

Imunoelektroforéza

Imunofixace

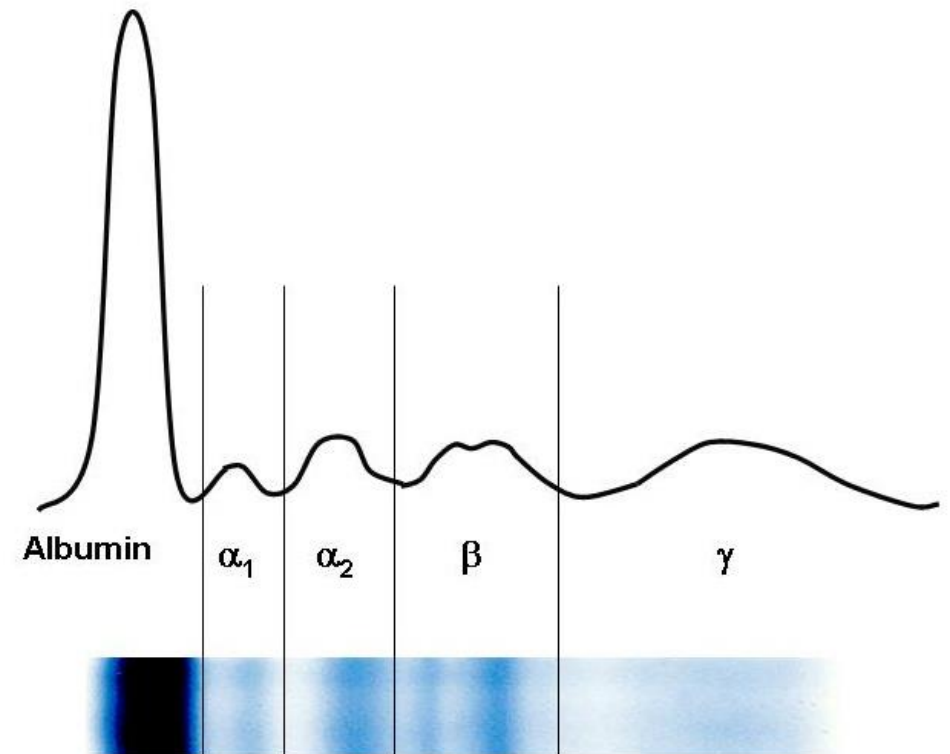
Mgr. Julie Štíhová

ÚKIA-FNUSA



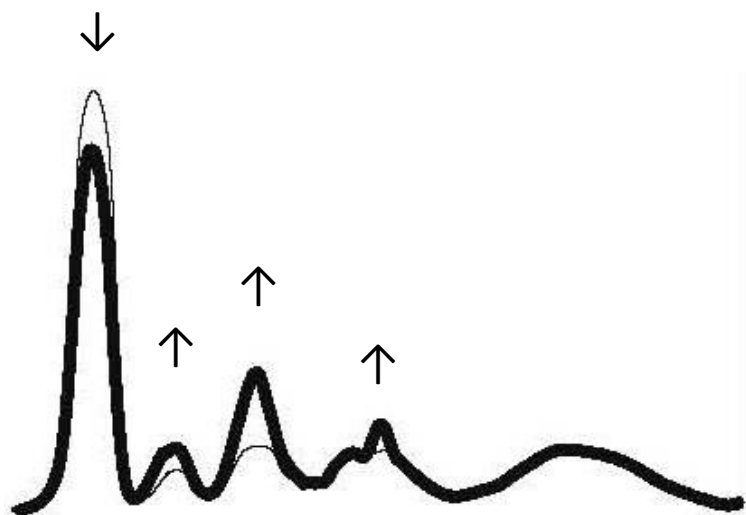
Klasická elektroforéza - screening

- Separace proteinů 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
- Imunologie – gamafrakce

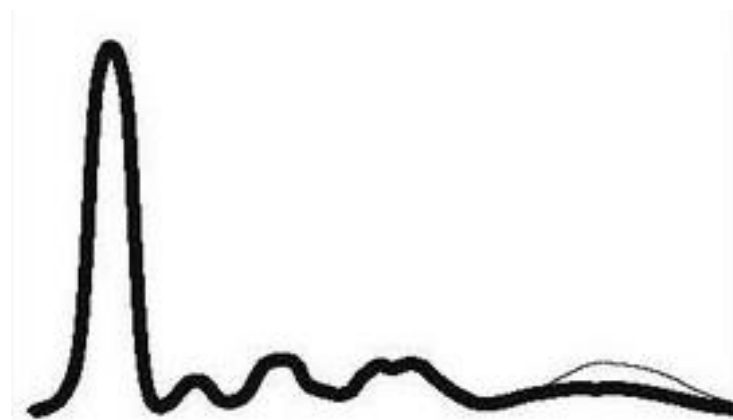


Klasická elektroforéza - screening

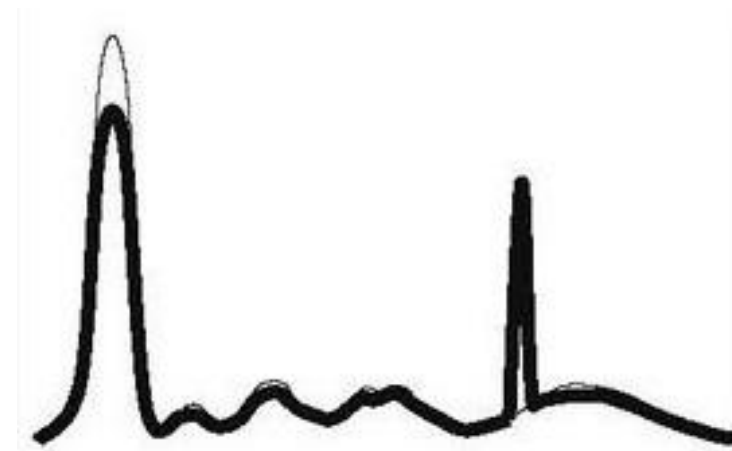
Nevýhoda – detekce pouze velkých změn v proteinových frakcích



Zánět



Hypogamaglobulinemie



Hypergamaglobulinemie
monoklonální gamapatie

Imunoelektroforetické techniky

- Zvýšenou (i sniženou) koncentraci gamaglobulinů je nutno došetřit:
- Metody kvalitativní
 - Immunoelektroforéza (dle Graba a Williamse)
 - Protisměrná elektroforéza
- Metody kvantitativní
 - Raketková imunoelektroforéza (dle Laurella)
 - Dvourozměrná imunoelektroforéza

Imunoelektroforéza

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

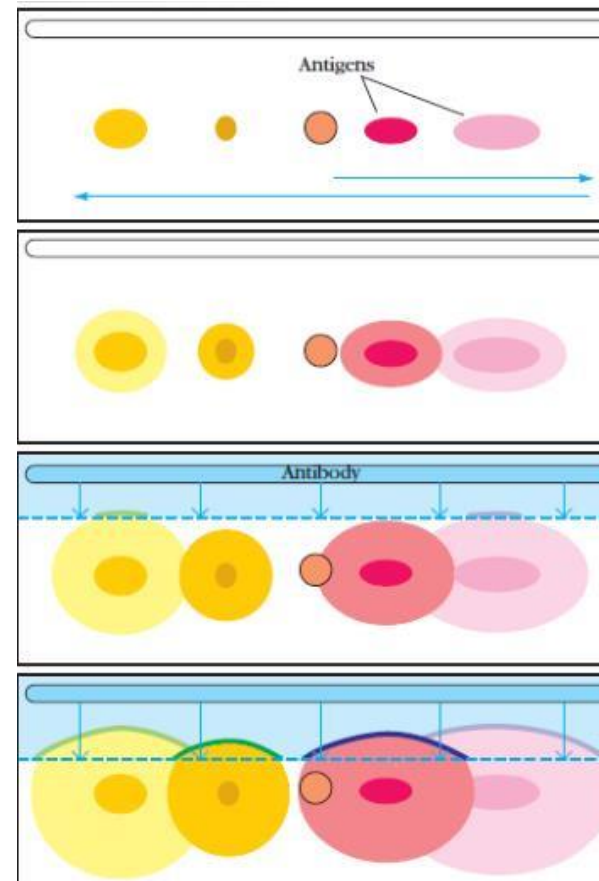


Figure:
Immunoelectrophoresis of an antigen mixture.

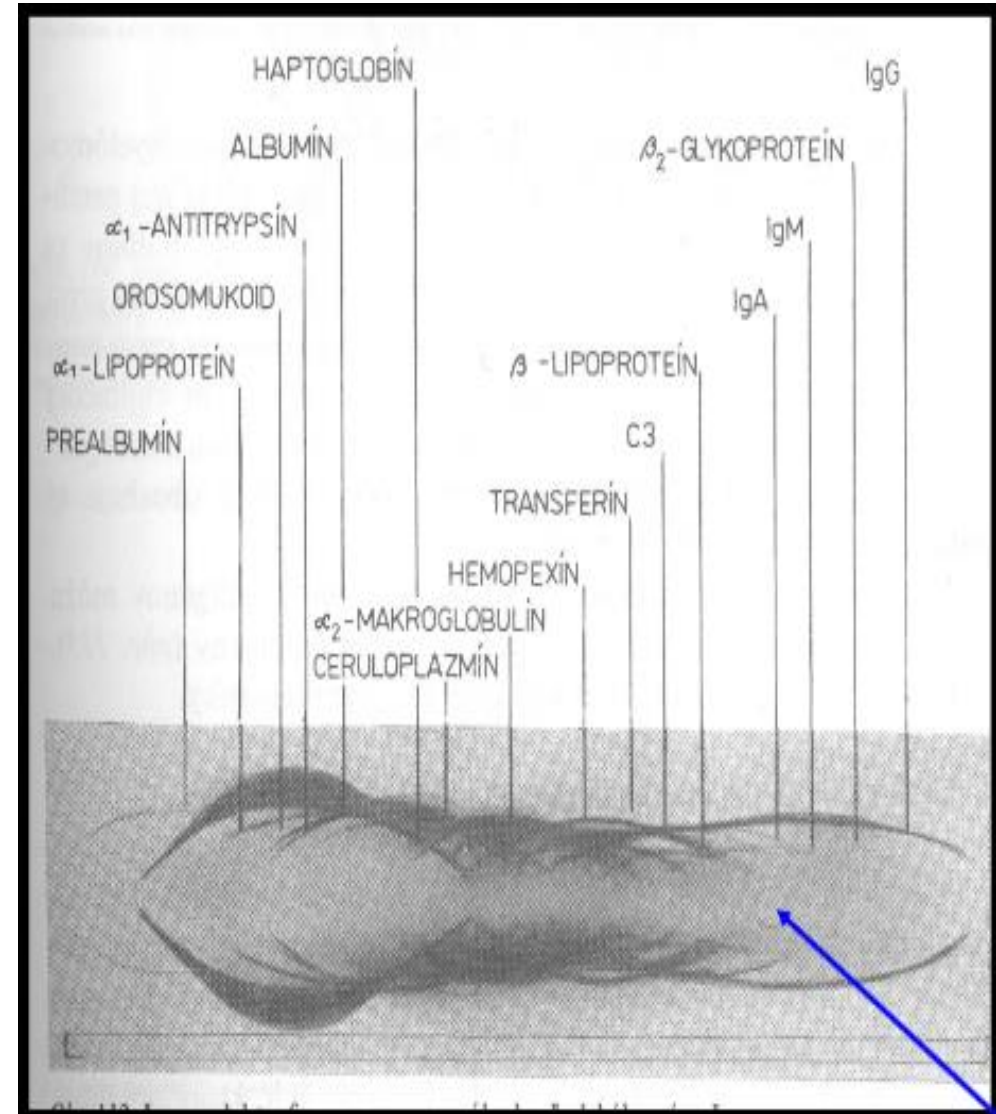
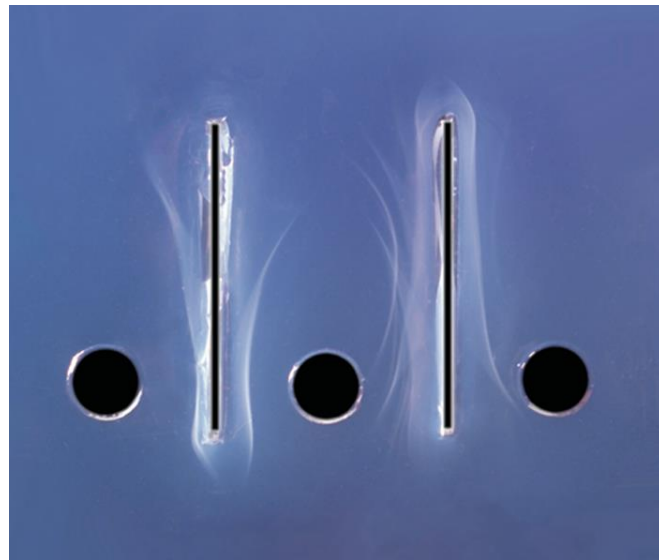
-An antigen preparation (orange) is first electrophoresed, which separates the component antigens on the basis of charge.

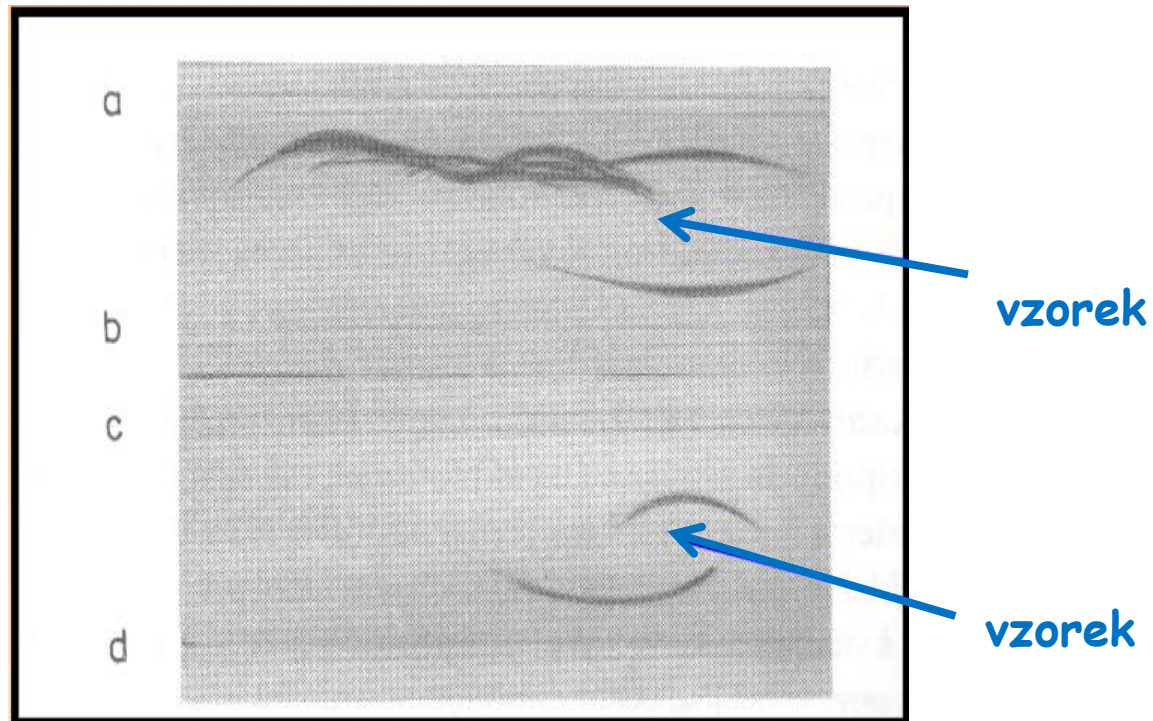
-Antiserum (blue) is then added to troughs on one or both sides of the separated antigens and allowed to diffuse.

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

Imunoelektroforegram normálního lidského séra

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





Nevýhody:

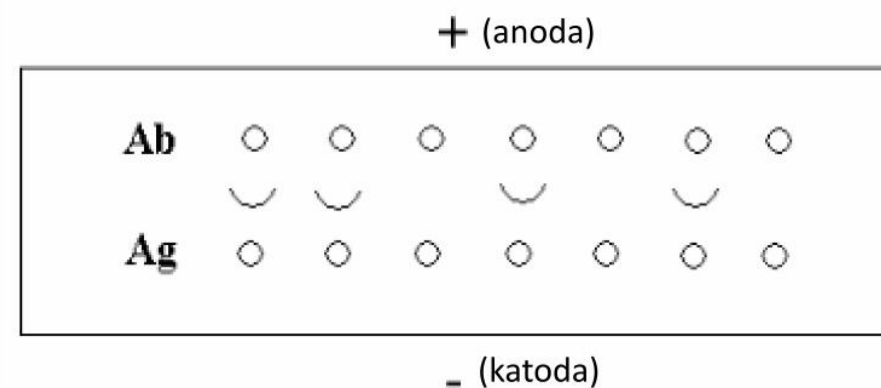
- Dlouhé zpracování
- Okometrické odečítání
- Výsledky pouze kvalitativní
- Nutná zkušenost odečítajícího – různé monografie, atlasy

Imunoelektroforegram normálního lidského séra:

žlábek a	polyspecifické antisérum proti lidským sérovým proteinům
žlábek b	monospecifické antisérum proti IgG
žlábek c	monospecifické antisérum proti IgM
žlábek d	monospecifické antisérum proti IgA

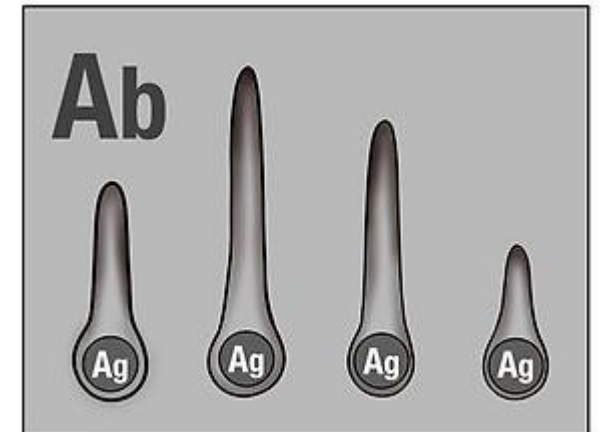
Protisměrná elektroforéza

- Immunodifuze 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

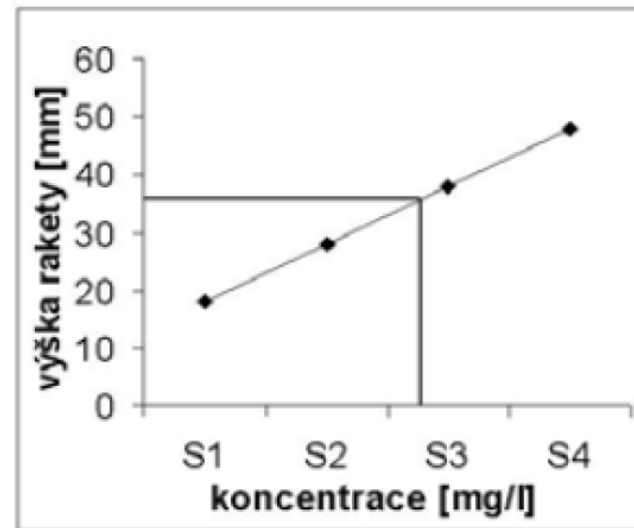
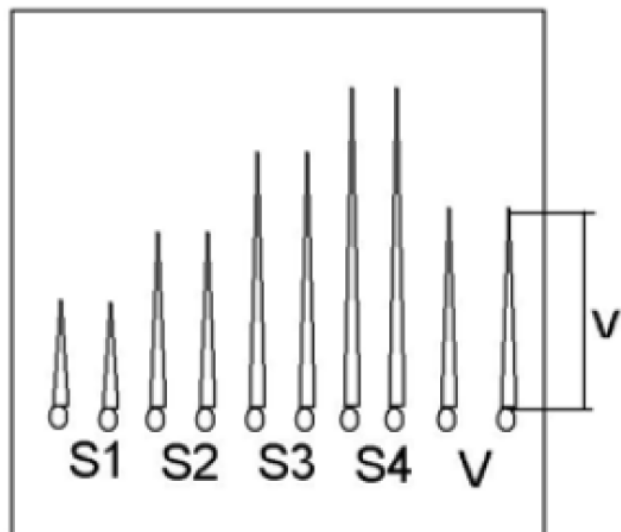


Raketková imunoelektroforéza

- Umožňuje kvantitativní hodnocení, citlivost od 0,1 mg/l
- Immunodifuze probíhající v el.poli
- Rozdíl od předchozích metod – protilátka (antisérum) se přimíchá do agarózového gelu při jeho výrobě
- 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“

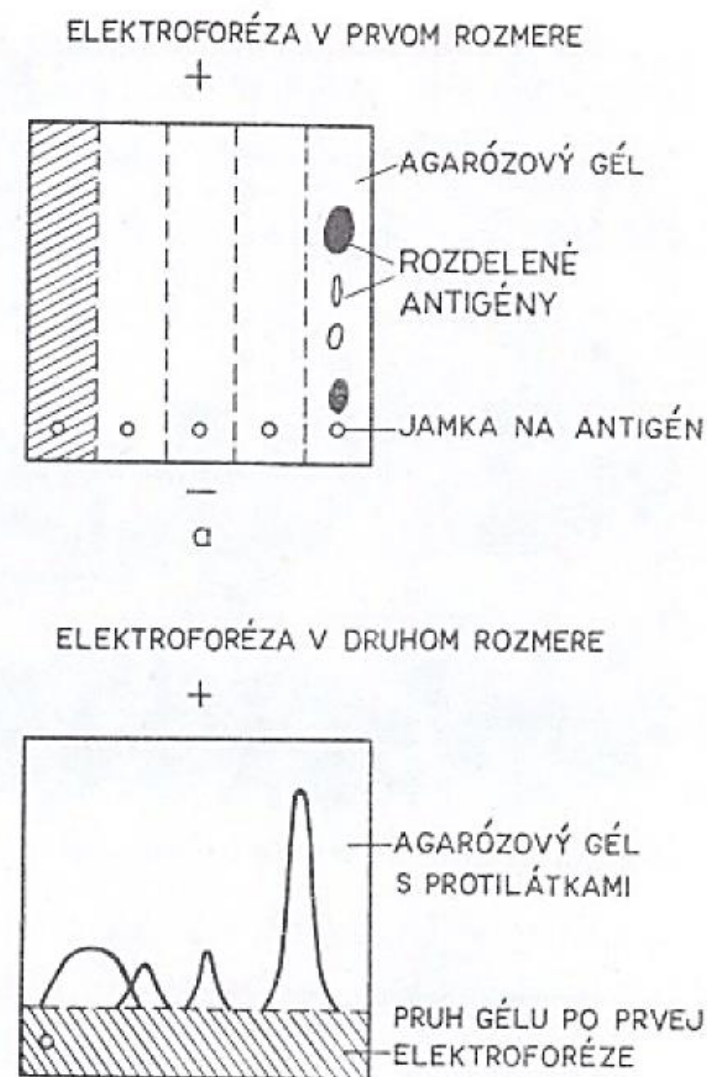
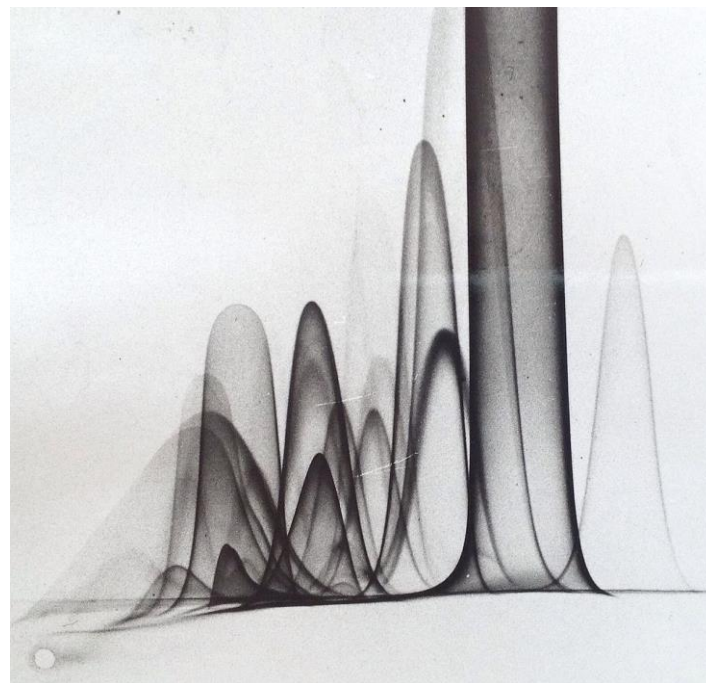


Raketková imunoelektroforéza



Dvourozměrná (2D) imunoelktroforéza

- Kombinace elektroforézy s raketkovou imunoelktroforézou
- 2 elektroforetické kroky
- Současná kvantifikace více proteinů

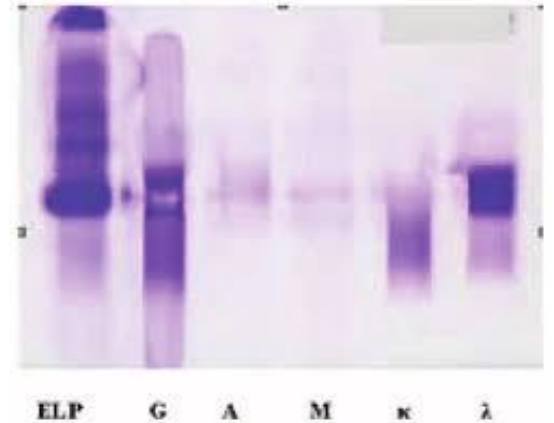


Dvourozměrná (2D) imunoelktroforéza

- 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 (protein)
- Lidské sérum – touto metodou lze stanovit až 50 různých proteinů

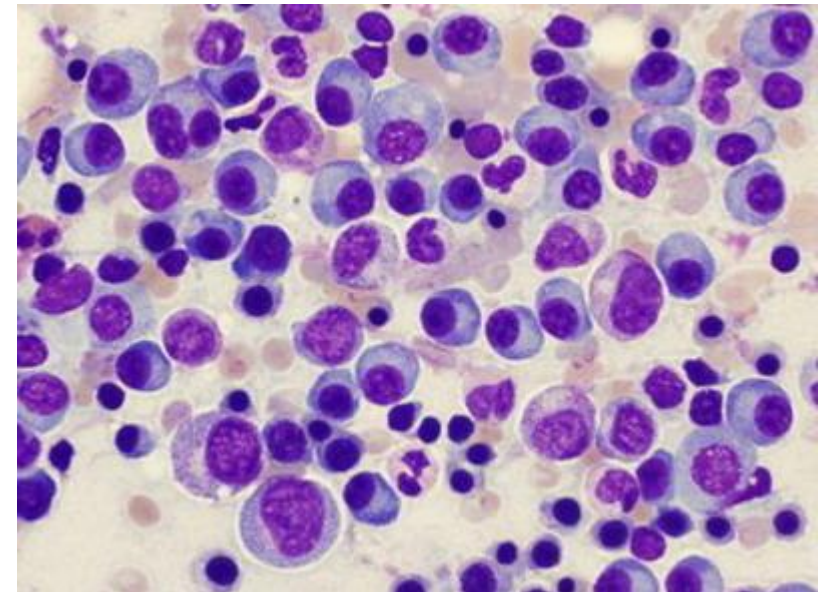
Imunofixace

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



Monoklonální gamapatie

- Onemocnění s výskytem monoklonálního imunoglobulinu v séru
 - Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS)
 - Mnohočetný myelom
 - Plazmocytom
 - Nemoci těžkých řetězců
 - Waldenströmová makroglobulinemie
 - AL amyloidóza
- Immunofixace - význam
 - Diferenciální diagnostika gamapatie
 - Sledování vývoje nemoci v čase
 - Sledování terapie
 - Vyšetření **séra + moči** současně!

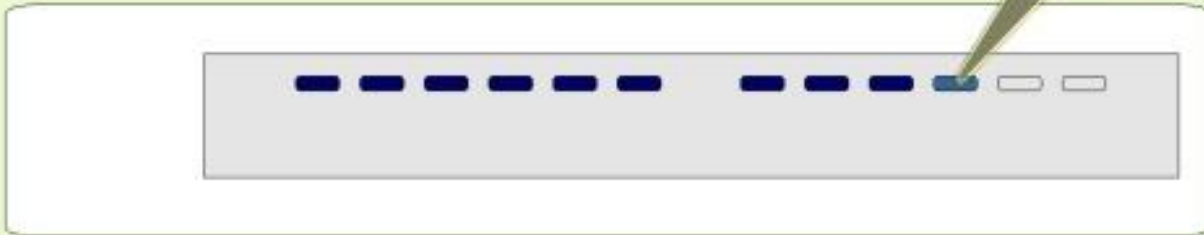


Imunofixace - postup

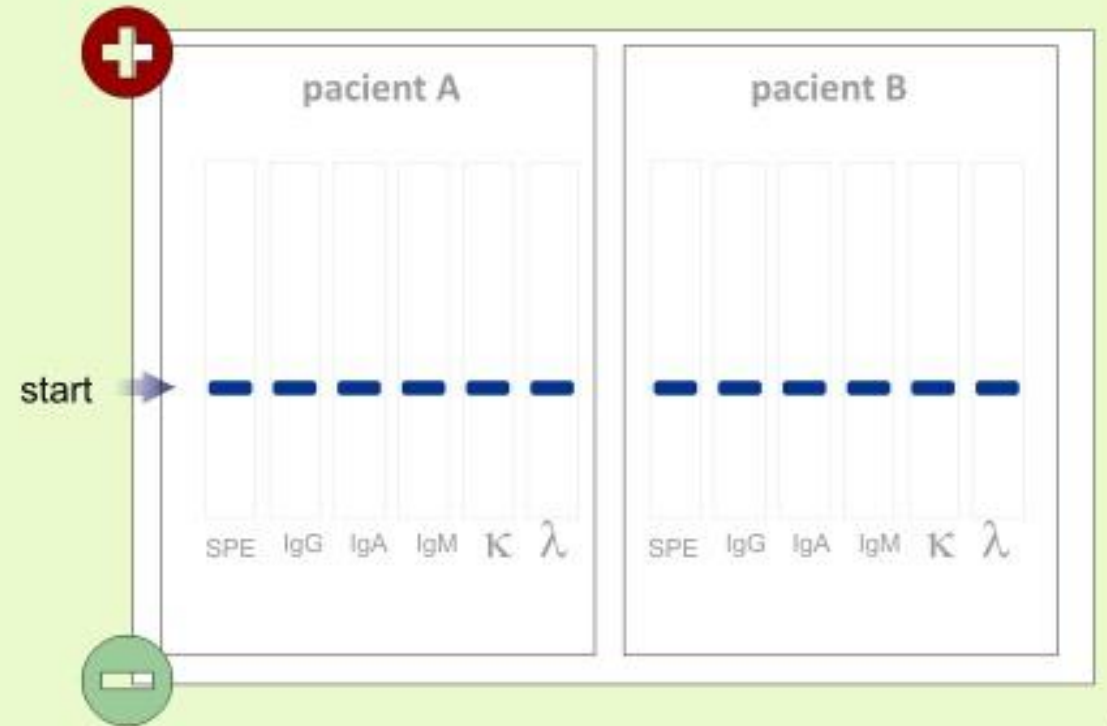
vzorky jsou aplikovány do 6ti specifických stop šablony

pacient A

pacient B



start elektroforetické migrace



2014/f

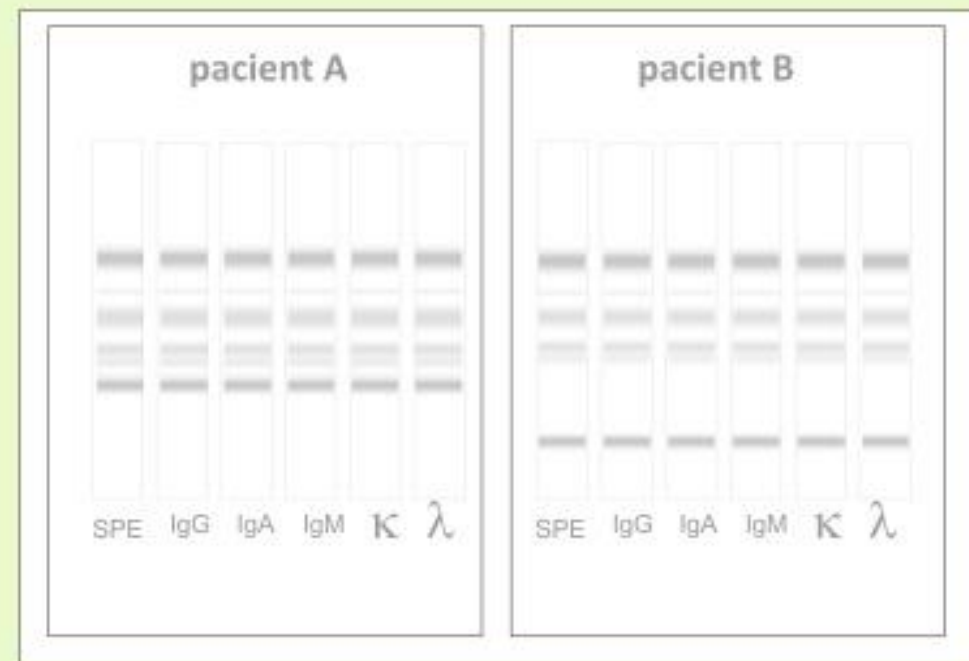
2014/f

Imunofixace - postup

elektroforetická separace proteinů v alkalickém pH



separované imunoglobulinové molekuly

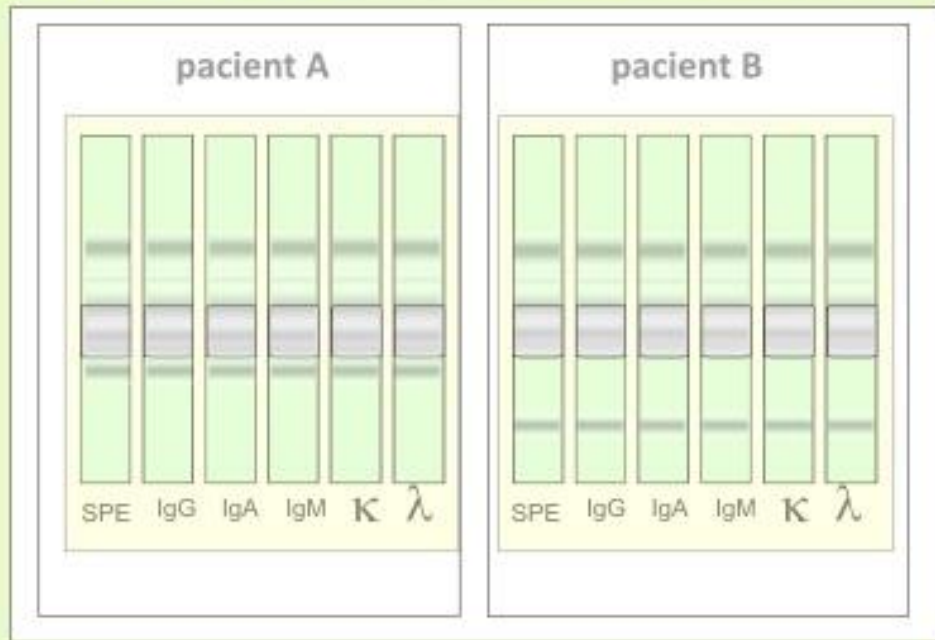


2011/

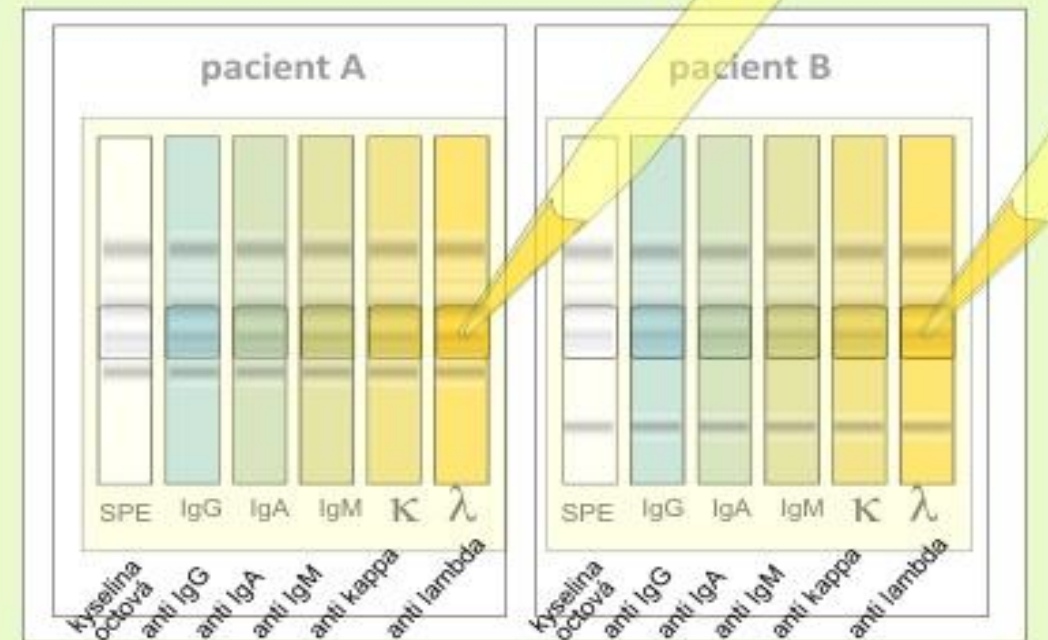
2011/

Imunofixace - postup

přiložení magnetické masky
pro aplikaci roztoků antisér



aplikace monospecifických antisér

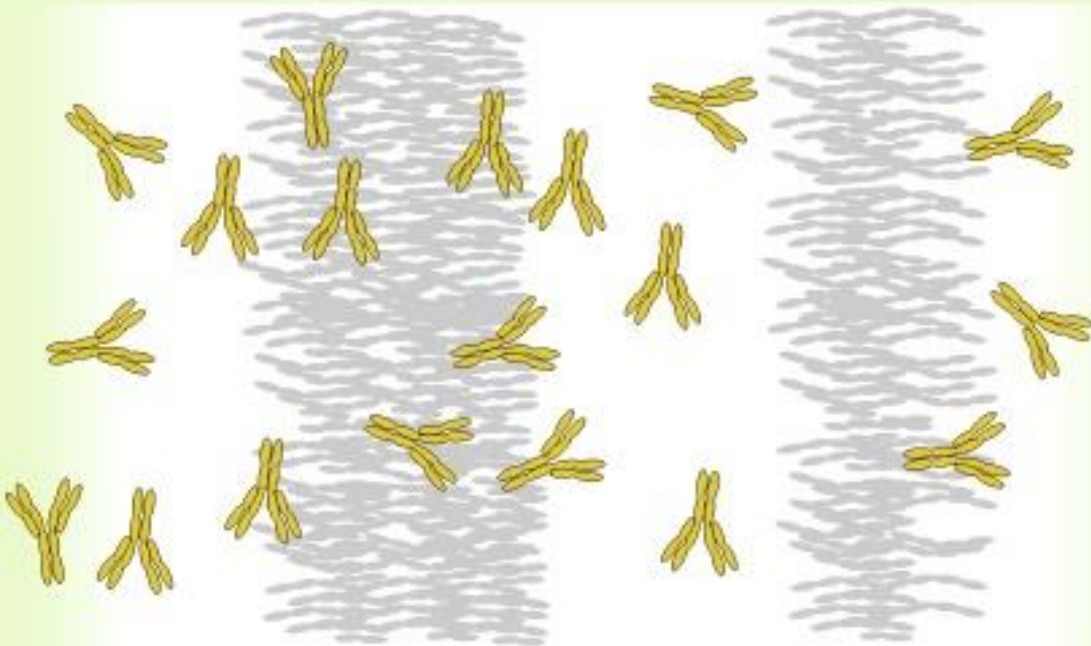


2014/

2014/

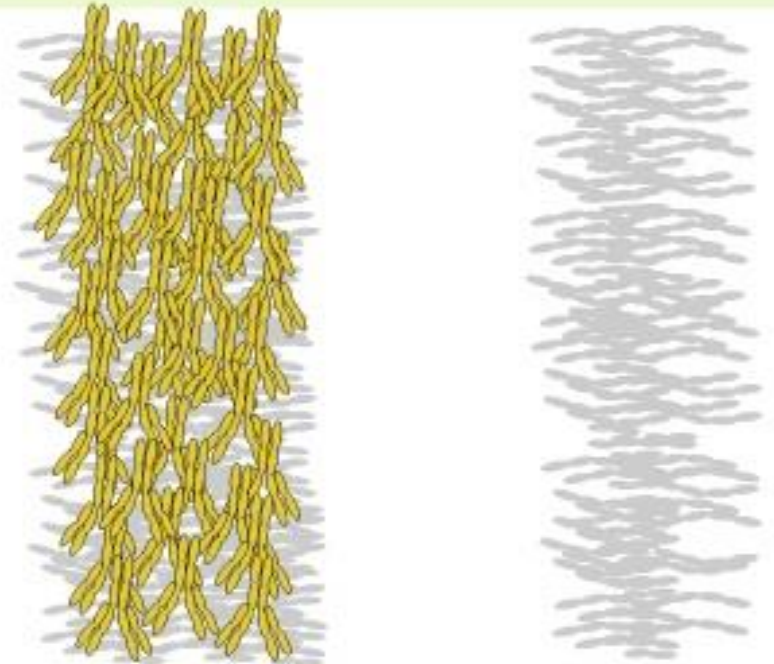
Imunofixace - postup

monospecifická antiséra



2014/

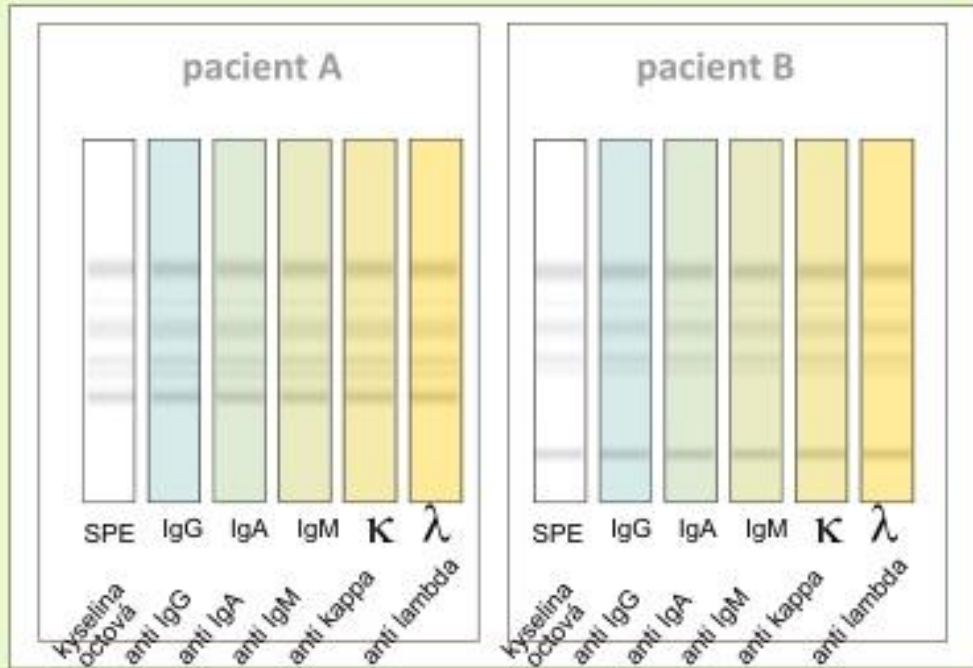
inkubace,
imunoprecipitace s monospecifickými antiséry



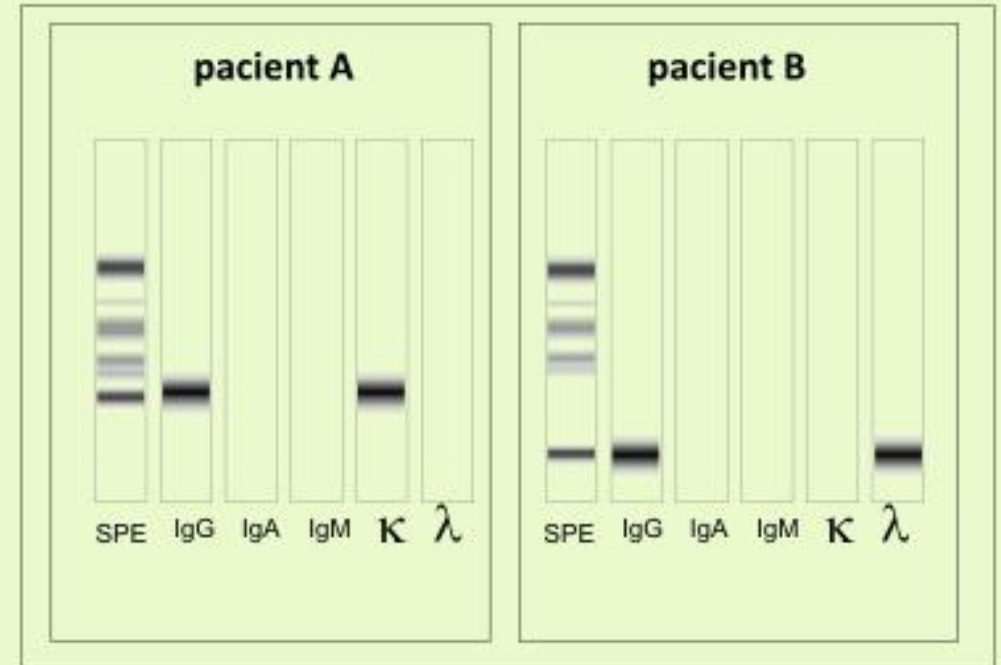
2014/

Imunofixace - postup

inkubace,
imunoprecipitace s monospecifickými antiséry



denaturace při 60°C

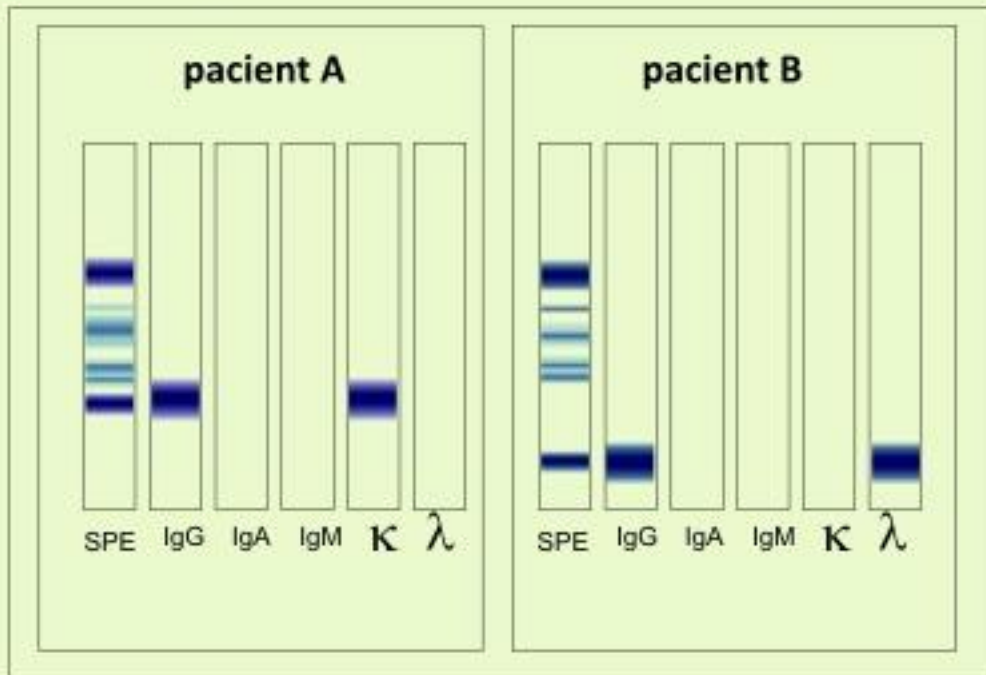


2016/

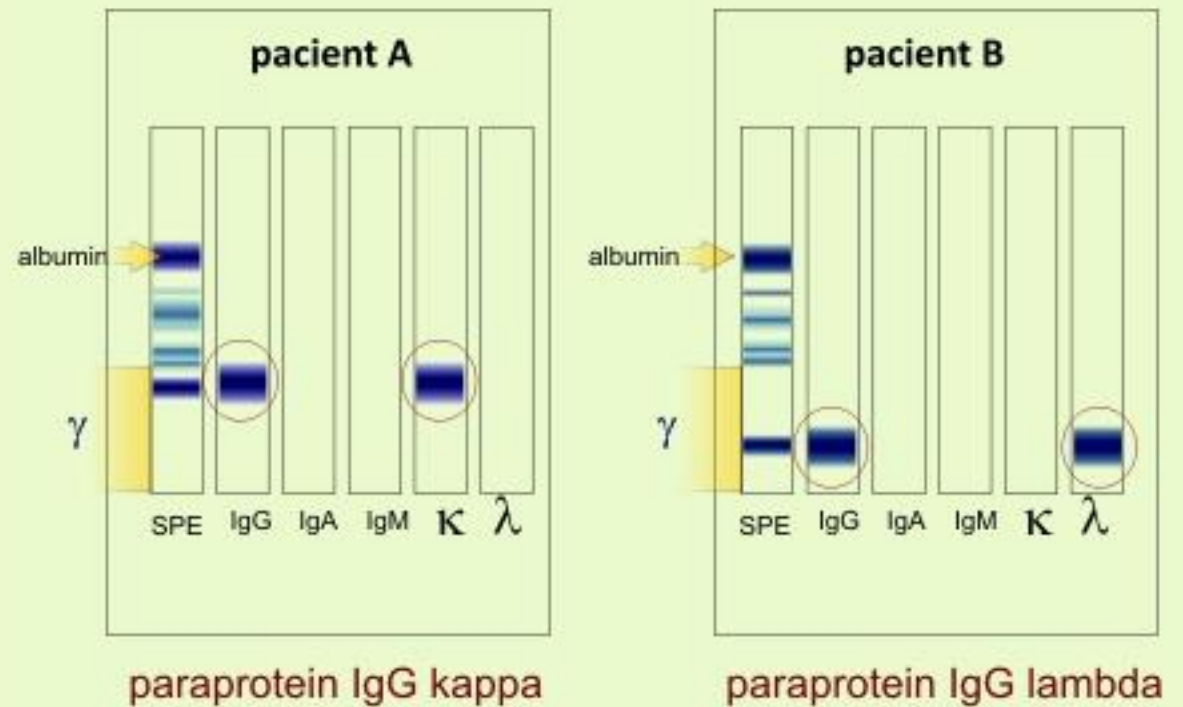
2016/

Imunofixace - postup

barvení

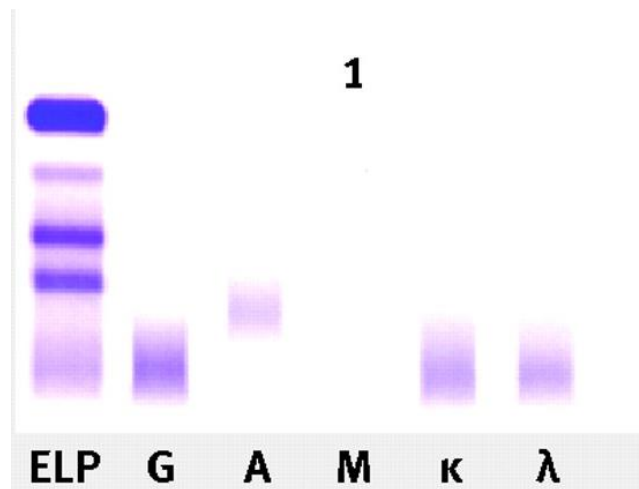


vyhodnocení

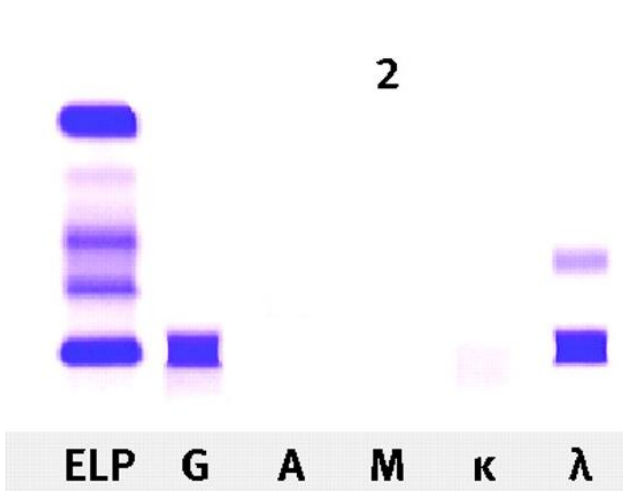


Odečítáme typ monoklonálního Ig – v jednotlivých drahách pátráme po proučcích se shodnou polohou na elektroforeogramu

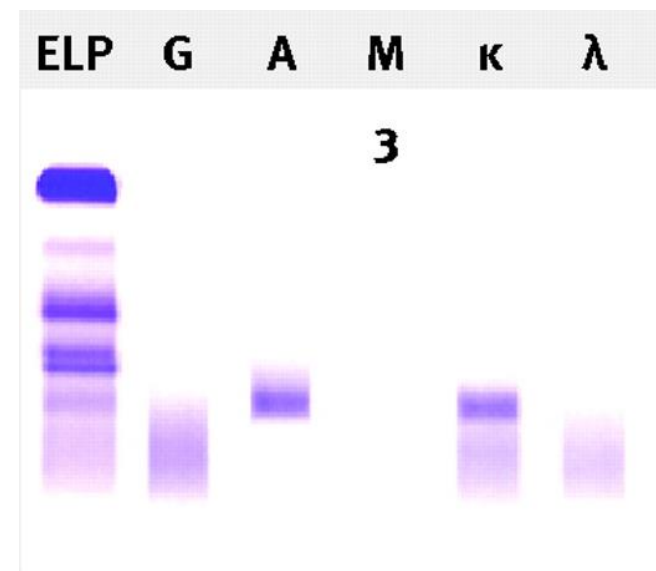
Imunofixace – odečítání výsledků



Polyklonální Ig – zdravý člověk

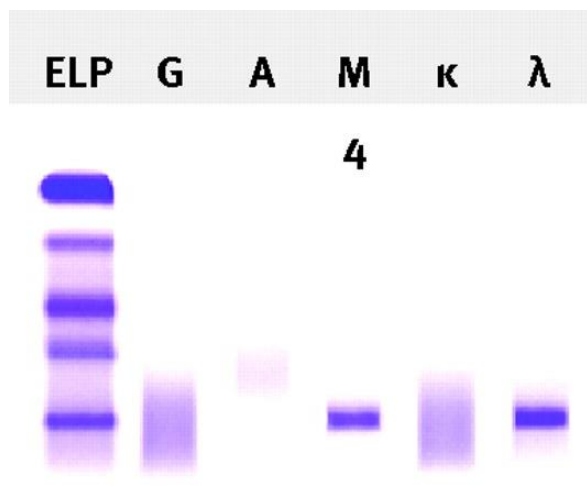


Pacient s paraproteinem IgG λ
a lehkými řetězci λ

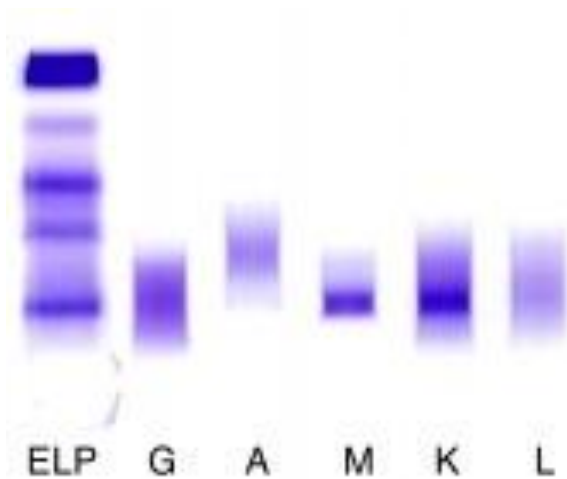


Pacient s paraproteinem IgA κ

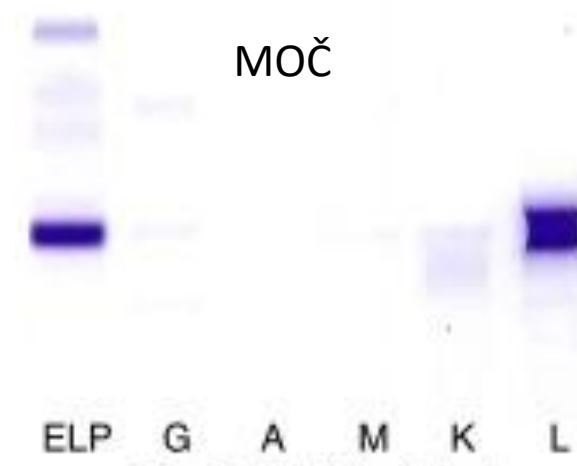
Imunofixace – odečítání výsledků



Pacient s paraproteinem IgM λ

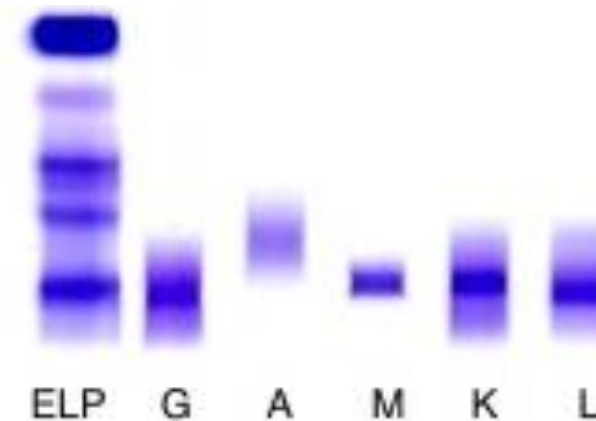


Pacient s paraproteinem IgM κ



Volné lehké řetězce λ

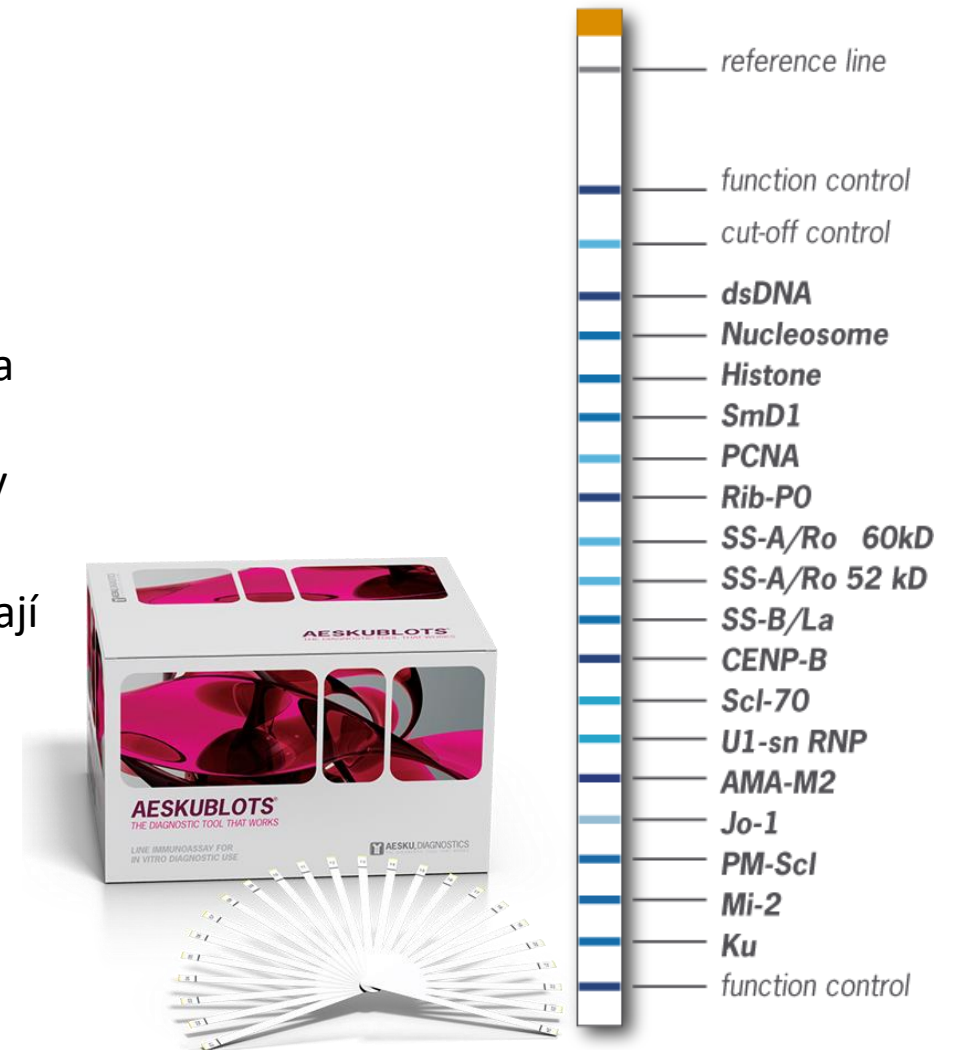
Biklonální gamapatie
IgG κ + IgM λ



Imunoblot

- Slouží k diagnostice autoantilátek
- Příprava blotů (výrobce):
 - Proteiny elektroforeticky rozděleny v gelu – přenos (otisk) na nitrocelulózovou membránu (blotting)
 - Membrána je rozstříhána na jednotlivé diagnostické proužky
 - každý protein má na proužku definovanou polohu
 - Výrobce v kitu dodává i šablonu, podle které se bloty odečítají

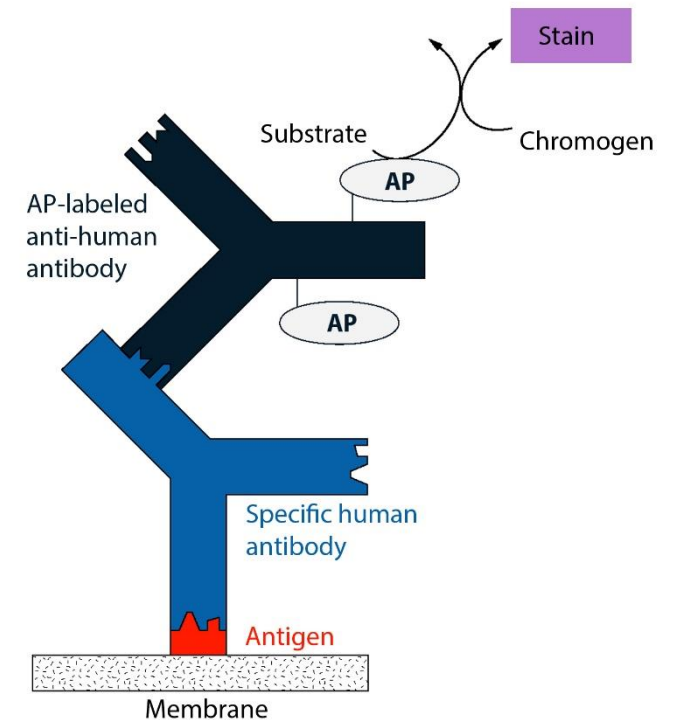
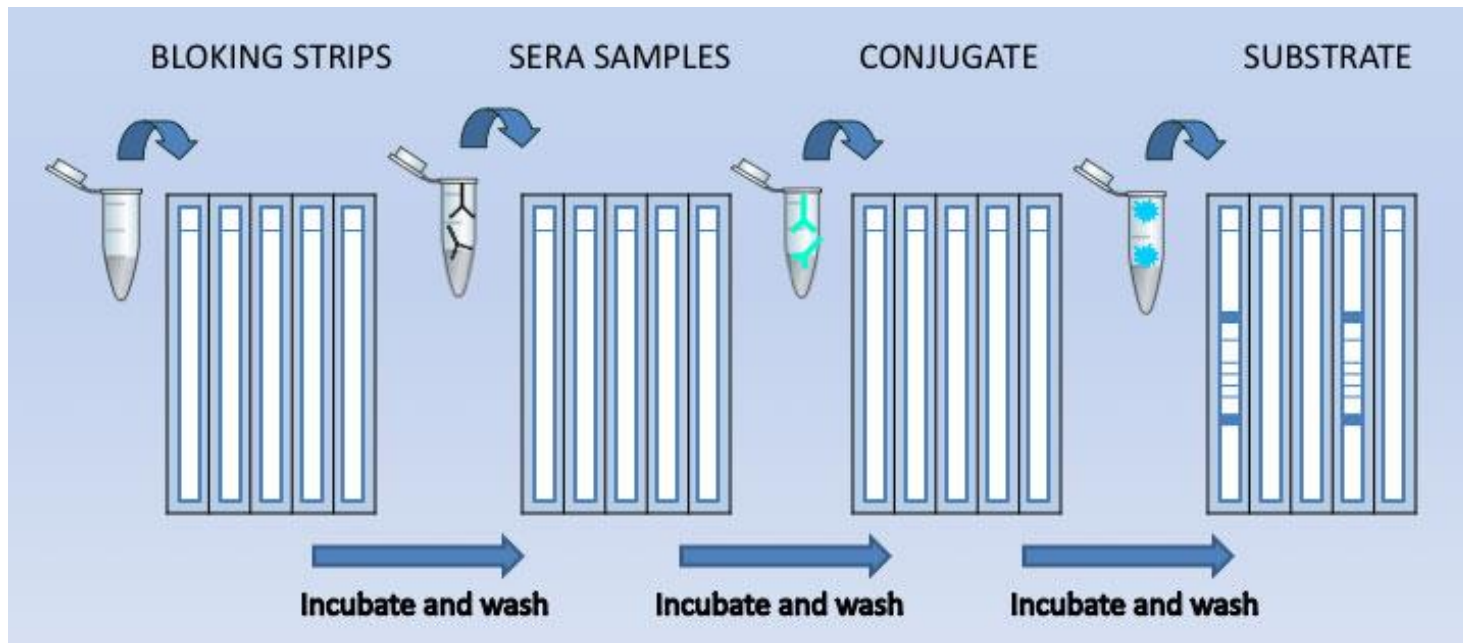
ANA-17 Pro



Imunoblot

○ Princip stanovení:

- Pokud je autoprotilátka proti určitému proteinu (antigenu) přítomna v séru, naváže se na tento protein (antigen) imobilizovaný na stripu
- Detekce vazby autoprotilátky pomocí diagnostických protilátek značených enzymem
- Enzym přemění substrát na barevný produkt
- Výsledkem je vznik barevného proužku na stripu



Imunoblot

- Jednotlivé barevné proužky se porovnávají s kontrolní šablonou
- Hodnotí se přítomnost kontrolních proužků (interní kontrola)
- Odečet vizuálně nebo denzitometricky (% pozitivity – semikvantitativní stanovení)
- Imunoblotem se vyšetřují pacienti, které nelze vyšetřit jinou metodou (ELISA)
- Diagnostika – zejména roztroušená skleróza

