

Faculty of Medicine in Rijeka

**Curriculum
2022/2023**

For course

Metode imunoanalize proteina

Study program: **Medicina (R)** (elective)
University integrated undergraduate and graduate study
Department: **Centre for Proteomics**
Course coordinator: **prof. dr. sc. Lenac Roviš Tihana**

Year of study: **3**
ECTS: **1.5**
Incentive ECTS: **0 (0.00%)**
Foreign language: **No**

Course information:

Okvirni sadržaj:

P1 (2 sata) Predavanje: Osnovne karakteristike antitijela i dizajn eksperimenata s višestrukim bojenjem - U kratkom uvodu, ponovit će se znanje o strukturi antitijela. Obuhvatit će se tehnike označavanja antitijela fluoroforima, biotinom i enzimima. Zatim će se kroz nekoliko primjera detaljno prikazati što treba uzeti u obzir prilikom provođenja eksperimenta koji uključuje višestruko bojenje.

P2 (1 sat) Predavanje: Bioinformatički alati za analizu strukture proteina i antitijela - 3D prikaz kompleksa, proteina i antitijela

P3 (2 sata) Predavanje: ELISA principi za mjerenje proteina u istraživačkim i dijagnostičkim laboratorijima - Na temelju usvojenih načela direktnih i indirektnih metoda ELISA, bit će predstavljen napredni dizajn laboratorijskog eksperimenta za određivanje proteinskih analita (npr. tumorskih markera ili proteina upalnih markera iz krvi). Bit će raspravljeno i nekoliko složenijih oblika metode, poput kompetitivne ELISA. Također će biti predstavljeni odobreni dijagnostički kitovi, poput testa za imunoglobulin IgG radi određivanja titra antitijela na SARS-CoV-2 ili preosjetljivost na hranu.

P4 (2 sata) Predavanje: Upotreba Western blottinga i naprednih metoda imunoprecipitacije u istraživanju i dijagnostici - Bit će predstavljene metode u kojima je visoka osjetljivost Western blotting metode i njezina sposobnost otkrivanja proteina različitih veličina pronašla primjenu u medicinskoj dijagnostici. Primjeri su borelijoza, Creutzfeldt-Jakobova bolest i određene vrste virusnih infekcija. Također će biti obuhvaćeni napredni materijali poput magnetskih kuglica, posebnih značajki imunoprecipitacije iz uzoraka krvi kao kompleksne mješavine bogate proteinima, albuminom i samim antitijelima, itd.

P5 (1 sat) Predavanje: Osnove analize rezultata citometrije protoka - protočna citometrija je osnovna metoda imunološke analize proteina na stanicama, posebno u slučaju analize proteina na površini stanica. Kratko će se uz primjere pojasniti histogram i točkasta (dot-plot) prezentacija rezultata kao osnova za razumijevanje literature u eksperimentalnoj medicini.

L6 (2 sata) Predavanje: Imunofluorescencija s analizom konfokalnog mikroskopa - metoda imunofluorescentne mikroskopije važna je za analizu proteina u stanicama i tkivima. Slijedeći principe imunofluorescencije i njezine primjene u konfokalnim mikroskopskim metodama, okosnicu predavanja čini dizajn naprednih eksperimenata i priprema za izvođenje jednostavnih eksperimenata s višestrukim bojenjem (V2 i V3) priprava staničnih kultura pomoću fluorescentno označenih antitijela i analiza konfokalnim mikroskopom. Također će se kratko objasniti principi naprednih metoda poput FRET (fluorescentna rezonancijska energijska transferna) metoda za određivanje interakcije proteina i metoda mikroskopije s dvofotonskim pobuđenjem za analizu debljih uzoraka poput organotipskih modela.

V1 (1 sat) Eksperimentalni rad: Dizajn eksperimenta s višestrukim imunobojenjem. Studenti će rješavati individualne zadatke sa ciljem pronalaska odgovarajućih antitijela putem izvora s interneta koja će im omogućiti imunofluorescentno bojenje prethodno dodijeljenih proteina u uzorku.

V2 (5 sati) Eksperimentalni rad: Priprema uzoraka za imunofluorescentnu mikroskopiju - bojenje (do 4 boje) na uzorcima staničnih kultura

V3 (3 sata) Eksperimentalni rad: Analiza uzoraka na konfokalnom mikroskopu

Seminari (6 sati): Planirane su kratke prezentacije studenata uz raspravu

Cilj predmeta je pomoći studentima da prodube netom stečena i usvoje napredna znanja o imunološkoj analizi proteina, tj. o metodama analize proteina koje se temelje na upotrebi protutijela. Ova vrsta analiza osnova je mnogih istraživačkih i dijagnostičkih postupaka te će njihovo razumijevanje studenti moći iskoristiti u primjerice kliničkoj imunologiji, infektologiji, mikrobiologiji, onkologiji, patologiji i molekularnoj dijagnostici. Očekuje se osnovno predznanje iz biologije proteina i imunoloških laboratorijskih metoda te izražen interes za znanja iz područja molekularne dijagnostike i molekularnih mehanizama u zdravlju i bolesti.

List of assigned reading:

Robert K. Murray et al.: Harperova ilustrirana biokemija – odabrana poglavlja

Berg JM, Tymoczko JL, and Stryer L: Biochemistry Stryer – odabrana poglavlja

List of optional reading:

Odabrani znanstveni i stručni radovi i pregledni radovi iz okvira kolegija

Curriculum:

Lectures list (with titles and explanation):

P1. Osnovna obilježja protutijela i dizajn pokusa s više vrsta protutijela

P1 (2h) Osnovna obilježja protutijela i dizajn pokusa s više vrsta protutijela – u kratkom uvodu bit će utvrđeno znanje o strukturi protutijela. Obradit će se tehnike obilježavanja protutijela fluoroforama, biotinom i enzimima. Potom će se na nekoliko primjera detaljno prikazati o čemu treba voditi računa kod izvođenja pokusa koji uključuje više vrsta protutijela i višestruko bojenje preparata.

Student će biti osposobljen da:

1. Definira sljedeće pojmove koji su vezani uz metode imuno-analize proteina: primarna i sekundarna protutijela, kros-reaktivnost protutijela, obilježavanje protutijela, podrijetlo protutijela (vrsta), izotip protutijela, dijagnostički kit

P2. Bioinformatički alati za 3D prikaz proteina i protutijela

P2 (1h) Bioinformatički alati za analizu strukture proteina i protutijela – 3D prikaz kompleksa, proteina, protutijela

Student će biti osposobljen da:

1. Opiše osnovna obilježja kompleksa proteina i protutijela
2. Pronađe alate koji omogućavaju jednostavnu vizualizaciju strukture proteina

P3. ELISA za mjerenje proteina u istraživačkim i dijagnostičkim laboratorijima

P3 (2h) ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) za mjerenje proteina u istraživačkim i dijagnostičkim laboratorijima – nastavno na usvojene principe direktne i indirektna ELISA metode, bit će izložen napredan dizajn laboratorijskog pokusa za određivanje proteinskih analita (primjerice eksperimentalnih solubilnih tumorskih markera ili proteina markera upale, iz krvi) temeljenog na tehnici ELISA te neki složeniji oblici izvedbe ove metode, poput kompetitivne ELISA-e. Nadalje, bit će obrađeno nekoliko kitova koji su odobreni za upotrebu u dijagnostici, a temelje se na tehnici ELISA: poput testa imunoglobulina IgG u svrhu određivanja protutijela na SARS-CoV-2 ili preosjetljivosti na hranu.

Student će biti osposobljen da:

1. Raspravlja o prednostima i ograničenjima metoda ELISA u laboratorijskoj praksi
2. Raspravlja o čimbenicima koji otežavaju analizu proteina u krvi

P4. Upotreba Western blot/imunoblot metode i naprednih metoda imunotaloženja u istraživanjima i dijagnostici

P4 (2h) Upotreba Western blottinga i naprednih metoda imunotaloženja u istraživanjima i dijagnostici – nastavno na usvojene temeljne principe imunotaloženja i Western blottinga, bit će izloženo nekoliko metoda u kojima je velika osjetljivost metode Western blot i njena sposobnost da, za razliku od metode ELISA, ukaže na proteinske forme različite veličine našla primjenu u medicinskoj dijagnostici. Primjeri su borelija, Creutzfeldt-Jakobova bolest te neke vrste virusnih infekcija. Nadalje, obradit će se napredni materijali za provođenje metode imunotaloženja, poput magnetskih kuglica, koje za razliku od klasičnih metoda unose mnogo manje onečišćenja u sustav, a što je od posebne važnosti za imunotaloženja iz uzoraka krvi, kao složene smjese koja obiluje proteinom albuminom i samim protutijelima.

Student će biti osposobljen da:

1. Raspravlja o prednostima i ograničenjima metode Western blot/imunoblot u laboratorijskoj praksi

P5. Osnove analize rezultata protočne citometrije

P5 (1h) Osnove analize rezultata protočne citometrije – protočna citometrija je osnovna metoda imunoanalize proteina na stanicama, bez konkurencije u slučaju analize površinskih proteina. Unutar kratkog predavanja utvrdit će se temelji histogramskog i 'dot blot' prikaza rezultata kao osnove za nesmetano praćenje literature u (eksperimentalnoj) medicini.

Student će biti osposobljen da:

1. Opiše osnovne prikaze rezultata protočne citometrije i njenu prednost u analizi proteina stanične površine

P6. Imunofluorescencija s analizom konfokalnim mikroskopom

P6 (2h) Imunofluorescencija s analizom konfokalnim mikroskopom – metoda imunofluorescentne mikroskopije je važna imunološka laboratorijska metoda za analizu proteina u stanicama i tkivima. Nastavno na principe imunofluorescencije i njezine primjene u metodama konfoklane mikroskopije, okosnica predavanja bit će dizajniranje naprednih pokusa i priprema za izvođenje jednostavnih pokusa višestrukog bojanja (V2 i V3) preparata staničnih kultura fluorescentno obilježenim protutijelima uz analizu konfokalnim mikroskopom. Ukratko će se izložiti i principi naprednih metoda poput primjerice metode FRET (Fluorescence resonance energy transfer) za određivanje interakcije proteina i metode dvofotonske mikroskopije (Two-photon excitation microscopy) za analizu uzoraka veće debljine, poput organotipskih modela.

Student će biti osposobljen da:

1. Definira sljedeće pojmove koji su vezani uz metode imunofluorescentne analize proteina: fluorofora, konfokalno, autofluorescencija

Practicals list (with titles and explanation):

V1. Dizajn vlastitog pokusa s višestrukim imuno-bojenjem preparata.

V1 (1h) Dizajn vlastitog pokusa s višestrukim imuno-bojenjem preparata. Studenti će rješavati individualne zadatke sa ciljem pronalaska odgovarajućih protutijela putem izvora s interneta koja će im omogućiti imunofluorescentno bojanje više zadanih proteina u preparatu.

Student će biti osposobljen da:

1. **Samostalno provede odabir protutijela za bilo koji eksperiment koji uključuje višestruko imuno-bojanje**

V2 Priprava preparata za imunofluorescentnu mikroskopiju

V2 (5h) Priprava preparata za imunofluorescentnu mikroskopiju – višestruko bojanje (do 4 boje) na uzorcima staničnih kultura.

Student će biti osposobljen da:

1. **Samostalno provede bojanje preparata staničnih kultura protutijelima uz nadzor**

V3 Analiza preparata na konfokalnom fluorescentnom mikroskopu

V3 (3h) Analiza preparata na konfokalnom fluorescentnom mikroskopu

Student će biti osposobljen da:

1. Procijeni i argumentira rezultate fluorescentne mikroskopije

Seminars list (with titles and explanation):

S - Seminari

Seminari (6h): Predviđene su kratke prezentacije studenata uz raspravu iz sadržaja teme kolegija i relevantne znanstvene literature ili literature vezane uz dijagnostičke postupke

Student obligations:

redovito pohađanje nastave (predavanja, seminari, vježbe)

izrada seminarskog rada/polaganje završnog ispita

Exam (exam taking, description of the written/oral/practical part of the exam, point distribution, grading criteria):

Other notes (related to the course) important for students:

COURSE HOURS 2022/2023

Metode imunoanalize proteina

Lectures (Place and time or group)	Practicals (Place and time or group)	Seminars (Place and time or group)
--	--	--

List of lectures, seminars and practicals:

LECTURES (TOPIC)	Number of hours	Location
P1. Osnovna obilježja protutijela i dizajn pokusa s više vrsta protutijela	2	
P2. Bioinformatički alati za 3D prikaz proteina i protutijela	1	
P3. ELISA za mjerenje proteina u istraživačkim i dijagnostičkim laboratorijima	2	
P4. Upotreba Western blot/imunoblot metode i naprednih metoda imunotaloženja u istraživanjima i dijagnostici	2	
P5. Osnove analize rezultata protočne citometrije	1	
P6. Imunofluorescencija s analizom konfokalnim mikroskopom	2	

PRACTICALS (TOPIC)	Number of hours	Location
V1. Dizajn vlastitog pokusa s višestrukim imuno-bojenjem preparata.	1	
V2 Priprava preparata za imunofluorescentnu mikroskopiju	5	
V3 Analiza preparata na konfokalnom fluorescentnom mikroskopu	3	

SEMINARS (TOPIC)	Number of hours	Location
S - Seminari	6	

EXAM DATES (final exam):
