

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETER VRTAČNIK

RAZVOJ METODE ZA MERJENJE MUCINA Z ENCIMSKO
IMUNSKO TEHNIKO V CELIČNIH KULTURAH

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETER VRTAČNIK

RAZVOJ METODE ZA MERJENJE MUCINA Z ENCIMSKO
IMUNSKO TEHNIKO V CELIČNIH KULTURAH

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR MEASURING MUCIN WITH
ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY IN CELL CULTURES

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem opravljal na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Boruta Božiča in somentorstvom prof. dr. Jane Lukač Bajalo.

Zahvalil bi se rad mentorju izr. prof. dr. Borutu Božiču in somentorici prof. dr. Jani Lukač Bajalo za strokovno vodstvo in pomoč pri izdelavi diplomskega dela.

Prav tako bi se rad zahvalil vsem sodelavcem Katedre za klinično biokemijo, ki so mi nemalokrat priskočili na pomoč.

Iskrena hvala tudi moji družini, ki me je vzpodbujala in mi stala ob strani tekom celotnega študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod mentorstvom izr. prof. dr. Boruta Božiča in somentorstvom prof. dr. Jane Lukač Bajalo.

Ljubljana, september, 2009

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Aleš Mrhar

Član diplomske komisije: doc. dr. Aleš Obreza

VSEBINA

1	UVOD.....	1
1.1	ZGRADBA IN FUNKCIJE TANKEGA ČREVEESA	1
1.2	CELICE EPITELIJSKE PLASTI TANKEGA ČREVEESA	2
1.2.1	Čašaste celice	2
1.2.1.1	Mucini.....	3
1.2.2	Ostale celice	4
1.3	IDENTIFIKACIJA CELIC V MEŠANI KULTURI.....	6
1.3.1	Protitelesa kot reagenti	6
1.4	IMUNOKEMIJSKE METODE	9
1.4.1	Pasivna gelska difuzija	9
1.4.2	Označene imunske metode.....	11
1.4.2.1	Kompetitivne metode	11
1.4.2.2	Nekompetitivne imunometrične metode z uporabo enega epitopa	12
1.4.2.3	Nekompetitivne imunometrične metode z uporabo dveh epitopov.....	13
1.5	POMEMBNI PARAMETRI ANALIZNIH METOD	14
2	NAMEN DELA.....	16
3	MATERIALI IN METODE	17
3.1	MATERIALI.....	17
3.1.1	Reagenti in kemikalije	17
3.1.2	Priprava pufrov in raztopin.....	18
3.1.3	Vzorci.....	20
3.1.4	Aparature.....	21
3.2	METODE	21
3.2.1	Sendvič ELISA	21
3.2.1.1	Opis metode.....	21
3.2.1.2	Postopek dela.....	22
3.2.2	Direktna ELISA	23
3.2.2.1	Opis metode.....	23
3.2.2.2	Postopek dela I	24

3.2.2.3	Postopek dela II	25
3.2.3	<i>Dvojna imunodifuzija</i>	26
3.2.3.1	Opis metode	26
3.2.3.2	Postopek dela	26
3.2.3.3	Razporeditev vdolbinic	27
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	28
4.1	DOLOČANJE ČAŠASTIH CELIC IN MUCINA 2	28
4.2	RAZVOJ ENCIMSKO IMUNSKE METODE (ELISA)	29
4.2.1	<i>Korak 1</i>	29
4.2.2	<i>Korak 2</i>	32
4.2.3	<i>Korak 3</i>	33
4.2.4	<i>Korak 4</i>	34
4.2.5	<i>Korak 5</i>	35
4.2.6	<i>Korak 6</i>	37
4.2.7	<i>Korak 7</i>	38
4.2.8	<i>Korak 8</i>	39
4.2.9	<i>Korak 9</i>	41
4.2.10	<i>Korak 10</i>	42
4.2.11	<i>Korak 11</i>	43
5	SKLEP	48
6	LITERATURA	49

POVZETEK

Epitelijsko plast tankega črevesa sestavljajo enterociti, čašaste celice, Panethove celice, enteroendokrine celice, celice M, prehodne celice in matične celice. Čašaste celice so zaslužne za proizvodnjo in vzdrževanje plasti mukusa, katerega glavna sestavina je mucin 2. Slednjega v prebavnem traktu izločajo izključno čašaste celice, zato ga je mogoče uporabiti kot njihov označevalec v mešani kulturi celic.

Namen našega dela je bil razviti encimsko imunsko metodo za merjenje mucina 2 v kulturi razpršenih podganjih intestinalnih epitelijskih celic. S tem bi dobili orodje za spremljanje čašastih celic v študijskem modelu primarne kulture intestinalnih celic.

Razvoj sendvič izvedbe encimsko imunske metode smo pričeli z analizo mucinskega standarda, vendar brez pozitivnih rezultatov. Postopoma smo preverjali posamezne spremenljivke in iskali vzroke. Ugotovili smo, da za neodzivnost metode nista bila kriva čas inkubacije ali rigoroznost spiranja. Potrdili smo ustrezno vezavo primarnih protiteles na mikrotitrsko ploščo. S pomočjo dvojne imunodifuzije smo dokazali dobro reaktivnost med sekundarnimi in terciarnimi protitelesi. Za preskus vezave primarnih in sekundarnih protiteles na mucin 2 pa smo izbrali direktno izvedbo encimsko imunske metode. V dveh ločenih poizkusih smo ugotovili, da se primarna protitelesa vežejo na mucinski standard, sekundarna pa ne. Ker je bil naš standard rekombinantni mucin 2, smo preverili odziv sendvič in direktne izvedbe encimsko imunske metode še z vzorčnimi raztopinami. Te so predstavljali celični lizati in rabljen kultivacijski medij šestih podganjih intestinalnih celičnih kultur, kultiviranih pet tednov. V primeru vzorčnega mucina 2 smo dobili pozitivne rezultate pri obeh metodah. Razvili smo torej sendvič izvedbo encimsko imunske metode, ki je primerna za ugotavljanje prisotnosti mucina 2 v celičnih kulturah, ne omogoča pa njegove kvantifikacije ob uporabi rekombinantnega mucina 2 kot standarda.

Rezultati poizkusov so pokazali še, da je imela direktna izvedba encimsko imunske metode boljšo občutljivost in razmerje med signalom in šumom kot sendvič izvedba. Zaradi tega smo se odločili, da naše delo nadgradimo z analizo vzorčnih raztopin z direktno izvedbo metode. Rezultati so pokazali, da v celičnih lizatih ni bilo prisotnega mucina 2. V rabljenem kultivacijskem mediju pa je njegova koncentracija v prvem tednu kultiviranja močno padla, v nadaljevanju pa obdržala bolj ali manj konstanten nivo.

SUMMARY

The small intestinal epithelium consists of enterocytes, goblet cells, Paneth cells, enteroendocrine cells, M cells, transit cells and stem cells. Goblet cells produce and maintain mucus blanket which is composed mainly of mucin 2. In the intestinal tract mucin 2 is secreted exclusively by goblet cells making it a useful goblet cell marker.

The aim of our work was to develop an enzyme-linked immunosorbent assay for mucin 2 in the culture of dispersed rat intestinal epithelial cells. It would enable us to follow the goblet cell population in a primary intestinal cell culture study model.

We began with the development of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay directly by analysing our mucin 2 standard, but without success. Step by step we tested all the variables and tried to identify the problem. We determined that the incubation time and the washing procedure were appropriate. We proved adequate coating of the microtiter plate with primary antibodies. We showed good reactivity between secondary and tertiary antibodies with the use of double immunodiffusion. To test the binding of primary and secondary antibodies to mucin 2 we chose direct enzyme-linked immunosorbent assay. Two separate tests showed that primary antibodies bound to the mucin standard and that secondary antibodies didn't. Because we used recombinant mucin 2 as standard we were interested also in the results of sandwich and direct enzyme-linked immunosorbent assays of the samples. Cell lysates and used cultivation medium from six rat intestinal cell cultures cultivated for the period of five weeks were used. In the case of sample mucin 2 both methods gave positive results. We succeeded in developing a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay capable of determining the presence of mucin 2 in cell cultures. Unfortunately it could not be used for the quantification of mucin in combination with recombinant mucin 2 standard.

Our results also showed that direct enzyme-linked immunosorbent assay had better sensitivity and signal-to-noise ratio than the sandwich assay. That was the reason why we supplemented our work with analysis of sample solutions with direct enzyme-linked immunosorbent assay. With it we showed that there was no mucin 2 present in cell lysates. In used cultivation medium the concentration of mucin 2 dropped significantly during the first week of cultivation but maintained relatively constant value thereafter.

SEZNAM OKRAJŠAV

ABTS – 2,2'-azino-bis(etilbenzotiazolin-6-sulfonat)

ALP – alkalna fosfataza

anti-Muc2 – protitelesa, usmerjena proti mucinu 2

BP – Britanska farmakopeja

BSA – goveji serumski albumin

CCK – holecistokinin

cDNA – komplementarna deoksiribonukleinska kislina

CDR – komplementarnost določajoče področje

DNA – deoksiribonukleinska kislina

E. coli – *Escherichia coli*

ELISA – encimsko imunska metoda na trdni podlagi

ELLA – encimsko lektinska metoda

FBS – fetalni goveji serum

GIP – želodčni inhibitorni peptid

GST-Muc2 – fuzijski protein glutation-S-transferaze in mucina 2

HEPES – 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan-sulfonska kislina

HRP – hrenova peroksidaza

Ig – imunoglobulin

IgA – imunoglobulin A

IgD – imunoglobulin D

IgE – imunoglobulin E

IgG – imunoglobulin G

IgM – imunoglobulin M

mRNA – informacijska ribonukleinska kislina

Muc – mucin

OPD – o-fenilendiamin

p.a. – pro analysis (stopnja čistote)

PAS – perjudna kislina/Schiffov reagent

PBS – fosfatno pufrana slanica

Ph. Eur – Evropska farmakopeja

pNPP – para-nitrofenilfosfat

puriss. – zelo čisto (stopnja čistote)

RID – radialna imunodifuzija

RNA – ribonukleinska kislina

RPMI 1640 – tip medija za celične kulture

RT-PCR – obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo

SDS/PAGE – poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata

Tff3 – trefoil factor 3

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin

1 UVOD

1.1 Zgradba in funkcije tankega črevesa

Tanko črevo predstavlja 2/3 dolžine prebavne cevi in poteka od pilorusa do slepega črevesa. Dolgo je 3–5 metrov in sestavljeno iz dvanajstnika (duodenum), teščega črevesa (jejunum) in vitega črevesa (ileum) (1).

Steno tankega črevesa sestavljajo sluznica, podsluznica, mišična plast in seroza. Sluznica je iz epiteljske plasti, lamine proprije in mišične plasti. Površino sluznice povečujejo sluznične gube, resice (vili) in mikrovili. Sluznične gube tvorita sluznica in podsluznica in ležijo prečno glede na potek tankega črevesa. Najbolj so razvite v dvanajstniku, jejunumu in proksimalnem delu ileuma. Resice imajo obliko prstastih izrastkov in so visoke od 0,2 do 1,2 mm. Najpogostejše so v dvanajstniku in jejunumu, v ileumu pa postanejo krajše in redkejšje. V vsako vodijo krvne žilice in limfni vodi. Mikrovili so prekriti z glikokaliksom in se nahajajo na apikalni površini enterocitov, ki pokrivajo zunanjo plast resic. Med resicami se v lamino proprijo ugrezajo cevaste črevesne žleze (Lieberkühnove kripte). Sestavlja jih enostaven visokoprizmatški epitelij, ki se nadaljuje v epitelij resic. Podsluznica vsebuje fibroelastično vezivo, histiocite, limfocite, plazmatke, tkivne bazofilce, številne krvne in limfne žile, živce ter vegetativni parasimpatični submukozni (Meissnerjev) živčni pletež. Mišično plast sestavljata notranji krožni in zunanji vzdolžni sklad gladke mišičnine, med katerima je vegetativni parasimpatični mienterični (Auerbachov) živčni pletež. Seroza je iz plasti veziva s ploščatimi epiteljskimi celicami in pokriva celotno tanko črevo z izjemo spodnje tretjine dvanajstnika, ki ga prekriva adventicija (1, 2).

V tankem črevesu poteka prebava hranilnih snovi, pri kateri gre za njihovo razgradnjo do manjših sestavin, ki so primerne za prehod skozi črevesno sluznico. Pomembna naloga je tudi absorpcija hranilnih snovi, soli in vode. Za te procese so potrebni številni encimi in hormoni, ki jih proizvajajo in izločajo celice vzdolž celotnega črevesa. Poleg tega je normalna črevesna sluznica notranja pregrada za absorpcijo številnih antigenov, kot so bakterije, virusi in beljakovine v hrani (2).

1.2 Celice epitelijske plasti tankega črevesa

Epitelijsko plast sluznice tvori enoskladni visokoprizmatški epitelij, v katerem najdemo vsaj pet vrst zrelih celic, in sicer enterocite, čašaste celice, Panethove celice, enteroendokrine celice in celice M (Slika 1) (3).



Slika 1: Shematski prikaz štirih vrst intestinalnih epitelijskih celic.

1.2.1 Čašaste celice

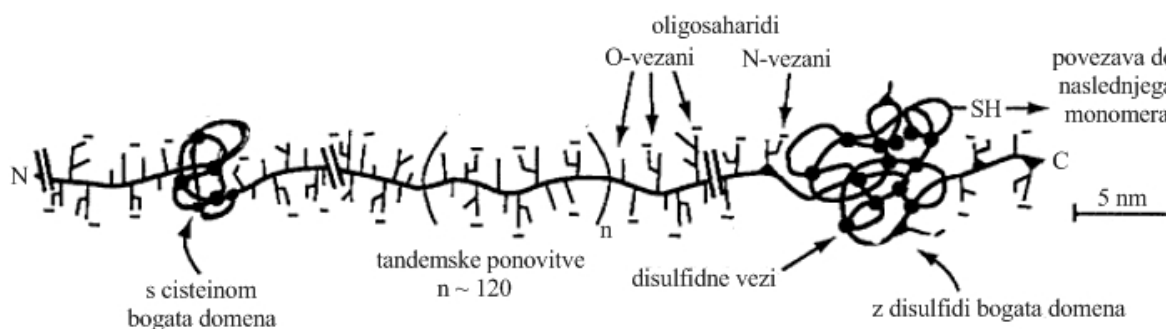
Čašaste celice so enocelične žleze, ki izločajo glikoproteine, imenovane mucini. Tako kot v drugih epitelijih so tudi v črevesju odgovorne za proizvodnjo in vzdrževanje zaščitne plasti mukusa. Pri čašastih celicah ločimo bazalno in pospešeno izločanje mucinov. Pri bazalnem izločanju gre za počasno redno eksocitozo mucinov posamezne mucinogene granule, kar zadošča za vzdrževanje mukusne plasti. Pod vplivom holinergične stimulacije, črevesne anafilaksije ter kemičnega ali fizikalnega draženja pa pride do pospešenega izločanja. Pri tem celice hitro izločijo večji del ali celo vso svojo zalogo mucinogenih granul, ki so jo sposobne prav tako hitro obnoviti. Kljub odsotnosti mucinogenih granul ostane oblika celic nespremenjena, za kar je zaslužen kompleksen citoskelet. Število čašastih celic narašča od duodenuma proti terminalnemu delu ileuma. V apikalnem delu imajo shranjeno veliko količino mucinogenih granul, zaradi česar je vrh razširjen in deformira sosednje celice. Bazalni del tako spominja na ozko steblo oz. pecelj. Ta del je tudi izrazito bazofilen, saj se v njem nahajajo celično jedro, obsežen zrnati endoplazmatski

retikulum, prosti ribosomi in mitohondriji. Obsežen in sploščen Golgijev aparat ima obliko široke sklede in obdaja novonastale mucinogene granule tik nad jedrom celice. V njem poteka glikozilacija proteinskega jedra mucinov in njihovo shranjevanje v mucinogene granule. Na apikalni površini so prisotni mikrovili, vendar so krajši in bistveno redkejši kot pri enterocitih. Nezrele čašaste celice v črevesnih žlezah so velike in piramidalne oblike z organeli, razporejenimi med mucinogenimi granulami. Imajo obsežen stik z bazalno lamino, pri čemer pa sega do lumna črevesnih žlez le majhen del celične površine. Med pomikanjem proti vrhu črevesnih žlez in nato naprej po resicah celice dozori, pri čemer se jim bistveno zmanjša volumen in oblika spremeni v značilno čaši podobno. Prav tako se zmanjša stik z bazalno lamino, poveča stik z lumnom črevesnih žlez in spremeni glikozilacija mucinov. Razlog za takšno poimenovanje celic je njihova že omenjena značilna oblika s širokim apikalnim delom in ozkim bazalnim pecljem, saj spominja na čašo (vrsta kozarca). Življenjska doba čašastih celic je 3–5 dni (3, 4, 9).

1.2.1.1 Mucini

Mucini so O-glikozilirani proteini z veliko navidezno molekulsko maso (~ 600 kDa), katere kar 60–80 % predstavljajo oligosaharidne verige. Te so sestavljene iz 2–12 enot fukoze, galaktoze, N-acetilgalaktozamina, N-acetilglukozamina in sialične kisline. Oligosaharidi niso enakomerno razporejeni vzdolž proteinskega jedra, pač pa so nakopičeni v močno glikoziliranih segmenetih, v katerih prevladujejo glikozilirane aminokisline serin, treonin in prolin (Slika 2). Vzorci glikozilacije proteinskega jedra so tkivno specifični znotraj gastrointestinalnega trakta. Mucini so hidrofilni in viskozni. Njihova viskoznost je pomembna za tvorbo mukusa in izvira v veliki meri iz njihove težnje po polimerizaciji, ki poteče preko disulfidnih vezi. Polimerizirane molekule so lahko dolge preko 10 µm z navidezno molekulsko maso preko 10⁴ kDa. Poznanih je 20 različnih genov, ki kodirajo Muc1–4, Muc5AC, Muc5B, Muc6–19. Delimo jih lahko v dve skupini: sekrecijski, gelirajoči mucini (predvsem Muc2, Muc5AC, Muc5B, Muc6 in Muc19) in membranski mucini (predvsem Muc4). Mucin 2 najdemo v tankem črevesu, debelem črevesu in dihalnih poteh (4, 5, 6, 7, 26). Je prevladujoči mucin črevesja in intestinalnih čašastih celic. V prebavnem traktu ga izločajo izključno nezrele in zrele čašaste celice. Zaradi tega se uporablja kot označevalec, specifičen za omenjene celice (8, 9). Muc2 je tudi glavni dejavnik, ki je odgovoren za značilno obliko čašastih celic in njihov fenotip (18). Mucini

po sprostitvi v lumen hidrirajo in gelirajo ter tako tvorijo zaščitno plast mukusa na površini epitelija. V mukusu so ujetе tudi druge snovi, kot so voda, elektroliti, peptid Tff3 (trefoil factor 3), odluščene epiteljske celice, celični fragmenti in izločeni imunoglobulini. Skupaj predstavljajo fizikalno in kemično zaščito sluznice pred bakterijami, bakterijskimi in okoljskimi toksini, drugimi škodljivimi spojinami ter razvojem tumorjev. Poleg tega zmanjšujejo trenje med sluznico in črevesno vsebino ter vzdržujejo normalno črevesno floro. Mukus predstavlja difuzijsko pregrado za hranljive snovi in majhne molekule. Njihova absorpcija je zato sorazmerna s hitrostjo difuzije skozi plast mukusa, ta pa z molekulsko maso. Mucini ščitijo sluznico tudi pred razgradnjo z encimi črevesne flore, saj sami predstavljajo substrat za te encime (4, 9, 24).



Slika 2: Shematski prikaz gelirajočega mucina. Področja tandemskih ponovitev so močno O-glikozilirana. N-vezanih oligosaharidov je malo in se nahajajo predvsem na robovih monomera. Večina oligosaharidnih verig ima na koncu negativni naboj (34).

1.2.2 Ostale celice

Enterociti so absorpcijske celice, ki prenašajo snovi iz črevesnega lumna v krvni in limfni obtok. Poleg tega so tudi sekrecijske celice, saj izločajo vodo in elektrolite. Na apikalni membrani imajo encime (di- in oligosaharidaze, amino- in dipeptidaze, esterase), ki so potrebni za dokončno prebavo snovi in njihovo absorpcijo. Absorpcija tekočine s strani vilusnih enterocitov je v normalnih razmerah v ravnotežju z izločanjem tekočine s strani enterocitov v črevesnih žlezah. Enterociti so povezani z ostalimi celicami epitelija s tesnimi stiki, ki predstavljajo pregrado med črevesnim lumnom in epiteljskim medceličnim prostorom ter omogočajo selektivno zadrževanje absorbiranih snovi. Njihovo apikalno stran tvorijo mikrovili, ki povečajo njeno površino tudi do 600-krat, in ji dajejo ščetkast videz (brush border). Enterociti se obnovijo v 5 do 6 dneh (3, 10).

Panethove celice so eksokrine celice in se nahajajo le na dnu črevesnih žlez (Lieberkühnovih kript). Izločajo encim lizocim in α -defensine ter tako ščitijo pred okužbami s paraziti in bakterijami ter sodelujejo pri regulaciji normalne bakterijske črevesne flore. Izločajo tudi tumorje nekrotizirajoči faktor α , ki ima vlogo pri odzivu na okužbe in poškodbe tkiva. So piramidne oblike z okroglim jedrom in velikimi eozinofilnimi granulami v apikalnem delu celice. Njihova življenjske doba je 20 dni (1, 3).

Enteroendokrine celice se nahajajo predvsem v globljih delih črevesnih žlez, vendar jih zaradi njihove počasne migracije lahko najdemo na vseh nivojih posamezne resice (vilijske). Zelo so podobne enteroendokrinim celicam želodca, saj proizvajajo skoraj vse enake peptidne hormone kot jih v želodcu. Med najbolj aktivne regulatorje v tem delu prebavnega trakta tako spadajo holecistokinin (CCK), sekretin, želodčni inhibitorni peptid (GIP) in motilin. Poleg teh izločajo enteroendokrine celice tudi vsaj dva parakrina hormona, in sicer somatostatin in histamin, ki delujeta lokalno in ne vstopata v krvni obtok. Bazalni deli celic ležijo na bazalni lamini, pri čemer celice ne segajo do površine epitelija. Številne sekretorne granule, ki se nahajajo na bazalni strani, celice izločajo preko bazalne lamine v vezivno tkivo (3). Kot označevalec enteroendokrinih celic se pogosto uporablja kromogranin A (9).

Celice M so spremenjeni enterociti, ki prekrivajo Peyerjeve plošče in druge povečane limfatične folikle v lamini proprijii. Z endocitozo zajemajo mikroorganizme in makromolekule iz črevesnega lumna ter jih transportirajo do bazolateralne membrane, kjer jih izločijo v epiteljski medcelični prostor v neposredno bližino celic imunskega sistema. Na apikalni površini imajo celice M namesto mikrovilijev mikrogube (3).

Prehodne celice so prevladujoče celice v srednjem delu črevesnih žlez (Lieberkühnovih kript). Sposobne so omejenega števila celičnih delitev, preden se diferencirajo v eno izmed petih vrst zrelih celic. Prve tri generacije prehodnih celic, ki nastanejo iz pravih matičnih celic, so potencialne matične celice. To pomeni, da so sposobne delovati kot matične celice, če je to potrebno (npr. po obsežni poškodbi celic) (11).

Vse opisane zrele in prehodne celice črevesnega epitelija izvirajo iz ene same populacije **matičnih celic**. Zanje je značilno, da so nediferencirane, sposobne proliferacije in samoobnavljanja. Nahajajo se tik nad dnom črevesnih žlez, kjer iz njih nastajajo z asimetrično delitvijo prehodne celice. Te med zorenjem in diferenciacijo potujejo navzgor iz črevesnih žlez proti vrhu resic (vilijske), kjer se nepoškodovane odluščijo v lumen. Zrele celice se tako nahajajo predvsem na resicah (vilijskih). Izjema so Panethove celice, ki se med

zorenjem spustijo na dno črevesnih žlez pod matične celice. Matičnih celic ne moremo morfološko ločiti od preostalih epiteljskih celic, prav tako pa še ni poznanih označevalcev, ki bi bili specifični za te celice (3, 11).

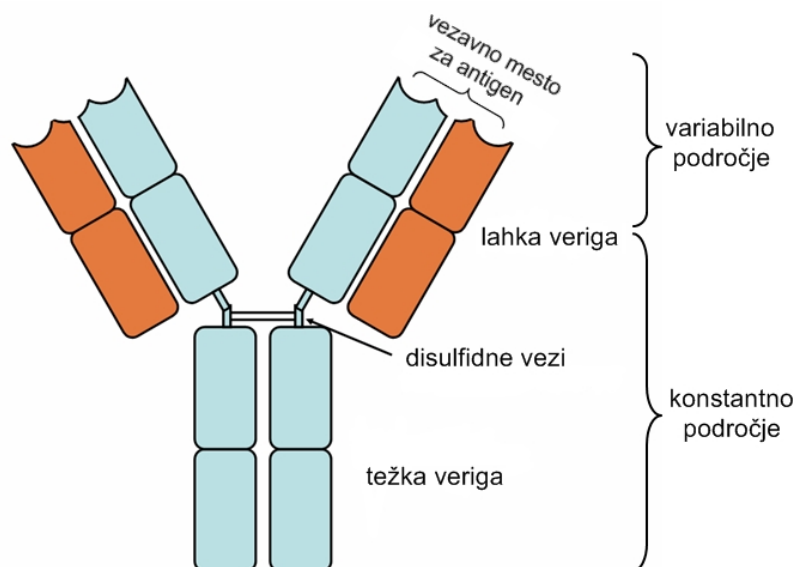
1.3 Identifikacija celic v mešani kulturi

Za identifikacijo celic v mešani kulturi uporabljamo različne pristope. Eden je morfološko razlikovanje celic pod mikroskopom s pomočjo faznega kontrasta ali s pomočjo nespecifičnega barvanja. Drugi je citokemično barvanje, v kolikor se metabolizem celic značilno razlikuje. Možno pa je tudi imunokemijsko opredeljevanje celic glede na njihove specifične znotrajcelične, membranske ali izločene molekule. Pri tem izkoriščamo molekulsko specifičnost vezave protiteles na tarčno molekulo.

1.3.1 Protitelesa kot reagenti

Protitelesa ali imunoglobulini (Ig) so glikozilirani globularni proteini z navidezno molekulsko maso okrog 150 kDa. Njihova struktura je simetrična, sestavljena iz dveh enakih težkih polipeptidnih verig ter dveh enakih lahkih polipeptidnih verig, povezanih z disulfidnimi vezmi. Glede na vrsto težke verige jih razdelimo v razrede IgG, IgM, IgA, IgD in IgE ter naprej na podrazrede. Težke in lahke polipeptidne verige sestavljajo konstantna in variabilna področja, ki se razlikujejo v stopnji ohranjenosti aminokislinske sestave med različnimi protitelesi iste vrste.

Protitelesa IgG imajo lahko verigo sestavljeno iz enega, težko pa iz treh konstantnih področij. Ta so odgovorna za vezavo IgG na komplement in na celice, udeležene v imunskem odgovoru. Na N-koncu lahke in težke verige je variabilno področje protiteles, ki določa njihovo specifičnost za antigene in za katerega je značilna večja raznolikost v aminokislinskem zaporedju. Znotraj variabilnega področja posamezne verige so po tri področja hipervariabilnega zaporedja (komplementarnost določajoča področja – CDR). Po šest CDR-jev na vsaki strani molekule predstavlja vezavno mesto za antigen. Omenjena področja imajo največjo idiotipsko variabilnost med protitelesi, ki je osnova imunskega odziva. Tridimenzionalna struktura molekule IgG ima obliko črke Y (Slika 3).



Slika 3: Shematski prikaz strukture IgG.

Protitelesa IgM nastopajo v obliki pentamerov, sestavljenih iz petih osnovnih struktur (v obliki črke Y), povezanih z disulfidnimi vezmi in segmentom v obliki črke J. Njihove težke verige so sestavljene iz petih področij oz. domen. Običajno imajo nižjo afiniteto od IgG, saj nastajajo pretežno v začetnih stopnjah imunizacije.

Protitelesa so del humoralnega imunskega sistema in so prisotna v krvi, tkivnih tekočinah in telesnih izločkih. Do aktivacije imunskega sistema in nastanka specifičnih protiteles pride najpogosteje ob vdoru mikroorganizmov v telo. Tuj antigen se veže na ustrezne limfocite B in s tem sproži njihovo delitev in diferenciacijo v plazmatske celice. Te izločajo velike količine specifičnega imunoglobulina, kar omogoča takojšnje in učinkovito ukrepanje imunskega sistema. Nekateri aktivirani limfociti B pa se diferencirajo v spominske celice. Te ne izločajo protiteles in so zaslužne za hitrejši in večji imunski odziv ob kasnejšem ponovnem stiku z omenjenim antigenom.

Pri vezavi protiteles na antigen pride do tvorbe nekovalentnih vezi, in sicer vodikovih in ionskih vezi, hidrofobnih interakcij ter van der Waalsovih sil. Kljub temu, da gre za nekovalentne vezi, je povezava antigena in protitelesa močna zaradi velikega števila tovrstnih interakcij.

Poliklonska protitelesa so protitelesa proti različnim epitopom na antigenu, ki jih proizvajajo številni kloni limfocitov B. Ta protitelesa imajo različni specifičnost in afiniteto. Njihov nastanek sprožijo kompleksni antigeni z več epitopi. Pridobivajo jih z imunizacijo živali in odvzemanjem njihove krvi. **Monoklonska protitelesa** so med seboj

enaka protitelesa proti istemu epitopu, pridobljena iz enega samega klona limfocitov B. Nastanejo, če je na antigenu prisoten le en epitop. Za uporabo v diagnostične in terapevtske namene so primernejša od poliklonskih, saj imajo definirano specifičnost in možnost pridobivanja v velikih količinah s pomočjo hibridomskih celic *in vitro*.

Pri imunokemijskih metodah močno prevladuje uporaba protiteles razreda IgG. Razlogi za to so številni: pri imunizaciji nastane največ ravno protiteles IgG, izmed vseh se vežejo na epitope z največjo afiniteto, so stabilni med izolacijo in čiščenjem ter imajo številna funkcionalna mesta, ki jih lahko uporabimo za kemično vezavo z minimalno izgubo afinitete. Protitelesa IgM imajo zaradi svoje pentamerne strukture nekaj prednosti pri uporabi, kadar je potrebno ojačanje signala pri imunohistokemijskih in podobnih metodah. Težave lahko povzročajo njihova velikost, nižja afiniteta in zahtevnejše čiščenje ter frakcionacija. Protitelesa razredov IgA, IgD in IgE se redko uporabljajo pri imunokemijskih metodah, bodisi zaradi njihove majhne količine bodisi njihove nižje afinitete.

Priprava poliklonskih protiteles je najenostavnejša, najhitrejša in najcenejša, vendar njihovo uporabnost omejuje stopnja njihove specifičnosti in čistosti ter omejena količina antiseruma, pridobljenega iz posamezne živali. Pri nekaterih metodah je nabor protiteles proti različnim epitopom prednost, pri številnih drugih pa ravno to zmanjšuje njihovo specifičnost. Prednosti monoklonskih protiteles so v možnosti pridobivanja neomejenih količin teh protiteles in v njihovi zelo veliki specifičnosti za posamezen epitop. Dejstvo pa je, da ima lahko več različnih molekul enak epitop. Prav tako je zahtevno njihovo pridobivanje, ki terja veliko dela in časa. Vse več se uporablja tudi rekombinantni pristop, ki omogoča pripravo protiteles z zelo širokim naborom specifičnosti iz dane knjižnice. Situacija je torej takšna, kot da bi imeli na voljo celo vrsto različnih monoklonskih protiteles. Poleg tega je mogoče s spreminjanjem genov odpraviti nezaželeno navzkrižno reaktivnost, izboljšati afiniteto ter ustvariti večvalentne konstrukte. Njihovo pridobivanje s pomočjo bakterijskih fermentorjev je prav tako hitrejše in cenejše kot *in vitro* pridobivanje monoklonskih protiteles. Pred novo uporabo je potrebno z ustreznimi kontrolami, ne glede na to, ali so protitelesa poliklonska, monoklonska ali rekombinantna, temeljito preveriti njihovo specifičnost in določiti najprimernejše koncentracije v metodah, za katere smo jih namenili (12, 13).

1.4 Imunokemijske metode

Z izrazom imunokemijske metode označujemo analitične metode, ki temeljijo na uporabi protiteles kot reagentov in nam omogočajo delo z nizkimi koncentracijami analitov (antigenov) v kompleksnih vzorcih. Zasluga za široko uporabo tovrstnih tehnik gre na račun treh lastnosti protiteles. Prva je sposobnost vezave številnih naravnih in umetnih kemijskih spojin, bioloških molekul, celic in virusov. Druga lastnost je izjemna specifičnost vezave antigenov, kljub prisotnosti zelo podobnih spojin. Tretja pa je velika moč nekovalentnih vezi med protitelesi in antigeni, ki prestanejo tudi bolj grobe faze analiz. Pri imunokemijskih metodah nastane imunski kompleks, ki ga moramo zaznati. Za slednje je možnih več pristopov, od najenostavnejših vizualizacij nastale oborine ali izkosmičenja do kompleksnejših, ki obsegajo dodatne imunokemijske reakcije z označenimi molekulami (izotopi, encimi, fluorokromi), kar omogoči identifikacijo in kvantifikacijo preiskovanih spojin (13, 14). V nekaterih primerih ni ostre meje med imunokemijskimi in imunološkimi metodami, saj je nastanek imunskega kompleksa v obeh primerih ključno dogajanje.

1.4.1 Pasivna gelska difuzija

Številne kvalitativne in kvantitativne metode se izvajajo v poltrdnem mediju, kot je agarozni gel ali gel iz agarja. Uporaba gela poveča občutljivost in ločljivost obarjalnih analiz v primerjavi s tistimi v raztopini. Prav tako stabilizira proces difuzije, saj preprečuje mešanje, povzročeno s tresenjem ali konvekcijo. Poleg tega omogoča kvalitativno in kvantitativno ovrednotenje reakcije preko vizualizacije nastale oborine. Pasivna difuzija je odvisna od koncentracijskega gradienta in difuzijskega koeficienta snovi, ki difundira. Slednji je odvisen od temperature in velikosti hidratirane molekule analita. Količina snovi, ki prepotuje z začetne na končno točko, je odvisna od časa, ki je na voljo za difuzijo. Zelo pomembni sta začetni koncentraciji protiteles in antigena. Vse spojine oblikujejo s časom lasten koncentracijski gradient v gelu. Ko pride do stika med potujočimi protitelesi in antigenom, se reakcija prične, vendar oborina še ne nastane. V primeru izrazitega prebitka protiteles pride do nastanka majhnih topnih kompleksov protitelo-antigen. Razlog je v tem, da protitelesa zelo hitro zasedejo vsa vezavna mesta na antigenih in tako preprečijo premreženje kompleksov. O stanju ekvivalence govorimo, kadar so protitelesa le v rahlem

presežku, kar pomeni, da so na vsako molekulo antigena prisotne dve do tri molekule protiteles. Takrat je verjetnost premreženja antigenov s protitelesi največja, zato nastanejo veliki kompleksi, ki so netopni in jih vidimo kot oborino. V primeru, da je v prebitku antigen, nastanejo kompleksi iz dveh molekul antigena in ene molekule protiteles. Ker so zasedena vsa vezavna mesta na protitelesih, ne pride do premreženja in tudi v tem primeru oborina ne nastane. Oborina lahko nastane in se nato ponovno raztopi zaradi omenjenega presežka difundirajočega antigena. To se ponavlja, dokler se ne vzpostavi ekvivalenca in se položaj oborine ne stabilizira. Na opisanem principu temeljita dve pogostejši uporabljene metodi.

Prva je kvantitativna in se imenuje **radialna imunodifuzija (RID)**. V tem primeru so običajno protitelesa določene koncentracije kar sestavni del samega gela, antigen pa je edini reaktant, ki potuje v gelu in pri katerem se vzpostavi koncentracijski gradient. Antigen difundira iz vdolbinice v gel, dokler se ne vzpostavi rahel prebitek protiteles in nastane oborina. Ta ima obliko obroča okrog vdolbinice in se povečuje toliko časa, da je doseženo ravnotežje. Za kvantifikacijo se uporabi površina ali premer nastalega obroča. Protitelesa morajo biti poliklonska, občutljivost metode pa je 1–20 mg/l antigena. Metoda se uporablja rutinsko za meritve serumskih proteinov, zlasti imunoglobulinov, pri sumu na multipli mielom ali pri pomanjkanju imunoglobulinov. Je zelo enostavna in zahteva minimalno opreme, vendar je tudi počasna, zlasti za antigene z visoko molekulsko maso.

Druga metoda je kvalitativna in je poznana pod imenom **dvojna imunodifuzija** ali **Ouchterlonyjeva tehnika**. Pri tej metodi potujejo iz vdolbinic v gel in oblikujejo koncentracijski gradient tako antigen kot tudi protitelesa. Med vdolbinicami, kjer se vzpostavi ravnotežje med antigenom in protitelesi, nastane oborina, ki ima obliko črte. Če je v vzorčnih raztopinah prisotnih več različnih antigenov, ki lahko reagirajo s protitelesi v antiserumu, bo nastalo med vdolbinicami več črt. Položaj teh oborin bo odvisen od začetnih koncentracij reaktantov v vdolbinicah in njihovih molekulskih velikosti. Z opazovanjem geometrijskih oblik oborin, ki jih tvorijo antigeni iz sosednjih vdolbinic s protitelesi, lahko primerjamo in ugotavljamo, ali so antigeni v različnih vzorcih enaki, različni ali navskrižno reaktivni. Poleg tega lahko približno določimo koncentracije antigenov na podlagi debeline precipitacijskih črt. Opisana metoda se uporablja tudi za preverjanje antiserumov na prisotnost in specifičnost protiteles proti določenemu antigenu ter za določanje precipitacijskih lastnosti in približnega titra antiserumov. Občutljivost Ouchterlonyjeve tehnike je odvisna od koncentracij antigenov in protiteles ter od

medsebojne oddaljenosti vdolbinic. Pri tem velja, da manjša kot je oddaljenost vdolbinic, večja je občutljivost. Običajno je mogoče zaznati antigene v raztopinah s koncentracijo od 10 mg/l naprej. Inkubacija gela lahko poteka pri različnih temperaturah, pri čemer je pri višjih lahko krajša, saj poteka difuzija hitreje. Tako je potrebno pustiti gel pri 37°C le nekaj ur, pri temperaturi 20–25°C 24–48 ur, pri 4°C pa kar 48–72 ur. Metoda je enostavna, vendar počasna in zahteva uporabo poliklonskih protiteles (12, 14, 15).

1.4.2 Označene imunske metode

Za razliko od zgoraj opisanih metod, pri katerih je merilo za obseg reakcije med antigenom in protitelesi količina nastalega imunskega kompleksa, služijo označenim imunskim metodam za kvantifikacijo reakcije antigeni in protitelesa s posebnimi označevalci. Med slednje spadajo radioaktivni izotopi, encimi, luminiscenčne snovi, kofaktorji, fluorofori, radikali, inhibitorji, kovine, polinukleotidi, substrati in drugi. Izvedbe so lahko kompetitivne ali nekompetitivne (14).

1.4.2.1 Kompetitivne metode

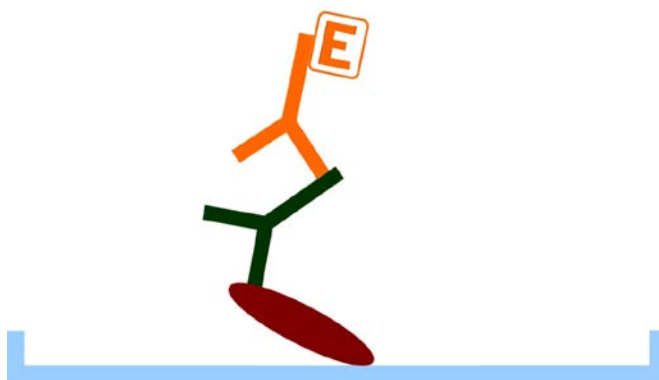
Kompetitivne metode so primerne za analizo majhnih molekul. Temeljijo na uporabi omejene količine protiteles ene vrste. Reagent, potreben za tvorbo signala, je kar molekula analita, označena z ustreznim označevalcem. Izvajamo jih lahko tako, da istočasno dodamo vse reagente ali pa jih dodajamo postopoma. V prvem primeru označen reagent "tekmuje" z analitom iz vzorca za vezavo na omejeno količino protiteles. Delež reagenta, ki se veže na protitelesa, je obratno sorazmeren količini analita v vzorcu pod pogojem, da protitelesa vežejo oba antigena z enako afiniteto. V primeru postopnega dodajanja reagentov najprej dodamo analitu presežno koncentracijo protiteles in pustimo, da se vzpostavi ravnotežje. Nato dodamo označen reagent, ki se veže na preostala prosta protitelesa. Koncentracijo analita v vzorcu preračunamo iz signala, ki ga daje vezan označen reagent. Pri postopnem dodajanju reagentov se na protitelesa veže večji delež analita iz vzorca kot v primeru hkratnega dodatka vseh reagentov. Meja detekcije je zato lahko 2–4-krat nižja, v obeh primerih pa odvisna tudi od afinitete protiteles. Kljub imenu pri opisanih metodah ne gre za pravo tekmovanje med analitom in reagentom. Označen reagent predstavlja le način, s katerim določimo delež vezanega in delež prostega analita iz vzorca (13, 14).

1.4.2.2 Nekompetitivne imunometrične metode z uporabo enega epitopa

Te metode predstavljajo naslednjo stopnjo v razvoju imunskih metod. Glavna razlika v primerjavi s kompetitivnimi metodami je v uporabi označenih protiteles za tvorbo signala namesto uporabe označenih molekul analita.

Preiskovani spojini v vzorcu dodamo označena protitelesa in inkubiramo. Nato odstranimo nevezana protitelesa z dodatkom presežne količine analita, vezanega na trdno fazo. Izvajamo jih lahko na dva načina. Pri prvem uporabimo omejeno količino označenih protiteles, zato je s tega vidika analogen kompetitivnim metodam. Drugi način pa narekuje uporabo presežne količine označenih protiteles. S tem se pomakne ravnotežje reakcije med antigenom in protitelesi bolj v smeri nastajanja kompleksa antigen–protitelo, kot je to mogoče pri kompetitivnih metodah. Merimo lahko jakost signala protiteles, vezanih na preiskovano spojino, ali pa jakost signala presežnih protiteles, vezanih na trdno fazo.

Med imunometrične metode z uporabo enega epitopa spada tudi redkeje uporabljena oblika encimsko imunske metode na trdni podlagi, ki jo lahko imenujemo direktna ELISA. Metoda je zelo podobna kasneje opisani sandvič ELISI s to razliko, da na trdno podlago ne vezemo lovilnih protiteles, pač pa spojine, prisotne v vzorcu. Temu sledi spiranje podlage, s čimer odstranimo preostale proste spojine in inkubacija z označenimi protitelesi, specifičnimi za antigen, ki ga želimo določiti. Naslednji korak je odstranitev presežnih protiteles in meritev jakosti signala, ki ga oddajajo vezana označena protitelesa (Slika 4). Imunometrične metode z uporabo enega epitopa in presežno količino označenih protiteles imajo le redko večjo občutljivost kot kompetitivne metode (13, 16).

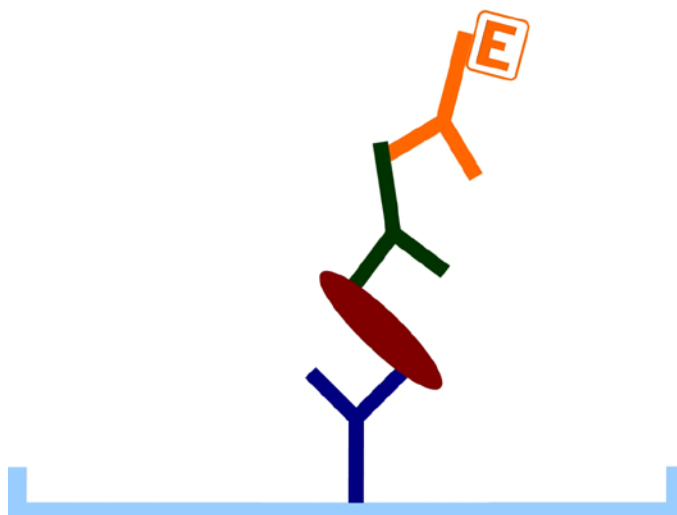


Slika 4: Princip direktne ELISE z uporabo dveh vrst protiteles, pri čemer so sekundarna protitelesa označena z encimom.

1.4.2.3 Nekompetitivne imunometrične metode z uporabo dveh epitopov

Uporabljamo jih za analizo analitov z več epitopi, ki so med seboj dovolj oddaljeni, da omogočajo vezavo dveh različnih protiteles hkrati. Prva stopnja je pasivna ali kovalentna vezava lovilnih protiteles na trdno podlago. Sledi inkubacija vzorca, pri čemer lovilna protitelesa reagirajo s prvim epitopom na preiskovanem analitu in ga tako vežejo na podlago. To nato spiramo in s tem odstranimo vse ostale proste spojine. Sledi inkubacija z označenimi protitelesi, ki se vežejo na drugi epitop ujetega preiskovanega analita. Presežno količino označenih protiteles odstranimo s ponovnim spiranjem. Zadnja stopnja je merjenje jakosti signala, ki ga daje označevalec drugih protiteles, vezanih na antigen. Namesto označenih protiteles lahko na drugi epitop ujetega preiskovanega analita vežemo tudi neoznačena sekundarna protitelesa. To zahteva, da po spiranju uporabimo še tretji nivo protiteles, in sicer označena protitelesa proti konstantnemu delu sekundarnih protiteles. Enako kot prej tudi pri tej izvedbi sledi še eno spiranje in merjenje jakosti signala. Pri tovrstnih metodah je jakost signala premo sorazmerna koncentraciji preiskovane spojine v vzorcu. Opisane metode so zelo specifične zaradi uporabe dveh vrst protiteles. Ta so lahko poliklonska ali monoklonska. V primeru uporabe dveh vrst monoklonskih protiteles, specifičnih proti različnima epitopoma, je mogoče z vezanimi lovilnimi protitelesi inkubirati hkrati tako preiskovani antigen kot tudi označena protitelesa. Imunometrične metode z uporabo dveh epitopov lahko torej izvajamo tako, da istočasno dodamo vse reagentne ali pa jih dodajamo postopoma. Zaradi lege analita med dvema protitelesoma opisane metode pogosto poimenujemo kar sendvič metode. Njihova meja detekcije je v največji meri odvisna od zmožnosti detektorja, da izmeri signal, ki ga posreduje označevalec. Med najboljčutljivejše imunske metode spadajo nekompetitivne luminescenčne encimsko imunske metode. Imunometrične metode, ki imajo lovilna protitelesa vezana na trdno podlago in druga protitelesa označena z encimom, imenujemo tudi encimsko imunske metode na trdni podlagi ali ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Slika 5). Aktivnost encima omogoča detekcijo in kvantifikacijo imunske reakcije ter njeno ojačanje, saj vsaka molekula encima katalizira nastanek številnih signalnih molekul. Najpogosteje uporabljeni encimi so alkalna fosfataza, hrenova peroksidaza, glukoza-6-dehidrogenaza, β -galaktozidaza, ureaza in penicilinaza G. Pri tem lahko uporabimo kromogene, fluorogene ali luminescenčne substrate in nato ustrezne fotometre, detektorje fluorescence ali detektorje luminiscence. Za povečanje občutljivosti se uporablja tudi

sistem encimske kaskade, kjer gre za skupno ojačanje signala s strani vseh encimov v kaskadi. Potek ELISE je enak zgoraj opisanemu s postopnim dodajanjem reagentov. Kot trdna podlaga se najpogosteje uporabljajo mikrotitrne plošče. Učinkovitost ELISE je posledica dejstev, da encimi konjugirajo protitelesa ali antigene, pri tem pa se ohranijo biološke značilnosti obeh komponent, nadalje da se po vezavi na mikrotitrne plošče ohrani aktivnost protiteles oz. antigenov in da tvorba imunskega kompleksa ter enostavno spiranje nevezanih komponent ustvari visoko razmerje signal/šum. Sendvič ELISA je zelo uporabna zaradi visokih specifičnosti in občutljivosti ter enostavnosti. Uporablja se za dokazovanje prisotnosti in določanje koncentracije antigenov ali protiteles v vzorcih ob uporabi ustreznih standardov in umeritvenih krivulj. Je zanesljiva in primerna metoda za presejalne preizkuse velikega števila vzorcev. Uporablja se tudi za rutinsko preverjanje monoklonskih protiteles, določanje specifičnih izotipov protiteles in imunskih kompleksov. Zaradi enostavne izvedbe in dobre občutljivosti je osnova nekaterim urinskim testom za ugotavljanje nosečnosti (12, 13, 14, 17).



Slika 5: Princip sendvič ELISE z uporabo treh vrst protiteles, pri čemer so terciarna protitelesa označena z encimom.

1.5 Pomembni parametri analiznih metod

Parametri, s katerimi ocenjujemo in opisujemo kvaliteto analizne metode, so točnost, natančnost, analizna občutljivost, analizna specifičnost, meja detekcije, analizno območje, vrednost ozadja, moteči dejavniki, robustnost, stabilnost reagentov in morebitne interakcije

z vzorci. Vrednosti naštetih parametrov predstavljajo pomemben dejavnik pri odločanju o primernosti posamezne analizne metode za našo uporabo.

Točnost je definirana kot bližina med izmerjeno vrednostjo analita in njegovo resnično oz. sprejeto vrednostjo. Za njeno vrednotenje uporabljamo sistemsko napako in celokupno napako. Sistemsko napako običajno določimo s primerjavo rezultatov preizkušane in referenčne metode. Celokupna napaka pa zajema tako sistemsko kot tudi naključno napako in predstavlja največjo možno napako pri dani metodi.

Natančnost je sposobnost metode, da daje pri večkratnih analiza istega vzorca ves čas enake vrednosti. Za njeno vrednotenje uporabljamo naključno napako. Običajno jo določimo tako, da analizo danega vzorca ponovimo vsaj 20-krat in nato izračunamo standardno deviacijo meritev. Natančnost lahko najboljše ocenimo z izračunom variabilnostnega koeficienta.

Analizna občutljivost je definirana kot naklon umeritvene krivulje oz. sposobnost metode, da daje spremenjen odziv pri določeni spremembi merjene količine. To nam pove, kakšna je sprememba signala pri določeni spremembi količine analita. V analizo občutljivost sodi tudi meja zaznavanja ali **meja detekcije**. Opisujemo jo kot najmanjšo koncentracijo oz. količino analita, ki jo analizna metoda še zazna z določeno stopnjo zanesljivosti. Odvisna je od natančnosti metode in od vrednosti njenega ozadja. Tudi mejo detekcije lahko razberemo iz umeritvene krivulje, ki je v idealnem primeru kar njeno presečišče z ordinatno osjo.

Analizna specifičnost je sposobnost metode, da meri izključno tisti analit, zaradi katerega jo uporabljamo in ne reagira z drugimi podobnimi substancami.

Analizno območje je interval koncentracije oz. druge količine vzorca, znotraj katerega lahko uporabljamo metodo brez posebnih modifikacij. Pogosto je to območje linearno. Biti mora tudi dovolj široko, da zajame pričakovane vrednosti preiskovanega analita.

Vrednost ozadja je signal, ki ga daje metoda zaradi reagentov in sestavin vzorca in ne kot posledica prisotnosti preiskovanega analita. Ozadje prispeva k celokupni napaki metode.

Moteči dejavniki so snovi, ki niso predmet analize, vendar vplivajo na točnost izmerjene količine analita.

Metoda je **robustna**, če daje zanesljive rezultate skozi daljši čas ob uporabi različnih serij reagentov in s strani različnih laboratorijev (14).

2 NAMEN DELA

Številne kronične črevesne bolezni, kot sta celiakija in kronična vnetna črevesna bolezen, so predmet intenzivnih raziskav. Te so zelo zahtevne, tudi zaradi pomanjkanja ustreznega heterogenega *in vitro* celičnega modela, ki ne bi bil sestavljen iz rakavih celičnih linij. Lukač Bajalo in sod. razvijajo študijski model primarne kulture intestinalnih celic. Njihovo delo z mišjim modelom je pokazalo, da je mogoče kultivirati mišje enterocite skozi daljše obdobje, vendar pa je za sočasno spremljanje več intestinalnih celičnih vrst potrebna večja gostota celic. To je razlog, da so v nadaljevanju raziskovalnega dela uporabili podganji model. V heterogenem intestinalnem celičnem modelu so najverjetneje prisotne vse intestinalne celične vrste, in sicer enterociti, čašaste celice, Panethove celice, enteroendokrine celice, celice M, prehodne celice in matične celice.

V študijskem modelu razpršenih podganjih intestinalnih epitelijskih celic bomo spremljali čašaste celice. Spreminjanje njihovega števila oz. aktivnosti tekom kultiviranja bomo ocenili s pomočjo mucina 2, označevalca intestinalnih čašastih celic. Komerencialno dostopnega analiznega kompleta nismo našli, zato je namen našega dela razvoj metode za merjenje omenjenega glikoproteina. Ker gre za heterogeni celični model, pričakujemo manjše število čašastih celic in s tem nizko vsebnost Muc2. Poleg tega predstavljajo celični lizati in uporabljen kultivacijski medij takšnega števila različnih celičnih vrst zelo kompleksne vzorce. Ker bomo potrebovali zelo občutljivo in specifično metodo, smo se odločili za eno izmed encimsko imunskih tehnik. Razvili bomo encimsko imunsko metodo na trdni podlagi (ELISA), pri čemer bomo uporabili komercialno dostopna protitelesa, kot trdno podlago pa mikrotitrne plošče. Muc2 čašaste celice shranjujejo v sekretornih granulah in izločajo v lumen, zato bomo preverili njegovo prisotnost tako v celičnih lizatih kot v uporabljenem kultivacijskem mediju.

Dobljeni rezultati bodo predstavljali izhodišče za pripravo orodja za spremljanje čašastih celic v kulturah razpršenih podganjih intestinalnih epitelijskih celic preko merjenja mucina 2.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Reagenti in kemikalije

- mikrotitrne plošče (Nunc Immobilizer Amino F96 Clear 436006 Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Danska)
- kunčja poliklonska protitelesa, usmerjena proti Muc2, H – 300 (Santa Cruz Biotechnology sc – 15334, Santa Cruz, ZDA)
- kozja poliklonska protitelesa, usmerjena proti Muc2, R – 12 (Santa Cruz Biotechnology sc – 13312, Santa Cruz, ZDA)
- oslovska protitelesa, konjugirana z ALP, usmerjena proti kozjim protitelesom (Santa Cruz Biotechnology sc – 2022, Santa Cruz, ZDA)
- kozja protitelesa, konjugirana s HRP, usmerjena proti kunčjim protitelesom (Millipore 12-348, Billerica, ZDA)
- rekombinantni Muc2 (Thermo Fisher Scientific RP – 10770 – PABX, Fremont, ZDA)
- substrat za fosfatazo (Sigma – Aldrich S0942 – 100TAB, St. Louis, ZDA)
- 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) (Sigma – Aldrich T8665 – 1L, St. Louis, ZDA)
- goveji serumski albumin (Sigma – Aldrich A3803 – 50G, St. Louis, ZDA)
- Tween 20 (Bio – Rad Laboratories 170 – 6531, Hercules, ZDA)
- dietanolamin (Sigma – Aldrich D8885 – 500G, St. Louis, ZDA)
- Coomassiejevo briljantno modro R 250 (Merck 112553, Darmstadt, Nemčija)
- citronska kislina (Sigma – Aldrich C1909, St. Louis, ZDA)
- agaroz (Sigma – Aldrich A6877, St. Louis, ZDA)
- brezvodni etanol (Carlo Erba Reagenti 414607002, Rodano, Italija)
- brezvodna etanojska kislina (Merck 1000631000, Darmstadt, Nemčija)
- RPMI 1640 medij s HEPES-om (Sigma – Aldrich R5886, St. Louis, ZDA)
- FBS (Sigma – Aldrich F4135, St. Louis, ZDA)
- raztopina L-glutamina (Sigma – Aldrich G7513, St. Louis, ZDA)
- raztopina antibiotika/antimikotika (10000 U/ml penicilina, 10 g/l streptomicina, 25 mg/l amfotericina B) (Sigma – Aldrich A5955, St. Louis, ZDA)

- 2-merkaptoetanol (Sigma – Aldrich M7522, St. Louis, ZDA)
- glukoza (Zorka Šabac, Šabac, Srbija)
- NaCl (za molekularno biologijo, $\geq 98\%$)
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (za molekularno biologijo, $\geq 99\%$)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Ph. Eur., BP)
- KCl (p.a.)
- KH_2PO_4 (p.a.)
- HCl (puriss. p.a.)
- NaOH (Baker analyzed, $\geq 98\%$)
- voda (ultra čista)

3.1.2 Priprava pufrov in raztopin

- o PBS – fosfatno pufrana slanica (pH 7,4)
za 500 ml potrebujemo:
4,00 g NaCl (137 mM)
0,579 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6,5 mM)
0,101 g KCl (2,7 mM)
0,102 g KH_2PO_4 (1,5 mM)
raztopimo v 450 ml destilirane vode,
pH uravnamo na 7,4 z 2 M HCl oz. NaOH,
dopolnemo z destilirano vodo do 500 ml

- o dietanolaminski pufer (pH 9,8)
za 250 ml potrebujemo:
2,63 g dietanolamina (100 mM)
0,0508 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mM)
raztopimo v 200 ml destilirane vode,
pH uravnamo na 9,8 z 2 M HCl oz. NaOH,
dopolnemo z destilirano vodo do 250 ml,
vsebnik zavijemo v aluminijasto folijo in shranimo pri 4°C

- o nanašalni pufer: PBS (pH 8,0)
 - za 100 ml potrebujemo:
 - do 100 ml PBS (pH 7,4)
 - pH uravnamo na 8,0 z 2 M HCl oz. NaOH

- o pufer za spiranje: PBS z 0,05 % (v/v) Tween 20 (pH 7,4)
 - za 100 ml potrebujemo:
 - 50 µl Tween 20
 - dopolnemo s PBS (pH 7,4) do 100 ml

- o blokirni pufer: PBS z 1 % BSA (pH 7,4)
 - za 100 ml potrebujemo:
 - 1 g BSA
 - raztopimo v 50 ml PBS (pH 7,4),
 - dopolnemo s PBS (pH 7,4) do 100 ml,
 - filtriramo in shranimo pri 4°C

- o pufer za TMB: fosfatno-citratni pufer (pH 6,0)
 - za 1000 ml potrebujemo:
 - 21 g $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$
 - 17,8 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$
 - raztopimo v 900 ml destilirane vode,
 - pH uravnamo na 6,0 z 2 M HCl oz. NaOH,
 - dopolnemo z destilirano vodo do 1000 ml

- o raztopina za barvanje
 - za 1000 ml potrebujemo:
 - 1 g Coomassiejevo briljantno modro R 250
 - 450 ml 96 % etanola
 - 100 ml brezvodne očetne kisline
 - dopolnemo z destilirano vodo do 1000 ml

- o raztopina za razbarvanje
 - za 1000 ml potrebujemo:
 - 250 ml 96 % etanola
 - 100 ml brezvodne očetne kisline
 - dopolnemo z destilirano vodo do 1000 ml

- o kompletiran RPMI 1640 kultivacijski medij
 - za 400 ml potrebujemo:
 - 352 ml RPMI 1640 s HEPES-om
 - 40 ml FBS
 - 4 ml 200 mM raztopine L-glutamina
 - 4 ml raztopine antibiotika/antimikotika
 - 400 mg glukoze
 - 400 µl 50 nM raztopine 2-merkaptoetanola

3.1.3 Vzorci

Ker je šlo za razvoj metode, smo pri večini eksperimentov uporabili standardne raztopine rekombinantnega Muc2. Tega smo z začetne koncentracije 100 mg/l redčili do ustrezne koncentracije z blokirnimi ali nanašalnimi pufromi.

Po končanem razvoju metode smo delo nadgradili z analizo vzorčnih raztopin. Imeli smo dve vrsti vzorcev, in sicer celične lizate ter rabljen kultivacijski medij. Osnova za pripravo teh vzorcev so bile izolirane epitelijske celice tankega črevesa šestih podgan, ki smo jih kultivirali po modificirani metodi Lukač Bajalo in sod. (33) pet tednov. Ob času 0 in ob koncu vsakega tedna smo iz določene količine celic pripravili celične lizate v destilirani vodi z zamrzovanjem in odmrzovanjem. Kasneje smo celičnim lizatam dodali še detergent Triton X in s tem zagotovili popolno lizo celic. Pred pripravo celičnih lizatov je bilo potrebno celice centrifugirati in jih ločiti od rabljenega kultivacijskega medija. Tega smo takoj po ločitvi zamrznili in ga pustili v zmrzovalniku do analize. Za kultiviranje smo uporabili kompletiran RPMI 1640 kultivacijski medij.

3.1.4 Aparature

- * mikrotitrski čitalec Safire² (Tecan, Männedorf, Švica)
- * mikrotitrski čitalec GENios (Tecan, Männedorf, Švica)
- * stresalnik in termostatirana komora Environmental Shaker-Incubator ES-20 (Biosan, Riga, Latvija)
- * sistem za analizo in dokumentiranje gelov G: BOX (Syngene, Cambridge, Velika Britanija)
- * sistem za pripravo ultra čiste vode Purelab Classic (Elga, High Wycombe, Velika Britanija)
- * pH meter SevenEasy (Mettler-Toledo, Columbus, ZDA)
- * tehnica Exacta 300 EB (Tehnica, Železniki, Slovenija)
- * vibracijsko mešalo Bio vortex V1 (Biosan, Riga, Latvija)

3.2 Metode

3.2.1 Sendvič ELISA

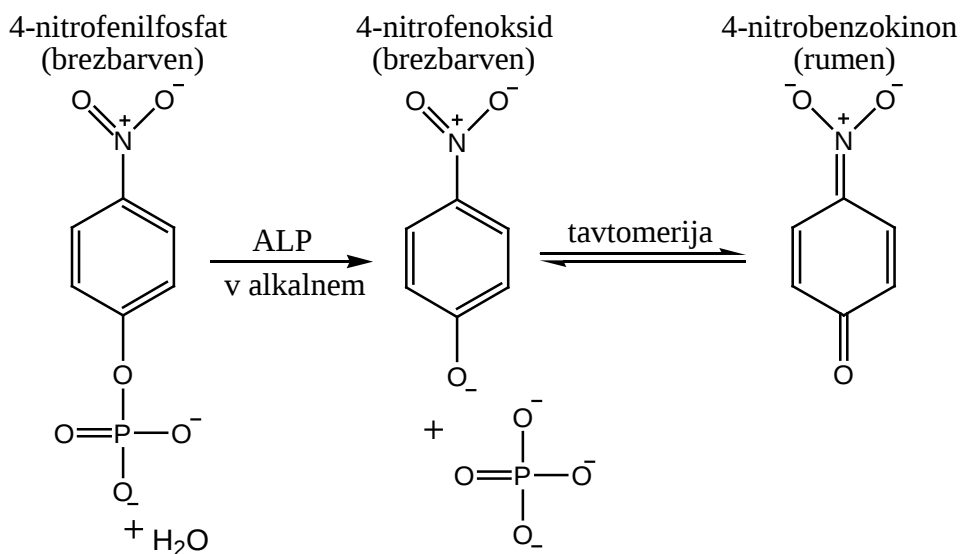
3.2.1.1 Opis metode

Pri sendvič izvedbi encimsko imunske metode smo kot primarna (lovilna) protitelesa na mikrotitrsko ploščo vezali kunčja poliklonska protitelesa, usmerjena proti aminokislinam na C-koncu Muc2. Za sekundarna (detekcijska) protitelesa smo si izbrali kozja poliklonska protitelesa, usmerjena proti aminokislinam v bližini N-konca Muc2. Obe vrsti protiteles sta se vezali na različne epitope na različnih delih antigena, kar je nujen pogoj pri sendvič ELISI. Poleg tega je pomembno tudi, da sta bili pridobljeni obe vrsti protiteles z imunizacijo različnih živali. V nasprotnem primeru bi se terciarna (konjugirana) protitelesa vezala na primarna in sekundarna protitelesa, namesto da bi se vezala samo na sekundarna. Proizvajalec primarnih in sekundarnih protiteles navaja, da so primerna za uporabo v encimsko imunskih metodah Muc2 mišjega, podganjega ali človeškega izvora. Dodaja pa, da nima podatkov glede njihove uporabe pri sendvič ELISI. Ker sekundarna protitelesa niso bila označena, smo uporabili še terciarna protitelesa, in sicer oslovsko protitelesa, konjugirana z encimom alkalna fosfataza, usmerjena proti kozjim protitelesom (29, 30).

Kot trdni nosilec smo uporabili mikrotitrne plošče, ki kovalentno vežejo peptide, proteine in protitelesa. Izdelane so s pomočjo fotokemične metode, ki uvede na površino mikrotitrne plošče etilenglikolni vmesnik in stabilno elektrofilno skupino. Slednja reagira z aminskimi, tiolnimi, hidroksilnimi in drugimi nukleofilnimi skupinami. Proizvajalec navaja, da so plošče pripravljene za takojšno uporabo brez predhodne aktivacije ali kasnejšega koraka blokade nezasedenih vezavnih mest (31).

Naš standard je bil rekombinantni humani mucin 2. Proizvajajo ga v obliki GST-Muc2 fuzijskega proteina z navidezno molekulsko maso okrog 50 kDa. Kot ekspresijski sistem pri tem uporabljajo *E. coli* (32).

Uporabljena terciarna protitelesa so bila označena z encimom alkalna fosfataza, zato je detekcija nastalih imunskih kompleksov temeljila na njeni katalizi pretvorbe substrata v obarvan produkt. Alkalna fosfataza (ALP) je encim, ki katalizira hidrolitično cepitev estrske vezi med fosforjevo kislino in hidroksilno skupino (Slika 6). Njena aktivnost je optimalna pri pH 9,5–10,5. Kot substrat smo uporabili brezbarven pNPP (para-nitrofenilfosfat), ki se je po reakciji obarval rumeno in smo ga lahko merili spektrofotometrično pri 405 nm (14).



Slika 6: Pretvorba pNPP v obarvan produkt pod vplivom alkalne fosfataze.

3.2.1.2 Postopek dela

1. Na mikrotitrsko ploščo Nunc ImmobilizerTM Amino smo nanesti raztopine kunčjih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti Muc2, pripravljene z nanašalnim pufrom. Obseg nanosa je bil 100 μl /vdolbinico.

2. Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali v škatli z rahlim stresanjem pri temperaturi 20–25°C.
3. Raztopine smo odstranili iz vdolbinic in ploščo spirali s pufrom za spiranje 3-krat s po 300 µl/vdolbinico.
4. V vdolbinice smo dodali po 100 µl/vdolbinico raztopin Muc2 v blokirnem pufru.
5. Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali v škatli pri temperaturi 20–25°C.
6. Raztopine smo odstranili iz vdolbinic in ploščo spirali s pufrom za spiranje 3-krat s po 300 µl/vdolbinico.
7. V vdolbinice smo dodali po 100 µl/vdolbinico raztopin kozjih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti Muc2, v blokirnem pufru.
8. Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali v škatli pri temperaturi 20–25°C.
9. Raztopine smo odstranili iz vdolbinic in ploščo spirali s pufrom za spiranje 3-krat s po 300 µl/vdolbinico.
10. V vdolbinice smo dodali po 100 µl/vdolbinico raztopin oslovskih protiteles, konjugiranih z ALP, usmerjenih proti kozjim protitelesom, v blokirnem pufru.
11. Mikrotitrsko ploščo smo inkubiramo v škatli pri temperaturi 20–25°C.
12. Raztopine smo odstranili iz vdolbinic in ploščo spirali s pufrom za spiranje 3-krat s po 300 µl/vdolbinico.
13. V vdolbinice smo dodali raztopino substrata za fosfatazo (pNPP v dietanolaminskem pufru s koncentracijo 1 g/l) v obsegu 100 µl/vdolbinico.
14. Mikrotitrsko ploščo smo pustili, da je reakcija poteka 10 minut pri temperaturi 20–25°C.
15. Analizo smo izvedli s čitalcem mikrotitrskih plošč z valovno dolžino, nastavljeno na 405 nm.

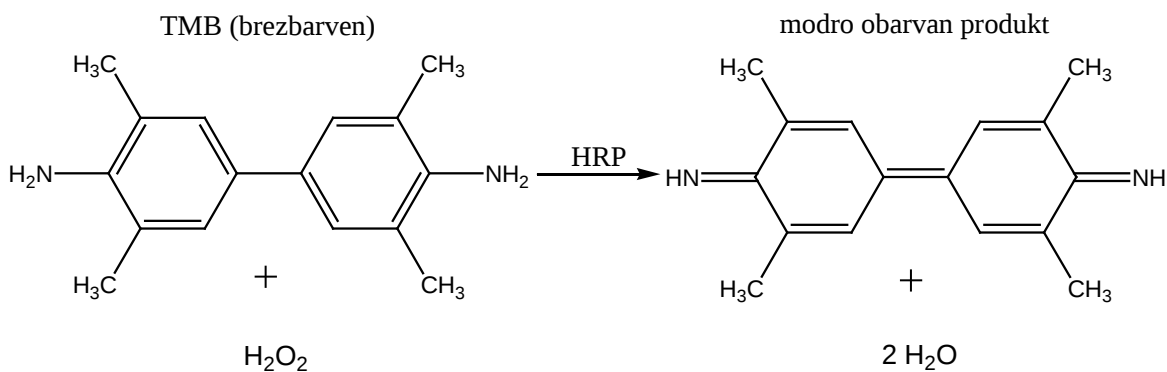
3.2.2 Direktna ELISA

3.2.2.1 Opis metode

Pri direktni ELISI smo uporabili enake mikrotitrške plošče in standard kot v zgornjem primeru. Po vezavi Muc2 v vdolbinice mikrotitrške plošče je sledila inkubacija kozjih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti Muc2. Za detekcijo teh pa smo uporabili oslovska protitelesa, konjugirana z alkalno fosfatazo, usmerjena proti kozjim protitelesom. Obe vrsti protiteles smo pred tem uporabili že pri sendvič ELISI. Ker smo imeli na voljo dve različni

vrsti protiteles proti različnim epitopom na dveh različnih delih antigena, smo lahko preizkusili še drugo izvedbo direktne ELISE. V tem primeru smo za detekcijo Muc2 uporabili najprej kunčja poliklonska protitelesa, usmerjena proti Muc2, v naslednjem koraku pa kozja protitelesa, konjugirana z encimom hrenova peroksidaza, usmerjena proti kunčjim protitelesom.

Hrenova peroksidaza (HRP) je oksidoreduktaza, ki reducira vodikov peroksid v vodo ob prisotnosti različnih donorjev vodika (Slika 7). Od slednjih je odvisno, ali bo oksidiran produkt obarvan, fluorescenčen ali luminiscenčen. Encim ima veliko katalitično hitrost, zato učinkovito ojača signal. Aktiven je v območju pH 4,0–8,0. Najpogostejši substrati za HRP so ABTS[®] (2,2'-azino-bis(etilbenzotiazolin-6-sulfonat)), OPD (o-fenilendiamin) in TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin), ki smo ga uporabili tudi sami. Absorbanco smo merili brez ustavljanja reakcije pri valovni dolžini 630 nm (13).



Slika 7: Pretvorba TMB v obarvan produkt pod vplivom hrenove peroksidaze.

3.2.2.2 Postopek dela I

1. Na mikrotitrsko ploščo Nunc ImmobilizerTM Amino smo nanесли raztopine Muc2, pripravljene z nanašalnim pufrom v obsegu 100 µl/vdolbinico.
2. Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali v škatli z rahlim stresanjem pri temperaturi 20–25°C.
3. Raztopine smo odstranili iz vdolbinic in ploščo spirali s pufrom za spiranje 3-krat s po 300 µl/vdolbinico.
4. V vdolbinice smo dodali po 100 µl/vdolbinico raztopin kozjih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti Muc2, v blokirnem pufu.
5. Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali v škatli pri 20–25°C.

6. Raztopine smo odstranili iz vdolbinic in ploščo spirali s pufrom za spiranje 3-krat s po 300 μl /vdolbinico.
7. V vdolbinice smo dodali po 100 μl /vdolbinico raztopin oslovskih protiteles, konjugiranih z ALP, usmerjenih proti kozjim protitelesom, v blokirnem pufru.
8. Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali v škatli pri 20–25°C.
9. Raztopine smo odstranili iz vdolbinic in ploščo spirali s pufrom za spiranje 3-krat s po 300 μl /vdolbinico.
10. V vdolbinice smo dodali raztopino substrata za fosfatazo (pNPP v dietanolaminskem pufru s koncentracijo 1 g/l) v obsegu 100 μl /vdolbinico.
11. Mikrotitrsko ploščo smo pustili, da je reakcija poteka 10 minut pri temperaturi 20–25°C.
12. Analizo smo izvedli s čitalcem mikrotitrskih plošč z valovno dolžino, nastavljeno na 405 nm.

3.2.2.3 Postopek dela II

1. Na mikrotitrsko ploščo Nunc ImmobilizerTM Amino smo nanесли raztopine Muc2, pripravljene z nanašalnim pufrom v obsegu 100 μl /vdolbinico.
2. Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali v škatli z rahlim stresanjem pri 20–25°C.
3. Raztopine smo odstranili iz vdolbinic in ploščo spirali s pufrom za spiranje 3-krat s po 300 μl /vdolbinico.
4. V vdolbinice smo dodali po 100 μl /vdolbinico raztopin kunčjih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti Muc2, v blokirnem pufru.
5. Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali v škatli pri 20–25°C.
6. Raztopine smo odstranili iz vdolbinic in ploščo spirali s pufrom za spiranje 3-krat s po 300 μl /vdolbinico.
7. V vdolbinice smo dodali po 100 μl /vdolbinico raztopin kozjih protiteles, konjugiranih s HRP, usmerjenih proti kunčjim protitelesom, v blokirnem pufru.
8. Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali v škatli pri 20–25°C.
9. Raztopine smo odstranili iz vdolbinic in ploščo spirali s pufrom za spiranje 3-krat s po 300 μl /vdolbinico.
10. V vdolbinice smo dodali raztopino substrata za HRP (TMB in pufer za TMB v razmerju 1:1) v obsegu 200 μl /vdolbinico.

11. Mikrotitrsko ploščo smo pustili, da je reakcija poteka 10 minut pri temperaturi 20–25°C.
12. Analizo smo izvedli s čitalcem mikrotitrskih plošč z valovno dolžino, nastavljeno na 630 nm.

3.2.3 Dvojna imunodifuzija

3.2.3.1 Opis metode

Agarozni gel smo vlili na plastične petrijevke s premerom 100 mm, pri čemer smo za eno petrijevko porabili približno 15 ml raztopine agaroze. Za izdelavo vdolbinic v strjenem gelu smo uporabili zadnji del kovinskega vložka za kemični svinčnik. Z njim smo zarezali v gel, nastale čepke pa odstranili s pomočjo injekcijskih igel in mikropipet. V vsako vdolbinico smo napipetirali po 12 µl preiskovane raztopine, kar je bilo dovolj, da smo jih napolnili do vrha. Inkubacija je potekala v škatli z navlaženo staničevino, saj bi se v nasprotnem primeru gel izsušil in difuzija bi se ustavila. Kjer je prišlo do imunske reakcije, je nastala belo obarvana oborina v obliki tanke ravne črte. Ker so bile te neizrazite v opalescenčnem gelu, smo jih po končani inkubaciji pobarvali z raztopino za barvanje (barvilo Coomassiejevo briljantno modro R 250) po spodaj opisanem postopku. Na ta način so postale bistveno izrazitejše, kar nam je omogočilo nedvoumno potrditev reakcije, če je do te prišlo.

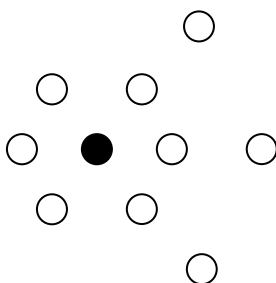
3.2.3.2 Postopek dela

1. Pripravili smo 1 % raztopino agaroze v PBS pufru (pH 7,4) ob segrevanju s pomočjo mikrovalovne pečice, dokler se vsa agarozna ni raztopila in je bila raztopina bistra.
2. Nekoliko ohlajeno raztopino agaroze smo vlili na plastično petrijevko do debeline 1–2 mm.
3. Na povsem vodoravni podlagi smo pustili petrijevko približno 30 minut, da se je gel strdil.
4. V gel smo naredili vdolbinice velike $\varnothing = 3$ mm po shemi, ki smo si jo predhodno pripravili in je prikazana na sliki 8.
5. V stranske vdolbinice smo napipetirali po 12 µl raztopin izbranih protiteles, pripravljenih s PBS pufrom (pH 7,4).

6. V sredinsko vdolbinico smo dali 12 μ l raztopine Muc2.
7. Gel smo inkubirali v škatli z navlaženo staničevino pri temperaturi 20–25°C 72 ur.
8. Prisotnost lis smo preverili po 24, 48 in 72 urah inkubacije.
9. Po končani inkubaciji smo začeli z barvanjem gela tako, da smo nanj položili navlažen filter papir in papirnate brisače ter pustili 15 minut.
10. Gel smo sprali tako, da smo nanj nalili 15 ml PBS pufra (pH 7,4) in stresali 15 minut. Ta korak smo ponovili 3-krat.
11. Na gel smo položili suh filter papir in papirnate brisače ter pustili 15 minut.
12. Gel smo posušili v termostahirani komori pri temperaturi 30°C.
13. Na gel smo nalili 15 ml raztopine za barvanje in stresali 5 minut.
14. Gel smo sprali tako, da smo nanj nalili 15 ml destilirane vode in stresali 15 minut.
15. Na gel smo nalili 15 ml raztopine za razbarvanje in stresali 15 minut pri temperaturi 30–37°C. Ta korak smo ponovili 4-krat oz. po potrebi.
16. Gel smo sprali s 15 ml destilirane vode.
17. Gel smo posušili v termostahirani komori pri temperaturi 30°C.

3.2.3.3 Razporeditev vdolbinic

Vdolbinice so imele premer 3 mm, med seboj pa so bile oddaljene za približno dva premera. V sredinsko vdolbinico, ki je na spodnji sliki obarvana črno, smo vedno nanесли raztopino Muc2. V sredinski vdolbinici najbližje stranske vdolbinice smo dali ločeno raztopino z različnimi koncentracijami kunčjih in kozjih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti Muc2. Bolj oddaljene stranske vdolbinice pa smo uporabili za preverjanje interakcije med kozjimi poliklonskimi protitelesi, usmerjenimi proti Muc2, in oslovskimi protitelesi, konjugiranimi z alkalno fosfatazo, usmerjenimi proti kozjim protitelesom.



Slika 8: Shema razporeditve vdolbinic na agaroznem gelu.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Določanje čašastih celic in mucina 2

Muc2 se običajno določa z namenom identifikacije ali spremljanja aktivnosti intestinalnih čašastih celic. Različni avtorji preučujejo različne biološke vzorce in se zato poslužujejo različnih metod.

Pri preučevanju histoloških preparatov črevesa je mogoče čašaste celice pobarvati z barvilom alciansko modro, z barvilom PAS (perjodna kislina/Schiffov reagent) ali s kombinacijo obeh barvil. Gre za nespecifično detekcijo mucinov, saj obarva alciansko modro kisle glikoproteine, PAS pa nevtralne. Položaj in število obarvanih čašastih celic nato določimo z uporabo mikroskopa (18). Čašaste celice lahko v histoloških preparatih spremljamo tudi preko Muc2 s pomočjo monoklonskih ali poliklonskih anti-Muc2 protiteles. Vizualizacija z uporabo ustreznih sekundarnih protiteles in detekcijskega sistema nam omogoči identifikacijo čašastih celic ter semikvantitativno ovrednotenje jakosti izražanja Muc2 (19, 20).

Izolacija Muc2 je mogoča z imunoprecipitacijo iz celičnega lizata, kultivacijskega medija ali tkivnega homogenata s pomočjo anti-Muc2 antiseruma. Oborjeni mucin nato analiziramo z SDS/PAGE in detektiramo lise ter jih po potrebi denzitometrično kvantificiramo. Ustrezna lega lis dokazuje istovetnost z Muc2 (21, 22). Izražanje omenjenega mucina je smiselno določiti tudi na nivoju mRNA. Izolirano celokupno RNA je potrebno ločiti na agaroznem gelu, jo prenesti na membrano in hibridizirati z ustreznimi cDNA sondami (Northern blot) (23). Druga možnost je analiza izolirane celokupne RNA s pomočjo običajne RT-PCR ob uporabi ustreznih specifičnih primerjev. Pomnoženo DNA je potrebno nato ločiti z gelsko elektroforezo, jo prenesti na membrano in ustrezno vizualizirati ter kvantificirati (Southern blot) (24). Poleg običajne RT-PCR se za kvantifikacijo mRNA Muc2 uporablja tudi RT-PCR v realnem času. Slednja omogoča kvantifikacijo analita z merjenjem fluorescence uporabljenega barvila na koncu vsakega cikla verižne reakcije s polimerazo (25). Muc2 lahko analiziramo tudi z western prenosom. Vzorčno raztopino najprej ločimo z SDS/PAGE, lise prenesemo na membrano in jih inkubiramo z anti-Muc2 protitelesi. Potrebna je še inkubacija z ustreznimi sekundarnimi protitelesi ter detekcija (24). Mucine, prenesene na membrano, lahko detektiramo tudi nespecifično z uporabo barvila PAS ali z uporabo lektinov (27). Podobno lahko analizo

izvedemo tudi z metodo direktna ELISA. Najprej je potrebno v vdolbinicah mikrotitrne plošče inkubirati vzorce, nato ustrezna primarna protitelesa, sledi inkubacija ustreznih sekundarnih protiteles in na koncu detekcija signala. Opisana ELISA ima omejeno kapaciteto za vezavo antigena, zato je potrebno vzorčne raztopine ustrezno redčiti (24, 26). Za analizo mucinov je primerna tudi sendvič ELISA. Pri slednji inkubiramo v vdolbinicah mikrotitrne plošče najprej primarna protitelesa, ki vežeje preiskovani analit iz vzorca. Sledi inkubacija sekundarnih in še terciarnih protiteles, če sekundarna niso označena. Zadnji korak je detekcija signala in njegova kvantifikacija (27). Za nespecifično določanje mucinov se lahko uporabi tudi ELLA (encimsko lektinska metoda). Podobno kot pri direktni ELISA je potrebno najprej v vdolbinicah mikrotitrne plošče inkubirati vzorec, nato biotiniliran aglutinin in na koncu z encimom konjugiran avidin. Sledi še dodatek substrata in detekcija s čitalcem mikrotitrskih plošč (25).

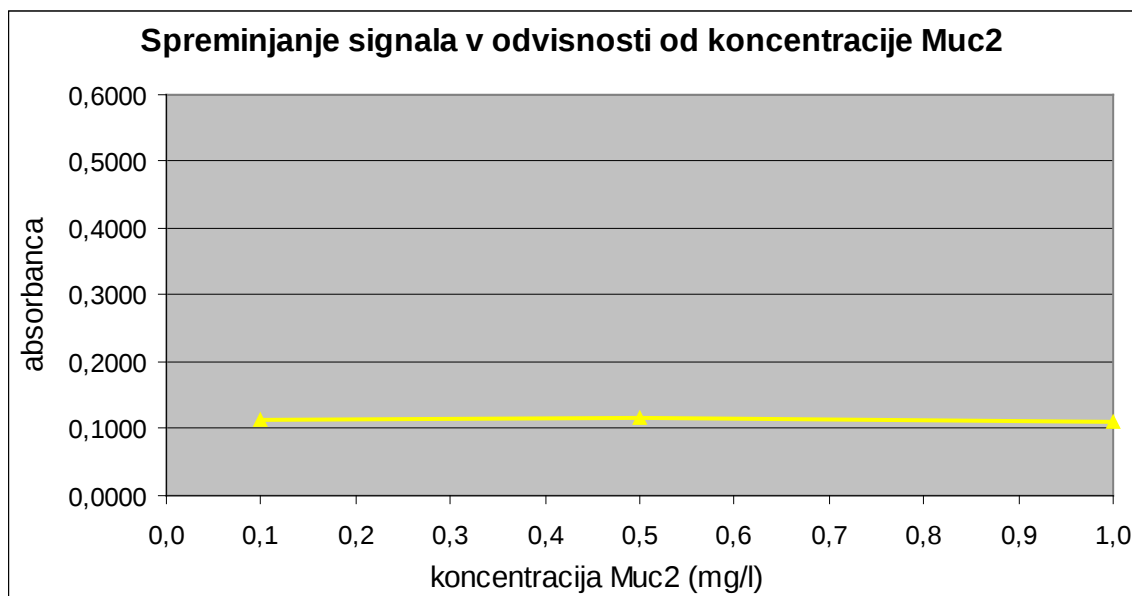
4.2 Razvoj encimsko imunske metode (ELISA)

4.2.1 Korak 1

Odločili smo se za sendvič izvedbo encimsko imunske metode, ker je zelo občutljiva in ne zahteva predhodne izolacije analita (28). Pripravili smo si načrt dela in s pomočjo literature (28, 35) določili koncentracije primarnih, sekundarnih in terciarnih protiteles ter standardne raztopine Muc2. Uporabili smo kunčja poliklonska protitelesa, usmerjena proti Muc2, s koncentracijami 0,5, 2,0, 5,0 in 10 mg/l. Kozja poliklonska protitelesa, usmerjena proti Muc2, in oslovska protitelesa, konjugirana z ALP, usmerjena proti kozjim protitelesom, so imela koncentracije 0,5, 1,0, 2,0 in 5,0 mg/l. Raztopine Muc2 smo pripravili s koncentracijami 0,1, 0,5 in 1,0 mg/l. Vse inkubacije so potekale eno uro pri temperaturi 20–25°C. Raztopine smo razporedili na mikrotitrski plošči tako, da smo v vertikalni smeri povečevali koncentracijo primarnih protiteles, v horizontalni pa koncentracije sekundarnih in terciarnih protiteles ter Muc2. Tako so bile vse koncentracije primarnih protiteles preizkušene z vsemi koncentracijami mucinskega standarda, oboji pa še z vsemi koncentracijami sekundarnih in terciarnih protiteles. Sekundarna in terciarna protitelesa so bila enakih koncentracij. Na mikrotitrsko ploščo so bile vse kombinacije raztopin nanešene v dveh paralelkah. Po dodatku raztopine pNPP smo začeli z merjenjem absorbance in jo izmerili 15-krat (na vsake 2 minuti) brez ustavljanja reakcije. Na ta način

smo si zagotovili možnost za kasnejšo analizo rezultatov po različno dolgih časih reakcije, če bi bilo to potrebno.

Pri vseh uporabljenih koncentracijah Muc2 smo izmerili enake vrednosti absorbance. Tudi pri najvišji koncentraciji mucina (1,0 mg/l) signal ni presegel signala ob izhodiščni, 10-krat nižji koncentraciji (Graf 1).

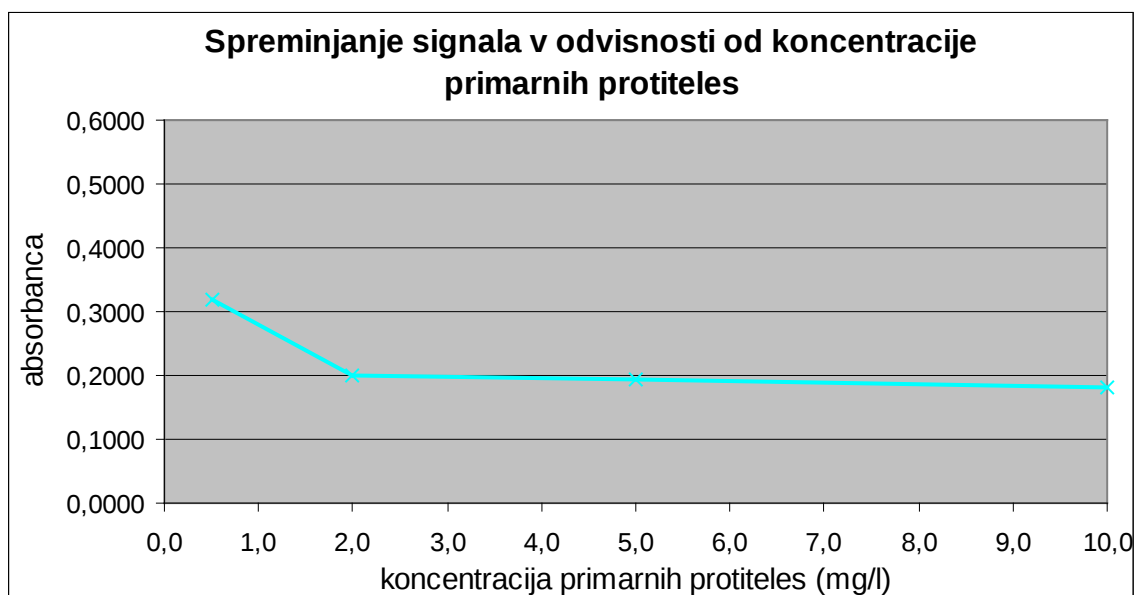


Graf 1: Prikazana je vrednost absorbance v odvisnosti od koncentracije Muc2 16 minut po dodatku substrata za kombinacijo 5,0 mg/l primarnih ter 2,0 mg/l sekundarnih in terciarnih protiteles.

Prikazana je le ena kombinacija koncentracij primarnih protiteles s sekundarnimi in terciarnimi protitelesi, ker so vse ostale kombinacije dale enak rezultat. Razlog je v tem, da ni prišlo do vsaj ene izmed štirih potrebnih vezav (vezava primarnih protiteles na mikrotitrsko ploščo, vezava antigena na primarna protitelesa, vezava sekundarnih protiteles na antigen in vezava terciarnih protiteles na sekundarna protitelesa). Signal, ki smo ga izmerili, je bil najverjetneje posledica nespecifične vezave sekundarnih in terciarnih protiteles. Ker je prišlo do rumenega obarvanja po dodatku substrata za alkalno fosfatazo, lahko zaključimo, da je bil encim, konjugiran na terciarna protitelesa, aktiven, in da sam nastanek signala ni bil problematičen.

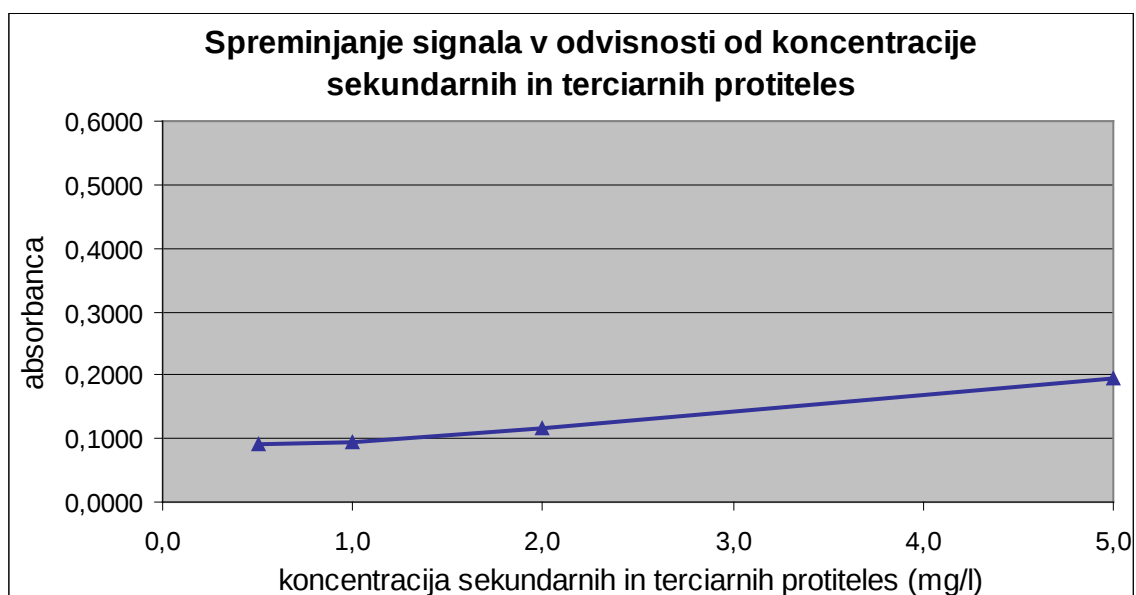
Graf 2 prikazuje, kako je koncentracija primarnih protiteles vplivala na izmerjeno absorbenco. Dejstvo, da je bil signal največji pri najnižji koncentraciji primarnih protiteles, pri drugih koncentracijah pa konstanten, si lahko razlagamo s tem, da so verjetno pri najnižji koncentraciji primarnih protiteles ostala prosta mesta na mikrotitrski plošči, na

katera so se še dodatno vezala sekundarna in terciarna protitelesa. To je najverjetneje povzročilo odstopanje vrednosti ozadja navzgor pri tej koncentraciji primarnih protiteles.



Graf 2: Prikazana je vrednost absorbance v odvisnosti od koncentracije primarnih protiteles 16 minut po dodatku substrata (sekundarna in terciarna protitelesa 5,0 mg/l ter Muc2 0,5 mg/l).

Z grafa 3 je razvidno, da je z naraščajočo koncentracijo sekundarnih in terciarnih protiteles naraščala tudi vrednost absorbance. Višje koncentracije omenjenih protiteles so najverjetneje povečale obseg njihove nespecifične vezave.



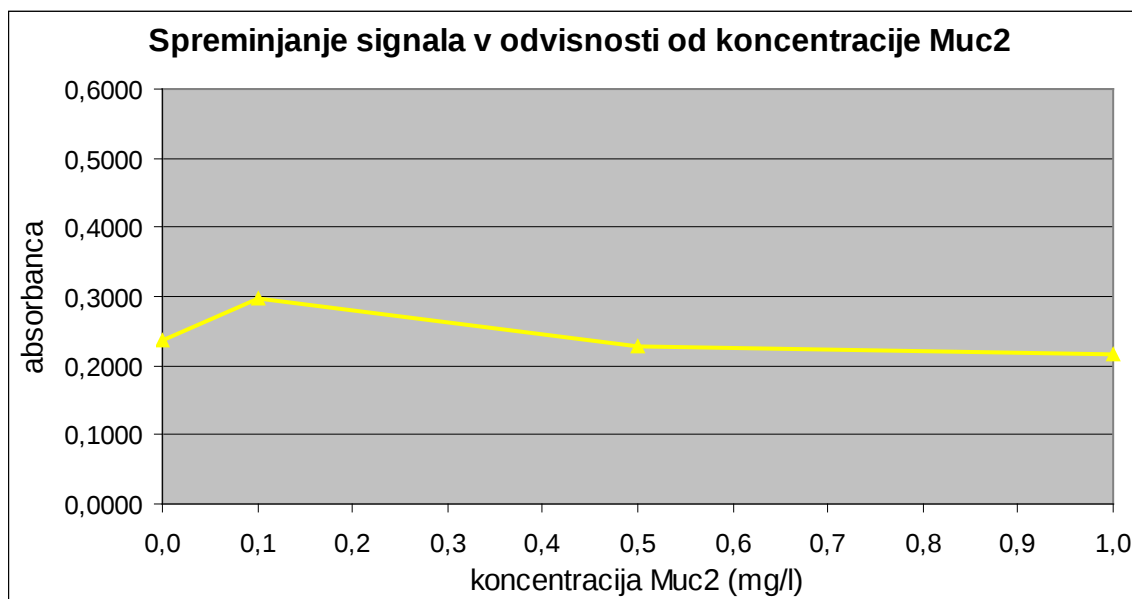
Graf 3: Prikazana je vrednost absorbance v odvisnosti od koncentracije sekundarnih in terciarnih protiteles 16 minut po dodatku substrata (primarna protitelesa 5,0 mg/l ter Muc2 0,5 mg/l).

4.2.2 Korak 2

Ob nespremenjenih koncentracijah primarnih protiteles in standardne raztopine Muc2 ter 0,5, 1,0 in 2,0 mg/l raztopinah sekundarnih in terciarnih protiteles smo preverili, kakšen vpliv imata čas inkubacije in rigoroznost spiranja na rezultate sendvič ELISE. Predvsem smo dvomili v vezavo primarnih protiteles na mikrotitrsko ploščo ter vezavo primarnih in sekundarnih protiteles na antigen, zato smo podaljšali inkubacije ravno pri teh treh fazah. V primeru majhne afinitete uporabljenih protiteles za rekombinantni Muc2 bi s podaljšanjem časa, ki je na voljo za reakcijo, dosegli vsaj delno vezavo na antigen. Vezavo primarnih protiteles na mikrotitrsko ploščo smo tako inkubirali čez noč (19 ur) pri temperaturi 4–8°C. Standardno raztopino Muc2 smo inkubirali v vdolbinicah mikrotitrsko plošče štiri ure pri temperaturi 20–25°C. Inkubacija sekundarnih protiteles je potekala čez noč (22 ur) pri temperaturi 4–8°C. Terciarna protitelesa pa smo inkubirali le eno uro pri temperaturi 20–25°C. V tem primeru smo bili prepričani v vezavo, saj so bila omenjena protitelesa in njihov antigen (sekundarna protitelesa) pridobljena s strani istega proizvajalca. Ta celo priporoča njihovo skupno uporabo.

V primeru šibkih povezav med antigenom in protitelesi bi lahko grobo spiranje vdolbinic mikrotitrsko plošče povzročilo razpad nastalih imunskih kompleksov. Vsa spiranja razen prvega smo zato izvajali s PBS pufrom (pH 7,4) brez Tweena 20 in v samo dveh ponovitvah (namesto treh).

Tudi v primeru, prikazanem na grafu 4, signal ne narašča z naraščajočo koncentracijo Muc2. Pri tem eksperimentu smo poleg raztopin mucina na ploščo nanegli tudi slepi vzorec, in sicer je bil to kar blokirni pufer. Iz grafa 4 je razvidno, da je bil signal enak ne glede na to, ali je bil Muc2 prisoten ali ne in ne glede na to, kakšna je bila njegova koncentracija. Če primerjamo grafa 1 in 4 vidimo, da so pri slednjem vrednosti dvakrat višje. Ker so bile v obeh primerih uporabljene enake koncentracije Muc2, je razlog za razliko najverjetneje v nespecifični vezavi sekundarnih in terciarnih protiteles. Ta je bila zaradi bolj blagega spiranja plošče večja v primeru, prikazanem na grafu 4. Enaka je lahko razlaga tudi za nekoliko večji signal pri koncentraciji Muc2 0,1 mg/l na tem istem grafu. Zaradi preglednosti smo prikazali le eno kombinacijo koncentracij uporabljenih reagentov, saj ostale le potrjujejo zgoraj navedene ugotovitve. Zaključimo lahko, da niti čas inkubacije niti način spiranja nista bila razlog za neodzivnost sendvič ELISE.

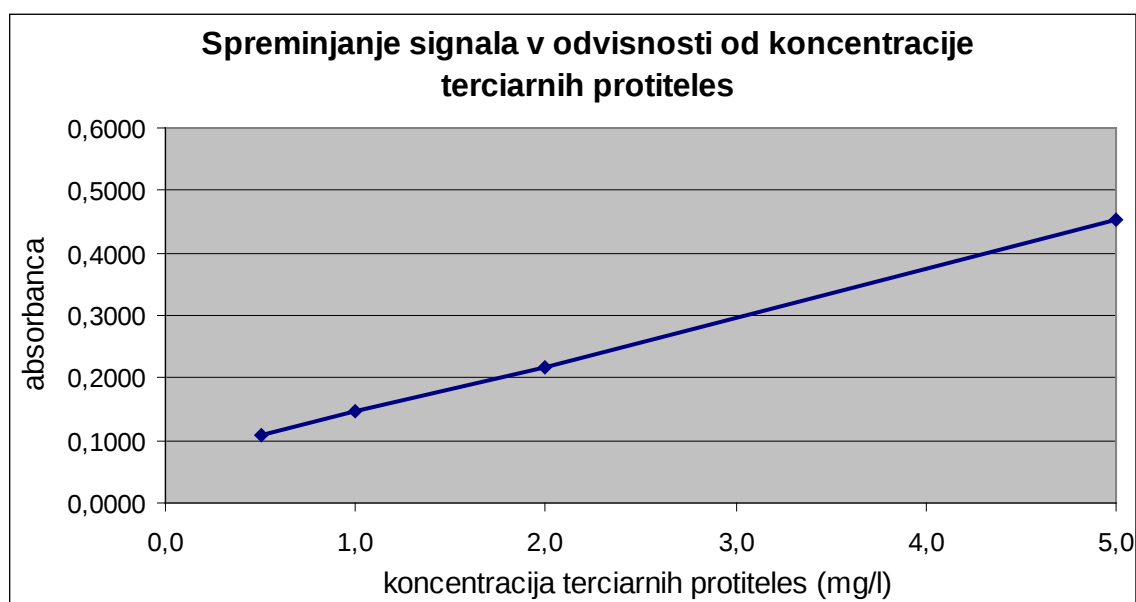


Graf 4: Prikazana je absorbanca v odvisnosti od koncentracije Muc2, izmerjena 16 minut po dodatku substrata za kombinacijo 5,0 mg/l primarnih ter 2,0 mg/l sekundarnih in terciarnih protiteles.

4.2.3 Korak 3

Želeli smo preveriti, ali signal, ki smo ga do sedaj izmerili, izvira le iz vezave terciarnih protiteles ali pri tem sodelujejo tudi druga protitelesa. Eksperiment smo zasnovali tako, da smo določili, kakšen je obseg nespecifične vezave terciarnih protiteles. Na mikrotitrsko ploščo smo kovalentno vezali goveji serumski albumin. To smo izvedli z dvournno inkubacijo 3 % raztopine BSA v PBS s pH 8,0 v vdolbinicah mikrotitrsko plošče. Sledila je še enournna inkubacija blokirnega pufra. Na tako pripravljeno mikrotitrsko ploščo smo nanegli oslovski protitelesi, konjugirana z ALP, usmerjena proti kozjim protitelesom, s koncentracijami 0,5, 1,0, 2,0 in 5,0 mg/l. Tudi ta inkubacija je potekala eno uro. Spiranja vdolbinic so bila tako kot pri prejšnjem eksperimentu blaga, in sicer s PBS pufrom (pH 7,4) brez Tweena 20 in v samo dveh ponovitvah (namesto treh).

Z grafa 5 je lepo razvidno, da signal narašča z naraščajočo koncentracijo terciarnih protiteles. Graf 5 je zelo podoben grafu 3 s to razliko, da sta naklon premice in odsek na ordinatni osi pri slednjem bistveno manjša. Razlog je najverjetneje v tem, da je bilo spiranje pri eksperimentu, prikazanem na grafu 3, močnejše in učinkovitejše kot pri eksperimentu, prikazanem na grafu 5, s čimer je bil dosežen manjši obseg nespecifične vezave.



Graf 5: Prikazano je spreminjanje absorbance v odvisnosti od koncentracije terciarnih protiteles, izmerjeno 15 minut po dodatku substrata za alkalno fosfatazo.

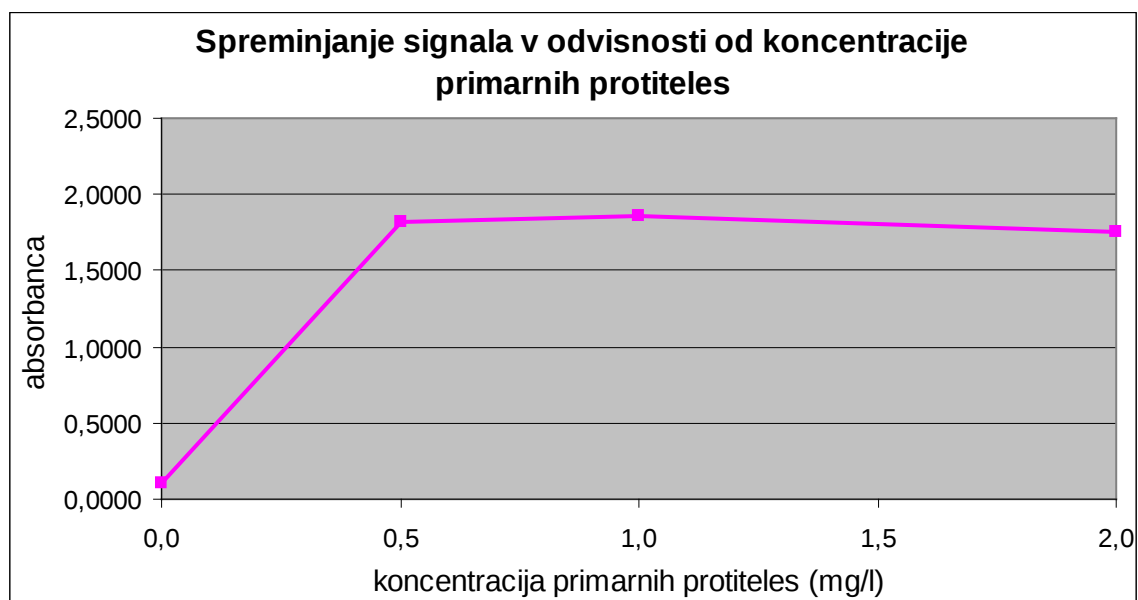
Na tej stopnji smo lahko zaključili, da so bili odzivi, ki smo jih do tedaj izmerili, posledica nespecifične vezave terciarnih protiteles na goveji serumski albumin. Ker do vezave preostalih protiteles in mucina očitno ni prišlo, in ker za to niso bili krivi pogoji izvedbe eksperimenta, so se zastavila vprašanja, ali pride do vezave primarnih protiteles na površino mikrotitrne plošče, ali je uporabljen Muc2 sploh primeren standard za sendvič ELISO in kako je z vezavo terciarnih protiteles na sekundarna.

4.2.4 Korak 4

Kljub informacijam s strani proizvajalca smo se želeli še sami prepričati o vezavi spojin na površino mikrotitrne plošče. Na ploščo smo zato vezali kunčja poliklonska protitelesa, usmerjena proti Muc2, in slepi vzorec (1 % BSA v nanašalnem pufru). Uporabili smo raztopine s koncentracijami 0,5, 1,0 in 2,0 mg/l protiteles in jih inkubirali dve uri. Sledila je inkubacija 2,0 mg/l raztopine kozjih protiteles, konjugiranih s hrenovo peroksidazo, usmerjenih proti kunčjim protitelesom, dolga eno uro. Vdolbinice smo spirali v treh ponovitvah s pufrom za spiranje, ki je vseboval detergent Tween 20. Po dodatku substrata za HRP smo merili absorbanco pri valovni dolžini 630 nm.

Z grafa 6 je razvidno, da je bila v primeru slepega vzorca izmerjena absorbanca zelo nizka. Po drugi strani pa smo izmerili zelo močan signal v vdolbinicah, v katere smo nanесли

primarna protitelesa. Tako smo dokazali, da so se primarna protitelesa zelo dobro vezala na površino mikrotitrne plošče in da je bila za nasičenje vdolbinic dovolj že koncentracija 0,5 mg/l kunčjih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti Muc2. Ker tudi vezava na trdno podlago ni bila vprašljiva, smo zmanjšali število možnih vzrokov za negativni rezultat modelne metode na problem vezave primarnih oz. sekundarnih protiteles na molekulo mucina 2.



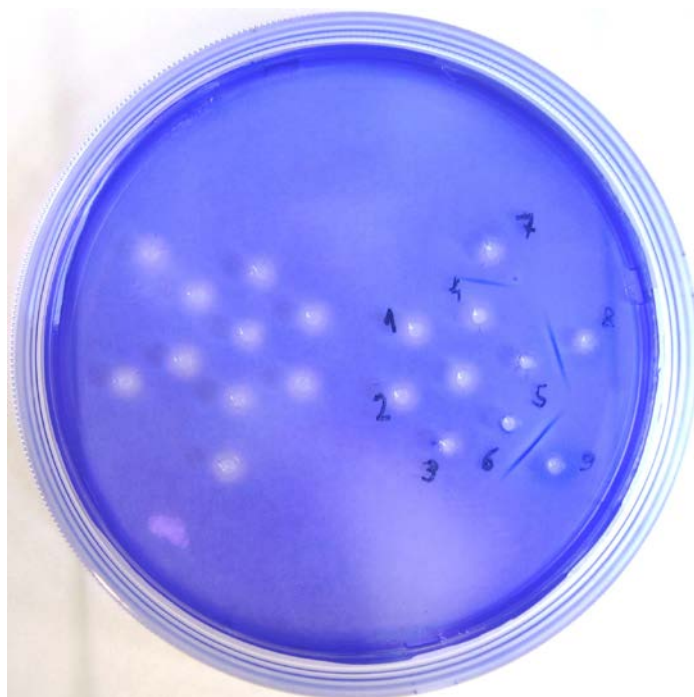
Graf 6: Prikazano je spreminjanje absorbance v odvisnosti od koncentracije primarnih protiteles, izmerjeno 15 minut po dodatku substrata za HRP pri uporabi kozjih protiteles, konjugiranih s HRP, usmerjenih proti kunčjim protitelesom, s koncentracijo 2,0 mg/l.

4.2.5 Korak 5

Z dvojno imunodifuzijo smo preverili, ali je potekla imunska reakcija med preiskovanim antigenom in uporabljenimi protitelesi ter med nekonjugiranimi in konjugiranimi protitelesi. Predvsem nas je zanimala vezava primarnih in sekundarnih protiteles na uporabljen Muc2, vezava terciarnih protiteles na sekundarna pa nam je služila za kontrolo samega poizkusa. V stranske vdolbinice na agaroznem gelu smo napipetirali po 12 µl raztopin primarnih, sekundarnih in terciarnih protiteles s koncentracijami 50, 100 in 200 mg/l. V sredinsko vdolbinico smo tri ure kasneje napipetirali še 12 µl raztopine Muc2 s koncentracijo 50 mg/l v PBS pufru (pH 7,4). Rekombinantni Muc2 je imel po navedbah proizvajalca trikrat manjšo molekulsko maso od protiteles in s tem bistveno večjo hitrost

difuzije v agaroznem gelu. Da bi se izognili nastanku imunskih kompleksov preblizu stranskih vdolbinic, smo se odločili za časovni zamik nanosa Muc2.

Modre ravne lise med vdolbinicami 4-7, 5-8 in 6-9 so jasno pokazale, da je prišlo do tvorbe imunskih kompleksov med sekundarnimi in terciarnimi protitelesi (Slika 9). S tem smo dokazali, da vezava med omenjenimi protitelesi ni bila kriva za dotedanje negativne rezultate. Pokazali pa smo tudi, da je bil poizkus pravilno izveden. Lise so se med seboj razlikovale po debelini in dolžini v odvisnosti od koncentracije uporabljenih protiteles. To dejstvo omogoča semikvantitativno ovrednotenje na takšen način analiziranih raztopin. Položaj lis je bil ravno na sredini med vdolbinicami, kamor smo nanесли sekundarna in terciarna protitelesa. To je bilo pričakovano, saj imajo vsi IgG zelo podobno molekulsko maso in s tem hitrost difuzije. Med sredinsko vdolbinico ter vdolbinicami s primarnimi in sekundarnimi protitelesi ni nastala nobena lisa.



Slika 9: Agarozni gel po 72 urah inkubacije in barvanju (vdolbinice 1–3: 50–200 mg/l kunčjih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti Muc2; vdolbinice 4–6: 50–200 mg/l kozjih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti Muc2; vdolbinice 7–9: 50–200 mg/l oslovskih protiteles, konjugiranih z ALP, usmerjenih proti kozjim protitelesom; sredinska vdolbinica: 50 mg/l rekombinantnega Muc2).

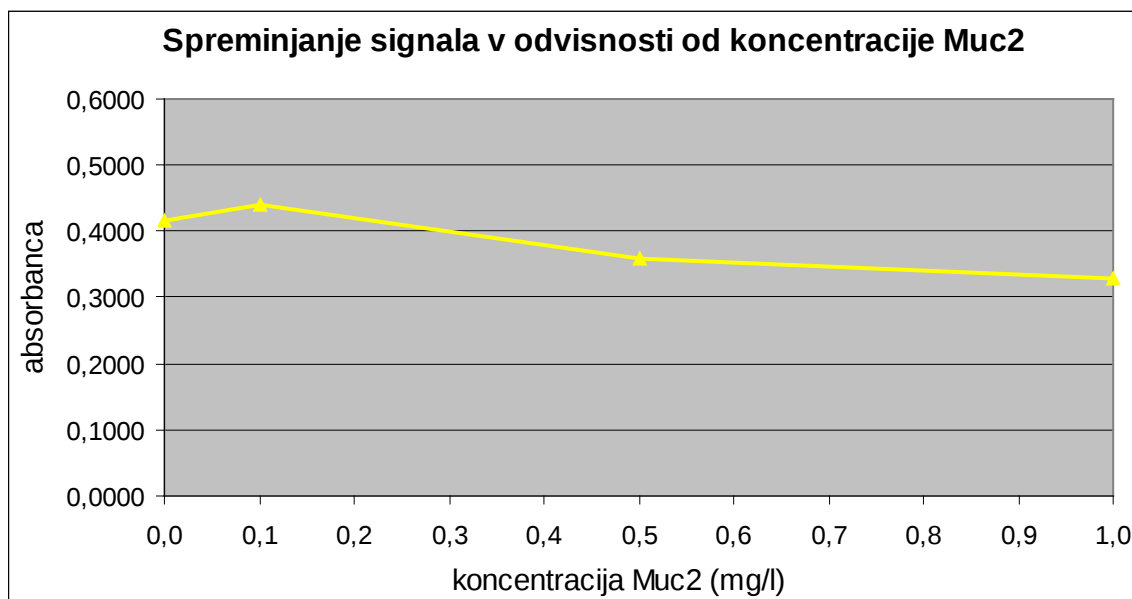
Kljub temu, da ni prišlo do tvorbe imunskih kompleksov z Muc2, ni bilo mogoče zaključiti, da primarna in sekundarna protitelesa niso vezala uporabljenega mucina. Razlog za nenastanek lis je bil lahko v tem, da ni prišlo do vzpostavitve ravnotežja med

koncentracijama mucina in primarnih oz. sekundarnih protiteles. Mogoče je tudi, da so imunski kompleksi nastali, vendar zaradi majhne molekulske mase rekombinantnega Muc2 niso bili vidni – so bili pod mejo detekcije.

4.2.6 Korak 6

Ker še vedno nismo imeli odgovora, ali so se primarna in sekundarna protitelesa vezala na rekombinantni Muc2, smo se odločili, da to preverimo še z direktno ELISO. Preizkusili smo vezavo najprej ene in nato še druge vrste protiteles. Na mikrotitrsko ploščo smo vezali Muc2 z dvourno inkubacijo raztopin s koncentracijami 0,1, 0,5 in 1,0 mg/l. Kot slepi vzorec smo uporabili 1 % raztopino BSA v nanašalnem pufu. Sledila je dvourna inkubacija raztopin kozjih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti Muc2, s koncentracijami 0,5, 1,0 in 2,0 mg/l. Dodali smo še 0,5, 1,0 in 2,0 mg/l raztopine oslovskih protiteles, konjugiranih z ALP, usmerjenih proti kozjim protitelesom, in jih inkubirali eno uro. Za spiranje vdolbinic smo ponovno uporabili bolj rigorozen način z uporabo detergenta Tween 20 s tremi ponovitvami.

Graf 7 prikazuje, da izmerjeni signal ni naraščal z naraščajočo koncentracijo Muc2, pač pa je celo padal. Tudi v tem primeru ni prišlo do vezave kozjih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti Muc2, na uporabljen mucin (v primeru sendvič ELISE so bila to sekundarna protitelesa). Izmerjena absorbanca je bila pri nižjih koncentracijah mucina višja najverjetneje zaradi manjše zasedenosti vdolbinic z mucinom in posledično večjega obsega nespecifične vezave oslovskih protiteles, konjugiranih z ALP, usmerjenih proti kozjim protitelesom. Visoke vrednosti absorbanc na grafu 7 kažejo tudi na bistveno večji obseg nespecifične vezave konjugiranih protiteles pri tej izvedbi direktne ELISE v primerjavi s sendvič ELISO (graf 1). Ostale kombinacije koncentracij uporabljenih protiteles le potrjujejo navedene ugotovitve, zato niso posebej prikazane. Kozja poliklonska protitelesa, usmerjena proti Muc2, torej niso bila primerna za analizo Muc2 ob uporabi rekombinantnega Muc2 kot standarne raztopine.

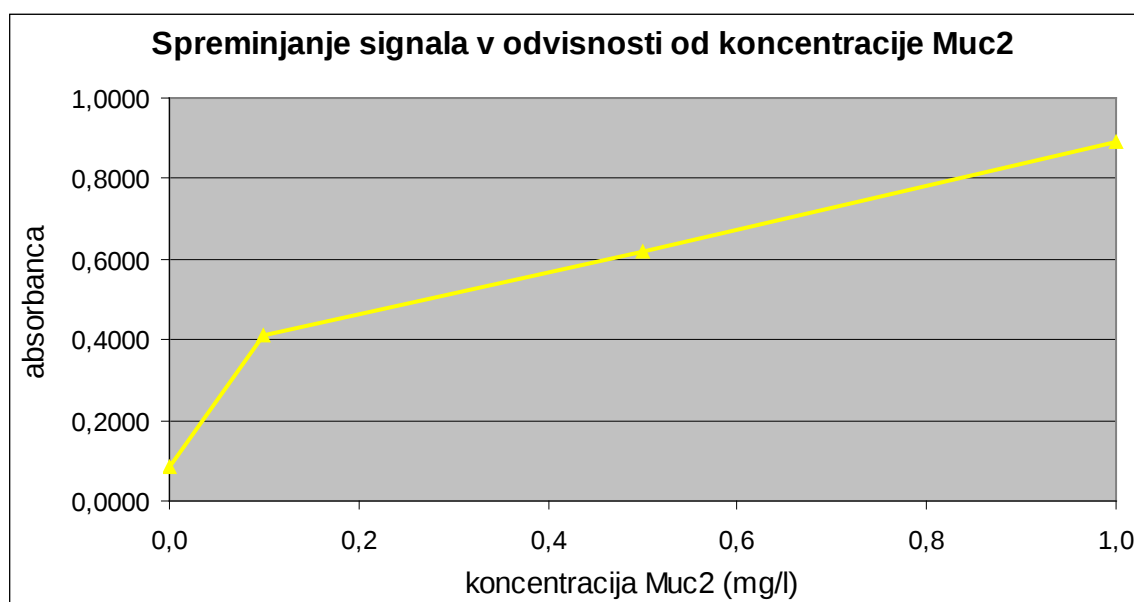


Graf 7: Prikazana je absorbanca v odvisnosti od koncentracije Muc2, izmerjena 15 minut po dodatku substrata v primeru koncentracij 2,0 mg/l za obe vrsti protiteles.

4.2.7 Korak 7

Ugotoviti smo morali še, ali je bila pri opravljenih poskusih prisotna vezava kunčjih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti Muc2, na rekombinantni Muc2. Ponovno smo se odločili za direktno ELISO, pri kateri smo na mikrotitrsko ploščo vezali mucinski standard s koncentracijami 0,1, 0,5 in 1,0 mg/l. Kot slepi vzorec smo uporabili 1 % BSA v nanašalnem pufru. Omenjene raztopine smo inkubirali dve uri. Naslednja stopnja je bila dvourni inkubacija 0,5, 1,0 in 2,0 mg/l raztopin kunčjih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti Muc2. Sledil je še dodatek raztopin kozjih protiteles, konjugiranih s hrenovo peroksidazo, usmerjenih proti kunčjim protitelesom, s koncentracijami 0,5, 1,0 in 2,0 mg/l. Ta protitelesa smo inkubirali eno uro. Vsa spiranja smo izvedli v treh ponovitvah s pufrom za spiranje. Po dodatku substrata za HRP smo absorbanco merili pri valovni dolžini 630 nm.

V tem koraku smo dobili odziv, ki je naraščal z naraščajočo koncentracijo rekombinantnega Muc2, kar je razvidno z grafa 8. To je bil dokaz, da je prišlo do vezave kunčjih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti Muc2, na uporabljen mucinski standard. Predstavljena je ponovno le ena kombinacija koncentracij uporabljenih protiteles, saj druge le potrjujejo prikazan trend.



Graf 8: Prikazana je absorbanca v odvisnosti od koncentracije Muc2, izmerjena 16 minut po dodatku substrata za HRP v primeru koncentracij 2,0 mg/l za obe vrsti protiteles.

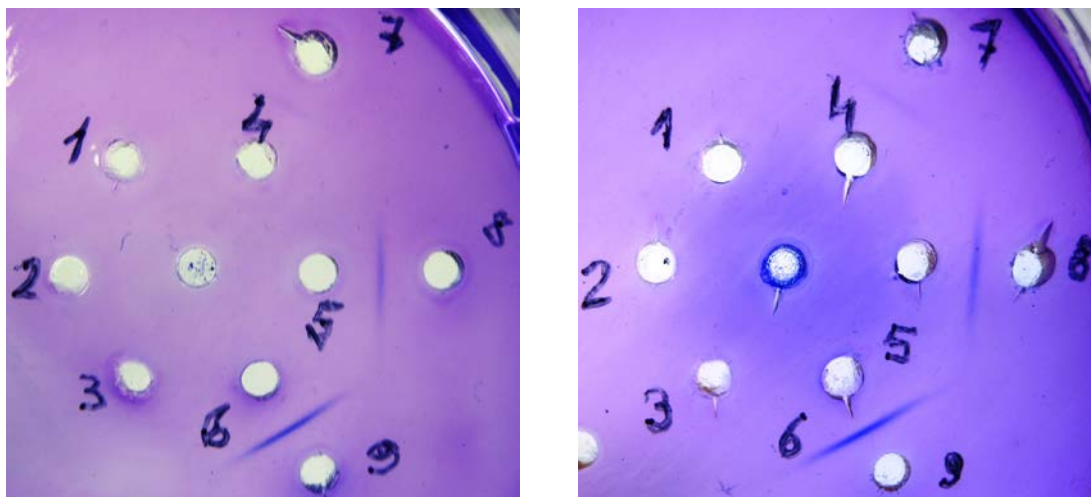
S tem eksperimentom smo dobili zaokrožen odgovor, zakaj sendvič ELISA v koraku 1 ni dala pozitivnih rezultatov. Kljub uspešni vezavi primarnih protiteles na mikrotitrsko ploščo in rekombinantnega Muc2 na ta protitelesa do vezave sekundarnih protiteles na ulovljeni analit ni prišlo. Tako je bil signal, ki je nastal pri analizi, opisani v koraku 1, posledica nespecifične vezave terciarnih protiteles. Zaključili smo lahko, da uporabljen rekombinantni Muc2 v kombinaciji z izbranimi protitelesi ni bil primeren za sendvič ELISO. Kljub temu ni bilo mogoče ovreči možnosti uporabe izbranih protiteles v sendvič ELISI za analizo vzorčnega Muc2 ali kakšnega drugega mucinskega standarda.

4.2.8 Korak 8

Ker kozja poliklonska protitelesa, usmerjena proti Muc2, niso bila primerna za uporabo skupaj z rekombinantnim Muc2, smo preverili, kakšna je bila njihova reaktivnost z mucinom 2 v naših vzorcih. Z dvojno imunodifuzijo smo analizirali enega izmed pripravljenih celičnih lizatov in nato še pripadajoči rabljen kultivacijski medij. Odločili smo se, da uporabimo vse tri vrste protiteles enako kot v koraku 5. V stranske vdolbinice na agaroznem gelu smo tako napipetirali po 12 µl raztopin kunčjih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti Muc2, kozjih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti Muc2, in oslovskih protiteles, konjugiranih z ALP, usmerjenih proti kozjim protitelesom, s koncentracijami 10,

25 in 50 mg/l. Za nižje koncentracije protiteles kot v koraku 5 smo se odločili zato, ker smo pričakovali v vzorcih nizko vsebnost Muc2. Pri dvojni imunodifuziji je nujno, da se med vdolbinicami vzpostavi ravnotežje, za kar je potrebno, da sta koncentraciji v nasprotnih vdolbinicah čim bolj podobni. Poleg tega smo z nižjimi koncentracijami sekundarnih in terciarnih protiteles, za katera vemo, da dajo pozitivno reakcijo, preverili, kako nizka je meja občutljivosti. V sredinsko vdolbinico smo dali 12 µl celičnega lizata v prvem in 12 µl rabljenega kultivacijskega medija v drugem primeru. Po 72-urni inkubaciji prvega in 96-urni inkubaciji drugega gela smo oba pobarvali z barvilom Coomassiejevo briljantno modro R 250.

Po barvanju so bile na obeh agaroznih gelih vidne tri lise, in sicer med vdolbinicami 4-7, 5-8 in 6-9. Šlo je za imunske komplekse med sekundarnimi in terciarnimi protitelesi, ki smo jih pričakovali, saj so nastali že pri imunodifuziji v koraku 5. S slike 10 je razvidno, da je bila lisa med vdolbinicama 4 in 7 komaj vidna. Tako smo lahko v danem primeru privzeli koncentracijo protiteles 10 mg/l kot približno mejo detekcije. Med sredinsko vdolbinico in stranskimi vdolbinicami s primarnimi in sekundarnimi protitelesi ni bilo vidnih lis. Na podlagi tega nismo mogli sklepati, ali je bil Muc2 v celičnem lizatu in rabljenem kultivacijskem mediju prisoten ali ne. Razloga za nenastanek lis sta bila lahko v tem, da niso bili izpolnjeni ustrezni pogoji za imunoprecipitacijo ali da je bila količina nastalih kompleksov premajhna za vizualizacijo.



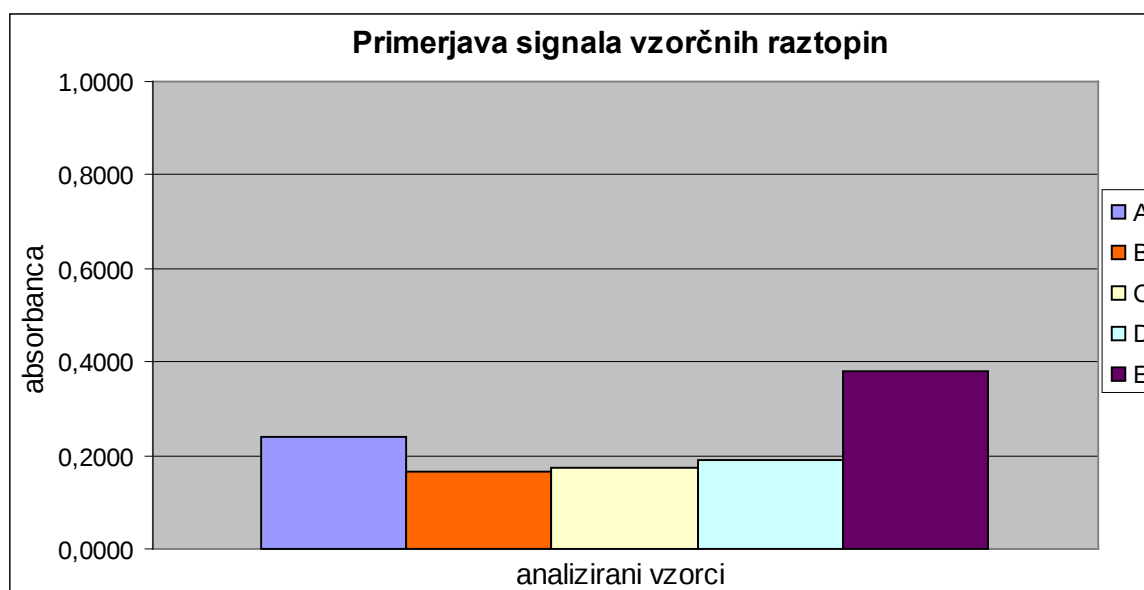
Slika 10: Agarozna gela po končani inkubaciji in barvanju (*na obeh gelih*: vdolbinice 1–3: 10–50 mg/l kunčjih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti Muc2; vdolbinice 4–6: 10–50 mg/l kozjih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti Muc2; vdolbinice 7–9: 10–50 mg/l oslovskih protiteles, konjugiranih z ALP, usmerjenih proti kozjim protitelesom; sredinska vdolbinica *levo*: celični lizat; sredinska vdolbinica *desno*: rabljen kultivacijski medij).

4.2.9 Korak 9

Ker z dvojno imunodifuzijo nismo dobili odgovora glede vezave primarnih in sekundarnih protiteles na Muc2, prisoten v vzorčnih raztopinah, smo analizirali omenjene raztopine še s sendvič ELISO brez uporabe mucinskega standarda. Najprej smo na mikrotitrski plošči inkubirali eno uro raztopino kunčjih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti Muc2, s koncentracijo 1,0 mg/l. Nato smo v vdolbinice nanесли vzorčne raztopine. Kot slepe vzorce smo uporabili blokirni pufer, lizat mišjih zrelih B-limfocitov A 20 in rabljen kultivacijski medij mišjih zrelih B-limfocitov A 20, ki niso vsebovali mucinov. Poleg teh smo nanесли celični lizat in rabljen kultivacijski medij iste celične kulture kakor v koraku 8. Inkubacija vzorčnih raztopin je trajala dve uri. Sledil je dodatek raztopine kozjih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti Muc2, s koncentracijo 1,0 mg/l, ki smo jo prav tako inkubirali dve uri. Dodali smo še 1,0 mg/l raztopino oslovskih protiteles, konjugiranih z ALP, usmerjenih proti kozjim protitelesom, in jo inkubirali eno uro. Mikrotitrsko ploščo smo spirali s tremi ponovitvami s pufrom za spiranje, ki je vseboval detergent Tween 20. Zaradi omejene količine vzorčnih raztopin smo opisani eksperiment morali izvesti brez paralelk.

Z grafa 9 je razvidno, da sta bili absorbanci obeh celičnih lizatov praktično enaki, kljub temu, da naj bi en lizat vseboval Muc2, drugi pa ne. Na podlagi tega smo lahko sklepali, da bodisi Muc2 ni bil prisoten v celičnem lizatu podganje kulture bodisi je bil v takšni obliki, da ga z uporabljenno metodo ni bilo mogoče analizirati. Po drugi strani pa smo videli jasno odstopanje med signaloma obeh rabljenih kultivacijskih medijev. Skoraj dvakrat večja vrednost absorbance rabljenega kultivacijskega medija podganje kulture v primerjavi z absorbanco rabljenega kultivacijskega medija mišjih zrelih B-limfocitov A 20 je najverjetneje posledica prisotnosti Muc2 v vzorcu podganje kulture.

Z opisanim poskusom smo potrdili sum, da je bil za neuspešnost sendvič ELISE v prejšnjih korakih kriv neprimeren mucinski standard in ne izbira protiteles ali izvedba metode. Na tem mestu smo tako lahko zaključili, da so bili uporabljeni materiali in postopek dela primerni za analizo naših predhodno pripravljenih vzorčnih raztopin. Sendvič encimsko imunsko metodo na trdni podlagi smo s korakom 9 razvili do stopnje, ki je omogočala merjenje prisotnosti mucina 2 v vzorčnih raztopinah. Zaradi pomanjkanja ustreznega mucinskega standarda pa je imela to pomanjkljivost, da ni omogočala absolutnega, pač pa le relativno spremljanje količine Muc2.



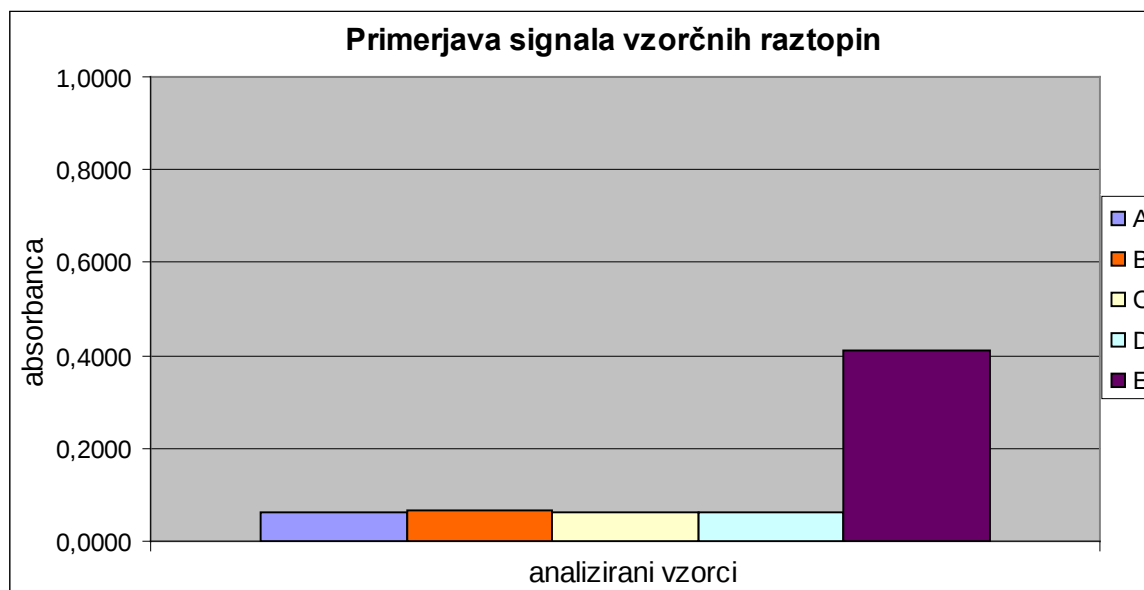
Graf 9: Prikazane so absorbance vzorčnih raztopin, izmerjene 15 minut po dodatku substrata za ALP (A – blokirni pufer; B – lizat mišjih zrelih B-limfocitov A 20; C – celični lizat podganje kulture; D – rabljen kultivacijski medij mišjih zrelih B-limfocitov A 20; E – rabljen kultivacijski medij podganje kulture).

4.2.10 Korak 10

Pri analizi rekombinantnega Muc2 z direktno ELISO v koraku 7 smo dobili pozitiven rezultat. Ta nas je kljub razvitemu postopku za merjenje prisotnosti mucina 2 s sendvič ELISO vzpodbudil, da smo na enak način preizkusili še vzorčne raztopine. Enake raztopine kot v koraku 9 (blokirni pufer, lizat mišjih zrelih B-limfocitov A 20, rabljen kultivacijski medij mišjih zrelih B-limfocitov A 20, celični lizat podganje kulture in rabljen kultivacijski medij iste podganje kulture) smo nanесли na mikrotitrsko ploščo in inkubirali dve uri. Nato smo dodali raztopino kunčjih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti Muc2, s koncentracijo 2,0 mg/l in inkubirali dve uri. Sledila je še raztopina kozjih protiteles, konjugiranih s hrenovo peroksidazo, usmerjenih proti kunčjim protitelesom, s koncentracijo 1,0 mg/l. Ta protitelesa smo inkubirali eno uro. Vsa spiranja so potekala v treh ponovitvah in s pufrom za spiranje, ki je vseboval Tween 20. Po dodatku substrata za HRP smo absorbenco merili pri valovni dolžini 630 nm. Tudi v tem primeru smo bili primorani izvesti eksperiment brez paralelk.

Podobno kot v koraku 9 sta dala tudi v tem primeru oba celična lizata enak odziv. Sklepali smo, da v celičnem lizatu podganje kulture ni bilo Muc2 oz. da ga z uporabljen metodo

nismo mogli analizirati. Z grafa 10 je bila tokrat še bolj vidna razlika med izmerjeno absorbanco rabljenega kultivacijskega medija mišjih zrelih B-limfocitov A 20 in absorbanco rabljenega kultivacijskega medija podganje kulture. Slednja je jasno pokazala na prisotnost Muc2. S primerjavo grafov 9 in 10 smo lahko videli, da je bila presenetljivo vrednost ozadja pri direktni ELISI veliko manjša od ozadja sendvič ELISE. Poleg tega je bil tudi signal Muc2 v rabljenem kultivacijskem mediju podganje kulture bistveno bolj izrazit pri direktni ELISI.



Graf 10: Prikazane so absorbance vzorčnih raztopin, izmerjene 16 minut po dodatku substrata za HRP (A – blokirni pufer; B – lizat mišjih zrelih B-limfocitov A 20; C – celični lizat podganje kulture; D – rabljen kultivacijski medij mišjih zrelih B-limfocitov A 20; E – rabljen kultivacijski medij podganje kulture).

4.2.11 Korak 11

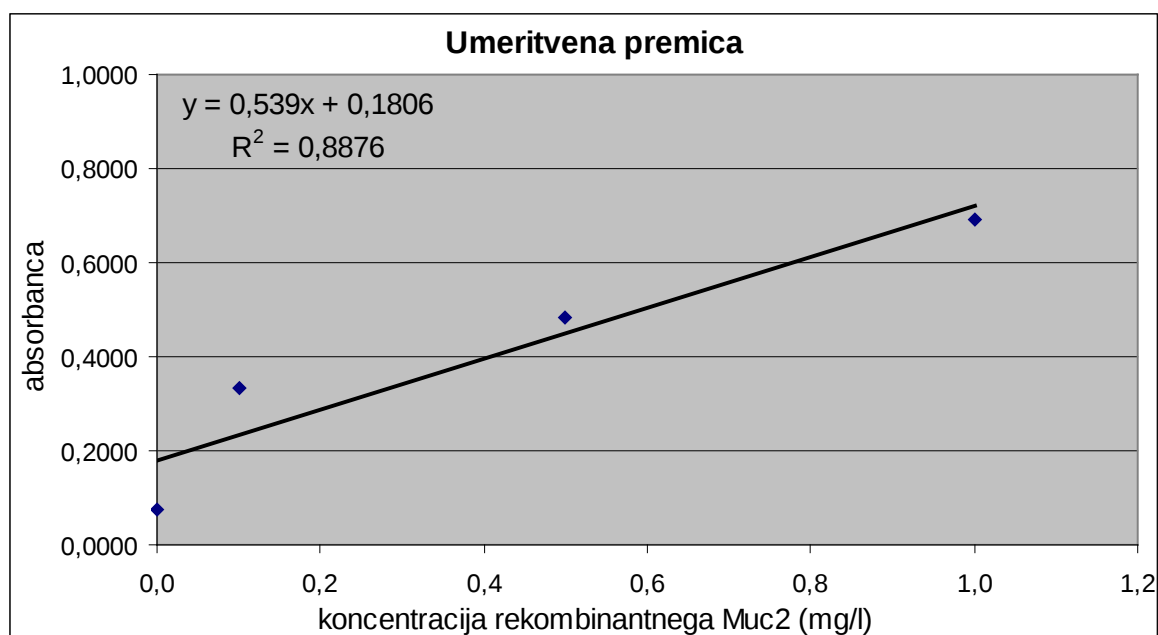
Direktna ELISA je v koraku 10 pokazala dobro razmerje med signalom in šumom. Poleg tega smo jo v koraku 7 uspešno uporabili v kombinaciji z rekombinantnim mucinskim standardom. Boljše razmerje med signalom in šumom ter možnost kvantitativne analize sta nas motivirala, da smo, kljub razvitemu postopku za merjenje prisotnosti Muc2 s sendvič ELISO in s tem doseženem cilju, delo nadgradili z analizo vzorčnih raztopin z direktno ELISO. Zaradi rezultatov, dobljenih v korakih 9 in 10, ter dejstva, da je Muc2 sekretorni mucin, smo analizirali le rabljen kultivacijski medij podganjih kultur, celične lizate pa pustili za druge analize.

Enako kot pri koraku 10 smo na mikrotitrsko ploščo najprej nanesti vzorčne raztopine. Šlo je za rabljen kultivacijski medij vseh šestih podganjih kultur, odvzet po vsakem tednu kultiviranja. Kot slepe vzorce smo uporabili blokirni pufer, rabljen kultivacijski medij mišjih zrelih B-limfocitov A 20 in neuporabljen kompletiran RPMI 1640 kultivacijski medij. Vse raztopine smo nanesti v dveh paralelkah in jih inkubirali dve uri. Nato smo uporabili kunčja poliklonska protitelesa, usmerjena proti Muc2, s koncentracijo 2,0 mg/l in jih inkubirali dve uri. Nanesli smo še kozja protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo, usmerjena proti kunčjim protitelesom, s koncentracijo 1,0 mg/l in jih inkubirali eno uro. Tudi tokrat so vsa spiranja potekala v treh ponovitvah in s pufrom za spiranje, ki je vseboval Tween 20. Po dodatku substrata smo absorbanco merili pri valovni dolžini 630 nm brez ustavljanja reakcije.

Za kvantitativno vrednotenje izmerjenih vrednosti smo potrebovali absorbance rekombinantnega Muc2, izmerjene v koraku 7 (Preglednica I). Z njihovo pomočjo smo narisali umeritveno premico, prikazano na grafu 11. Meritve vzorčnih raztopin smo predstavili v preglednici II kot normalizirane povprečne vrednosti absorbance. Njihove pripadajoče normalizirane povprečne koncentracije Muc2 pa smo izračunali z uporabo enačbe premice (Graf 11). Ločeno smo v preglednici III prikazali še povprečne vrednosti absorbance slepih vzorcev. Če jih primerjamo z vrednostmi vzorčnih raztopin, je razvidno, da je bil v slednjih res prisoten Muc2.

Preglednica I: Izmerjene vrednosti absorbance mucinskega standarda 16 minut po začetku reakcije v koraku 7. Koncentracija kunčjih poliklonskih protiteles, usmerjenih proti Muc2, je bila 2,0 mg/l, koncentracija kozjih protiteles, konjugiranih s HRP, usmerjenih proti kunčjim protitelesom, pa 1,0 mg/l.

koncentracija rekombinantnega Muc2 (mg/l)	absorbanca
0,0	0,0748
0,1	0,3327
0,5	0,4850
1,0	0,6923



Graf 11: Prikazana je umeritvena premica za rekombinantni Muc2, narisana na podlagi vrednosti, prikazanih v preglednici I.

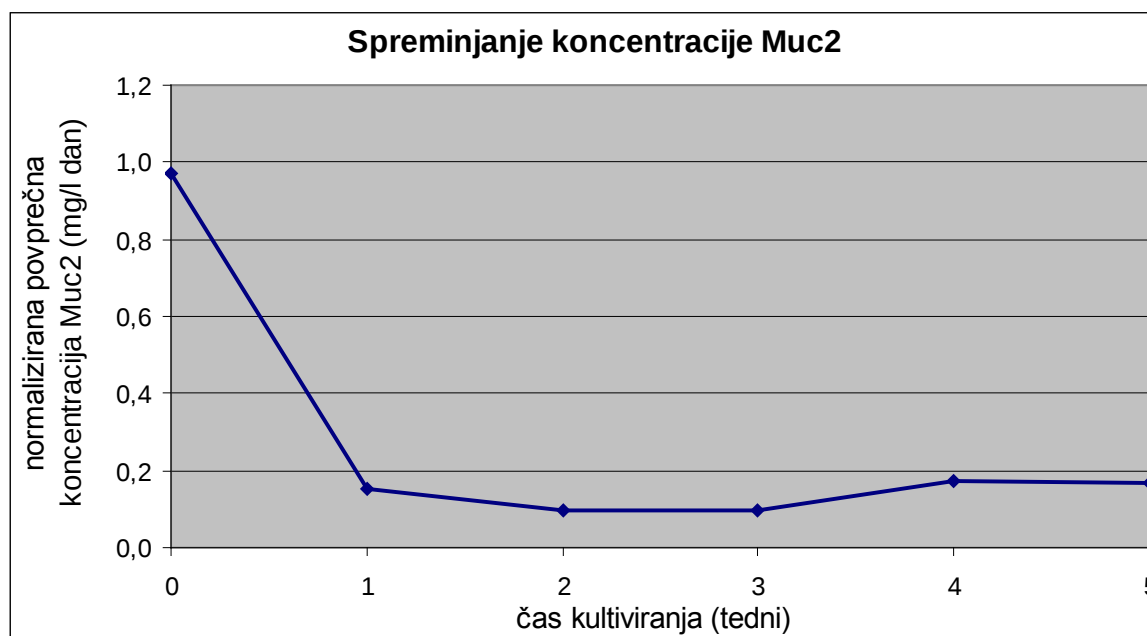
Preglednica II: Prikazane so normalizirane povprečne vrednosti absorbance in koncentracije Muc2 ob koncu vsakega tedna kultiviranja. Normalizacijo smo izvedli tako, da smo vrednosti delili s starostjo rabljenega kultivacijskega medija (čas, ko je bil medij v stiku s celicami). Prikazane so le povprečne vrednosti vseh šestih podganjih kultur.

čas kultiviranja (teden)	normalizirana povprečna absorbanca (1/dan)	normalizirana povprečna koncentracija Muc2 (mg/l dan)
0	0,6145	1,0
1	0,1112	0,2
2	0,2184	0,1
3	0,1098	0,1
4	0,1883	0,2
5	0,1854	0,2

Preglednica III: Povprečne vrednosti absorbance, izmerjene za analizirane slepe vzorce.

slepi vzorec	povprečna vrednost absorbance
blokirni pufer	0,0622
rabljen kultivacijski medij mišjih zrelih B-limfocitov A 20	0,0599
neuporabljen kompletiran RPMI 1640 kultivacijski medij	0,0596

Z grafa 12 je razvidno, da je količina Muc2 v kultivacijskem mediju močno upadla v prvem tednu kultiviranja, nato pa so bile spremembe bistveno manjše v naslednjih tednih. Sklepali smo, da smo pri izolaciji intestinalnih epiteljskih celic dobili veliko število čašastih celic, ki so izločale velike količine Muc2, kar je vidno na grafu 12 ob času 0. Tekom prvega tedna so nato vse izolirane čašaste celice propadle, saj je njihova življenjska doba le 3–5 dni. Nadomestile so jih čašaste celice, ki so najverjetneje nastale *in vitro* iz izoliranih matičnih ali prehodnih celic. Zaradi manjšega števila celic, ki se delijo, ter zahtevnejših pogojev za njihovo delitev je bilo novih čašastih celic bistveno manj. Manj čašastih celic pa je pomenilo manj Muc2, kar je razvidno tudi z grafa 12 ob časih kultiviranja 1–5 tednov. Vzpodbudno je bilo dejstvo, da količina Muc2 ni padla na ničlo. To pomeni, da so bile ves čas kultiviranja celične kulture prisotne čašaste celice, ki so izločale mucin. Njihova prisotnost kaže na to, da so bile verjetno prisotne tudi matične ali vsaj prehodne celice, ki so nujne za obnavljanje intestinalnih celičnih vrst. Ker so bili pogoji kultiviranja ves čas enaki, smo predpostavili, da sta bila tudi hitrost in obseg izločanja Muc2 ves čas konstanta. Ob upoštevanju te predpostavke smo lahko spreminjanje koncentracije Muc2 vzeli kot pokazatelj spreminjanja števila čašastih celic v intestinalni celični kulturi.



Graf 12: Prikazano je spreminjanje normalizirane povprečne koncentracije Muc2 v odvisnosti od časa kultiviranja.

Teoretično je sendvič ELISA občutljivejša metoda, primernejša za analizo kompleksnih vzorcev kot direktna ELISA. Pri našem delu pa se je izkazalo drugače. Razlogov za to je bilo lahko več. Vezava primarnih protiteles na antigen je lahko sterično ovirala vezavo sekundarnih. Del primarnih protiteles se je lahko vezal na mikrotitrsko ploščo v takšnem položaju, da ta niso omogočala vezavo antigena. Poleg tega pa protitelesa proti Muc2, uporabljena pri sendvič ELISA, še niso bila preizkušena pri tovrstni uporabi, zato tudi nismo poznali morebitnih omejitev njihove uporabe v takšni situaciji.

Kljub temu smo razvili postopek, ki predstavlja dobro izhodišče za optimizacijo in ovrednotenje imunokemijske metode za merjenje mucina 2 v kompleksnih vzorcih. Zaradi pomanjkanja ustreznega kontrolnega materiala, slednjega ni bilo mogoče izvesti že v okviru diplomske naloge. Rekombinantni Muc2, ki smo ga uporabljali kot standard, se je namreč izkazal za neprimerne. Pri analizi omenjenega mucina s sendvič ELISA nismo dobili pozitivnih rezultatov. Po drugi strani pa se je ista metoda pri preizkušanju Muc2, prisotnega v rabljenem kultivacijskem mediju, izkazala za primerno. To kaže na strukturno različnost rekombinantnega in vzorčnega Muc2. Z delom bi bilo tako smiselno nadaljevati tudi v smeri iskanja ustreznjšeega mucinskega standarda, ki bi omogočil uporabo metode za kvantitativne analize.

5 SKLEP

Naše delo je dobra osnova za nadaljnji razvoj metode za merjenje mucina 2. Ta bi predstavljala pomembno orodje pri delu s študijskim modelom primarne kulture intestinalnih celic, ki ga razvijajo Lukač Bajalo in sod.

- Razvili smo postopek za merjenje mucina 2 v celičnih kulturah s sendvič encimsko imunsko metodo na trdni podlagi in s tem dosegli zastavljeni cilj.
- Komercialno dostopni rekombinantni humani Muc2 v obliki fuzijskega proteina GST-Muc2 z aminokislinami 4958-5180, pripravljen s pomočjo *E. Coli*, ni primeren za uporabo pri sendvič ELISI v kombinaciji s kozjimi poliklonskimi protitelesi, usmerjenimi proti Muc2.
- Potrebno bi bilo poiskati drug komercialno dostopen mucinski standard, ki bi bil učinkovit v kombinaciji s protitelesi, uporabljenimi pri sendvič ELISI.
- V kolikor primerne komercialno dostopnega mucinskega standarda ne bi našli, bi bilo potrebno pripraviti lastnega z izolacijo in čiščenjem Muc2 iz vzorčnih raztopin.
- Uporabljen mucinski standard se je izkazal za primerne le pri direktni ELISI v kombinaciji s kunčjimi poliklonskimi protitelesi, usmerjenimi proti Muc2.
- Razvito metodo bi bilo potrebno optimizirati in ovrednotiti, kar bi jo opredelilo kot kvantitativno.
- Smiselno bi bilo tudi preveriti, ali vpliva na dobljene rezultate predhodna redukcija disulfidnih vezi polimernih molekul Muc2 v vzorčnih raztopinah.
- Z direktno ELISO smo dokazali prisotnost mucina 2 v rabljenem kultivacijskem mediju in s tem navzočnost čašastih celic v kulturi razpršenih podganjih intestinalnih epitelijskih celic.
- Ob predpostavki, da količina Muc2 odseva število čašastih celic, smo povzeli, da se je populacija teh celic tekom prvega tedna kultiviranja bistveno zmanjšala, nato pa vzdrževala bolj ali manj konstantni obseg.
- Ker so bile čašaste celice prisotne celoten čas kultiviranja, smo sklepali, da so bile najverjetneje prisotne tudi matične ali vsaj prehodne celice.
- Z direktno ELISO nismo zaznali Muc2 v celičnih lizatih, medtem ko se je rabljen kultivacijski medij izkazal kot zelo primerna vzorčna raztopina.

6 LITERATURA

1. Zorc Pleskovič R, Milutinović Živin A, Petrovič D: Histologija, Učbenik za študente farmacije, Inštitut za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2006: 69–85.
2. Kocijančič A, Mravlje F: Interna medicina, 2. dopolnjena izdaja, EWO in DZS, Ljubljana, 1998: 355–516.
3. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W: Histology, A Text and Atlas with Cell and Molecular Biology, Fourth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Philadelphia, 2003: 491–501.
4. Specian RD, Oliver MG: Functional biology of intestinal goblet cells. *Am J Physiol* 1991; 260: C183–C193.
5. Voet D, Voet JG: Biochemistry, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1995: 251–276.
6. Johnson LR, Barrett KE: Physiology of the Gastrointestinal Tract Volume 1, Fourth Edition, Academic Press, Oxford, 2006: 763–780. (Google Book Search 8. 5. 2009)
7. Gum Jr.JR, Hicks JW, Toribara NW, Siddiki B, Kim YS: Molecular Cloning of Human Intestinal Mucin (Muc2) cDNA. *J Biol Chem* 1994; 269: 2440–2446.
8. Bergstrom KSB, Guttman JA, Rumi M, Ma C, Bouzari S, Khan MA, Gibson DL, Vogl AW, Vallance BA: Modulation of Intestinal Goblet Cell Function during Infection by an Attaching and Effacing Bacterial Pathogen. *Infect Immun* 2008; 76: 796–811.
9. Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, Lee CS, Labosky PA, Yang VW, Kaestner KH: The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development* 2002; 129: 2619–2628.
10. Devlin TM: Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, Fifth Edition, Wiley-Liss, New York, 2002: 1081–1115.
11. Booth C, Potten CS: Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest* 2000; 105: 1493–1499.
12. Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: od gena do učinkovine, 1. izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 531–578.
13. Wild D: The Immunoassay Handbook, Third Edition, Elsevier Ltd., Oxford, 2005: 3-166, 192–211.

14. Burtis CA, Ashwood ER: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Fifth Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2001: 177–194, 234–250, 352–389.
15. Walker JM: The Protein Protocols Handbook, Humana Press Inc., Totowa, 1996: 749–752.
16. Navodila za delo: Protocol: ELISA Assays, Santa Cruz Biotechnology, Inc.
http://www.scbt.com/protocol_elisa_assays.html (17. 5. 2009).
17. Kemeny DM, Challacombe SJ: ELISA and Other Solid Phase Immunoassays: Theoretical and Practical Aspects, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 1988: 319–342.
18. Paulus U, Loeffler M, Zeidler J, Owen G, Potten CS: The differentiation and lineage development of goblet cells in the murine small intestinal crypt: experimental and modelling studies. *J Cell Sci* 1993; 106: 473–484.
19. Van der Sluis M, De Koning BAE, De Bruijn ACJM, Velcich A, Meijerink JPP, Van Goudoever JB, Büller HA, Dekker J, Van Seuningen I, Renes IB, Einerhand AWC: Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That Muc2 Is Critical for Colonic Protection. *Gastroenterology* 2006; 131: 117–129.
20. Ajioka Y, Allison LJ, Jass JR: Significance of Muc1 and Muc2 mucin expression in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 1996; 49: 560–564.
21. Tytgat KMAJ, Bovelandt FJ, Opdam FJM, Einerhand AWC, Büller HA, Dekker J: Biosynthesis of rat Muc2 in colon and its analogy with human Muc2. *Biochem J* 1995; 309: 221–229.
22. McCool DJ, Forstner JF, Forstner GG: Regulated and unregulated pathways for Muc2 mucin secretion in human colonic LS180 adenocarcinoma cells are distinct. *Biochem J* 1995; 312: 125–133.
23. Tytgat KMAJ, Opdam FJM, Einerhand AWC, Büller HA, Dekker J: Muc2 is the prominent colonic mucin expressed in ulcerative colitis. *Gut* 1996; 38: 554–563.
24. Gouyer V, Wiede A, Buisine MP, Dekeyser S, Moreau O, Lesuffleur T, Hoffmann W, Huet G: Specific secretion of gel-forming mucins and TFF peptides in HT-29 cells of mucin-secreting phenotype. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1539: 71–84.
25. Plaisancie P, Ducroc R, El Homsy M, Tsocas A, Guilmeau S, Zoghbi S, Thibaudau O, Bado A: Luminal leptin activates mucin-secreting goblet cells in the large bowel. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G805–G812.

26. Phillips JE, Case NR, Celly C, Chapman RW, Hey JA, Minnicozzi M: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of mucin levels in bronchoalveolar lavage fluid. *J Pharmacol Toxicol Meth* 2006; 53: 160–167.
27. Corfield AP: *Glycoprotein Methods and Protocols: The Mucins*, Humana Press, Totowa, 2000: 45–55. (Google Book Search 4. 6. 2009)
28. Navodila za delo: Sandwich ELISA protocol, Abcam.
<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11422> (8. 6. 2009).
29. Informacije o reagentu: Mucin 2 (H-300): sc-15334, Santa Cruz Biotechnology, Inc., 2008.
30. Informacije o reagentu: Mucin 2 (R-12): sc-13312, Santa Cruz Biotechnology, Inc., 2008.
31. Navodila za uporabo: Nunc ImmobilizerTM Amino, Nunc, No. 77102, ver. 1.1, YNI 03.05.
32. Informacije o reagentu: Muc2, Recombinant Human Muc2 Protein, Thermo Scientific, Rev 060706A.
33. Lukač Bajalo J, Ungerer R, Hekkens AJM, van de Biezen E, Hekkens WThJM: Circadian Aspects of In Vitro Culture of Rat Intestinal Rings. *J Interdiscipl Cycle Res* 1987; 18/4: 243–248.
34. Mestecky J, Bienenstock J, Lamm ME, McGhee JR, Strober W, Mayer LF: *Mucosal Immunology*, Third Edition, Academic Press, Oxford, 2005: 49–72. (Google Book Search 10. 6. 2009)
35. Navodila za delo: Sandwich ELISA protocol, Rev: 030107, BioLegend.
http://www.biolegend.com/media_assets/support_protocol/BioLegend_Sandwich_ELISA_protocol.pdf (11. 6. 2009).