

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. lékařská fakulta

**Anatomický ústav**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Testování použitelnosti nově  
vyvinuté anti-c-Myb protilátky**

Vypracovala:

Markéta Pleschnerová

Vedoucí diplomové práce:

MUDr. Pavel Šnajdr

Studijní obor:

Specializace ve zdravotnictví

Studijní zaměření:

Zdravotnická technika a informatika

Praha 2007

## Poděkování

Děkuji vedoucímu mé diplomové práce MUDr. Pavlu Šnajdrovi za velmi zajímavé téma, za odborné vedení, přínosné konzultace a opravy této práce. Děkuji mu také za odběry myších embryí, za které děkuji i Ing. Elišce Krejčí.

Ing. Elišce Krejčí děkuji také za provedení transfekce 3T3 myších embryonálních fibroblastů, přípravu sond a pomoc při metodě western blot a v neposlední řadě za odborné konzultace a opravy této práce.

Další poděkování patří Evě Kluzákové a Bc. Michalu Tůmovi za zpracování některých preparátů, RNDr. Barboře Dvořánkové za populaci 3T3 myších embryonálních fibroblastů a RNDr. Michalu Dvořákovi, CSc. za konzultace ohledně protilátky anti-c-Myb a poskytnutí c-Myb plasmidu.

Děkuji Prof. MUDr. Miloši Grimovi, DrSc. za možnost realizace této práce a studia v laboratoři pro molekulární embryologii na Anatomickém ústavu 1. lékařské fakulty UK v Praze a zejména za odborné konzultace a kritické připomínky.

Marku Smolovi děkuji za reprodukci této práce.

Tato práce byla vypracována s podporou Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy; z Výzkumného záměru 0021620806 a z Centra základního výzkumu VC LC 06061.

S experimentálními zvířaty bylo nakládáno v souladu se zákonem 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a použila jsem jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu literatury.

Souhlasím, aby tato práce byla uložena a zpřístupněna ke studijním účelům v knihovně 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

V Praze dne 30. 8. 2007

Markéta Pleschnerová

# Obsah

Souhrn .....	7
Summary .....	9
<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>11</b>
<b>2 Současný stav řešené problematiky .....</b>	<b>12</b>
2.1 Imunohistochemie a imunocytochemie .....	12
2.1.1 <i>Antigeny</i> .....	12
2.1.2 <i>Imunoglobuliny</i> .....	13
2.1.2.1 Typy a charakteristika tříd Ig .....	15
2.1.2.2 Polyklonální protilátky .....	16
2.1.2.3 Monoklonální protilátky .....	16
2.1.2.4 Srovnání vlastností polyklonálních a monoklonálních protilátek ..	17
2.1.2.5 Afnita a avidita protilátky .....	18
2.1.2.6 Zkřížená reaktivita protilátky .....	18
2.1.3 <i>Metody pro testování vazby antigenu s protilátkou</i> .....	19
2.1.3.1 ELISA .....	19
2.1.3.2 Western blot .....	20
2.1.3.3 Dot blot .....	20
2.1.4 <i>Fixace a další zpracování tkáně</i> .....	20
2.1.4.1 Fyzikální metody fixace .....	21
2.1.4.2 Chemické metody fixace .....	21
2.1.4.3 Krájení a další zpracování tkáně .....	22
2.1.5 <i>Nespecifické a neimunní vazby protilátky</i> .....	23
2.1.5.1 Hydrofobní a elektrostatické interakce .....	23
2.1.6 <i>Testování protilátky: specifita a základní kontroly</i> .....	24
2.1.6.1 Purifikace protilátek .....	24
2.1.6.2 Ředění a testování nové primární protilátky .....	24
2.1.7 <i>Zpřístupnění antigenu</i> .....	25
2.1.8 <i>Detekční systém vizualizace průkazu antigenu</i> .....	26
2.1.8.1 Přímý detekční systém .....	26
2.1.8.2 Nepřímý detekční systém .....	27

2.1.9	<i>Vizualizační molekuly</i> .....	29
2.2	<i>In situ</i> hybridizace (ISH) mRNA .....	30
2.3	Transkripční faktor c-Myb .....	31
<b>3</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	34
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	35
4.1	Materiály a přístroje .....	35
4.1.1	<i>Chemikálie</i> .....	35
4.1.2	<i>Protilátky a séra</i> .....	35
4.1.3	<i>Komerční kity</i> .....	36
4.1.4	<i>Zalévací a montovací média</i> .....	36
4.1.5	<i>Ostatní</i> .....	36
4.1.6	<i>Roztoky a pufry</i> .....	37
4.1.7	<i>Biologický materiál</i> .....	37
4.1.8	<i>Přístroje</i> .....	37
4.1.9	<i>Softwarové vybavení</i> .....	37
4.2	Užité metody .....	38
4.2.1	<i>Western blot</i> .....	38
4.2.1.1	SDS elektroforesa v polyakrylamidovém gelu .....	38
4.2.1.2	Blot a imunoreakce .....	38
4.2.2	<i>Imunocytochemická reakce v buňkách tkáňové kultury transfekovaných genem c-myb</i> .....	39
4.2.3	<i>Imunohistochemie v tkáňových řezech</i> .....	40
4.2.3.1	Fixace a další zpracování tkáně .....	40
4.2.3.1.1	Fixace paraformaldehydem a zalití do kryoprotektivního média .....	40
4.2.3.1.2	Fixace paraformaldehydem a zalití do parafínu .....	40
4.2.3.1.3	Fixace dle Serry a zalití do parafínu .....	41
4.2.3.1.4	Fixace methacarnem a zalití do parafínu .....	41
4.2.3.2	Odparafinování a rehydratace tkáně .....	41
4.2.3.3	Zpřístupnění antigenu .....	42
4.2.3.3.1	Zpřístupnění antigenu pomocí mikrovlnné trouby .....	42
4.2.3.3.2	Zpřístupnění antigenu pomocí zvýšené teploty ve vodní lázni ...	42

4.2.3.3.3	Zpřístupnění antigenu pomocí tlakové nádoby .....	42
4.2.3.4	Blokace endogenní peroxidasy .....	42
4.2.3.5	Blokace nespecifických vazeb .....	43
4.2.3.6	Blokace endogenního avidinu/streptavidinu a biotinu .....	43
4.2.3.7	Inkubace s primární protilátkou .....	43
4.2.3.8	Inkubace se sekundární protilátkou .....	44
4.2.3.9	Zesílení pomocí avidin-biotin systému .....	44
4.2.3.10	Fluorescenční značení, jaderné značení, montáž a detekce .....	44
4.2.3.11	Detekce navázané peroxidasy .....	45
4.2.3.12	Dobarvení jader pro optickou mikroskopii, montáž .....	45
4.2.4	<i>In situ</i> hybridizace mRNA .....	45
4.2.4.1	Sterilizace a minimalizace možnosti degradace RNA .....	45
4.2.4.2	<i>In situ</i> hybridizace mRNA <i>c-myb</i> v celých embryích .....	46
4.2.4.2.1	Nakrájení tkáně a dobarvení jader po ISH mRNA .....	47
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>49</b>
5.1	Specifita protilátky anti-c-Myb testovaná metodou western blot ..	49
5.2	Použití protilátky anti-c-Myb pro imunocytochemii .....	50
5.3	<i>In situ</i> hybridizace mRNA <i>c-myb</i> .....	52
5.4	Reaktivita protilátky anti-c-Myb v tkáňových řezech .....	56
5.4.1	<i>Fixace tkáně a odhalení antigenu</i> .....	57
5.4.2	<i>Amplifikace signálu</i> .....	58
<b>6</b>	<b>DISKUSE</b> .....	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>69</b>
	<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>75</b>
	<b>Přílohy</b> .....	<b>78</b>
	<i>Příloha 1: chemikálie</i> .....	78
	<i>Příloha 2: roztoky a pufr</i> .....	80
	<i>Příloha 3: přístroje</i> .....	84
	<i>Příloha 4: protokol imunohistochemické reakce s protilátkou anti-c-Myb v parafinových řezech</i> .....	86

## Souhrn

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 biomedicínském 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 člácích 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

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.



## Summary

Specific molecules present in cell enables to determine its properties such as function, origin, stage of differentiation. Antigenic features of these molecules are used for their detection, especially in biomedical research and diagnostics. Specific bond between antigen and antibody can be proved by imunological methods e.g. ELISA or Western Blot. Applicability of the antibody for cell and tissue antigens needs to be tested directly by immunocytochemistry and immunohistochemistry.

Each antigen requires specific ways of fixation, processing or retrieval. These are the crucial steps for successful antigen detection. Other important steps are appropriate antibody dilution and duration and temperature of incubation.

The aim of this work was to determine the applicability of newly developed anti-c-Myb antibody, obtained by immunization of chick with a fragment of murine c-Myb protein. Blood serum obtained from the same animal before immunization was used as a negative control.

Western Blot was applied to verify the specificity of our antibody. Its application for immunocytochemistry was succesfully proved on c-Myb transfected murine embryonic fibroblasts. Results of *in situ* hybridization (ISH) of *c-myb* mRNA in whole mount murine embryos compared to published data were used to define prospective c-Myb protein positive tissues. The final step was to optimize the immunohistochemical reaction in embryonic sections.

Our ISH of *c-myb* mRNA results confirmed the expression of this gene in neuroretina, vomeronasal organ and in subperitoneal part of liver, newly also in distal phalanx of both limbs and whisker follicle.

Some of the tissues, which were published as being *c-myb* mRNA positive (according to radioactive ISH), we found to be negative (villi and crypts of intestine, proximal bronchi and trachea and subcapsular part of kidney). This can be due to the insufficient penetration of the probe to deeper situated organs of whole mount embryo.

Different methods and times of fixation, different methods of antigen retrieval and the effect of avidin-biotin amplification were compared for immunohistochemistry. Optimization of these steps enabled the detection of c-Myb protein in transverse

sections. Olfactory epithelium, vomeronasal organ, neuroretina and hematopoietic cells of the liver proved to be c-Myb protein positive in accordance with the expression of *c-myb* mRNA. Newly, c-Myb protein was revealed in the neural tube and in between digits. Some of tissues expressing *c-myb* mRNA were c-Myb protein negative when using our antibody (villi and crypts of the intestine, proximal bronchi and trachea). One of possible explanations is that the mRNA presence not necessarily means the synthesis of the protein.

The best results were obtained using fixation method according to Serra regardless the duration. 24 hour fixation with methacarn and short fixation (2 hours) with 4% paraformaldehyde followed by antigen retrieval yielded reasonable results.

Antibody dilution 1:5 000–1:10 000 and duration of incubation 60 minutes in laboratory temperature followed by 15 hours in 4 °C were set as optimal. Secondary antibody conjugated with horse-radish peroxidase was used.

Signal amplification required higher antibody dilution (1:10 000–1:15 000). However amplification did not improve the results.

We can conclude that c-Myb antibody is well applicable for Western Blot and immunocytochemistry. Its applicability for imunohistochemistry could be more problematic depending on used method of the fixation.

# 1 ÚVOD

Ve všech buňkách mnohobuněčného organismu probíhá současně řada procesů, z nichž některé jsou společné všem, jiné charakterizují určitou buněčnou skupinu. Každého z těchto procesů se účastní specifické molekuly bílkovinné i nebílkovinné povahy. Průkaz těchto molekul pak umožňuje určit vlastnosti dané buňky, např. její funkci, původ, stupeň diferenciaci, apod.

Molekuly antigenní povahy můžeme prokázat pomocí imunologických metod. Ty jsou poměrně snadné a díky vysoké afinitě protilátky a antigenu specifické. Mezi imunologické metody v biomedicíně výzkumu nejpoužívanější patří western blot, imunocytochemie a imunohistochemie. Některé protilátky reagují velmi robustně a fungují za různých podmínek, některé jsou naopak na podmínky reakce velmi citlivé a určitá modifikace v některém z kroků laboratorního postupu může rozhodovat o úspěchu či neúspěchu.

Každý antigen vyžaduje specifický způsob fixace, zpracování a eventuálně následného zpřístupnění. Pro žádný z těchto kroků neexistuje universálně platný postup, je třeba se snažit nalézt tu variantu, která povede k úspěšné detekci antigenu specifickou protilátkou kterou máme k dispozici. To bylo i cílem této práce.

Úkolem bylo testovat použitelnost polyklonální anti-c-Myb protilátky připravené na pracovišti Ústavu molekulární genetiky AV ČR v Kolči imunizací kura domácího. Testování bylo prováděno v laboratoři molekulární embryologie na Anatomickém ústavu 1. lékařské fakulty UK v Praze, kde autorka diplomové práce pracovala během studia několik let jako technický laborant a později jako odborný pracovník.

## 2 Současný stav řešené problematiky

### 2.1 Imunohistochemie a imunocytochemie

Imunohistochemie je aplikací imunologických principů při studiu tkání, imunocytochemie je aplikací imunologických principů při studiu jednotlivých buněk. Obě metody využívají k detekci afinitu a vzájemnou vazbu antigenu a specifické protilátky.

Histochemie vznikla ve 30. letech 20. století jako spojení histologie, analytické chemie a biochemie. Cílem histochemie je identifikovat a lokalizovat chemické látky v místě jejich výskytu ve tkáních.

Imunohistochemie se jako metoda začala vyvíjet na základech histochemie, zaváděním postupně objevených zákonitostí specifické imunologické reakce.

Historie imunocytochemie se počítá od roku 1941, kdy se podařilo Coonsovi a jeho spolupracovníkům prokázat první antigen, kterým byla prokázána bakterie *Streptococcus pneumoniae* [Coons, *et al.*, 1941]. V roce 1950 lokalizovali Coons a Kaplan antigen v tkáňovém řezu [Coons, Kaplan, 1950]. Tímto způsobem identifikovali např. *Rickettsie* a virus průšnic a imunohistochemie se tak začala využívat v patologii [Coons, Snyder, 1950]. Postupně se díky molekulárnímu, proteinovému a genovému inženýrství zlepšovala specifita, sensitivita a dostupnost těchto metod. Širšímu využití a zavedení do praxe pomohlo zejména spojení protilátky a enzymu, který lze následně detekovat [Nakane, Pierce, 1966, Avrameas, Uriel, 1966, Masson, Sammons, 1978, Suffin, *et al.*, 1979, Bondi, *et al.*, 1982].

#### 2.1.1 Antigeny

Každá látka, která má schopnost vyvolat imunitní odpověď se označuje jako antigen (antibody generator).

Za antigenní specifitu není zodpovědná celá molekula, ale její část, označována jako determinantní skupina. Na povrchu molekuly může být několik determinantních skupin, zvaných také epitopy.

Nízkomolekulární látky nejsou samy o sobě antigeny. Mohou mít však úlohu nekompletních antigenů neboli haptenu. Při přípravě protilátky se antigenem stanou po vazbě na bílkovinu (nosič), haptenu je pak její antigenní determinantou (determinantní skupinou). Jako těchto nosičů se používá hovězí sérový albumin (BSA), thyroglobulin nebo KHL (keyhole limpet haemocyanine) - haemocyanin z děrnatky obrovské (*Fissurella crenulata*) [Polak, Van Noorden, 2003].

Většinou jsou Ag proteiny, jejichž molekulová hmotnost je větší než 10 kDa. Podstatným faktorem pro úspěšnou vazbu protilátky s Ag je rozložení epitopů na povrchu antigenu a jejich fyzikálně-chemická stabilita. Částečná denaturace Ag může jeho antigenní schopnosti i zvýšit, pokud zpřístupní (demaskuje) nové determinantní skupiny.

## 2.1.2 Imunoglobuliny

Protilátky nebo-li imunoglobuliny (Ig) jsou významnou součástí imunitního systému obratlovců. Jsou produkovány B-lymfocyty, které dozrávají v kostní dřeni. Ig jsou glykoproteiny, jejichž celková koncentrace v séru u člověka se pohybuje v rozmezí 15–20 g/l a tvoří tak přibližně 20 % všech proteinů krevního séra.

Základní studii Ig provedl Portman a Edelman, za což jim byla v roce 1972 udělena Nobelova cena ve fyziologii a medicíně.

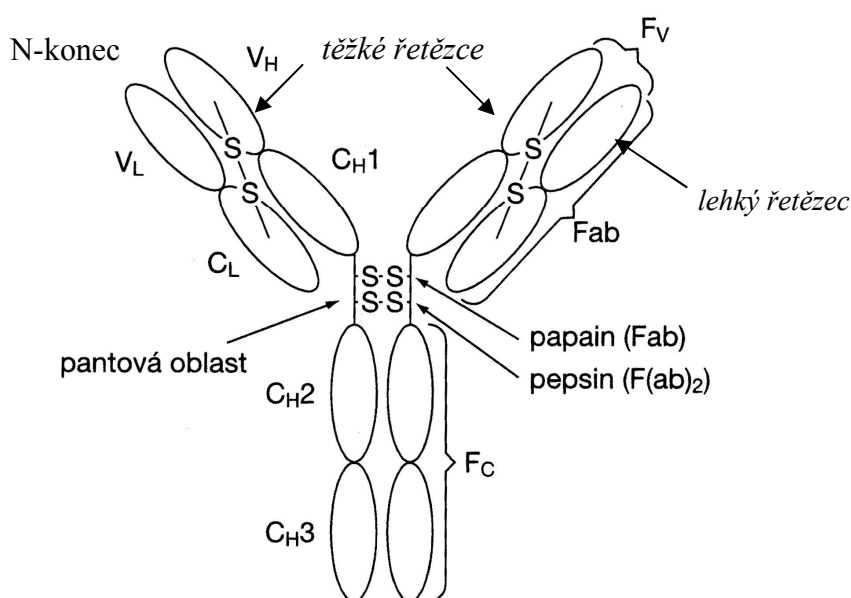
Molekulová hmotnost Ig se pohybuje v rozmezí 150–190 kDa [Racek, *et al.*, 2006].

Všechny Ig mají obdobnou stavbu molekuly. Ta je tvořena dvěma páry těžkých (H, heavy) řetězců o molekulové hmotnosti 50–75 kDa a dvěma páry lehkých (L, light) řetězců, ty mají molekulovou hmotnost přibližně 25 kDa [Goding, 1993]. Těžké řetězce lze rozdělit do pěti typů ( $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\delta$  a  $\epsilon$ ), podle nichž se rozlišuje 5 tříd imunoglobulinů IgG, A, M, D a E. Lehké řetězce jsou dvou typů, kappa ( $\kappa$ ) a lambda ( $\lambda$ ). Molekula Ig má oba těžké i lehké řetězce vždy identického typu. Dva H řetězce jsou kovalentně

spojeny disulfidovými (cystinovými) můstky. Ke každému H řetězci je cystinovým můstkem připojen jeden L řetězec (obr. 1) [Hořejší, Bartůňková, 2002].

Strukturální základ pro vznik protilátek s různou specifitou je variabilita aminokyselinové (AK) sekvence N-konců lehkých i těžkých řetězců. Tato část je dlouhá přibližně 110 AK, nazývá se variabilní oblastí. Variabilní domény H a L řetězců vytvářejí společně vazebné místo pro antigen (Ag).

Variabilní oblast se označuje  $V_L$  (variabilní oblast lehkých řetězců) a  $V_H$  (variabilní oblast těžkých řetězců). Zbytek molekuly má přibližně stejnou strukturu v rámci jedné třídy (nebo podtřídy), proto je nazývána oblastí konstantní (C). Konstantní domény lehkých řetězců se označují  $C_L$ , konstantní domény těžkých řetězců  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  (obr. 1) a případně  $C_{H4}$  (u IgM, IgA).



Obr. 1. Strukturální prvky molekuly IgG [Hořejší, Bartůňková, 2002]

Proteolytické enzymy papain [Porter, 1959] a pepsin štěpí molekulu Ig na charakteristické fragmenty. Papain při neutrálním pH štěpí Ig na dva menší fragmenty Fab (fragment antigen binding) a jeden větší Fc (nazýván podle toho, že v některých případech snadno krystalizuje, crystallizes). Dalším kontrolovaným dělením lze někdy získat z Fab fragmentů menší fragment F<sub>v</sub>, který se skládá jen z nekovalentně asociovaných variabilních (N-koncových) domén obou řetězců [Hořejší, Bartůňková,

2002]. Pepsin při pH kolem 4 štěpí Ig na jeden  $F(ab')_2$  fragment, který je na rozdíl od Fab fragmentu bivalentní. Zbytek molekuly je pepsinem rozštěpen na malé kousky.

Molekuly Ig jsou v tzv. pantové (hinge) oblasti flexibilní, takže vzdálenost mezi vazebnými místy se může měnit v závislosti na dostupnosti antigenu.

### 2.1.2.1 Typy a charakteristika tříd Ig

Nejvíce jsou v séru u člověka zastoupeny protilátky třídy IgG (75 %). Protilátky IgG mají tvar písmene Y se dvěma stejnými vazebnými místy pro antigen na konci každého ramene. U řetězců  $\gamma$  existují 4 významně odlišné subtypy  $\gamma 1$ - $\gamma 4$ , které definují jednotlivé podtřídy IgG (1–4). Největší podíl IgG tvoří podtřída IgG1.

Druhou nejvíce zastoupenou třídou Ig v séru jsou IgM (10 %). IgM jsou fylogeneticky nejstarší Ig [Goding, 1993] a objevují se v krvi v časném stádiu (2–3 dny) odpovědi na antigen, zejména na bakterie a viry [Voet, Voetová, 1990]. Jejich syntéza je v pozdějších fázích infekce vystřídána syntézou IgG [Racek, *et al.*, 2006]. IgM se vyskytuje ve formě pentameru nebo pravděpodobně i hexameru.

Imunoglobuliny třídy IgA se vyskytují ve formě slizniční a sérové. IgA neaktivuje komplement, funguje jako opsonin [Hořejší, Bartůňková, 2002]. Brání povrch sliznic gastrointestinálního traktu (GIT), spojivek, dýchacích cest před bakteriální infekcí.

IgD se vyskytují v krvi ve velice nízké koncentraci, jejich význam je neznámý. Zvýšení koncentrace bylo popsáno u některých chronických infekcí [Musil, 1994].

IgE se vyskytují v séru zdravých lidí v nepatrných koncentracích. Vyšší hladiny jsou přítomny u alergiků. Jejich komplex s alergenem vyvolá uvolnění histaminu a dalších mediátorů alergické reakce z mastocytů [Racek, *et al.*, 2006].

U ptáků (konkrétně u kura) byly identifikovány celkem tři isotypy imunoglobulinů IgM, IgY (také označován jako IgG) a IgA [Jaurissen, *et al.*, 1998]. Ptačí IgM jsou podobné savčím IgM, se kterými jsou asi ze 30 % homologické. IgY svou funkcí odpovídá savčímu IgG, avšak na základě srovnání homologních úseků je stejně blízký savčímu IgG jako IgE. Pravděpodobně je IgY evolučním předkem IgG i IgE savců [Demaries, Ratcliffe, 1998]. IgY má 1 variabilní doménu a 4 domény konstantní [Renshaw, 2007].

### 2.1.2.2 Polyklonální protilátky

Imunizace zvířete, nejčastěji králíka, ale používají se také např. osel, koza, v poslední době též slepice, se provádí primární injekcí, většinou subkutánně a po příslušném intervalu podpůrnou injekcí. Z krve se pak centrifugací odstraní erytrocyty. Ačkoli získaná tekutina obsahující protilátky je plasma a ne sérum, protože nebyl odstraněn fibrin, je pracovní roztok někdy nelogicky nazýván jako antisérum [Polak, Van Noorden, 2003].

Každý klon B lymfocytů produkuje protilátku s jednou specifitou, protilátku rozpoznávající jednu antigenní determinantu, která vyvolala jeho množení. Jeden Ag může aktivovat mnoho klonů B lymfocytů. Jedná se tedy o polyklonální odpověď [Lukáš, *et al.*, 1997].

Polyklonální protilátky, získané odběry krve po opakované imunizaci se liší nejen u různých zvířat stejného druhu, ale i u téhož zvířete mezi jednotlivými odběry.

Kvalitu polyklonální protilátky je možné se pokusit zlepšit purifikací.

Vzhledem k heterogennímu složení polyklonální protilátky může být v některých případech její užití značně komplikované. Proto bylo cílem imunologického výzkumu připravit homogenní protilátky s jedinou specifitou. Toho bylo docíleno užitím hybridomové technologie, díky které je možno získat protilátky produkované jedním buněčným klonem tzv. protilátky monoklonální [Lukáš, *et al.*, 1997].

### 2.1.2.3 Monoklonální protilátky

V roce 1975 César Milstein a Georges Köhler [Milstein, Köhler, 1975] vyvinuli techniku, která umožňuje *in vitro* kultivaci buněčné populace jednoho klonu B lymfocytů produkující protilátku žádané specifity. V roce 1984 jim a Nielsovi Jernemu byla udělena Nobelova cena za fyziologii a medicínu.

První fáze přípravy monoklonálních protilátek je podobná jako příprava polyklonálního séra. Zvíře, nejčastěji myš, je imunizováno vybraným antigenem. Ze sleziny imunizovaného zvířete, obsahující aktivované B lymfocyty je připravena buněčná suspenze, která je fúzována s myelomovými buňkami. Myelomové buňky



jsou odvozené od buněčné linie nádorových B lymfocytů, která ztratila schopnost syntetizovat molekuly Ig, získala však schopnost relativně neomezeného dělení (nesmrtelnosti) [Goding, 1993]. Klon vzniklé hybridomové (hybrid-myelom) buňky syntetizuje imunoglobulin B lymfocytu, ale má zároveň schopnost opakovaného dělení a může být dlouhodobě kultivován.

Jednotlivé hybridomové buňky se pak klonují a sleduje se jejich produkce protilátek. Dobrý klon může být pěstován, aby produkoval neomezené množství protilátek, buď v kultuře nebo jako myší nádor. Monoklonální protilátky produkované jednou hybridomovou linií jsou identické, tzn. že jsou jedné třídy resp. podtřídy, vykazují vazbu na stejnou antigenní determinantu, váží se na ní stejnou afinitou a mají stejné fyzikálně-chemické vlastnosti [Voet, Voetová, 1990, Lukáš, *et al.*, 1997].

Příprava monoklonálních protilátek je technicky i časově náročná, ale podaří-li se získat hybridom produkující protilátku žádané kvality, získáme tak standardní reagentii v prakticky neomezeném množství. Hybridomy lze zamrazit a dlouhodobě skladovat.

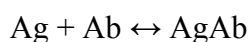
#### **2.1.2.4 Srovnání vlastností polyklonálních a monoklonálních protilátek**

Základní rozdíl je, že monoklonální protilátka reprezentuje pouze jednu složku polyklonální odpovědi, rozpozná pouze jeden epitop, zatímco polyklonální protilátka rozpozná více epitopů téhož antigenu. Monoklonální protilátky se tak dají použít pro identifikaci jednotlivých isoform proteinů, mapování funkčních míst proteinů či pro sledování jejich posttranslačních modifikací.

Negativní důsledek monospecifity se může projevit v případě, že epitop rozpoznávaný monoklonální protilátkou je během přípravy preparátů (fixace, denaturace apod.) změněný natolik, že ho protilátka nerozpozná. U polyklonálních protilátek je toto nebezpečí menší, protože je menší pravděpodobnost zničení všech epitopů. Řešením může být získání více hybridomů proti různým epitopům a následně výběr takové monoklonální protilátky, která v daném systému/laboratorním protokolu funguje.

### 2.1.2.5 Afinita a avidita protilátky

Specifitou reakce antigen-protilátka se rozumí míra afinity vazebného místa protilátky vůči určitému epitopu na molekule antigenu. Afinita je výsledkem všech odpuzivých a přitažlivých sil (van der Waalsovy síly, vodíkové můstky, hydrofobní interakce) mezi těmito dvěma komplementárními strukturami a vyjadřuje energii vazby mezi jedním vazebným místem na protilátce a příslušným epitopem na antigenu. Můžeme ji kvantifikovat jako asociační konstantu ( $K_A$ ) reakce



dle vzorce:

$$K_A = (\text{AgAb}) / (\text{Ag}) \times (\text{Ab}),$$

kde Ab a Ag představuje nenavázanou protilátku, resp. antigen a AgAb jejich komplex, (AgAb), (Ag) a (Ab) jsou jejich molární koncentrace.

V případě monoklonálních protilátek vyjadřuje afinita celkovou vazebnou energii komplexu protilátka-antigen. U polyklonálních protilátek, které jsou heterogenní, je celková vazebná energie dána součtem afinit jednotlivých vazebných míst na protilátce se všemi epitopy antigenu a označuje se termínem avidita. [Bartůňková, *et al.*, 2005].

V ideálním případě mají ostatní protilátky v získaném séru menší aviditu než specifická protilátka k příslušnému antigenu.

Imunocytochemie a imunohistochemie vyžaduje protilátky, které se pevně váží s příslušným antigenem, tak aby během procesu reakce nebyly odstraněny např. vymytím [Polak, Van Noorden, 2003].

### 2.1.2.6 Zkřížená reaktivita protilátky

Existují případy kdy může dojít k tzv. zkřížené reaktivitě. Vedle vazby na protein našeho zájmu dojde i k vazbě na jiný protein. Tento protein vytváří podobný epitop jako je epitop na specifickém antigenu. Odstranit tyto nežádoucí vazby je u polyklonálních protilátek obtížné (např. vysycení protilátky zkříženě reagujícím proteinem) a u monoklonální protilátky nemožné a je nutné vybrat takovou, která zkříženou reaktivitu nevykazuje [Lukáš, *et al.*, 1997].

### **2.1.3 Metody pro testování vazby antigenu s protilátkou**

Existuje řada metod, kterými se dají testovat komplexy antigen-protilátka. Vazba protilátky na antigen může být testována pomocí metod jako je enzymová analýza na imunosorbentech (ELISA), radioimunologická analýza (RIA), dále se používají techniky jako je western blot a dot blot.

Nejlepší cestou testování protilátky je metoda western blot (imunoblot) a praktické ověření imunocytochemickou nebo imunohistochemickou reakcí na materiálu, kde je známá pozitivita [Polak, Van Noorden, 2003].

Protilátka vykazující dobrou vazbu na antigen při použití těchto metod testování však nemusí být použitelná pro imunohistochemii a naopak [Polak, Van Noorden, 2003].

#### **2.1.3.1 ELISA**

Enzymová analýza na imunosorbentech (ELISA) je nejužívanější imunologická metoda k detekci a kvantifikaci protilátek nebo antigenu. Metoda ELISA je bližší imunohistochemii více než RIA [Polak, Van Noorden, 2003]. ELISA se používá k testování zejména monoklonálních protilátek.

Znamé množství příslušného antigenu, které je imobilizováno v jamce mikrotitrační destičky je inkubováno s příslušnou testovanou protilátkou v různých koncentracích. V dalším kroku je detekována případná navázaná protilátka na antigen pomocí sekundární protilátky proti zvířeti, které bylo imunizováno pro tvorbu specifické protilátky. Sekundární protilátka je označena enzymem. Po provedení kolorimetrické reakce lze aktivitu navázaného enzymu odečíst pohledem nebo fotometricky.

### **2.1.3.2 Western blot**

Časově náročnější a dražší, ale za to přesnější je metoda western blot (imunoblot).

Název metody vznikl jako slovní hříčka dle metody Southern blot (technika otisku DNA) zavedené Edwardem Southernem, analogicky byl vytvořen také název metody detekce RNA northern blot.

Metoda western blot je založená na elektroforetickém rozdělení proteinů v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecyl sulfátu sodného (SDS-PAGE). V SDS mají všechny proteiny záporný náboj a v elektrickém poli migrují k anodě. Velké proteiny migrují v sítu gelu pomaleji než malé. Výsledkem elektroforesy je rozdělení proteinů podle jejich molekulové hmotnosti. Proteiny se pak otisknou pomocí stejnosměrného proudu, difuze, kapilárního tlaku nebo vakua na pevný nosič (např. filtrační papír, nitrocelulosová, nylonová nebo polyvinyliden fluridová membrána).

Detekce probíhá pomocí specifické protilátky s navázaným enzymem, případně radioisotopem, který je pak exponován na citlivý film. Zesílení reakce v případě navázaných enzymů je možné pomocí chemiluminiscenčních substrátů (ECL), které jsou také exponovány na citlivý film.

### **2.1.3.3 Dot blot**

Jedná se o nejjednodušší metodu, kdy je antigen nanesen na pevný nosič a je fixován. Antigen je pak detekován pomocí specifických protilátek stejným způsobem jako u detekce western blot [Larsson, 1981].

## **2.1.4 Fixace a další zpracování tkáně**

K uchování morfologie, tkáňových a buněčných struktur musí být biologický materiál fixován. Principem fixace je zabránění autolýzy buňky inaktivací

lyzomálních enzymů a zabránění růstu bakterií a plísní. Fixace by měla být šetrná, aby byla tkáň co nejméně pozměněna. Fixace může být fyzikální nebo chemická.

Každý způsob fixace může způsobit určité změny antigenu. K některým změnám dochází dosud neznámými mechanismy. Fixace musí být tedy optimalizována pro konkrétní účel.

#### **2.1.4.1 Fyzikální metody fixace**

Fyzikální fixace tkáně může být provedena buď vysokými teplotami (varem nebo suchým teplem) nebo zmražením. Vysoká teplota většinou značně poškozuje strukturu tkáně a pro imunohistochemii se příliš nehodí. Vhodnější je zmražení, ale i to poškozuje morfologii tkáně, což je zvláště patrné pokud má řez větší plochu obsahuje více typů tkání (např. řez celým embryem). Pro zmražení tkáně se používají tekuté plyny, nejčastěji tekutý dusík. Další metodou fyzikální fixace je vysušení za nízké teploty (freezing-drying).

#### **2.1.4.2 Chemické metody fixace**

Nejčastěji používaný způsob fixace pro imunohistochemii je fixace chemická pomocí formaldehydu. Formaldehyd a také používaný glutaraldehyd patří mezi aldehydová fixativa, která příčně svazují polypeptidové řetězce (cross linking). Používá se 4–8% paraformaldehyd (polymer formaldehydu) rozpuštěný ve vhodném roztoku nebo pufu. Formaldehyd jako látka vhodná k fixaci tkání byla objevena v roce 1893 Ferdinandem Blumem a je používána do dnešní doby. Tento způsob fixace je rychlý a snadný a dobře uchovává morfologii tkání [Vacek, 1988].

Další typy fixačních činidel mohou obsahovat v různé koncentraci kyselinu pikrovou (2,4,6-trinitrofenol), octovou a další kyseliny či sublimát (chlorid rtuťnatý). Kyselina pikrová a octová rychle pronikají do tkáně, fixační tekutiny se sublimátem mají silné denaturační účinky na proteiny.

Další možností je fixace ethanolem, methanolem, acetonem a jejich různými poměry (protein precipitující fixativa). Tyto způsoby fixace jsou vhodné pokud je

antigen větší protein (nad 100 kDa), u menších proteinů se doporučuje nejprve použít fixaci aldehydovou [Polak, Van Noorden, 2003].

Kombinací aldehydové a alkoholové fixace je např. fixativum dle Serry [Serra, 1946] (formaldehyd, ethanol, kyselina octová).

Jiným doporučovaným fixativem je methacarn (methanol Carnoy) [Putschler, *et al.*, 1970] a jeho modifikace [Mitchell, *et al.*, 1985]. Methacarn obsahuje methanol, chloroform a kyselinu octovou.

Proces fixace probíhá po určitou dobu podle velikosti a druhu tkáně a také podle způsobu dalšího zpracování. Tkáň fixovaná chemickou cestou musí být zbavena fixativa a následně zpracována podle druhu média do kterého se zalévá.

Tkáň pro zalití do parafínu se odvodňuje vzestupnou alkoholovou řadou, prosytí se intermédiem, kterým je organické rozpouštědlo např. benzen, xylen, toluen nebo estery (methylbenzoát, methylsalicylát). Poté se tkáň prosycuje parafínem v termostatu při teplotě 56–58 °C [Vacek, 1988] a zalévá se do parafínu do připravených forem.

Před zalitím do kryoprotektivního média se tkáň po fixaci vypere a prosytí pomocí vhodného prostředku jako je například sacharosa, který by měl zabránit poškození morfologie tkáně při zmražování.

### **2.1.4.3 Krájení a další zpracování tkáně**

Zpracovaná tkáň se krájí na podložní skla pomocí mikrotomu (v případě použití pro elektronovou mikroskopii pomocí ultramikrotomu). Mikrotomy jsou konstrukčně dvou základních typů: sáňkový a rotační. Na principu rotačního mikrotomu pracuje i mikrotom zmrazovací (kryomikrotom, kryocut).

Nakrájené řezy se tradičně lepí na skla pomocí směsi bílku a glycerínu. Lepším médiem je dnes želatina, poly-L-lysin [Husain, *et al.*, 1980] nebo silan, kterým jsou skla předem potažená. Protože má poly-L-lysin vysokou molekulovou hmotnost (150–300 kDa), je podle některých autorů nejlepším médiem [Huang, *et al.*, 1983].

K napnutí parafinového řezu dochází účinkem povrchového napětí vody na ohřátý parafín, po odstranění vody se řezy nechávají schnout při teplotě 37 °C nejméně přes noc nebo 60 min při teplotě 60 °C [Polak, Van Noorden, 2003].

Pro odstranění parafínu z řezů před samotnou reakcí se používají organická rozpouštědla a tkáň se rehydratuje.

## 2.1.5 Nespecifické a neimunní vazby protilátky

Před samotným nanesením protilátky na tkáň je nutné blokovat nespecifické a neimunní vazby a event. zpřístupnit (odmaskovat) příslušné epitopy.

### 2.1.5.1 Hydrofobní a elektrostatické interakce

Zdrojem nežádoucí nespecifické vazby jsou hydrofobní interakce proteinů zejména po aldehydové fixaci. Hydrofobní jsou však také imunoglobuliny. Nežádoucí interakce mezi Ig lze potlačit optimalizací fixace. Čím nižší je koncentrace iontů, tím slabší je hydrofobní afinita [Lukáš, *et al.*, 1997].

Důležitým krokem je odstranění lipidových komponent, které by bránily ve vazbě protilátky na antigen, ze tkáně pomocí detergentů (Triton X-100, Tween 20) nebo saponinů [Polak, Van Noorden, 2003]. Detergenty také zabraňují vzniku nespecifických vazeb proteinu [Larsson, 1988].

Elektrostatické interakce mohou vzniknout mezi Ig a částicemi ve tkáni s opačným nábojem.

Aplikace neimunního (normálního) séra může eliminovat jak hydrofobní tak elektrostatické interakce. Jako neimunní sérum se používá sérum ze zvířecího druhu, jaký byl použit pro přípravu sekundární protilátky v koncentraci 5–20 % (pro eliminaci vyšší nespecifické vazby až neředěné sérum přidané do předinkubační směsi) [Polak, Van Noorden, 2003], případně se ještě přidává 2–5% hovězí nebo fetální sérum [Lukáš, *et al.*, 1997] nebo albumin [Polak, Van Noorden, 2003].

Vazba Ig k Fc receptoru v tkáni nebývá většinou problémem zejména pokud je tkáň fixována, tato vazba ale může vzniknout ve tkáni nefixované. Nejlepším řešením je použití F(ab) fragmentů místo celé molekuly Ig [Polak, Van Noorden, 2003].

## **2.1.6 Testování protilátky: specifita a základní kontroly**

### **2.1.6.1 Purifikace protilátek**

U mnoha polyklonálních protilátek se často vyskytuje nežádoucí reaktivita, která je většinou způsobena přítomností protilátek proti jiným antigenům, než kterými bylo imunizováno. Tyto nežádoucí reaktivity je možné se pokusit odstranit purifikací. Purifikace protilátek se provádí buď pouze srážením síranem amonným nebo lépe metodami ionexové a afinitní chromatografie. Jestliže, ale vykazuje protilátka příliš vysoké pozadí, většinou ani purifikace nepomůže a protilátku nelze použít [Polak, Van Noorden, 2003]. Nevýhodou purifikace pomocí afinitní chromatografie může být ztráta frakce protilátky s nejvyšší afinitou k antigenu.

### **2.1.6.2 Ředění a testování nové primární protilátky**

Nejsou-li doporučená koncentrace či ředění pro protilátku již známy, u polyklonálních protilátek se obecně doporučuje vyzkoušet několik ředění, v rozmezí 1:50 až 1:10 000, pro monoklonální a purifikované polyklonální protilátky se známou koncentrací se doporučuje použít koncentraci v rozmezí 0,5–40  $\mu\text{g/ml}$  [Polak, Van Noorden, 2003]. Jako negativní kontrola je místo protilátky použito normální (neimunizované) sérum zvířete. Ještě výhodnější je použití séra získaného ještě předtím, než je imunizováno (tzv. preimmunní sérum). Negativní kontrolou se detekují případné nespecifické vazby.

Správné zvolení koncentrace protilátky je nejdůležitějším faktorem a musí být optimalizováno. Vyšší ředění protilátky se zkouší až do stavu, kdy specifická vazba je ještě dostatečně silná pro zřetelnou vizualizaci a nespecifické vazby jsou co nejslabší. Bohužel faktory vedoucí ke vztahu mezi koncentrací a aviditou protilátky jsou neznámé [Polak, Van Noorden, 2003].

Délka inkubace s protilátkou může být velmi rozdílná (10 min až 24 hod) [Polak, Van Noorden, 2003]. Inkubace probíhá při teplotě 4 °C, 37 °C nebo při laboratorní teplotě (LT). Použití teploty 37 °C snižuje dobu nutnou pro inkubaci s



protilátkou, roste ale riziko nespecifických a nežádoucích vazeb a to zejména u nepurifikovaných polyklonálních protilátek [Polak, Van Noorden, 2003]. Inkubace při teplotě 37 °C je tak vhodná pro monoklonální nebo přečištěné protilátky. Udává se, že inkubace při LT po dobu 2 hod je ekvivalentní s inkubací protilátky při teplotě 4 °C přes noc (15 hod) [Polak, Van Noorden, 2003].

### 2.1.7 Zpřístupnění antigenu

V průběhu fixace a dalšího zpracování tkáně může docházet ke změnám vedoucím k zneprístupnění a někdy i k zablokování antigenních determinant. Antigeny lze určitými postupy zpřístupnit [Larsson, 1988]. Antigenní determinanty se doporučuje zpřístupnit zejména po fixaci formaldehydem [Cattoretti, *et al.*, 1993]. K zpřístupnění antigenních determinant se používají proteolytické enzymy pepsin, trypsin, ficin, pronasa při teplotě 37 °C [Huang, 1975]. Používány jsou také některé chemikálie jako např. močovina [Hausen, Dreyer, 1982] nebo kyselina mravenčí [Kitamoto, *et al.*, 1987], NaOH/methanol nebo sacharosa [Ellias, 1990].

Lepší způsob zpřístupnění antigenů je pomocí vysoké teploty [Shi, *et al.*, 1991]. Důležitou úlohu hraje také pH a molární koncentrace roztoku, ve kterém se řezy vaří. Doporučováno je použití vyššího pH než je pH 6 [Shi, *et al.*, 1997]. Čím vyšší teplota, tím vyšší efekt a stačí pak kratší doba působení [Kawai, *et al.*, 1994b]. Metodami zpřístupnění antigenu vysokými teplotami je autoklávování [Shi, *et al.*, 1991, Pons, *et al.*, 1995], vodní lázeň [Kawai, *et al.*, 1994a], ohřev parou [Pasha, *et al.*, 1995, Taylor *et al.*, 1995] a použití mikrovlnné trouby [Taylor, *et al.*, 1995, Pertschuk, *et al.*, 1994].

Prokázaně efektivní technikou je použití mikrovlnné (MV) trouby [Kahveci, *et al.*, 2003]. Původně bylo mikrovlnné záření aplikováno jako alternativní fixace [Mayers, 1970], nedochází při něm ke ztrátě proteinů jako u fixace chemické. Mikrovlny jsou elektromagnetické vlny o frekvenci 300 MHz–300 GHz [Pojar, 1993], to odpovídá vlnové délce 1 m až 1 mm. V laboratoři lze použít mikrovlnné trouby určené pro domácnost, které pracují při frekvenci 2,45 GHz nebo profesionální, které jsou k tomuto účelu zkonstruované. Mechanismus stabilizace proteinů/zpřístupnění antigenu není detailně známý, ale významnou roli hraje každopádně zvýšená teplota a přímý účinek

vln na nekovalentní vazby. U průkazu některých antigenů je použití MV nezbytné, u některých zvyšuje poměr signálu a šumu. Na některé antigeny nemá použití MV žádný vliv, některým antigenům dokonce tento proces škodí [Lukáš, *et al.*, 1997, Polak, Van Noorden, 2003].

Různými detekčními systémy lze zesílit výsledný signál reakce, toto je však limitováno právě možnostmi zpřístupněním antigenu [Leong, *et al.*, 1988].

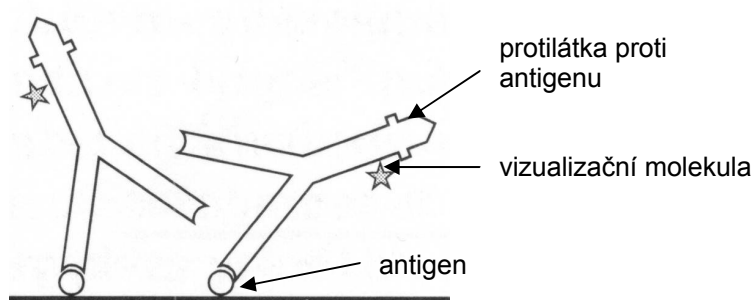
## 2.1.8 Detekční systém vizualizace průkazu antigenu

### 2.1.8.1 Přímý detekční systém

Detekční systém imunologických metod lze rozdělit na přímý a nepřímý.

Přímý způsob je nejjednodušším způsobem lokalizace antigenu ve tkáni. Primární protilátka proti příslušnému antigenu je přímo označena a umožňuje vizualizaci ihned po její aplikaci (obr. 2).

Pro konečné značení přímé i nepřímé metody se používají fluorochromy, enzymy, které lze detekovat kolorimetrickou katalytickou reakcí, kovy, radioisotopové prvky a další molekuly umožňující vizualizaci



Obr. 2. Přímý způsob značení antigenu specifickou protilátkou proti antigenu. Na protilátku je navázána vizualizační molekula [Polak, Van Noorden, 2003].

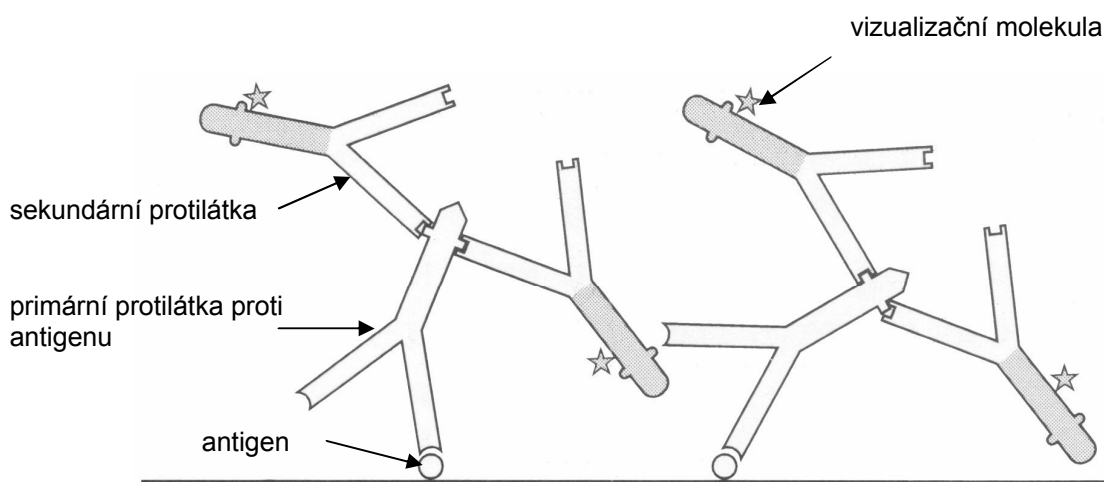
Přímou metodu lze použít tehdy, pokud je antigen ve tkáni přítomen v dostatečně vysoké koncentraci. Pro použití na parafinových řezech je tato metoda

málo citlivá. V těchto případech se signál zesiluje nepřímým systémem detekce antigenu.

### 2.1.8.2 Nepřímý detekční systém

Postupným upravováním přímé metody vyvinuli Coons a jeho spolupracovníci v roce 1955 dodnes velmi rozšířenou metodu nepřímého značení protilátky [Coons, *et al.*, 1955].

Zesílení signálu pomocí nepřímého detekčního systému má více než jeden stupeň detekce. Primární protilátka proti antigenu není označena vizualizační molekulou, ale nejprve se na ní naváže protilátka sekundární. Sekundární protilátka je vytvořena proti Ig zvířecího druhu, který byl použit pro získání primární protilátky. Na sekundární protilátku je navázána vizualizační molekula (obr. 3).



Obr. 3. Nepřímý (dvojstupňový) detekční systém značí antigenu příslušnou protilátkou, která je dále detekována pomocí specifické protilátky sekundární. Sekundární protilátka je označena vizualizační molekulou [Polak, Van Noorden, 2003].

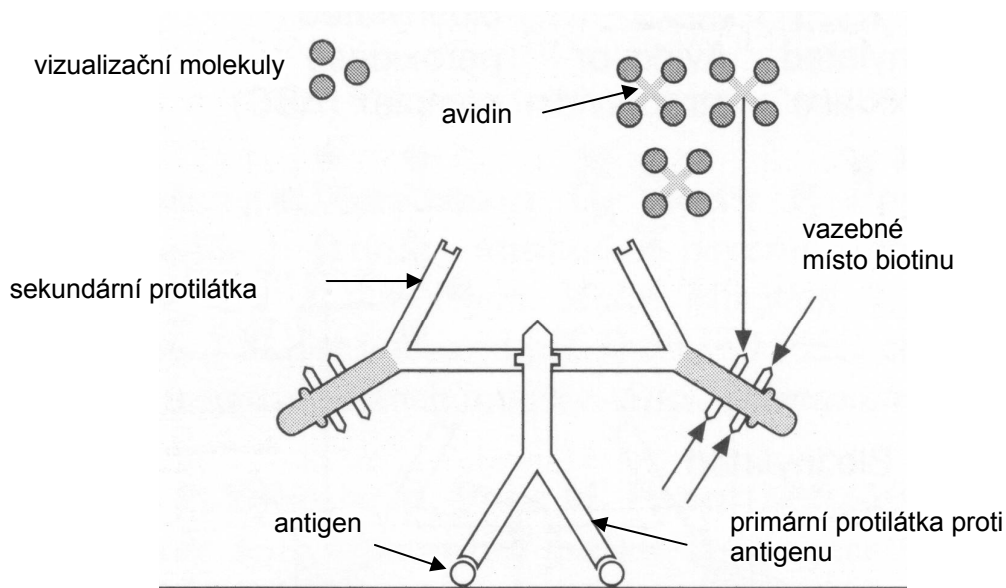
Existují i další systémy více než dvojstupňové. Nejpoužívanější třístupňovou metodou je využití komplexu avidin-biotin, kdy je na sekundární protilátku navázán biotin, na který se ve třetím stupni naváže avidin s vizualizační molekulou. Tento

system zavedli v roce 1979 Guesdon, Ternynck a Avrameas [Guesdon *et al.*, 1979, Hsu, *et al.*, 1981].

Biotin (vitamin H) je možné detekovat pomocí avidinu (obr. 4). Avidin je glykoprotein vaječného bílku, který má silnou afinitu k biotinu. Biotin může navázat až čtyři molekuly avidinu.

Jako alternativu k avidinu lze použít streptavidin získaný z bakterie *Streptococcus avidinii*.

Ještě větší amplifikace signálu je možné dosáhnout pomocí tyraminu (TSA) [Bobrow, *et al.*, 1989, Köhler, *et al.*, 2000].



Obr. 4. Antigen je detekován specifickou nekonjugovanou primární protilátkou. Ta je dále detekována příslušnou protilátkou sekundární konjugovanou biotinem. V dalším kroku je biotin detekován avidinem s navázanou vizualizační molekulou [Polak, Van Noorden, 2003].

Sensitivnější než trojstupňový systém avidin-biotin je dvojstupňový systém, kde jsou na sekundární protilátku navázány polymerní řetězce nesoucí velké množství vizualizačních molekul (EnVision™, od firmy Dako; ImmPRESS™ kit, Vector nebo více stabilní PowerVision™, Immunovision Technologies) [Vyberg, Nielsen, 1998, Shi, *et al.*, 1999].

Signál lze také amplifikovat pomocí terciální protilátky, proti Ig zvířete, které bylo použito pro získání protilátky sekundární či pomocí protilátky proti vizualizační molekule.

## 2.1.9 Vizualizační molekuly

Pro konečné značení přímé i nepřímé metody se používají vizualizační molekuly nejčastěji fluorochromy nebo enzymy.

Fluorochromy jsou molekuly schopné absorbovat světlo příslušné vlnové délky, excitovat elektron a při jeho návratu do základního stavu emitovat záření o větší vlnové délce.

Značení fluorochromy zavedl Coons v roce 1941, když použil molekulu fluoresceinu isocyanátu [Coons, *et al.*, 1941]. Tento způsob vizualizace je používán do dnešní doby, fluorescein isocyanát ale byl nahrazen molekulou fluoresceinu isothiocyanátu (FITC), který se dobře spojuje s protilátkou a je stabilnější [Riggs, *et al.*, 1958]. Další často používané fluorochromy jsou tetrahydroamin isothiocyanát (TRITC), texaská červeň (Texas red), 7-amino-4-methylkumarin-3-kyselina octová (AMCA), cyaniny, např. Cy3 (indokarbocyanin), Cy5 (indodikarbocyanin) a další. Fluorescenční vizualizace je výhodná v tom, že je možno při užití dvou či více protilátek na jednom preparátu sledovat každou z protilátek samostatně (s použitím příslušného filtru), obrazy pak jednotlivě skládat, což umožňuje např. možnost přesného určení vzájemné lokalizace sledovaných epitopů (event. jejich kolokalizaci).

Informaci o vnitřním uspořádání buňky lze získat pomocí specifické vazby některých fluorochromů na jednotlivé části buňky. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) a ethidium bromid se váže na DNA a RNA, Hoechst (bisbenzimidin) a propidium jodid se váže na DNA.

Dalším ve výzkumu používaným fluorochromem je zelený fluorescenční protein (GFP), získaný z medúzy *Aequorea victoria*.

Enzymové konečné značení bylo původně vyvinuto na základě detekce výskytu přirozených enzymů ve tkáni pomocí histochemických metod. Prvním enzymem navázaným na protilátku, který byl použit, byla křenová peroxidasa (HRP). Tento

způsob značení vyvinuli v roce 1966 Nakane a Pierce [Nakane, Pierce, 1966], a zároveň ve Francii Avrameas a Uriel [Avrameas, Uriel, 1966]. Další enzymy, které jsou používány: alkalická fosfatasa (AP) [Masson, Sammons, 1978], glukosooxidasa [Suffin, 1979], a  $\beta$ -galaktosidasa [Bondi, *et al.*, 1982].

Některé tyto enzymy se přirozeně vyskytují v určitých tkáních, kde je nutná jejich inaktivace ještě před navázáním značené protilátky.

Peroxidasovou endogenní aktivitu lze blokovat peroxidem vodíku ve vhodné koncentraci. Pro blokaci endogenní peroxidasy v erythrocytech, neutrofilech a makrofázích je možné použít jodistan a borohydrát [Heyderman, 1979], methanol a ferrikyanid sodný [Straus, 1971] nebo fenylyhydrazin [Straus, 1972].

Při použití AP se endogenní aktivita blokuje lewamisolem [Ponder, Wilkinson, 1981].

Peroxidasa může oxidovat různé substráty, které slouží jako donory elektronů. Substrát se změní v důsledku oxidace na barevný produkt. Nejpoužívanějšími substráty jsou 3,3-diaminobenzidin tetrachlorid (DAB) [Graham, Karnovsky, 1966] a 3-amino-9-etylkarbazol (AEC) [Graham, *et al.*, 1965].

Substrátem pro AP může být např. směs chromogenních substrátů BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát) a NBT (nitrotetrazoliová modř).

Glukosooxidasa (GOD) je běžně dostupná z plísní *Aspergillus niger* nebo *Penicillium notatum*, ve tkáni savců se nevyskytuje, není nutné tedy počítat s endogenní aktivitou. Nevýhodou je však o řád nižší citlivost ve srovnání s HRP.

$\beta$ -galaktosidasa z *E. coli* při pH 7–7,5 neinterferuje s  $\beta$ -galaktosidasou savců, která má optimální pH 5,5–6.

## 2.2 *In situ* hybridizace (ISH) mRNA

Metodu ISH vyvinuli v roce 1969 Pardue a Gall [Gall, Pardue, 1969, Pardue, Gall, 1969] a nezávisle na nich John [John, *et al.*, 1969]. Tato metoda umožňuje obecně detekovat nukleovou kyselinu určité sekvence v tkáni, buňkách a dokonce i na subcelulární úrovni v chromosomech.

Toho se využívá zejména při tvorbě chromosomálních map, analýze chromosomální struktury a aberací, studiu struktury, funkce a vývoje chromosomů a genomů, určování pohlaví, detekci a analýze virů a bakterií a detekci mRNA,

Metodou *in situ* hybridizace mRNA lze detekovat mRNA, která slouží jako podklad k syntéze příslušného proteinu. Tímto způsobem je možné ověřit expresi daného genu.

Princip metody spočívá ve specifické vazbě basí připravené DNA nebo RNA sondy s komplementárními basemi detekované nukleové kyseliny (vzniku hybridu) v místě jejího přirozeného výskytu.

Nevýhodou metody ISH mRNA je poměrně dlouhý pracovní postup, který vyžaduje přísné pracovní podmínky zabraňující degradaci RNA. Další významnou nevýhodou může být různý poločas rozpadu mRNA a proteinu, takže přestože je v buňce aktivní protein, mRNA již nemusí být detekovatelná. Nebo naopak, vzhledem k možným posttranskripčním, translačním a posttranslačním regulacím, nemusí přítomnost mRNA nutně znamenat, že je protein syntetizován.

## 2.3 Transkripční faktor c-Myb

c-Myb je transkripční faktor patřící do rodiny Myb proteinů. Myb je akronym odvozený ze slova myeloblastosis, staršího výrazu pro leukémii. U obratlovců patří do této rodiny ještě A-Myb a B-Myb.

Rodina proteinů Myb je definována přítomností Myb DNA vazebné domény s motivem šroubovice-otáčka-šroubovice (helix-turn-helix). Tato doména se skládá ze třech úseků o délce 51–53 AK (aminokyselin), které jsou zodpovědné za rozpoznávání specifické sekvence DNA [Ibanez, Lipsick, 1988]. Protein c-Myb má molekulovou hmotnost 75 kDa, u kuřete, myši i člověka je popsána v některých tkáních i jeho isoforma o molekulové hmotnosti 89 kDa, vzniklá alternativním sestřihem mRNA.

Jako transkripční faktor s DNA vazebnou doménou je c-Myb typicky jaderný protein, u některých buněčných typů je ale popisován i v cytoplasmě [Kopecki, *et al.*, 2007].

*c-myb* byl poprvé identifikován ve zkrácené formě onkogenu *v-myb* (viral) viru ptačí myeloblastosy (avian myeloblastosis virus – AMV). AMV způsobuje rychlou smrtelnou monoblastickou myeloblastosu (leukémií) u kuřat [Hall *et al.*, 1941, Roussel *et al.*, 1979].

Později byl objeven *c-myb* jako celulární (buněčný) protoonkogen *v-mybu*. Dalším poznaným genům z této rodiny bylo přiřazeno označení A a B.

*c-myb* patří mezi protoonkogeny. Protoonkogen je strukturní gen buňky, jehož produkt se obvykle podílí na regulaci základních buněčných dějů, jako je dělení a růst buněk a jejich diferenciaci (jsou to často růstové faktory či receptory růstových faktorů, transkripční faktory a regulátory programované buněčné smrti). Z nich jsou odvozeny onkogeny, které prostřednictvím svých proteinových produktů (onkoproteinů) transformují buňky. U virových onkogenů je protoonkogen začleněn do genomu retrovirů a je pak také schopen transformovat buňky.

Exprese *c-myb* je vysoká v nezralých buňkách hematopoetického systému a v průběhu jejich diferenciaci postupně klesá. V souvislosti s tím *c-myb* můžeme detekovat také u orgánů, účastnících se hematopoesy, tzn. v játrech, ve slezině a v buňkách kostní dřeně. Význam genu *c-myb* pro krvetvorbu potvrzuje fenotyp myši, u které byly oba geny vyřazeny z funkce (knock out). Myši, kterým chybí gen pro *c-myb* umírají kolem 14–15 embryonálního dne (ED), příčinou je těžká anémie. Období 12–13 ED odpovídá u myši přesunu krvetvorby z krevních ostrůvků do jater, zdá se tedy, že *c-myb* není nutný pro krvetvorbu v krevních ostrůvcích (ta začíná daleko časněji), je ale klíčový pro krvetvorbu v játrech [Mucenski, *et al.*, 1991].

Exprese *c-myb* mimo krvetvornou tkáň byla zatím zkoumána jen omezeně. Bylo publikováno několika prací na myších embryích, které byly získány pomocí *in situ* hybridizace v řezech s použitím radioaktivně značené sondy [Ess, *et al.*, 1999, Sitzman, *et al.*, 1995]. Takto získané černobílé obrázky prokazují expresi genu v několika orgánových systémech, její přesnější lokalizace do konkrétních buněčných typů však na základě této metody není možná.

Exprese genu *c-myb* u myši jak je popsána ve výše zmíněné literatuře, je uvedena v tabulce (tab. 1). Také zde platí, že gen je exprimován v nediferencovaných buněčných populacích a s jejich diferenciací (růstem embrya) jeho exprese klesá a pravděpodobně jen v menšině případů je zachována i po narození.



Tab. 1. Exprese genu *c-myb* u myši.

stáří	exprese genu <i>c-myb</i> u myši [Ess, <i>et al.</i> , 1999, Sitzman, <i>et al.</i> , 1995]
ED 10,5 – a dále až postnatálně	játra – krvetvorba – v prekurzorech myeloidní a erytroidní řady, ne v extraembryonální krvetvorbě, v kostní dřeni méně, snad přetrvává i postnatálně v kmenových buňkách
ED 12,5 – 14,5	vyvíjející se oko – nervové buňky sítnice oka
ED 12–15	vyvíjející se štítná žláza, v této době začíná sestup od base jazyka, ale ne již u ED 16, kdy je ukončen sestup
ED 12–18 a asi déle	vyvíjející se thymus, exprese přetrvává v kůře zatímco ve dřeni klesá (ED 18)
ED 14	vyvíjející se zubní papila (ektomesenchymová část zubu)
ED 14,5–16	oblast čichového epitelu nosní sliznice, vomeronasální orgán, subkapsulární část ledviny; epitel vnitřního ucha; epitel oropharyngu; slezina
ED 14 až postnatálně	vyvíjející se trachea a epitel proximálních bronchů (zatímco u distálních je negativní), přetrvává krátce i postnatálně, později mizí
ED 14–16 až postnatálně	GIT – krypty i vyvíjející se klky střeva, klky do ED 16, krypty exprimují i postnatálně
postnatálně	vlasový folikul, folikul hmatového chlupu (whisker)

### 3 CÍL PRÁCE

Tato práce vychází z konkrétní situace výzkumu v laboratoři molekulární embryologie Anatomického ústavu. Důvod, proč byla připravena vlastní anti-c-Myb protilátka i přesto, že na trhu je několik dostupných komerčních protilátek např. polyklonální protilátka anti-c-Myb (Santa Cruz Biotechnology), monoklonální protilátka anti-c-Myb (Uppstate) a anti-c-Myb/v-Myb (Abcam) byl ten, že žádná z nich na tkáňových řezech pomocí různých způsobů imunohistochemického průkazu antigenu, nepodávala očekávaný signál. Se všemi bylo zacházeno podobným způsobem jak bude uvedeno v této práci.

K ověření použitelnosti nově vyvinuté protilátky jsou nutné následující kroky, které zároveň představují dílčí cíle této práce:

1. V prvním kroku je třeba ověřit vazbu protilátky s proteinem našeho zájmu pomocí metody western blot (u komerčních protilátek provádí většinou výrobce).
2. Druhým krokem je imunocytochemický průkaz proteinu v buňkách, do kterých byl zaveden plasmidový vektor nesoucí gen pro protein c-Myb (a buňky jej tedy v nadbytku produkují). Z našich zkušeností i z literatury vyplývá, že průkaz proteinu v jednotlivých buňkách je jednodušší a spolehlivější, než jeho průkaz na histologickém řezu tkání. Zároveň se již jedná o složitější systém, situaci ve tkáni mnohem bližší.
3. Dalším z úkolů je prokázat expresi genu *c-myb* pomocí metody mRNA *in situ* hybridizace v celých embryích a porovnat ji s již publikovanými údaji. To poslouží k vytipování tkání, ve kterých lze předpokládat přítomnost proteinu c-Myb, na který by se specifická protilátka měla vázat.
4. Posledním krokem je vlastní imunohistochemická reakce na řezech celým embryem a její srovnání s expresí příslušného genu.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiály a přístroje

#### 4.1.1 Chemikálie

Viz příloha 1.

#### 4.1.2 Protilátky a séra

anti digoxigenin -AP	Roche Diagnostics, Švýcarsko
anti-c-Myb	ÚMG AV ČR Koleč, ČR
anti-chicken-biotin (Biotin SP conjugated affini pure goat anti-chicken IgY (IgG) H+L)	Jackson Immunoresearch, USA
anti-chicken-Cy3 (Cy3 conjugated affini pure F(ab') <sub>2</sub> fragment donkey anti chicken IgY (IgG) H+L)	Jackson Immunoresearch, USA
anti-chicken-peroxidasa (Peroxidase-conjugated afinity pure F(ab) <sub>2</sub> fragment donkey anti chicken IgY (IgG) H+L)	Jackson Immuno Reasearch Lab.
BSA (hovězí sérový albumin)	Fluka, Švýcarsko,
BSA (hovězí sérový albumin)	Sigma, USA
NDS (normální oslí sérum)	Jackson Immunoresearch, USA
NGS (normální kozí sérum)	Jackson Immunoresearch, USA
NSS (normální oslí sérum)	Jackson Immunoresearch, USA

Polyklonální protilátka anti-c-Myb byla připravena pracovníky Ústavu molekulární genetiky Akademie věd ČR, pracoviště farmy v Kolči imunizací kura domácího (*Gallus gallus*) fragmentem proteinu c-Myb myši (*Mus musculus*) bez DNA vazebné domény. Z odebrané krve byla získána plasma, obsahující protilátku anti-c-Myb.

### 4.1.3 Komerční kity

Avidin/Biotin blocking kit	Vector, USA
Streptavidin/Biotin blocking kit	Vector, USA

### 4.1.4 Zalévací a montovací média

DePeX	Serva, Německo
Kaiserova glycerinová želatina pro mikroskopii	Merck, Německo
Paraplast plus	Tyco healthcare group, UK
Tissue Tek® O. C. T. Compound	Sakura Finetechnical, Japonsko
Vectashield mounting medium for fluorescence with DAPI	Vector, USA

### 4.1.5 Ostatní

Blocking reagent	Roche Diagnostics, Švýcarsko
extravidin-peroxidasa (Extravidin peroxidase conjugated)	Sigma, USA
GeneJammer® Transfection Reagent	Stratagene, USA
Immobilon™ PVDF Transfer Membrane, Immobilon-P	Millipore, USA

membrána Millipack 0,22 µm	Millipore, USA
odtučněné sušené mléko	Nestlé, Švýcarsko
PageRuler™ prestained protein ladder	Fermentas, Kanada
Prestained protein molekular weight marker	Fermentas, Kanada
streptavidin-TRITC (Streptavidin Rhodamine (TRITC) conjugated)	Jackson Immunoresearch, USA
Yeast RNA	Roche Diagnostics, Švýcarsko

#### 4.1.6 Roztoky a pufry

Viz příloha 2.

#### 4.1.7 Biologický materiál

Metodou *in situ* hybridizace a imunohistochemie byla studována embrya laboratorní myši (*Mus musculus*) kmene C57/BL6 embryonálního stáří (ED) 13,5–14,5.

Pro transfekci bylo použito populace 3T3 embryonálních myších fibroblastů.

V metodě western blot byly použity bakterie *Escherichia coli* kmen XL1-Blue a *E. coli* kmen BL21 exprimující c-Myb z vneseného plasmidu pET15B-c-mybΔDNA bd nesoucího zkrácenou formu genu pro *c-myb* (bez DNA vazebné domény).

#### 4.1.8 Přístroje

Viz příloha 3.

#### 4.1.9 Softwarové vybavení

Windows 2000 Professional (Microsoft, USA)

Adobe Photoshop 7.0 CE (Adobe, USA)

Cell'P 1.20 (Olympus, Soft Imaging System, Německo)

Microsoft Office 2000 (Microsoft, USA)

Quick PHOTO CAMERA 2.0 (Olympus, Japonsko)

## **4.2 Užité metody**

### **4.2.1 Western blot**

#### **4.2.1.1 SDS elektroforesa v polyakrylamidovém gelu**

Bakterie *E. coli* kmene BL21 exprimující zkrácený protein c-Myb a kontrolní *E. coli* kmene XL1-Blue se vloží do mikrozkušavky do vzorkového redukujícího pufru (2x PLB) a po dobu 5 min se denaturují. Vzorky se skladují při  $-80$  až  $-20$  °C. Vzorky včetně referenčních proteinů (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) se nanese do jamek vytvořených hřebenem v 5% zaostřovacím polyakrylamidovém gelu.

Elektroforesa v polyakrylamidovém gelu ve vertikálním uspořádání v Tris-glycinovém SDS pufru se provádí za konstantního napětí 130–150 V po dobu 90 min. Koncentrace polyakrylamidového dělicího gelu je 10 %.

#### **4.2.1.2 Blot a imunoreakce**

Elektroblot proteinů z gelu na membránu z polyvinyliden fluoridu (PVDF) (Immobilon™ Transfer Membrane, Immobilon P) probíhá v blotovacím pufru pomocí stejnosměrného napětí o velikosti 15 V po dobu 90 min v elektroforetické vaně v blotovacím modulu.

Po přenosu se proteiny fixují v methanolu (15 s) a následně se nanese předinkubační směs, obsahující 5% sušené odtučněné mléko a 10% normální oslí sérum (NDS) v 0,05% Tween 20 v PBS. Po předinkubaci, která trvá 60 min se přidá protilátka

anti-c-Myb v poměru 1:30 000. Inkubace s protilátkou trvá 60 min. Vzorky se vyperou 3x10 min v 0,05% Tween 20 v PBS a aplikuje se sekundární protilátka anti-chicken konjugovaná s peroxidasou (Peroxidase-conjugated AffiniPure F(ab)<sub>2</sub> Fragment Donkey Anti Chicken IgY(IgG) H+L) ředěná 1:20 000 v 5% sušeném odtučněném mléku a 10% NDS v 0,05% v PBS po dobu 60 min. Vzorky se vyperou 3x10 min v 0,05% Tween 20 v PBS. Peroxidasa se detekuje reakcí, aplikací roztoku s 3,3-diaminobenzidinu tetrachloridu (DAB) po dobu 10–20 min. Po vyprání v destilované vodě se membrána vloží na 5 min do methanolu a nechá se uschnout.

#### **4.2.2 Imunocytologická reakce v buňkách tkáňové kultury transfekovaných genem *c-myb***

Pro transfekci bylo použito populace 3T3 embryonálních myších fibroblastů. Transfekční činidlo (GeneJammer® Transfection Reagent) se aplikuje dle návodu. Pro transfekci byla použita směs plasmidů pro expresi c-Myb a GFP zhruba v poměru 2:1.

Buňka, která byla úspěšně ovlivněna transfekčním činidlem, inkorporuje pravděpodobně oba plasmidy a následně spustí produkci obou proteinů (GFP a c-Mybu). Protein GFP (zelený fluorescenční protein) po ozáření světlem příslušné vlnové délky (395 nm) excituje záření o vlnové délce 508 nm (zelené). GFP aktivita je tak snadno ověřitelným měřítkem úspěšnosti transfekce. Většina buněk, které po transfekci začaly produkovat GFP, budou pravděpodobně produkovat i protein c-Myb.

Po odstranění kultivačního média se buňky fixují 30 min ve 4% PFA v PBS. Po fixaci se buňky několikrát vyperou v PBS a přibližně 5 min permeabilizují v PBS s 0,05% Tritonem X-100. Následuje blokace případných nespecifických vazeb v 1:10 NDS v 2% BSA přibližně 60 min. Po té se nanese protilátka anti-c-Myb v ředění 1:5000. Inkubace s protilátkou probíhá minimálně 15 hod při teplotě kolem 4 °C. Po několika vypráních v PBS se nanese na buňky protilátka sekundární, která je označena fluorescenční značkou Cy3 (Cy3 conjugated Affini Pure F(ab')<sub>2</sub> fragment donkey anti chicken IgY (IgG) H+L). Buňky se po skončení reakce a po vyprání v PBS zamontují do média pro fluorescenci, které obsahuje jaderné barvivo DAPI, vážící se na DNA a RNA (Vectashield mounting medium for fluorescence with DAPI).

Fluorescenční značení buněk je detekováno pomocí inverzního mikroskopu se sestavou vhodných filtrů (tab. 2).

## **4.2.3 Imunohistochemie v tkáňových řezech**

### **4.2.3.1 Fixace a další zpracování tkáně**

#### **4.2.3.1.1 Fixace paraformaldehydem a zalití do kryoprotektivního média**

Embrya se odebírají do zkumavek a fixují se 4% paraformaldehydem v 0,1 M K-fosfátovém pufru (KFP) 2 hodiny nebo 15 hod při teplotě 4 °C. Při teplotě 4 °C se provádí také další zpracování tkáně. Tkáň se pere v 0,1 M KFP po dobu minimálně 3x10 min. Následuje prosycení 7,5% sacharosou v 0,1 M KFP po dobu několika hodin nebo přes noc, prosycení 15% sacharosou přes noc a 30% sacharosou nejlépe přes noc nebo do doby než embrya klesnou na dno zkumavky. Tkáň se zalije do kryoprotektivního média (Tissue Tek O. C. T. Compound) a rychle se nechá zmrazit za pomoci tekutého dusíku. Vzorky se uchovávají v -20 °C. Bloček s tkání se nakrájí pomocí kryocutu při -20 °C na podložní skla předem potažená 0,01% poly-L-lysinem. Řezy se krájí silně 5 µm. Na skla nakrájená tkáň se nechá uschnout při laboratorní teplotě (LT) přibližně 2 hodiny nebo při teplotě 4 °C, při které se dá i krátkodobě (týdny) skladovat. Pro delší skladování se používá teplota -20 °C.

#### **4.2.3.1.2 Fixace paraformaldehydem a zalití do parafínu**

Odběr se provádí do zkumavek a embrya se fixují 4% paraformaldehydem v PBS po dobu 2 hod nebo 15 hod, fixace probíhá při 4 °C. Po té se tkáň vypere v PBS a odvodní se vzestupnou ethanolovou řadou (30, 50, 60, 70, 80, 90, 96, 100% ethanol). Doba odvodňování závisí na velikosti embrya. Pro myší embryo stáří ED 13,5 se aplikuje každý stupeň ethanolu po dobu 50 min, pro ED 14,5 po dobu 70 min.



Tkáň se odvodňuje nejlépe při teplotě 4 °C. Po odvodnění následuje prosycení benzenem při LT po dobu 3x10min. Pak následuje prosycení parafínem (Paraplast plus) v termostatu při teplotě 56–58 °C po 30 min se parafín vymění a dále se prosycuje 2x60 min. Tkáň se pak zalévá do parafínu (Paraplast plus) do připravených forem, nechá se vychladnout a uloží se do 4 °C.

Tkáň se krájí pomocí mikrotomu na 6 µm řezy. Řezy se natahují na podložní skla předem potažená 0,01% poly-L-lysinem, pomocí destilované vody nanesené na skla při teplotě kolem 42 °C. Když jsou řezy narovnané, voda se nechá vychladnout a odstraní se pomocí papírových ubrousků. Řezy se vysuší při 37 °C na ploténce a dále se suší při 42 °C několik hodin nebo přes noc. Řezy se můžou dlouhodobě skladovat při laboratorní teplotě

#### 4.2.3.1.3 **Fixace dle Serry a zalití do parafínu**

Odběr se provádí do zkumavek a embrya se fixují po dobu 2 hod nebo 15 hod, fixace probíhá při teplotě 4 °C.

Vzhledem k tomu, že fixativum dle Serry obsahuje 60% ethanol, odvodňuje se tkáň od 70% ethanolu. Další postup odvodnění a následné zalití do parafínu je stejný jako u fixace paraformaldehydem.

#### 4.2.3.1.4 **Fixace methacarnem a zalití do parafínu**

Methacarnem se tkáň fixuje 24 hod [Lukáš, *et al.*, 1997]. Tkáň se vypere ve 100% ethanolu a prosytí se benzenem 3x10 min. Další postup zalití do parafínu je stejný jako u fixace paraformaldehydem.

#### 4.2.3.2 **Odparafínování a rehydratace tkáně**

Parafínové řezy se zbavují parafínu v organickém rozpouštědle (Bio-clear) po dobu 5x5 min. Potom se řezy rehydratují pomocí sestupné ethanolové řady (100, 96, 80,

70% ethanol) a destilované vody po 3–5 min. Následuje praní v PBS 10 min a praní v detergentu 0,05% Tween 20 v PBS 5 min a konečné praní v PBS.

Tkáň, která byla zalita do kryoprotektivního média se pouze vypere 3x10 min v PBS.

### **4.2.3.3 Zpřístupnění antigenu**

#### **4.2.3.3.1 Zpřístupnění antigenu pomocí mikrovlnné trouby**

Podložní skla s řezy se vloží do plastické kyvety s citrátovým pufrem, pH 6 nebo 0,05 M Tris-HCl, pH 8 a při výkonu 750 W (teplota pufru je pak 100 °C) se působí mikrovlnným zářením po dobu 5x5 min v mikrovlnné troubě pro domácí použití (frekvence 2,45 GHz, tedy vlnová délka mikrovln je 12,24 cm). Potom se roztok nechá vychladnout asi 20 min a řezy se vypírají v PBS a v 0,05% Tween 20 nebo 0,1% Triton X-100 v PBS 10 min.

#### **4.2.3.3.2 Zpřístupnění antigenu pomocí zvýšené teploty ve vodní lázni**

Do vodní lázně při teplotě 100 °C se vloží podložní skla s řezy v plastické kyvetě s pufrem 0,05 M Tris-HCl, pH 8. Teplota pufru ve vodní lázni je tedy přibližně 70 °C. Proces probíhá 30 min. Po vychlazení pufru se řezy vypírají 10 min v PBS s 0,1% Tritonem X100 a v PBS.

#### **4.2.3.3.3 Zpřístupnění antigenu pomocí tlakové nádoby**

Tkáňové řezy se vloží do kyvety s destilovanou vodou a 30 min se vaří v tlakové nádobě.

### **4.2.3.4 Blokace endogenní peroxidasy**

Blokace endogenní peroxidasy se provádí v 0,6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v PBS. Tkáň se blokuje 25–30 min. Po té se tkáň vypere 2x5 min v PBS a permeabilizuje v 0,05 % Tween 20 v PBS.

#### **4.2.3.5 Blokace nespecifických vazeb**

Pro blokaci nespecifických vazeb se používá 2,5% BSA v PBS a 15–50% sérum z druhu zvířete, který byl imunizován pro tvorbu sekundární protilátky (tzv. předinkubační směs).

Tkáň se blokuje minimálně 90 min.

#### **4.2.3.6 Blokace endogenního avidinu/streptavidinu a biotinu**

V případě zesilování signálu pomocí avidin (streptavidin)/ biotinového systému se tkáň blokuje avidinem nebo streptavidinem (Avidin/biotin blocking kit, Streptavidin/biotin blocking kit). Ředí se 4 kapky na 1 ml předinkubační směsi po dobu minimálně 15 min. Po vyprání 3–5x5–10 min se blokuje roztokem biotinu ve stejném ředění a po stejnou dobu.

#### **4.2.3.7 Inkubace s primární protilátkou**

Polyklonální kuřecí nepřečištěná protilátka anti-c-Myb, která byla získána po imunizaci kura domácího) antigenem c-Myb, se ředí 1:50–1:20 000 v předinkubační směsi (15% NS v 2,5% BSA v PBS). Inkubace s protilátkou trvá 60 min při 27 °C a dále ještě přes noc (15 hodin) při 4°C. Kontrolou případné nespecifické vazby primární protilátky bylo použití preimunního séra ve stejném ředění jako protilátka anti-c-Myb. Pro ověření případné nespecifické vazby sekundární protilátky, případně nespecifické vazby avidinu či biotinu, se aplikuje místo specifické protilátky anti-c-Myb pouze samotná předinkubační směs. Po inkubaci se tkáň dostatečně vypere (3-5x10 min) a aplikuje se sekundární protilátka.

Pro ověření dostatečné blokace endogenní peroxidasy se aplikuje roztok se substrátem.

#### **4.2.3.8 Inkubace se sekundární protilátkou**

Protilátka anti-chicken konjugovaná s peroxidasou (Peroxidase-conjugated AffiniPure F(ab)<sub>2</sub> Fragment Donkey Anti Chicken IgY(IgG) H+L) se ředí 1:600.

Protilátka anti-chicken konjugovaná s Cy3 (Cy3-conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Donkey Anti Chicken IgY(IgG) H+L) se ředí v poměru 1:500.

Protilátka anti-chicken konjugovaná s biotinem (Biotin SP conjugated Affini Pure Goat anti-Chicken IgY) 1:600.

Protilátky se ředí v příslušné předinkubační směsi a inkubují se po dobu 75–90 min a to při LT.

#### **4.2.3.9 Zesílení pomocí avidin-biotin systému**

Po inkubaci protilátkou anti-chicken konjugovanou s biotinem (Biotin SP conjugated Affini Pure Goat anti-Chicken IgY) se tkáň několikrát vypere v PBS (3–5x5–10 min) a následuje inkubace s avidinem (streptavidinem), který se na biotin pevně váže. Pro fluorescenční detekci se použije streptavidin konjugovaný s TRITC v ředění 1:300. Pro detekci ve viditelném spektru extravidin konjugovaný s peroxidasou v ředění 1:100 v předinkubační směsi. Inkubace za laboratorní teploty trvá 25–30 min.

#### **4.2.3.10 Fluorescenční značení, jaderné značení, montáž a detekce**

Pokud je koncovou značkou fluorochrom, tkáň se vypere v PBS a zamontuje se do média pro fluorescenci, které obsahuje jaderné barvivo DAPI, vážící se na DNA a RNA (Vectashield mounting medium for fluorescence with DAPI).

Fluorescenční značení je detekováno pomocí mikroskopu se sestavou vhodných filtrů (tab. 2).

Tab. 2. Charakteristiky použitých fluorochromů

<i>fluorochrom</i>	<i>barva</i>	<i>absorbční maximum (nm)</i>	<i>emisní maximum (nm)</i>
DAPI	modrá	359	460
GFP	zelená	395	508
Cy3	červená	552	565
TRITC	červená	555	580

#### **4.2.3.11 Detekce navázané peroxidasy**

Konečné značení reakce pomocí sekundární protilátky nebo extravidinu konjugovanými s peroxidasou se dále detekuje histochemickou reakcí s roztokem 3,3-diaminobenzidinu tetrachloridu (DAB), která trvá 10 min. Řezy se po reakci vyperou v destilované vodě.

#### **4.2.3.12 Dobarvení jader pro optickou mikroskopii, montáž**

Tkáň se dobarví hematoxylinem (hematoxylin Mayerův) 10–20 s, případně se diferencuje kyselým ethanolem několik sekund a vypere se v tekoucí vodě 5–10 min. Po té se tkáňové řezy odvodní vzestupnou řadou ethanolů a po dobu 5 min se projasní v karbolxylenu. Nakonec se ještě projasní 2x3 min v xylenu a řezy se zamontují krycími skly pomocí média DePeX.

### **4.2.4 *In situ* hybridizace mRNA**

#### **4.2.4.1 Sterilizace a minimalizace možnosti degradace RNA**

Práce s RNA je velmi náročná vzhledem k nestabilitě RNA a všudypřítomným RNAsám, které ji degradují. RNasy si zachovávají svou aktivitu i po dlouhém vaření a autoklávování.

Pro práci s RNA se stále používají sterilní rukavice nebo rukavice ošetřené přípravky s denaturačními schopnostmi např. 0,1% SDS (dodecyl síran sodný). 0,1% SDS se v průběhu práce ošetřují také pracovní plochy.

K práci se používají komerční sterilní pomůcky na jedno použití (plastikové zkumavky, mikrozukavky, pipety apod.). Nádobí a používané nástroje se myjí v laboratorní myčce a oplachují se v destilované vodě, usuší se při 120 °C 2 hod, zabalí se do vhodných obalových materiálů jako je alobal a sterilizují se v termostatu při 180–200 °C 2–4 hod. Nástroje se ještě balí do materiálů propouštějících páru a autoklávují se. Autoklávování probíhá při teplotě 121 °C min po dobu 20 min a při tlaku 200 kPa (2 atm) nebo při odpovídající teplotě, tlaku a expozici sterilizace. Autoklávuje se i nádobí, které nelze sterilizovat horkým vzduchem v termostatu.

Roztoky se připravují z čistých chemikálií a z vody ošetřené DEPC (diethylpyrokarbonát) a pak jsou autoklávovány. Určité roztoky se neautoklávují (např. roztoky obsahující SDS). Všechny operace s tkání a s používanými reagensy se provádějí v chladu.

#### **4.2.4.2 *In situ* hybridizace mRNA *c-myb* v celých embryích**

Pro práci se používají sterilní pipety, nástroje a nádobí a dodržují přísné podmínky, zabraňující kontaminaci RNAsami, a to až do praní po hybridizaci.

Embrya se odebírají do sterilních plastikových mikrozukavek. Odebraná tkáň se fixuje 4% PFA v PBT přes noc při 4 °C.

Tkáň se pere v PBT 2x10 min při 4 °C, při houpání. Dále se tkáň dehydratuje s 50% methanolem v PBT 10 min a 100% methanolem 2x10 min, endogenní fosfatasa se blokuje v 6% peroxidu vodíku ředěném v methanolu po dobu 30 min, po té se znovu vypere ve 100% methanolu 10 min. V této fázi po nebo už před blokací peroxidem vodíku je možné tkáň několik týdnů uchovávat při –20 °C (v methanolu, případně ethanolu) [Rosen, Beddington, 1993]. Následně se tkáň rehydratuje s 50% methanolem v PBT 10 min a PBT 10 min.

Embrya se natravují proteínasou K v koncentraci 20 µg/ml [Panoskaltis-Mortari, Bucy, 1995] při laboratorní teplotě (LT) a 37 °C [Correia, Conlon, 2001] aby se usnadnila penetrace sondy do tkáně dle stáří (velikosti) embrya. Pro myší embryo ED 13,5 po dobu 36 min při LT, pro ED 14,5 po dobu 36 min při LT a zároveň ještě 10 min při teplotě 37 °C.

Tkáň se vypere v PBT 5 min a refixuje se 4% PFA v PBT s 0,25% glutaraldehydem, několikrát se vypere v PBT a aplikuje se hybridizační směs při 70 °C a při houpání. Po 1–2 hodinách se hybridizační směs vymění a druhý den se přidá protismyslná (antisense) sonda proti genu *c-myb* o délce 1100 basí a koncentraci 60 ng/ml. Pro negativní kontrolu se ve stejné koncentraci přidá smyslná (sense) sonda. Hybridizace se provádí při 65 °C po dobu 60 hod. Hybridizační směs se sondou se odsaje a uchová se pro případné další použití při -20°C. Tkáň se po hybridizaci vypírá v 2x SSC při 70 °C 20 min, 2x SSC s 0,2% CHAPS při 70 °C 3x20 min a 0,2x SSC s 0,2% CHAPS 3x 20 min. Následující histochemická reakce by měla probíhat ve skleněných nádobkách, protože v plastickém nádobí může dojít ke vzniku sraženin [Wilkinson, Nieto, 1993]. Následuje praní v KTBT 2x10 min a 2–4 hod blokace případných nespecifických vazeb 15% normálním oslím sérem (NSS) v KTBT. NSS bylo tepelně inaktivováno 5 min při 65 °C. Po blokaci se aplikuje protilátka proti digoxigeninu konjugovaná s alkalickou fosfatásou (anti-digoxigenin-AP) (koncentrace 750 U/ml) v ředění 1:2 500 v 15% NSS v KTBT, inkubuje se přes noc na rotátoru při 4 °C, po té se tkáň pere přibližně 5x v intervalu 1–2 hodin a dále přes noc. Další den se vypere v alkalickém pufru NTMT 2x15 min při laboratorní teplotě, barví se ve tmě přidáním substrátů BCIP a NBT do NTMT za kontroly pod preparačním mikroskopem po dobu několik hodin. Po vybarvení se barvicí reakce zastaví v PBS a fixuje se v 4% PFA v 1x PBS. Vzorky lze ve fixativu dlouhodobě skladovat při 4 °C.

#### 4.2.4.2.1 Nakrájení tkáně a dobarvení jader po ISH mRNA

Vzorky se vyperou v PBS nebo 0,1 M K-fosfátovém pufru (KFP). Následně se několik hodin nebo přes noc prosycují postupně 7,5, 15 a 30% sacharosou v 0,1 M KFP. Po prosycení se zalije tkáň do kryoprotektivního média (Tissue Tek O. C. T. Compound) za velmi nízké teploty pomocí tekutého dusíku. Tkáň se nakrájí na

mikrotomu na řezy silné 12–20  $\mu\text{m}$  na podložní skla. Řezy se nechají při laboratorní teplotě 1–2 hod schnout.

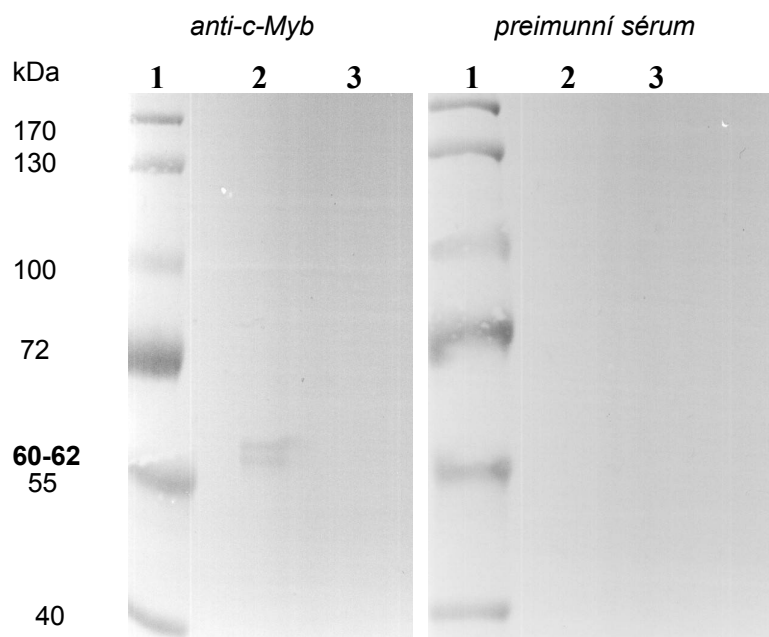
Řezy se dobarví jádrovou červení (20 s) a zamontují se do média rozpustného ve vodě (Kaiserova glycerinová želatina pro mikroskopii).



## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Specifita protilátky anti-c-Myb testovaná metodou western blot

Otiskem proteinů po elektroforese pomocí metody western blot a následnou aplikací protilátky anti c-Myb byla ověřena specifita vazby s proteinem c-Myb (obr. 5). Protein c-Myb, respektive jeho část bez DNA vazebné domény, byl syntetizován pomocí plasmidu pET15B-c-myb $\Delta$ DNA bd genu pro c-Myb vneseného do bakterie *E. coli* BL21.



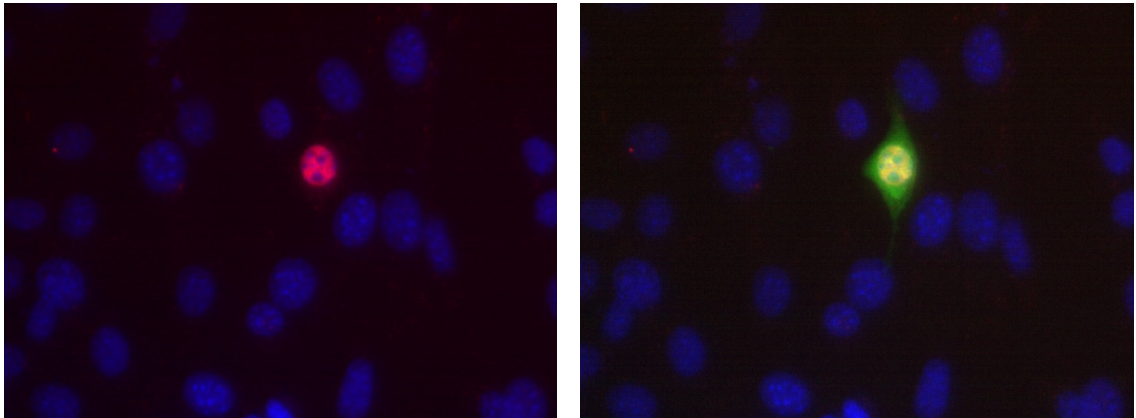
Obr. 5. Výsledek metody western blot, vlevo s inkubací protilátkou anti-c-Myb, vpravo s preimunním sérem. 1) Marker (PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder) o známé molekulové hmotnosti (kDa). 2) c-Myb produkovaný bakterií *E. coli* BL21. 3) *E. coli* XL1-Blue bez produkce c-Mybu (negativní kontrola). Inkubace s protilátkou anti-c-Myb (vlevo) pozitivní ve sloupci 2 tzn. c-Myb produkovaný bakterií *E. coli* BL21, který má předpokládanou molekulovou hmotnost přibližně 60 a 62 kDa.

Protože vnesený plasmid kóduje neúplnou sekvenci *c-myb* bez DNA vazebné domény, měla být molekulová hmotnost takto syntetizovaného (neúplného) proteinu c-Myb nižší (přibližně 60 kDa) než molekulová hmotnost celého proteinu (75 kDa). Ve výsledku imunoreakce s protilátkou anti c-Myb byly odečteny 2 pozitivní proužky přibližně o molekulové hmotnosti 60 a 62 kDa. Druhý proužek o nižší molekulové hmotnosti je pravděpodobně degradačním produktem fragmentu c-Myb. Reakce s preimunním sérem byla negativní. Negativní byla i inkubace protilátky i preimunního séra s lyzátem bakterií *E. coli* XL1-Blue bez vloženého plasmidu.

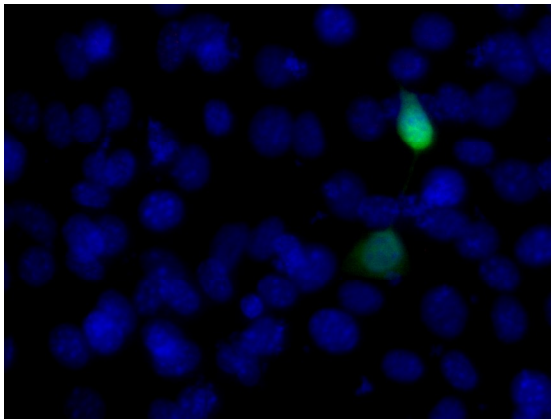
## 5.2 Použití protilátky anti-c-Myb pro imunocytochemii

Pomocí transfekčního činidla (GeneJammer® Transfection Reagent), byla provedena transfekce myších embryonálních fibroblastů směsí plasmidů s geny pro GFP a c-Myb v poměru 2:1. Většina buněk, které po transfekci začaly produkovat GFP by zároveň měla produkovat i protein c-Myb.

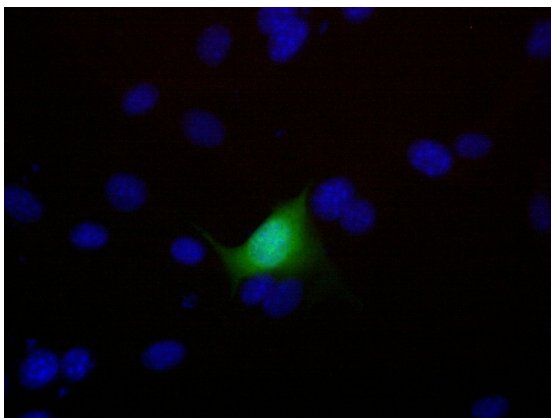
Transfekované fibroblasty byly po 30 min fixaci 4% PFA v PBS inkubovány 15 hod při teplotě 4 °C s protilátkou anti-c-Myb (obr. 6) a také s preimunním sérem jako negativní kontrolou (obr. 7). Pro negativní kontrolu případné nespecifické vazby sekundární protilátky, byly buňky inkubovány pouze v předinkubační směsi (obr. 8). Obě negativní kontroly byly bez nežádoucí nespecifické reakce. Protilátka anti-c-Myb vykazovala jasnou silnou pozitivitu v reakci s transfekovanými buňkami při ředění 1:5 000.



Obr. 6. Anti-c-Myb (Cy3-červená). Jádra jsou označena DAPI (modrá) Při složení obrázku s lokalizací GFP (zelená) (obrázek vpravo), je výsledná kolokalizace c-Myb a GFP (oranžová).



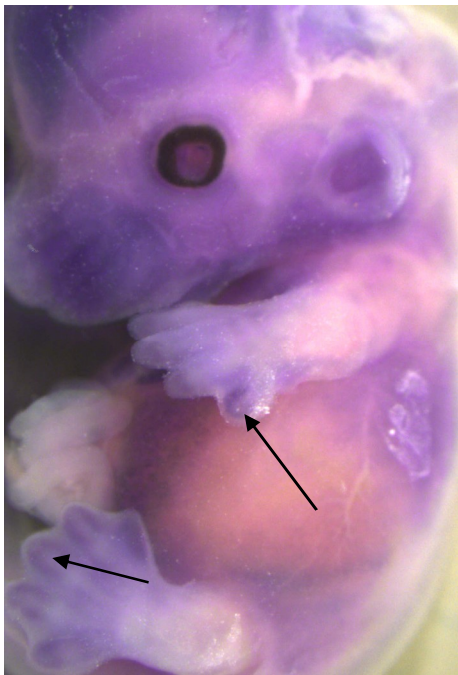
Obr. 7. Preimunní sérum (Cy3-červená) je negativní, pomocí DAPI (modře) jsou znázorněna jádra. Zeleně (GFP) jsou označeny c-Myb transfekované buňky.



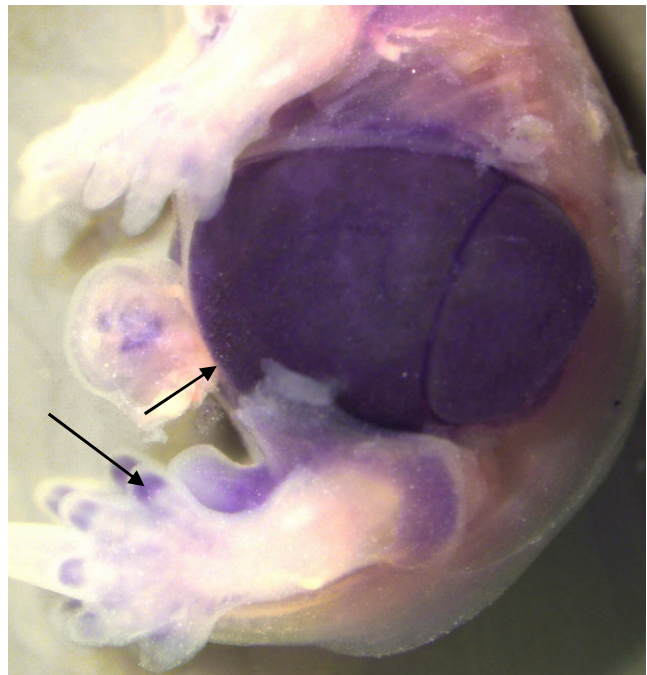
Obr. 8. Negativní kontrola pro detekci nespecifické vazby sekundární protilátky označené Cy3 (červená) a případnou autofluorescenci. Zeleně (GFP) jsou označeny c-Myb transfekované buňky.

### 5.3 *In situ* hybridizace mRNA *c-myb*

Pomocí *in situ* hybridizace v celých embryích byla ověřena lokalizace genu *c-myb* v celých myších embryích stáří ED 13,5–14,5. S použitím protismyslné (antisense) *c-myb* sondy byla detekována pozitivita v játrech a distální části prstů končetin u myši ED 13,5 (obr. 9) a 14,5 (obr. 10). Tyto tkáně byly v reakci s negativní kontrolou se smyslnou (sense) *c-myb* sondou negativní.



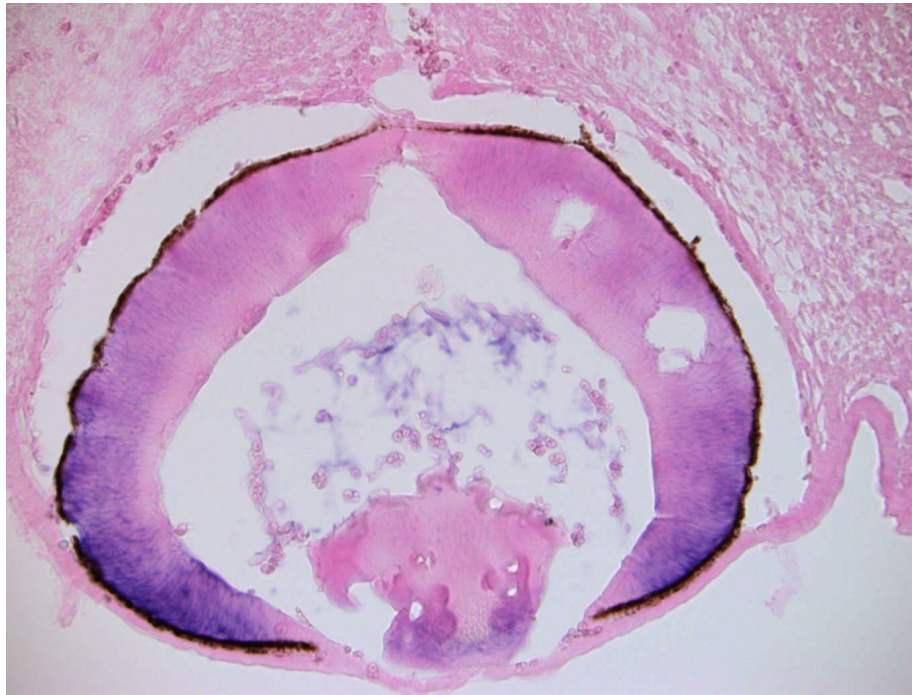
Obr. 9. ED 13,5



Obr. 10. ED 14,5

Obr. 9 a 10. Celá embrya po reakci ISH mRNA *c-myb* ED 13,5 (obr. 9) a ED 14,5 (obr. 10) s pozitivitou v distální části prstů končetin a v játrech (šipky).

Embrya ED 13,5 byla po ukončení reakce ISH převedena do kryoprotektivního média, nakrájena a dobarvena jádrovou červení (obr. 11–18). Cílem bylo lépe srovnat tyto výsledky s výsledky, které byly publikovány a které byly získány na řezech, nikoliv v celých embryích. Pozitivita v řezech byla detekována v nervových buňkách sítnice oka (obr. 11 a 12), v nasální oblasti, ve vyvíjejícím se vomeronasálním orgánu (obr. 13–15), ve folikulu hmatového chlupu (obr. 16 a 17) a v subperitoneální části jater (obr. 18). Hluběji uložené tkáně u nichž byla také popsána exprese *c-myb* byly bez signálu.



Obr. 11. Pozitivní výsledek ISH mRNA *c-myb* (modrá) v nervových buňkách sítnice oka. embrya myši ED 13,5. Jádra jsou dobarvena jádrovou červení.



Obr.12. (detail obr. 11) Pozitivní výsledek ISH mRNA *c-myb* (modrá) v nervových buňkách sítnice oka (detail) u embrya myši ED 13,5. Jádra jsou dobarvena jádrovou červení.



Obr. 13

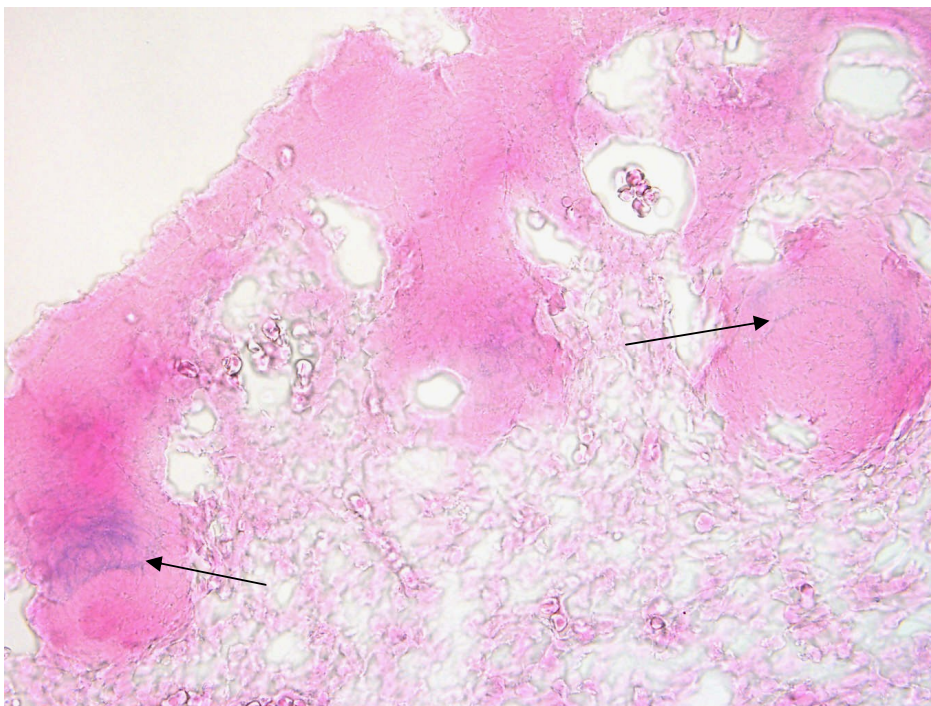


Obr. 14

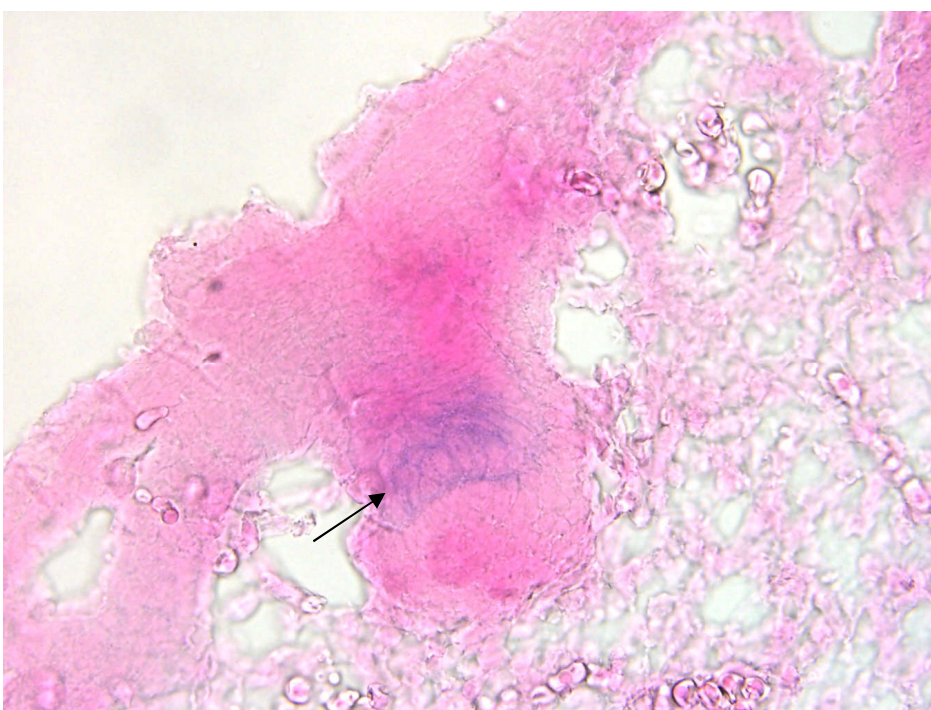


Obr. 15

Obr. 13–15. Pozitivní výsledek ISH mRNA *c-myb* (modrá) v čichové oblasti nosní sliznice (vomeronasální orgán) u embrya myši ED 13,5 (šipka). Jádra jsou dobarvena jádrovou červení.

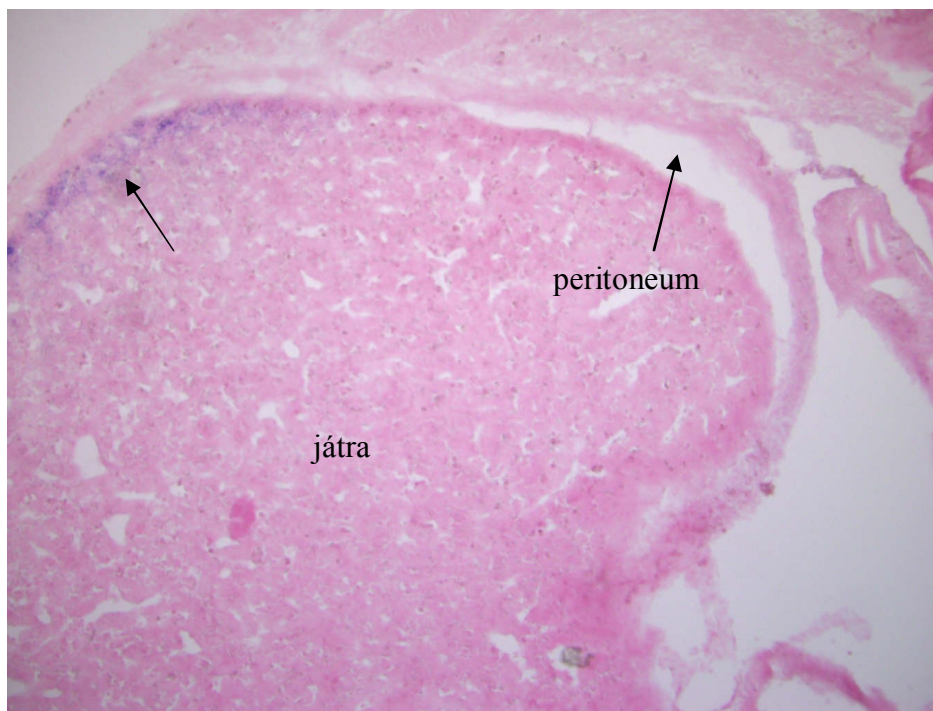


Obr. 16



Obr. 17. detail obr. 16

Obr. 16 a 17. Pozitivní výsledek ISH mRNA *c-myb* (modrá) ve folikulu hmatového chlupu embrya myši ED 13,5 (šipky). Jádra jsou dobarvena jádrovou červení.



Obr. 18. Pozitivní výsledek ISH mRNA *c-myb* (modrá) v subperitoneální části jater embrya myši ED 13,5 (šipka). Jádra jsou dobarvena jádrovou červení.

## 5.4 Reaktivita protilátky anti-c-Myb v tkáňových řezech

Výsledky získané pomocí ISH mRNA *c-myb* spolu s literárními údaji sloužily jako podklad ke stanovení několika typických, referenčních úrovní řezu embrya, ve kterých se dá očekávat přítomnost proteinu c-Myb a které byly tedy vhodné pro testování imunoreaktivity anti c-Myb protilátky. Byly to:

1. transversální řez hlavou embrya v úrovni oka s předpokládanými pozitivitami: čichový epitel nosní sliznice (literární údaje), folikul hmatového chlupu (dle získaných výsledků v této práci), vomeronasální orgán a retina (dle získaných výsledků popsaných v této práci a zároveň literárních údajů)
2. transversální řez v horní části hrudníku s předpokládanou lokalizací proteinu c-Myb: trachea, epitel bronchů (dle literárních údajů)



3. transversální řez embryem v oblasti břišní dutiny s předpokládanými pozitivitami: játra (dle získaných výsledků popsaných v této práci i literárních údajů), slezina, ledviny, krypty a klky střeva (literární údaje)

Byly vyzkoušeny různé způsoby fixace, byly vyzkoušeny různé metody zpřístupnění antigenu. Testováno bylo také zesílení signálu pomocí avidin-biotin komplexu (viz tab. 3). Každá reakce byla opakována nejméně třikrát.

### 5.4.1 Fixace tkáně a odhalení antigenu

Nejlepšího výsledku bylo dosaženo pomocí fixace dle Serry po dobu 2 nebo 15 hod bez potřeby odhalení antigenu (obr. 19–30).

Ne tak dobrý výsledek reakce byl získán s použitím fixace tkáně 4% PFA po dobu 2 hod (obr. 31–33) či pomocí fixace methacarn po dobu 24 hod (obr. 34–38). Tyto způsoby fixace vykazovaly určité pozadí, poměr signálu a šumu nebyl tedy optimální. V případě použité fixace pomocí 4% PFA bylo nutné odmaskovat antigen varem ve vodní lázni v pufru 0,05 M Tris, pH 8. Srovnatelného výsledku bylo dosaženo užitím parafinových i zmražených řezů. Struktura zmražených řezů byla vždy mnohem horší. Pro účely lokalizace proteinu v řezech celým embryem jsou klíčové parafinové řezy.

Stejný výsledek vykazovala i fluorescenčně označená sekundární protilátka. Její použití však vzhledem k autofluorescenci tkáně, zejména jater a krevních elementů bylo méně vhodné.

Pozitivita byla nalezena v játrech v buňkách hematopoetické řady (obr. 22), v nervových buňkách retiny (obr. 29, 31, 32), čichovém epitelu nosní sliznice (obr. 25, 26, 33), vomeronasálním orgánu (obr. 33, 36, 38) a v krevních buňkách a nově též u skupiny buněk v neurální trubici, odpovídající pravděpodobně pregangliovým neuronům autonomního systému (obr. 19, 21, 34) a nově také mezi paprsky prstů (obr. 27 a 28). V ostatních *c-myb* exprimujících tkáních (bronchy, klky a krypty střeva) však pozitivita prokázána nebyla.

Přes určité přetrvávající pozadí, které se nepodařilo zcela vyblokovat, lze tento signál považovat za specifický.

K blokaci nespecifických vazeb bylo použito 2,5% BSA a 15% normální sérum ze stejného druhu zvířete, který byl imunizován pro výrobu sekundární protilátky (NGS nebo NDS). Předinkubace s touto směsí trvala vždy minimálně 90 min při laboratorní teplotě, tato směs byla použita pro ředění primární i sekundární protilátky. Přesto se nepodařilo zcela zamezit nespecifickým vazbám a určitý šum (pozadí) je zřetelný zejména u fixace 4% PFA a methacarnu.

Porovnávány byly tři různé metody zpřístupnění antigenu. Var tkáně v tlakové nádobě v destilované vodě pravděpodobně úplně denaturoval epitopy ve tkáni, tkáň nevykazovala žádnou pozitivitu. Naopak po použití mikrovlnné trouby či varem ve vodní lázni v pufru 0,05 M Tris, pH 8 byly antigenní determinanty, což bylo zásadní zejména po fixaci PFA. Struktura tkáně po odmaskování pomocí mikrovln vykazovala určité deformace, proto byl nejlepším způsobem odhalení antigenu var ve vodní lázni v 0,05 M Tris, pH 8.

Ředění protilátky bylo stanoveno na 1:5 000–1:10 000, kdy je poměr signálu a šumu (nespecifické vazby) relativně optimální. Nejlépe se osvědčila inkubace s protilátkou v trvání 60 min při laboratorní teplotě s následující prodlouženou inkubací přes noc (15 hod) při teplotě 4 °C.

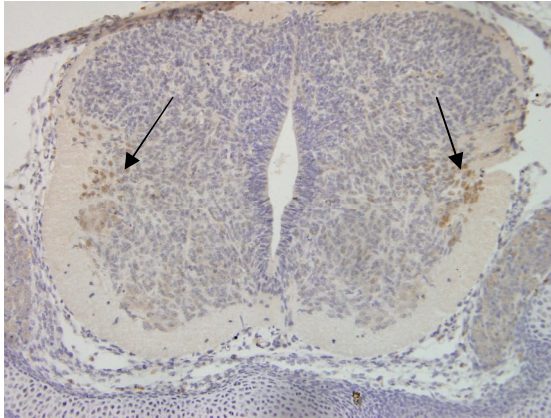
Při delší fixaci tkáně pomocí PFA (15 hod) se nepodařilo antigen detekovat vůbec.

## 5.4.2 Amplifikace signálu

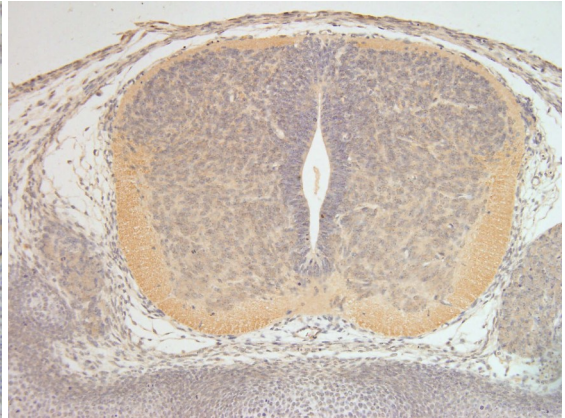
Metoda amplifikace signálu zároveň zvýšila také nespecifické vazby. Ředění protilátky anti-c-Myb pak bylo vhodné zvýšit v rozmezí 1:15 000–1:20 000. Amplifikace signálu žádný nový výsledek ani zřetelné zlepšení signálu nepřinesla.

Tab. 3. Vývojový diagram postupu optimalizace imunohistochemické reakce průkazu anti-c-Myb protilátky.

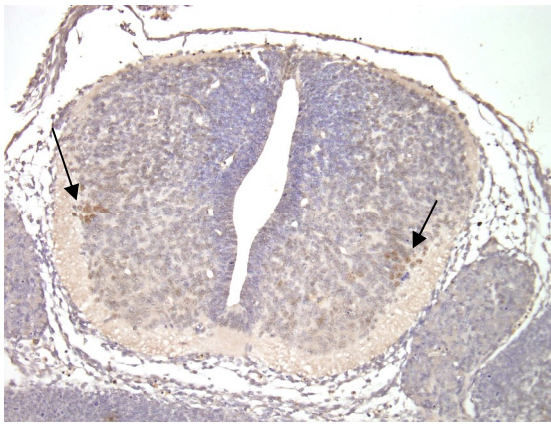
způsob fixace	doba fixace	zpřístupnění antigenu (var ve vodní lázni v pufru 0,05 M Tris, pH 8)	avidin-biotin systém	výsledek
4% PFA	2 hod	ano	ano	+
			ne	+
		ne	ano	-
			ne	-
	15 hod	ano	ano	-
			ne	-
		ne	ano	-
			ne	-
dle Serry	2 hod	ano	ano	+
			ne	+
		ne	ano	+
			ne	+
	15 hod	ano	ano	+
			ne	+
		ne	ano	+
			ne	+
methacarn	24 hod	ano	ano	+
			ne	+
		ne	ano	+
			ne	+



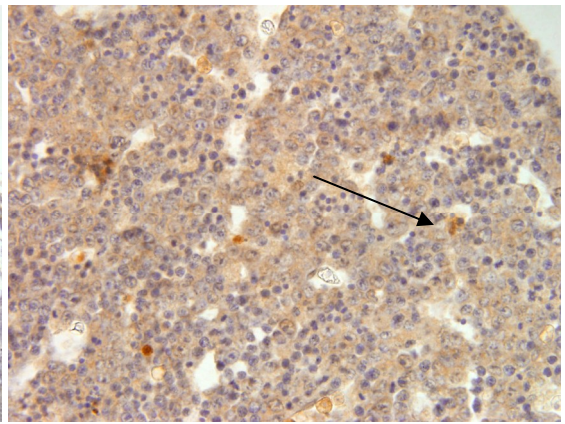
Obr. 19. Anti-c-Myb, neurální trubice.



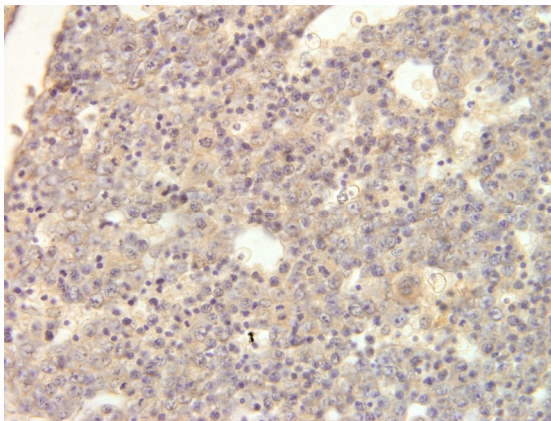
Obr. 20. Preimunní sérum, neurální trubice.



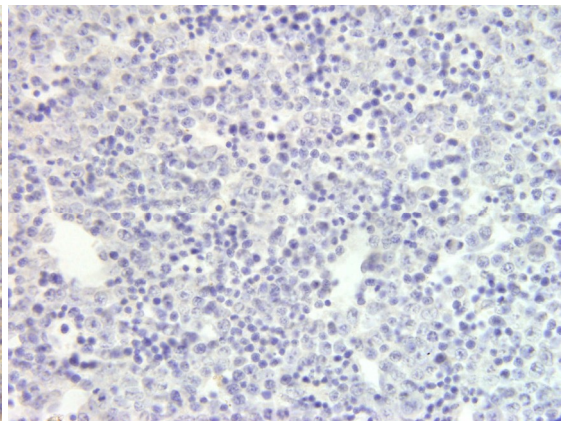
Obr. 21. Anti-c-Myb, neurální trubice.



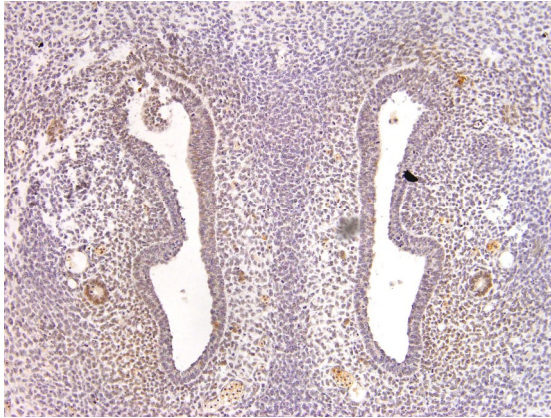
Obr. 22. Anti-c-Myb, játra.



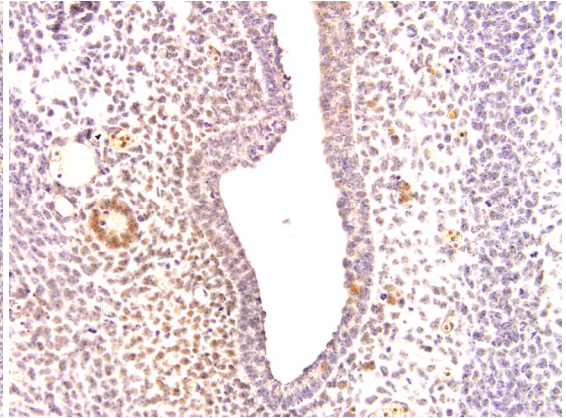
Obr. 23. Preimunní sérum, játra.



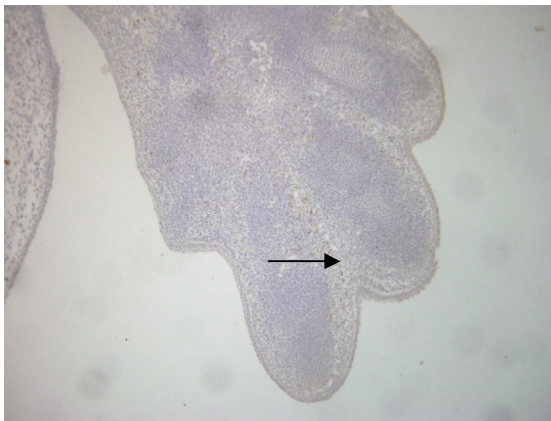
Obr. 24. Negativní kontrola pro sekundární protilátku, játra.



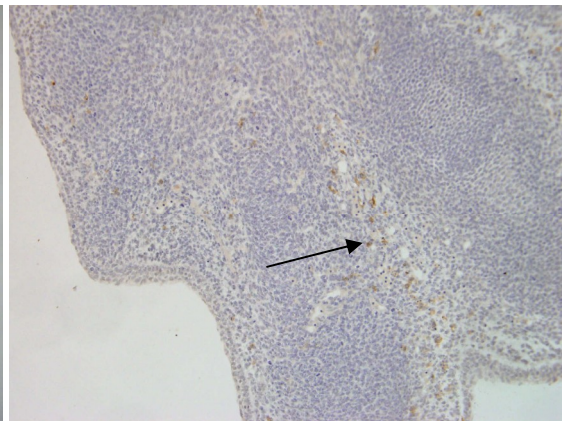
Obr. 25. Anti-c-Myb, čichová oblast  
nosní sliznice.



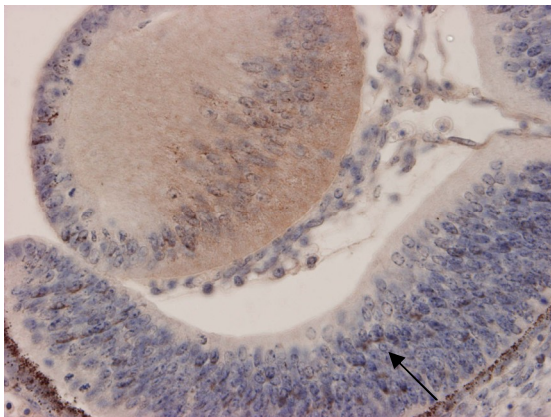
26. Detail obr. 25.



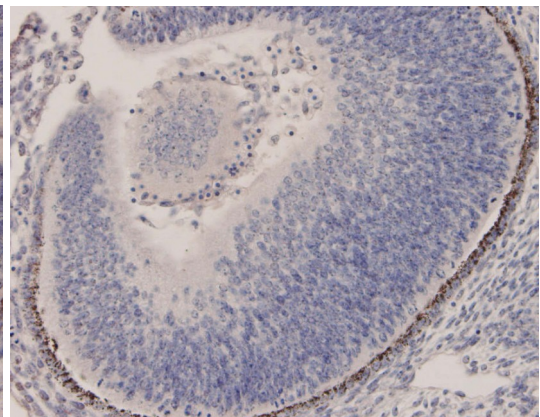
Obr. 27. Anti-c-Myb, přední končetina.



Obr. 28. Detail obr. 27, pozitivita mezi paprsky  
prstů (šipka).



Obr. 29. Anti-c-Myb, sítnice oka (šipka).

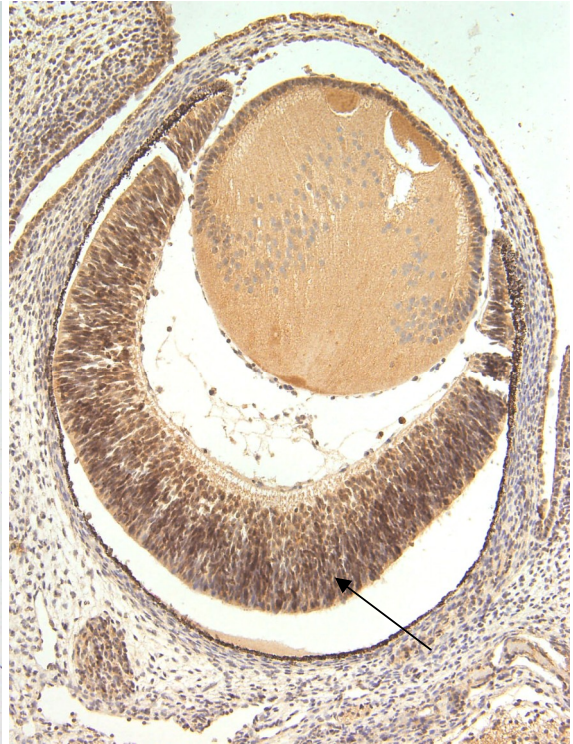


Obr. 30. Preimunní sérum (negativní).

Obr. 20–30. Fixace dle Serry (2 a 15 hod). Pozitivity jsou označeny hnědě (DAB), jádra jsou dobarvena hematoxylinem (modrá). Embrya myši ED 13,5 (obr. 21. ED 14,5).



Obr. 31. Anti-c-Myb, oko.

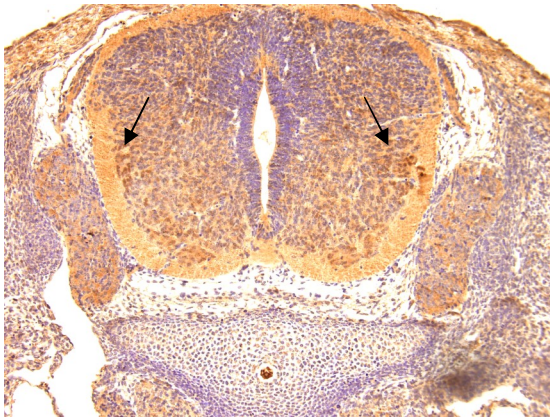


Obr. 32. anti-c-Myb, nerv. buňky sítnice (šipka).

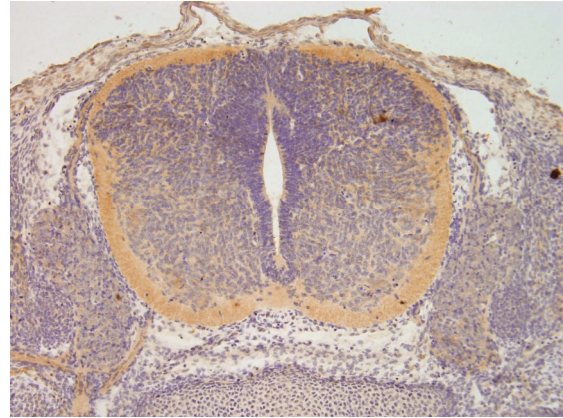


Obr. 33. Anti-c-Myb, čichová oblast, VO.

Obr. 31–33. Fixace 4% PFA (2 hod), po zpřístupnění antigenu. Pozitivity jsou označeny hnědě (DAB), jádra jsou dobarvena hematoxylinem (modrá). Embrya myši ED 13,5.



Obr. 34. Anti-c-Myb, neurální trubice.



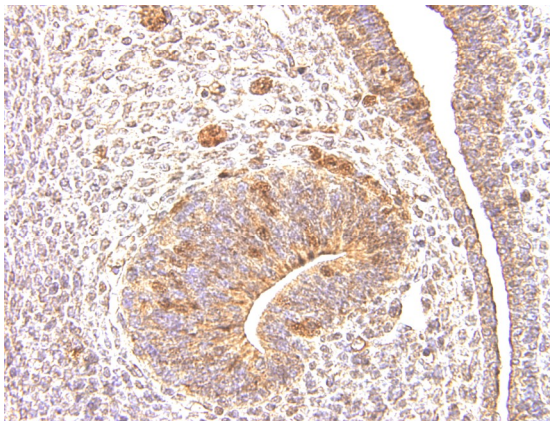
Obr. 35. Preimunní sérum, neurální trubice.



Obr. 36. Anti-c-Myb, vomeronasální orgán (VO)



Obr. 37. Preimunní sérum, VO.



Obr. 38. Anti-c-Myb, detail obr. 36.

Obr. 34–38. Fixace methacarn (24 hod). Pozitivity jsou označeny hnědě (DAB), jádra jsou dobarvena hematoxylinem (modrá). Embrya myši ED 13,5.

## 6 DISKUSE

Cílem této práce bylo otestovat použitelnost protilátky pro imunohistochemické znázornění. Před tímto úkolem stojí pracovníci imunohistochemických laboratoří poměrně často. Mají k dispozici protilátku proti antigenu svého zájmu, ať již nově připravenou či komerčně dostupnou. Velmi často nejsou ale k dispozici další údaje, jako použitelnost pro jiné metody než je western blot (imunoprecipitace, imunocytochemie, imunohistochemie), tím méně přímo doporučené konkrétní protokoly, jako tomu bývá u některých vyzkoušených protilátek, kdy je doporučen a vyzkoušen způsob fixace, metoda zalití i koncentrace protilátky.

V prvním kroku byla ověřena metodou western blot specifita protilátky anti-c-Myb.

Ve druhém kroku byla demonstrována bezproblémovost použitelnosti protilátky pro imunocytochemickou reakci. K ní bylo použito fragmentem genu *c-myb* transfekované fibroblasty. V tomto experimentálním uspořádání fibroblasty produkují příslušný protein v daleko větším množství, než by odpovídalo fyziologickým situacím, což může významně zjednodušit jeho dostupnost pro vazbu s protilátkou. Nebyla testována linie buněk, o které by bylo známo, že produkuje spontánně c-Myb.

Vzhledem k tomu ale, že většina těchto linií je odvozena z malignit krevních řad, produkují také c-Myb deregulovaně a v nadbytku. Například buněčná linie Jurkat, doporučená některými výrobci protilátek jako pozitivní kontrola pro western blot, je odvozená z T buněčné akutní lymfoblastické leukémie. Svou nadprodukcí c-Myb se tyto linie podobají spíše v této práci užitým modelům, než buňkám *in vivo* produkujícím fyziologické hladiny proteinu c-Myb.

Provedená ISH mRNA *c-myb* na celých embryích měla sloužit k vytipování tkání s očekávanou přítomností proteinu znázornitelnou vazbou s protilátkou. Následné nakrájení preparátu umožnilo porovnání s publikovanými výsledky získanými mRNA ISH na tkáňových řezech. Bohužel nevýhodou ISH na celých embryích je, že penetrace sondy do hloubky tkáně nebývá moc dobrá. To se potvrdilo i v tomto případě a tkáň uložená hlouběji uvnitř těla byla zcela bez signálu. Tak byly jen dílčím způsobem



potvrzeny údaje z literatury. Výhodou ISH v celých embryích však je, že dávají dobrý souhrnný přehled exprese. Tak bylo možné pozorovat expresi *c-myb* v končetině, což nebylo (alespoň dle dostupných literárních pramenů) ještě nikde popsáno.

Dosažené výsledky použití protilátky na řezech nebyly zcela uspokojivé. Žádnou z použitých variant fixace a zpřístupnění antigenu a zesílení signálu nebyly získány pozitivita ve všech tkáních, kde je popisována exprese genu *c-myb*.

Pouze při užití některých variant fixace a event. po odmaskování antigenu byl dosažen opakovaně signál, který lze považovat za specifický, přestože byl zatížen určitým pozadím (nespecifickým signálem). Toto pozadí nebylo možné žádnými způsoby eliminovat. O další snížení nespecifických vazeb by bylo možné se pokusit purifikací protilátky pomocí metody ionexové nebo afinitní chromatografie, případně získáním a použitím protilátky monoklonální.

Pozitivita v nervových buňkách sítnici, v hematopoetických buňkách jaterní tkáně, ve vomeronasálním orgánu a v čichovém epitelu nosní sliznice odpovídají místům exprese *c-myb*. Navíc byly detekovány pozitivita v paprscích prstů a také ve skupině buněk v laterální části šedé hmoty míchy, odpovídající pravděpodobně lokalizaci pregangliových neuronů autonomního systému. Naopak nikdy nebyly pozorovány pozitivita v epitelu trachey a bronchů, ve střevě, v ledvině, tedy v orgánech v kterých je exprese genu také popisována [Ess, *et al.*, 1999, Sitzman, *et al.*, 1995].

Proč se výsledky exprese genu *c-myb* a imunohistochemického znázornění proteinu c-Myb neshodují ve všech tkáních nelze zcela vysvětlit. Lze se domnívat, že vzhledem k mnoha možným úrovním posttranskripční regulace přítomnost mRNA v tkáni nutně neznamená, že protein je v ní přepisován, nebo jeho přepis může nastartovat až s velkým odstupem i několika dnů. Naopak populace buněk v nervové trubici, která je znázorněna užitím protilátky, je tvořena relativně málo početnou skupinou buněk a při radioaktivní mRNA ISH mohla uniknout pozornosti [Ess, *et al.*, 1999, Sitzman, *et al.*, 1995]

K dispozici není žádná přesvědčivá práce, která by demonstrovala imunohistochemickou reakci s protilátkou anti-c-Myb na myší tkáni, s kterou by bylo možné dosažené výsledky porovnat. Existuje jen několik prací, využívajících imunohistochemii na lidském materiálu, většinou v nádorové tkáni. To může naznačovat nezáměr o tuto problematiku, avšak vzhledem k tomu, že v medicínské

databázi PubMed (Medline) je pod klíčovým slovem c-Myb publikováno k dnešnímu dni 1761 odborných článků, zdá se pravděpodobnější, a to naznačuje i tato práce, že je imunohistochemický průkaz proteinu c-Myb velmi obtížný.

Tato práce ukazuje, že protilátka velmi dobře použitelná pro metodu western blot a pro imunocytochemii nemusí být bezproblémově použitelná pro imunohistochemii. Každá tato metoda je natolik odlišná, že dle výsledků jedné z nich nelze usuzovat na obecnou použitelnost protilátky.

## 7 ZÁVĚR

- Metodou western blot byla ověřena specifita protilátky anti-c-Myb.
- Protilátka je dobře použitelná pro imunocytochemii v jednotlivých buňkách. Ředění protilátky je 1:5 000.
- Exprese genu byla ověřena pomocí techniky *in situ* hybridizace (ISH) mRNA *c-myb* v celých embryích. Pomocí techniky ISH mRNA byla identifikována ještě nepublikovaná exprese genu *c-myb* v distální části prstů a exprese ve folikulu hmatového chlupu již u embryonálního stádia ED 13,5.
- Pomocí imunohistochemické techniky byl lokalizován protein c-Myb v jaterních hematopoetických buňkách, nervových buňkách sítnice oka, vomeronasálním orgánu, v čichové oblasti nosní sliznice a také mezi paprsky prstů a v neurální trubici.

Pro imunohistochemický průkaz proteinu c-Myb doporučuji na základě této práce tento postup:

1. Fixace tkáně 4% PFA v PBS musí být krátká (2 hod), pro delší fixace (15 až 24 hod) je vhodná fixace pomocí fixativa dle Serry a methacarnu a to při teplotě 4 °C.
2. Nejlepší způsob fixace je dle Serry, kdy je poměr signálu a šumu optimální.
3. Protein c-Myb musí být po fixaci 4% PFA zpřístupněn nejlépe metodou varu ve vodní lázni v 0,05 M Tris, pH 8 po dobu 30 min.
4. Pro snížení nespecifických vazeb (pozadí) se do předinkubačního roztoku a veškerých inkubací s protilátkami přidá 2,5% BSA a 15% normálním sérum druhu zvířete, který byl imunizován pro tvorbu sekundární protilátky.
5. Ředění této protilátky anti-c-Myb je 1:5 000–1:10 000, v případě následného zesílení pomocí komplexu avidin-biotin je lépe zvýšit na 1:10 000–1:15 000. Inkubace s protilátkou trvá 60 min při laboratorní teplotě a ještě minimálně 15 hod při teplotě 4 °C.

Podrobný protokol viz příloha 4.

Pro testování imunohistochemické reakce s neznámou protilátkou doporučuji na základě výsledků této práce tento obecný postup:

Vyzkoušet různé typy fixace (aldehydová, nealdehydová). Použít různou dobu fixace, kratší (1–2 hod) i delší (15–24 hod).

U protilátky o neznámé koncentraci použít ředění v rozmezí 1:50 až 1:20 000.

Při neúspěchu použít metodu odhalení antigenu, případně některou z nepřímých metod zesílení signálu reakce.

## 8 LITERATURA

AVRAMEAS, S., URIEL, J. Méthode de marquage d'antigène et d'anticorps avec des enzymes et son application en immunodiffusion. *C R Acad Sci Paris Sér.* 1966, no. 262, s. 2543–2545.

BARTUŇKOVÁ, J., et al. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 1. vyd. Sv. 1. Praha : Grada Publishing, 2005. ISBN 80-247-0691-1. Metody užívané k vyšetřování složek humorální imunity, s. 43–63.

BOBROW, M. N., et al. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods*. 1989, no. 125, s. 279–285.

BONDI, A., et al. The use of beta-galactosidase as a tracer in immunocytochemistry. *Histochemistry*. 1982, vol. 76, no. 2, s. 153–158.

CATTORETTI, G., et al. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol*. 1993, 171, s. 83–98.

COONS, A. H., CREECH J. H, JONES, R. N. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1941, 47, s. 200–202.

COONS, A. H., KAPLAN, M. H. Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med*. 1950, vol. 91, no. 1, s. 1–13.

COONS, A. H., LEDUC, E. H., CONNOLLY, J. M. Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. *J Exp Med*. 1955, vol. 102, no. 1, s. 49–60.

COONS, A. H., SNYDER, J. C. Localization of antigen in tissue cells; antigens of rickettsiae and mumps virus. *J Exp Med*. 1950, vol. 91, no. 1, s. 31–38.

CORREIA, K. M., CONLON, R. A. Whole-mount in situ hybridization to mouse embryos. *Methods*. 2001, vol. 23, no. 4, s. 335–8.

DEMARIES, S. L., RATCLIFFE, M. S. H. Cell surface and secreted immunoglobulins in B cell development. In PASTORE, P. P., et al. *Handbook of vertebrate immunology*. London : Academic press, 1998. s. 89–92.

- ELLIAS, J. M. *Immunohistopatology: A Practical Approach to Diagnosis*. Chicago: ASCP Press, 1990.
- ESS, K. C., et al. Diverse developing mouse lineages exhibit high-level c-Myb expression in immature cells and loss of expression upon differentiation. *Oncogene*. 1999, 18, no. 18, s. 1108–1111.
- GALL, J. G., PARDUE, M. L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1969, vol. 63, no. 2, s. 378–83.
- GODING, W. James. *Monoclonal antibodies: Principles and practice*. 3rd edition [s.l.]: Academic press, 1993. ISBN 978-0-12-2870231.
- GRAHAM, R. C., LUNDHOLM, U., KARNOVSKY, M. J. Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole. *J Histochem Cytochem*. 1965, no. 13, s. 150–2.
- GRAHAM, R. C., KARNOVSKY, M. J. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem*. 1966, vol. 14, no. 4, s. 291–302.
- GUESDON, J. L., TERNYNCK, T., AVRAMEAS, S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem*. 1979, vol. 27, no. 8, s. 1131–9.
- HAUSEN, P., DREYER, C. Urea reactivates antigens in paraffin sections for immunofluorescent staining. *Stain Technol*. 1982, vol. 57, no. 5, s. 321–324.
- HEYDERMAN, E. Immunoperoxidase technique in histopathology: applications, methods, and controls. *J Clin Pathol*. 1979, vol. 32, no. 10, s. 971–8.
- HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J. *Základy imunologie*. 2. vyd. Praha : Triton, 2002. 260 s. ISBN 80-7254-215-X
- HSU, S. M., RAINE, L., FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*. 1981, vol. 29, no. 4, s. 577–80.
- HUANG, S. N. Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections. *Lab Invest*. 1975, vol. 33, no. 1, s. 88–95.

- HUANG, W. M., et al. Improved section adhesion for immunocytochemistry using high molecular weight polymers of L-lysine as a slide coating. *Histochemistry*. 1983, vol. 77, no. 2, s. 257–9.
- HUSAIN, O. A. N., MILETT, J. A., GRAINGER, J. M. Use of polylysine-coated slides in preparation of cell samples for diagnostic cytology with special reference to urine sample. *J Clin Pathol*. 1980, vol. 33, no. 3, s. 309–11.
- IBANEZ, C. E., LIPSICK, J. S. Structural and functional domains of the myb oncogene: requirements for nuclear transport, myeloid transformation, and colony formation. *J Virol*. 1988, vol. 62, no. 6, s. 1981–8.
- RENSHAW, S. *Immunohistochemistry: methods express series*. 1st edition. [s.l.] : Scion Publishing, 2007. 300 s. ISBN 1904842038.
- JAUSSSEN, S. H. M., VAINIO, O., RATCLIFFE, M. S. H. Avian immunology: Leukocyte markers in the chicken. In PASTORE, P. P., et al. *Handbook of vertebrate immunology*. London : Academic press, 1998. s. 81–86.
- JOHN, H. A., BIRNSTIEL, M. L., JONES, K. W. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*. 1969, vol. 223, no. 5206, s. 582–7.
- KAHVECI, Z., et al. A comparison of microwave heating and proteolytic pretreatment antigen retrieval techniques in formalin fixed, paraffin embedded tissues. *Biotech Histochem*. 2003, vol. 78, no. 2, s. 119–128.
- KAWAI, K., et al. Heat-induced antigen retrieval of proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Pathol Int*. 1994a, vol. 39, no. 10–11, s. 759–764.
- KAWAI, K., UMEMURA, S., TSUTSUMI, Y. Antigen retrieval by heating treatment. *Saibo (Cell)*. 1994b, 26, s. 152–157.
- KITAMONO, T., et al. Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloids. *Lab Invest*. 1987, vol. 57, no. 2, s. 230–236.
- KOPECKI, Z., et al. Collagen loss and impaired wound healing is associated with c-Myb deficiency. *J Pathol*. 2007, no. 211, s. 351–361.
- KÖHLER, A., LAURITZEN, B., VAN NOORDEN, C. J. F. Signal amplification in immunohistochemistry at the light microscopic level using biotinylated tyramide and nanogold–silver staining. *J Histochem Cytochem*. 2000, no. 125, s. 279–285.

- LARSSON, L. I. *Immunocytochemistry: Theory and practise*. [s.l.] : Boca Raton FL, CR, Press, 1988. Fixation and tissue pretreatment, s. 41–170.
- LARSSON, L., I. A novel immunocytochemical model system for specificity and sensitivity screening of antisera against multiple antigens. *J Histochem Cytochem*. 1981, vol. 29, no. 3, s. 408–410.
- LEONG, A. S. Y., MILIOS, J., DUNCIS, C. G. Antigen preservation in microwave-irradiated tissues: a comparison with formaldehyde fixation. *J Pathol*. 1988, no. 156, s. 275–282.
- LUKÁŠ, Z., et al. *Imunohistochemické metody v biologii a biotické diagnostice*. 1. vyd. Brno : Masarykova Universita v Brně, 1997. s. 7–10. ISBN 80-210-0620-X.
- MASSON, D. Y., SAMMONS, R. Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. *J Clin Pathol*. 1978, vol. 31, no. 5, s. 454–460.
- MAYERS, C. P. Histological fixation by microwave heating. *J Clin Pathol*. 1970, vol. 23, no. 3, s. 273–5.
- MILSTEIN, C., KÖHLER, G. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975, vol. 256, (5517), s. 495–597.
- MITCHELL, D., IBRAHIM, S., GUSTERSON, B. A. Improved immunohistochemical localization of tissue antigens using modified methacarn fixation. *J Histochem Cytochem*. 1985, vol. 33, no. 5, s. 491–5.
- MUCENSKI, M. L., et al. A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell*. 1991, vol. 65, no. 4, s. 677–689.
- MUSIL, J. *Molekulové základy klinické biochemie*. 1. vyd. Praha: Grada Avicenum, 1994. 384 s. ISBN 80-7169-056-2.
- NAKANE, P. K., PIERCE, G. B. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem*. 1966, vol. 14, no. 12, s. 929–31.
- PANOSKALTSIS-MORTARI, A., BUCY, R. P. In situ hybridization with digoxigenin-labeled RNA probes: facts and artifacts. *Biotechniques*. 1995, vol. 18, no. 2, s. 300–7.
- PARDUE, M. L., GALL, J. G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1969, vol. 64, no. 2, s. 600–4.



- PASHA, T., MONTONE, K. T., TOMASZEWSKI, J. E. Nuclear antigen utilizing steam heat. *Lab Invest.* 1995, no. 72, s. 167A.
- PERTSCHUK, L. P., et al. Estrogen receptor immunocytochemistry: the promise and the perils. *J Cell Biochem.* 1994, no. 19, s. 134–137.
- POLAK, J. M., VAN NOORDEN, S. *Introduction to immunocytochemistry.* 3rd enl. edition. [s.l.] : Bios Scientific Publisher, 2003. 176 s. ISBN 1859962084.
- PONDER, B. A., WILKINSON, M. M. Inhibition of endogenous tissue alkaline phosphatase with the use of alkaline phosphatase conjugates in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem.* 1981, vol. 29, no. 8, s. 981–4.
- PONS, C., et al. Antigen retrieval by wet autoclaving for p53 immunostaining. *Appl Immunohistochem.* 1995, no. 3, s. 256–267.
- PORTER, R. R. The hydrolysis of rabbit  $\gamma$ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J.* 1959, no. 73, s. 119–26.
- POZAR, D. M. *Microwave engeneering.* [s.l.] : Addisson-Wesley Publishing company, 1993. ISBN 0-201-50418-9.
- PUCHTLER, H., et al. Methacarn (methanol-Carnoy) fixation. Practical and theoretical considerations. *Histochemie.* 1970, vol. 21, no. 2, s. 97–116.
- RACEK, J., et al. *Klinická biochemie.* L. Houdek; J. Havlíčková. 2006. přeprac. vyd. Praha : Galén, 2006. 29 s. ISBN 80-7262-324-9.
- RANDALL, T. D., BREWER, J. W., CORLEY, R. B. Direct evidence that J chain regulates the polymeric structure of IgM in antibody-secreting B cells. *J Biol Chem.* 1992, vol. 267, no. 25, s. 18002–7.
- RIGGS, J. L., et al. Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. *Am J Pathol.* 1958, vol. 34, no. 6, s. 1081–97.
- ROSEN, B., BEDDINGTON, R. S. Whole-mount in situ hybridization in the mouse embryo: gene expression in three dimensions. *Trens Genet.* 1993, vol. 9, no. 5, s. 162–7.
- SERRA, J. A. Histochemical tests for protein and amino acids : The characterizaiton of basic protein. *Stain Technol.* 1946, no. 21, s. 5–18.
- SHI, S-R., et al. Sensitivity and detection efficiency of a novel two-step detection system (PowerVision) for immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 1999, vol. 7, s. 201–8.

- SHI, S-R, COTE, R. J., TAYLOR, C. R. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present and future. *J Histochem Cytochem.* 1997, vol. 45, no. 3, s. 327–343.
- SHI, S-R., KEY, M. E., KALRA, K. L. Antigen retrieval in formalin fixed, paraffin-embedded tissues: an enhanced method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue section. *J Histochem Cytochem.* 1991, no. 39, s. 741–748.
- SITZMANN, J., NOBEN-TRAUTH, K., KLEMPNAUER, K. H. Expression of mouse c-myc during embryonic development. *Oncogene.* 1995, vol. 11, no. 11, s. 2273–9.
- STRAUS, W. Inhibition of peroxidase by methanol and by methanol-nitroferrocyanide for use in immunoperoxidase procedures. *J Histochem Cytochem.* 1971, vol. 19, no. 11, s. 682–8.
- STRAUS, W. Phenylhydrazine as inhibitor of horseradish peroxidase for use in immunoperoxidase procedures. *J Histochem Cytochem.* 1972, vol. 20, no. 11, s. 941–951.
- SUFFIN, S. C., et al. Improvement of the glucose oxidase immunoenzyme technique. Use of a tetrazolium whose formazan is stable without heavy metal chelation. *Am J Clin Pathol.* 1979, vol. 71, no. 5, s. 492–496.
- TAYLOR, C. R., et al. A comparative study of antigen retrieval heating methods. *CAP Today.* 1995, no. 9, s. 16–22.
- VACEK, Z. *Histologie a histologická technika.* 1. vyd. Praha: Avicenum, 1988. 496 s. ISBN 08-091-88.
- VOET, D., VOETOVÁ, J. G. *Biochemie.* Prof. RNDr. Arnošt Kotyk. 1. vyd. Praha: Victoria Publishing Praha, 1990. 1325 s. ISBN 80-85605-44-9.
- VYBERG, M., NIELSEN S. Dextrane polymer conjugate two step visualization system for immunohistochemistry: a comparison of EnVision+ with two three step avidin-biotin techniques. *Appl Immunohistochem.* 1998, vol. 6, s. 3–10.
- WILKINSON, D. G., NIETO, M. A. Detection of messenger RNA by in situ hybridization to tissue sections and whole mounts. *Methods Enzymol.* 1993, no. 223, s. 361–73.

## Seznam použitých zkratek

Ab	protilátka (antibody)
ABC	avidin-biotin komplex
AEC	3-amino-9-etylkarbazol
Ag	antigen
AK	aminokyselina
AMCA	7-amino-4-methylkumarin-3-kyselina octová
AMV	virus ptačí myeloblastosy (avian myeloblastosis virus)
AP	alkalická fosfatasa (alkaline phosphatase)
APS	persíran amonný (amonium persulfate)
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
CCD	nábojově vázaný prvek (charge coupled device)
Cy3	indokarbocyanin
Cy5	indodikarbocyanin
DAB	3,3-diaminobenzidin tetrachlorid
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DDT	dithiothreitol
DEPC	diethylpyrokarbonát
DIG	digoxigenin
DMF	dimethylformamid
DNA	kyselina deoxyribonukleová (deoxyribonucleic acid)
ECL	zesílení chemiluminiscencí (enhanced chemiluminiscence)
ED	embryonální den
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (ethylendiamin tetraacetic acid)
ELISA	enzymová analýza na imunosorbentech (enzyme-linked immunosorbent assay)
FITC	fluorescein isothiocyánát

GFP	fluorescenční zelený protein (green fluorescein protein)
GIT	gastrointestinální trakt
GOD	glukosooxidasa
HRP	křenová peroxidasa (horseradish peroxidase)
HS	hybridizační směs
Ig	imunoglobulin
ISH	<i>in situ</i> hybridizace
KFP	K-fosfátový pufr
KHL	děrnatka (keyhole limpet)
LT	laboratorní teplota
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MV	mikrovlnné elektromagnetické záření o frekvenci 300 MHz–300 GHz
NA	nukleová kyselina (nucleic acid)
NBT	nitrotetrazoliová modř (4-nitro blue tetrazolium chlorid)
NDS	normální oslí sérum (normal donkey serum)
NGS	normální kozí sérum (normal goat serum)
NS	normální sérum
NSS	normální ovčí sérum (normal sheep serum)
PAGE	elektroforesa v polyakrylamidovém gelu (polyacrylamide gel electroforesis)
PAP	peroxidasa proti peroxidase
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffer saline)
PFA	paraformaldehyd
PLB	vzorkový pufr (protein loading buffer)
PVDF	polyvinyliden fluorid
RIA	imunoanalýza s použitím radioaktivních prvků (radioimmunosorbent-assay)
RNA	kyselina ribonukleová (ribonucleic acid)
RNasa	ribonukleasa
SDS	dodecyl síran sodný (sodium dodecyl sulphate)
TBE	Tris-borát-EDTA
TEMED	tetramethylenethylen diamin

TRITC	tetrrhodamin isothiocyánát
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
TSA	amplifikace signálu pomocí tyraminu (tyramine signal amplification)
UK	Univerzita Karlova
ÚMG AV ČR	Ústav molekulární genetiky Akademie věd České republiky
VO	vomeronasální orgán
<sup>v</sup> /v	objem/objem (volume/volume)
<sup>w</sup> /v	hmotnost/objem (weight/volume)
WM	celý preparát (whole mount)

# Přílohy

## Příloha 1: chemikálie

agar	Roth, Německo
akrylamid	Serva, Německo
APS (persíran amonný)	Sigma, USA
BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát)	Roche Diagnostics, Švýcarsko
benzen	Lachema, ČR
Bio-clear	Bio-Optica, Itálie
bromfenolová modř	Sigma, USA
CaCl <sub>2</sub>	Sigma, USA
citrát sodný	Sigma, USA
DAB (3,3-diaminobenzidin)	Roche Diagnostics, Švýcarsko
DDT (dithiothreitol)	Sigma, USA
DEPC (diethylpyrokarbonát)	Sigma, USA
EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová)	Serva, Německo
ethanol	Lachema, ČR
ether	Lachema, ČR
ethidium bromid	Serva, Německo
fenol	Lachema, ČR
formaldehyd (10%)	CSC, ČR
formamid	Fluka, Švýcarsko
glutaraldehyd (25% vodný roztok)	Serva, Německo
glycerol	Sigma, USA
glycin	Sigma, USA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	Fluka, Švýcarsko
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Sigma, USA

HCl (36%)	Lachema, ČR
hematoxylin	Loba Chemie Fischameud, Rakousko
heparin	Sigma, USA
CHAPS (3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propansulfonát)	Sigma, USA
chloralhydrát	Litolab, ČR
chloroform	Sigma, USA
imidazol (1,3-diaza-2,4-cyklopentadien)	Sigma, USA
jádrová červec	Edward Gurr
jodičnan sodný	Lachema, ČR
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Lachema, ČR
KCl	Sigma, USA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma, USA
kyselina citronová	Lach-Ner
kyselina octová (ledová)	Lachema, ČR
methanol	Lachema, ČR
MgCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	Sigma, USA
N,N'-methylen-bis(akrylamid)	Serva, Německo
Na <sub>2</sub> EDTA	Serva, Německo
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma, USA
NaCl	Sigma, USA
NBT (nitrotetrazoliová modř)	Roche Diagnostics, Švýcarsko
paraformaldehyd	Sigma, USA
Poly-L-lysin (0,1%)	Sigma, USA
proteinasa K	Sigma, USA
sacharosa	Lach-Ner, ČR
SDS (dodecyl síran sodný)	Sigma, USA
síran hlinitý	Lach-Ner, ČR
síran hlitodraselný	Penta, ČR
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylenethylen diamin)	Serva, Německo

Tris (2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol)	Roche Diagnostics, Švýcarsko
Triton X-100 (t-octylfenoxypolyethoxyethanol)	Sigma, USA
Tween 20 (polyoxyethylen-20-sorbitan monolaurát)	Roth, Německo
xylén	Lachema, ČR

## Příloha 2: roztoky a pufry

Roztoky a pufry jsou pro ISH připravené z vody ošěžené DEPC a jsou zautoklávované (20 minut, 121°C, 200 kPa).

### DEPC voda

destilovaná a deionizovaná voda, filtrovaná přes sterilní membránu (Millipack) 0,22 µm  
 diethylpyrokarbonát 0,1 % (v/v)  
 protřepávat, druhý den protřepat, autoklávovat

### PBS (20x) zásobní roztok

NaCl	2,74 M
KCl	0,5 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,35 M

### PBT

PBS	1x
Triton X-100	0,1 (v/v) %

### Fixační roztok 4% PFA v PBT

paraformaldehyd	4 (w/v) %
PBS	1x
Triton X-100	0,1 % (v/v)

uchovávat 4 °C, pro delší skladování –20 °C



**Fixační roztok dle Serry [Serra, 1946]**

ethanol (96%)	60 % (v/v)
formaldehyd (10%)	30 % (v/v)
kyselina octová (ledová)	10 % (v/v)

**Fixační roztok methacarn (methanol Carnoy)**

methanol	60 % (v/v)
chloroform	30 % (v/v)
kyselina octová (ledová)	10 % (v/v)

**Hybridizační směs**

formamid	50 % (v/v)
SSC	5x
CHAPS	0,1 % (v/v)
Triton X-100	0,1 % (v/v)
EDTA (pH 8)	0,005 M
heparin	50 µl/ml
tRNA (z vlastní Yest RNA)	1 mg/ml
Blocking reagent	2 (w/v) %
skladování při -20°C	

**SSC (20x) zásobní roztok**

NaCl	3 M
citrát sodný	0,3 M
upravit pomocí HCl na pH 7, autoklávovat	

**KTBT**

NaCl	0,15 M
KCl	0,2 M
Tris, pH 7,5	0,25 M
upravit pH pomocí HCl na 7,3	

Tween 20 1 % (v/v)

**NTMT - alkalický pufr**

NaCl 0,1 M  
MgCl<sub>2</sub>.6 H<sub>2</sub>O 0,05 M  
Tris, pH 9,5 0,1 M  
Triton X-100 1 (v/v) %

připravuje se vždy čerstvý ze zásobních roztoků

**Barvicí roztok s NBT/BCIP**

DMF (dimethylformamid) v NTMT 10 (v/v) %  
NBT (100 mg/ml DMF) 450 µg/ml  
BCIP (50 mg/ml DMF) 175 µg/ml

**Barvicí roztok s DAB**

Tris, pH 7,6 0,05 M  
Imidazol 0,011 M  
DAB 0,45 mg/ml  
rozpustit, filtrovat  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,007 (v/v) %

**0,2 M K-fosfátový pufr (zásobní roztok)**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M

roztok 0,2 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> se upraví roztokem 0,2 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tak, aby pH bylo 7,4–7,8, zásobní roztok lze uchovávat v -20°C

**1x TBS**

Tris 121,14 6g 0,05 M  
NaCl 58,44 8,76g 0,12 M

upravit na požadované pH pomocí HCl

**Citrátový pufr pH 6,0**

kyselina citrónová	1,8 mM
citrát sodný	8,2 mM

**Jádrová červeň**

jádrová červeň	0,1 (w/v) %
síran hlinitý	0,08 M
rozpustí se při 60° C, po vychladnutí se zfiltruje	

**Hematoxylin Mayerův**

hematoxylin	3,3 mM
jodičnan sodný	1 mM
síran hlinitodraselný	0,1 M
kyselina citronová	4,8 mM
chloralhydrát	0,3 M
kyselina citronová a chloralhydrát se přidají až po rozpuštění předchozích látek	

**Kyselý ethanol**

HCl (36%)	0,05–0,01 (v/v) %
ethanol (96%)	

**Karbolxylen**

xylén	75 (v/v) %
fenol	25 (v/v) %

**2x vzorkový pufr (PLB)**

Tris	0,05 M
DTT	0,1 M

SDS	2 (w/v) %
bromfenolová modř	0,1 (w/v) %
glycerol	10 (w/v) %
upravit pomocí HCl na pH 6,8	

### **10x Tris glycinový pufr pro SDS elektroforezu (zásobní roztok)**

Tris	0,4 M
glycin	1 M
SDS	1 (w/v) %

### **Blotovací pufr**

glycin	0,04 M
Tris	0,05 M
SDS	0,037 (w/v) %
methanol	20 (v/v) %

## **Příloha 3: přístroje**

autokláv	Tuttnauer 3150 EL, Německo
blotovací modul	Thermo Fisher Scientific ThermoEC EC140, mini blot module, USA
CCD kamera	Olympus DP50, Japonsko
digestoř	Melite, Fume Abrober TA2 19, Německo
elektroforeza vertikální	Thermo Fisher Scientific, mini vertical gel system EC 120, USA
kryocut	Leica CM1900, Německo
míchačka	IKA Labortechnik, Německo
mikroskop	Olympus BX51, Japonsko
mikroskop inverzní	Olympus IX71, Japonsko
mikroskop preparační	Olympus SZX12, SZH10, Japonsko
mikrotom	Leica RM2155, Německo

mikrovlnná trouba	Eta 7197, ČR
odstředivka	Roth, Microcentrifuge SD 220VAC, Německo
odstředivka	Eppendorf, Centrifuge 5415R, Německo
pH metr	Jenway, pH Metr 3310, UK
rotátor	Stuart rotator SB3, UK
rotátor, houpačka	Heidolph Instruments, Duomax 1030, Německo
termoblok	soukromá výroba Royal Veterinary College, London, UK
termocyklér	Quanta Biotech, QB-96, UK
termoplotýnka	Leica, Jung HI 1230, Histotemp, Německo
termoplotýnka	Medite, CTS 40.3040, Německo
termostat	Sanyo, Sanyo omt oven, Japonsko
termostat pro parafín	Laboratorní přístroje Praha, THC 100, ČR
termostat pro parafín	Laboratorní přístroje Praha, Biological termostat BT 120, ČR
transluminátor	Leica CLS 100X, Německo
třepačka	IKA-VIBRAX-VXR basic, Německo
třepačka	Janke & Kunkel, typ VX8, Německo
váhy	Ohaus Scout, SC 6010, USA
váhy analytické	A & D Instruments, HR-120, Itálie
vodní lázeň	Memmert, WB7, Německo
vortex	Velp scientifica, 2x <sup>3</sup> , Itálie
vortex	IKA RCT basic, Německo
vortex	Snijders 34524, Holandsko
zdroj pro elektroforesu	Sigma, Consort, E844, USA
zdroj studeného světla	Olympus KL 1500 LSD, Japonsko
zdroj světla	Olympus Highlight 2000, Japonsko
zdroj světla pro fluoresenci	Olympus U-RFL-T, Japonsko

## Příloha 4: protokol imunohistochemické reakce s protilátkou anti-c-Myb v parafínových řezech

	doba	teplota
1. a) aldehydová fixace (4% PFA)	2 hod	4 °C
b) kombinovaná fixace (fixace dle Serry)	15 hod	4 °C
c) methacarn	24 hod	4 °C
2. zpracování tkáně do parafínu a následné nakrájení tkáně (5 µm)		
3. odparafínování, rehydratace, PBS, 0,05% Tween 20 v PBS		LT
4. a) odhalení antigenu pro aldehydovou krátkou fixaci (4% PFA): var ve vodní lázni v 0,05 M Tris, pH 8	30 min	70–100 °C
5. a) chlazení	20 min	LT
6. a) 0,1 % Triton X100 v PBS	10 min	LT
7. PBS	4x 5 min	LT
8. blokace endogenní peroxidasy v 0,6% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> v PBS	25 min	LT
9. PBS	4x 5 min	LT
10. 0,05% Tween 20 v PBS		LT
11. předinkubace 20% NDS v 2,5% BSA v PBS	90 min	LT
12. anti-c-Myb 1:5 000–1:10 000 v 15% NDS 2,5% BSA v PBS	60 min + + 15 hod	LT 4 °C
13. PBS	4x 5 min	
14. anti-chicken-peroxidasa (Peroxidase-conjugated AffiniPure F(ab) <sub>2</sub> Fragment Donkey Anti Chicken IgY(IgG) H+L) 1:600 v 15% NDS v 2,5% BSA	75 min	27 °C
15. PBS	4x 5 min	LT
16. aplikace roztoku s DAB	10 min	LT
17. destilovaná voda		LT
18. dobarvení jader hematoxylinem (hematoxylin Mayerův)	15 s	LT

19. voda	5 min	LT
20. případná diferenciace kyselým ethanolom	1–3 s	LT
21. destilovaná voda		LT
22. dehydratace pomocí vzestupné ethanolové řady		LT
23. karbolxylen	5 min	LT
24. xylen	2x3 min	LT
25. montáž preparátu (DePex)		