

Přítomnost specifických molekul v buňce umožňuje určit její vlastnosti jako např. funkci, původ, stupeň diferenciaci. Při průkazu těchto molekul jsou často využívány jejich antigenní vlastnosti, zejména v biomedicinském výzkumu a v diagnostice. Specifická vazba antigenu a protilátky může být prokázána pomocí imunologických metod jako je např. ELISA či western blot. Vazbu protilátky a antigenu

v buňkách nebo tkáni je nutné testovat přímo pomocí imunocytochemie a imunohistochemie.

Každý antigen vyžaduje specifické způsoby fixace, zpracování, případně jeho zpřístupnění. Pro jeho detekci pomocí protilátky jsou tyto kroky klíčové. Dalšími důležitými kroky pro dosažení úspěšného výsledku reakce je vhodné ředění protilátky, zejména polyklonální a přiměřená doba a teplota inkubace.

Cílem práce bylo zjistit použitelnost nově vyvinuté anti-c-Myb protilátky, získané imunizací kura domácího fragmentem myšního proteinu c-Myb. Zároveň bylo používáno sérum získané před imunizací kura (preimunní sérum), které sloužilo jako negativní kontrola ke specifické reakci s protilátkou.

Prvním z cílů bylo zjistit specifitu vazby antigen-protilátka pomocí metody western blot. Ve druhém kroku byla protilátka imunocytochemicky ověřena v buňkách myších embryonálních fibroblastů transfekovaných c-Mybem. Použitím *in situ* hybridizace (ISH) mRNA pro c-Myb v celých embryích myši ED 13,5 a 14,5 a jejím srovnáním s publikovanými údaji byly vytipovány tkáně s přítomností proteinu c-Myb. Posledním krokem této práce bylo vyzkoušet a optimalizovat imunohistochemickou reakci v řezech embryem myši.

Specifita protilátky anti-c-Myb byla potvrzena pomocí metody western blot.

Byla ověřena dobrá použitelnost protilátky pro imunocytochemii.

Pomocí ISH mRNA *c-myb* v myších embryích byla detekována exprese genu v nervových buňkách sítnice oka, vomeronasálním orgánu a v subperitoneální části jater

a nově také v distálních člancích prstů obou končetin a ve folikulu hmatového chlupu.

Některé tkáně, u kterých byla dle dostupných literárních údajů získaných na základě radioaktivní ISH mRNA v řezech také očekávaná pozitivita, byly negativní (klky a

8

krypty střeva, proximální bronchy a trachea a subkapsulární část ledviny). Lze se

domnívat, že sonda pro ISH mRNA *c-myb* v celém embryu nedostatečně penetrovala do

hlouběji uložených orgánů a jeho hlubších částí.

Pro použití protilátky pro imunohistochemii byly porovnány různé metody a délky fixace, různé metody zpřístupnění antigenu a efekt zesílení pomocí avidin-biotin komplexu. Optimalizací těchto kroků bylo možné detekovat pozitivitu *c-Myb* v řezech celým embryem v čichové oblasti nosní sliznice, ve vomeronasálním orgánu, nervových

buňkách retiny, hematopoetických buňkách jaterní tkáně, což odpovídá části tkání, v kterých byla prokázána přítomnost mRNA pro *c-Myb*. Nově byl protein *c-Myb* prokázán také v neurální trubici a také mezi paprsky prstů. V části tkání, exprimujících *c-myb* mRNA, nebyla přítomnost proteinu pomocí této protilátky detekována (klky a krypty střeva, proximální bronchy a trachea). Jedním z možných vysvětlení je, že přítomnost mRNA nemusí nutně znamenat, že je nebo byl protein syntetizován.

Relativně nejlepší poměr signálu a pozadí byl získán pomocí fixace dle Serry bez ohledu na její délku. Použitelná byla také fixace methacarnem po dobu 24 hod nebo

krátká (2 hod) fixace tkáně pomocí 4% PFA, po fixaci PFA bylo nutné antigen zpřístupnit.

Optimální ředění protilátky anti-*c-Myb* bylo stanoveno na 1:5 000–1:10 000 a doba inkubace na 60 min při laboratorní teplotě a zároveň ještě alespoň 15 hod při 4 °C.

Následná detekce navázané protilátky byla provedena pomocí protilátky sekundární s navázanou peroxidasou.

Pro amplifikaci signálu je ředění protilátky vyšší a to v rozmezí 1:10 000–1:15 000, tento způsob však poměr signálu a šumu nezlepšil.

Závěrem lze konstatovat, že tato protilátka anti-*c-Myb* je velmi dobře použitelná pro metodu western blot a pro imunocytochemii. Její použití pro imunohistochemii však

může být problematické v závislosti na použité metodě fixace.