

1 Elektroforetické metody

Princip

Rozdělení proteinů (nejčastěji krevních bílkovin) na základě jejich pohyblivosti v elektrickém poli. Po tomto kroku většinou navazují další metody založené na reakci antigen – protilátka. Důležité je, že bílkoviny se dělí podle povrchového náboje. K realizaci elektroforetických metod je nutný zdroj stejnosměrného elektrického proudu, speciální elektroforetické vany, vhodný pufr a vhodný nosič. Jako nosič se v minulosti používal papír, acetatcelulózní membrána nebo agar, dnes se prakticky výlučně používá agaróza nebo polyakrylamidový gel.

Rozdíl mezi agarózou a agarem spočívá v tom, že agar je nehomogenní směs polysacharidů získaných z mořských řas, zatímco agaróza je homogenní, po chemické stránce se jedná o polymer složený z disacharidových jednotek – agarobiózy. Agaróza se pro elektroforézu používá v koncentraci 0,5 – 2 %. Při této koncentraci tvoří gel, který vyhovuje požadavkům, pouze je křehký, což mírně komplikuje manipulaci.

Polyakrylamid je homogenní, hydrofilní, má výborné mechanické vlastnosti, nízkou elektroosmózu a nízkou absorpci. Lze ho připravit v různé hustotě, zkoumané látky se potom dělí nejen podle náboje, ale i podle velikosti molekul. Nevýhodou je pouze toxicita základního monomeru.

Imunoelektroforéza: jedná se o elektroforetickou separaci následovanou imunoprecipitací rozdělených proteinů specifickými protilátkami, většinou v prostředí agarózy. V této metodě je tedy obsažena i imunologická reakce antigen – protilátka. Metoda imunoelektroforéza (imunoelfo) byla poprvé publikována v roce 1952 a od té doby našla rozsáhlé uplatnění v imunologickém výzkumu i diagnostice. V současnosti se nejvíce používá při stanovení paraproteinu (čili neúplných řetězců imunoglobulinů) při monoklonálních gamapatiích.

Výhody a nevýhody: metoda imunoelektroforézy je nenáročná na čas i vybavení, není drahá. Pouze proces odečítání a interpretace výsledků je do značné míry závislý na zkušenostech pracovníka, o složitosti této problematiky svědčí fakt, že o imunoprecipitaci proteinů existují celé samostatné monografie.

Imunofixace: je modifikací imunoelektroforézy; spočívá v tom, že po elektroforéze se na agarózový gel položí maska s výřezy. Otvory se naplní příslušnými protilátkami anti IgG, anti IgA, anti IgM, anti kappa, anti lambda. Vzniklé precipitační linie se pak porovnávají se standardním sérem a lze tak posuzovat odchylky ve smyslu poklesu nebo nárůstu jednotlivých tříd protilátek, resp. lehkých řetězců.

Využití elektroforetických metod:

- orientační vyšetření bílkovin krevní plasmy: zde se nejčastěji posuzují linie odpovídající albuminu, α_1 , α_2 , β a γ globulinu. Při imunologických vyšetřeních lze touto metodou zachytit zvýšení, resp. snížení γ globulinové frakce.
- rozdělení antigenů pro imunoblotting
- obecně dělení bílkovin v experimentálních studiích

ÚLOHA 10: Raketová elektroimunodifuze podle Laurella

Princip

Zkoumaný antigen je stejnosměrným elektrickým proudem unášen po gelu s protilátkou. Vazbou antigenu a protilátky vznikají imunokomplexy, které se projeví jako precipitát v podobě tzv. raket. Podstatou techniky je putování antigenu a tvorba imunokomplexů až do vzdálenosti, ve které je veškerý antigen ze vzorku vyváznán protilátkou v gelu. Jde o jednu z nejpřesnějších kvantitativních elektroimunodifuzních metod.

Výhody a nevýhody

Metoda je poměrně přesná a jednoduchá na provedení. Vyžaduje však nákladné přístrojové vybavení. Je také nutné počítat s nejméně hodinovou rezervou při elektroforetické fázi a vyhodnocení výsledku je možné až po určité době.

Chemikálie a roztoky

1. Komerční lidské sérum obsahující IgM pro kalibraci (Orion Diagnostica)
Obsah IgM je 1,25g/l.
2. Protilátka - sérum s anti-IgM protilátkami
3. Fyziologický roztok
4. Agaróza v práškové formě
5. Borát-fosfátový pufr (pH 6,8)
6. Roztok Coomassie blue - malé množství rozpuštěné v dH₂O
7. Barvicí roztok
225 ml CH₃OH + 25 ml CH₃COOH + 0,25 g amidočerni 10B
8. Odbarvovací diferenční roztok
CH₃OH : CH₃COOH - 10:1

Vzorek: Komerční lidské sérum obsahující neznámé množství IgM (Orion Diagnostica)
Vystupuje jako antigen.

Přístroje a pomůcky

Skleněné plotny 5x5 cm, skleněná pipeta, korkovrt na vysekávání jamek, vývěva, zdroj napětí, elektroforetické komory, Petriho misky na vlhkou komůrku, filtrační papír.

Skleněné plotny s agarózovým gelem:

1. *Vyvážíme podložku na nalévání do vodorovné polohy.*
2. *Skleněnou plotnu (5x5 cm) očistíme alkoholem a necháme oschnout.*
3. *Přípravenou skleněnou pipetu několikrát propláchneme horkou vodou.*
4. *Na plotnu naneseme skleněnou pipetou 2,4 ml 1% roztoku agarózy v borát-fosfátovém pufru s anti-IgM sérem.*
5. *Gel necháme několik minut zatuhnout na kalibrované vodorovné ploše.*
6. *Z Petriho misky a vlhkého filtračního papíru připravíme vlhkou komůrku. Do ní umístíme skleněnou plotnu s agarózou, aby tato nevyschla.*

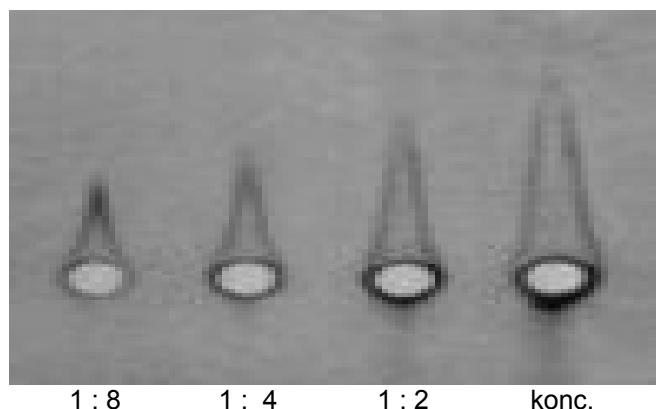
Postup (vlastní práce) - pracujeme ve dvojicích

- Ze zásobního komerčního séra o známé koncentraci IgM si připravíme další ředění.
 - do zkumavek 2. a 3. napipetujeme 10 μ l fyziologického roztoku
 - do zkumavky 1. napipetujeme 20 μ l séra se známou koncentrací IgM
 - ze zkumavky 1. přenášíme 10 μ l do zkumavky 2., důkladně promícháme a přeneseme 10 μ l do zkumavky 3.
 - do další zkumavky si připravíme směs 10 μ l ze zkumavky 3. a 5 μ l roztoku coomassie blue

Označení zkumavky	1.	2.	3.	4.
Coomasie Blue	-	-	-	5 μ l
Fyziologický roztok	-	10 μ l	10 μ l	-
Antigen (sérum)	20 μ l	-	-	-

Ředění:	-	2x	4x	-
Koncentrace [g/l]:				
Celkový objem:	10 μ l	10 μ l	10 μ l	15 μ l

- Podle šablony vysekáme do gelu s protilátkou řadu pěti jamek. Do jamek nanese:
 - do prvních tří jamek 5 μ l ze zkumavek 1.-3.
 - do čtvrté jamky 5 μ l séra o neznámé koncentraci
 - do páté jamky 5 μ l naředěného kontrolního séra smíchaného s roztokem coomassie blue ze zkumavky 4.
- Do elektroforetických komor nalijeme borát-fosfátový pufr, na hranici mezi katodou a anodou položíme připravená sklíčka a ze dvou protilehlých stran (od katody a anody) přiložíme na kraj gelu filtrační papír nasátý borát-fosfátovým pufrem za účelem vedení elektrického proudu.
- Každou komoru obsahující tři sklíčka zakryjeme a zapojíme elektrický obvod tak, aby do každé elektroforetické komory vedl proud o velikosti 60 mA (20 mA na sklíčko). Elektroforéza bude probíhat cca 1 hodinu, přičemž její průběh budeme sledovat na séru označeném roztokem coomassie blue.
- Po skončení elektroforézy pereme skla nejvýše 2 minuty ve fyziologickém roztoku, zabalíme je do chromatografického papíru navlhčeného fyziologickým roztokem a přes noc sušíme při pokojové teplotě.
- V dalším cvičení sejmeme ze sklíček papír, skla opereme pod tekoucí vodou a barvíme barvicím roztokem do dostatečného obarvení linií. Pozadí odbarvíme diferenačním roztokem. Nakonec opereme v destilované vodě a usušíme bez papíru.

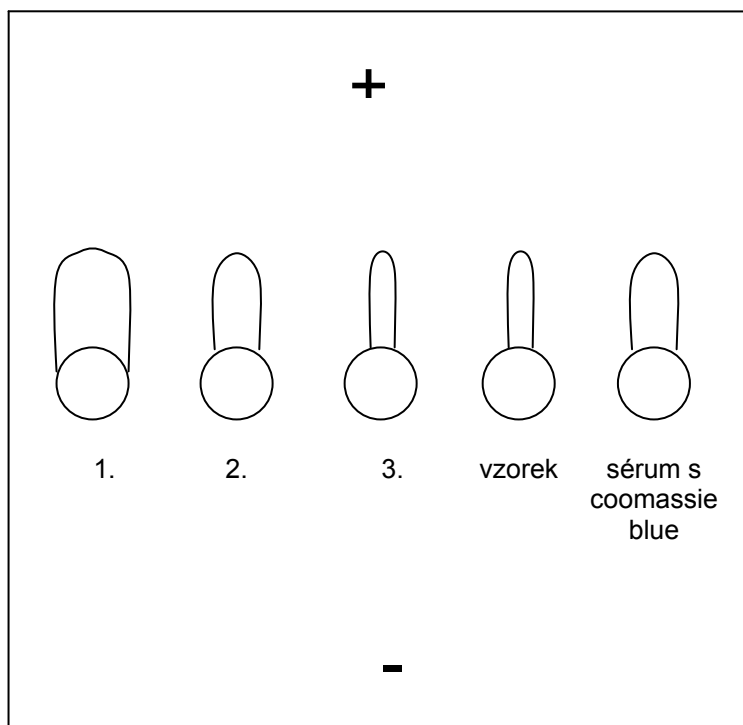


Hodnocení

Plocha popř. výška raketky po odečtení startovací jamky je úměrná koncentraci antigenu.

Hodnoty výšky/plochy precipitačních útvarů (cm²) u prvních tří jamek vyneste do bodového grafu proti hodnotám koncentrace séra v příslušné jamce a vyneste kalibrační křivku s rovnicí regrese a hodnotou spolehlivosti

Hodnotu výšky/plochy precipitačního útvaru u čtvrté jamky (lidské sérum o neznámé koncentraci IgM) dosadte do rovnice regrese a vypočítejte koncentraci IgM.



Výstup

- 1) Tabulku s hodnotami výšky/plochy precipitačních útvarů různých koncentrací kontrolního séra a vzorku.
- 2) Kalibrační graf závislosti výšky/plochy precipitačních útvarů na koncentraci kontrolního séra s rovnicí regrese a hodnotou spolehlivosti.
- 3) Výpočet koncentrace IgM ve vzorku lidského séra.