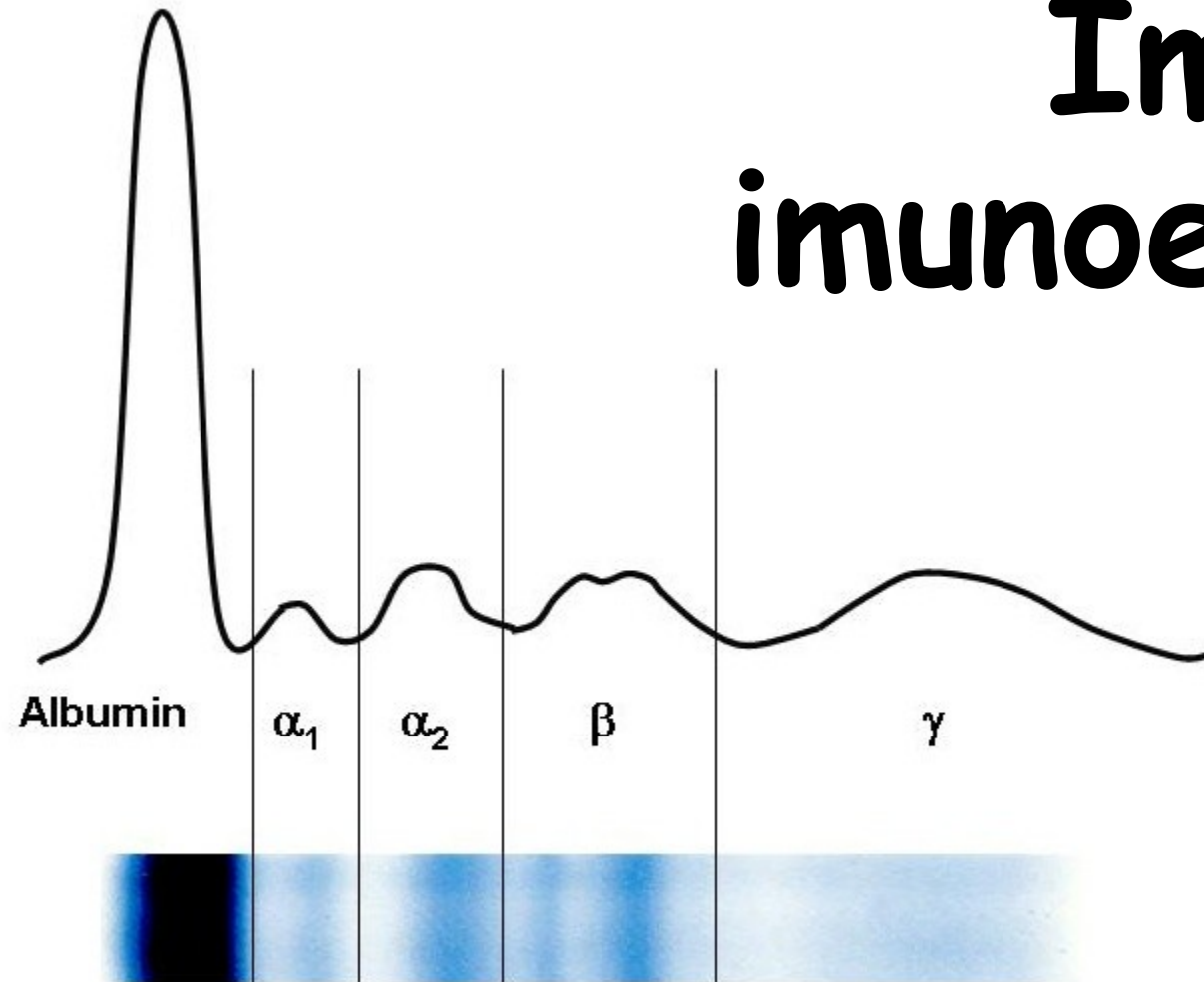
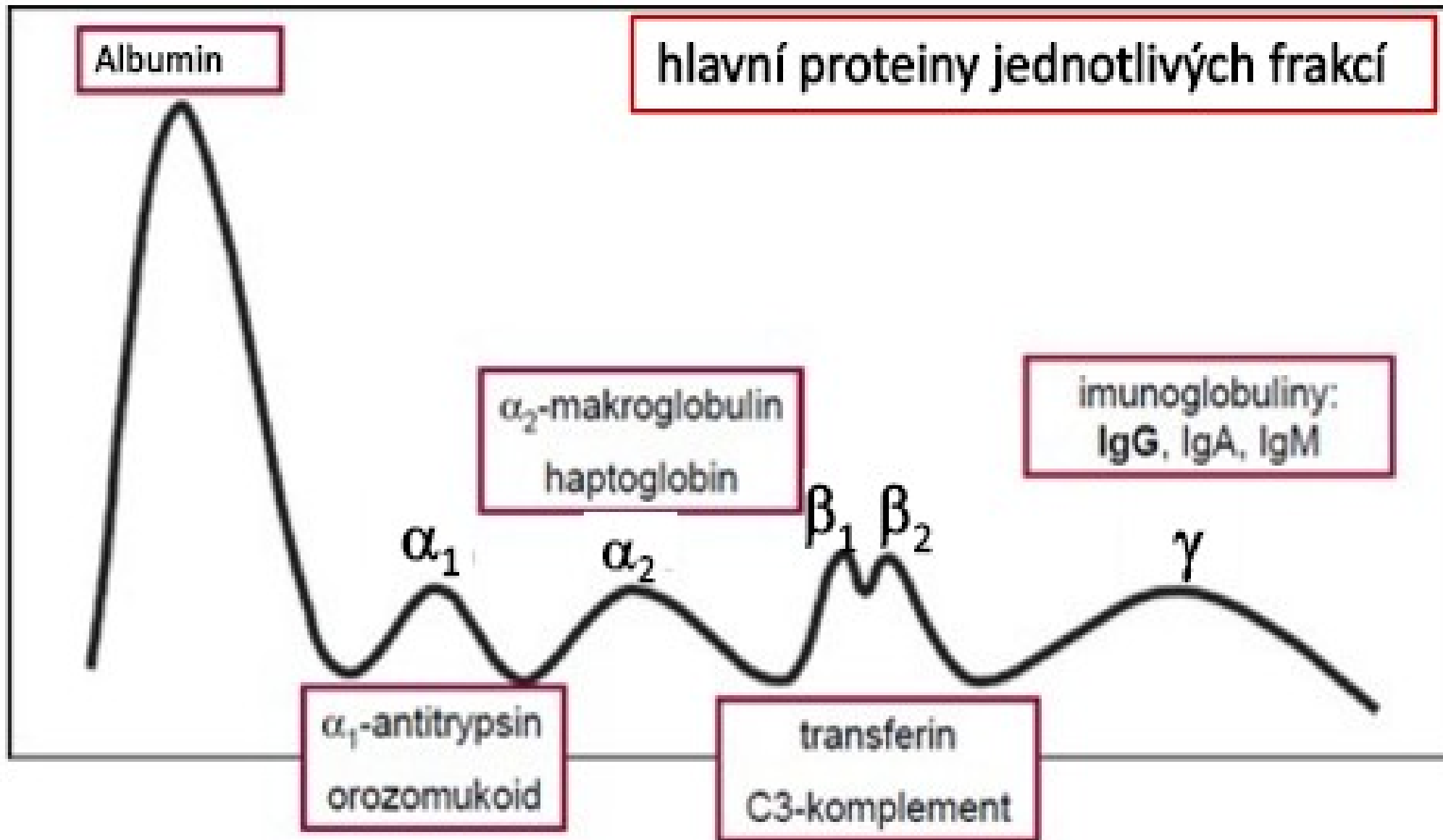


Imunoblot, imunoelektroforéza





Zóna α_1 -globulinů

- hlavním proteinem - α_1 -antitrypsin
- zřetelné zesílení - při akutních zánětech

Zóna α_2 -globulinů

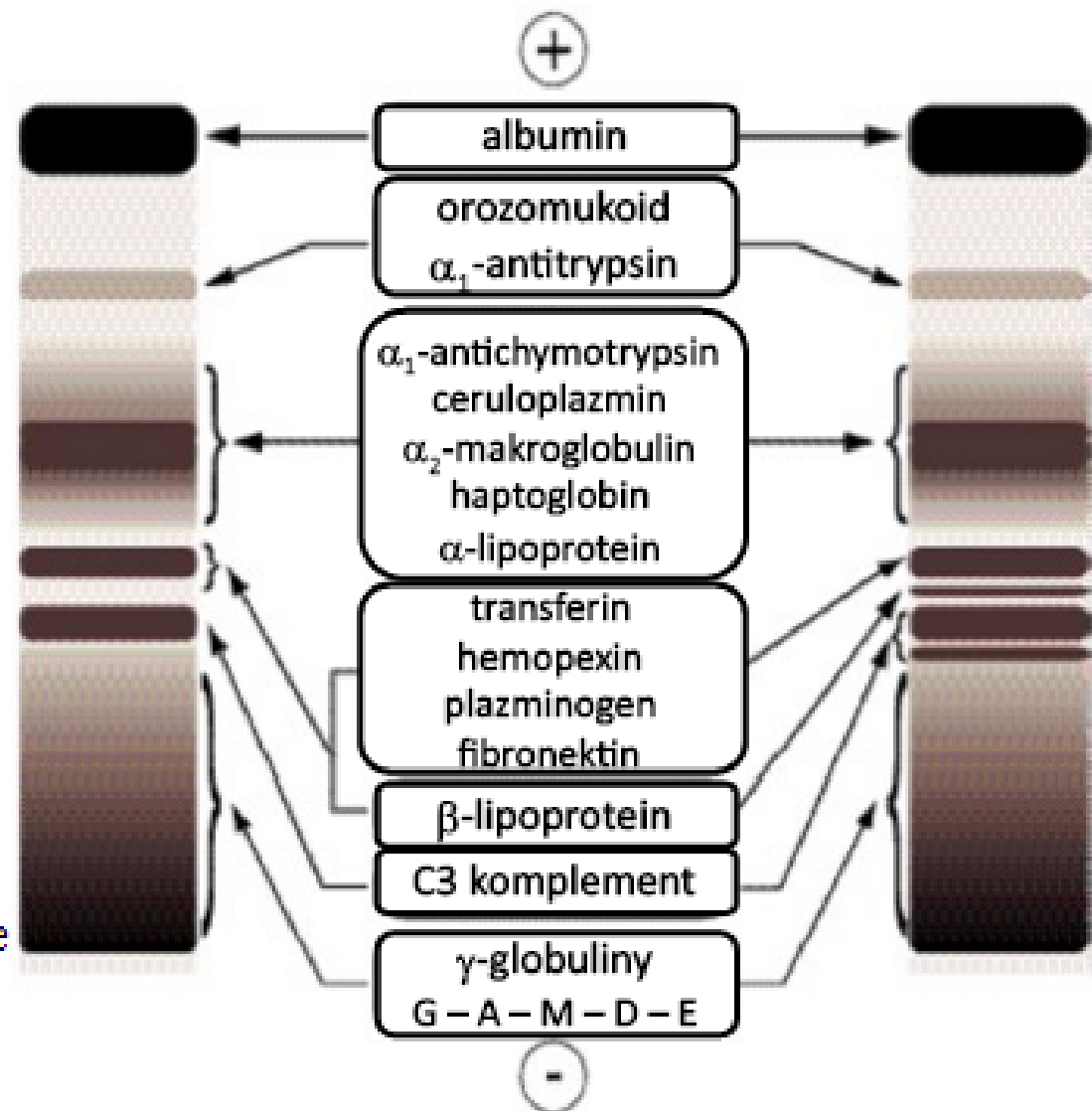
Haptoglobin - 6 fenotypů - liší se elfo pohyblivostí. !!ALE: elfo stanovení neumožňuje rozlišení fenotypů haptoglobinu

Zóna β_1 -globulinů

- hlavním proteinem – transferin
- intenzita zóny dobře koreluje s celkovou vazebnou kapacitou plazmy pro železo. Při anemii z nedostatku železa a v těhotenství se zvyšuje syntéza transferinu a intenzita zóny se zesílí.

Zóna β_2 -globulinů

- hlavním proteinem - C3 složka komplementu

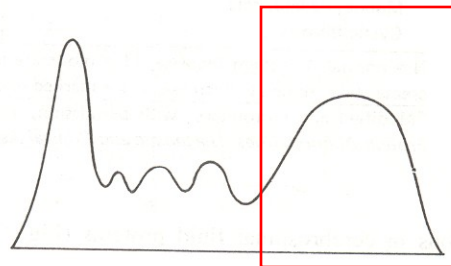


Elfo frakce plazmatických proteinů

<i>Frakce</i>	<i>Zastoupení (%)</i>	<i>c (g/l)</i>
Albuminy : albumin prealbumin (transthyretin)	52 – 58	34 – 50
α_1-globuliny : globulin vázající thyroxin, transkortin, α_1 -kyselý glykoprotein, α_1 -antitrypsin, α_1 -lipoprotein (HDL), α_1 -fetoprotein	2,4 – 4,4	2-4
α_2-globuliny : haptoglobin, makroglobulin, ceruloplasmin	6,1 – 10,1	5 – 9
β-globuliny : transferin, hemopexin, lipoprotein LDL, fibrinogen, C-reaktivní protein, C3 a C4 složka komplementu	8,5 – 14,5	6 – 11
γ-globuliny : IgG, IgM, IgA, IgD, IgE	10 – 21	8 – 15

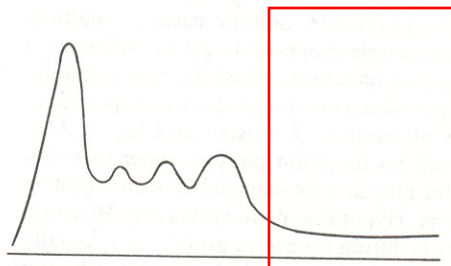
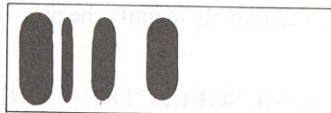
Použití zónové elektroforézy v klinické praxi

Polyclonal hypergammaglobulinemia



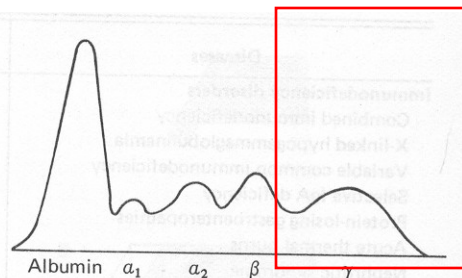
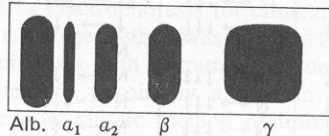
Hypergammaglobulinemie

Hypogammaglobulinemia



Hypogammaglobulinemie

Normal serum



Normální sérum

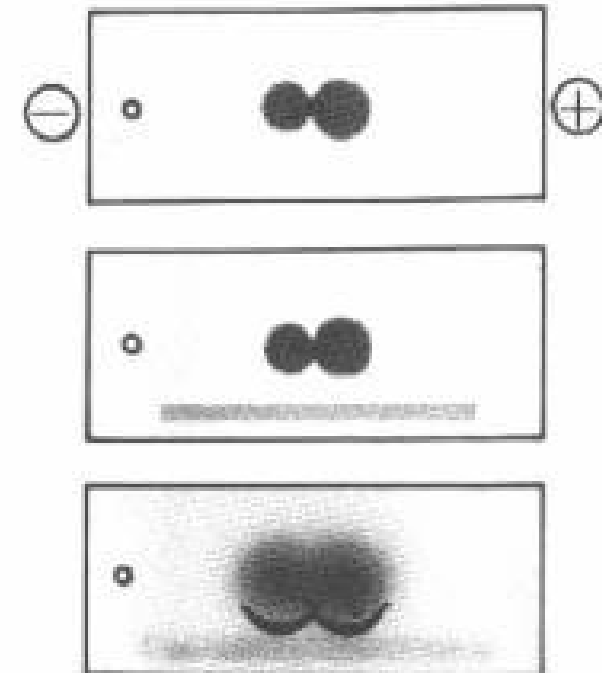
Imunoelektroforéza

- A. Kvalitativní imunoelektroforetické metody
 - 1. Imunoelektroforéza
 - 2. Protisměrná elektroforéza

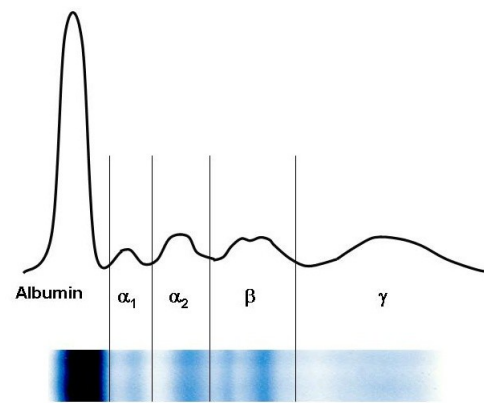
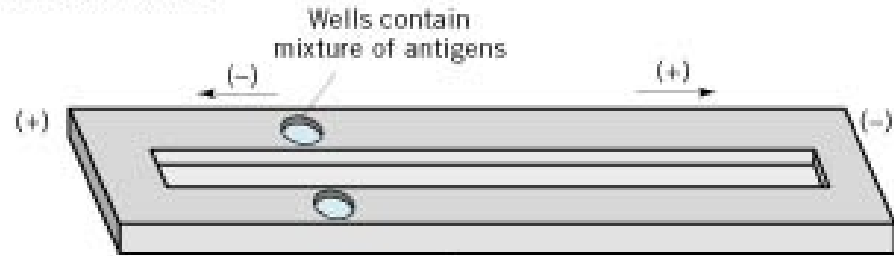
- B. Kvantitativní imunoelektroforetické metody
 - 1. Elektroimunodifuze podle Laurella (raketková)
 - 2. Dvourozměrná imunoelektroforéza

Imunoelektroforéza (podle Grabara a Williamse)

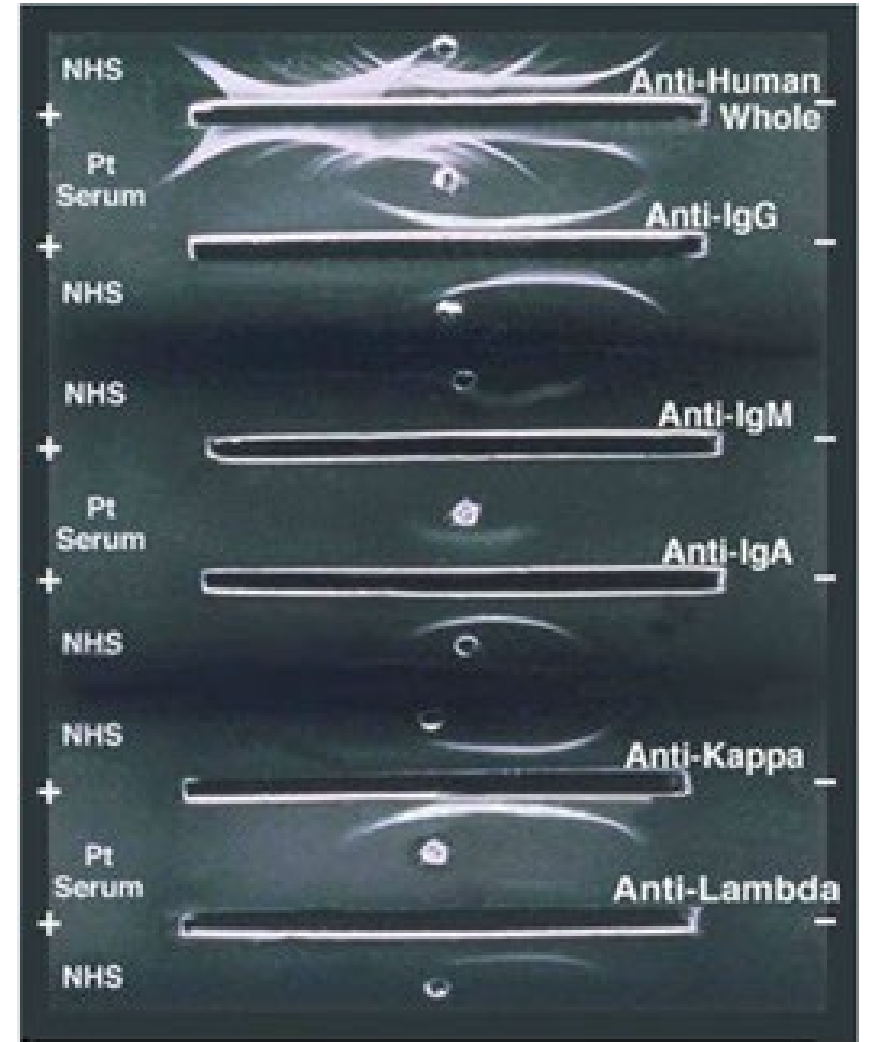
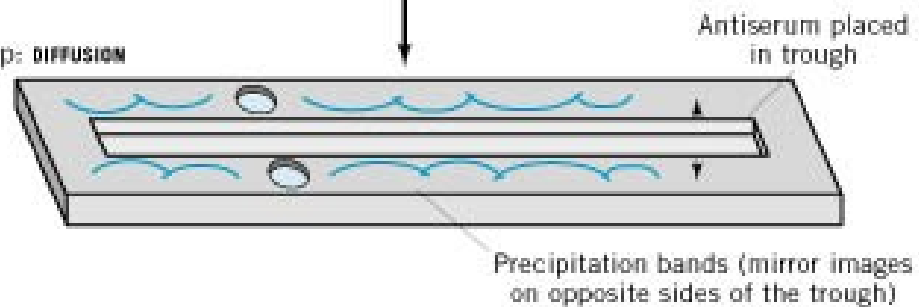
- imunoelektroforéza je kombinací elektroforetického dělení s imunodifuzním
- rozdělení sledované látky (sérum) elektroforézou na gelu (působením stejnosměrného proudu), po ukončení se gel nesuší ani nebarví, ale následuje druhá fáze
- vedle rozdělených složek se do gelové vrstvy vykrojí úzký žlábek, do něj se pipetuje protilátka (polyvalentní anti sérum), následuje inkubace
- mezi antigenem jednotlivých složek a protilátkou se vytvoří precipitační linie, které se zvýrazní obarvením
- zjišťování některých gamapatií
- poruchy v biosyntéze imunoglobulinů



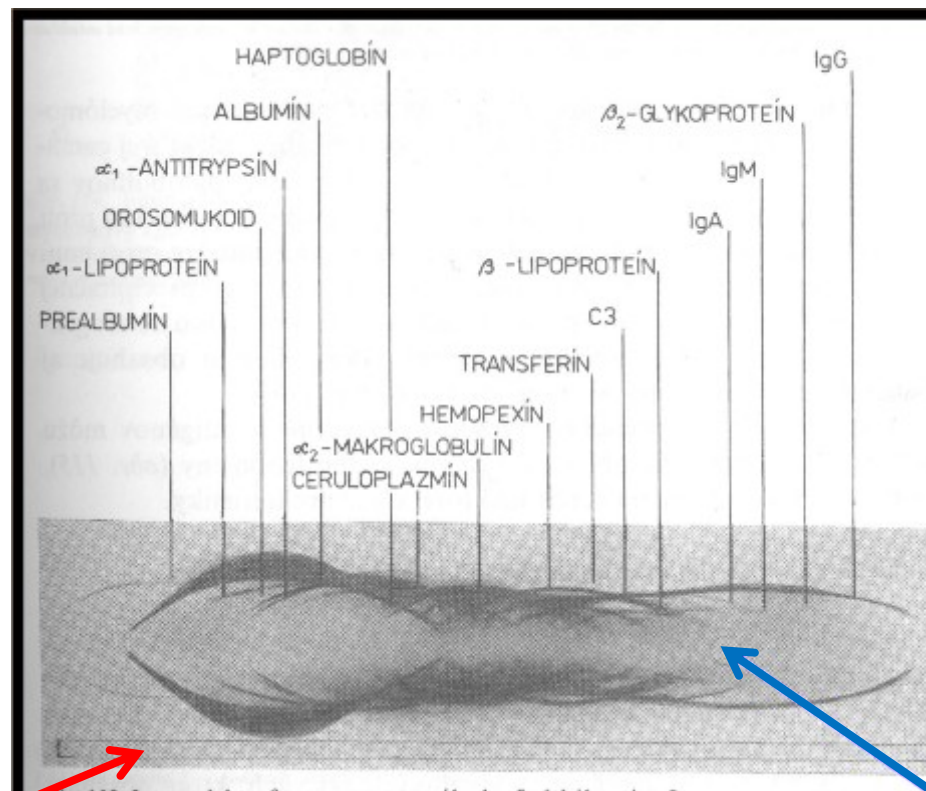
First step: **ELECTROPHORESIS**



Second step: **DIFFUSION**



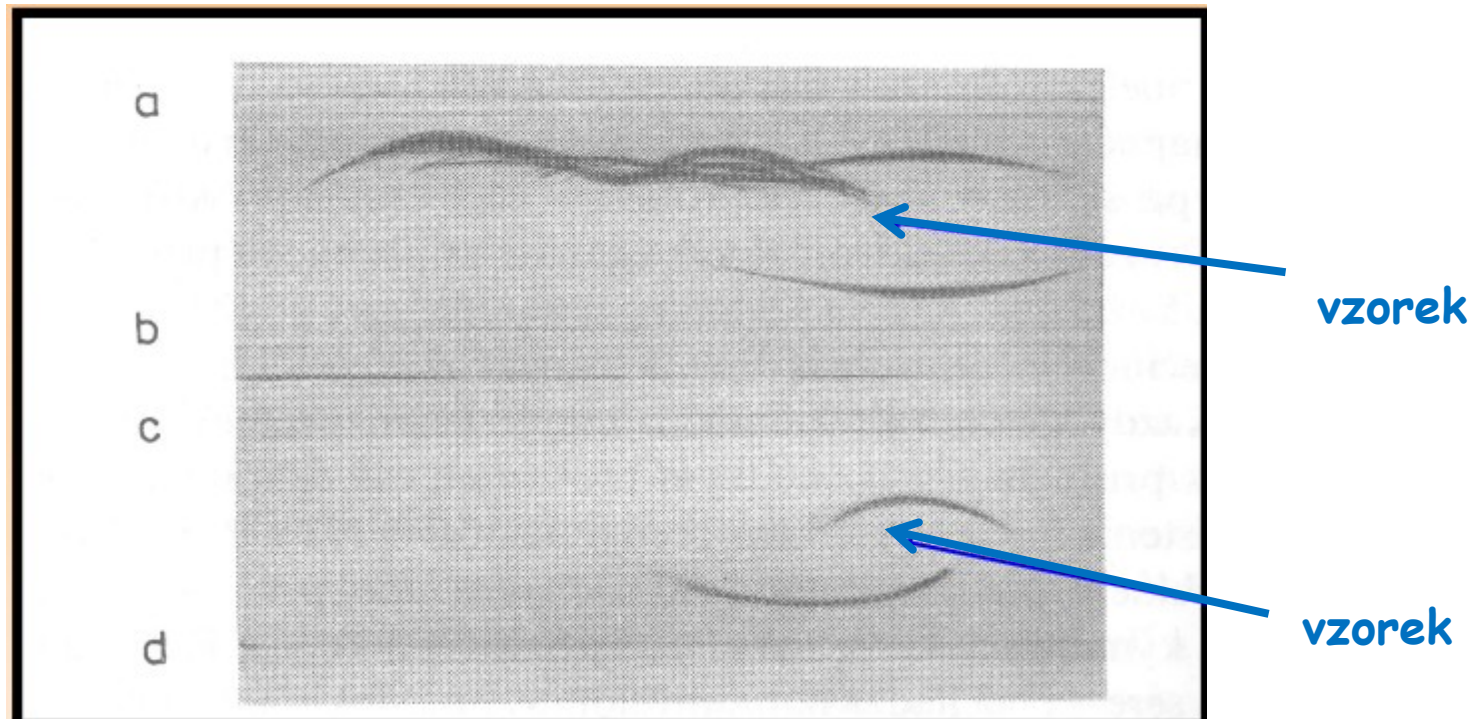
Imunoelektroforegram normálního lidského séra



při použití polyspecifického antiséra až 35 precipitačních obloučků (každý oblouček = 1 protein), které mají charakteristický tvar a umístění na imunoelektroforegramu

Králičí antisérum proti lidským sérovým proteinům

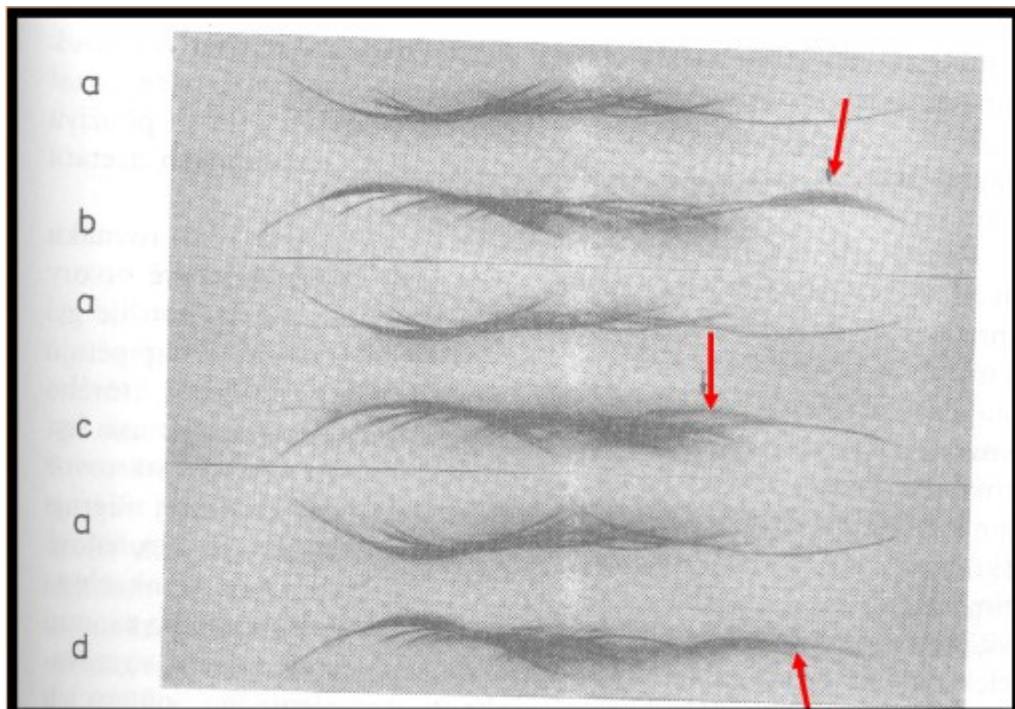
vzorek



Imunoelektroforegram normálního lidského séra:

žlábek a
 žlábek b
 žlábek c
 žlábek d

polyspecifické antisérum proti lidským sérovým proteinům
 monospecifické antisérum proti IgG
 antisérum proti IgM
 antisérum proti IgA



Imunoelektroforegramy normálních lidských sér (a)

a sér obsahujících myelómový IgG (b),

myelómový IgA (c)

Waldenströmův makroglobulin IgM (d)

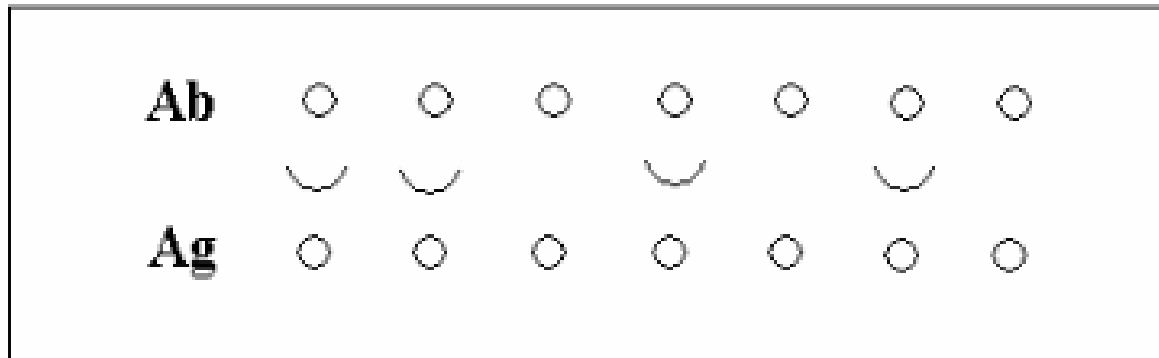
Ve žlábcích je polyspecifické antisérum proti lidským sérovým proteinům. Monoklonové (patologické) imunoglobuliny jsou vyznačeny šipkou.

Protisměrná imunoelektroforéza

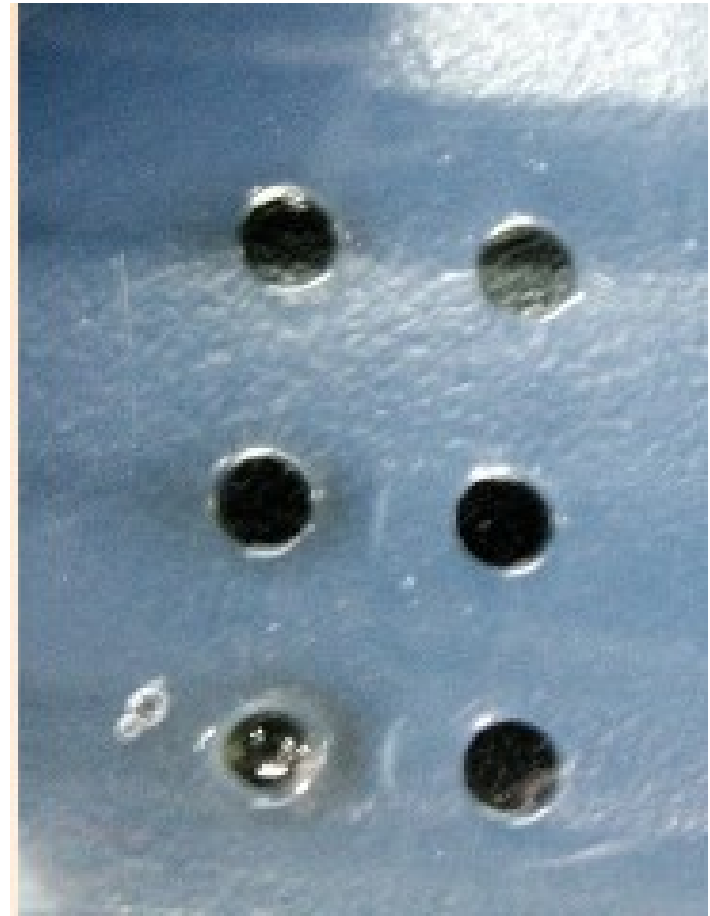
- protisměrná elektroforéza využívá opačný pohyb antigenu a protilátky v elektrickém poli. Je to imunodifuze za pomoci elektrického proudu, čímž se imunodifuzní reakce značně zrychlí
- je obměnou jednorozměrné dvojité difuze. Pohyb molekul antigenu a protilátek je však urychlován stejnosměrným elektrickým polem, takže výsledek můžeme odečítat obyčejně už za 30 minut.
- antigen a protilátka se umístí do dvou proti sobě položených startovacích jamek v gelu tak, aby protilátka byla blíže k anodě a antigen ke katodě
- v elektrickém poli se antigen pohybuje k anodě a protilátka naopak ke katodě, v místě jejich setkání se vytvoří precipitační linie, které se zvýrazňují barvením



+ (anoda)



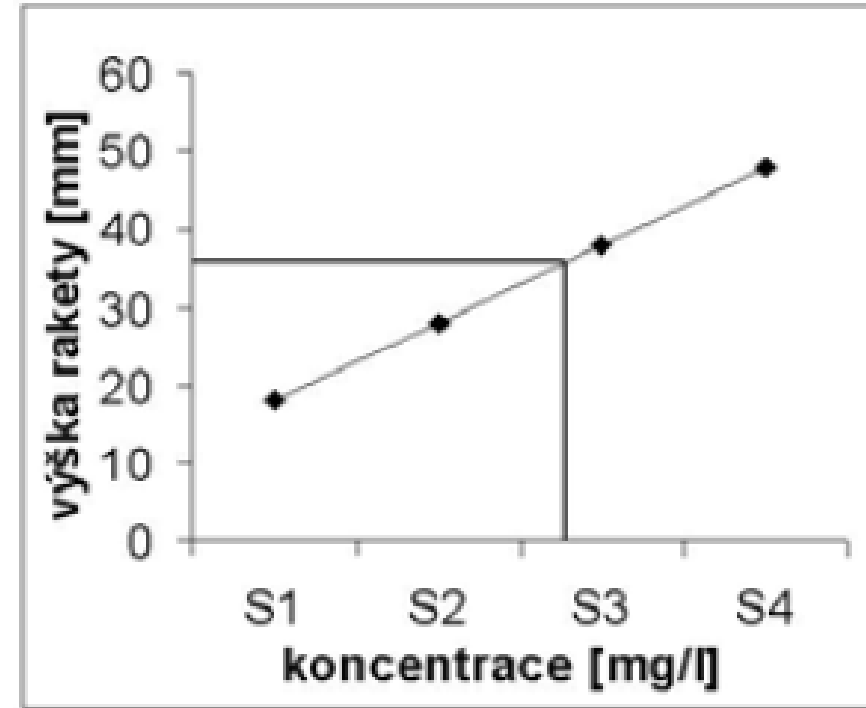
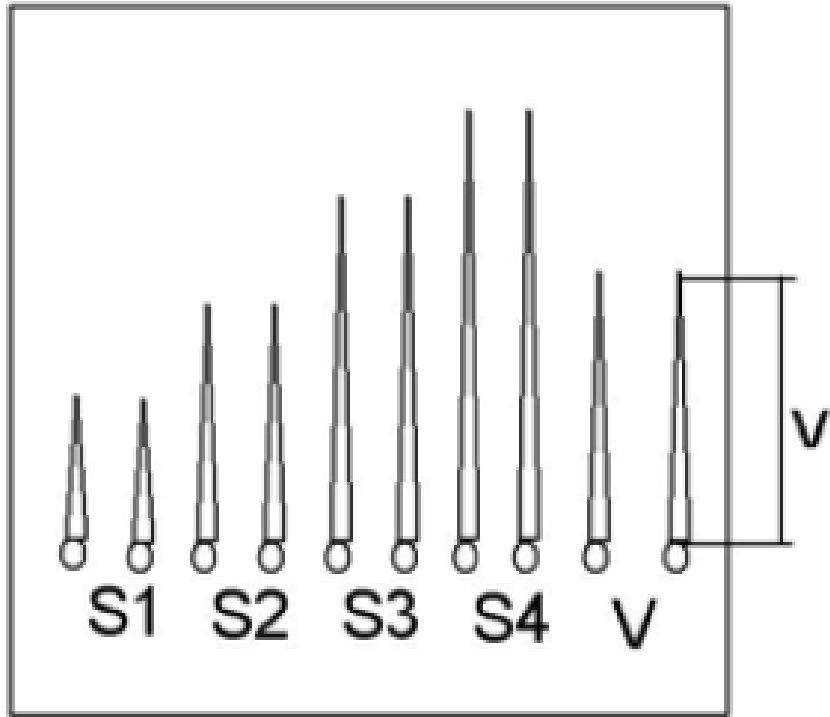
- (katoda)



Kvalitativní důkaz antigenu, které mají anodickou pohyblivost

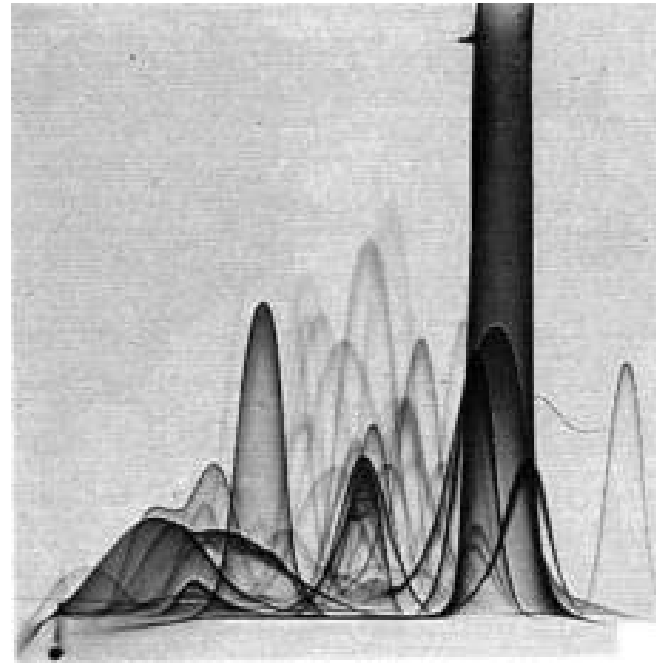
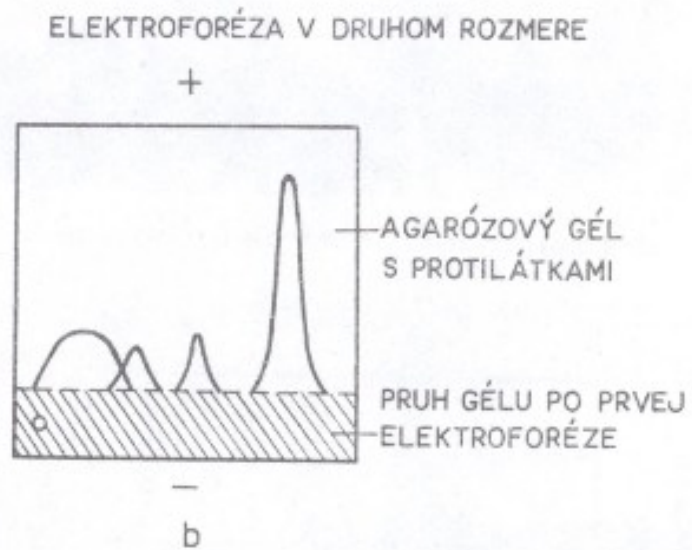
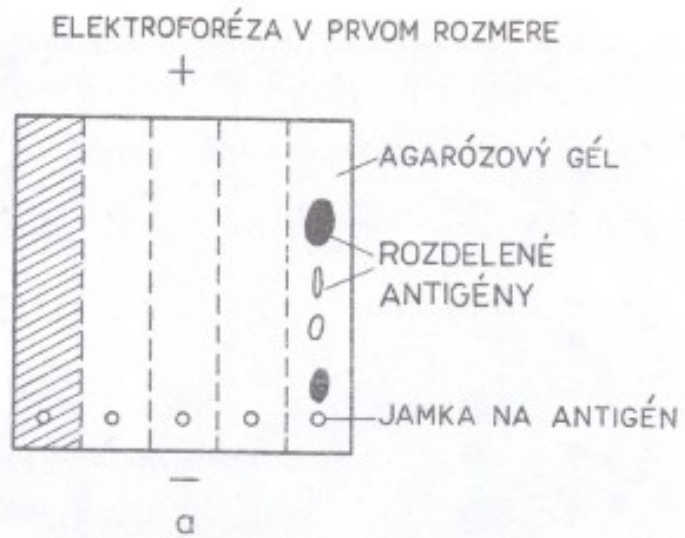
Raketová imunoelektroforéza

- umožňuje stanovit koncentraci proteinů až 0.1mg/l
- jedná se o jednoduchou imunodifuzní techniku probíhající v elektrickém poli (elektroimunodifuze)
- molekuly antigenu se zde nepohybují volnou difuzí, ale jejich pohyb je určován stejnosměrným elektrickým polem.
- většina proteinových antigenů putuje k anodě, v gelu se střetávají s molekulami protilátek
- po dosažení ekvivalentního poměru vznikají precipitáty ve tvaru rakety
- výška raketky je přímo úměrná koncentraci antigenu
- je možné i opačné uspořádání - stanovení koncentrace protilátek v séru (do gelu antigen)



Dvourozměrná imunoelektroforéza

- tato technika je kombinací elektroforézy a raketkové imunoelektroforézy (elektroimunodifuzi)
- na gelu (agarosa, polyakrylamid) se nejprve provede elektroforéza bílkovin (směs antigenů) na jednotlivé frakce
- poté se neobarvený proužek gelu přenese na novou desku, plocha se doplní gelem obsahujícím protilátku (polyvalentní antisérum), stane se startem elektroimunodifúze; elektroimunodifúze probíhá ve směru kolmém na gel se separovanými bílkovinami
- vznikají píky nebo oblouky, jejichž výška nebo plocha je úměrná koncentraci příslušné bílkoviny
- porovnání se standardem
- výhodná imunochemická metoda na analýzu směsi antigenů. V lidském séru lze touto metodou rozdělit až 50 různých proteinů.



Ag migrují do gelu s Ab a vytvářejí v zónách ekvivalence široké precipitační rakety nebo vrcholy

- umístění rakety charakterizuje druh antigenu.

- plocha vrcholu při dostatečném čase elektroforézy a také výška jsou úměrné koncentraci Ag

Imunofixace

- Při podezření na přítomnost monoklonální komponenty (monoklonální protein, M-protein, „paraprotein“) při elektroforetickém vyšetření proteinů krevního séra je provedena tzv. **imunofixace** (pro určení typu paraproteinu)
- po elektroforetickém rozdělení bílkovin séra se postupně přidají na povrch gelu specifické protilátky proti těžkým řetězcům imunoglobulinů IgG, IgA a IgM (příp. IgD) a proti lehkým řetězcům kappa a lambda, které difundují do gelu. Místa, kde dojde k precipitaci na podkladě reakce antigenu se specifickou protilátkou, jsou vizuálně vyhodnocena.
- analýza séra a moči je nezbytná u všech paraproteinemií
- na přítomnost paraproteinu nás může upozornit nezvykle vysoká koncentrace celkové bílkoviny séra (90 g/l a více)

Monoklonální protein je tvořen buď celou molekulou příslušného imunoglobulinu (H i L řetězec) charakterizována třídou ($\gamma, \alpha, \mu, \delta, \epsilon$) a antigenním typem (κ nebo λ), anebo je tvořena pouze těžkými (H) nebo lehkými (L) řetězci. Rozdíl proti normálním imunoglobulinům je především v jeho homogenitě.

Monoklonální gammapatie neznámého významu (MGUS) - Je nutné periodické sledování pacientů, protože u mnoha z nich přejde MGUS během pěti let v myelom (16%), makroglobulinémii (3%) nebo v primární amyloidozu (3%). Lymfoproliferativní onemocnění vzniká u 17% během 10 let, u 33% během 20 let.

Maligní monoklonální gammapatie

Mnohočetný myelom (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE a z volných lehkých řetězců kappa nebo lambda)
Plazmocytom

Maligní lymfoproliferativní onemocnění

Waldenströмова makroglobulinémie

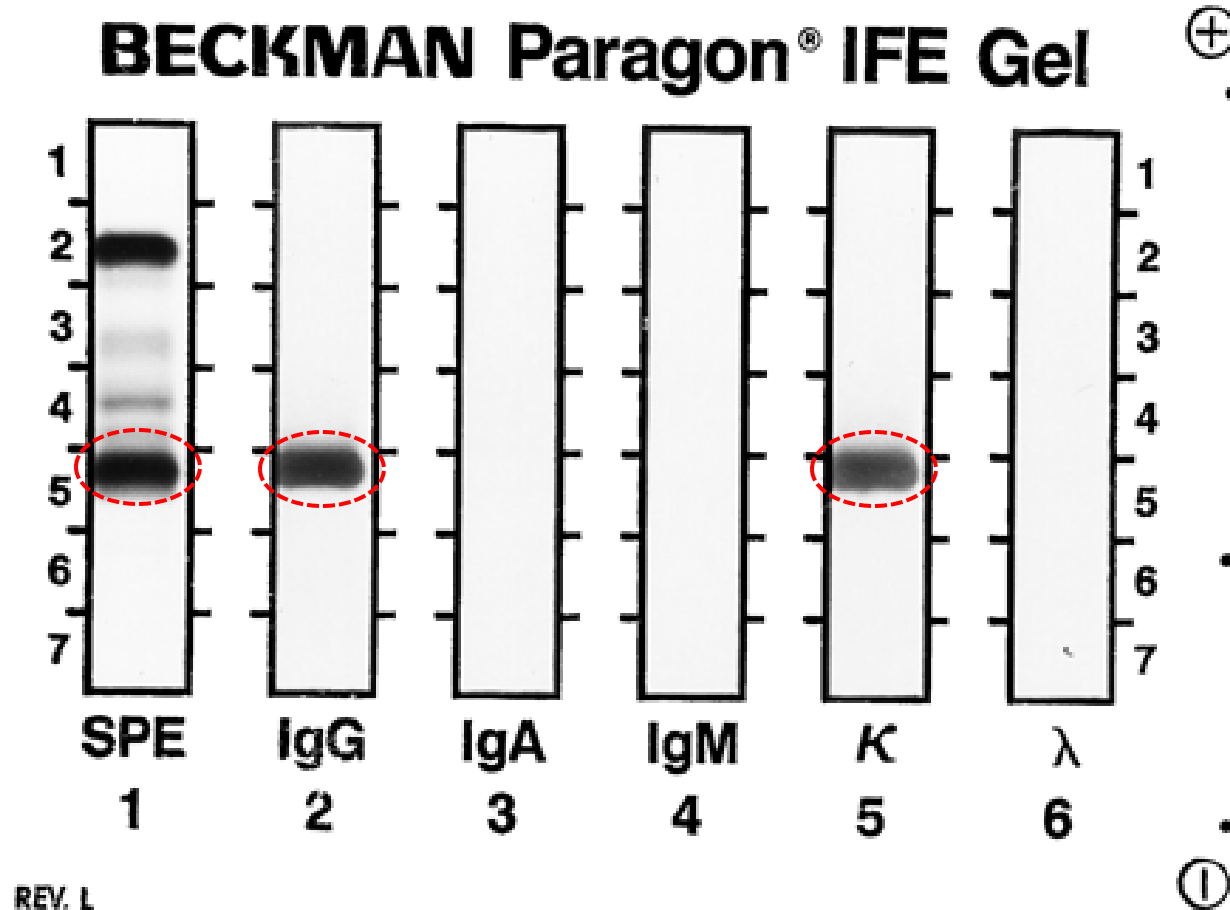
Maligní lymfomy

Chronická lymfatická leukémie (CLL) - koncentrace M-proteinu v séru je zpravidla 1g/l a většinou (88%) jde o M-protein IgM, imunofixací zahuštěné moče lze B₂J v moči prokázat u 65% CLL

Nemoc těžkých řetězců (heavy-chain disease) - gamma, alpha, mí, delta (produkce těžkých řetězců proliferací jednoho klonu plazmatických B lymfocytů bez asociace s řetězci lehkými)

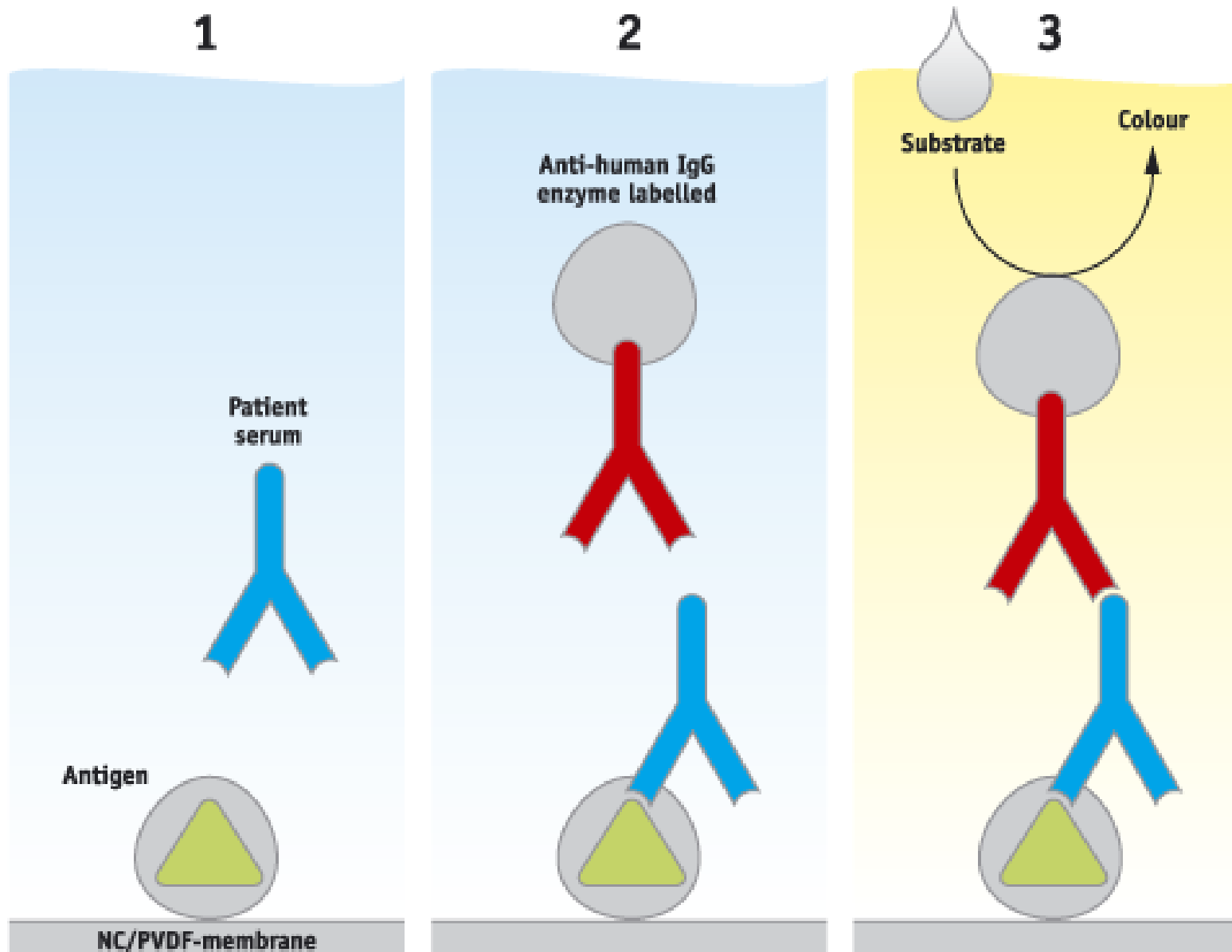
Primární AL amyloidóza

Imunofixace vzorku séra pacienta s paraproteinem IgGk



Imunoblot

- jde o kombinaci elektroforézy, blotingu (neboli otisku) a vizualizační metody (fluorescenční, enzymatické apod.)
- antigen je mnohem lépe definovaný, na rozdíl od klasických EIA testů, kde se pracuje se směsným antigenem. Nejčastěji se jedná o proteiny, glykoproteiny, DNA a RNA
- směs proteinů aplikuje na gelovou elektroforézu v nosné matrici, aby došlo k rozdělení proteinů podle velikosti, náboje, nebo jiných rozdílů v jednotlivé proteinové pásy
- oddělené proteinové pásy jsou pak přeneseny pomocí jednosměrného elektrického proudu do nosné membrány (např. nitrocelulózy nebo nylonu). Tento proces se nazývá bloting (*video*)
- proteiny přilnou na membránu ve stejném rozložení, jako byly rozděleny v gelu a jsou zde fixovány
- membrána se nařeže na jednotlivé proužky, které se nazývají stripy. Každý strip se používá pro jednoho pacienta



Postup pro imunoblot

- vaničku se stripy vložit do analyzátoru
- přidán blokovací roztok , inkubace – zabránění nespecifických vazeb
- promytí
- do příslušných žlábků přidáno sérum pacienta, inkubace
- promytí
- přidán konjugát (sek. protilátka značená enzymem)
- promytí
- inkubace se substrátem
- stop činidlo
- stripy osušit

AutoBlot 3000



