Linearni niz amino kiselina koje su međusobno povezane peptidnim vezama.

**Sekundarna struktura:** Ograničena struktura koja nastaje kada se ne-susedne amino kiseline povežu vodoničnim vezama.

**Tercijerna struktura:** Uvijanje jednog polipeptidnog lanca u globularnu strukturu. Nastalo povezivanjem pojedinačnih udaljenih amino kiselina nekovalentnim vezama i jakim disulfidnim mostovima (S-S).

**Kvaternarna struktura:** Kada je protein izgrađen od više od jednog polipeptidnog lanca.



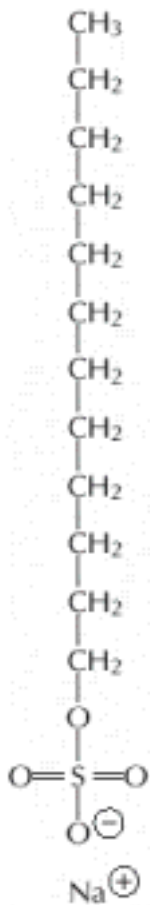
# SDS-PAGE: razdvajanje proteina po molekulskoj masi 1

## SDS:

Deterdžent: Natrijum dodecil sulfat (SDS) se koristi da obloži proteine u rastvoru.

Jedan SDS molekul se vezuje za dve AK u rastvoru.

SDS ima negativno naelektrisanje kojim se neutrališe naelektrisanje proteina tako da razdvajanje proteina zavisi isključivo od njihove mase.



SDS



# SDS-PAGE: razdvajanje proteina po molekulskoj masi 2

## $\beta$ -Merkaptoetanol



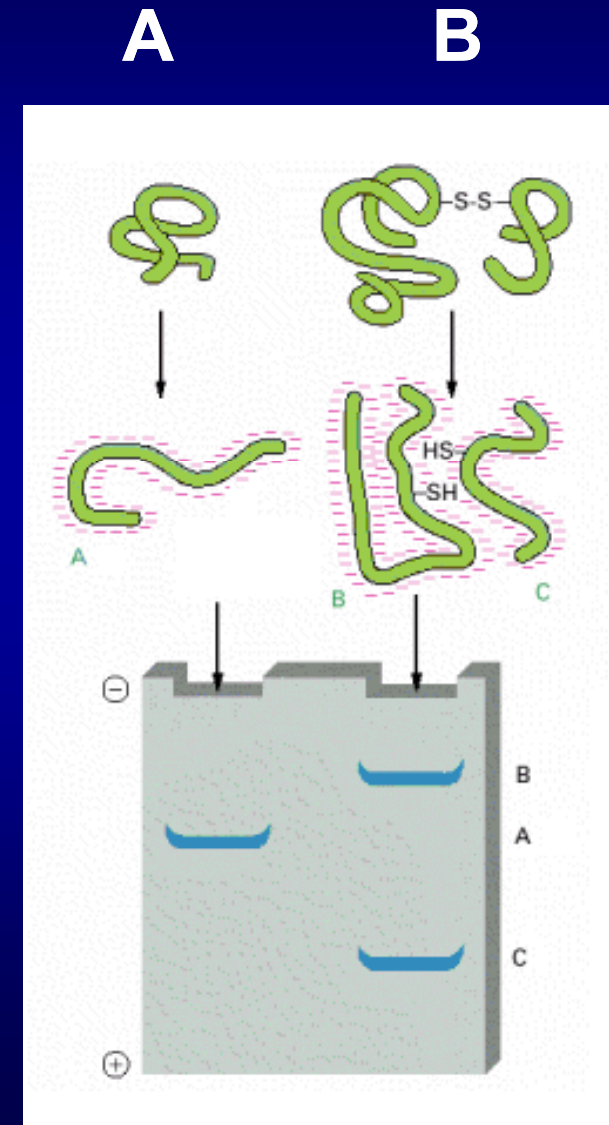
$\beta$ -mercaptoethanol

- Služi kao redukciono sredstvo za disulfidne mostove
- Neophodno sredstvo kad se vrši analiza denaturisanih polipeptida
- Bez  $\beta$ -Merkaptoetanola dimeri spojeni disulfidnim mostovima bi migrirali kao jedan protein čija je masa veća od mase ispitivanog proteina

# SDS-PAGE: razdvajanje proteina po molekulkj masi 3

## KLJUČNI KONCEPT:

- Zbog SDS-a i  $\beta$ -Merkaptoetanol, SDS-PAGE vrši separaciju proteina isključivo na osnovu **molekulske mase** pojedinačnih polipeptida

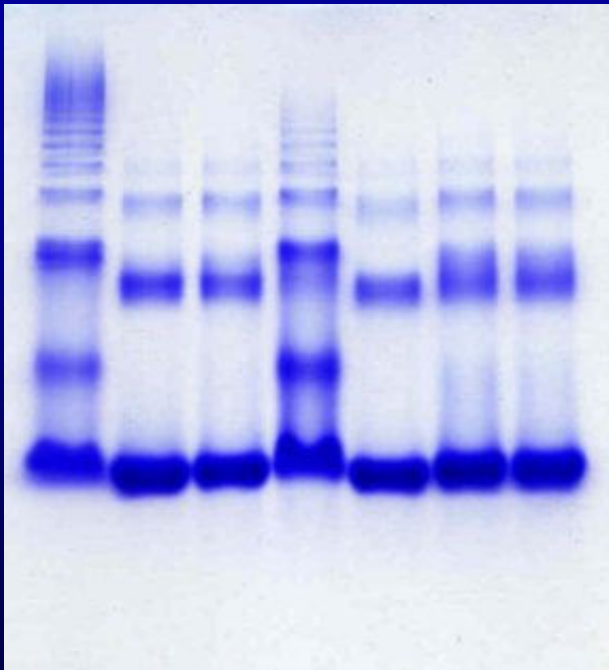


# Vizuelizacija proteina

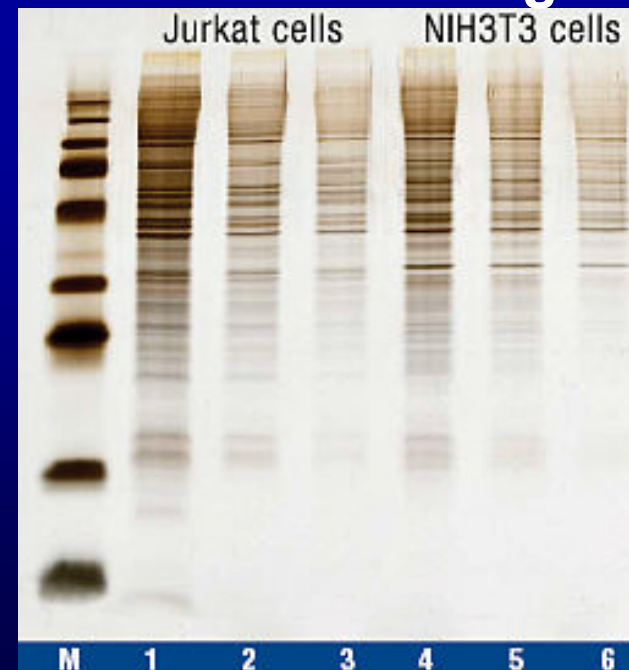
Popularne i jednostavne tehnike za vizuelizaciju proteina u gelu:  
Detekcija svih proteina u uzorku

- **problem**: nespecifičnost i mala senzitivnost

## Coomasie Blue



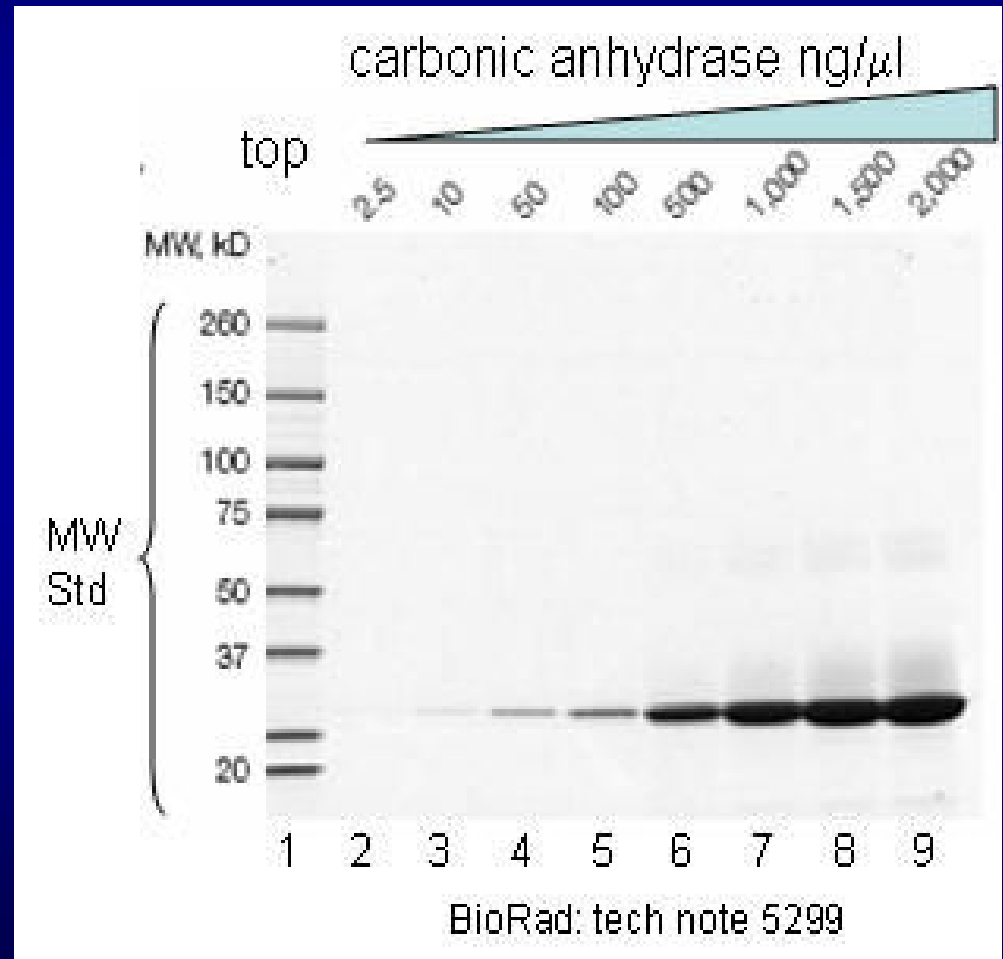
## Silver Staining



# Vizuelizacija proteina

## Western Blotting (Immunoblotting):

- imunodetekcija individualnih proteina
- najsenzitivnija i najspecifičnija metoda



# Western Blot ili Immunoblot:

**Opšti princip:** Imunološka detekcija pojedinih proteina posle separacije uzorka PAGE-om (Nativni PAGE ili SDS-PAGE)

- najčešće upotrebljavana tehnika za detekciju specifičnih proteina u ćeliji
- prednosti i razlozi velike upotrebe Western Blot-a:
  - senzitivnost - 5 pg proteina
  - specifičnost – izoforme proteina, lokalizacija u ćeliji, post-transkripcione modifikacije itd.

# Western Blot ili Immunoblot:

## Postupak:

1. Nativni PAGE ili SDS-PAGE
2. Elektroforetski transfer proteina na nitroceluloznu membranu
3. Blokiranje nespecifičnih interakcija antitela i membrane mlekom
4. Inkubacija membrane sa primarnim (specifičnim antitelom)
5. Ispiranje viška primarnog antitela sa membrane
6. Inkubacija membrane sa sekundarnim antitelom za koje je “prikačen” enzim koji omogućava vizualizaciju lokacije proteina na membrani
7. Vizuelizacija produkta enzimske reakcije posle dodavanja supstrata za enzim (obično hemiluminiscenca)

# Klinička primena Western blot-a

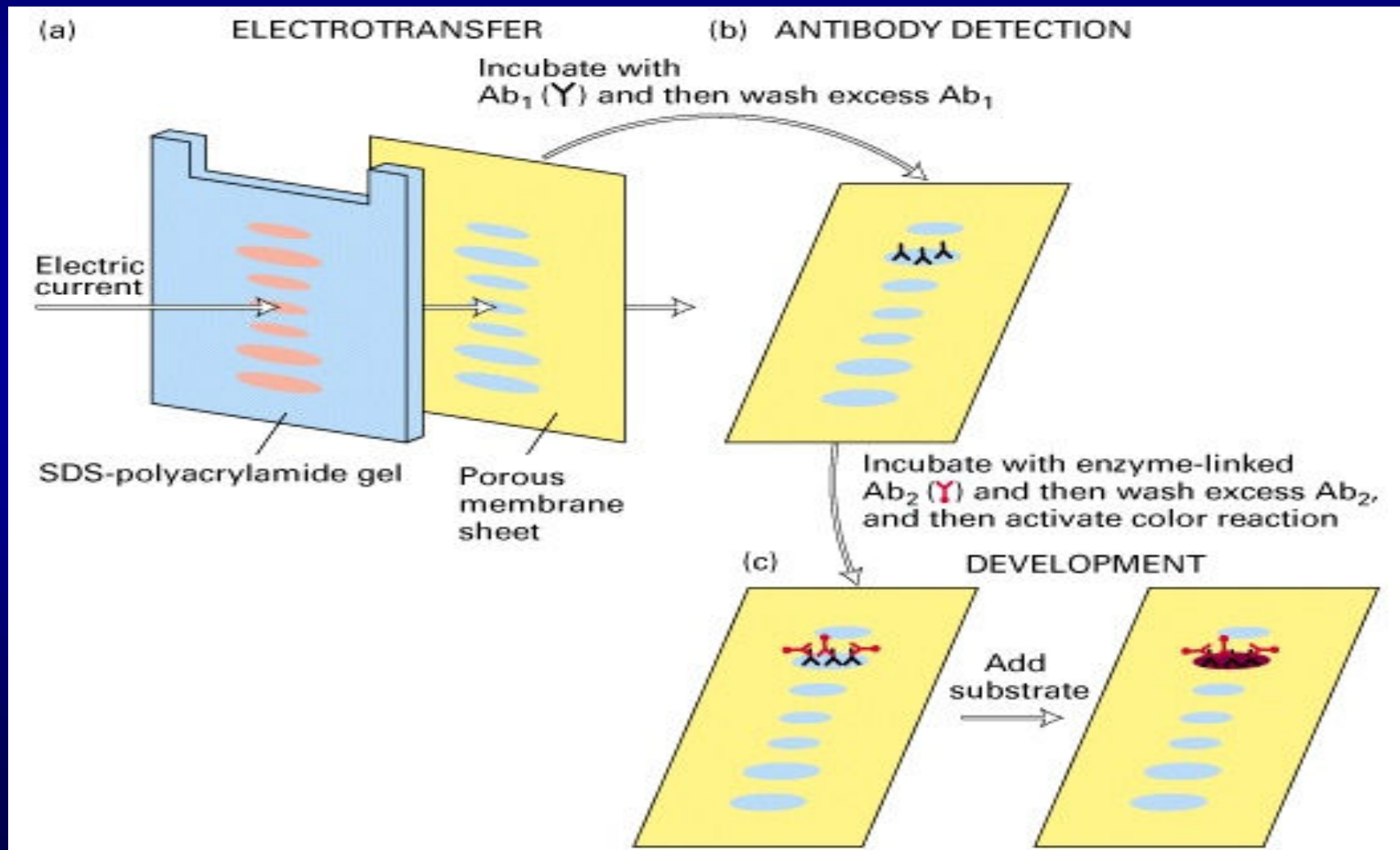
## U dijagnostici:

- **Potvrda prisustva anti-HIV antitela u serumu**

(proteini iz ćelija inficiranih HIV-virusom se razdvoje elektroforezom i prenesu na membranu. Ispitivani serumi se zatim nanesu analogno kao što se na membranu stavlja primarno antitelo; ne-vezano antitelo će se isprati, i dodaje se sekundarno antitelo na humani IgG, za koje je vezan enzim. Trake koje su se obojile pokazuju u kojem od ispitivanih seruma se nalaze antitela na HIV)

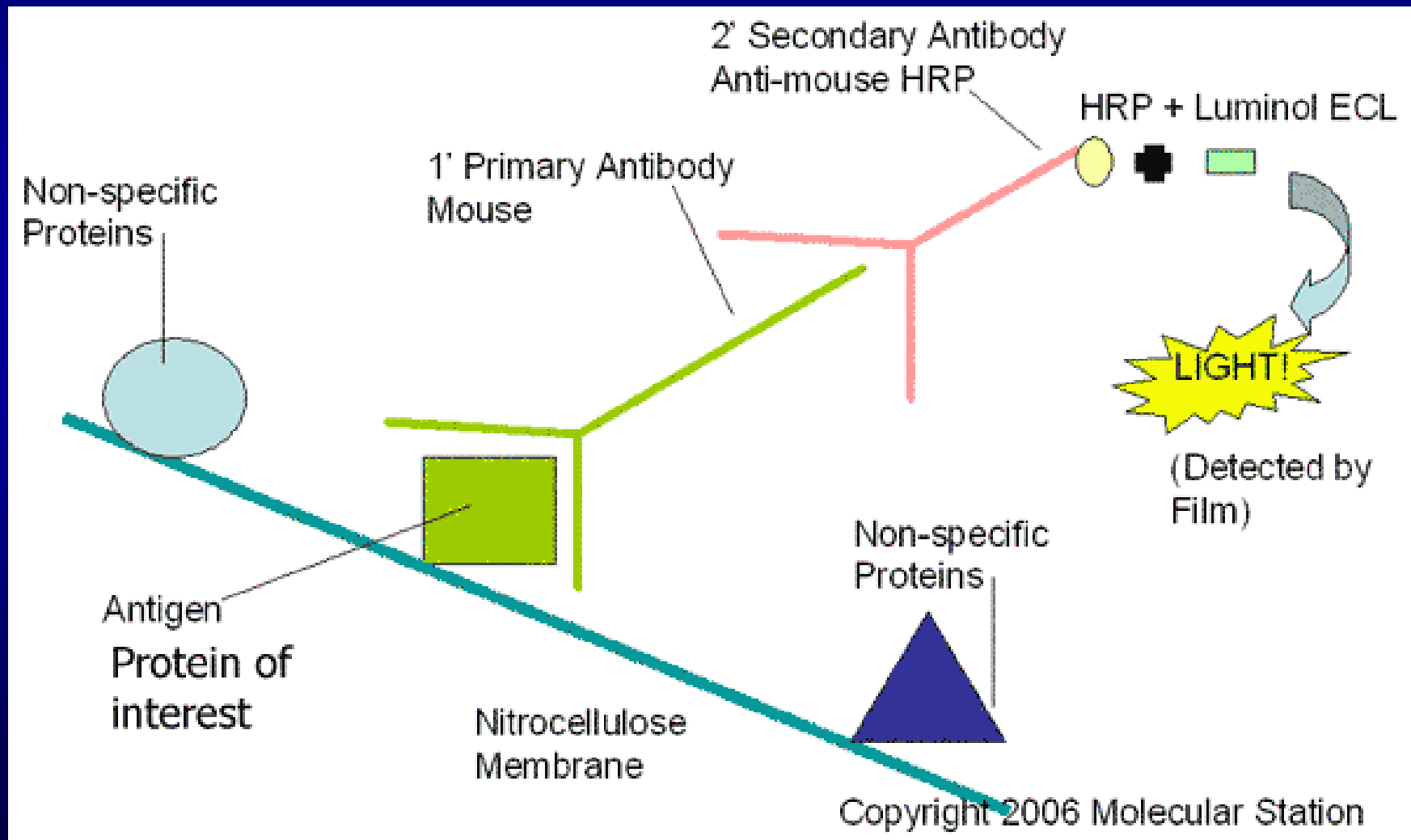
- **U dijagnostici sepse (prokalcitonin i njegovi razgradni proizvodi) –** mada postoje i komercijalni kitovi (enzimski)

# Western Blot ili Immunoblot:





# Western Blot ili Immunoblot:



# Klinička primena Western blot-a

## U dijagnostici:

- Detekcija prisustva C6 peptida *Boreliae burgdorferi* – Lajmska bolest
- Detekcija oligoklonalnih traka porekla imunoglobulina u likvoru (multipla skleroza)
- Definitivna potvrda dijagnoze za prionske bolesti kao što je spongiformna encefalopatija (BSE, 'bolest ludih krava').

## 2D-SDS-PAGE: Razdvajanje proteina po izoelektričnoj tački i molekulskoj masi: 1

Najmoćnija tehnika za razdvajanje proteina zato što:

1. Proteini se prvo razdvajaju izoelektričnoj tački (pI)
2. Zatim se proteini razdvajaju pomoću SDS-PAGE po molekulskoj masi
3. Kombinacija te dve tehnike za separaciju proteina daje takvu rezoluciju da može da se simultano vizuelizuje do 20,000 proteina u nekim uzorcima
  - Realno oko 1,000

## 2D-SDS-PAGE: Razdvajanje proteina po izoelektričnoj tački i molekulskoj masi: 2

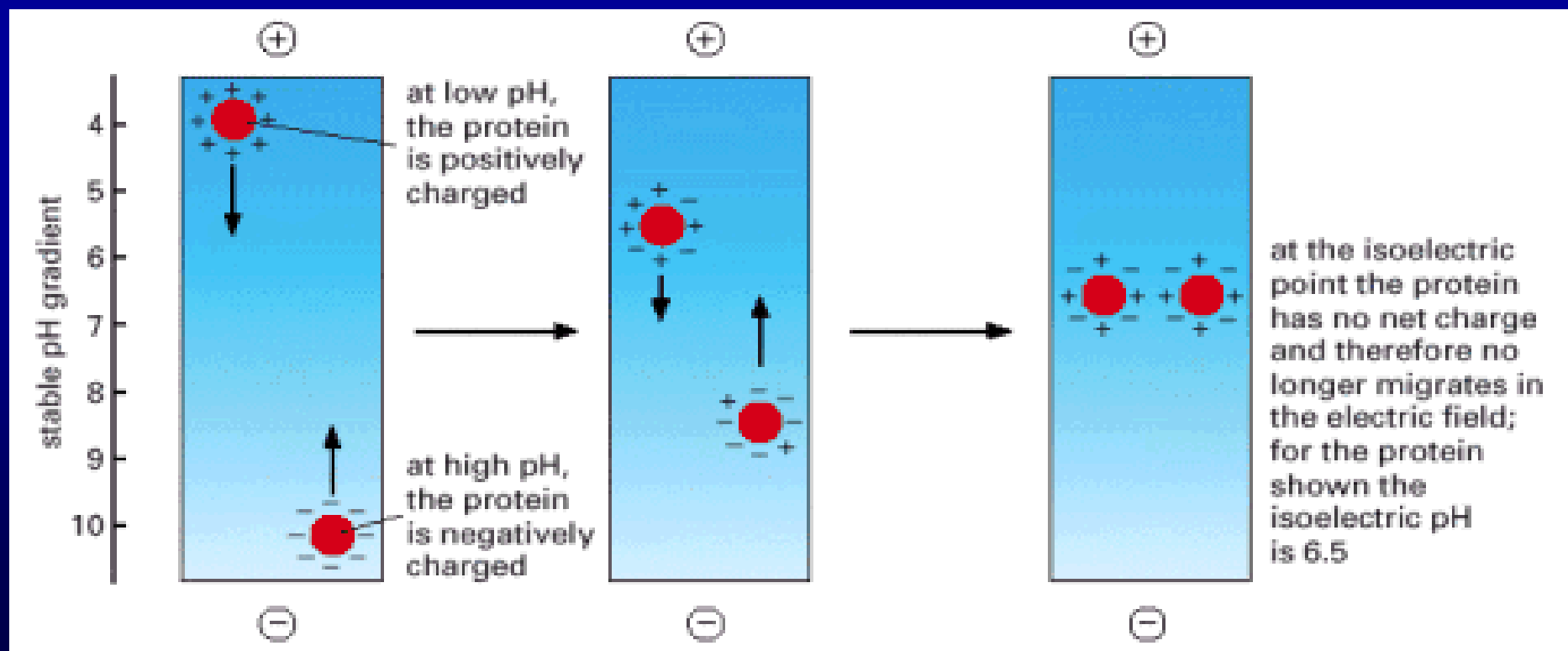
Šta je izoelektrična tacka (pI)?

- pH na kojoj je protein 100% neutralan
- proteini su kompleksni molekuli sa pozitivnim i negativnim nabojem na raznim mestima po dužini niza amino kiselina (npr. serini i glutamati)
- proteini se medjusobno razlikuju po broju i rasporedu pozitivnih i negativnih naboja
- pri pH koji odgovara pI ukupan zbir negativnih i pozitivnih naboja na proteinu je nula
- naboj specifičnih amino kiselina zavisi donekle od pH uslova

# 2D-SDS-PAGE: Razdvajanje proteina po izoelektričnoj tački i molekulskoj masi: 2

**pl u separaciji proteina:** imobilizovani pH gradijenti

- npr. Immobilon gel membrane i izoelektricno fokusiranje
- primer je samo jedan protein, ali naravno u uzorku su na 1000-e
- svaki sa drugačijim pl i molekulskom masom



# IMUNOTESTOVI SA ČVRSTOM FAZOM (RIA i ELISA)

Osnovna karakteristika ovih testova je da je jedan reagens (antigen ili antitelo) nerastvoran, odnosno u čvrstoj fazi (tj. vezan za zid epruvete ili zid bazenčića u polistirenskoj ploči za mikrotitraciju).

Sadržaj antitela u nekom serumu (na primer, autoantitela na DNK kod bolesnika sa sistemskim eritemskim lupusom) može se proceniti na osnovu njihove sposobnosti vezivanja za antigen (DNK) koji je prethodno fizički adsorbovan za zid plastične epruvete ili zidove plastične ploče za mikrotitraciju. Količina vezanih antitela (autoantitela na DNK) može se potom izmeriti dodavanjem radioaktivnim izotopom ( $^{125}\text{I}$ ) ili enzimom obeleženog antitela poreklom od druge vrste (miš, pacov, zec, ovca...), specifičnog za humane imunoglobuline, i merenjem radioaktivnosti, odnosno aktivnosti enzima.

## Enzimski imunotest

Enzimski imunotest - ELISA (*engl.* enzyme-linked immunosorbent assay) predstavlja metod za detekciju i merenje antigena ili antitela u kome se koristi reakcija enzima sa supstratom, a pri čemu enzim služi kao obeleživač. Enzimi se najčešće vezuju za antitela, i to za antitela koja su ili specifična za neki antigen ili za antitela na imunoglobuline (Ig).

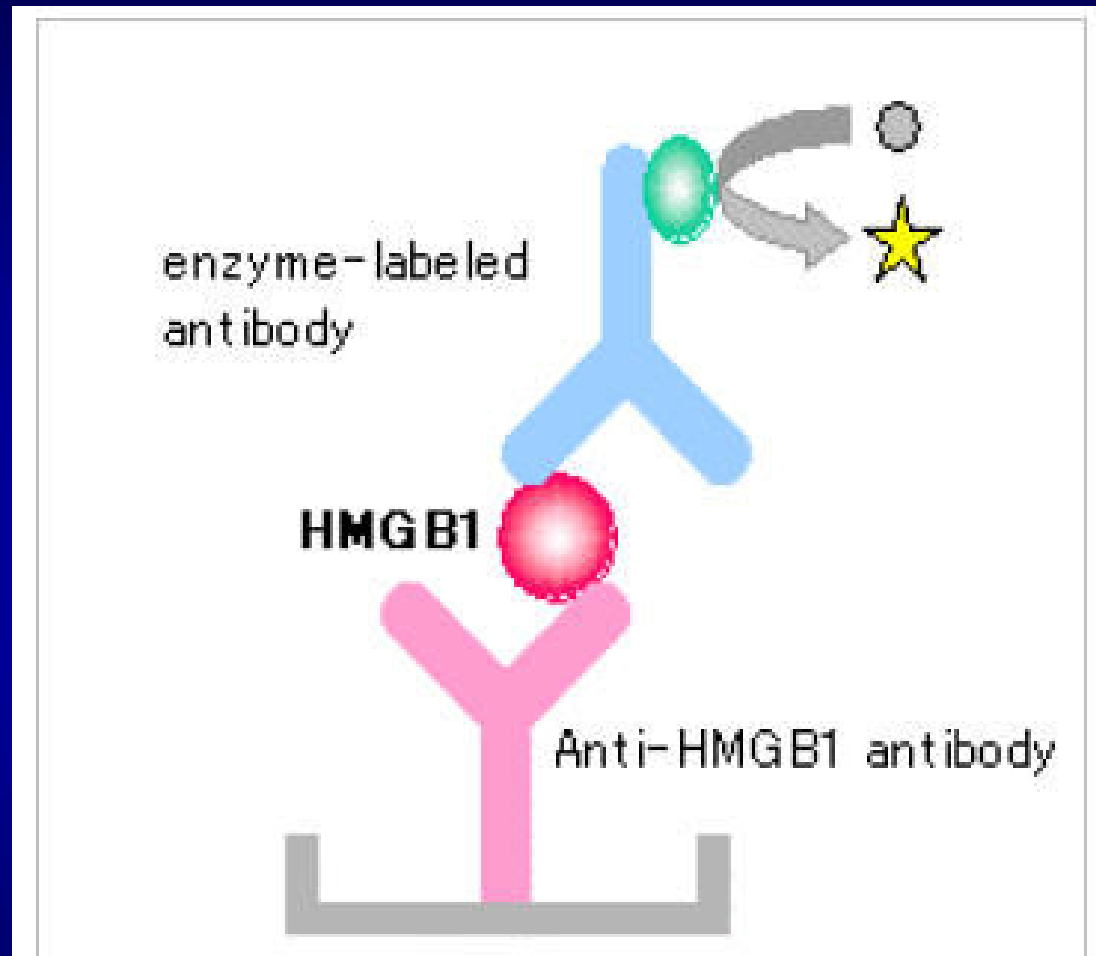
Količina enzima u antigen-antitelo kompleksu određuje se posredno merenjem količine produkta razgradnje odgovarajućeg supstrata koji se unosi u završnoj fazi testa. Koriste se enzimi čiji supstrati daju obojene produkte razgradnje i čija se količina lako može kolorimetrijski meriti. Na primer, enzim alkalna fosfataza i njen supstrat p-nitrofenil fosfat koji razgradnjom daje p-nitrofenol intenzivne žute boje.

U načelu, ELISA je slična radioimunotestovima sa čvrstom fazom. Varijante ELISA tehnike dele se na tehnike u kojima je antigen u čvrstoj fazi i tehnike u kojima je antitelo u čvrstoj fazi.

## Uzorak:

Eksperimentalni uzorak  
ćelijske kulture

Uzorak pacijenta  
(Plazma, Serum, Likvor,  
Urin)



***The HMGB1 ELISA Kit is a 2-step sandwich ELISA.***



# ELISA- Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

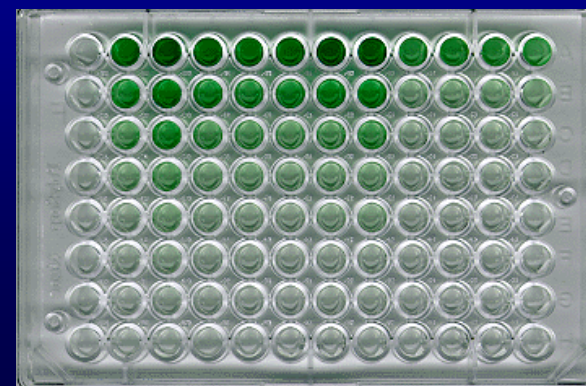
Izvodi se u ploči sa 96 bunara (mikrotitar ploča)

Biohemijsko/imunološka tehnika koja omogućava detekciju antitela ili antigena u uzorku.

Koristi se u dijagnostici .

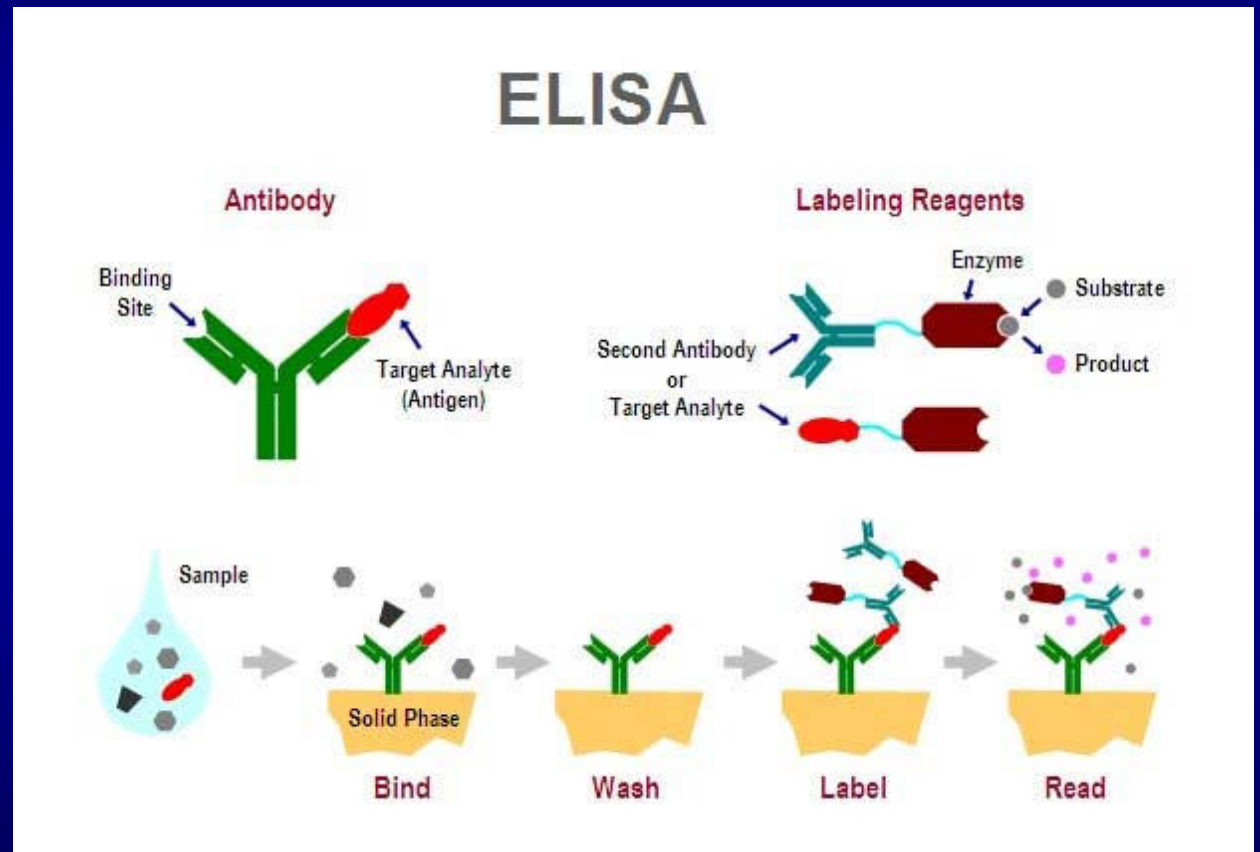
U ELISA dolazi do reakcije Antitelo-Antigen-Antitelo kojom se detektuje i kvantifikuje antigen prisutan u uzorku. Ukoliko je sekundarno antitelo vezano za enzim detekcija se završava dodavanjem enzimu specifičnog supstrata kako bi se razvila boja čija se apsorbanca očitava na automatskom ELISA čitaču (spektrofotometru). Sekundarno antitelo može biti konjugovano i sa nekim fluorohromom pri čemu se detekcija završava merenjem intenziteta fluorescence.

Izvođenje ELISA testa podrazumeva korišćenje jednog primarnog antitela koje je specifično za ispitivani antigen.



# Postupak izvođenja ELISA metode:

1. Nanošenje uzorka na ploču koja sadrži odgovarajuće primarno antitelo- inkubacija
2. Pranje
3. Nanošenje sekundarnog antitela (obeleženo sa enzimom ili fluorohromom)- inkubacija
4. Pranje
5. U slučaju korišćenja sekundarnog antitela obeleženog supstratom, nanošenje odgovarajućeg supstrata- inkubacija za razvijanje boje
6. Prekidanje enzimske reakcije



# Shematski prikaz ELISA metode

