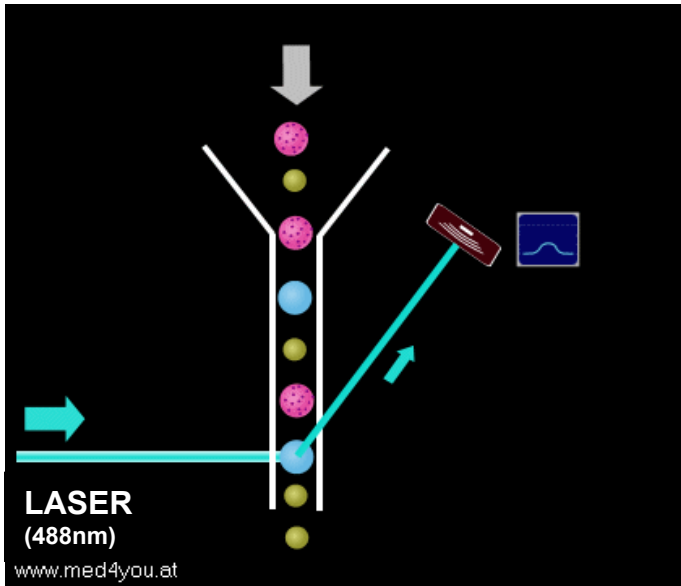


Immunológiai módszerek a klinikai kutatásban

9. előadás

Celluláris immunológiai
módszerek

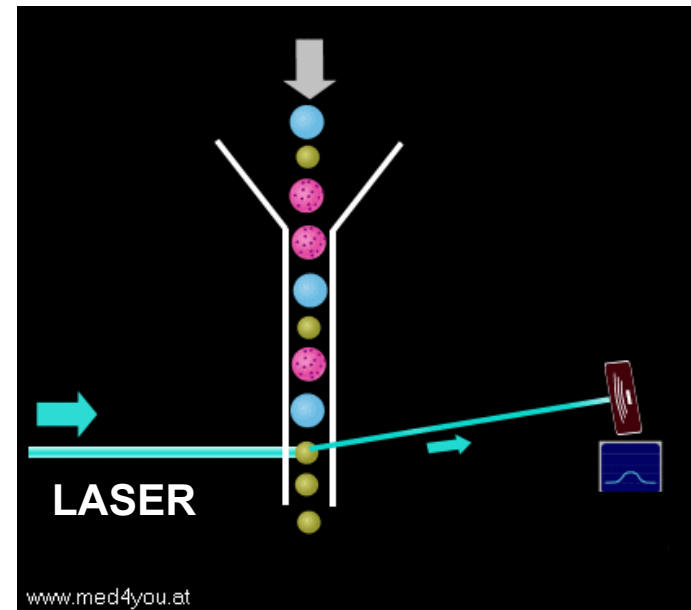
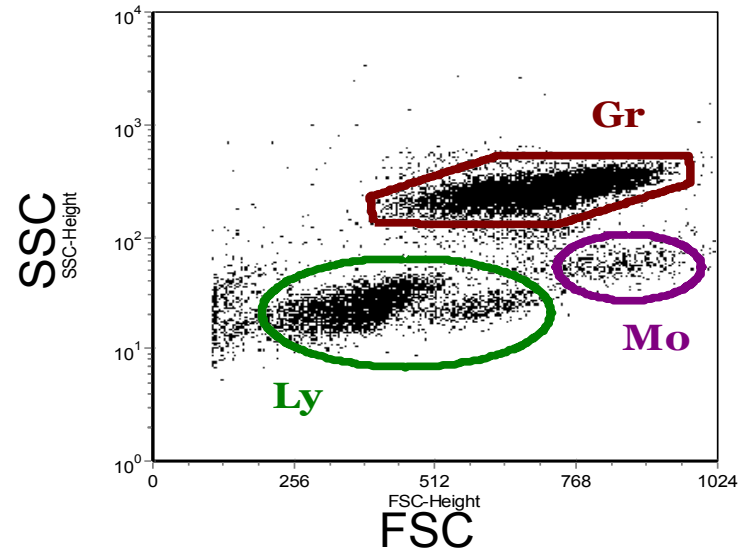
Áramlási citometria



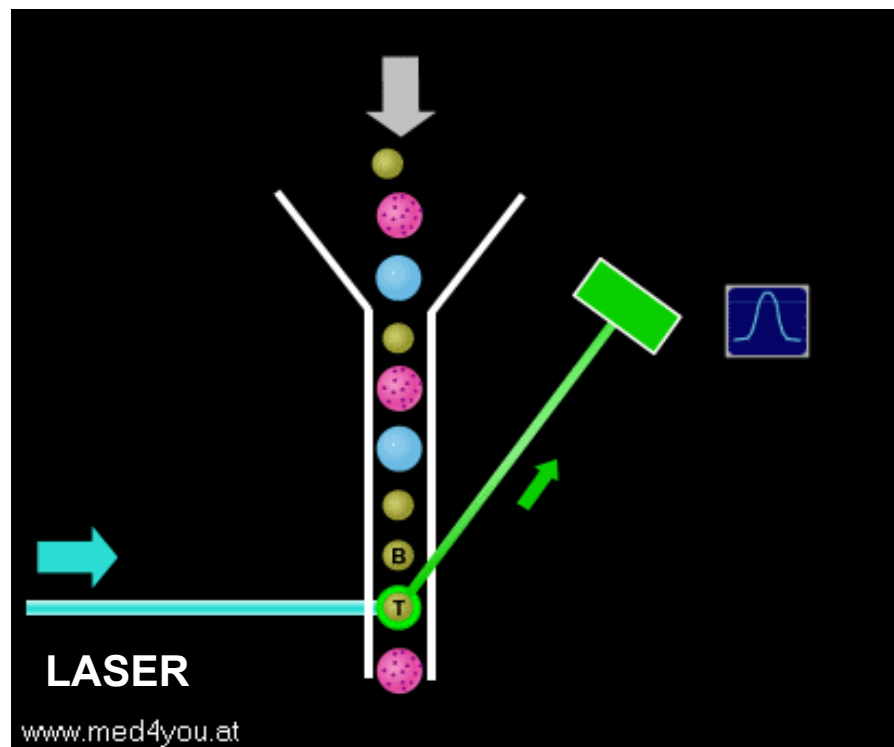
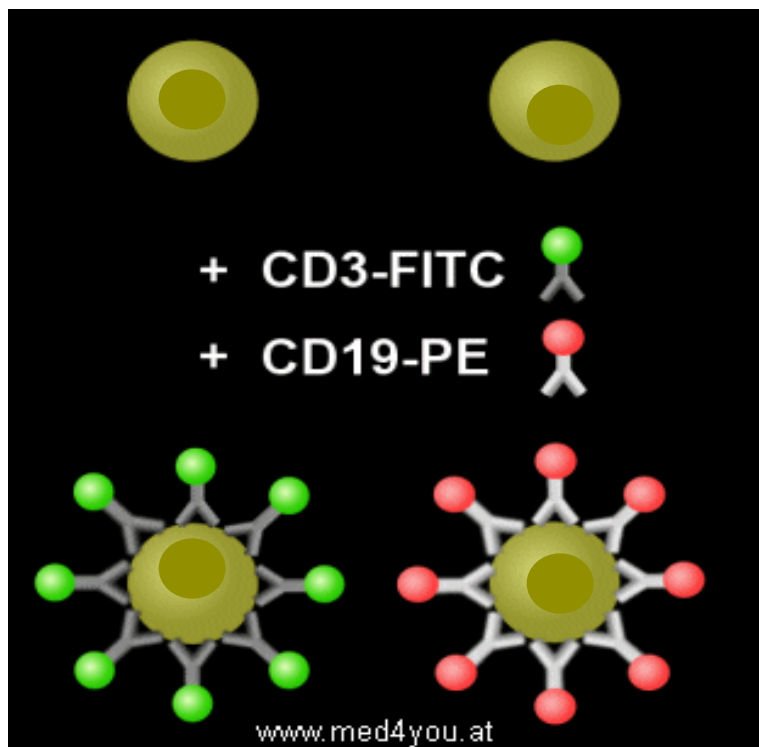
Side scatter (SSC) = granularitás

Fizikai paraméterek

Forvard scatter (FSC) = nagyság



Sejtfelszíni molekulák fluoreszcens jelölése áramlási citometriára



CD3-FITC – zöld → FL1
CD19-PE – narancs → FL2
CD56-CyChr – piros → FL3
CD45-APC - vörös → FL4

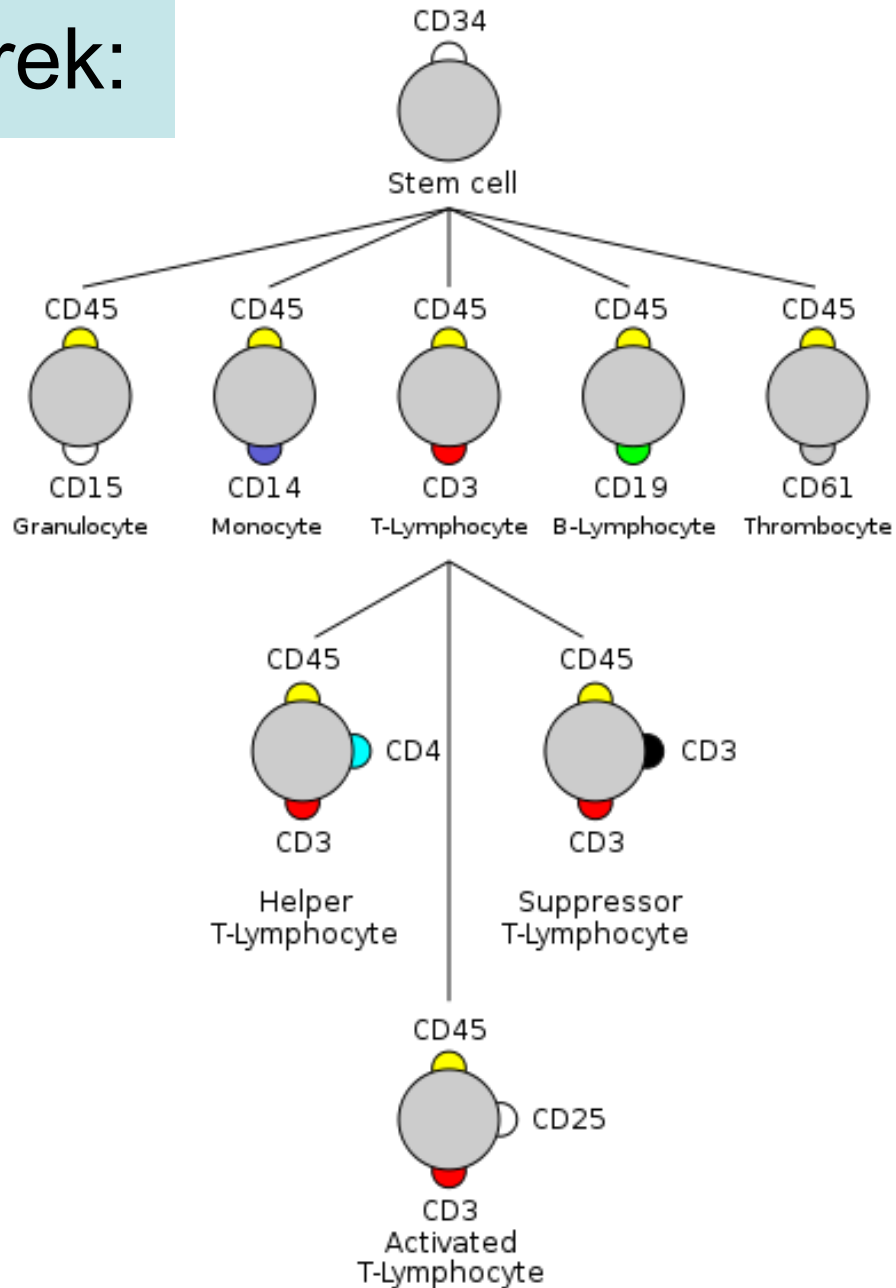
A legfontosabb mérhető paraméterek

- 1. Sejt nagyság (SSC)
- 2. Granuláltság (FSC)
- 3. Fluoreszcencia intenzitás: FL-1 (zöld), FL-2 (narancs), FL-3 (piros), FL-4 (távoli vörös)
- 4. Idő: pl. kalcium szignál mérésnél,

Immunfenotípus meghatározás indikációi

- Malignus hematológiai kórképek diagnosztikája és differenciál diagnosztikája
- Veleszületett és szerzett immunhiányos állapotok diagnosztikája és differenciál diagnosztikája
- Autoimmun betegségek aktivitásának nyomon követése
- Pre- és poszt-transzplantációs állapotok nyomon követése
- HLA-haplotípus vizsgálata
- Tumorsejtek vizsgálata: proliferációs antigének vizsgálata, adhéziós molekula expresszió kimutatás
- Fertőző betegségek diagnosztikája és nyomon követése
- Sejtfelszíni fehérje, vagy egyéb struktúrák távolságának meghatározása (energia transzfer)

CD markerek:



A legjellemzőbb CD markerek

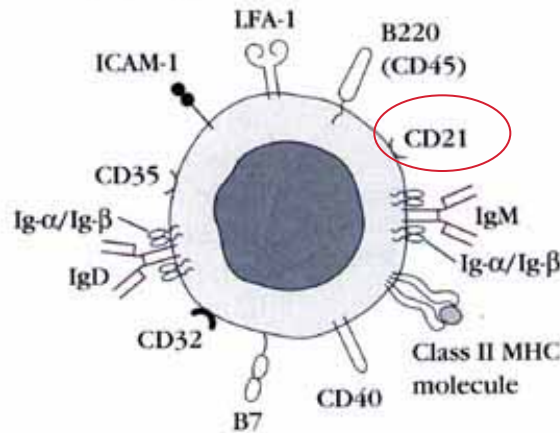
Sejttípus	CD markerek
Őssejt	CD34+, CD31-
Minden leukocita	CD45+
Granulocita	CD45+, CD15+
Monocita	CD45+, CD14+
T limfocita	CD45+, CD3+
T helper sejt	CD45+, CD3+, CD4+
T citotoxikus sejt	CD45+, CD3+, CD8+
B limfocita	CD45+, CD19+ vagy CD45+, CD20+
Trombocita	CD45+, CD61+
NK sejt	CD16+, CD56+, CD3-

Limfocita csoport azonosító CD markerek:

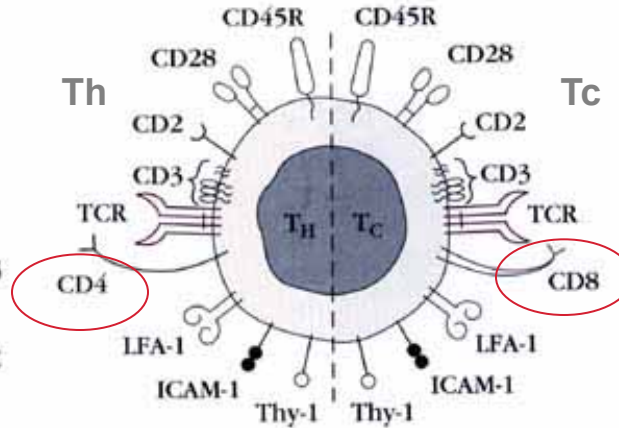
B sejt:

CD19
 CD20
 CD21
 CD5

(a) B lymphocyte



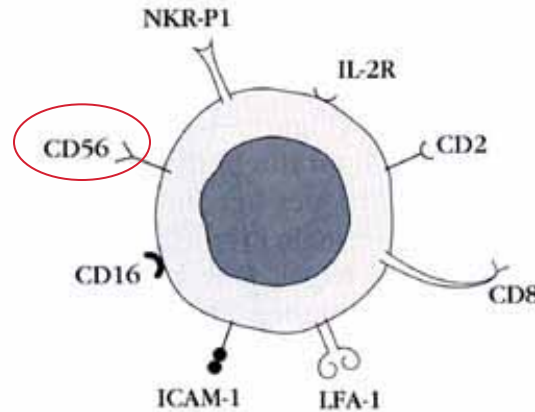
(b) T lymphocyte



T sejt:

CD3
 CD4
 CD8

(c) Natural killer cell



NK sejt: CD56, CD16



Funkcionális vizsgálatok

- Fagocitáló képesség vizsgálata: fagoburst teszt
- Intracelluláris kalciumion koncentráció meghatározás, sejtaktiváció mérés
- Intracelluláris pH meghatározás
- Enzim mennyiség, aktivitás ill. lokalizáció mérés
- Reaktív oxigén intermedierek (ROI) termelődésének detektálása (pl. H₂O₂)
- Kemotaxis vizsgálat
- Proliferációs index meghatározása, nyomon követése

Fontosabb fluorofór molekulák

FLUOROPHORE TABLE

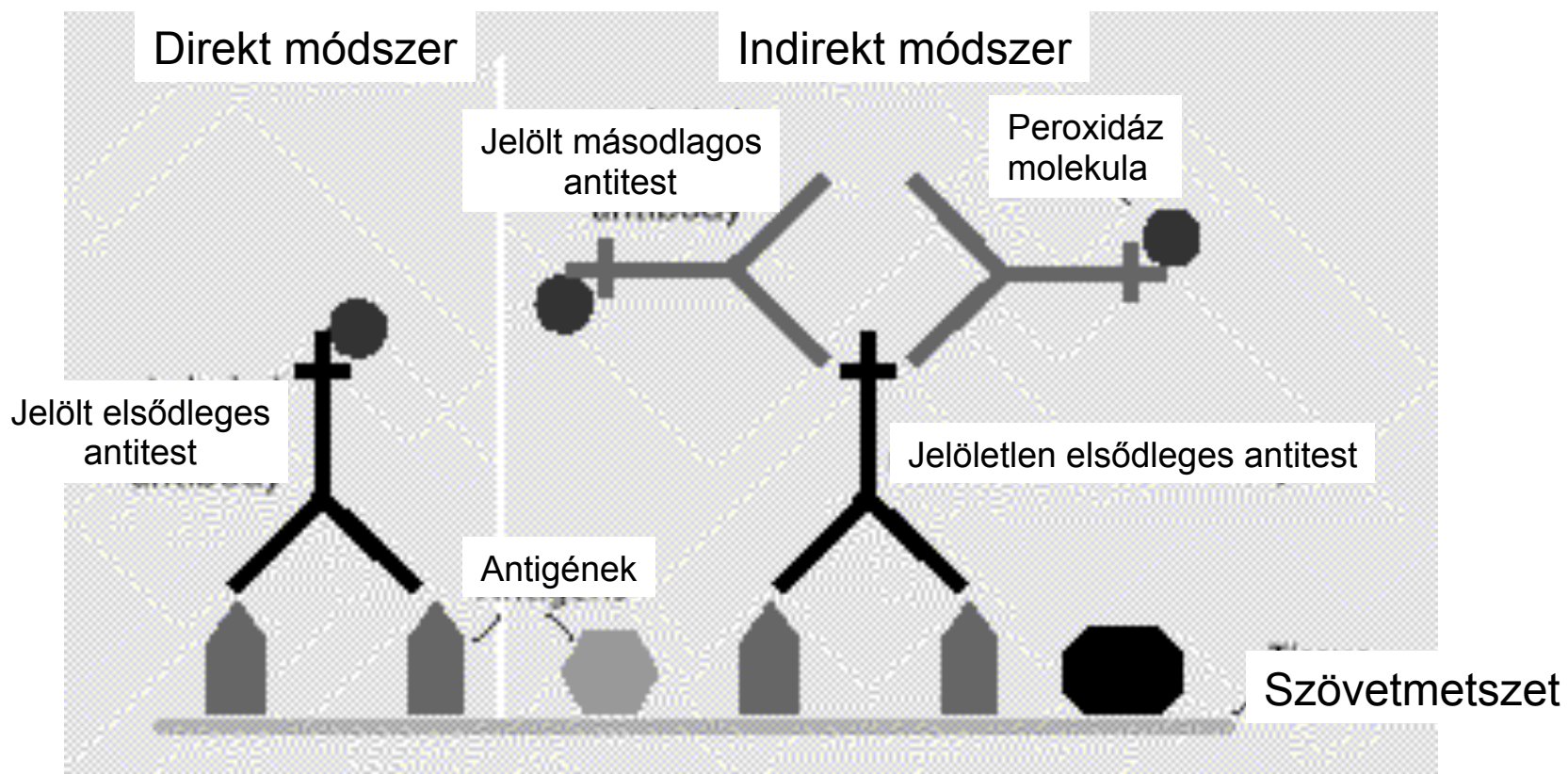
Festék	abszorpciós hullámhossz	emissziós hullámhossz	szin
Hydroxycoumarin	325	386	blue
methoxycoumarin	360	410	blue
Alexa fluor	345	442	blue
aminocoumarin	350	445	blue
Cy2	490	510	green (dark)
FAM	495	516	green (dark)
Alexa fluor 488	494	517	green (light)
Fluorescein FITC	495	518	green (light)
Alexa fluor 430	430	545	green (light)
Alexa fluor 532	530	555	green (light)
HEX	535	556	green (light)
Cy3	550	570	yellow
TRITC	547	572	yellow
Alexa fluor 546	556	573	yellow
Alexa fluor 555	556	573	yellow
R-phycoerythrin (PE)	480;565	578	yellow
Rhodamine Red-X	560	580	orange
Tamara	565	580	red
Cy3.5 581	581	596	red
Rox	575	602	red
Alexa fluor 568	578	603	red
Red 613	480;565	613	red

Fluoreszcens DNS festékek

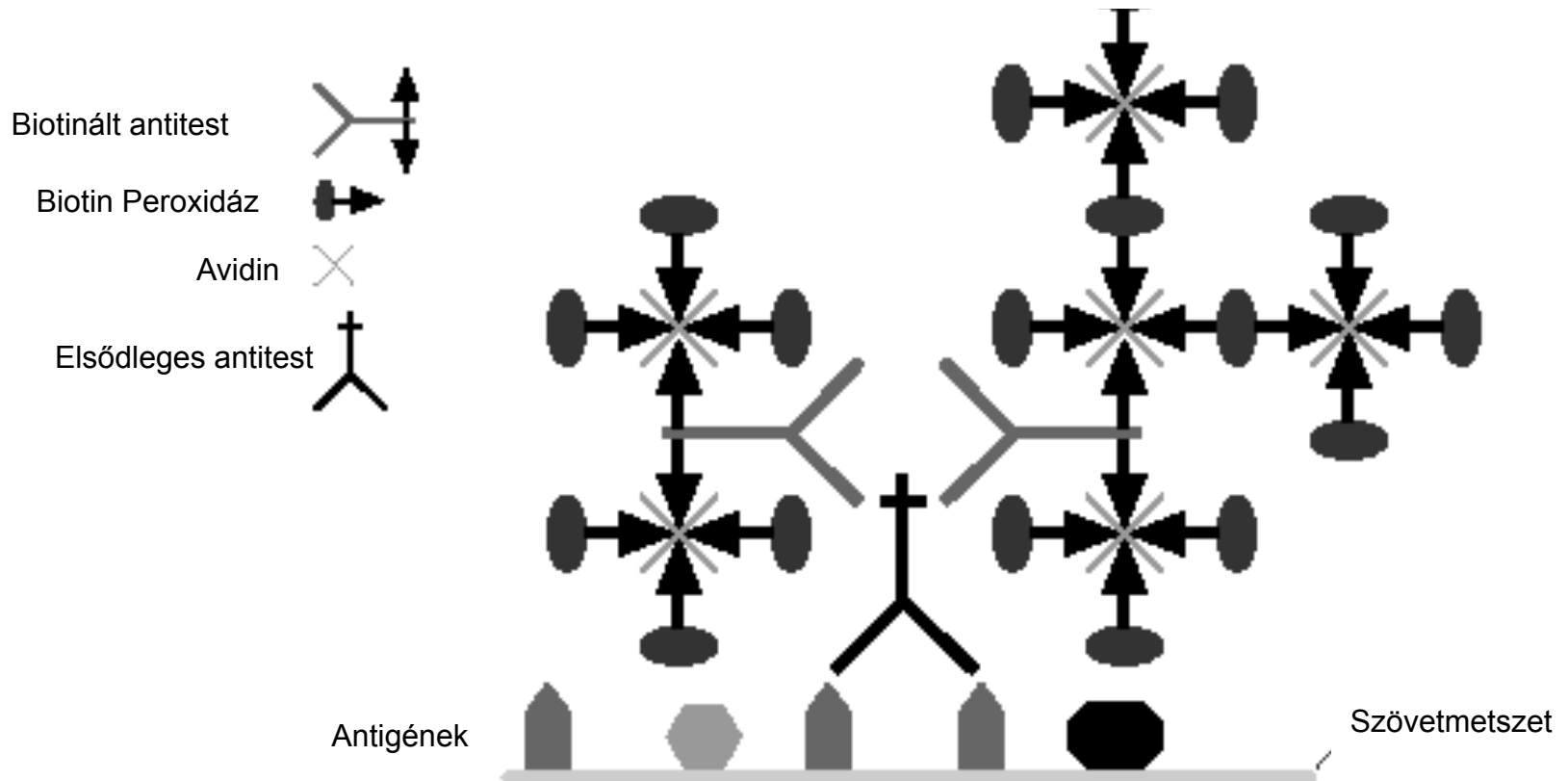
Nucleic acid probes:

Festék	abszorpciós hullámhossz	emissziós hullámhossz	szín
DAPI	345	455	blue
Hoechst 33258	345	478	blue
SYTOX blue	431	480	blue
Hoechst 33342	343	483	blue
YOYO-1	509	509	green
SYTOX green	504	533	green
TOTO 1, TO-PRO-1	509	533	green
SYTOX orange	547	570	yellow
Chromomycin A3	445	575	yellow
Mithramycin	445	575	yellow
Propidium iodide	536	617	red
Ethidium bromide	493	620	red

Dirket és indirekt immunhisztokémia

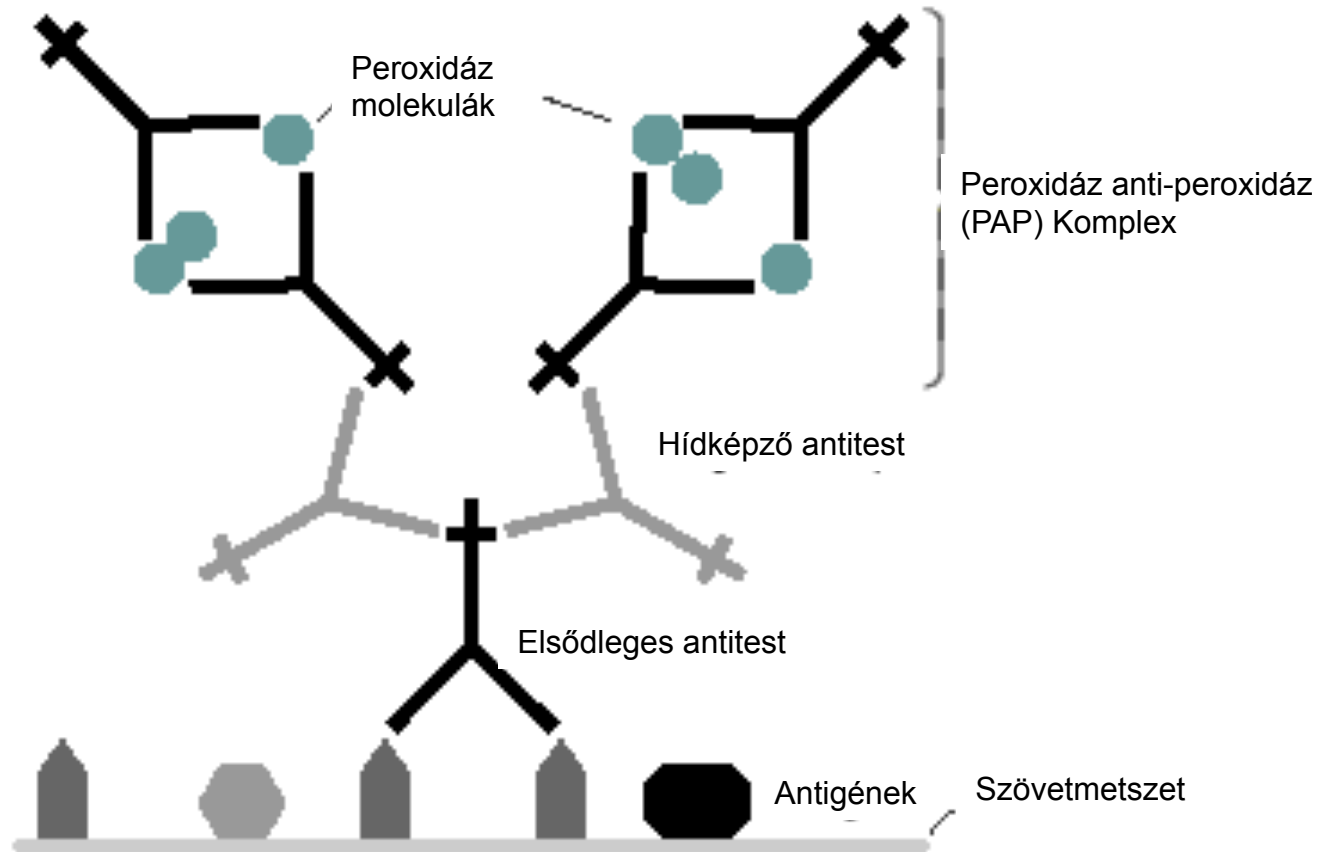


Avidin - Biotin-Peroxidáz komplex módszer



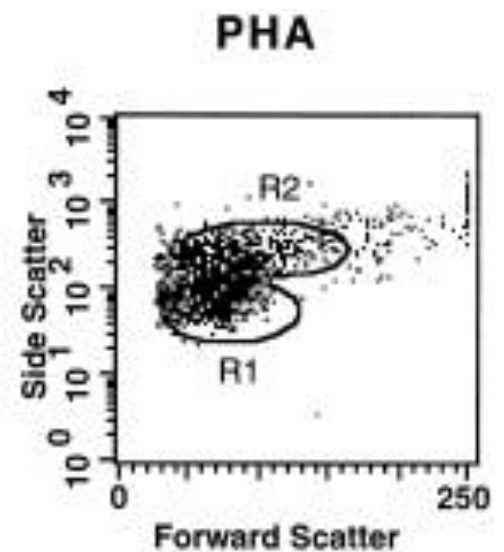
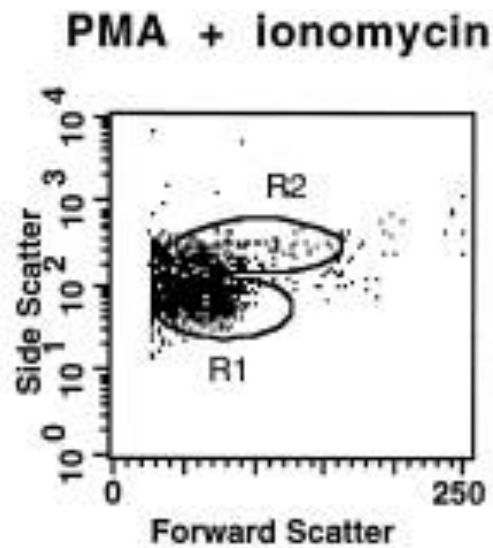
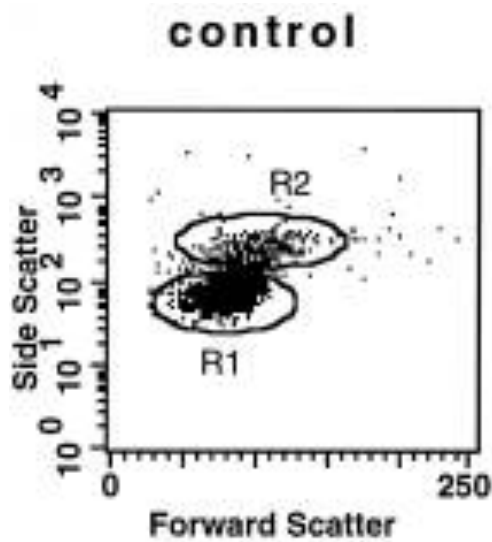
A biotinált másodlagos antitest nagy affinitású kapcsolatot létesít az avidin-biotin-peroxidáz komplex-szel

Peroxidáz-anti-peroxidáz (PAP) módszer

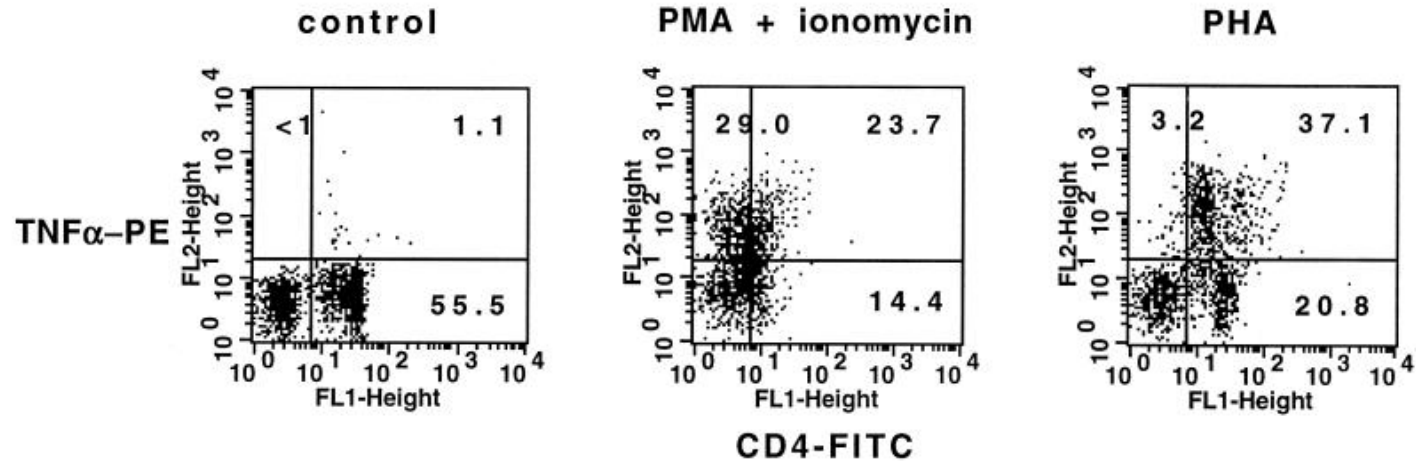


A három rétegű módszerben egy hídképző antitest köti össze az elsődleges antitestet a PAP komplex-szel

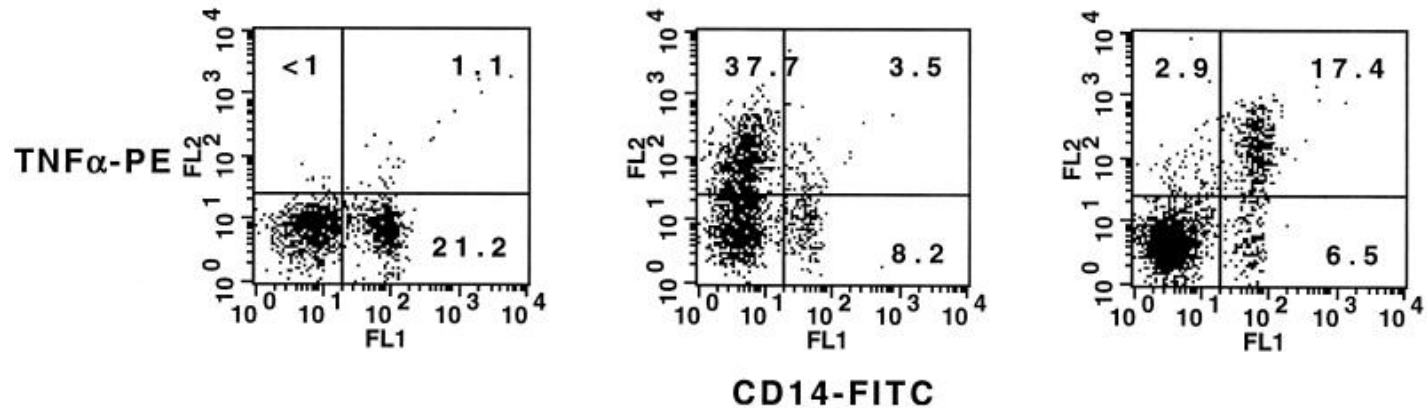
PMA/ionomycin stimulálás megváltoztatja a sejtek FSC/SSC flow citometriás megjelenését



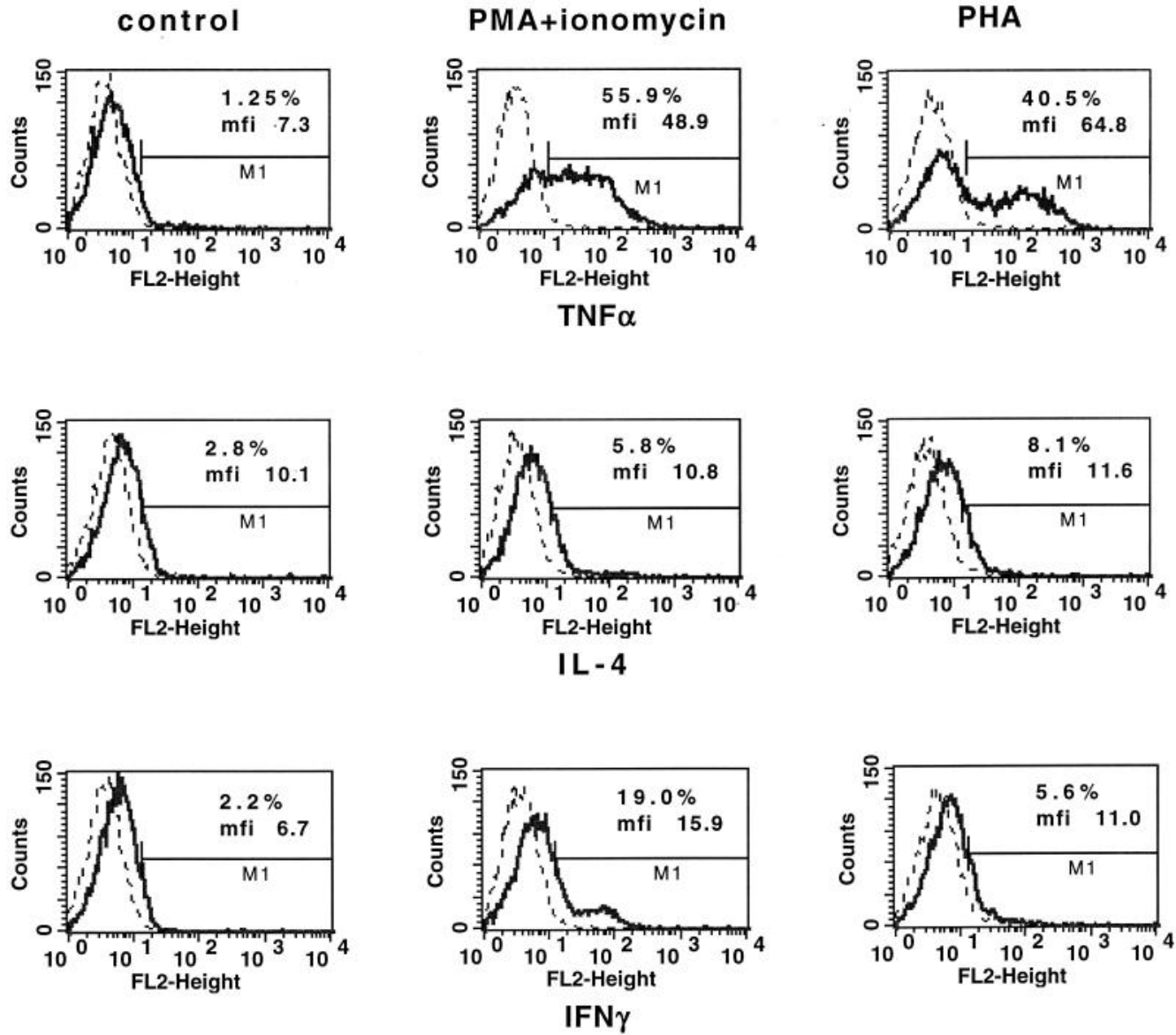
PMA/ionomycin stimulálás megváltoztatja a CD4 expressziót



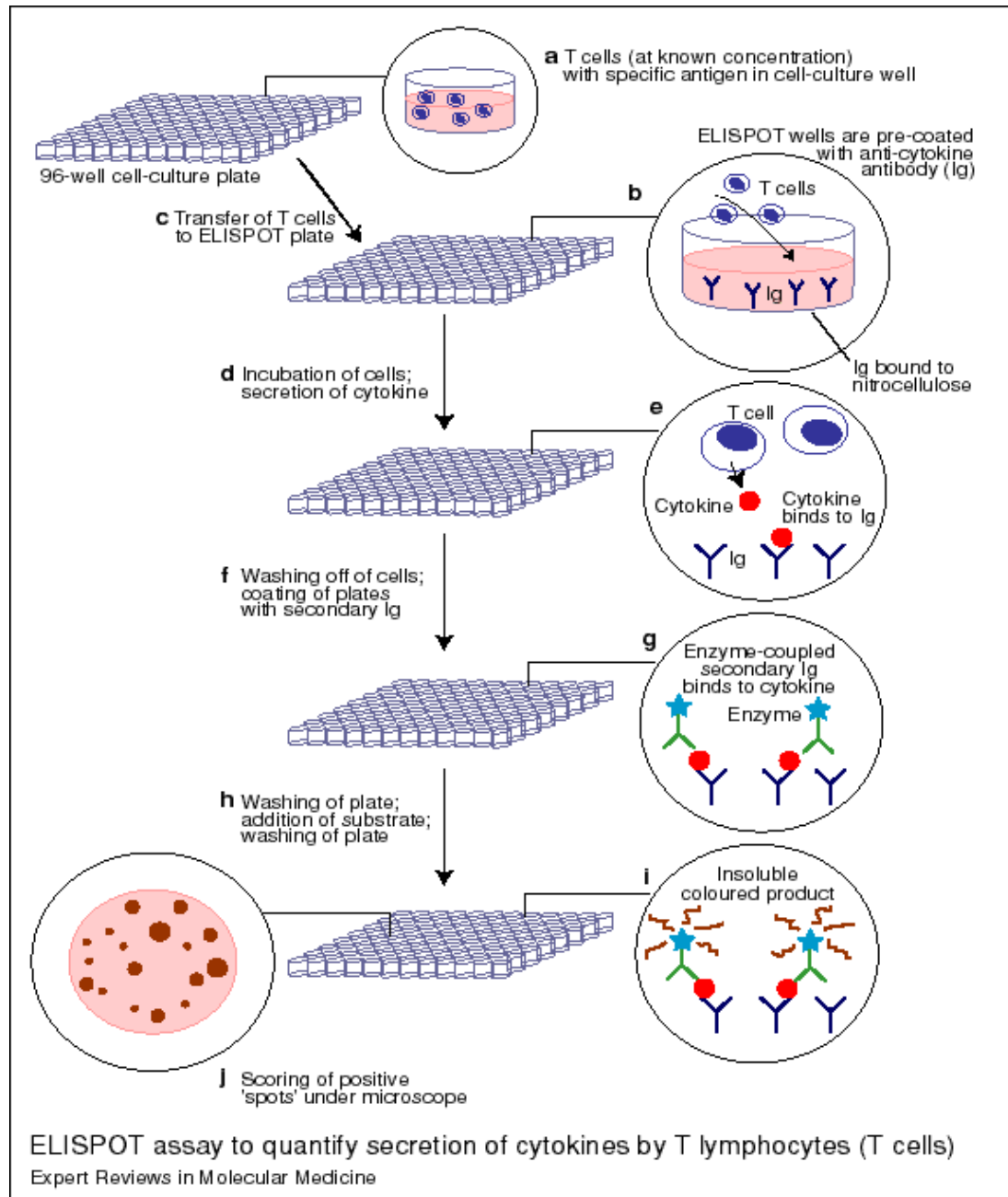
B



PMA/Ionomycin hatékonyabb citokin stimuláló szer



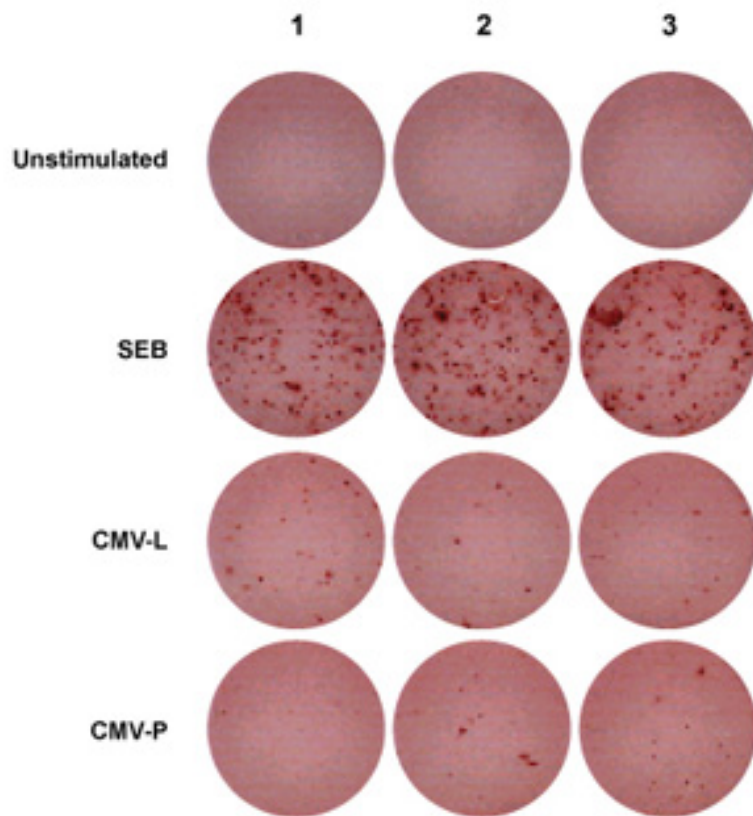
ELISPOT



ELISPOT assay to quantify secretion of cytokines by T lymphocytes (T cells)

Expert Reviews in Molecular Medicine

ELISPOT dot analízis



Number of dots (in triplicate)			Mean \pm SD
1	2	3	
2	0	1	1 ± 1
284	326	329	313 ± 25
43	21	22	29 ± 12
20	31	22	24 ± 6

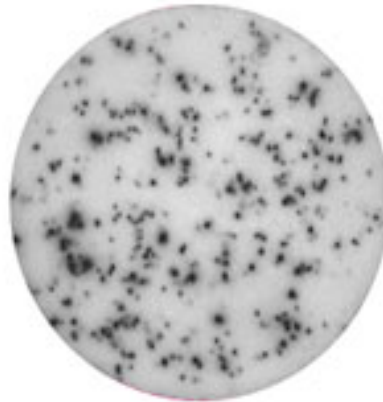
Humán IL-17A citokin mérése ELISPOT-tal

M



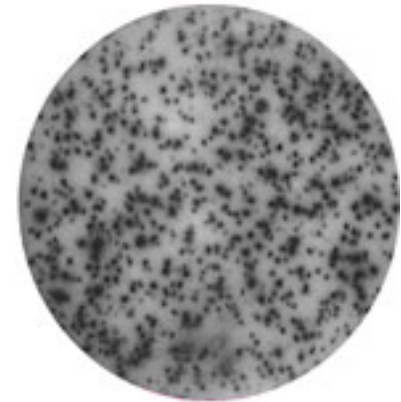
250.000 PBMC

SA



250.000 PBMC

PHA



125.000 PBMC

M = medium

SA = Heat-killed, formalin-fixed *Staphylococcus aureus* cells (whole bacterial particles)

PHA = Phytohaemagglutinin