



Elektroforetické metody

Bi5220c Imunologie - cvičení 2021

Elektroforetické metody - princip

- Rozdělení proteinů na základě jejich pohyblivosti v elektrickém poli (náboj, velikost)
- Gely:
 - Agar - nehomogenní směs polysacharidů z mořských řas
 - Agaróza – homogenní; polymer složený z disacharidových jednotek (agarobiózy); používá se v koncentraci 0,5 – 2% (křehký)
 - Polyakrylamid – homogenní, hydrofilní, má výborné mechanické vlastnosti, nízkou elektroosmózu a nízkou absorpci; základní monomer karcinogenní; používá se v různých koncentracích (2 – 20 %)

Imunoelektroforéza


- Elektroforetická separace následovaná imunoprecipitací rozdělených proteinů specifickými protilátkami, většinou v prostředí agarózy (imunologická reakce antigen – protilátka)
- 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 jsou do značné míry závislé na zkušenostech pracovníka.

Imunofixace

- Modifikací imunoelektroforézy
- 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 (albumin, α_1 α_2 β a γ globulin)
- rozdělení antigenů pro imunoblotting
- obecně dělení bílkovin v experimentálních studiích



**X. Úloha – 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
- Putování antigenu a tvorba imunokomplexů až do vzdálenosti, ve které je veškerý antigen ze vzorku vyváznut protilátkou v gelu
- Výška raketky je úměrná koncentraci antigenu

Chemikálie a roztoky

- Komerční lidské sérum obsahující IgG (*IgG 23 g/l*)
- Protilátka - sérum s anti-IgG protilátkami
- Fyziologický roztok
- *Agaróza*
- Borát-fosfátový pufr (pH 6,8)
- Roztok Coomassie
- Barvicí roztok
(*225 ml CH₃OH + 25 ml CH₃COOH + 0,25 g amidočerni 10B*)
- Odbarvovací diferenciační roztok
(*CH₃OH : CH₃COOH - 10:1*)
- Vzorek - komerční lidské sérum obsahující neznámé množství IgG (*Orion Diagnostica*)

Přístroje a pomůcky

- Skleněné plotny 5x5 cm
- Korkovrt
- Vývěva
- Zdroj napětí
- Elektroforetické komory
- Vlhkou komůrku
- Filtrační papír

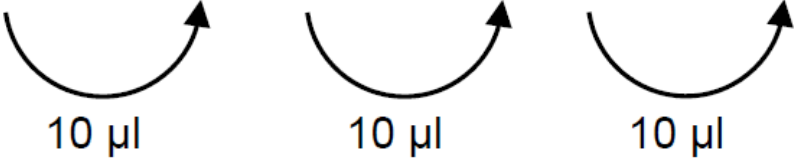
Postup

1. *Vyvážíme podložku na nalévání do vodorovné polohy*
2. *Skleněnou plotnu (5x5 cm) očistíme alkoholem a necháme oschnout*
3. *Na plotnu nanese 2,4 ml 1% roztoku agarózy v borát–fosfátovém pufru s anti-IgG sérem*
4. *Gel necháme několik minut zatuhnout na kalibrované vodorovné ploše*
5. *Z misky a vlhkého filtračního papíru připravíme vlhkou komůrku, do které umístíme skleněnou plotnu s agarózou, aby tato nevyschla*

Postup

6. Ze zásobního komerčního séra o známé koncentraci IgG si připravíme další ředění podle tabulky

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


10 μ l 10 μ l 10 μ l

Ředění:	-	2x	4x	8x
Koncentrace [g/l]:				
Celkový objem:	10 μ l	10 μ l	10 μ l	20 μ l

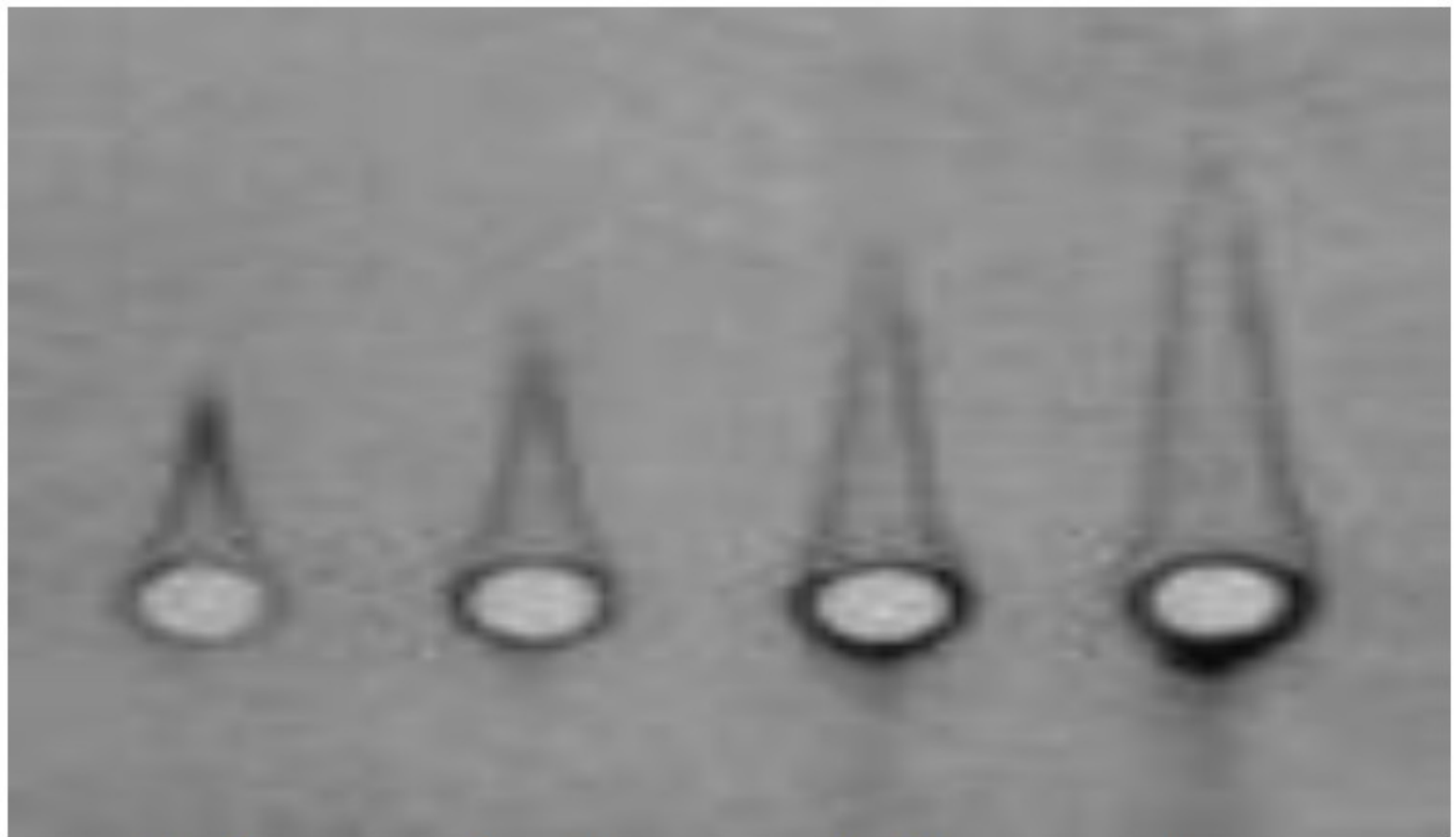
Postup

7. Podle šablony vysekáme do gelu s protilátkou řadu pěti jamek
8. Do jamek nanese me:
 - do prvních čtyř jamek 5 μ l ze zkumavek 1-4
 - do páté jamky 5 μ l séra o neznámé koncentraci
9. 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
10. 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)
11. Elektroforéza bude probíhat cca 1 hodinu, přičemž její průběh budeme sledovat na séru označeném roztokem Coomassie blue

Postup

12. 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
13. V dalším cvičení sejmeme ze sklíček papír, skla opereme pod tekoucí vodou a barvíme barvicím roztokem do dostatečného obarvení linií
14. Pozadí odbarvíme diferenciačním roztokem
15. Nakonec opereme v destilované vodě a usušíme bez papíru

Hodnocení a výstup



1 : 8

1 : 4

1 : 2

konc.

Hodnocení a výstup

- **Kalibrační graf** závislosti výšky precipitačních útvarů na koncentraci kontrolního séra **s rovnicí regrese a hodnotou spolehlivosti**
- **Tabulka** s hodnotami výšky jednotlivých precipitačních útvarů, hodnotami koncentrací kontrolního séra a výpočtem koncentrace IgG ve vzorku lidského séra