

Grupa.....

Wrocław,

Imiona i nazwiska studentów:

Imię i nazwisko prowadzącego:

.....
.....
.....

Ćwiczenie 3

Antygenowa identyfikacja komórek krwi i ocena peroksydacji lipidów w osoczu

Zagadnienia: grupy krwi, składniki morfotyczne krwi, metody oznaczania grup krwi, grupy krwi a dobór diety, stres oksydacyjny, zaburzenia metaboliczne, peroksydacja lipidów

Ćwiczenie obejmuje:

(1) Identyfikację antygenową grup krwi.

Do podstawowych komponentów krwi możemy zaliczyć krwinki czerwone, białe oraz płytki krwi. W osoczu znajdują się też inne substancje jak np. białka, cukry, tłuszcze, sole, enzymy oraz gazy. Każdy człowiek dziedziczy określoną grupę krwi. Obecność albo brak **antygenu A** lub **B** na powierzchni krwinek czerwonych warunkuje występowanie danej grupy krwi. Tym sposobem wyróżniono cztery grupy krwi: **A**, **B**, **AB** (na powierzchni krwinek czerwonych występują zarówno antygeny A jak i B oraz 0 (gdy nie występuje ani antygen A ani B), jak pokazano na Tabeli poniżej. Kolejnym istotnym antygenem jest **antygen Rhesus (Rh)** zwany też antygenem D. Osoby, u których występuje antygen D nazywamy **Rh+**, a osoby, które tego antygeny nie posiadają – **Rh-**. W ćwiczeniu będziemy obserwować reakcje poszczególnych grup krwi z przeciwciałami, wykorzystano reakcję antygen-przeciwciała, wykorzystywaną w oznaczeniach grup krwi. Na skutek reakcji będziemy obserwować zjawisko aglutynacji krwinek czerwonych. Aglutynacja jest odczynem immunologicznym, który polega na zlepianiu antygenów np. bakterii lub krwinek, pod wpływem swoistej surowicy krwi oraz znajdujących się w niej specyficznych przeciwciał – **aglutynin**. Aglutynacja przebiega w dwóch etapach: (1) swoiste związanie antygeny z przeciwciałem i (2) następnie nieswoiste tzw. „wyklaczanie”, zachodzące pod wpływem elektrolitów.

Grupy krwi w układzie ABO z wykorzystaniem antygenów		
Przeciwciała anti-A + krew: aglutynacja	Przeciwciała anti-B + krew: aglutynacja	Grupa krwi
Tak	Nie	A
Tak	Tak	AB
Nie	Tak	B
Nie	Nie	0

(2) Ocena peroksydacji lipidów na podstawie pomiaru dwualdehydu malonowego (MDA) w osoczu od pacjenta z zaburzeniami metabolicznymi

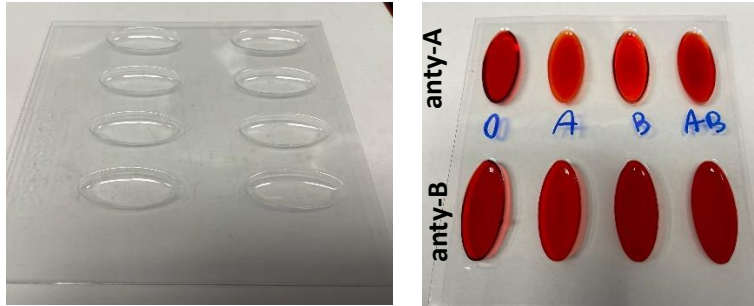
Peroksydacja lipidów jest procesem lawinowym, zapewniającym ciągłą dostawę wolnych rodników, które inicjują następne reakcje peroksydacji. W wyniku procesu peroksydacji lipidów powstają krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, alkohole, cykliczne endonadtlenki oraz aldehydy, w tym dwualdehyd malonowy. Produkty reakcji MDA z kwasem tiobarbiturowym (thiobarbituric acid- TBA) określa się jako produkty TBA-reaktywne i uważa za markery nieenzymatyczne procesu peroksydacji lipidów. Duże zainteresowanie wzbudza także ostatnio inny aldehyd- 4- hydroksynonenal (4-HNE), którego poziom może świadczyć o zaawansowaniu chorób metabolicznych. Zasada oznaczania LPO opiera się na reakcji z kwasem tiobarbiturowym

Metoda oznaczania peroksydacji lipidów opiera się na reakcji aldehydu malonowego (MDA) z kwasem tiobarbiturowym (TBA). Podstawą jest powstawanie barwnego adduktu w reakcji pomiędzy TBA i niektórymi produktami peroksydacji lipidów w kwaśnym środowisku i w podwyższonej temperaturze. Powstający addukt ma różowe zabarwienie, a jego stężenie oznacza się spektrofotometrycznie lub intensywność na zasadzie obserwacji.

(1) GRUPY KRWI

Materialy :

- seroplasty (płytki do oznaczania grup krwi)



- pipety Pasterua
- odczynnik **anty-A**
- odczynnik **anty-B**
- próbki krwi o znanej grupie krwi (0, A, B i AB)
- próbka krwi od nieznanego pacjenta (P1, P2 itd.)
- Rękawiczki – każdy przynosi swoje!!!**

Procedura:

1. Przygotować seroplasty i odczynniki do oznaczania grup krwi
2. Dodać jedną kroplę próbki krwi o znanej grupie krwi, używając pipety pasterówki, do pierwszej studzienki w każdym rzędzie na seroplaście. Postępuj zgodnie z rysunkiem 2.
3. Dodać po kropli odczynnika **anty-A** do każdej studzienki w pierwszym rzędzie i zapisać obserwacje w tabeli z wynikami. (Jeżeli wynik nie jest jednoznaczny, należy dodać kolejną kroplę odczynnika anty-A).
4. Dodać po kropli odczynnika **anty-B** do każdej studzienki w drugim rzędzie i zapisz obserwacje w tabeli z wynikami. (Jeżeli wynik nie jest jednoznaczny, należy dodać kolejną kroplę odczynnika anty-B).

+anty-A	0	A	B	AB
+anty-B	0	A	B	AB

5. Na podstawie wyników reakcji ocenić jak reagują poszczególne grupy krwi (0, A, B, AB) z przeciwciałami.
6. Dokonać badania grupy krwi nieznanego pacjenta na czystym seroplaście, postępując w analogiczny sposób. Zapisz wyniki w tabeli z wynikami.
7. Zapisz jakie grupy krwi mają badani pacjenci.

Roztwory użyte w tej wersji zaczerpnięto od Kola Naukowców Niezależnych Szkół z Australii Zachodniej (LABNETWEST)

OPRACOWANIE WYNIKÓW

Tabela wyników

Wyniki próbek o znanej grupie krwi		
Grupa krwi	Wyniki z użyciem odczynnika anty-A. Czy wystąpiła aglutynacja?	Wyniki z użyciem odczynnika anty-B. Czy wystąpiła aglutynacja?
A		
B		
AB		
0		

Wyniki próbek dla pacjenta o nieznannej grupie krwi		
Grupa krwi	Wyniki z użyciem odczynnika anti-A. Czy wystąpiła aglutynacja?	Wyniki z użyciem odczynnika anti-B. Czy wystąpiła aglutynacja?
A		
B		
AB		
0		

Wyjaśnij:

Dlaczego grupy krwi mogą mieć znaczenie w diecie?

(2) PEROKSYDACJA LIPIDÓW

Material:

Osocze krwi wzorcowe i od pacjenta z zaburzeniami metabolicznymi

Odczynniki:

A) 15% (m/v) roztwór kwasu trichlorooctowego (TCA) w 0.25 molowym roztworze HCl

B) 0.37% (m/v) roztwór kwasu tiobarbiturowego (TBA) w 0.25 molowym roztworze HCl

Wykonanie:

(1) Przygotowujemy próby w probówkach typu eppendorf wg tabeli:

	Próba prawidłowa	Próba patologiczna
Odczynnik A	500µl	500µl
Odczynnik B	500µl	500µl
Osocze	500µl	500µl

(2) Po wymieszaniu zamykamy probówki i ogrzewamy zawartość probówki w temperaturze 100°C (termoblok) przez 20 minut (w celu umieszczenia ich w termobloku oraz ich wyjęcia używamy pęsety).

UWAGA: PRZED INKUBACJĄ WIECZKO PROBÓWKI PROWADZĄCY PRZEKŁUWA SKALPELEM!

(3) Po inkubacji oceniamy zabarwienie próbek prawidłowej i patologicznej. Zapisz poniżej obserwacje i wnioski z przeprowadzonego doświadczenia.