

Elektroforéza

Petr Breinek

Elektroforéza je analytická metoda založená na rozdílné pohyblivosti nabitých částic v elektrickém poli.

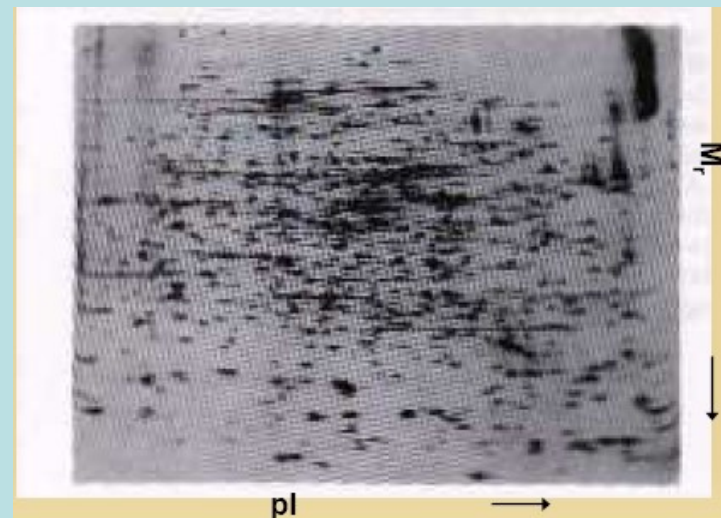
Pohyblivost částic závisí na:

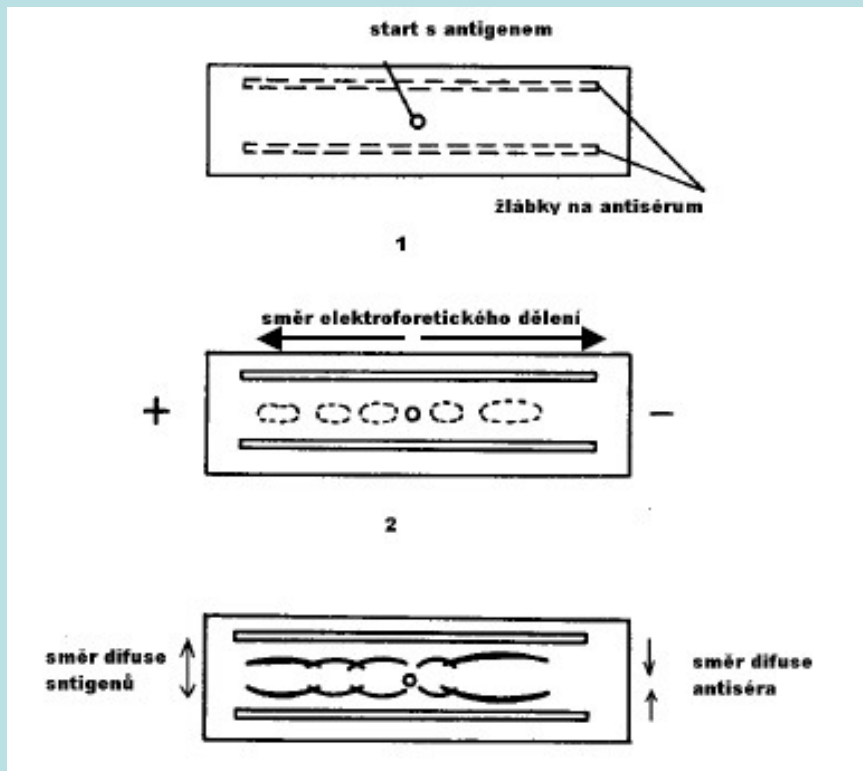
- velikosti náboje
- velikosti částice
- vlastnostech prostředí

Troška historie

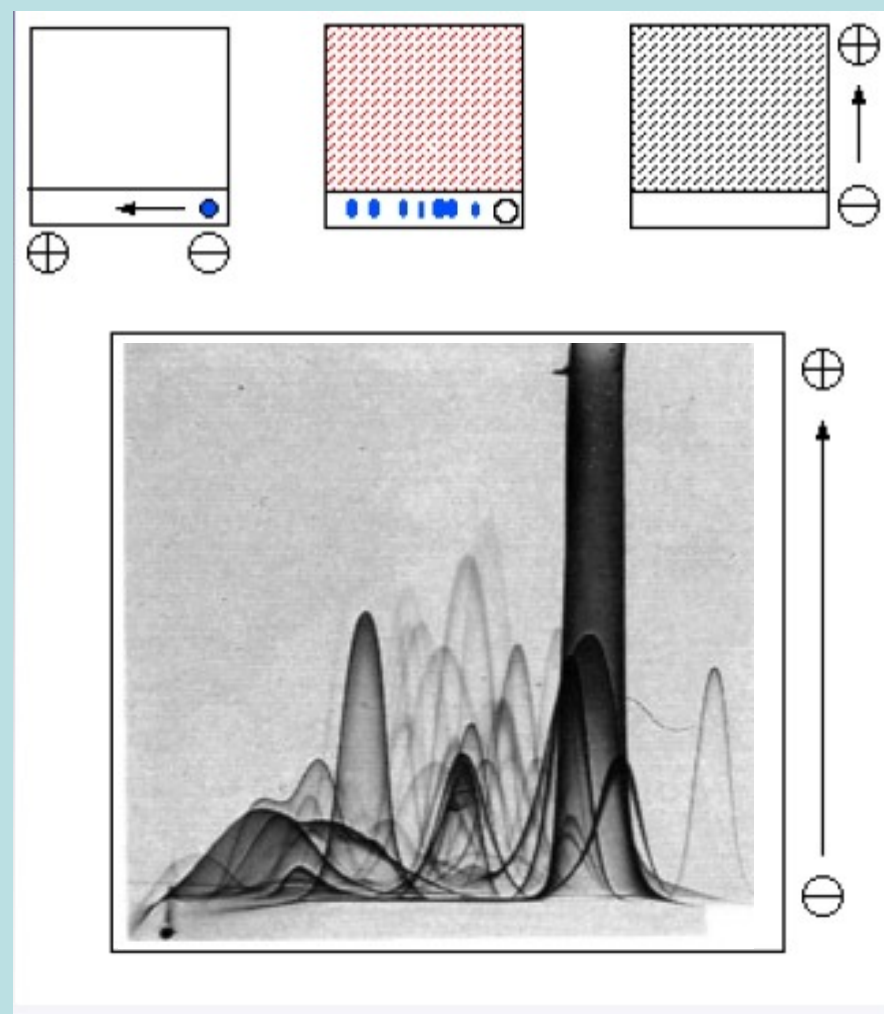
- Stanovení koncentrace celkových bílkovin
- Stanovení koncentrace jednotlivých bílkovin
- Stanovení izoenzymů, lipoproteinů,.....
- Průkaz a kvantifikace patologických bílkovin

Od ELFO na „papíru“ přes EID, IELFO,... k imunofixačním technikám a ?

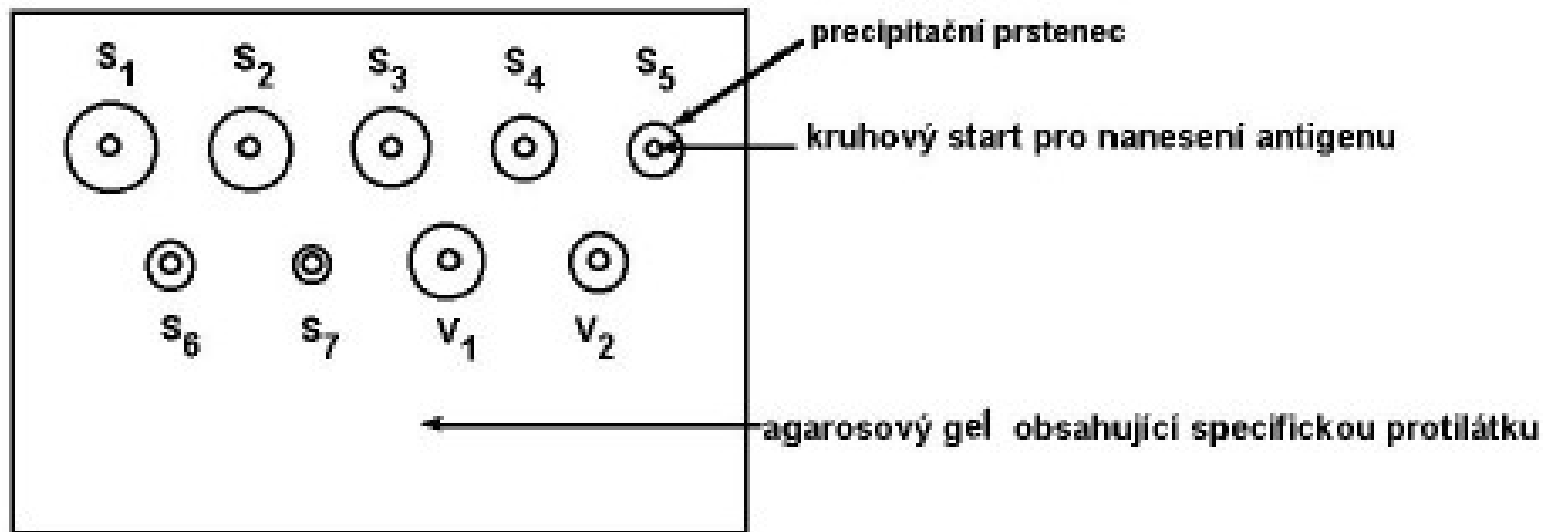




Imunoelektroforéza (IELFO)

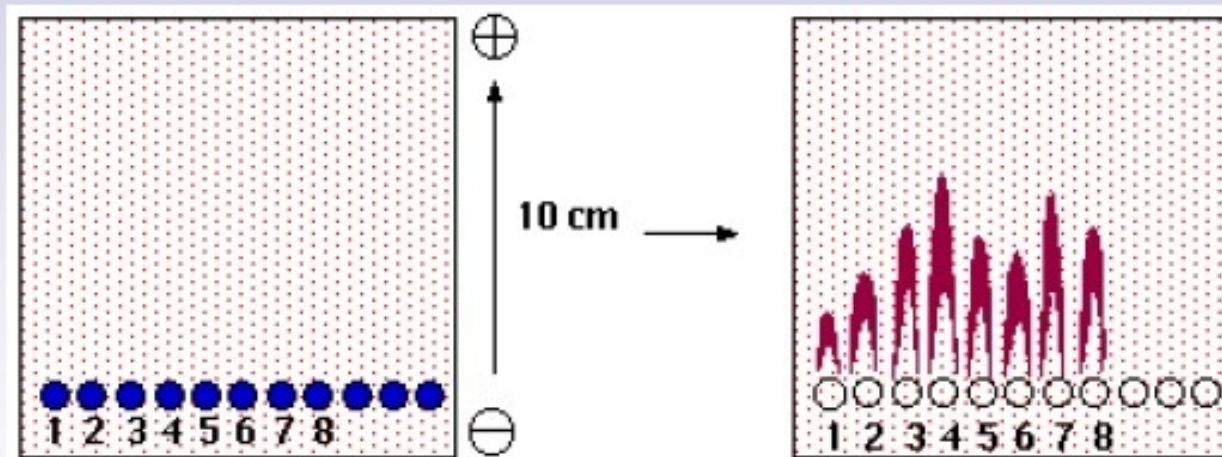


Dvozměrná imunoelektroforéza



Není ELFO metoda: Radiální imunodifúze dle Manciniové (RID)

raketová
imunoelktroforéza



Elektroimunodifúze dle Laurella

Využití pro stanovení:

- Bílkovin v séru, moči, likvoru
- Izoenzymů
- Lipoproteinů
- Hemoglobinů
- DNA,...

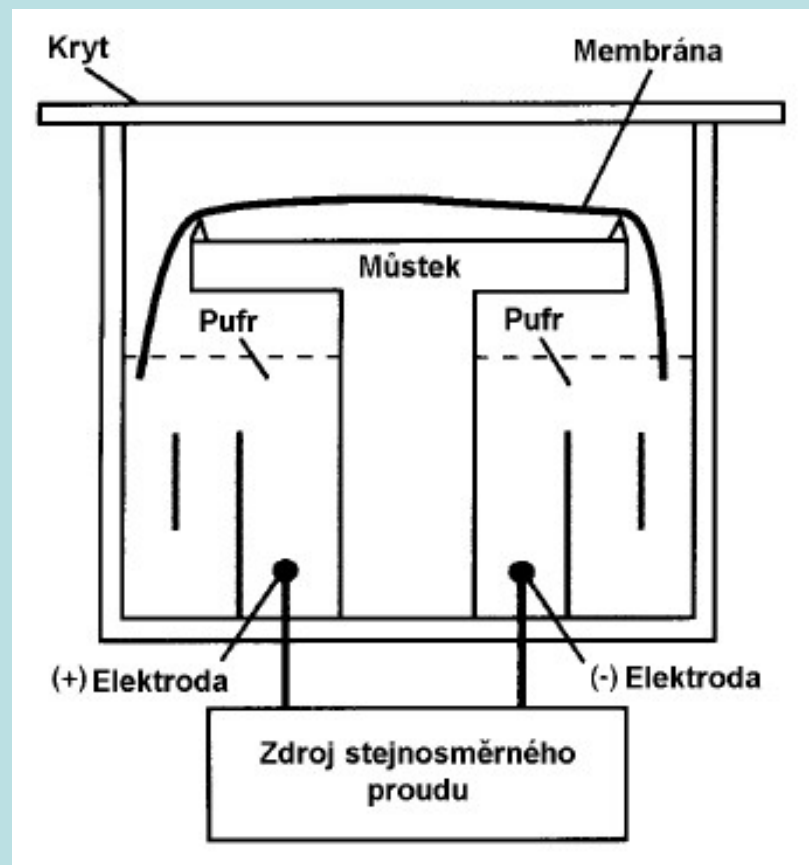
1. Zónová
2. Imunofixace
3. Izoelektrická fokuzace
4. Volná
5. Dvojrozměrná (two-dimensional)
6. Izotachoforéza
7. Imunoelektroforéza
8. Elektroimunoassay
9. Immunoblotting/ Western Blotting

Zónová elektroforéza- nosiče:

- Papír
- Acetátcelulózové folie
- Agarozový gel
- Škrobový gel
- Polyakrylamidový gel
(PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis)

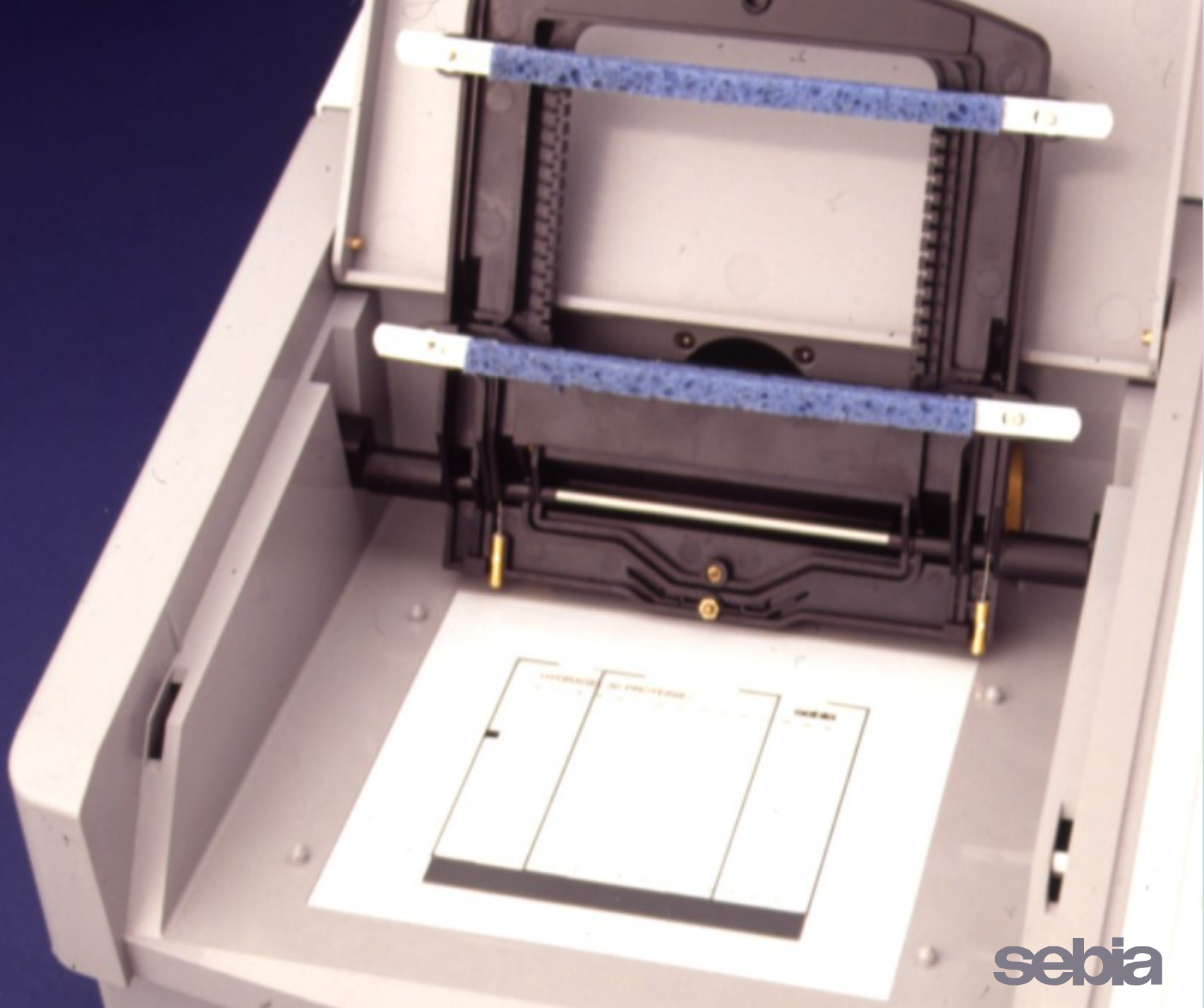
Postup (zjednodušeně)

- Aplikace vzorků
- Dělení
- Fixace a barvení
- Odbarvení
- Sušení
- Vyhodnocení

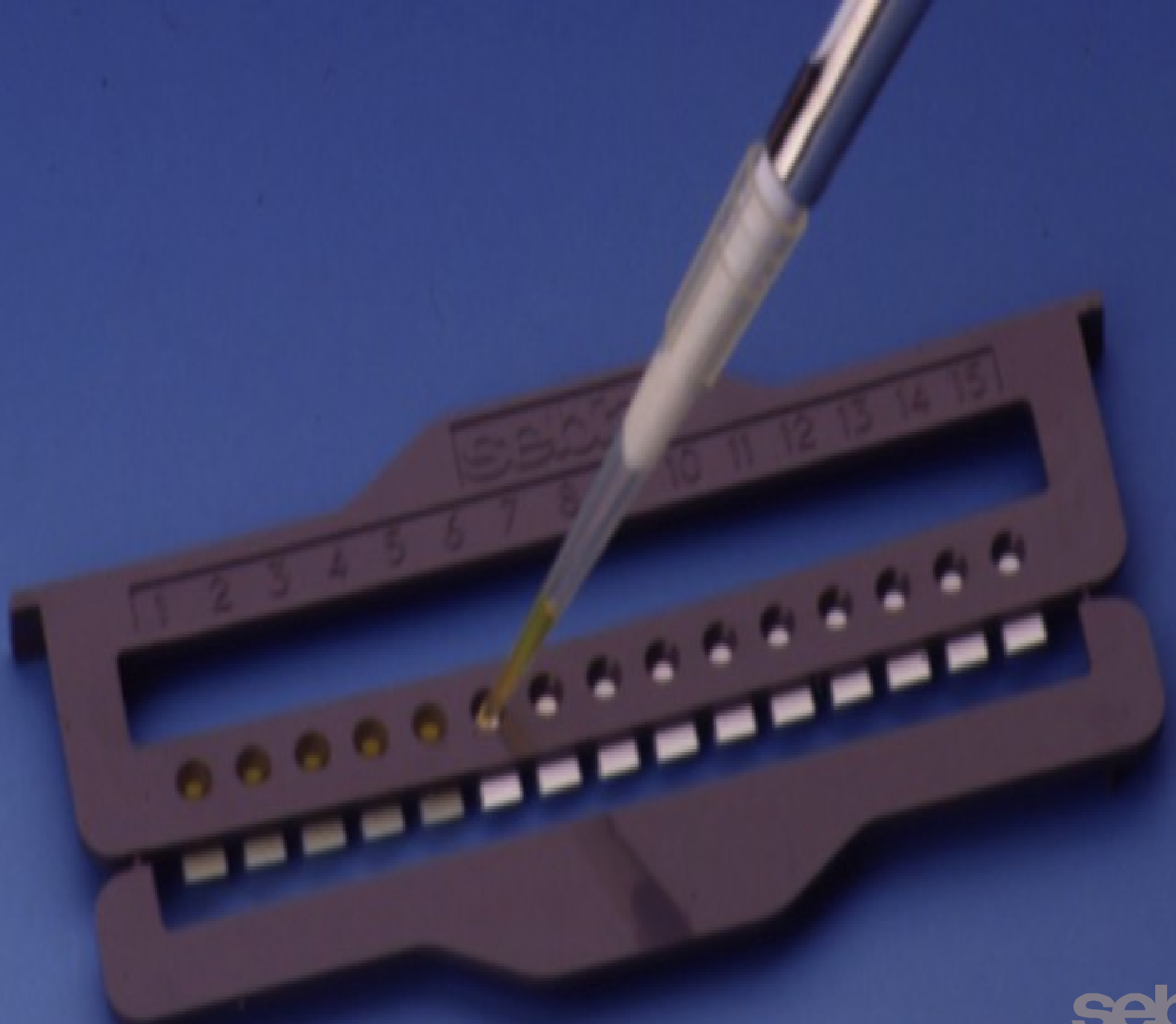


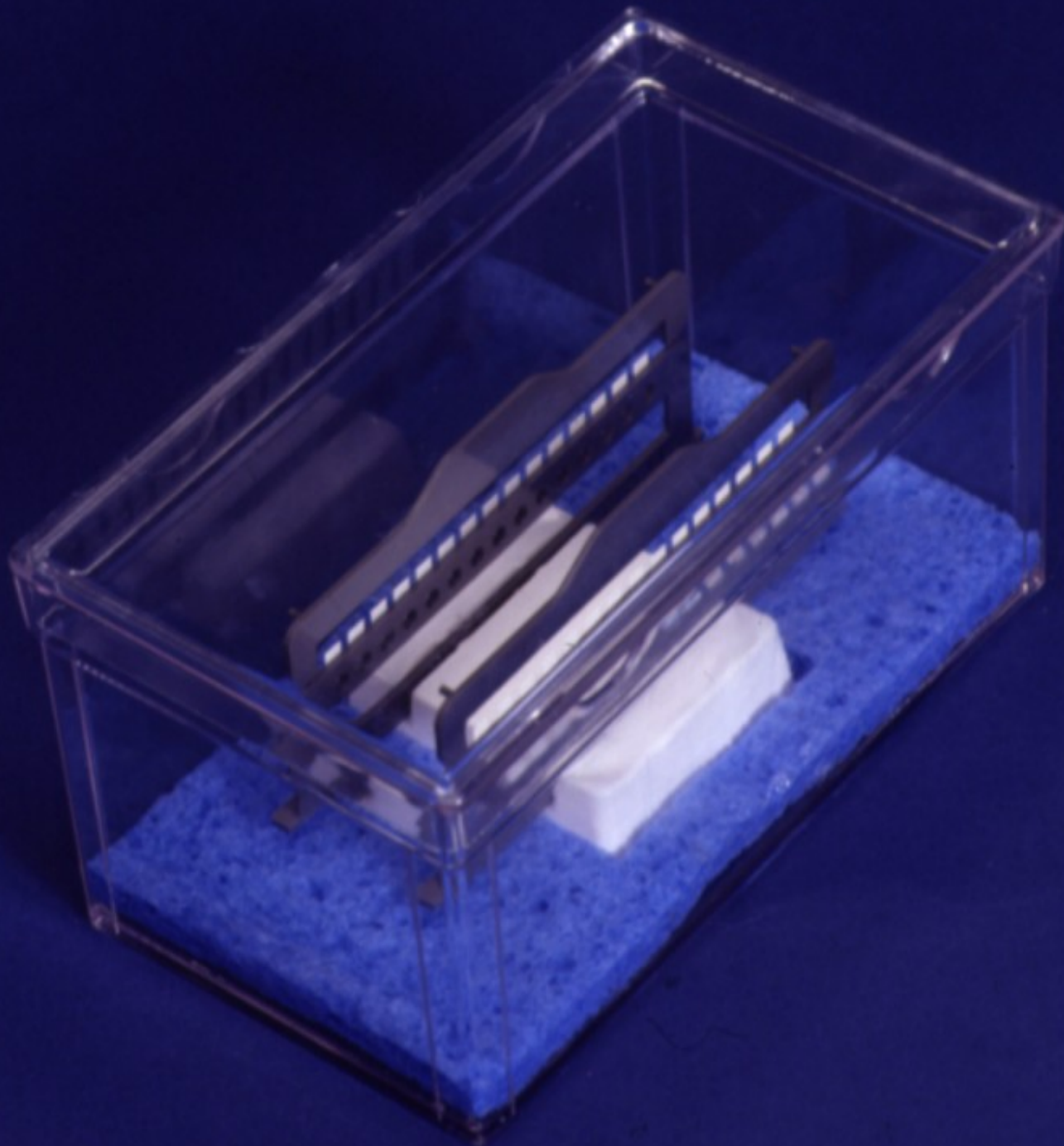
Automatický elektroforetický přístroj Hydrasys (Sebia, Francie)





sebia



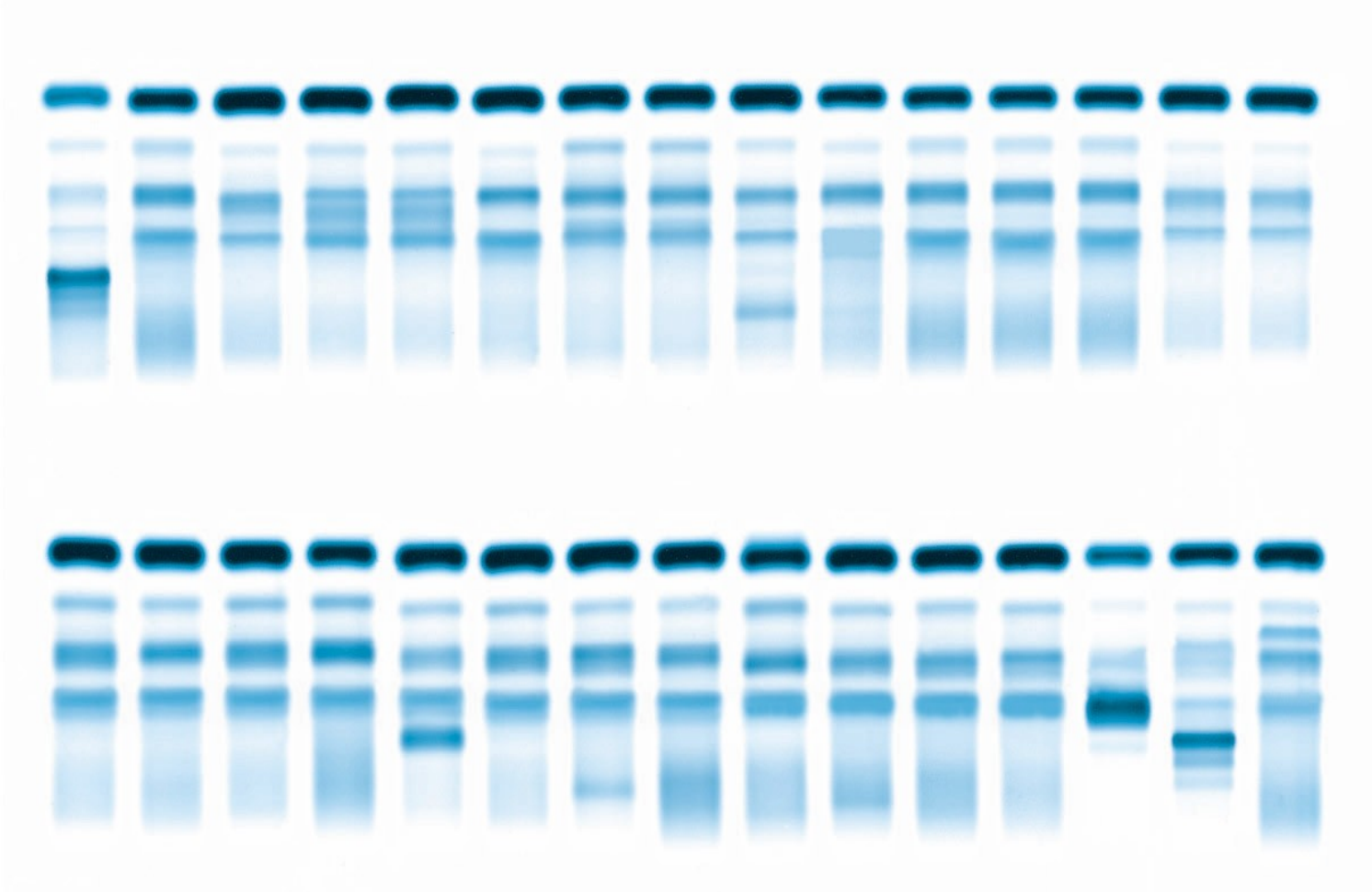


sebia

HYDRAGEL PROTEIN(E) 15/30

sebia

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

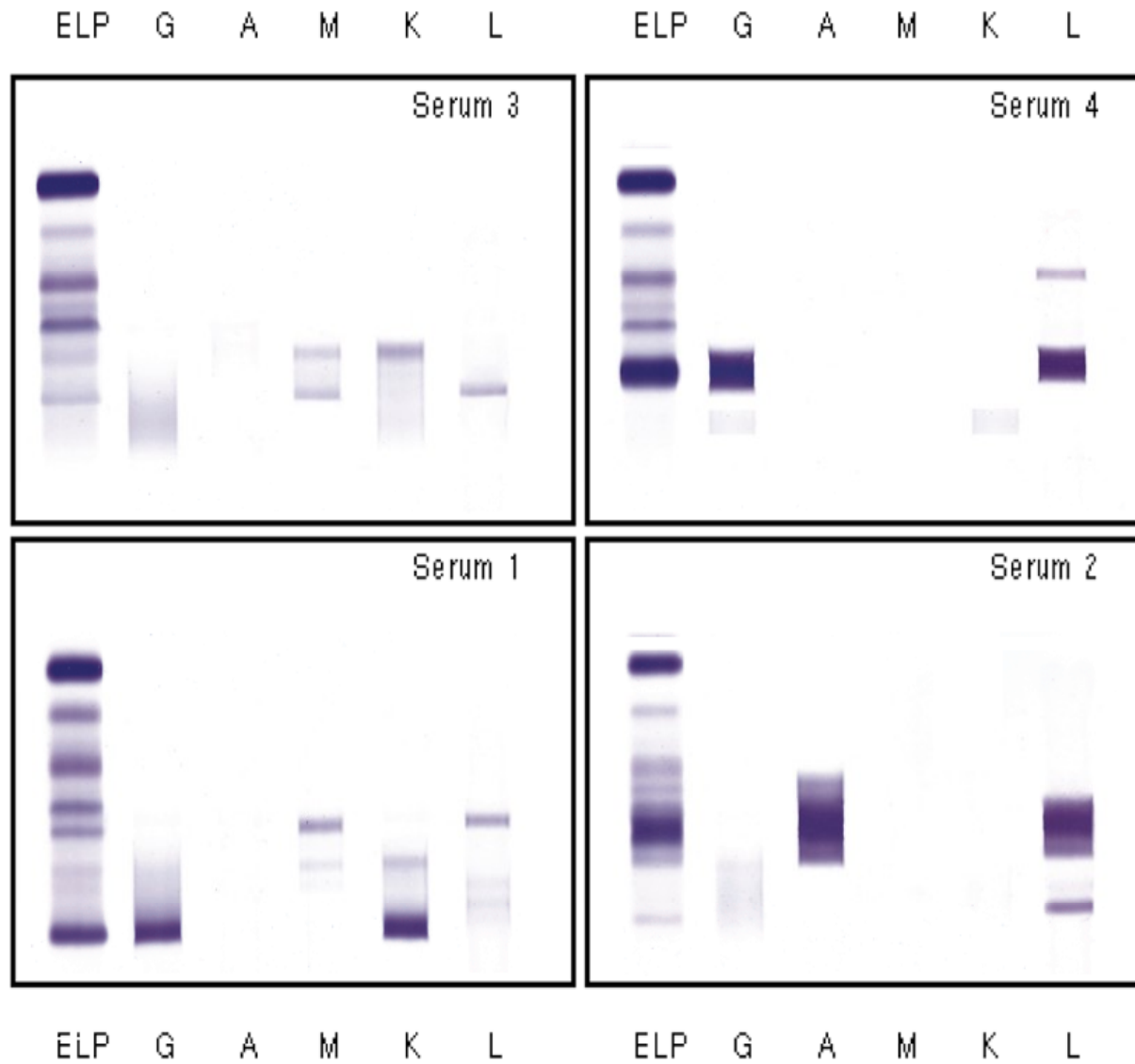
IMMUNOFIXACE

Fáze při imunofixaci

- Elektroforéza
- Aplikace specifických antisér
(proti těžkým řetězcům IgG, IgA, IgM a lehkým vázaným i volným kappa lambda řetězcům)
- Odstranění nezreagovaných bílkovin
- Barvení precipitátů, promývání a vysušení
- Hodnocení

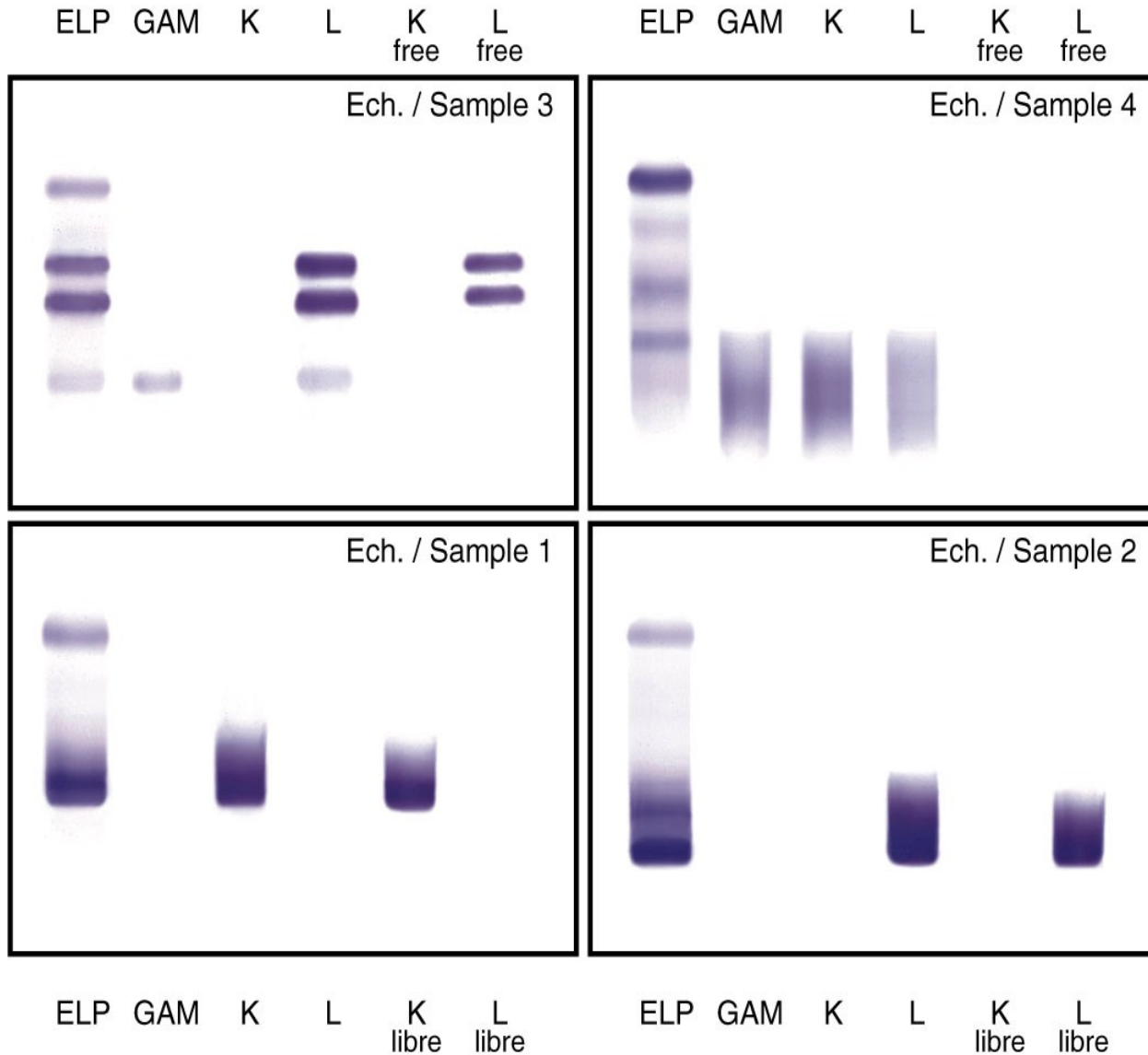
HYDRAGEL 4 IF

sebia



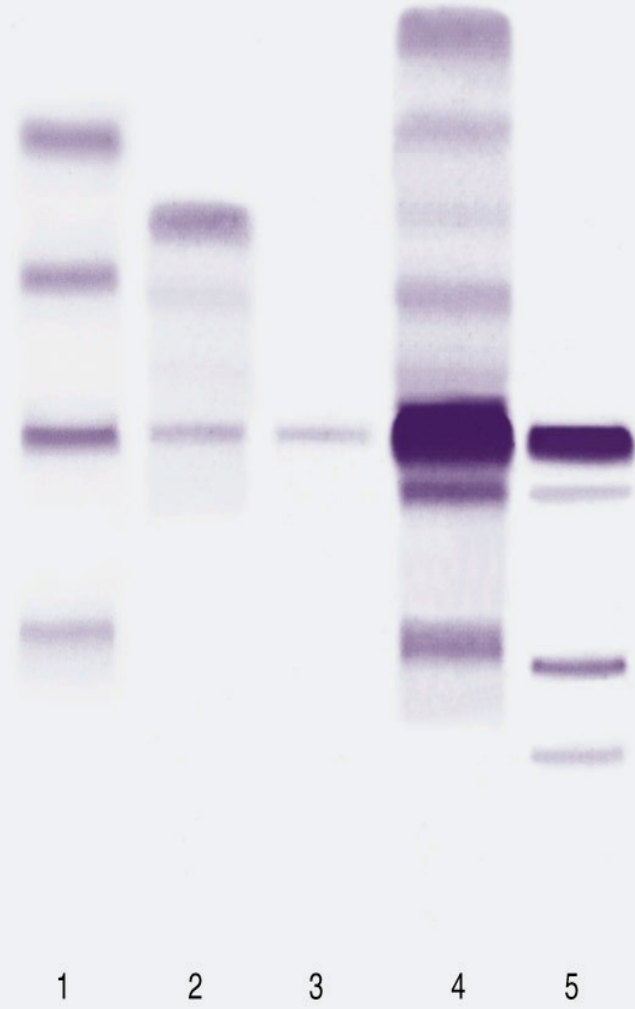
HYDRAGEL 4 BENICE JONES

sebia



PROTEINURIE

HYDRAGEL 5 PROTEINURIE



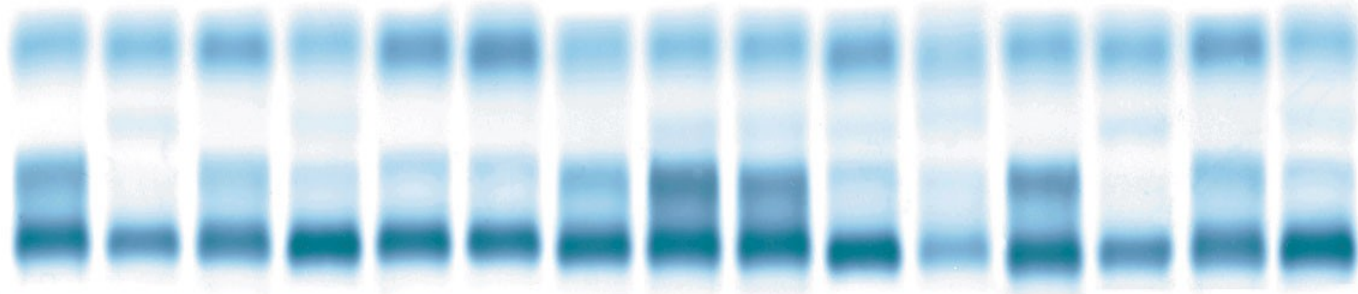
sebia

LIPOPROTEINY

HYDRAGEL LIPO + Lp(a) 15/30

sebia

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

IZOENZYMY

HYDRAGEL ISO CK/LD 15/30

sebia

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

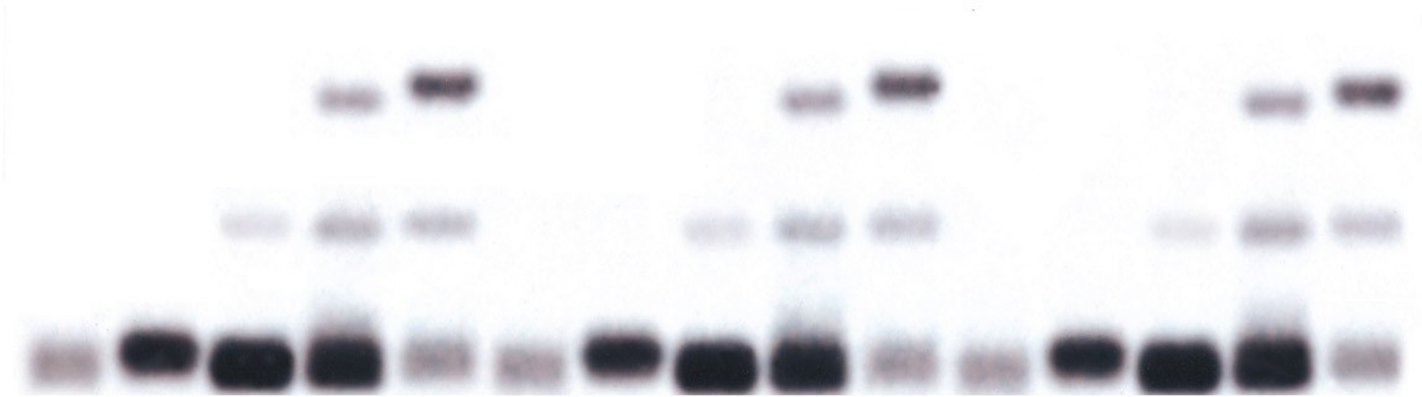


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

HYDRAGEL ISO CK/LD 15/30

sebia

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

IZOELEKTRICKÁ FOLUZACE (IEF)

- IEF je technika rozdělující bílkoviny podle jejich **izoelektrických bodů**
- Dělení probíhá v lineárním pH gradientu vytvořeném **amfolyty**
- Nosičem je agarózový nebo polyakrylamidový gel

Příklad využití IEF

Stanovení oligoklonálních pásů IgG v likvoru

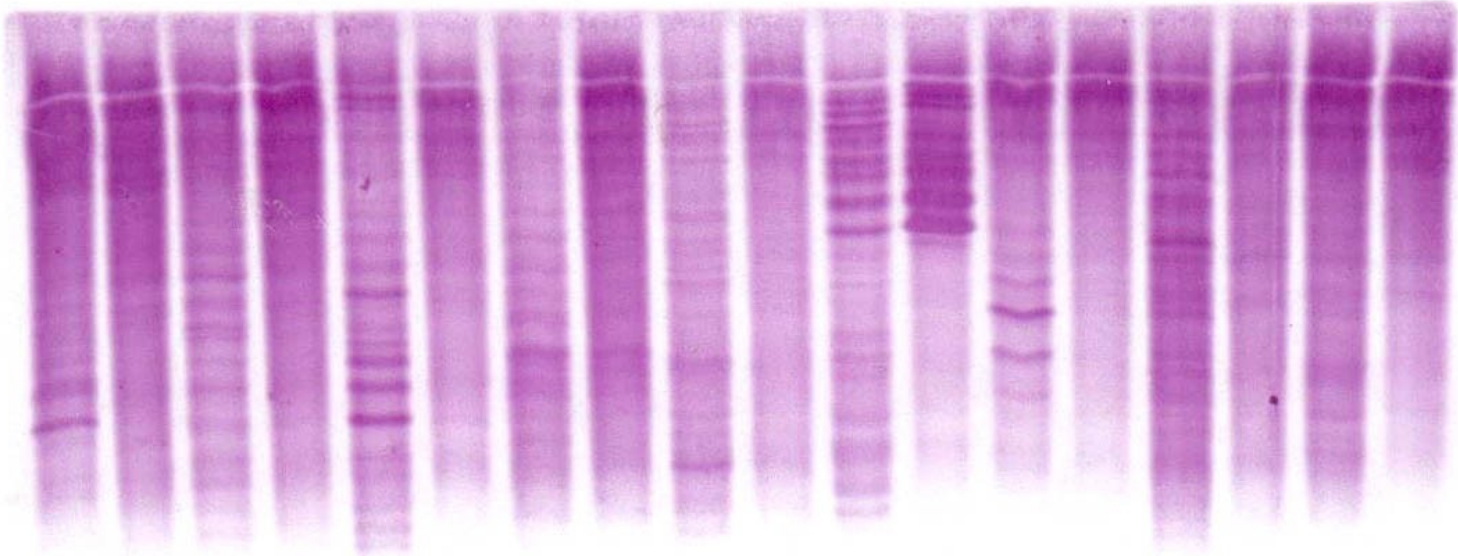
- Bez zahuštění likvoru
- Současně se analyzuje sérum a likvor (ve stejné koncentraci)
- Imunochemická detekce a barvení

Stanovení oligoklonálních IgG pásů v likvoru a v krevním séru metodou izoelektrické fokuzace s následným imunofixačním barvením umožňuje kvalitativní vyjádření intratekální syntézy IgG.

HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING

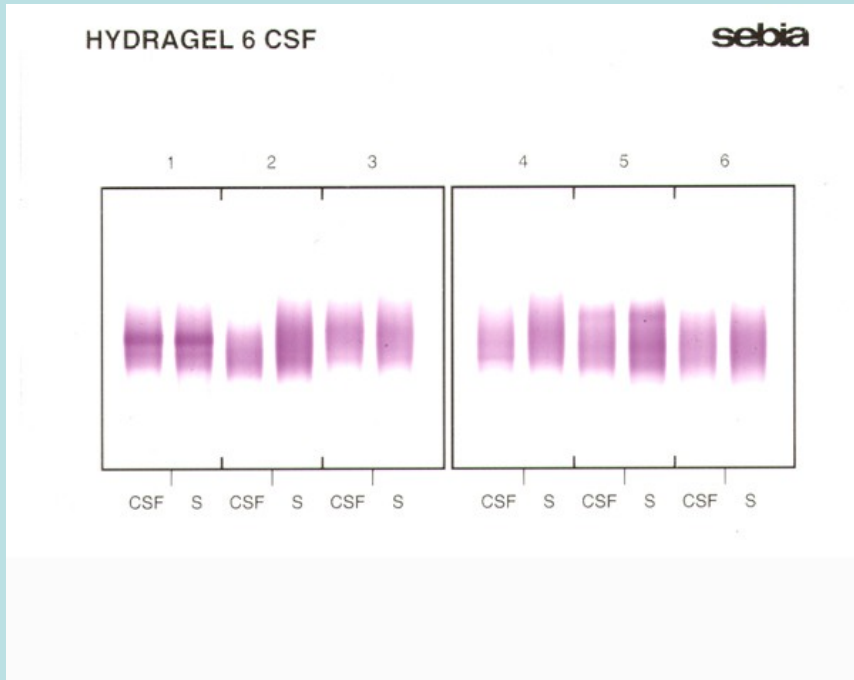
sebia

1 1' 2 2' 3 3' 4 4' 5 5' 6 6' 6' 7 7' 8 8' 9 9'

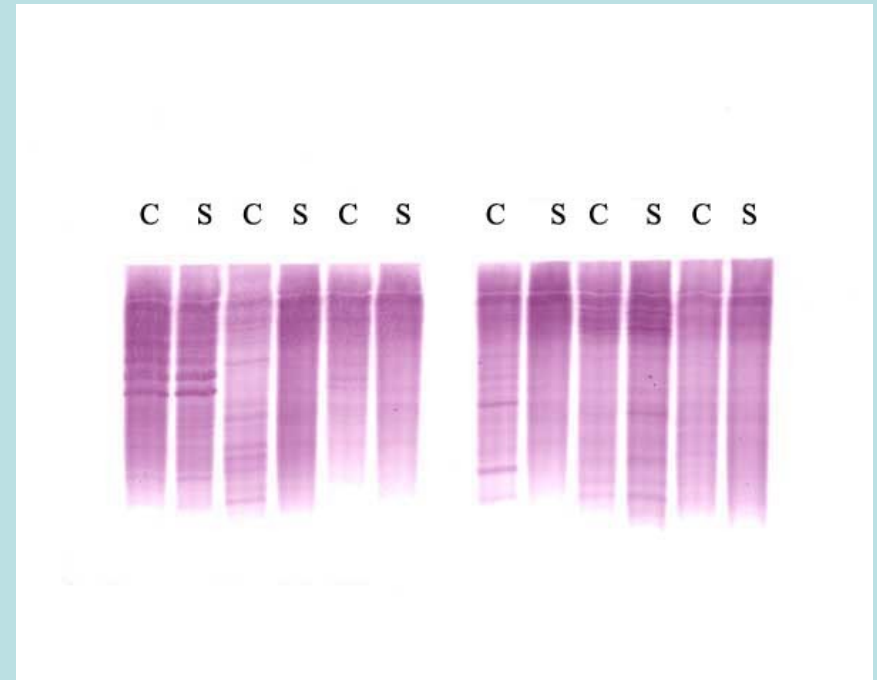


Typ 1	Normální nález	Stejný polyklonální obraz v likvoru a v séru
Typ 2	IgG intratekální syntéza	Oligoklonální pásy v likvoru a žádné v séru
Typ 3	IgG intratekální syntéza	Oligoklonální pásy v likvoru a současně některé identické pásy v séru
Typ 4	Bez intratekální syntézy	Zrcadlový obraz- identické pásy v likvoru i v séru
Typ 5	Bez intratekální syntézy	Paraproteinový obraz- identické pásy IgG v krátkém úseku pH gradientu

Hydragel CSF



Hydragel CSF Isofocusing



PAGE

PAGE

- ✓ Dělení látek nejenom na základě velikosti elektrického náboje, ale **i podle velikosti molekul**
- ✓ Gradient hustoty polyakrylamidového gelu
- ✓ Přídavek **SDS** (laurylsíran sodný/dodecylsulfát sodný) způsobí, že všechny molekuly mají téměř stejný el. náboj a dělí se jen podle velikosti svých molekul

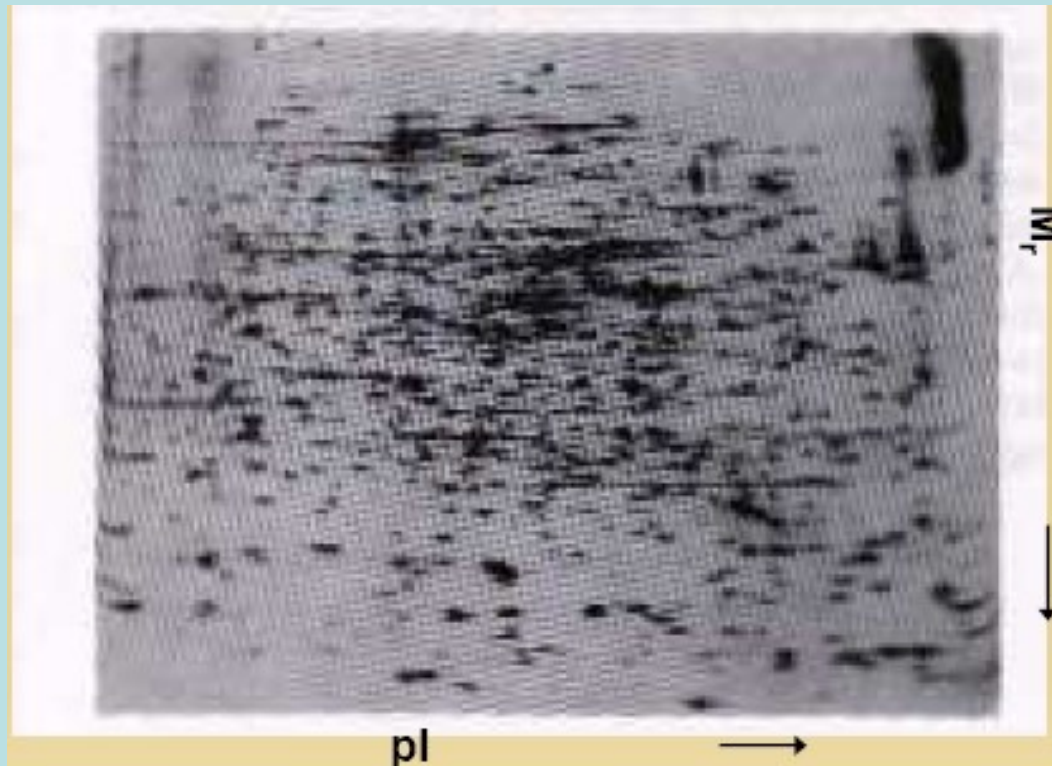
Imunobloting/ Western Blotting

Imunobloting/ Western Blotting

- ✓ Rozdělení v gelu
- ✓ Přenos na nitrocelulóзовou membránu obvykle elektrickým proudem
- ✓ Reakce přenesené látky v membráně s činidlem obsahujícím protilátku

Metoda je vhodná pro detekci jednotlivých bílkovin ve směsi

Dvojrozměrná elektroforéza

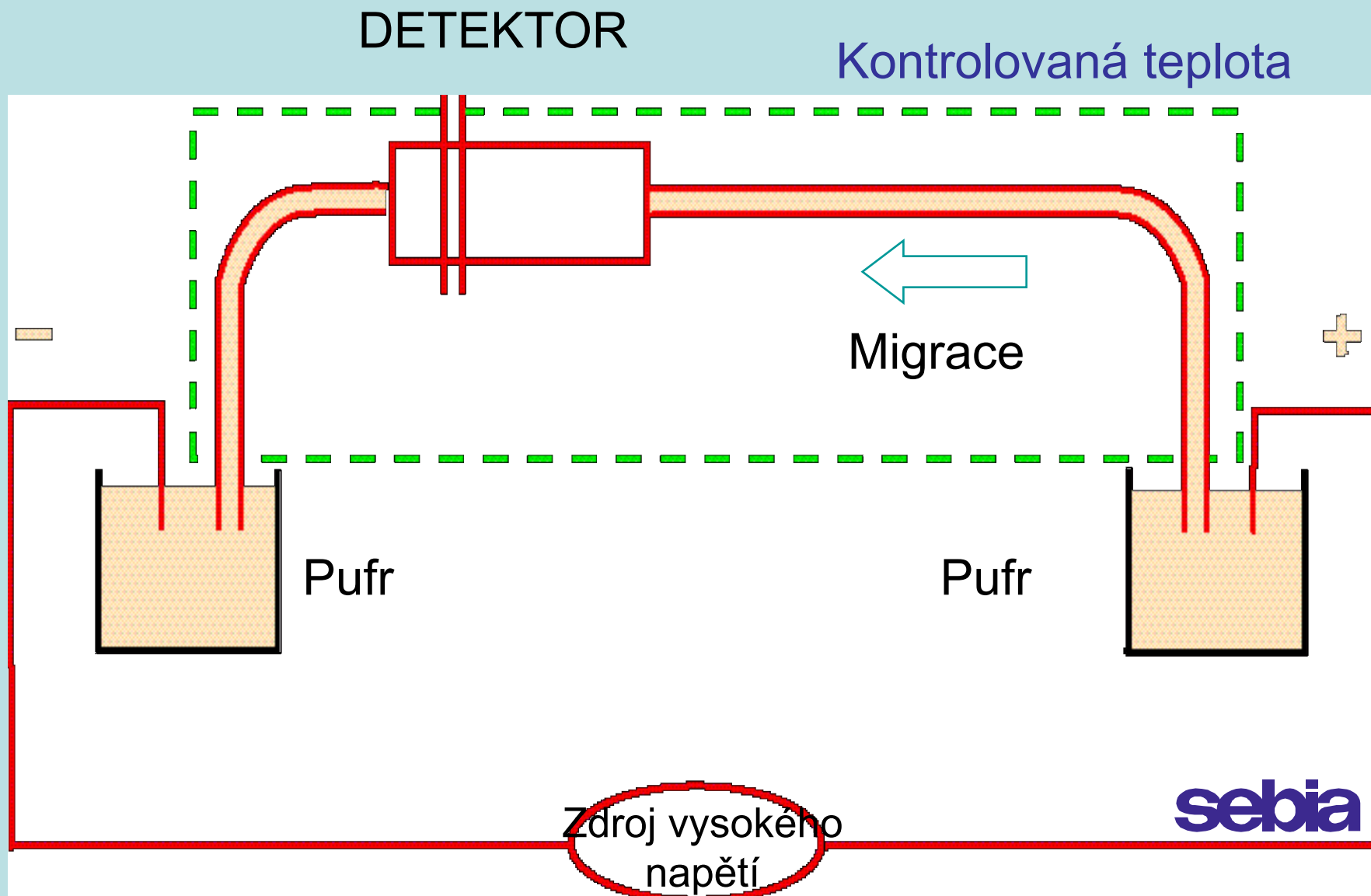


Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza

- ← Je technika založená na principu elektrokinetické separace v kapiláře malého vnitřního průměru (méně než 100 μm), naplněné elektrolytem při vysokém napětí (7 700 V).
- ← Výsledkem je rychlá a velice účinná separace molekul s výborným rozlišením.

PRINCIP KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY





CAPILLARYS



Echant. N° 128



Programme
Capillarys B1 B2

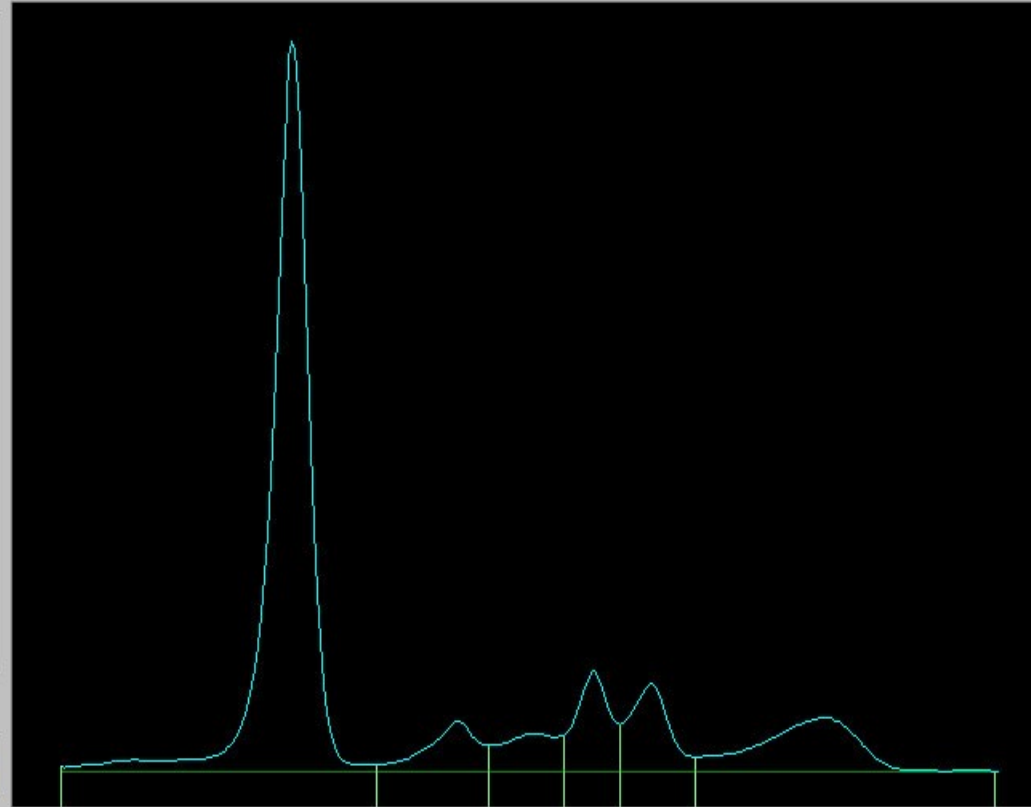
Oper.
ST

Mode minima

Mode D.O.

Résultats

Fractions	%
Albumine	62,2
Alpha 1	5,7
Alpha 2	4,9
Beta 1	7,6
Beta 2	7,7
Gamma	11,9



Données patient

A.....

Age: 13
Service: Med
ID : 154641e

Pics



Pathologie

Courbe Pathologique

Fiche détaillée

Fiche Visual

A/G 1,65
Conc. 72 g/l Alb



Commentaire

Empty text box for comments.