

# ELEKTROFORETICKÉ METODY

Mgr. Nikola Kučeráková

# Elektroforéza

- je analytická separační metoda
- k dělení látek dochází díky jejich rozdílné pohyblivosti vlivem vnějšího elektrického pole (stejnoseměrný el. proud)

Princip:

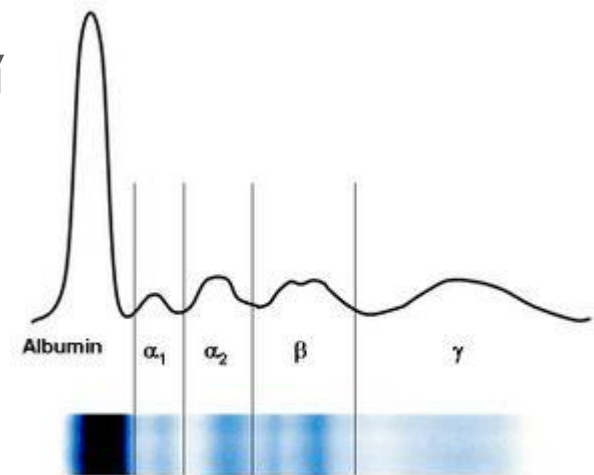
- využití rozdílné pohyblivosti (migrace) nabitých částic (iontů) v elektrickém poli. Při elektroforéze se jedná o mechanický přenos hmoty vlivem působení elektrického pole.

Rozdělení elektroforézy metod:

- **Volná elektroforéza**
  - provádí se ve vodných roztocích, kde částice putují směrem k elektrodě s opačnou polaritou.
- **Zónová (zonální) elektroforéza na nosičích**
  - agarózový (AGE) nebo polyakrylamidový gel (PAGE)

# Zónová elektroforéza

- Rychlost migrace proteinů závisí na těchto faktorech:
  - Elektrický náboj molekuly
  - Velikost a tvar molekuly – větší se pohybují pomaleji
  - Síla elektrického pole
  - Vlastnosti nosného média
  - Teplota
- Proteiny s rozdílnou pohyblivostí migrují v gelu jako pásy (bandy).



# Hlavní typy gelové elektroforézy

## Gelová nedenaturační elektroforéza

- *Nativní gelová elektroforéza*
  - probíhá bez denaturačních činidel
  - migrace proteinů gelem závisí na jejich **náboji, velikosti a tvaru**
  - citlivost elektroforézy je dána charakterem póru gelu

## Gelová denaturační elektroforéza

- *SDS gelová elektroforéza*
  - proteiny jsou denaturovány dodecylsíránem sodným (**SDS**) a  $\beta$ -merkaptoetanolem
  - Proteiny jsou separovány podle své **molekulové hmotnosti**

# SDS gelová elektroforéza

- **SDS je anionaktivní detergent**, který nese poměrně vysoký náboj, a proto ve vazbě na bílkovinu vyrovnává nábojové rozdíly bílkovin, které se potom pohybují v gelu **jen podle velikosti**.
- Vzorek proteinu se zpracuje s **tzv. vzorkovým pufrem** - obsahuje SDS a redukční činidlo  $\beta$ -merkaptoethanol.
- Působením těchto látek dojde k rozrušení kvarterní, terciární a do značné míry i sekundární struktury.
- Všechny bílkoviny váží SDS v konstantním poměru, asi 1,4 g SDS na 1 g bílkoviny, a tím charakteristicky mění svou konformaci.
- Výsledné komplexy SDS-bílkovina:
  - mají stejnou hodnotu povrchového náboje
  - konformace bílkovin se do jisté míry unifikuje

## Zpracování gelu po separaci

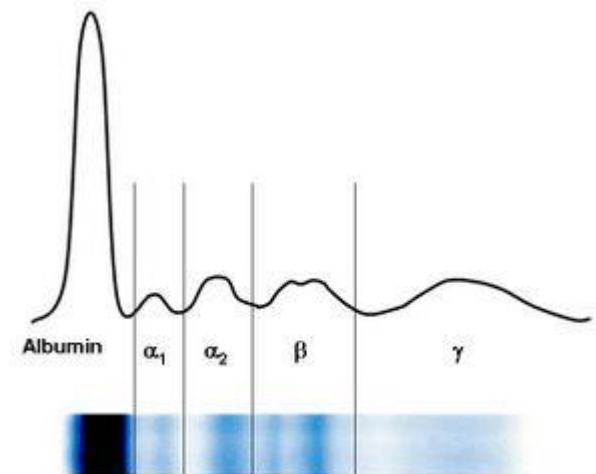
- Po proběhnutí elektroforéze je nutné gel sušit nebo fixovat fixačním roztokem (obsahuje kyselinu, např. kys. octová) - dojde k denaturaci proteinů a jejich imobilizaci v nosném médiu, aby se zabránilo difúzi jednotlivých zón.
- Dále je nutné gel obarvit, aby došlo k vizualizaci jednotlivých proteinových frakcí. Po promytí přebytku barviva, se gel suší. Barvy – amidočern, kyselá violeť,...
- Množství barviva, které se během barvení váže na proteiny závisí na mnoha faktorech. Je ovlivněno typem proteinu nebo stupněm denaturace při fixaci.

## Vyhodnocení: Detekce a kvantifikace

- Po elektroforetické separaci a barvení, je možné kvantifikovat jednotlivé zóny jako procentuální podíl přímou denzitometrii.
- Denzitometr je přístroj, který slouží k vyhodnocení hustoty zbarvení v plošném uspořádání. Jedná se o postup, který je podobný fotometrickému stanovení, zaznamenává měnící se hodnotu absorbance v závislosti na intenzitě zbarvení.
- Při denzitometrii se měří intenzita záření procházejícího průhlednou plochou, získává se grafický záznam fotometrovaného úseku.
- Plocha pod křivkou těchto píků připadající jednotlivým frakcím, je úměrná relativnímu zastoupení jednotlivých frakcí v dělené směsi.
- Elektroforeogram se automaticky posunuje nad štěrbinou, kterou prochází světlo zvolené vlnové délky (400 – 700 nm), v místě frakcí dochází k částečné absorpci záření – to se projeví při dopadu na detektor.
- Po zpracování signálu integrátorem získáme číselné výsledky jednotlivých frakcí.

# Gelová elektroforéza v praxi (SPE)

- při běžné elektroforéze se sérum rozdělí na frakci albuminu,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  a  $\gamma$ -globulinů
- proteiny migrují v gelu jako pásy (bandy)
- stanovení zastoupení jednotlivých frakcí může mít orientační význam při hodnocení stadia zánětlivého procesu (akutní zánět -  $\uparrow \alpha_1$  a později i  $\alpha_2$ ; chronický zánět -  $\downarrow$ albumin,  $\uparrow$  gamma globuliny)



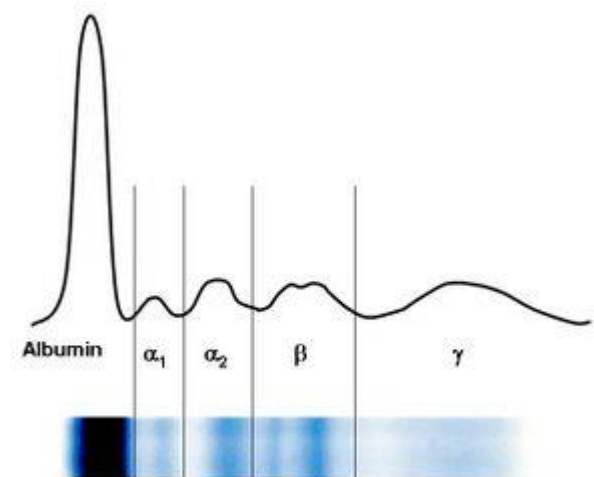


# Gelová elektroforéza v praxi (SPE):

## Frakce

### ALBUMIN

- 55-65 % z celkových proteinů plasmy
- denně produkce v játrech až 12 g
- elipsoidní tvar – nezvyšuje viskozitu plasmy
- funkce:
  - proteinová rezerva (zdroj AMK)
  - transport – bilirubin, hem, steroidní látky, kovy, léky
  - vazba vody – ztráty albuminů při poruchách ledvin vedou k přestupu vody do tkání → otoky



# Gelová elektroforéza v praxi (SPE):

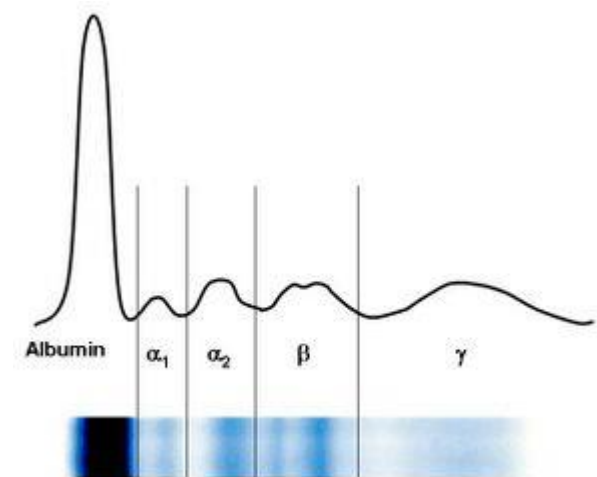
## Frakce

### $\alpha_1$ GLOBULINY

- prakticky jediná bílkovina, která ovlivňuje tvar a intenzitu alfa 1 zóny – alfa1-antitrypsin
  - chrání před enzymy zánětlivých buněk, inhibitor proteáz
- dále kyselý alfa-1 globulin, transkortin, transkobalamin

### $\alpha_2$ GLOBULINY

- intenzitu a morfologii bandu ovlivňují stejným dílem alfa2-makroglobulin a haptoglobin
- Haptoglobin:
  - vazba hemoglobinu z rozpadlých erytrocytů (zabraňuje ztrátám Fe)
  - $\uparrow$  při akutním zánětu a při zátěži
  - $\downarrow$  při rozpadu velkého množství erytrocytů



# Gelová elektroforéza v praxi (SPE):

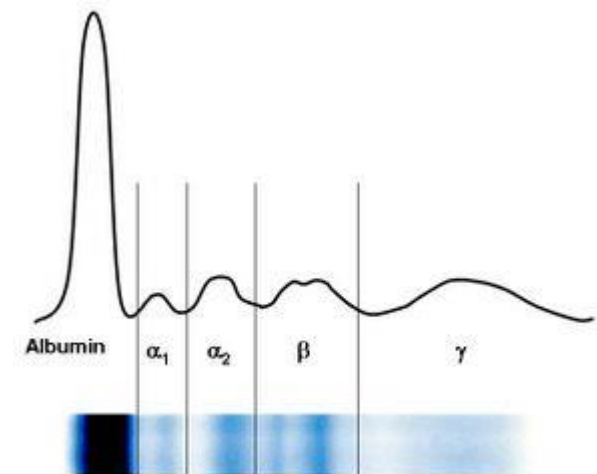
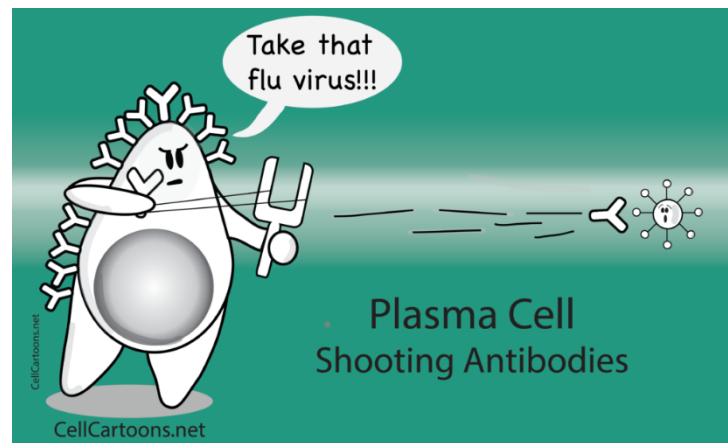
## Frakce

### $\beta$ GLOBULINY

- B<sub>1</sub> = transferin – vazba a transport železa
- $\beta_2 = C_3$

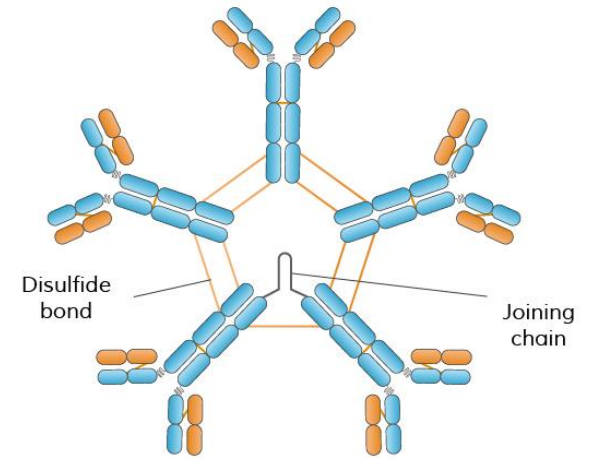
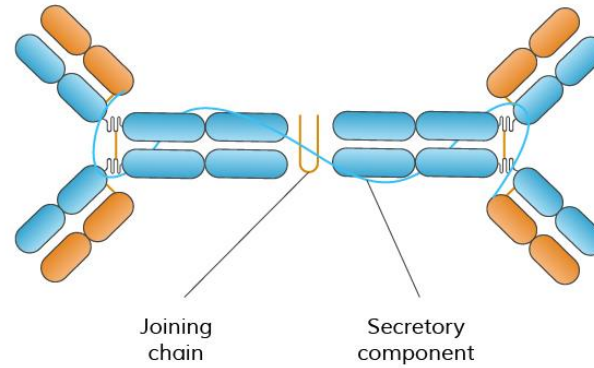
### $\gamma$ GLOBULINY

- IgG, IgM, IgA, IgD, IgE
- lehké řetězce  $\kappa\lambda$
- Produkovány B-lymfocyty (plazmatickými buňkami)



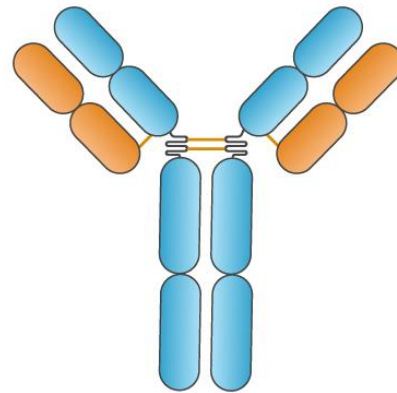
# Protilátky: struktura

- Light (L) chain
- Heavy(H) chain
- Disulfide bond
- Joining (J) chain

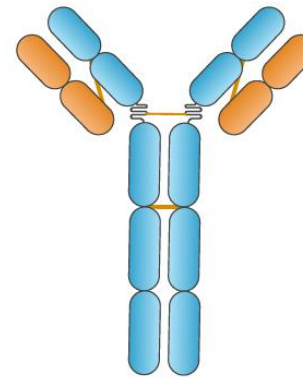


IgA

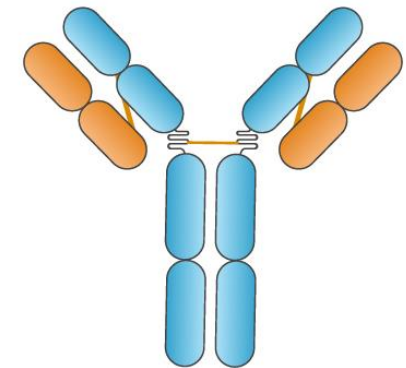
IgM



IgG



IgE



IgD

# Detekce paraproteinu

- imunoelektroforéza je v současné době používána téměř výhradně k průkazu monoklonálního imunoglobulinu = paraproteinu
- **paraprotein** (PP, Mlg) je produkován klonem nádorových plasmatických buněk = plazmocytom, plazmocytární myelom
- **Mnohočetný myelom** = nádor vycházející z plasmatických buněk
- **CRAB** symptomy
  
- přítomnost Mlg = výrazný nefyziologický band obvykle v gama zóně
- příčinou jasného pruhu je fakt, že se PP pohybuje velmi uniformě, protože každá molekula má stejné aminokyselinové složení (tudíž stejný náboj a molekulovou hmotnost)

# CRAB symptom

**C**

**R**

**A**

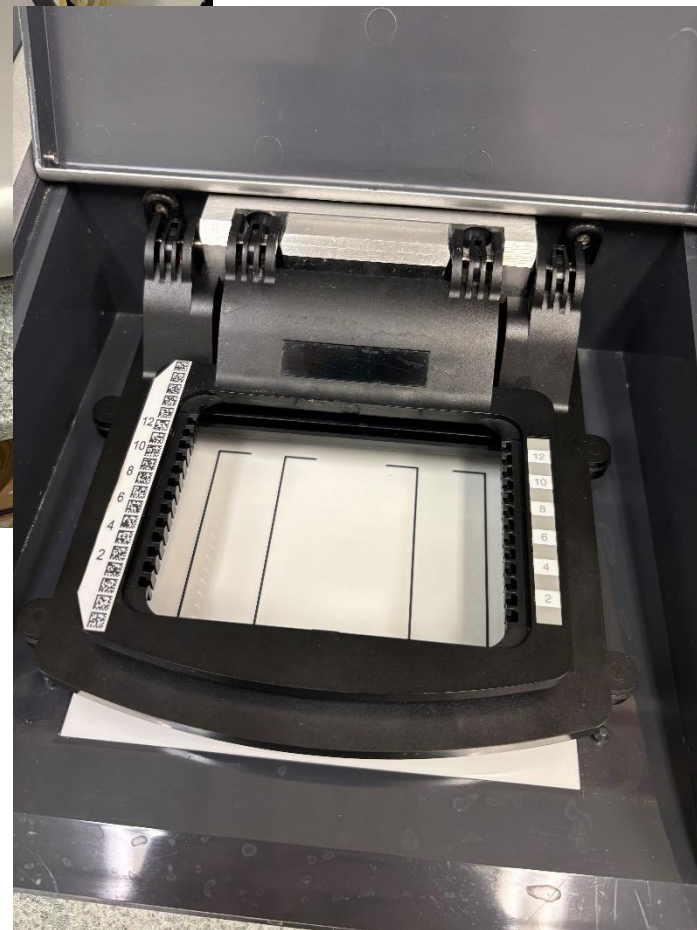
**B**

# Elektroforéza s následnou imunofixací

Provádí se ve čtyřech krocích:

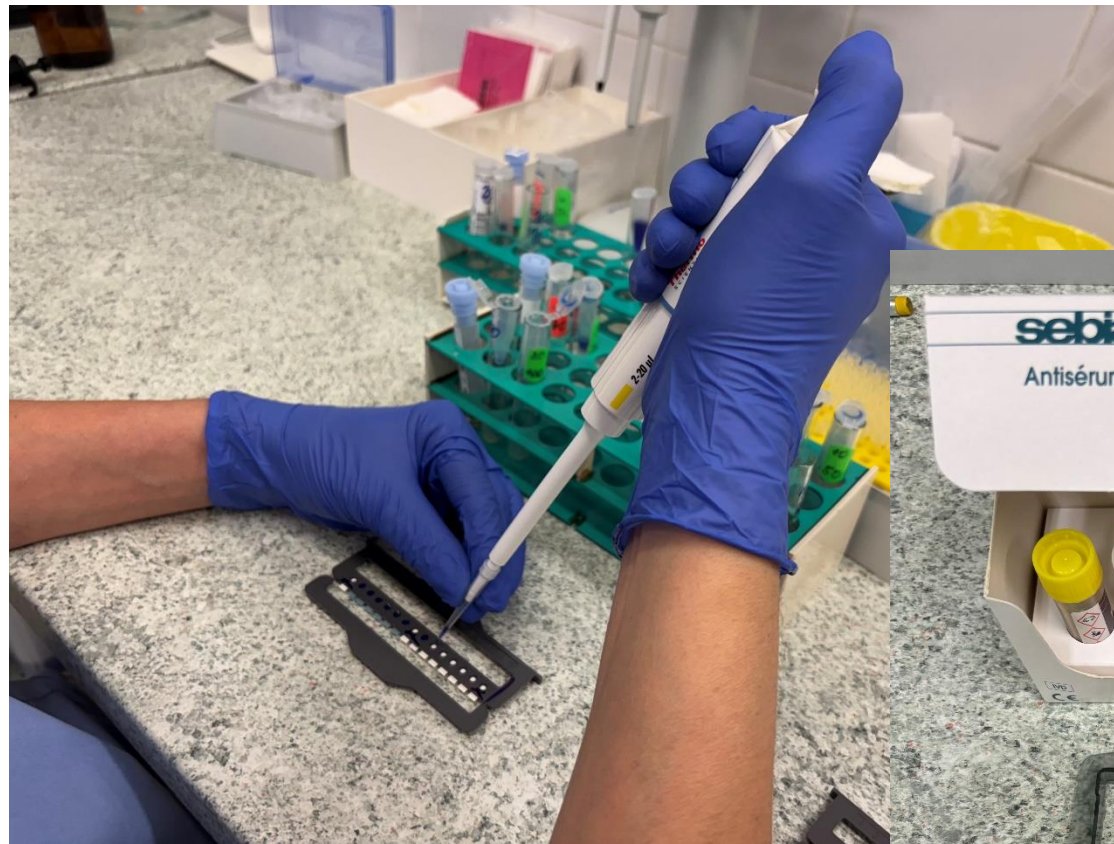
- Separace proteinů elektroforézou na agarózovém gelu.
- Imunofixace (imunoprecipitace) proteinů rozdělených elektroforézou – příslušné migrační stopy jsou překryty jednotlivými antiséry. Antiséra difundují do gelu a precipitují přítomné antigeny. Proteiny v referenční stopě jsou fixovány fixačním roztokem.
- Neprecipitované, rozpustné proteiny jsou z gelu odstraněny odsátím a promytím. Komplex antigen- protilátka zůstává v gelové matrix.
- Precipitované proteiny jsou vizualizovány obarvením

# Gelová elektroforéza: zpracování

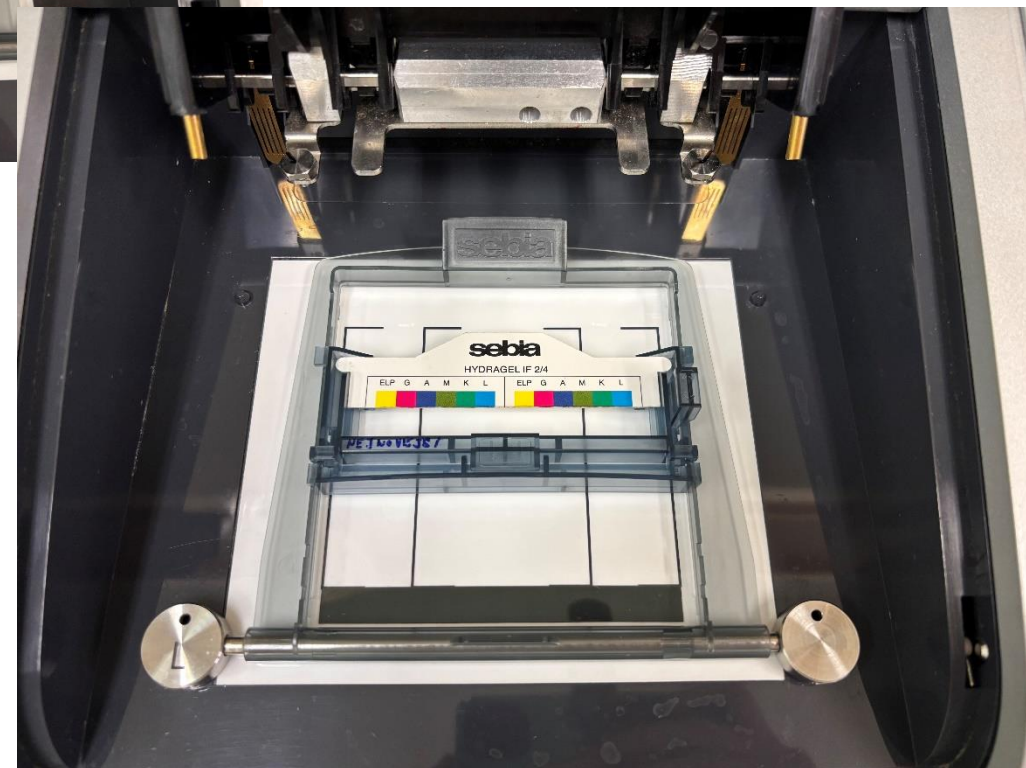
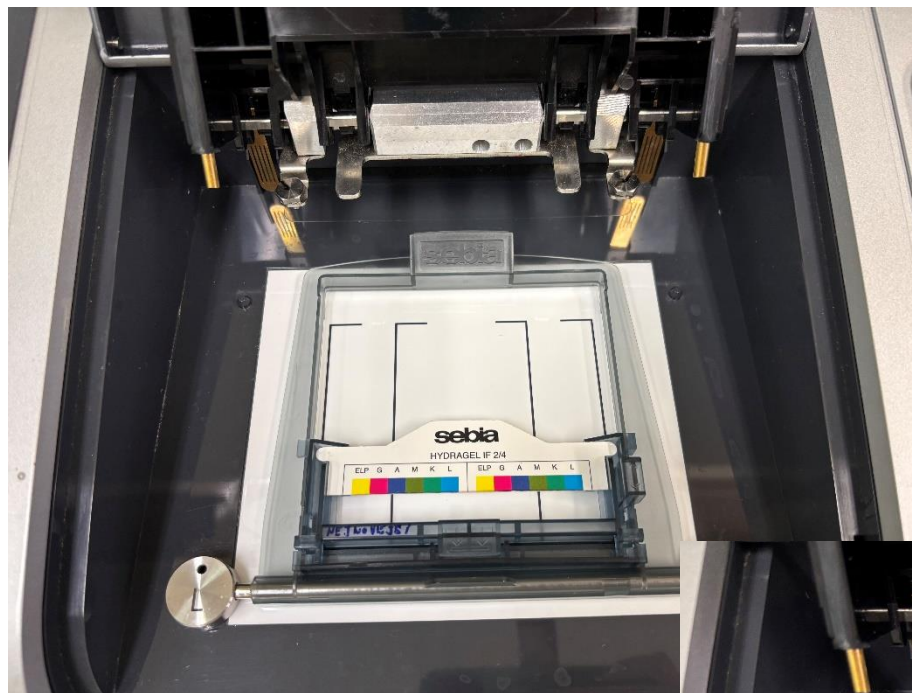




# Imunofixace: zpracování



# Imunofixace: zpracování

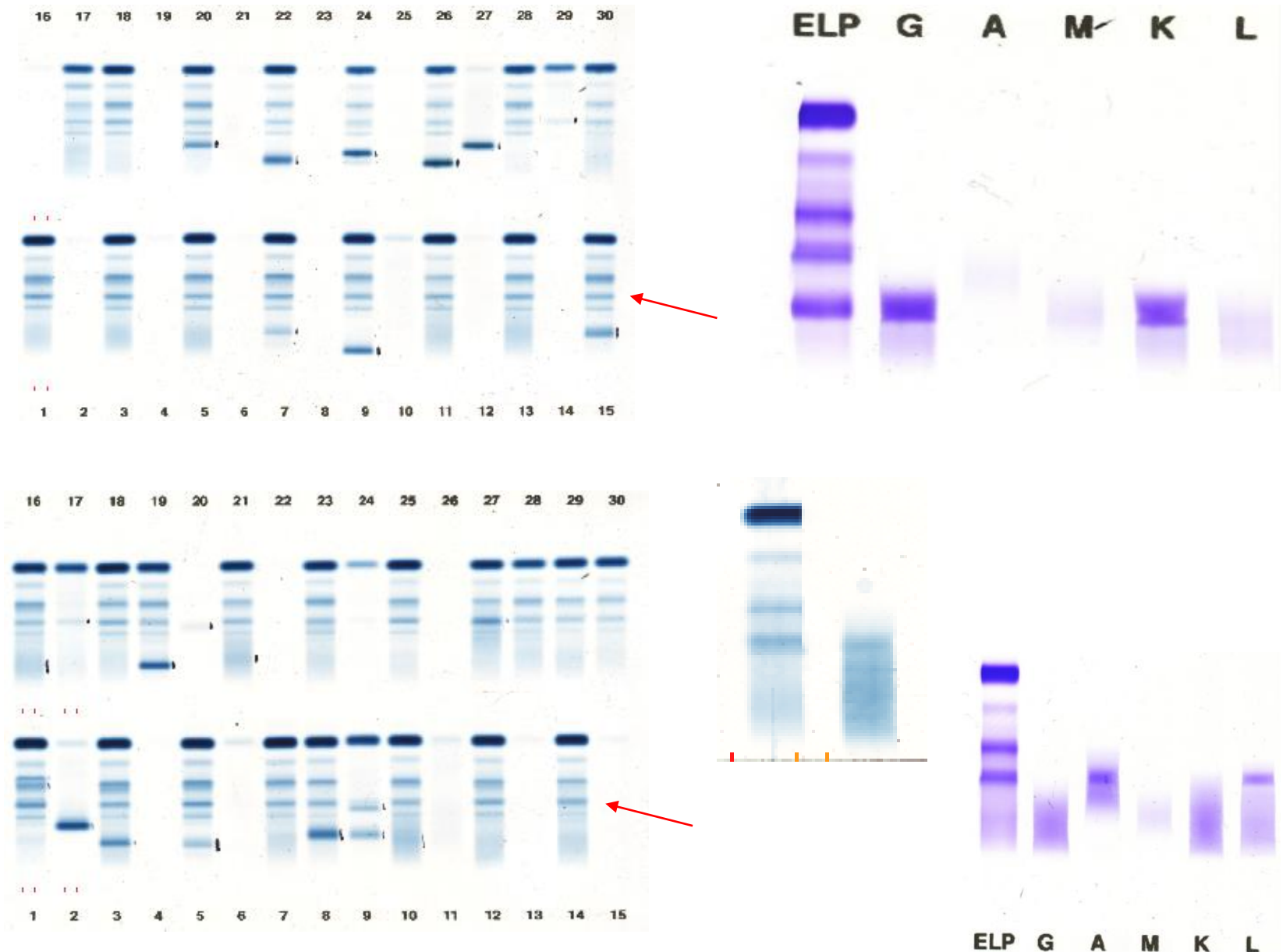




Hodnocení  
elektroforézy:

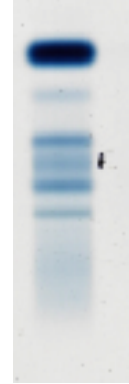
Pentafixace

Imunofixace

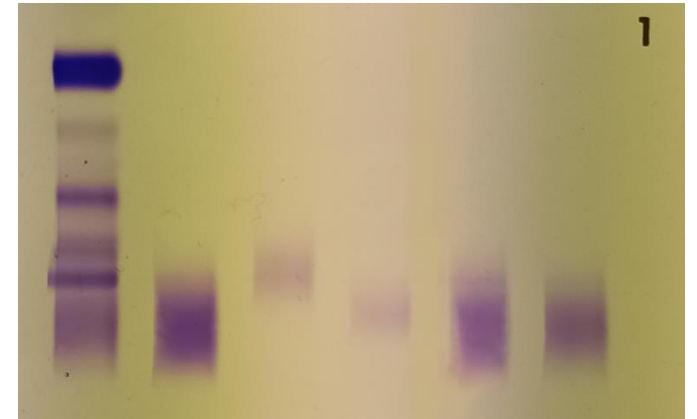
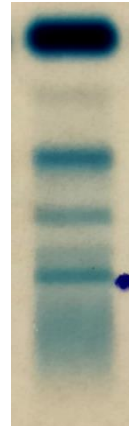


# Hodnocení elektroforézy

- Hemolýza = 1250 mg/l (norma 0-50)

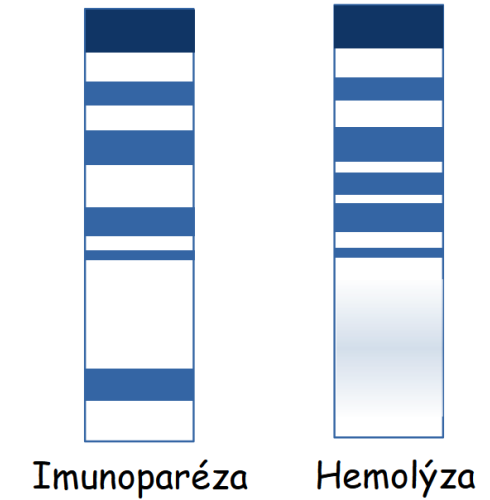
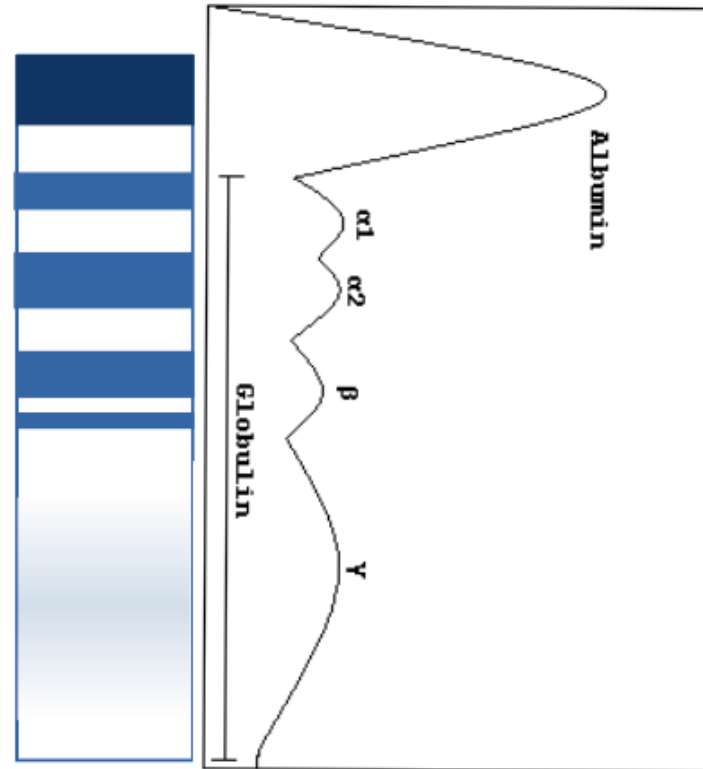


- Fibrinogen (plazma)



# Hodnocení elektroforézy

- NATIVNÍ ELEKTROFORÉZA



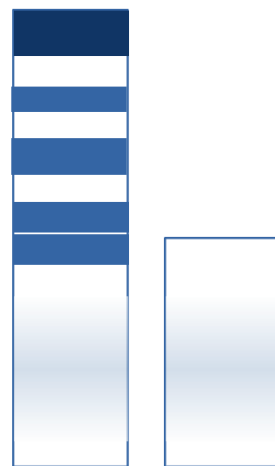
## Imunoparésis

- izolované zvýšení jednoho typu imunoglobulinu (paraproteinu) se současným snížením ostatních imunoglobulinů

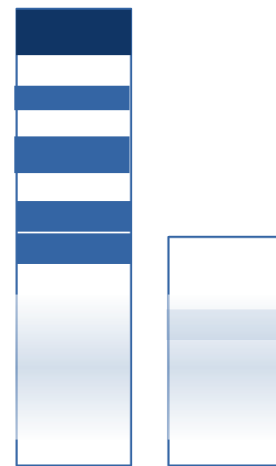
## Hemolýza

- při silné hemolýze se vytváří samostatný band mezi  $\alpha 2$  a  $\beta 1$  zónou

# Hodnocení pentafixace



Elfo Pentavalentní antisérum

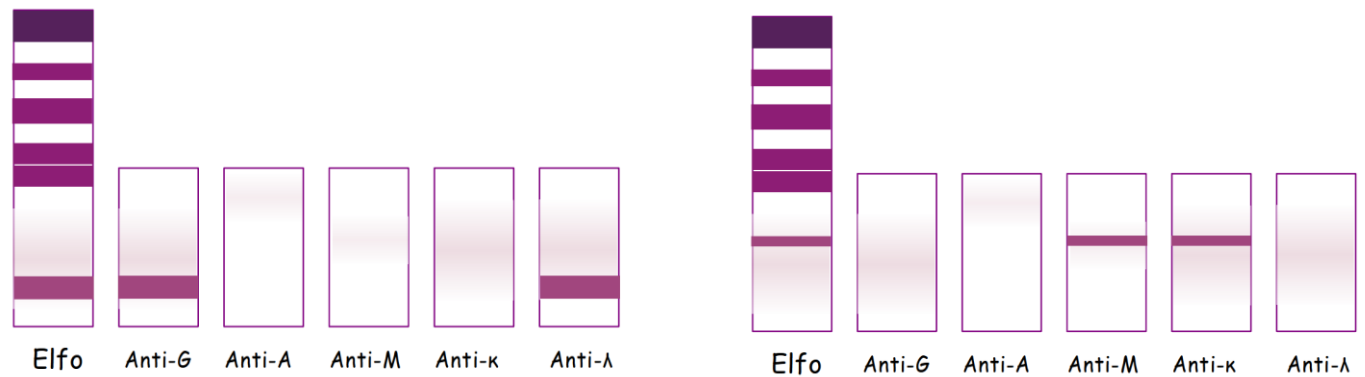
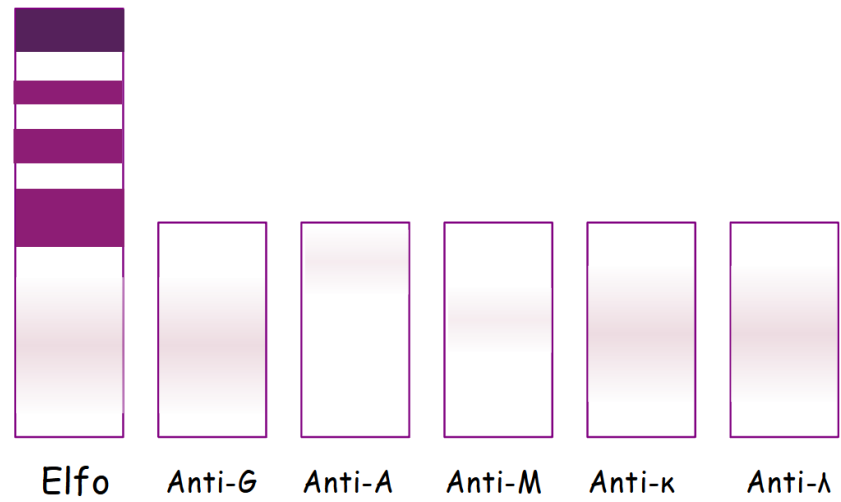


Elfo Pentavalentní antisérum



Elfo Pentavalentní antisérum

# Hodnocení imunofixace



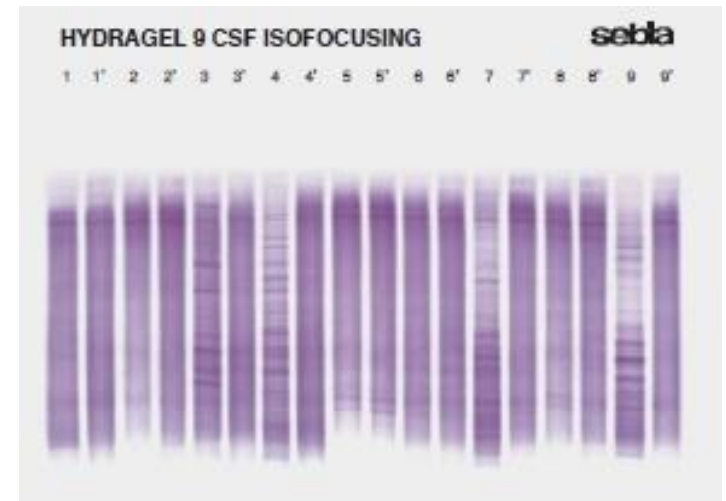
# Izoelektrická fokusace

- elektroforetická separační metoda, při níž dochází k dělení biomolekul **v gradientu pH** dle jejich izoelektrického bodu
- gradientu se dosahuje pomocí amfolytů obsahujících směsi  $\text{NH}_2^+$  a  $-\text{COOH}^-$ , které se ve stejnosměrném elektrickém poli seřadí podle svého izoelektrického bodu a vytvoří tak gradient pH (cca 5-10)
- **izoelektrický bod** = hodnota pH při níž je pro danou látku vyvážen počet kladných a záporných nábojů, takže se **molekula jeví navenek jako neutrální** = izoelektrické pH = pI
- **pI je hodnota pH, při které se molekuly vlivem elektrického pole nepohybují**
- dělené látky v průběhu IF putují po svých izoelektrických bodů, kde fokusují = koncentrují se



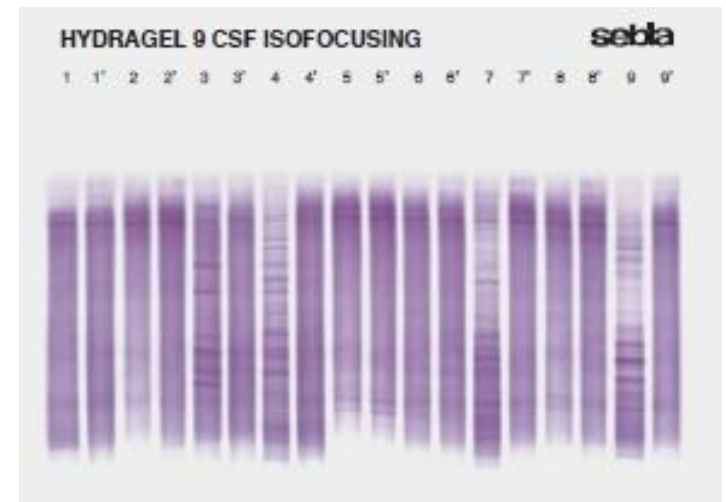
# Izoelektrická fokusace

- proteiny vykazují značné rozdíly v izoelektrických bodech: většina má pI v pH 4 – 7
- obecně by se vzorky neměly aplikovat na plochy, kde se očekává jejich fokusace
- aby se proteiny chránily před působením extrémních hodnot pH, neměly by se aplikovat blíže než 1 cm od elektrod
- proteiny můžeme před extrémy pH chránit také tím, že gradient pH vytvoříme před aplikací vzorku (pre-migrace)

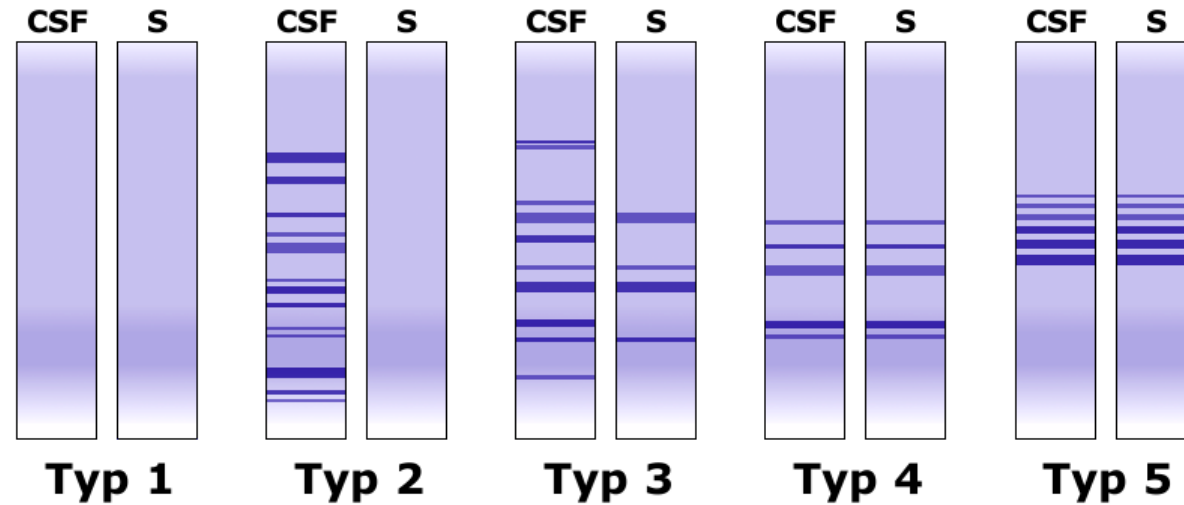


# Izoelektrická fokusace: použití

- Přítomnost intrathekálního IgG je významnou informací k diagnóze zánětlivého onemocnění CNS, jehož příčinou je např. rostroušená skleróza. Oligoklonální pásy nacházíme u více než 95 % těchto pacientů.
- Oligoklonální proužkování není ani diagnostické ani specifické pro toto onemocnění, ale je široce používáno jako podpůrná informace a považováno za základní vyšetření dle konsenzu Evropské komise pro sklerózu multiplex. Potvrzuje diagnózu u pacientů s klinickými příznaky choroby a pomáhá při diagnostice pacientů s nepřesvědčivými klinickými projevy.
- Dále lze pásy prokázat u chronických zánětů CNS, neuroborelióze, neurosyfilis atd.



# Izoelektrická fokusace: hodnocení



**Typ 1** – v séru i v moku pouze polyklonální IgG – normální nález;

**Typ 2** – oligoklonální proužky pouze v likvoru – lokální syntéza IgG (např. u roztroušené sklerózy);

**Typ 3** – oligoklonální proužky v likvoru a další oligoklonální proužky v likvoru i v séru – lokální syntéza IgG a produkce protilátek v organismu (systémové onemocnění)

**Typ 4** – identické oligoklonální proužky v séru i moku (tzv. „zrcadlový“ obraz proužků v séru a v likvoru – dochází k průniku protilátek z krve do likvoru) – systémová imunitní aktivace bez lokální syntézy IgG v CNS;

**Typ 5** – identické monoklonální proužky v séru i moku v krátkém úseku pH gradientu, jde o přítomnost monoklonálního paraproteinu v likvoru sérového původu (myelom, monoklonální gamapatie) – paraproteinový obraz.

## Izoelektrická fokusace: hodnocení

- Metoda zahrnuje izoelektrofokusaci na agarózovém gelu, následovanou immunofixací s anti-IgG antisérem.
- Vzorky CSF a séra od téhož pacienta jsou pak vizuálně porovnány.
- Citlivost metody dovoluje analýzu CSF bez předchozího zahušťování.
- K potvrzení intratékální syntézy Ig je nutno analyzovat sérum a mozkomíšní mok paralelně ve stejných koncentracích, aby byl demonstrován rozdíl v distribuci IgG.
- Fyziologicky mají imunoglobuliny v séru i mozkomíšním moku polyklonální charakter a vyjadřují heterogenitu individuálních protilátek produkovaných jako odpověď na nejrůznější antigeny, s nimiž se jedinec setkal.

# Izoelektrická fokusace: hodnocení

- Intratékálně produkované protilátky se vyznačují pouze omezenou (oligoklonální) heterogenitou, což se při izoelektrické fokusaci projeví jako izolované proužky, které nejsou patrné při analýze séra.
- Z toho vyplývá nutnost provádět současně analýzu imunoglobulinů likvoru i séra.
- Srovnává se přítomnost či nepřítomnost identických pruhů IgG v séru a moku; počet a lokalizace proužků nemá diferenciálně diagnostický význam.

# Detekce likvorey

- **Likvorea** = výtok mozkomíšního moku/likvoru, k němuž dochází při poranění lebky
- Někdy je důležité určit, zda u pacienta po úrazu hlavy je sekret vytékající z nosu jen zánětlivý exsudát z nosní sliznice nebo mozkomíšní mok
- V takovém případě se jedná o závažný stav s komunikací likvorových cest a nosní dutiny, ohrožující pacienta přestupem bakteriální flóry na mozkové blány (meningy)
- Likvor může odtékat např. z dutiny nosní či ucha
- Pro průkaz z specifické parametry: beta-trace protein, beta-2-transferin
- Srovnání hladin v séru pacienta a v jiné biologické tekutině (sekrety, výtoky z nosu, tekuté, nebo nasáté do tamponů)

# Beta-trace protein

- Prostaglandin D syntáza
- V likvoru jsou koncentrace 20-30 x vyšší než v séru
- U nás stanovení nefelometricky (Atellica, Siemens)
- BTP v sekretu:
  - $< 0,7$  mg/l – přítomnost likvoru nepravděpodobná
  - $\geq 1,3$  mg/l – přítomnost likvoru pravděpodobná
  - $0,7-1,29$  mg/l -> poměry
- BTP sekret/sérum  $< 2$  - přítomnost likvoru nepravděpodobná
- BTP sekret/sérum  $\geq 2$  - přítomnost likvoru nepravděpodobná

# Beta-2 transferin

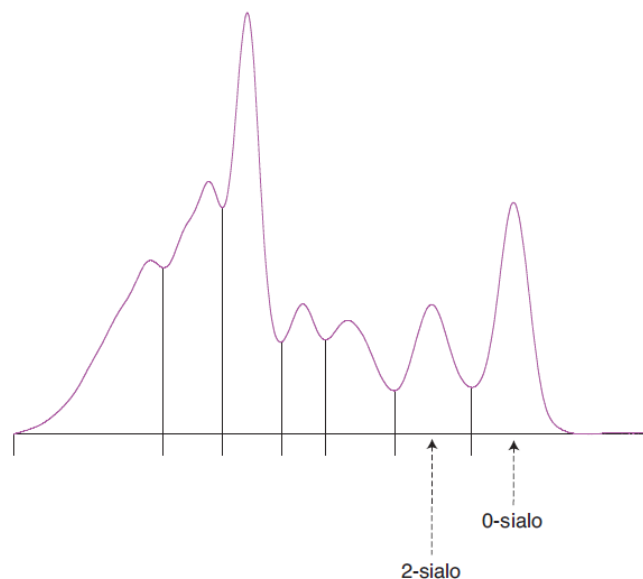
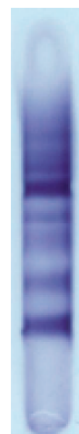
- Detekce pomocí elektroforézy, Sebia, Hydrasys
- Beta-2-transferin je desializovaná forma transferinu a nachází se pouze v likvoru (ani v séru, ani v slzách, ....). Přítomnost beta-2-transferinu lze pokládat za specifický průkaz likvoru nebo jeho příměsi
- Ze sérového transferinu se v likvorových prostorách odštěpí zbytky kyseliny sialové (mozkovou neuraminidázou), vzniká asialotransferin
- Vyhodnocení:
  - Vizuální pozorování elektroforetického záznamu umožňuje detekci desialylované frakce transferinu (nebo-li o-sialo frakce) ve vzorcích sekretu.
  - Když je desialylovaná frakce transferinu více vizualizovaná, než frakce disialo transferinu, je vzorek pozitivní.



# Beta-2 transferin: hodnocení

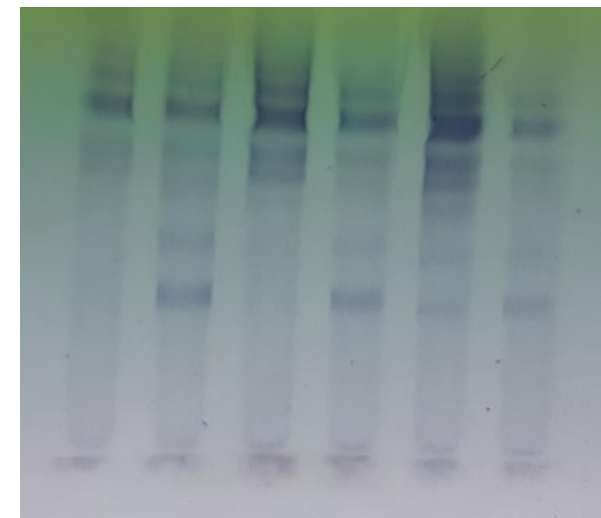
- Vizuální pozorování elektroforetického záznamu umožňuje detekci desialylované frakce transferinu (nebo-li o-sialo frakce) ve vzorcích sekretu.
- Když je desialylovaná frakce transferinu více vizualizovaná, než frakce disialo transferinu, je vzorek pozitivní.

Cerebrospinal fluid sample (= positive control)

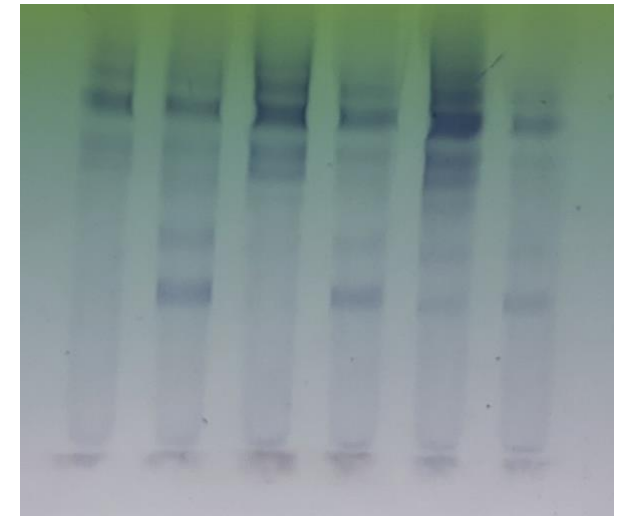
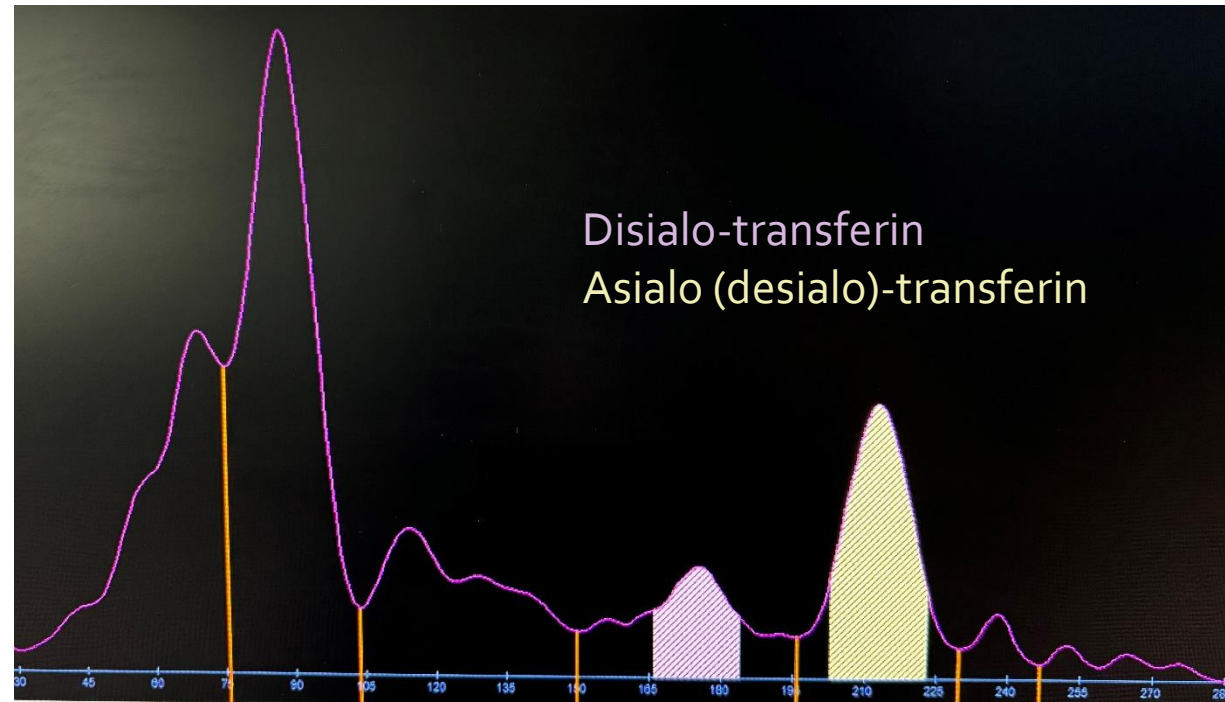


Fractions	%
2-sialo	9.7
0-sialo	14.4

$$R = \frac{0\text{-sialo}}{2\text{-sialo}} = 1.49$$



# Beta-2 transferin: hodnocení



Děkuji za  
pozornost