

Elektroforéza

Rozdělení proteinů na základě pohyblivosti v el. poli

K realizaci je nutné mít:

- Stejnoseměrný el. proud
- Speciální elektroforetické vany
- Vhodný pufr a nosič (dříve papír, acetátcelulóza, agar) nyní agaróza polyakrylamidový gel

Elektroforéza v imunologii

molekuly s (-) nábojem → **k anodě (+)**

(+) nábojem → **ke katodě (-)** proti zrychlení působí **odpor prostředí**

pohyblivost molekul je dána:

1. velikostí povrchového náboje

- elektrochemicky se uplatňují pouze *skupiny na povrchu globulární* ~

KONFORMAČNÍ STRUKTURA

- velmi silně se mění *vlastnosti při denaturaci* ~ na povrch se dostanou další skupiny → *mění se elektrochemické vlastnosti*

2. velikostí molekul

- větší se pohybují pomaleji ~ *odpor prostředí*

- záleží i na *velikosti síta nosiče*

3. tvaru molekul

- *kulovité* se pohybují rychleji

4. podmínkami prostředí

* typ nosiče ~ *agaróza, polyakrylový gel* * hodnota pH tlumivého prostředí /*pufry*/

* iontové složení prostředí

- *2 způsoby elektroforézy:*

- **volná** ~ volný elektrolyt, elektrody volně v roztoku

- *po vypnutí proudu molekuly difundují zpět*

→ nákladné a nepřesné

- **zónová** ~ zvýšení viskozity prostředí, ve kterém se elektroforéza provádí

(*např. ve vodě větší rychlost difuze než ve škrobu*)

- vytváří se tedy **pórovité gely** - škrob, acetylcelulóza, agar, polyakrylamid, agaróza

Postup: - **směs bílkovin se nanese do míst startu, pustí se el. proud** → **bílkoviny se detekují**

- udržování konst. pH → dělené molekuly během elektroforézy nemění náboj

využití

- kvalitativní a kvantitativní určení, popř. i pro separaci

dělení: • podle náboje

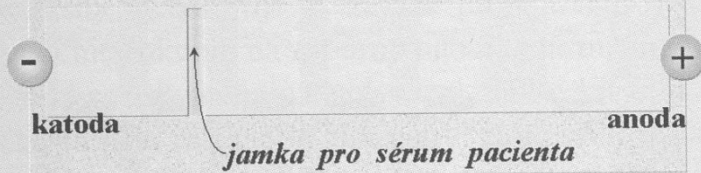
• podle velikosti molekul (M_r)

Imunoelektroforetické metody

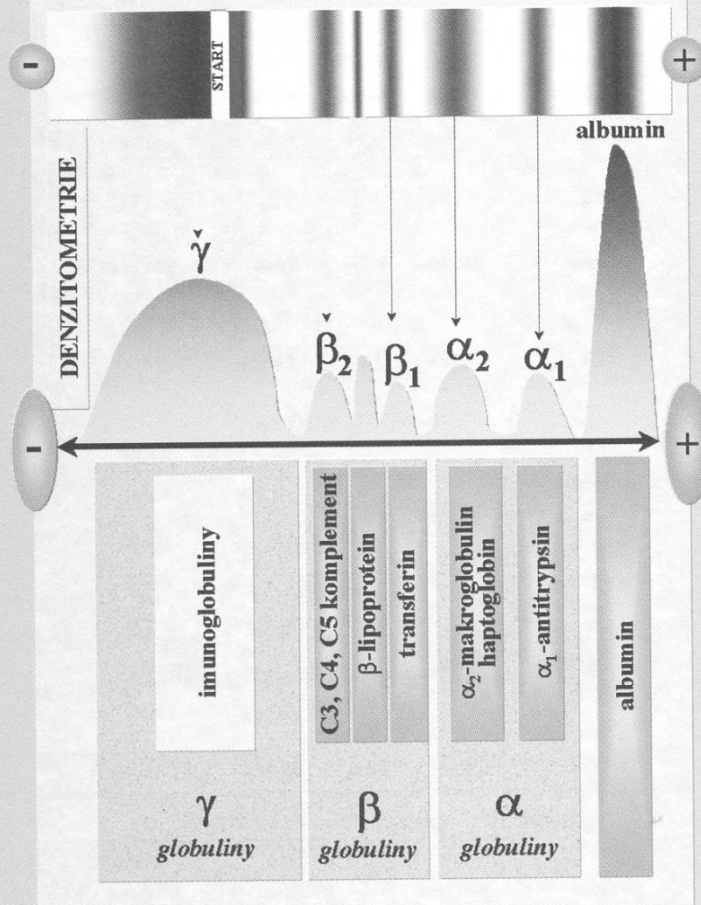
- kombinace metod elektroforetických a imunodifúzních
- **Bílkoviny se dělí v závislosti na molekulové váze a elektrickém náboji jednotlivých molekul v přítomnosti vhodného pufru a na vhodném nosiči.**
- **Dělení séra**
 - jednotlivé obloučky znamenají jednotlivé bílkoviny
 - detekce až 35 sérových proteinů

ELEKTROFORÉZA

nosič elektroforézy



ELEKTROFORETOGRAM



Elfo sérových proteinů

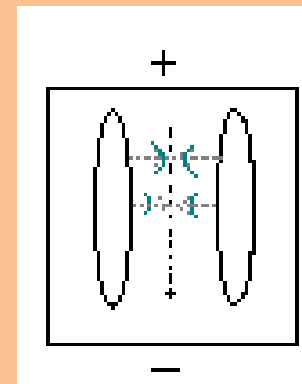
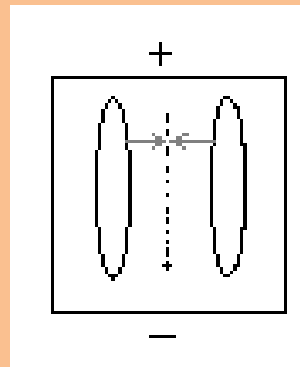
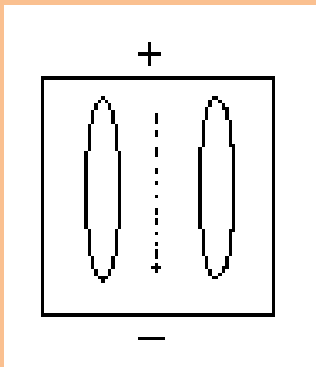
Při běžné elfo se sérum dělí na zónu albuminu, $\alpha - 1$, $\alpha - 2$, β , γ globulinů. Stanovení zastoupení jednotlivých frakcí může mít význam při hodnocení stádia zánětlivého procesu. Při akutních zánětech stoupá zastoupení $\alpha - 1$, později i $\alpha - 2$, při chronických zánětech dochází ke zvýšení zastoupení γ globulinů a poklesu albuminu

Imunoelektroforetické metody

- imunoelektroforéza *podle WILLIAMSE a GRABARA*
- *RAKETOVÁ* imunoelektroforéza
- *PROTISMĚRNÁ* imunoelektroforéza
- *DVOJROZMĚRNÁ* imunoelektroforéza

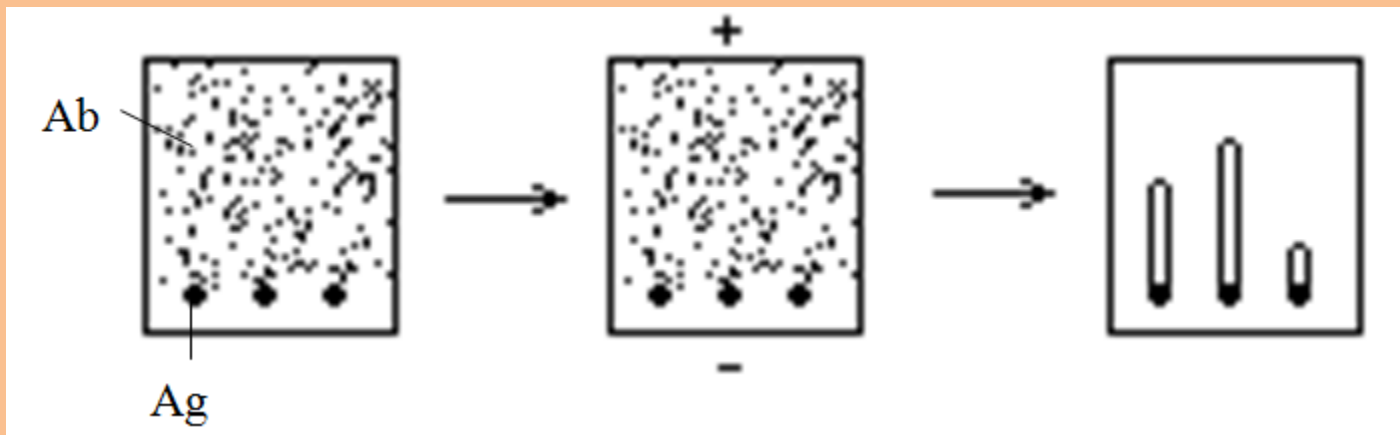
Imunoelektroforéza podle WILLIAMSE a GRABARA:

- - 1953 Williams a Grabar
- - 2 stupně: 1. **nalití destičky** (agarózní gel s pufrem)
vytvoření 2 žlábků a nanesení Ag mezi ně
- po rozdělení elektroforézou se do žlábků 2. napipetují **protilátky**
- inkubace 48 hodin v lednici → dochází **k DIFUZI**
- → v místě ekvivalence se vytváří **PRECIPITAČNÍ obloučky**



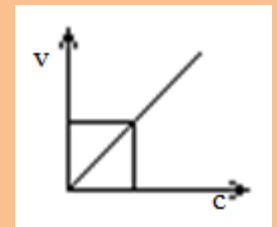
Raketová

- - *Laurell 1966*
- - kombinace jednoduché radiální imunodifúze s elektroforézou
- - monospecifická Ab + jeden Ag /či směs Ag/



Ab v gelu

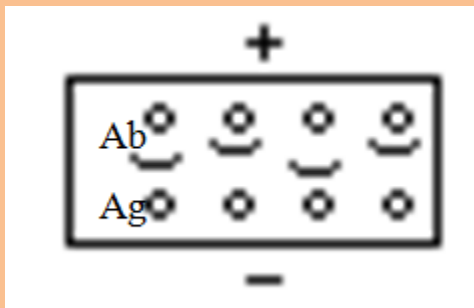
užívá se pro **zjišťování koncentrace Ag** –
koncentrace je přímo úměrná výšce „raketky“



kalibrační křivka:

PROTISMĚRNÁ imunoelektroforéza

- obměna jednosměrné dvojité imunodifúze, kdy je ***pohyb urychlován el. proudem***



2 řady jamek:

Ab...vždy k (-)

Ag...pouze ty se (-) nábojem

- v místě ekvivalence ***vzniknou precipitační obloučky***

DVOJROZMĚRNÁ imunoelektroforéza

- vypracována nezávisle na sobě : 1965 Laurell a Laurellová
1966 Clair a Frieman
- postup: • nalití čistého gelu + Ag – elektroforéza, rozřeže se



- nanese na čisté sklíčko a zalije se gelem, který obsahuje **rozptýlené polyspecifické protilátky**:



- v místě ekvivalence se vytvoří **precipitační útvary** – výška a plocha útvaru je úměrná koncentraci Ag:



v séru lze detegovat až 50 proteinů

Využití těchto metod:

	kvalitativní	kvantitativní
Williams		
raketová		
protisměrná		
dvojrozměrná		

Využití těchto metod:

<i>Metoda</i>	<i>KVALITATIVNÍ</i>	<i>KVANTITATIVNÍ</i>
<i>1.</i>	++	-
<i>2.</i>	-	++
<i>3.</i>	++	-
<i>4.</i>	++	+

legenda:

++...velmi vhodná

+.....vhodná

-.....nevhodná

Imunoelektroforetické metody

- **Využití:** Imunoelfo séra se v současné době používá výhradně k průkazu **monoklonálního imunoglobulinu v lidském séru – paraproteinu – monoklonální gamapatie**. Je vždy produkován klonem buněk vycházející z jedné plazmatické b., mající genetickou informaci pro tvorbu jedné variabilní oblasti lehkých a těžkých řetězců a jedné třídy Ig molekuly. Na rozdíl od imunoglobulinů běžného séra s velkým mn. různých variabilních oblastí Ig molekul.

Využití imunoelfo séra

- Při podezření na monokl. gamapatii se stanovuje mn. mono,-bi,-nebo oligoklonálních protilátek, které jsou produkty jednoho nebo několika málo patologicky zmnožených kmenů B lymfocytů
- **Paraprotein** se nachází. 1. u nemocných s myelomem (nádor vycházející z plazmatických buněk) 2. při jiných malignitách lymfatického systému, 3. při chronických zánětech 4. ve vyšších věk. skupinách

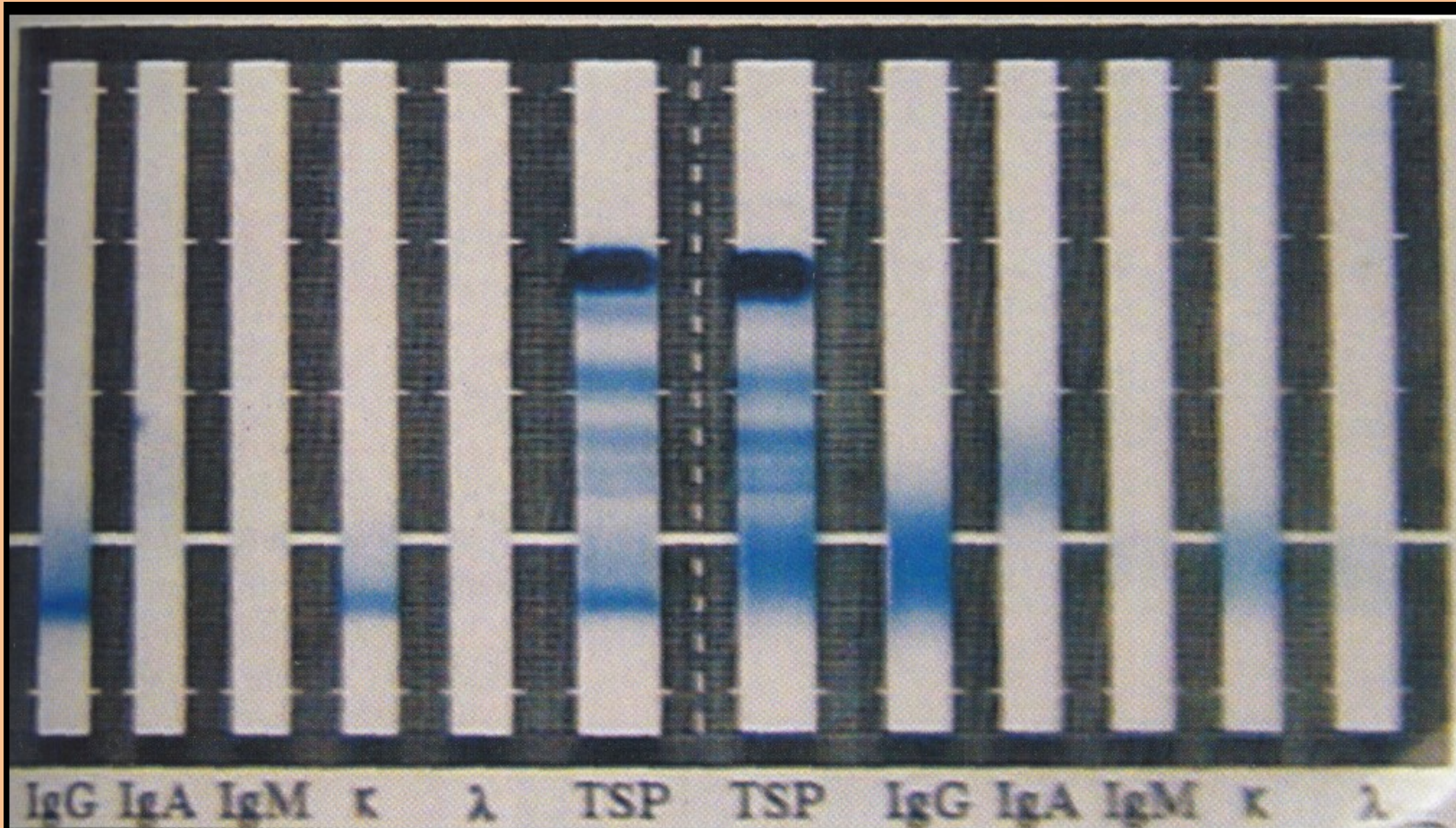
Imunofixace I.

Rozdělení různých proteinů na základě jejich pohyblivosti v el. poli modifikační metodou

1. **stupeň:** Elfo vyšetřovaného séra
2. **Stupeň:** na agarózu se položí plastikovaná maska s výřezy, naplní se s antiséry (anti IgG, IgA, IgM, anti kappa, anti lambda), pak porovnání s precip. reakce s normálním sérem, TSP – testovaná séra pacientů

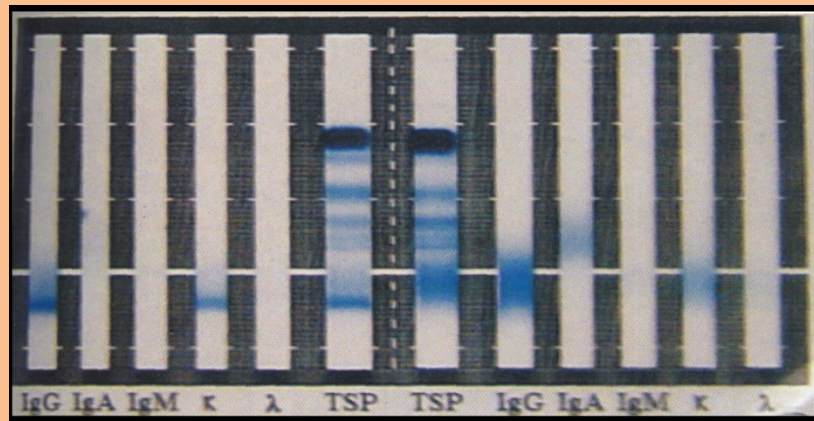
Hodnocení

- a) Okometricky
- b) denzitometricky



- **Výsledek:**

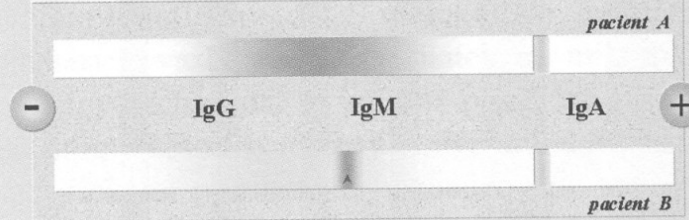
- TSP levé patologické, vpravo normální nález
- Levá ELFO patologická v paraproteinu IgG, řetězec kappa
- Vpravo ELFO normální
- Vzniká neobvyklý pruh při klasické elfo séra, neboť paraprotein se pohybuje uniformně (stejný náboj a Mr). V určitém místě elektroforetického pruhu způsobí vysokou koncentraci Ig příslušné třídy. Při následné precipitaci s přidáním antisérem je v oblasti, kam paraprotein doputoval, výrazně více antigenu, precipitační linie je deformovaná a posunuta blíže ke žlábkku s antisérem



Imunoelektroforéza

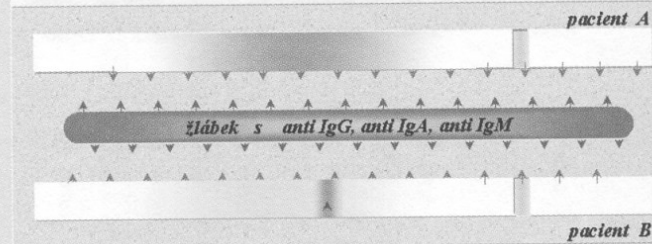
IMUNOELEKTROFORÉZA

1. ELEKTROFORETICKÉ ROZDĚLENÍ SÉROVÝCH Ig



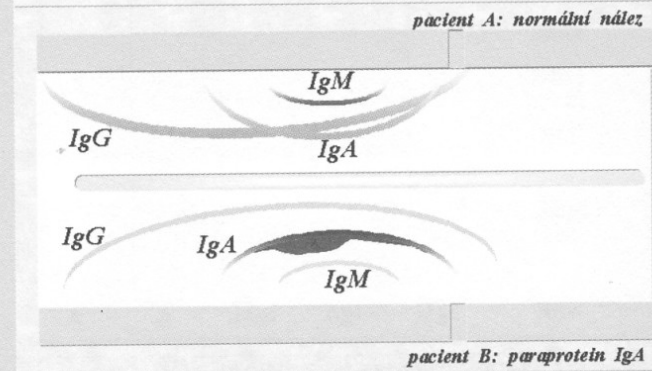
M-gradient (paraprotein)

2. DIFÚZE A PRECIPITACE



M-gradient (paraprotein)

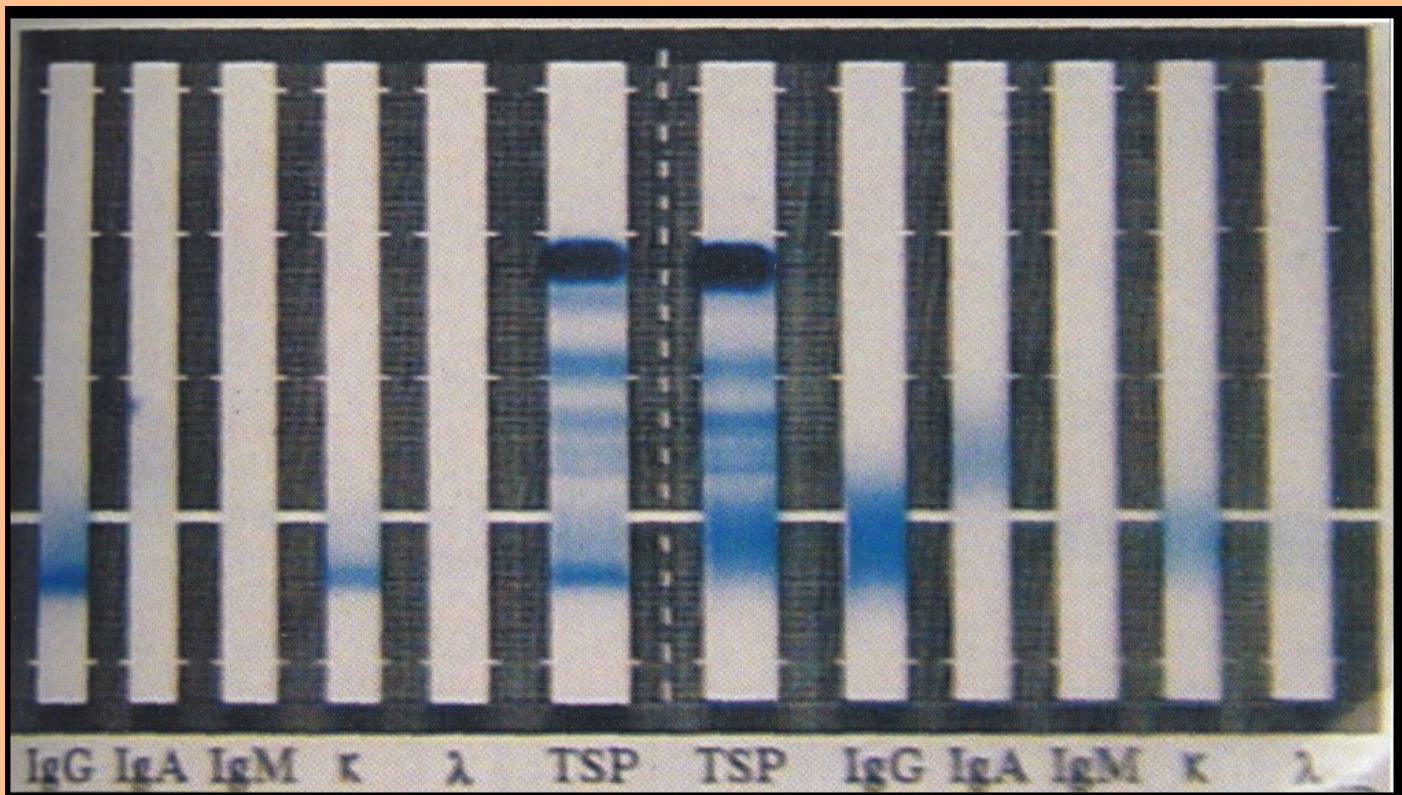
3. PRECIPITAČNÍ LINIE



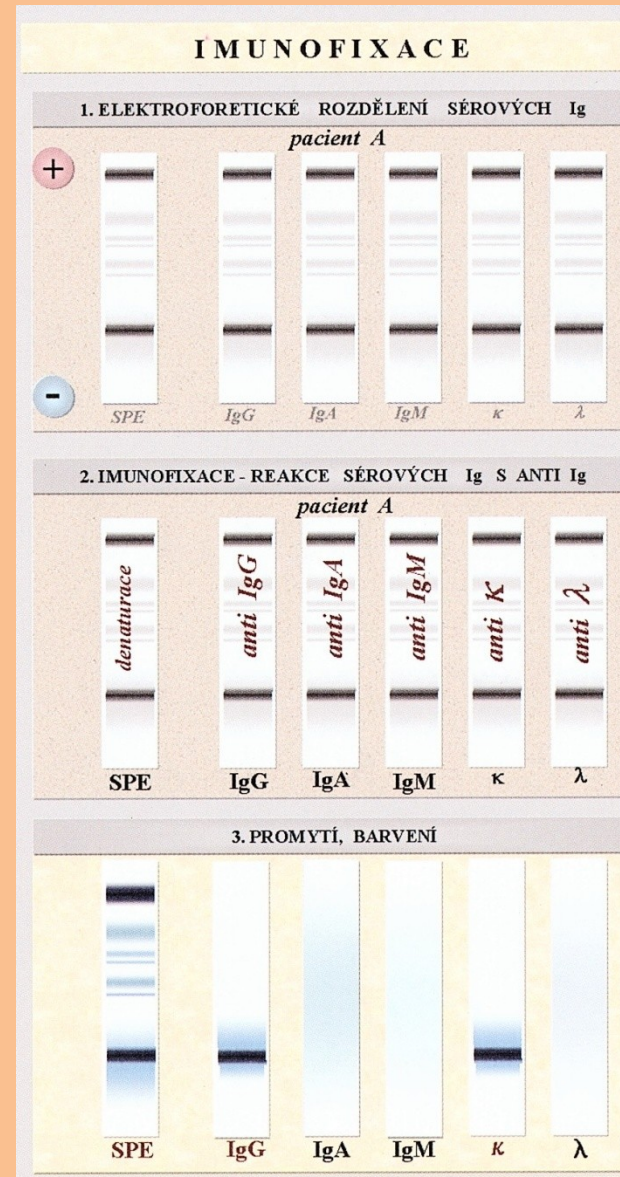
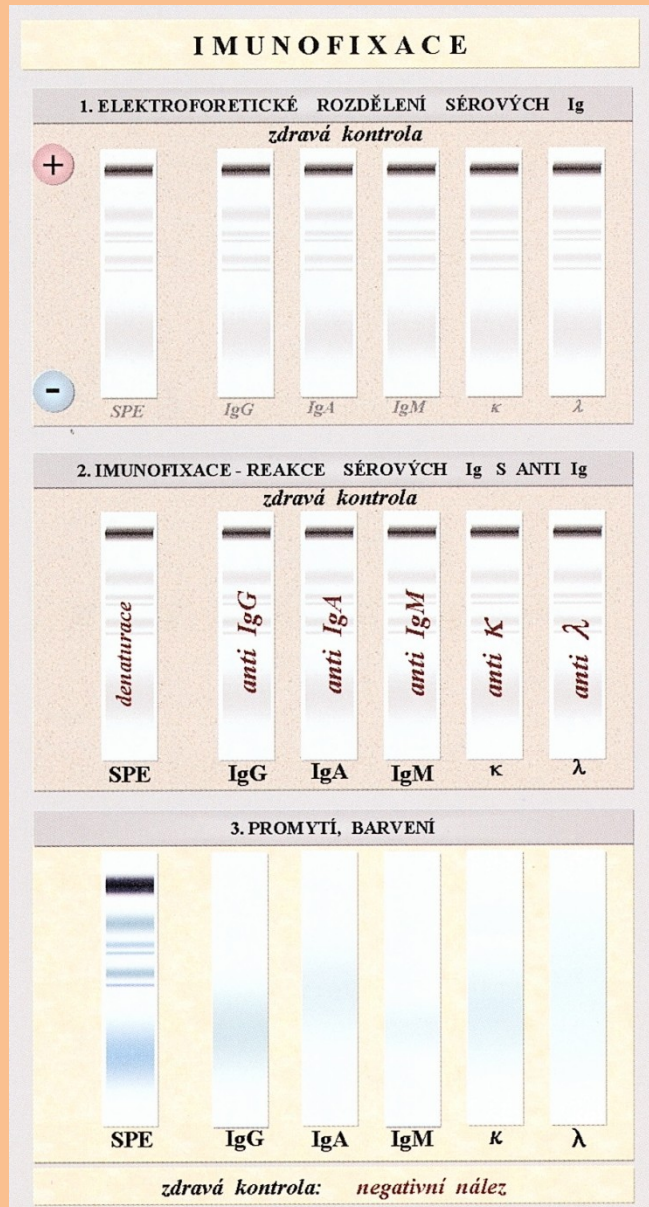
paraprotein (=M-gradient)

Výsledek:

- TSP levé patologické, vpravo normální nález
- Levá ELFO patologická v paraproteinu IgG, řetězec kappa
- Vpravo ELFO normální



Imunofixace II.



Imunofixace-výsledek

