

# Imunoelektroforéza

## Imunofixace

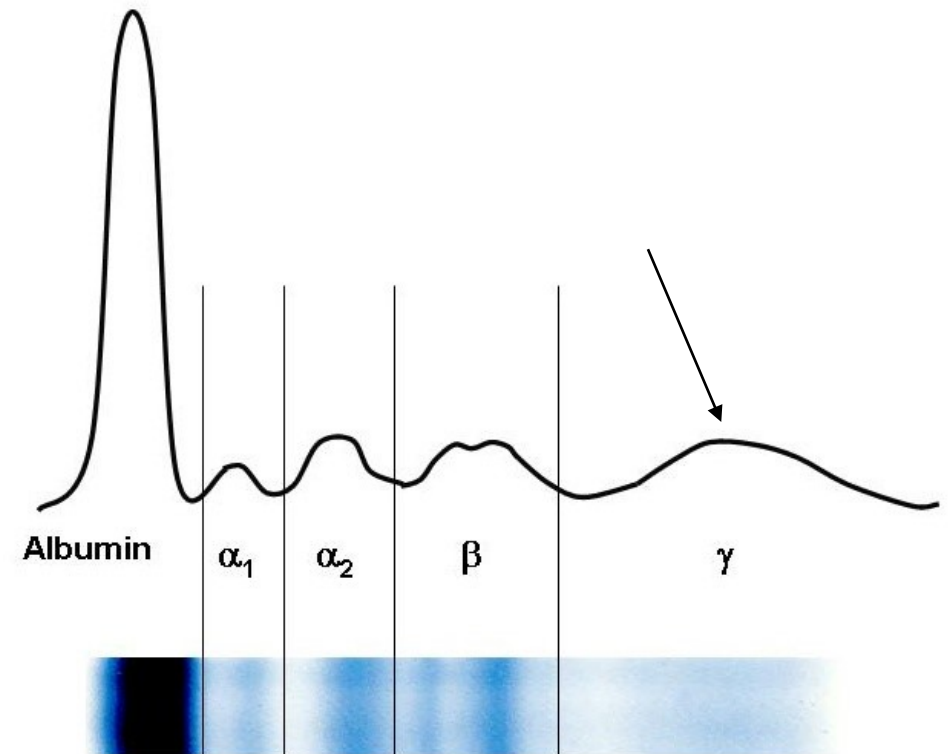
Mgr. Julie Štíhová

ÚKIA-FNUSA



# Klasická elektroforéza - screening

- Separace proteinů séra na základě rozdílné pohyblivosti v el. poli
- Médium – agarózový gel
- pH = 8,6 → anodická pohyblivost (většina proteinů izoel. bod kolem pH 5 - 6)
- Rozdělení do 5 základních frakcí
- Odečítání – většinou **denzitometrie**
  - Pokud známe koncentraci celkové bílkoviny → přepočítání % na koncentraci jednotlivých frakcí
- Immunologie – zájem o gamafrakci



Pozn. Detailní princip elektroforézy a denzitometrie lze najít v učebnicích klinické biochemie nebo instrumentální techniky

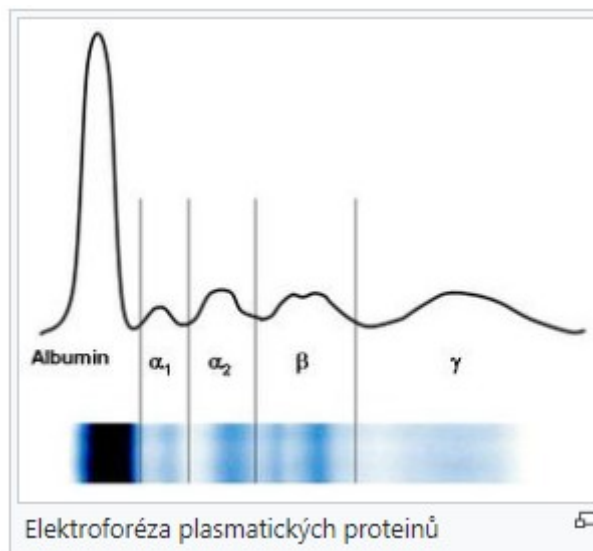
# Elektroforetické frakce obsahují tyto plazmatické proteiny

	<b>Bílkovina</b> <i>Relativní molekulová hmotnost</i>	<b>Koncentrace v séru [g/l]</b>	<b>Poločas [dny]</b>	<b>Funkce</b>	
	<b>Prealbumin</b> (Transthyretin) <i>54 000</i>	0,2–0,4	2	<ul style="list-style-type: none"> <li>vazba <b>hormonů štítné žlázy</b> a retinol vázajícího proteinu</li> </ul>	↓ malnutrice
	<b>Albumin</b> <i>68 000</i>	35–53	15–19	<ul style="list-style-type: none"> <li>nejvýznamnější transportní protein</li> <li>udržení koloidně-osmotického tlaku</li> <li>proteinová rezerva organismu</li> </ul>	↓ katabolismus ↓ hepatopatie ↓ ztráty bílkovin
<b>α<sub>1</sub> oblast</b>	<b>α<sub>1</sub>-lipoprotein</b> <i>180 000–360 000</i>	1,0–1,6 (Apo A-I)		<ul style="list-style-type: none"> <li>lipoprotein o vysoké hustotě (HDL)</li> <li>transport <b>cholesterolu</b> do jater</li> </ul>	
	<b>α<sub>1</sub>-antitrypsin</b> (α <sub>1</sub> -inhibitor proteáz) <i>54 000</i>	0,9–2,0	4	<ul style="list-style-type: none"> <li>inhibitor <b>lyzomálních proteáz</b> (hlavně elastázy z polymorfonukleárních leukocytů)</li> <li>vrozená deficience může být příčinou onemocnění plic (emfyzém) a jater (cirhóza)</li> </ul>	↑ <b>akutní zánět</b>
	α <sub>1</sub> -kyselý glykoprotein ( <b>orosomukoid</b> ) <i>40 000</i>	0,5–1,2	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>vazba lipofilních látek (např. progesteronu a některých léků)</li> <li>podílí se na regulaci imunitní odpovědi</li> </ul>	↑ <b>zánět</b>
	<b>α<sub>1</sub>-fetoprotein</b> <i>69 000</i>	< 7,5 μg/l	3,5	<ul style="list-style-type: none"> <li>fyziologicky produkován fetálními játry a žloutkovým váčkem</li> <li>hlavní protein fetálního séra</li> <li>fyziologicky přítomen v séru těhotných žen</li> </ul>	↑ hepatom ↑ některé malignity GIT ↑ těhotenství

<b>α<sub>2</sub></b> <b>oblast</b>	<b>Haptoglobin</b> <sup>[p 1]</sup> 85 000–1 000 000	0,3–2,0	2	<ul style="list-style-type: none"> <li>vychytává volný hemoglobin</li> </ul>	↑ <b>akutní zánět</b> ↓ hepatopatie ↓ intravaskulární hemolýza (konzumpce haptoglobinu)
	<b>α<sub>2</sub>-makroglobulin</b> 800 000	1,3–3,0	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>inhibitor proteáz (trombin, trypsin, chymotrypsin, pepsin)</li> <li>transport malých proteinů (cytokiny, růstové faktory) a dvojmocných iontů (např. Zn<sup>2+</sup>)</li> <li>díky velmi vysoké molekulové hmotnosti neprojde ani poškozenou glomerulární membránou</li> </ul>	↑ <b>akutní zánět</b>
	<b>Ceruloplasmin</b> 160 000	0,2–0,6	4,5	<ul style="list-style-type: none"> <li>oxidoredukční aktivita (oxidace Fe<sup>2+</sup> na Fe<sup>3+</sup>)</li> <li>vazba mědi (váže až 90 % Cu v séru)</li> </ul>	↓ <b>Wilsonova choroba</b> (hepatolentikulární degenerace)
<b>β<sub>1</sub></b> <b>oblast</b>	<b>Transferrin</b> 77 000	2,0–3,6	7	<ul style="list-style-type: none"> <li>transport a vychytávání volného železa</li> </ul>	↑ nedostatek železa ↓ malnutrice ↓ hepatopatie ↓ zánět
	<b>Hemopexin</b> 57 000	0,5–1,1	3–7	<ul style="list-style-type: none"> <li>vazba <b>hemu</b></li> </ul>	
	<b>β-lipoprotein</b> 2 750 000	0,7–0,9 (Apo B-100)	3	<ul style="list-style-type: none"> <li>lipoprotein o nízké hustotě (LDL)</li> <li>transport cholesterolu k buňkám</li> <li>velmi vysoká molekulární hmotnost</li> </ul>	
	<b>C4</b> složka komplementu 206 000	0,1–0,4	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>součást <b>komplementu</b></li> </ul>	↑ <b>zánět</b> ↓ autoimunitní stavy
<b>β<sub>2</sub></b> <b>oblast</b>	<b>C3</b> složka komplementu 180 000	0,8–1,4	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>součást komplementu</li> </ul>	↑ <b>zánět</b> ↓ autoimunitní stavy
	<b>β<sub>2</sub>-mikroglobulin</b> 11 800	0,001–0,002		<ul style="list-style-type: none"> <li>součást leukocytárních antigenů</li> </ul>	↑ hematologické nádory ↓ porucha tubulární resorpce
	<b>Fibrinogen</b> 340 000	1,5–4,5		<ul style="list-style-type: none"> <li>součást koagulační kaskády, prekurzor fibrinu</li> <li>fyzilogicky jen v plazmě, není v séru</li> </ul>	↑ zánět
	<b>C-reaktivní protein</b> 111 000	1,5–5 mg/l	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>aktivace komplementu</li> </ul>	↑ <b>akutní zánět (bakteriální)</b>

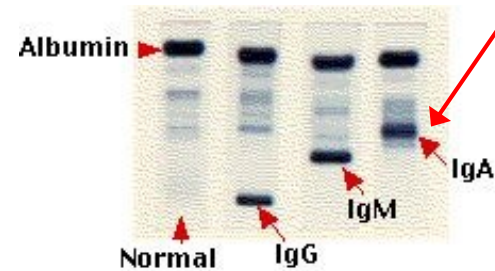
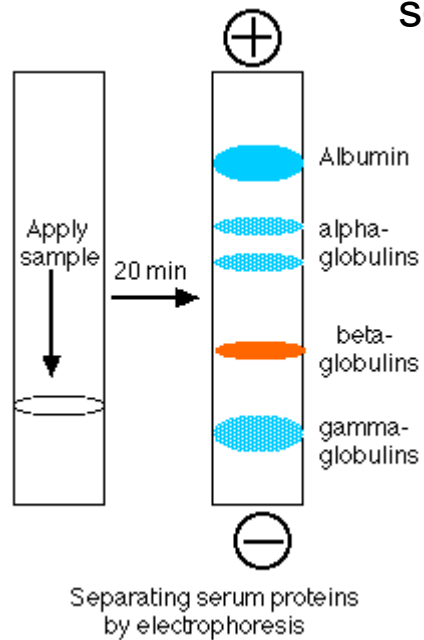
# Elektroforetické frakce obsahují tyto plazmatické proteiny

γ oblast	<b>IgG</b> 150 000	8,0–18,0	24	▪ pozdní protilátky	↑ (chronický) <b>zánět</b>
	<b>IgA</b> <sup>[p 2]</sup> 160 000	0,9–3,0	6	▪ protilátky slizniční imunity	↑ <b>záněty sliznic a jater</b>
	<b>IgM</b> 900 000	0,6–2,5	5	▪ časné protilátky	↑ <b>akutní zánět</b>



# Elektroforéza

sérové proteiny mohou být elektroforeticky separovány



- lze zachytit pouze hrubé změny:  
hypergamaglobulinémií,  
hypogamaglobulinémií či monoklonální  
gamapatií →

# Využití elektroforézy v klinické praxi screening chorobných stavů

- Vyšetřovaný materiál: sérum, moč, likvor

## **Hyperproteinémie** – hypergamaglobulinemie je vzácná:

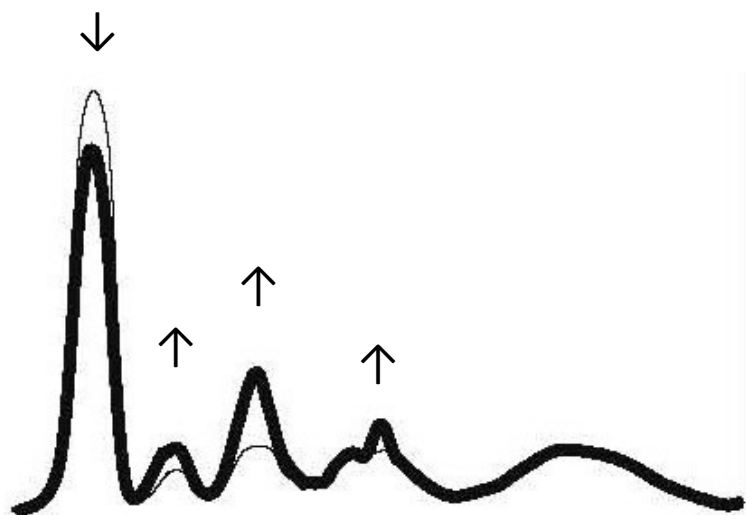
- Záněť
- **monoklonální gamapatie** (v moči – Bence-Jonesova bílkovina)
- chronické dlouhotrvající infekce, např. AIDS (zvýšená syntéza imunoglobulinů)
- Některé autoimunitní onemocnění – např. Sjögrenův syndrom

## **Hypoproteinémie** - většina chorobných stavů:

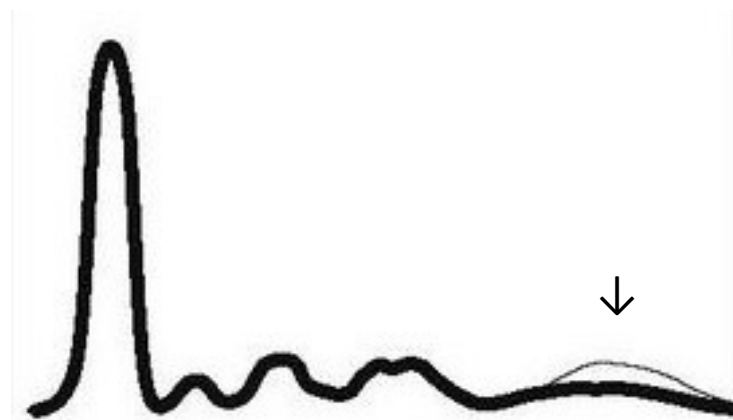
- porucha syntézy bílkovin v játrech
- nadměrné ztráty – nefrotický syndrom (vyšetření moči – zvýšené koncentrace bílkovin)
- poruchy výživy – malnutrice
- poruchy trávicího traktu – maldigesce a malabsorpce – nespecifické střevní záněty (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida)
- Rozsáhlé popáleniny
- Hyperhydratace – dochází k naředění bílkovin séra – těhotenství (fyziologicky), nevhodně podaná infuze

# Klasická elektroforéza - screening

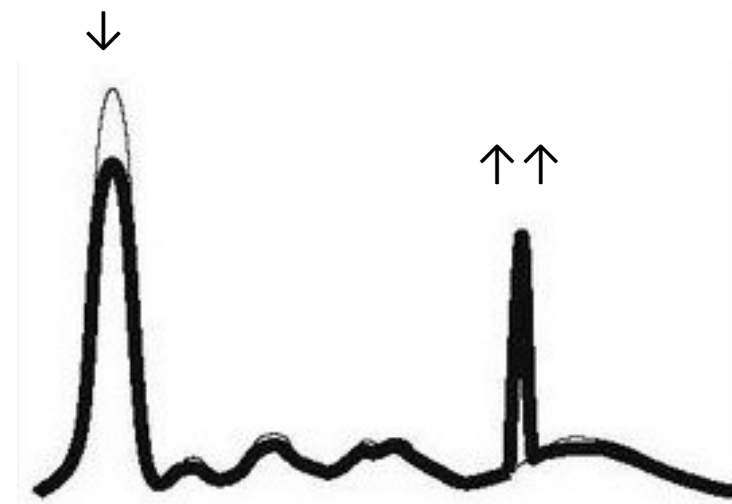
Nevýhoda – detekce pouze velkých změn v proteinových frakcích



Zánět



Hypogamaglobulinemie

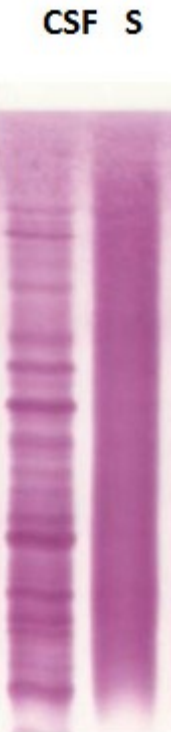


Hypergamaglobulinemie  
(monoklonální gamapatie)



# Využití elektroforézy v klinické praxi screening chorobných stavů

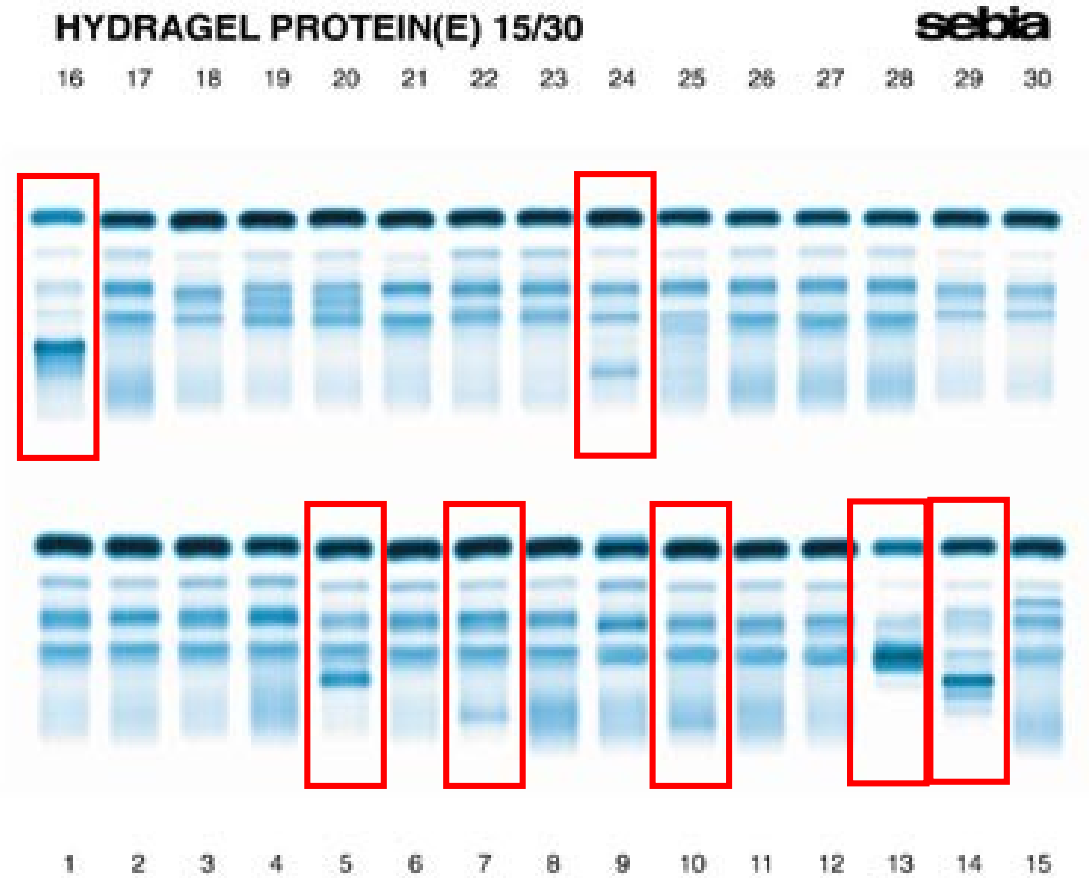
- **Izoelektrická fokusace:** kvalitativní průkaz intratékální syntézy imunoglobulinů
- Vyšetřovaný materiál: Likvor (CSF) + sérum (S) současně
- Intratékální syntéza protilátek v centrálním nervovém systému pochází z perivaskulárních infiltrátů B lymfocytů, které lokálně proliferují, dozrávají v plazmocyty a produkují příslušné protilátky
- Diagnostika **roztroušené sklerózy – průkaz oligoklonálních pásů v likvoru (pozitivita až v 98% případů)**
- Obrázek vpravo: oligoklonální pásy jsou přítomny pouze v likvoru (CSF), zatímco v séru chybí – jedná se o intratékální syntézu Ig – tento nález je pro roztroušenou sklerózu poměrně typický



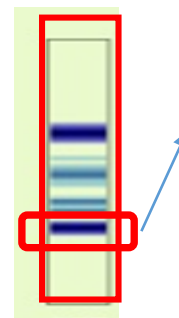
# Modifikace elektroforézy - Immunofixace

- Použití:
  - Identifikace paraproteinů- sérum, moč a likvor
- **paraprotein = monoklonální imunoglobulin**
  - produkován 1 klonem B-lymfocytů
- stav, kdy má pacient v séru paraprotein se nazývá **paraproteinémie** nebo též **monoklonální gamapatie**

# Elektroforéza



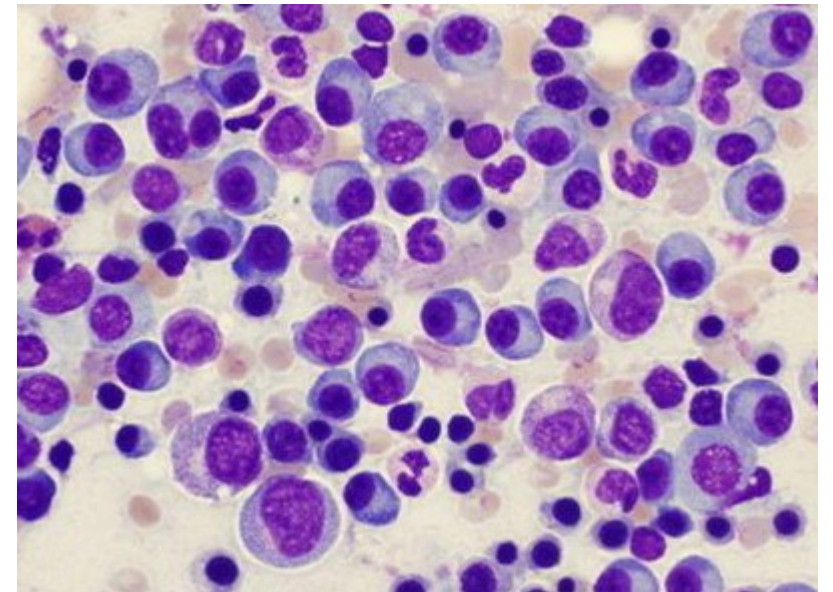
Příklady elektroforetického rozdělení řady patientských sér



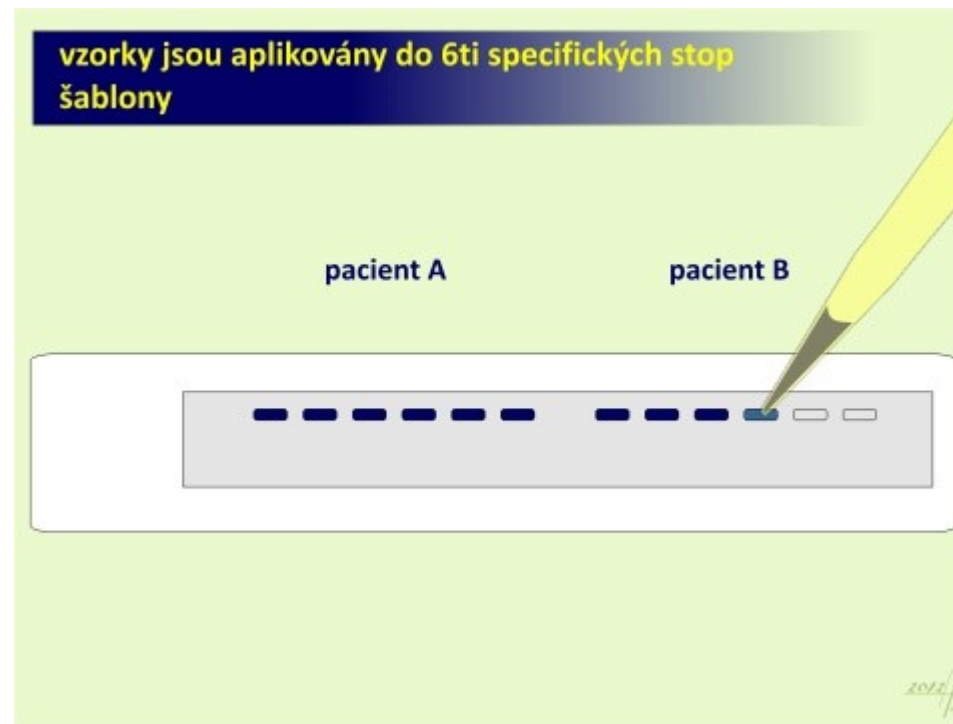
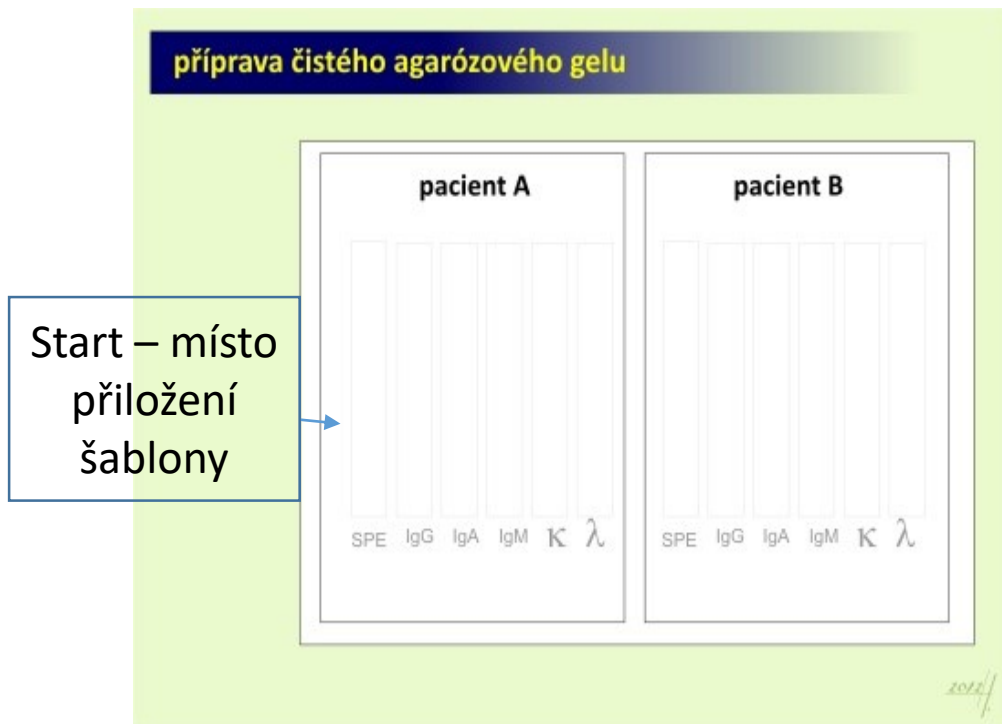
Ohraničený band v  $\gamma$ - globulinové oblasti = pacienti k dovyšetření imunofixací

# Monoklonální gamapatie

- Onemocnění s výskytem monoklonálního imunoglobulinu v séru
  - Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS)
  - Mnohočetný myelom
  - Plazmocytom
  - Waldenströмова makroglobulinemie
  - AL amyloidóza
  - Nemoci těžkých řetězců
- **Imunofixace slouží k:**
  - Diferenciální diagnostice gamapatie
  - Sledování vývoje onemocnění v čase
  - Sledování terapie
  - Vyšetření **séra + moči** současně!!

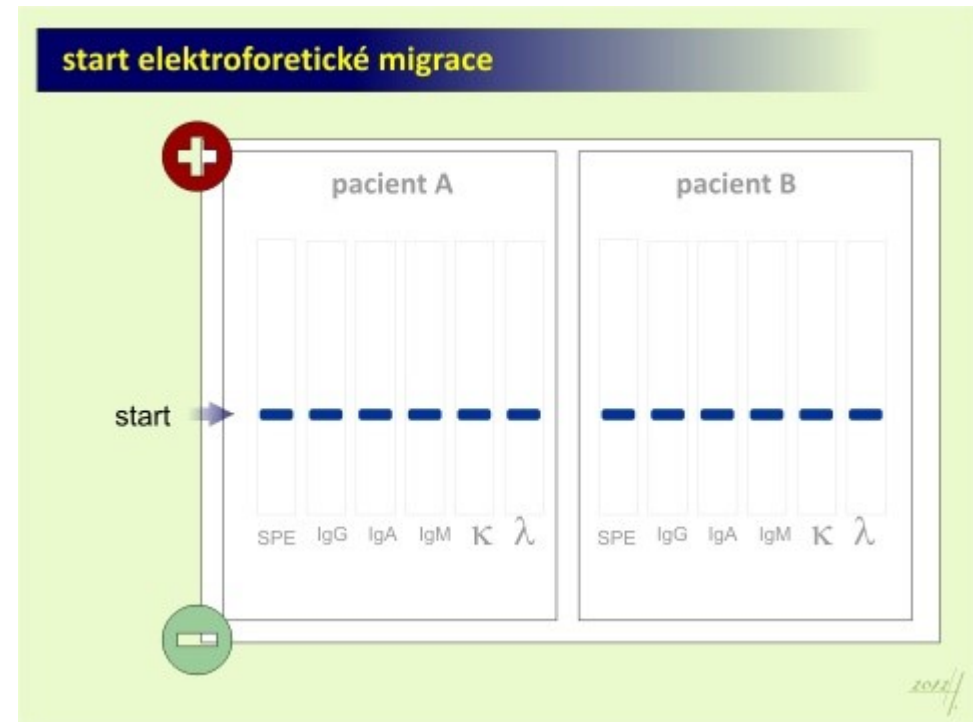
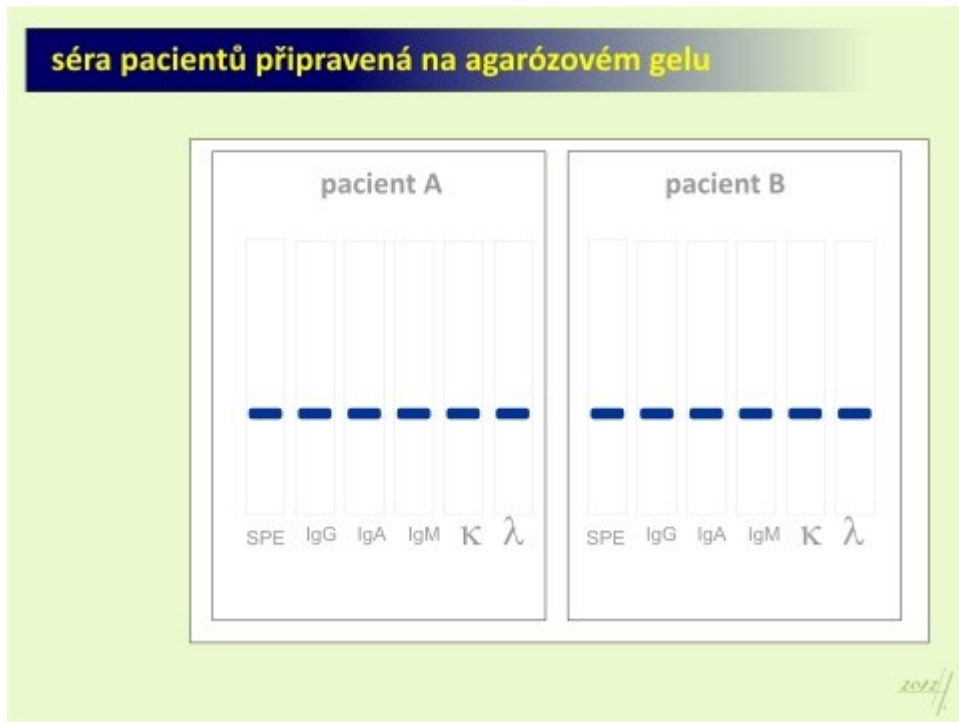


# Imunofixace - zpracování



Na agarózový gel se na pozici start nanesou pomocí šablony séra pacientů (**1 pacient = 6 drah**)  
Šablona = umělohmotný proužek s vyřezanými tvory který se přiloží na vyznačené místo na gelu pro start

# Agarózový gel před elektroforetickým rozdělením



## elektroforetická separace proteinů v alkalickém pH



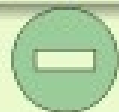
směr  
pohybu



start



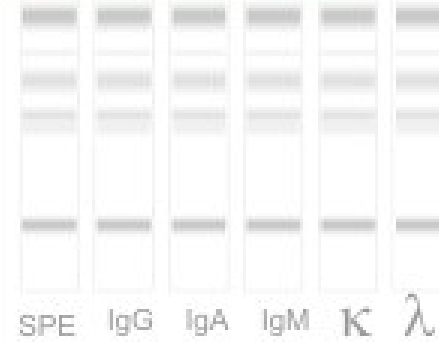
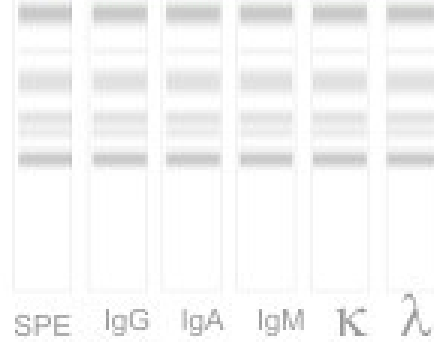
směr  
pohybu



pacient A

pacient B

rychlost pohybu je závislá  
na velikosti molekuly a síle náboje



2012/1

# Agarózový gel po elektroforetickém rozdělení

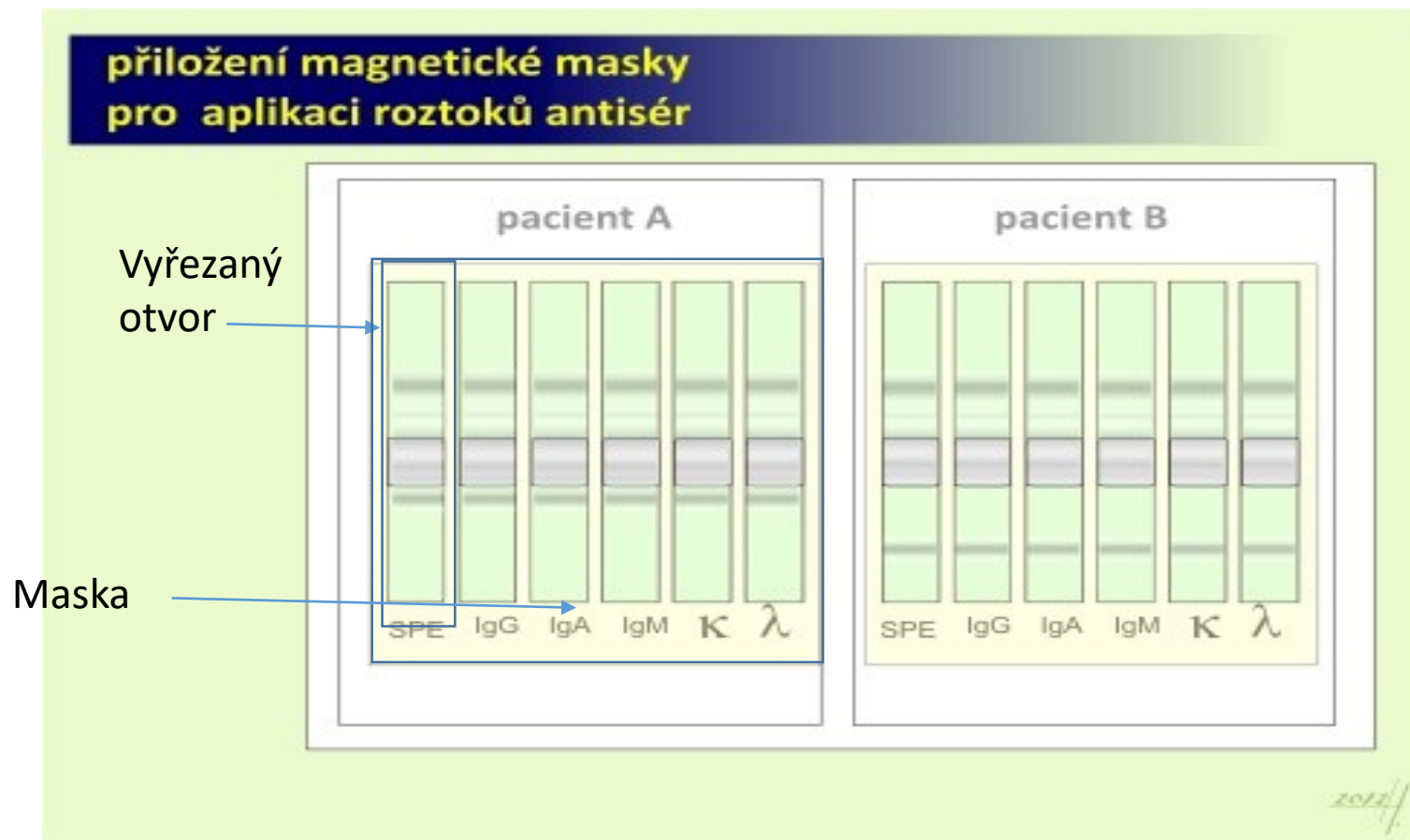
## separované imunoglobulinové molekuly



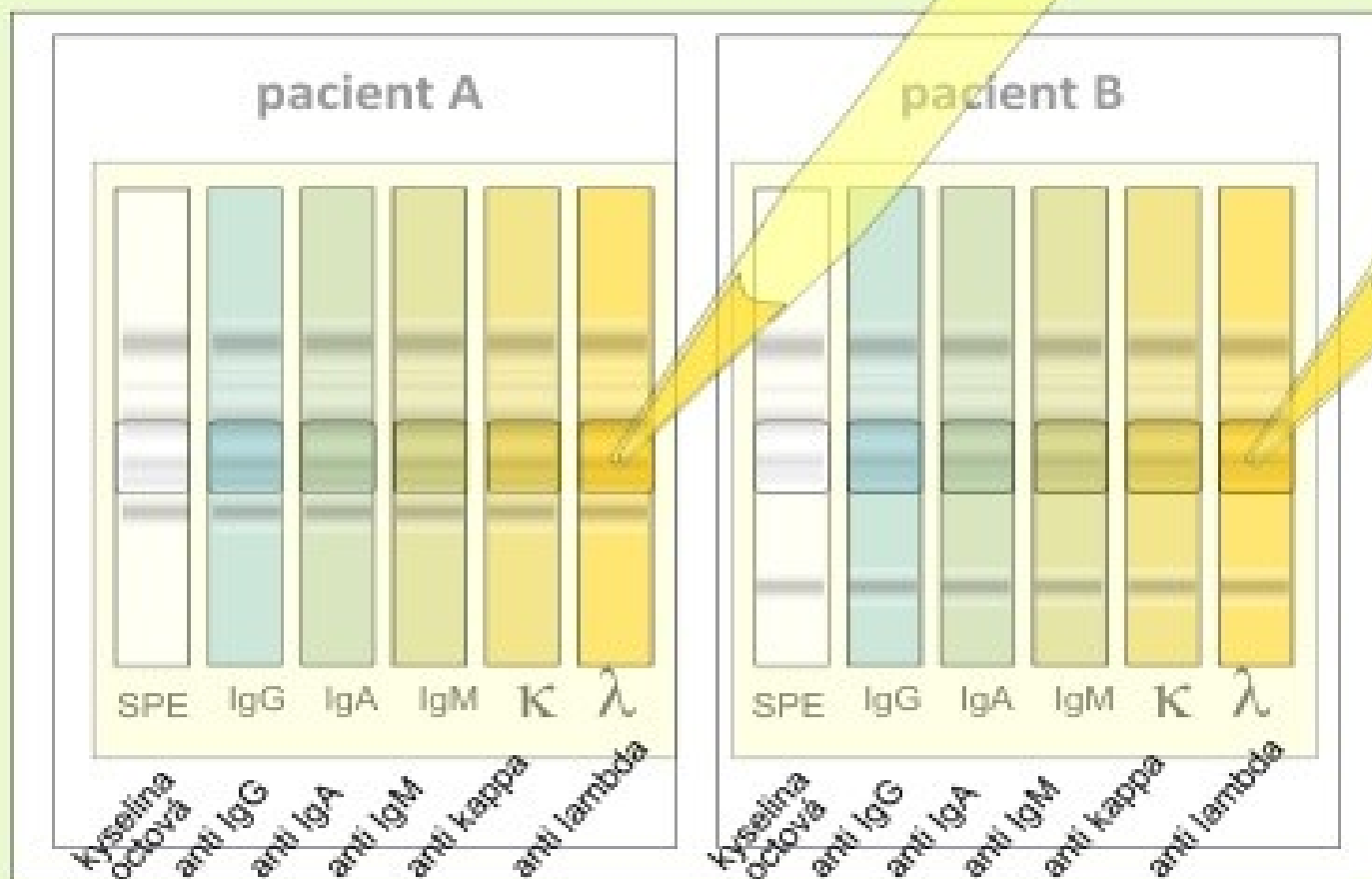
2024/



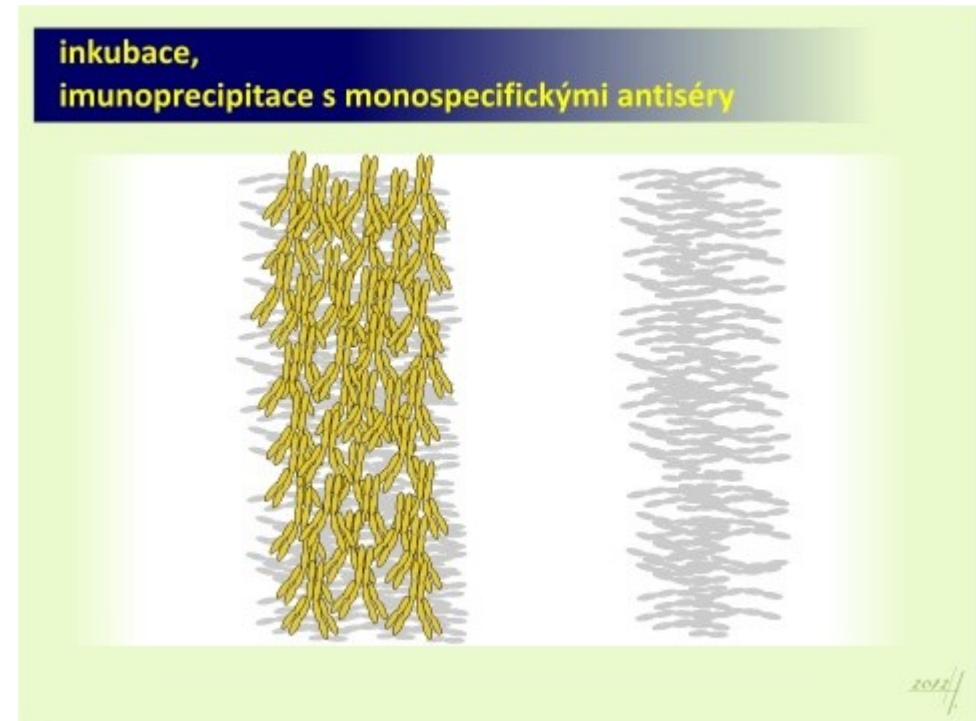
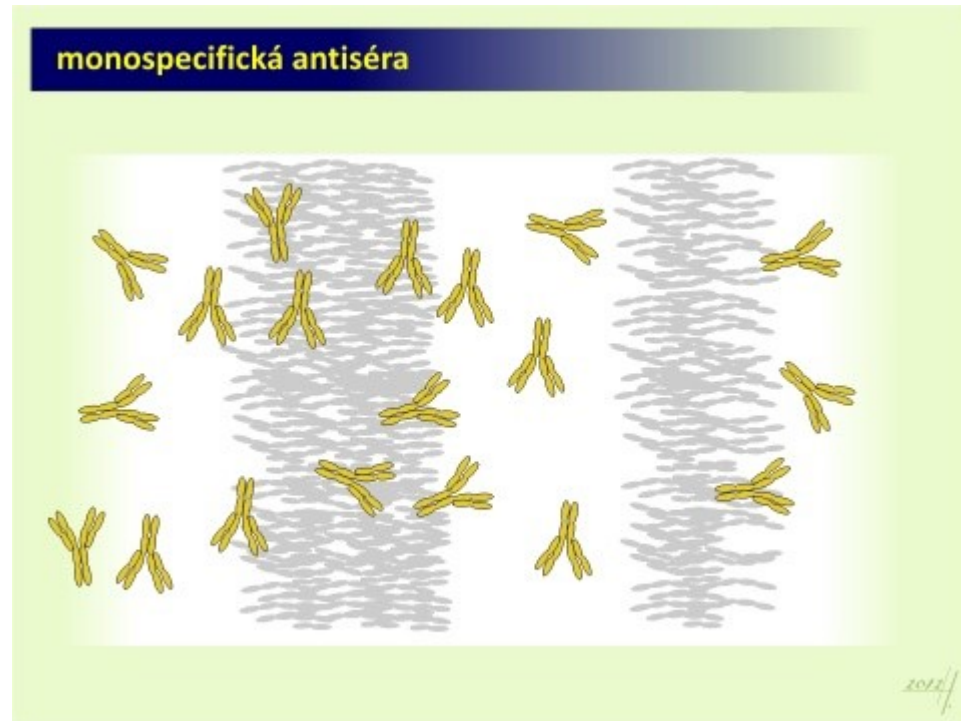
Na agarózový gel se po elektroforetickém rozdělení vzorků séra se přiloží maska  
- umělohmotná fólie s vyřezanými otvory tak, aby se na jednotlivé linie dalo aplikovat příslušné antisérum



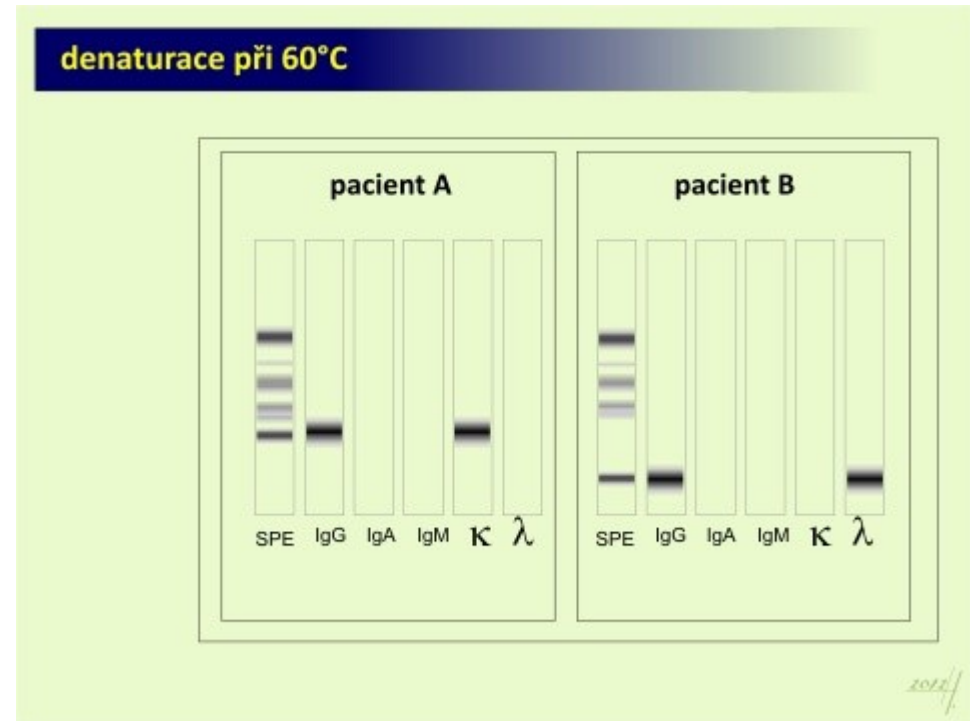
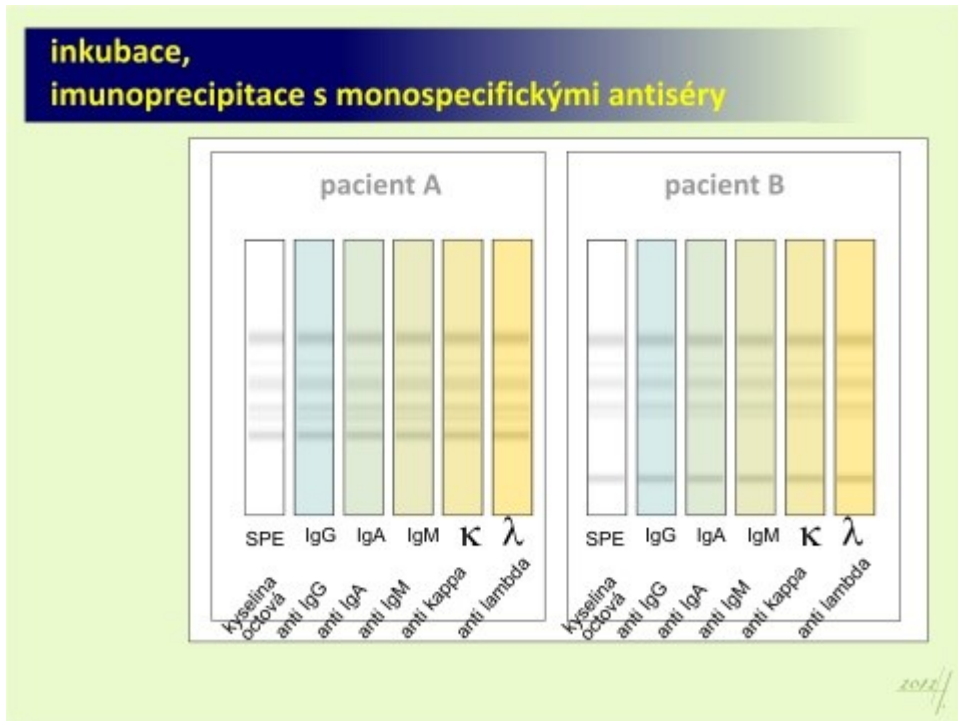
## aplikace monospecifických antisér



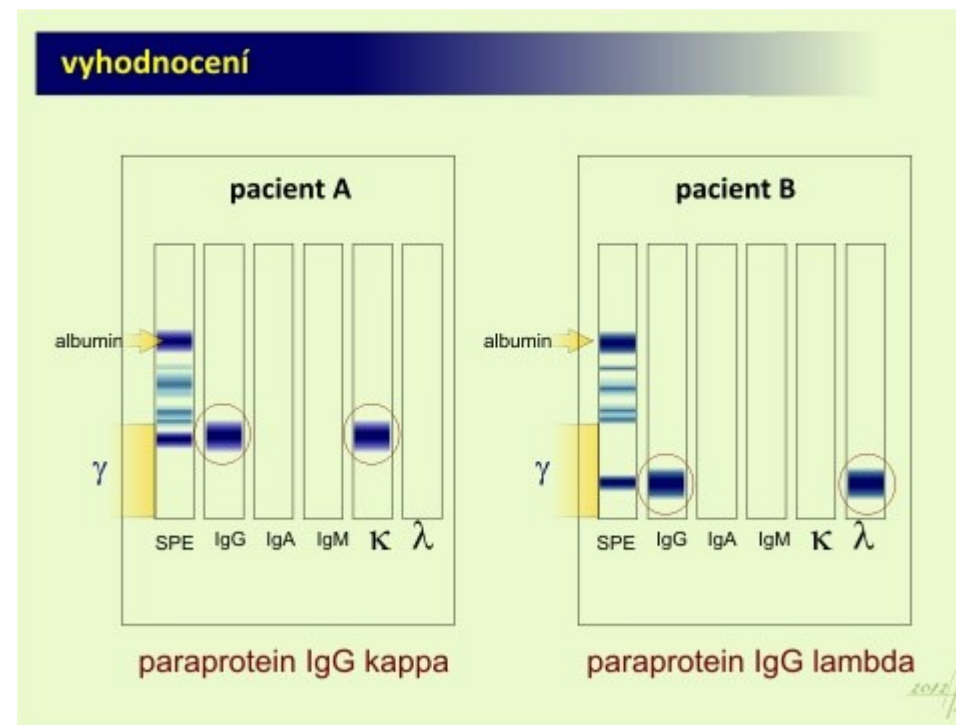
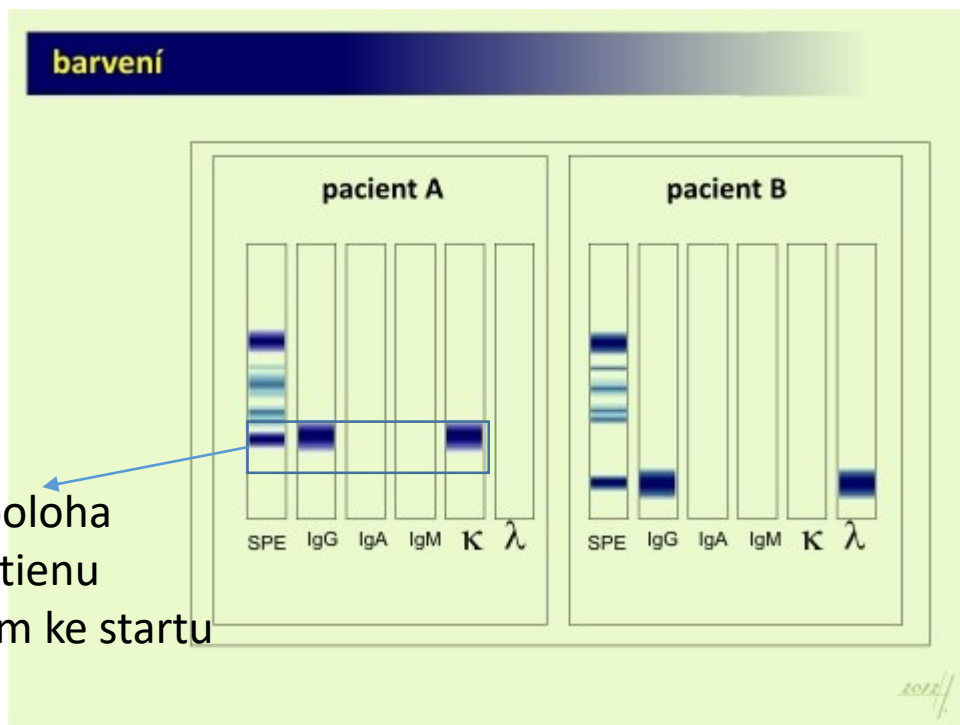
Při inkubaci s monospecifickými antiséry dochází k jejich vazbě na příslušné molekuly imunoglobulinů a dochází k precipitaci



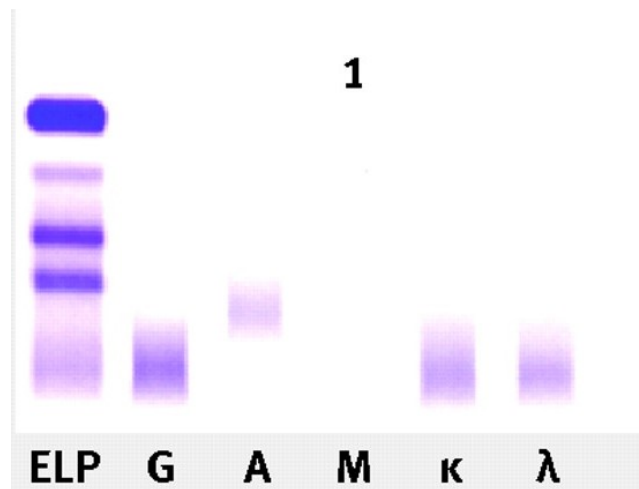
Po uplynutí inkubační doby se celý gel zahřeje na 60°C, čímž dojde k denaturaci vzniklých precipitátů a jejich přilnutí k podkladové membráně gelu.



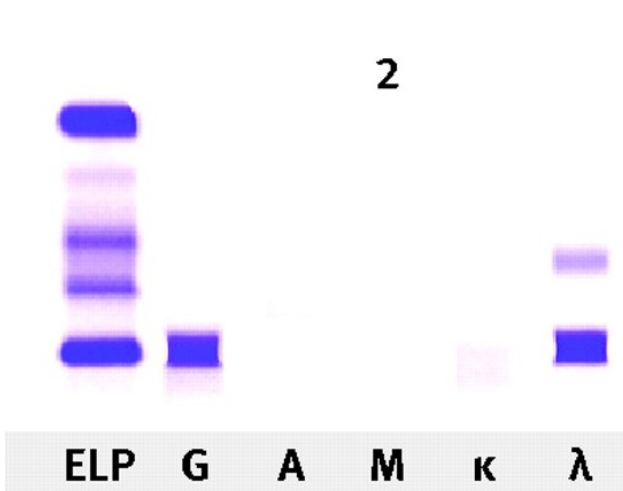
- Pro vyhodnocení se provádí barvení imunofixovaných vzorků a poté jejich vyhodnocení.
- Pokud vyšetřované sérum nebo moč pacienta obsahují zmnožený jeden klon imunoglobulinů nebo jen jejich část –  $\kappa$  nebo  $\lambda$  řetězce - vytvoří se ohraničený proužek tzv. band (paraprotein)
- Při vyhodnocování platí pravidlo, že band –paraprotein- v původním elektroforetickém rozdělení musí mít **ve všech pruzích stejnou polohu ve vzdálenosti od startu.**



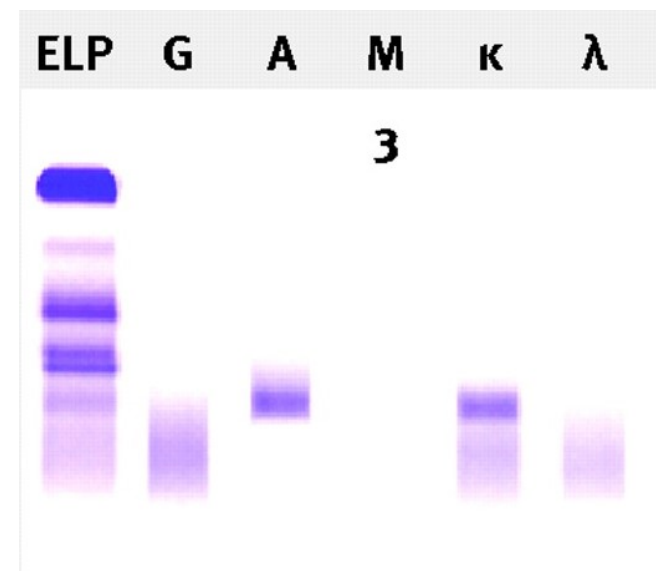
# Imunofixace – odečítání výsledků



Polyklonální Ig – zdravý člověk

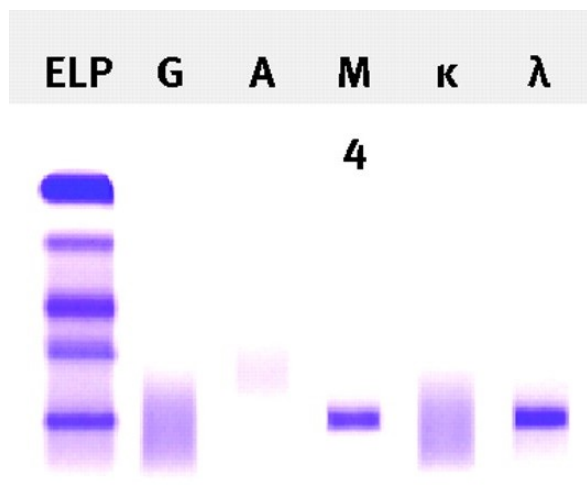


Pacient s paraproteinem IgG λ  
a lehkými řetězci λ

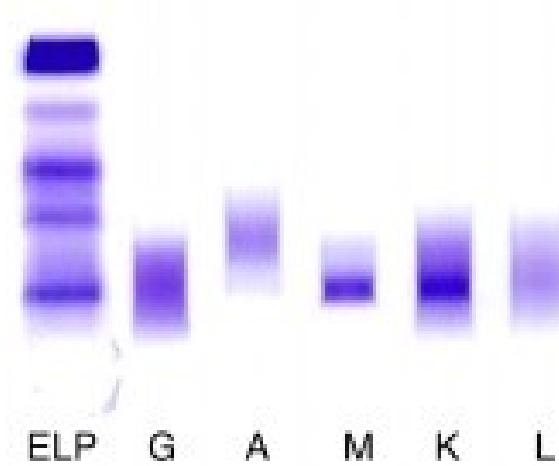


Pacient s paraproteinem IgA κ

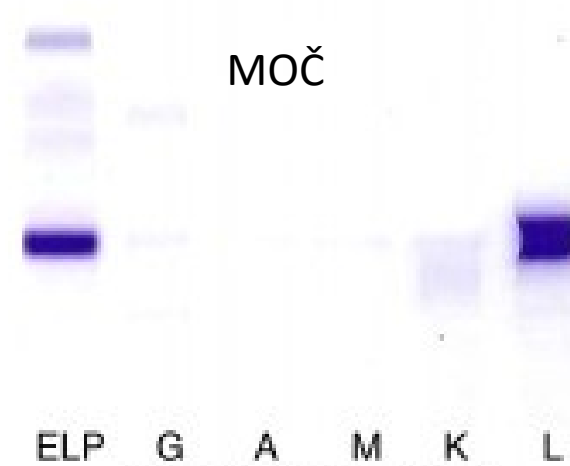
# Imunofixace – odečítání výsledků



Pacient s paraproteinem IgM λ

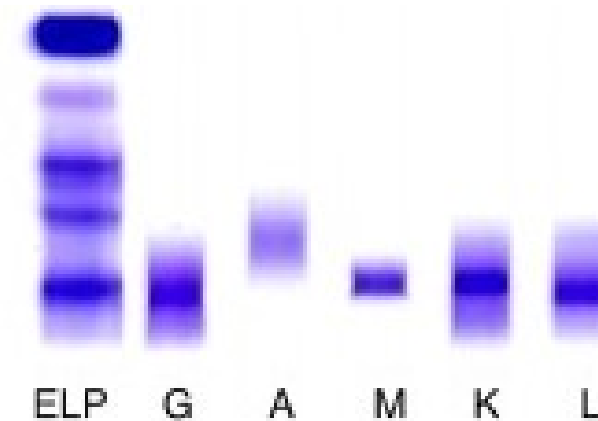


Pacient s paraproteinem IgM κ



Volné lehké řetězce λ

Biklonální gamapatie  
IgG κ + IgM λ



# Modifikace elektroforézy reakcí Ag-Ab – historické metody

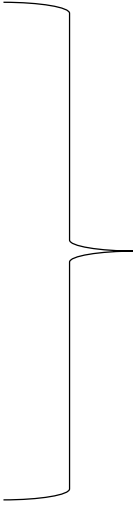
- Zvýšenou (i sniženou) koncentraci gamaglobulinů je nutno vždy dále došetřit

- **Metody kvalitativní**

- Imunoelektroforéza (dle Graba a Williamse)
- Protisměrná elektroforéza

- **Metody kvantitativní**

- Raketková imunoelektroforéza (dle Laurella)
- Dvourozměrná elektroforéza



Tyto metody jsou v dnešní době zastaralé a využívají se pouze výzkumně (pocházejí z dob, kdy nebyl znám proces výroby monoklonálních protilátek a používala se tedy pouze polyklonální směsná antiséra)

Pozn. Pro účely zkoušky je třeba důkladně znát **klasickou elektroforézu, imunofixaci a imunoblot**, ostatní metody jsou rozšířením znalostí.



# Imunoelektroforéza

- 2 fáze:
  - 1) Rozdělení proteinů klasickou ELFO
  - 2) Aplikace polyspecifického antiséra do podélně vykrojeného žlábků v gelu → difuze do gelu
- V místě ekvivalentní koncentrace obou složek se vytvoří obloukovitá precipitační linie

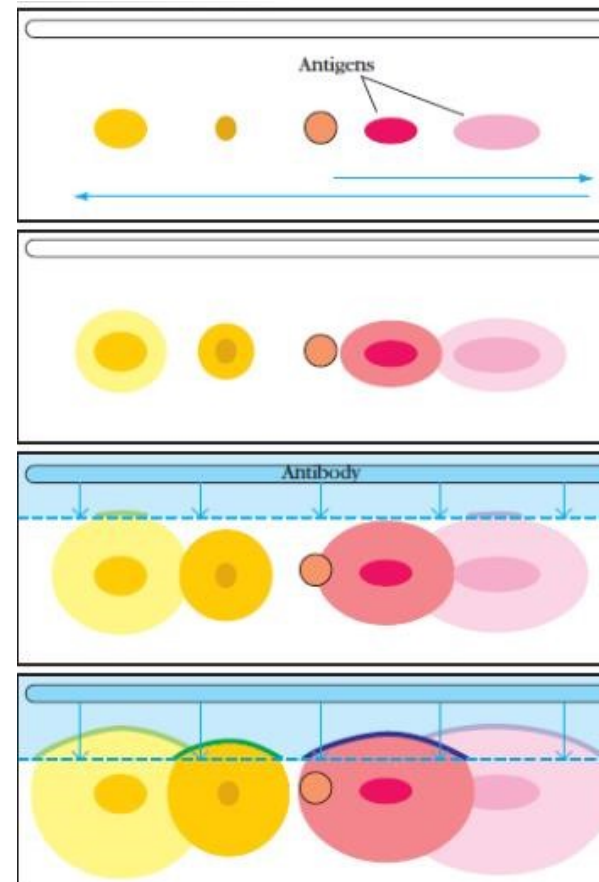


Figure:  
Immunoelectrophoresis of an antigen mixture.

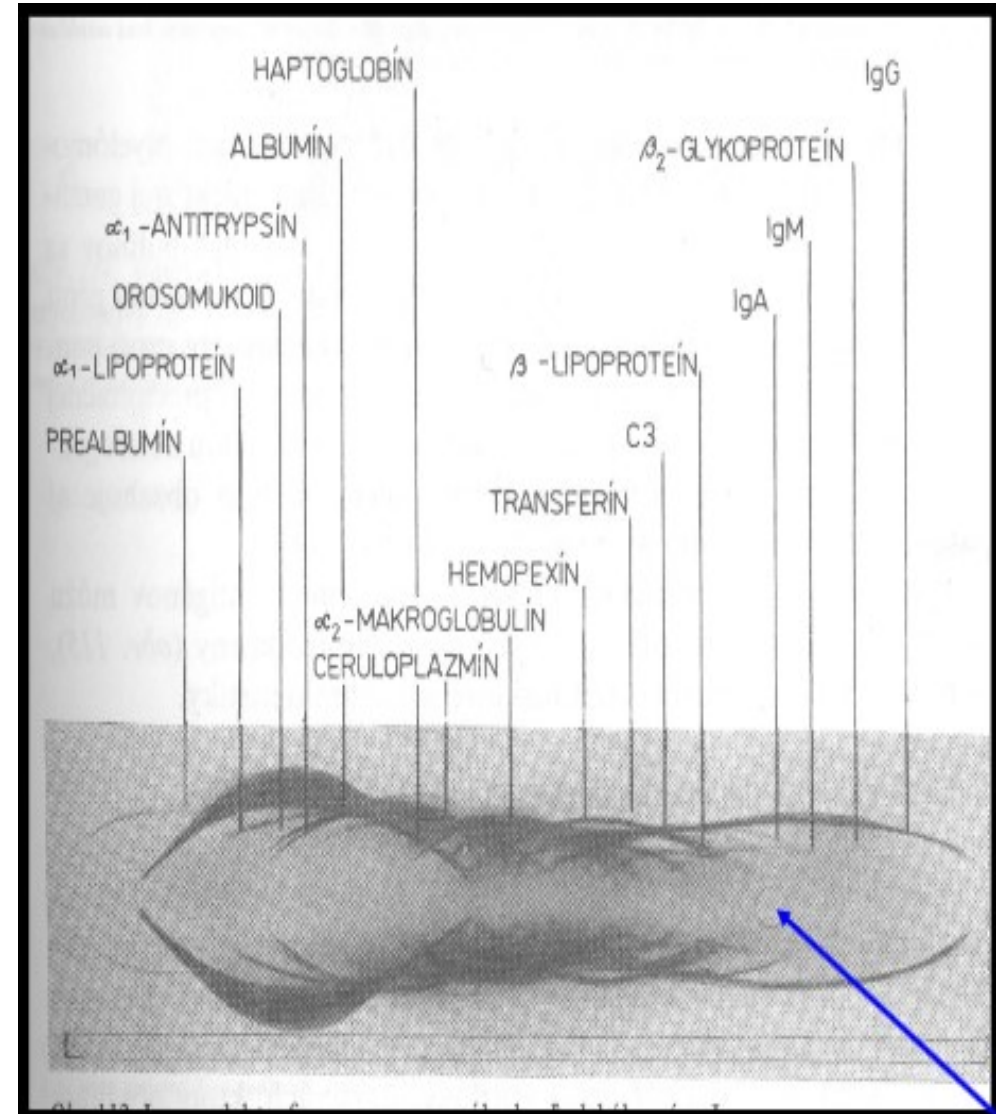
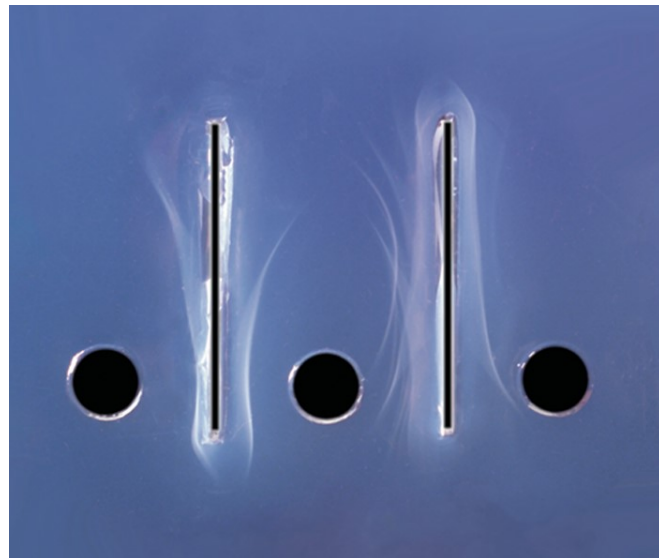
-An antigen preparation (orange) is first electrophoresed, which separates the component antigens on the basis of charge.

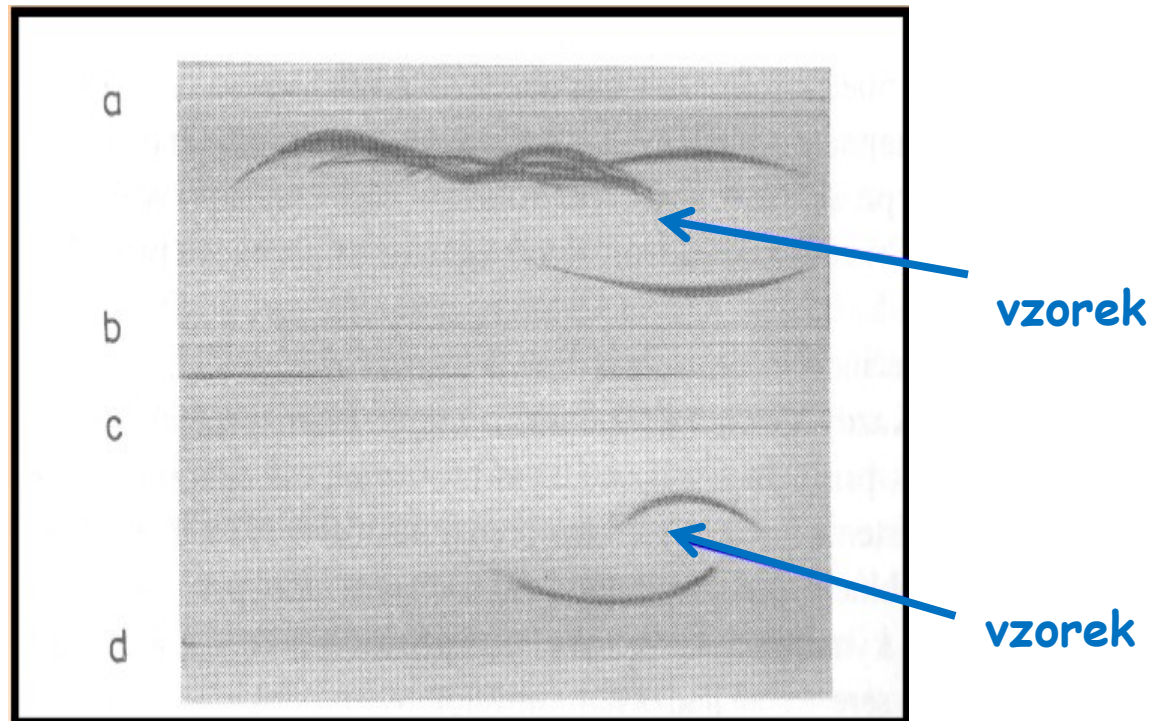
-Antiserum (blue) is then added to troughs on one or both sides of the separated antigens and allowed to diffuse.

-In time, lines of precipitation (colored arcs) form where specific antibody and antigen interact.

# Imunoelektroforeogram normálního lidského séra

- Použito **polyspecifické antisérum** → až 35 precipitačních obloučků (každý oblouček = 1 protein)
- Obloučky mají charakteristický tvar a umístění na imunoelektroforeogramu





Nevýhody:

- Okometrické odečítání
- Výsledky pouze kvalitativní
- Nutná zkušenost odečítajícího – různé monografie, atlasy

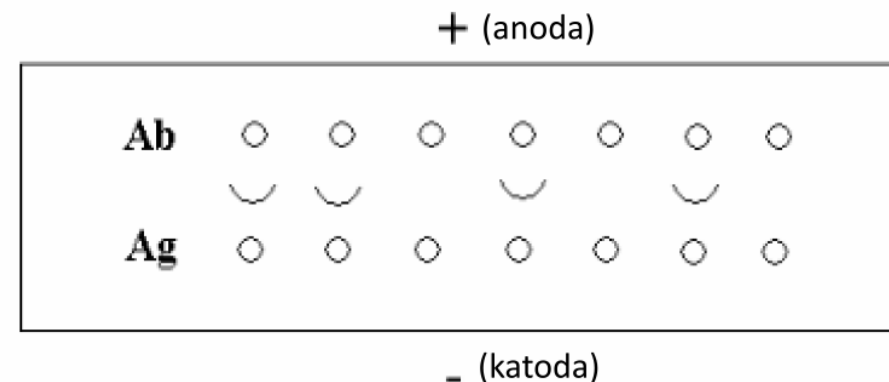
### Imunoelektroforegram normálního lidského séra:

žlábek a  
žlábek b  
žlábek c  
žlábek d

polyspecifické antisérum proti lidským sérovým proteinům  
**monospecifické** antisérum anti - IgG  
monospecifické antisérum anti - IgM  
monospecifické antisérum anti - IgA

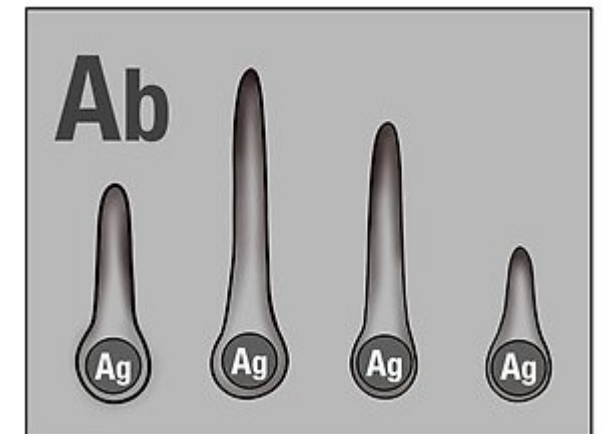
# Protisměrná elektroforéza

- Imunodifuze urychlená el. polem (výsledek za 30 min)
- Využívá opačných pohybů Ag a Ab v el. poli
- 2 jamky
  - Jedna blíže anodě – pipetujeme protilátku
  - Druhá blíže katodě – pipetujeme antigen
- V el. poli se bude antigen pohybovat k anodě a protilátka ke katodě → v místě ekvivalentní koncentrace obou složek se tvoří precipitát
- Kvalitativní průkaz antigenů s anodickou pohyblivostí

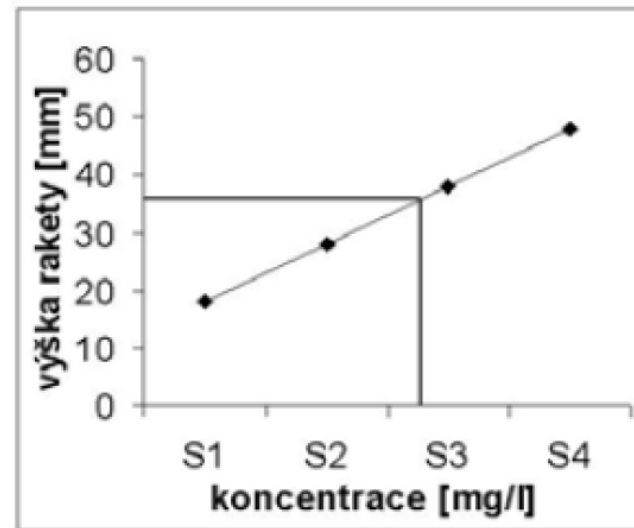
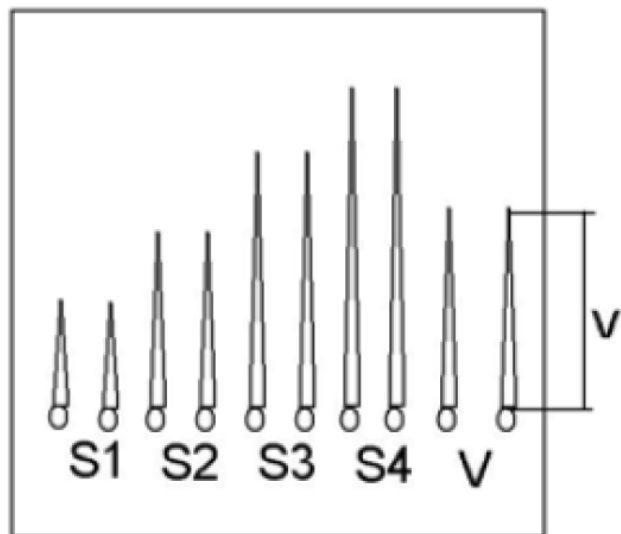


# Raketková imunoelektroforéza

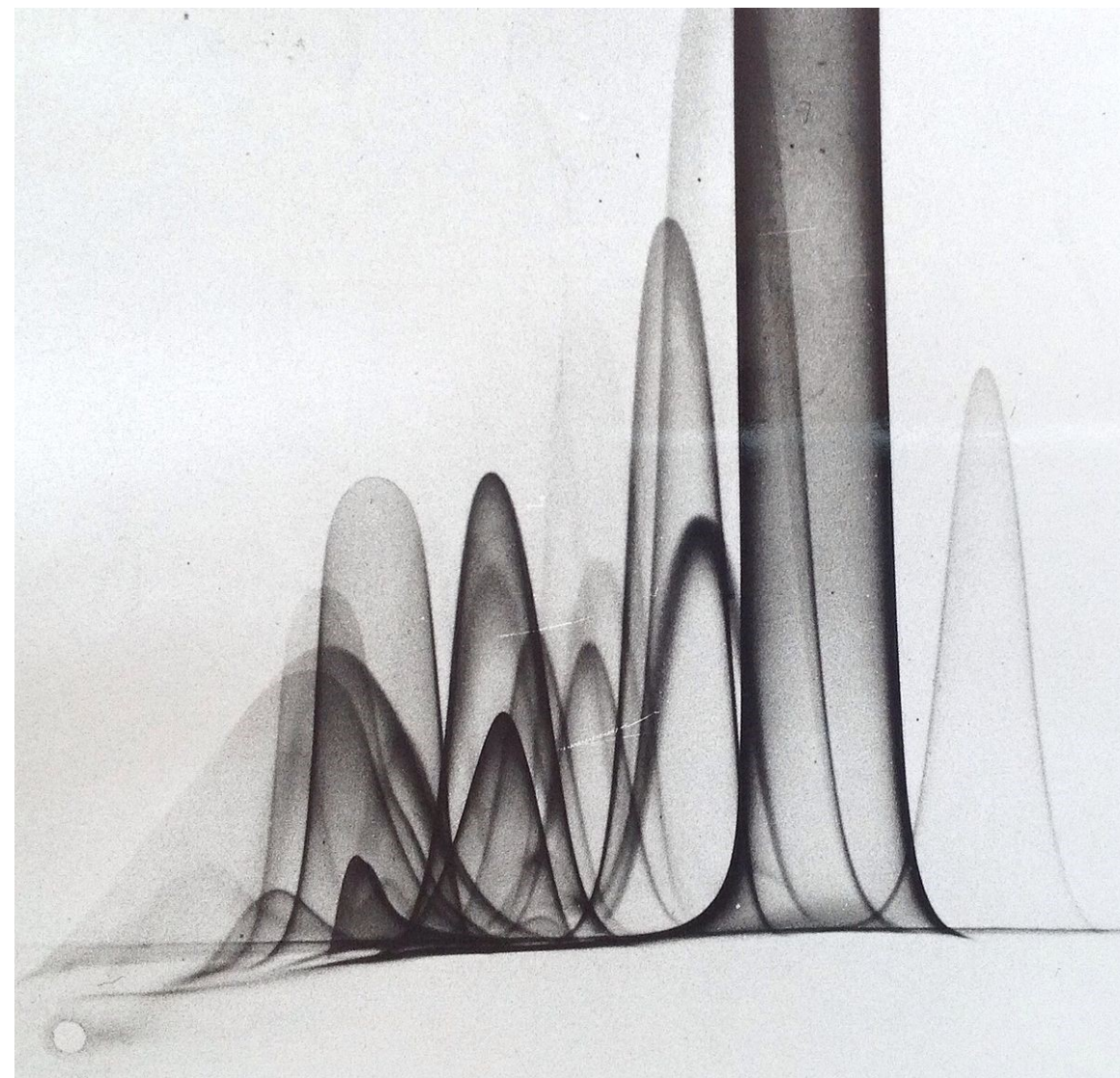
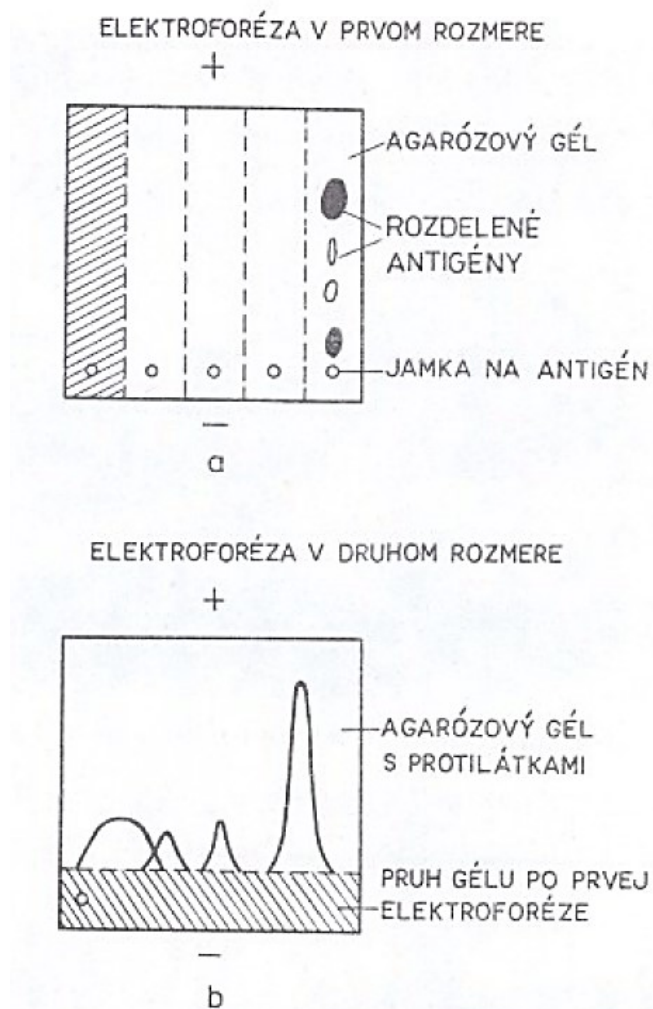
- Umožňuje kvantitativní hodnocení, citlivost od 0,1 mg/l
- Imunodifuze probíhající v el.poli
- Rozdíl od předchozí metody – protilátka (antisérum) se přimíchá do agarózového gelu
- Migrace proteinů – střetávají se s molekulami protilátky v gelu – v místě ekvivalentní koncentrace obou složek se tvoří precipitát
- Díky pohybu proteinů získává tvar píku – „raketky“



# Raketková imunoelektroforéza



# Dvourozměrná (2D) elektroforéza



# Dvourozměrná (2D) elektroforéza

- Kombinace elektroforézy s raketkovou imunoelektroforézou
- Krok 1: klasická elektroforéza séra
- Krok 2: Po ELFO slouží gel s rozdělenými proteiny jako start elektroimunodifuze – gel se otočí kolmo a k němu se doplní nový gel (obsahující polyvalentní antisérum) → elektroimunodifuze probíhá ve směru kolmém na gel se separovanými proteiny
- Vznik píků, jejichž plocha / výška je úměrná koncentraci daného proteinu
- Poloha píku charakterizuje druh antigenu
- Lidské sérum – touto metodou lze stanovit až 50 různých proteinů