

Imunoelektroforéza

Imunofixace

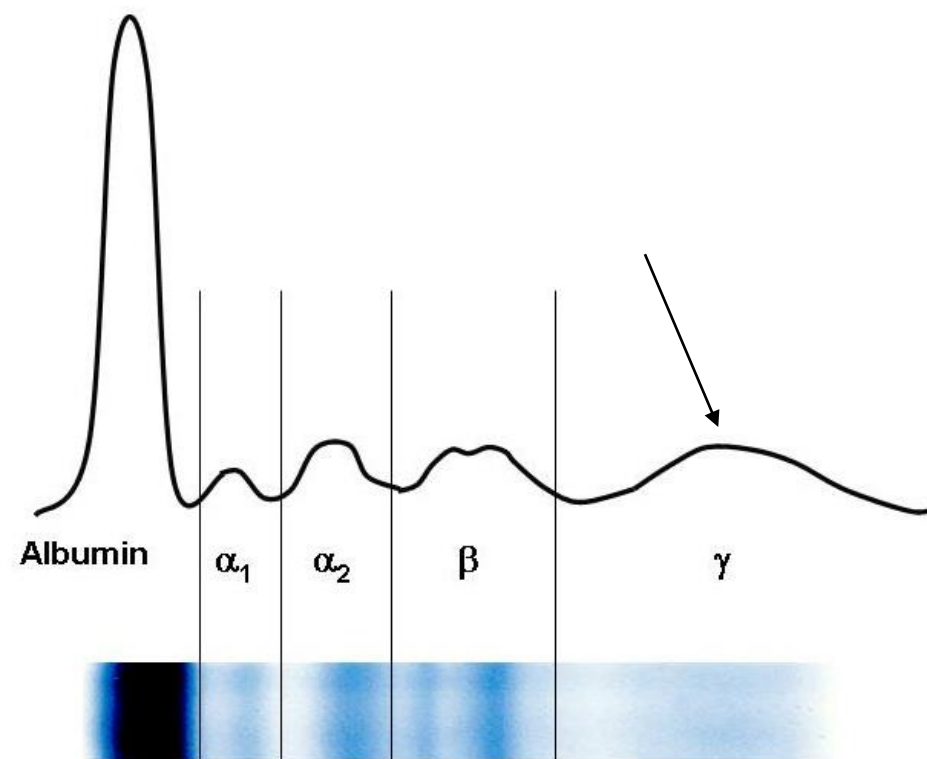
Mgr. Julie Štíhová

ÚKIA-FNUSA



Klasická elektroforéza - screening

- Separace proteinů séra na základě rozdílné pohyblivosti v el. poli
- Médium – agarózový gel
- pH = 8,6 → anodická pohyblivost (většina proteinů izoel. bod kolem pH 5 - 6)
- Rozdělení do 5 základních frakcí
- Odečítání – většinou **denzitometrie**
 - Pokud známe koncentraci celkové bílkoviny → přepočet % na koncentraci jednotlivých frakcí
- Immunologie – zájem o gamafrakci



Pozn. Detailní princip elektroforézy a denzitometrie lze najít v učebnicích klinické biochemie nebo instrumentální techniky

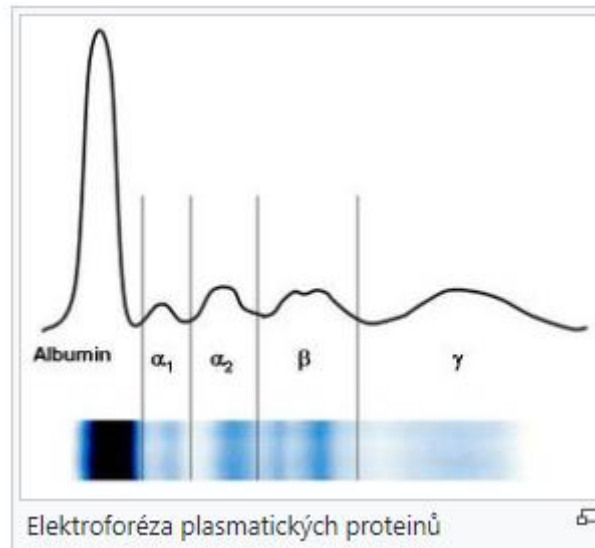
Elektroforetické frakce obsahují tyto plazmatické proteiny

| | Bílkovina <i>Relativní molekulová hmotnost</i> | Koncentrace v séru [g/l] | Poločas [dny] | Funkce | |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| | Prealbumin (Transthyretin) <i>54 000</i> | 0,2–0,4 | 2 | <ul style="list-style-type: none"> vazba hormonů štítné žlázy a retinol vázajícího proteinu | ↓ malnutrice |
| | Albumin <i>68 000</i> | 35–53 | 15–19 | <ul style="list-style-type: none"> nejvýznamnější transportní protein udržení koloidně-osmotického tlaku proteinová rezerva organismu | ↓ katabolismus ↓ hepatopatie ↓ ztráty bílkovin |
| α₁ oblast | α₁-lipoprotein <i>180 000–360 000</i> | 1,0–1,6 (Apo A-I) | | <ul style="list-style-type: none"> lipoprotein o vysoké hustotě (HDL) transport cholesterolu do jater | |
| | α₁-antitrypsin (α ₁ -inhibitor proteáz) <i>54 000</i> | 0,9–2,0 | 4 | <ul style="list-style-type: none"> inhibitor lyzomálních proteáz (hlavně elastázy z polymorfonukleárních leukocytů) vrozená deficience může být příčinou onemocnění plic (emfyzém) a jater (cirhóza) | ↑ akutní zánět |
| | α ₁ -kyselý glykoprotein (orosomukoid) <i>40 000</i> | 0,5–1,2 | 5 | <ul style="list-style-type: none"> vazba lipofilních látek (např. progesteronu a některých léků) podílí se na regulaci imunitní odpovědi | ↑ zánět |
| | α₁-fetoprotein <i>69 000</i> | < 7,5 μg/l | 3,5 | <ul style="list-style-type: none"> fyziologicky produkován fetálními játry a žloutkovým váčkem hlavní protein fetálního séra fyziologicky přítomen v séru těhotných žen | ↑ hepatom ↑ některé malignity GIT ↑ těhotenství |

| | | | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| α₂ oblast | Haptoglobin ^[p 1] 85 000–1 000 000 | 0,3–2,0 | 2 | <ul style="list-style-type: none"> vychytává volný hemoglobin | ↑ akutní zánět ↓ hepatopatie ↓ intravaskulární hemolýza (konzumpce haptoglobinu) |
| | α₂-makroglobulin 800 000 | 1,3–3,0 | 5 | <ul style="list-style-type: none"> inhibitor proteáz (trombin, trypsin, chymotrypsin, pepsin) transport malých proteinů (cytokiny, růstové faktory) a dvojmocných iontů (např. Zn²⁺) díky velmi vysoké molekulové hmotnosti neprojde ani poškozenou glomerulární membránou | ↑ akutní zánět |
| | Ceruloplasmin 160 000 | 0,2–0,6 | 4,5 | <ul style="list-style-type: none"> oxidoredukční aktivita (oxidace Fe²⁺ na Fe³⁺) vazba mědi (váže až 90 % Cu v séru) | ↓ Wilsonova choroba (hepatolentikulární degenerace) |
| β₁ oblast | Transferrin 77 000 | 2,0–3,6 | 7 | <ul style="list-style-type: none"> transport a vychytávání volného železa | ↑ nedostatek železa ↓ malnutrice ↓ hepatopatie ↓ zánět |
| | Hemopexin 57 000 | 0,5–1,1 | 3–7 | <ul style="list-style-type: none"> vazba hemu | |
| | β-lipoprotein 2 750 000 | 0,7–0,9 (Apo B-100) | 3 | <ul style="list-style-type: none"> lipoprotein o nízké hustotě (LDL) transport cholesterolu k buňkám velmi vysoká molekulární hmotnost | |
| | C4 složka komplementu 206 000 | 0,1–0,4 | 1 | <ul style="list-style-type: none"> součást komplementu | ↑ zánět ↓ autoimunitní stavy |
| β₂ oblast | C3 složka komplementu 180 000 | 0,8–1,4 | 1 | <ul style="list-style-type: none"> součást komplementu | ↑ zánět ↓ autoimunitní stavy |
| | β₂-mikroglobulin 11 800 | 0,001–0,002 | | <ul style="list-style-type: none"> součást leukocytárních antigenů | ↑ hematologické nádory ↓ porucha tubulární resorpce |
| | Fibrinogen 340 000 | 1,5–4,5 | | <ul style="list-style-type: none"> součást koagulační kaskády, prekurzor fibrinu fyziologicky jen v plazmě, není v séru | ↑ zánět |
| | C-reaktivní protein 111 000 | 1,5–5 mg/l | 1 | <ul style="list-style-type: none"> aktivace komplementu | ↑ akutní zánět (bakteriální) |

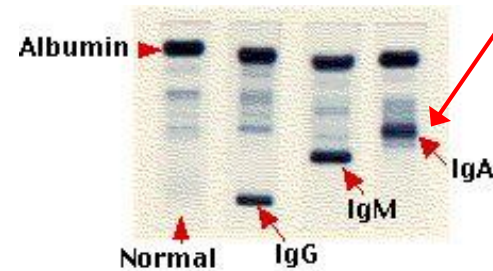
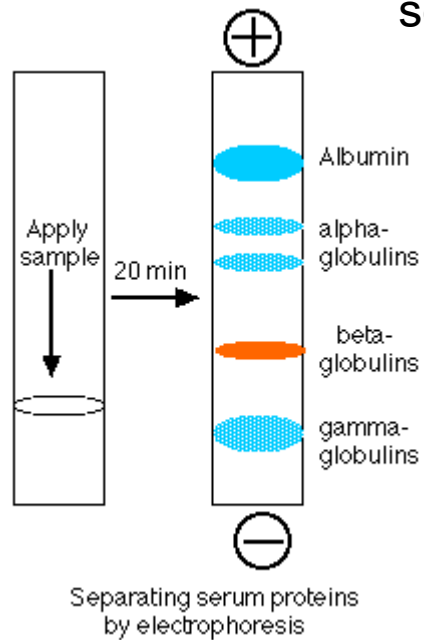
Elektroforetické frakce obsahují tyto plazmatické proteiny

| | | | | | |
|-------------|----------------------------------------|----------|----|--------------------------------|---------------------------------|
| γ oblast | IgG 150 000 | 8,0–18,0 | 24 | ▪ pozdní protilátky | ↑ (chronický) zánět |
| | IgA ^[p 2] 160 000 | 0,9–3,0 | 6 | ▪ protilátky slizniční imunity | ↑ záněty sliznic a jater |
| | IgM 900 000 | 0,6–2,5 | 5 | ▪ časné protilátky | ↑ akutní zánět |



Elektroforéza

sérové proteiny mohou být elektroforeticky separovány



imunoglobuliny

- lze zachytit pouze hrubé změny:
hypergamaglobulinémii,
hypogamaglobulinemii či monoklonální
gamapatie

Využití elektroforézy v klinické praxi screening chorobných stavů

- Vyšetřovaný materiál: sérum, moč, likvor

Hyperproteinémie – hypergamaglobulinemie je vzácná:

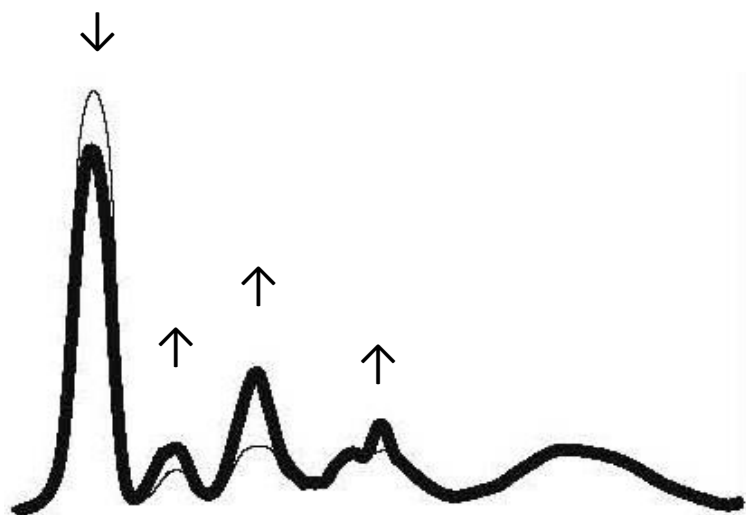
- Záněť
- **monoklonální gamapatie** (v moči – Bence-Jonesova bílkovina)
- chronické dlouhotrvající infekce, např. AIDS (zvýšená syntéza imunoglobulinů)
- Některé autoimunitní onemocnění – např. Sjögrenův syndrom

Hypoproteinémie - většina chorobných stavů:

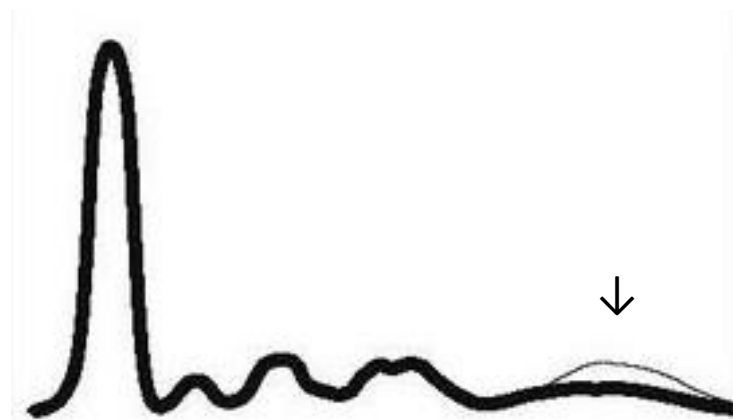
- porucha syntézy bílkovin v játrech
- nadměrné ztráty – nefrotický syndrom (vyšetření moči – zvýšené koncentrace bílkovin)
- poruchy výživy – malnutrice
- poruchy trávicího traktu – maldigestce a malabsorpce – nespecifické střevní záněty (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida)
- Rozsáhlé popáleniny
- Hyperhydratace – dochází k naředění bílkovin séra – těhotenství (fyziologicky), nevhodně podaná infuze

Klasická elektroforéza - screening

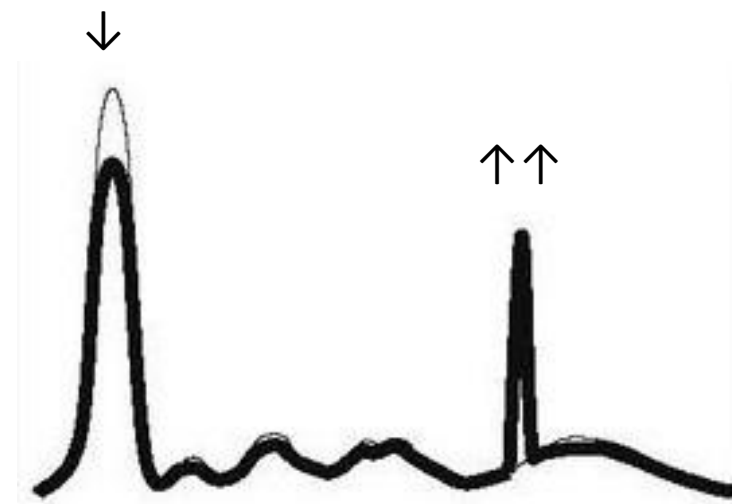
Nevýhoda – detekce pouze velkých změn v proteinových frakcích



Zánět



Hypogamaglobulinemie



Hypergamaglobulinemie
(monoklonální gamapatie)

Využití elektroforézy v klinické praxi screening chorobných stavů

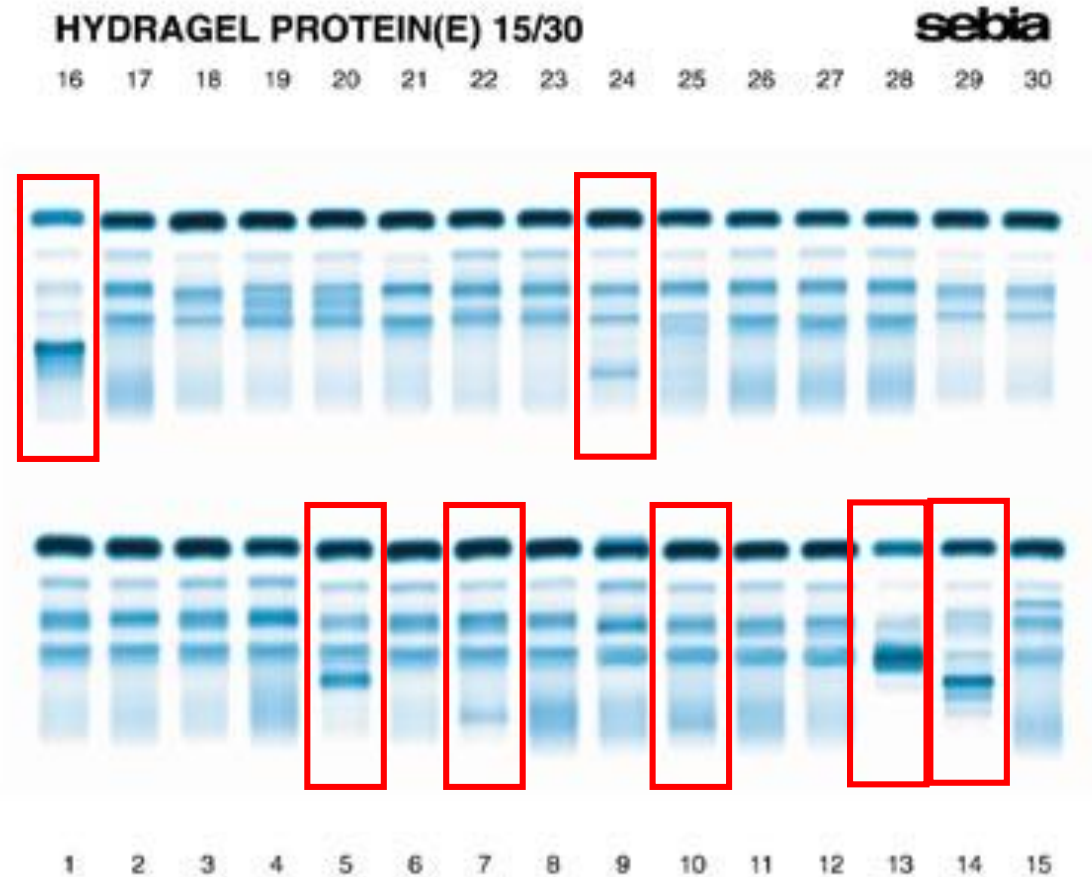
- **Izoelektrická fokusace:** kvalitativní průkaz intratékální syntézy imunoglobulinů
- Vyšetřovaný materiál: Likvor (CSF) + sérum (S) současně
- Intratékální syntéza protilátek v centrálním nervovém systému pochází z perivaskulárních infiltrátů B lymfocytů, které lokálně proliferují, dozrávají v plazmocyty a produkují příslušné protilátky
- Diagnostika **roztroušené sklerózy – průkaz oligoklonálních pásů v likvoru (pozitivita až v 98% případů)**
- Obrázek vpravo: oligoklonální pásy jsou přítomny pouze v likvoru (CSF), zatímco v séru chybí – jedná se o intratékální syntézu Ig – tento nález je pro roztroušenou sklerózu poměrně typický
- **Hematolikvorová bariéra** – neumožňuje přestup imunoglobulinů z krve do likvoru



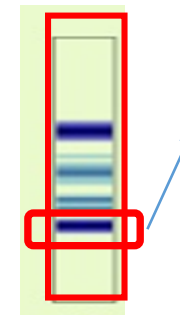
Modifikace elektroforézy - Immunofixace

- Použití:
 - Identifikace paraproteinů- sérum, moč a likvor
- **paraprotein = monoklonální imunoglobulin**
 - produkován 1 klonem B-lymfocytů
- stav, kdy má pacient v séru paraprotein se nazývá **paraproteinémie** nebo též **monoklonální gamapatie**

Elektroforéza



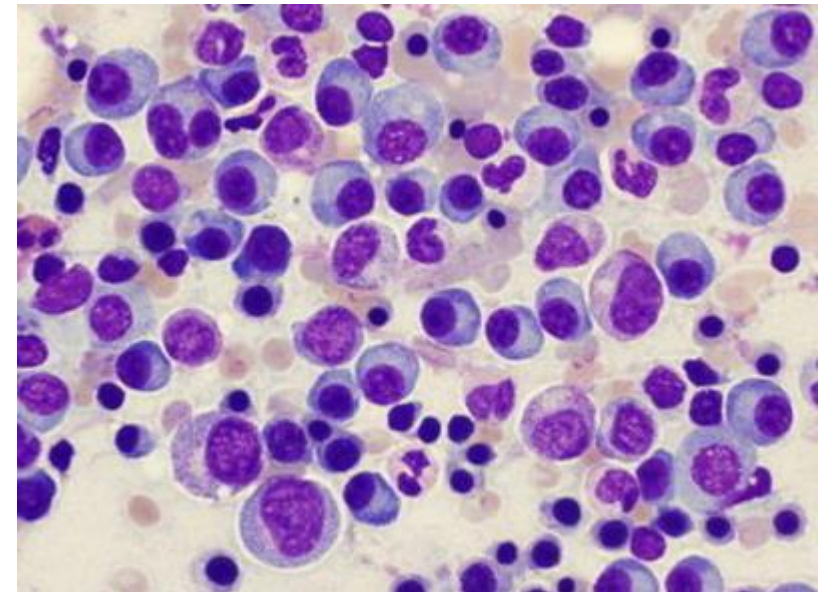
Příklady elektroforetického rozdělení řady patientských sér



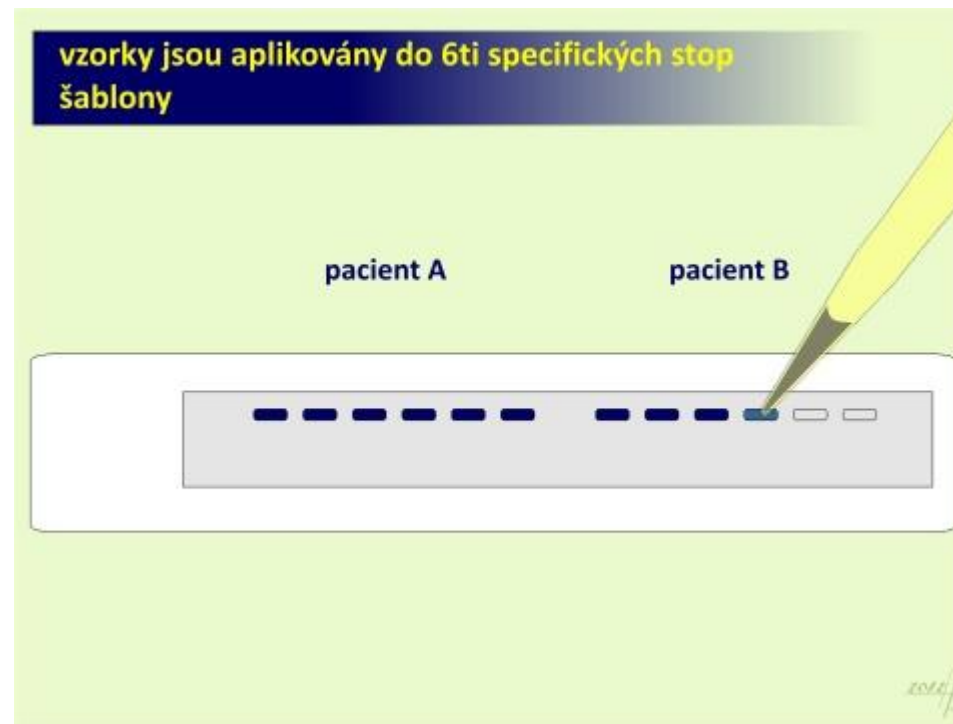
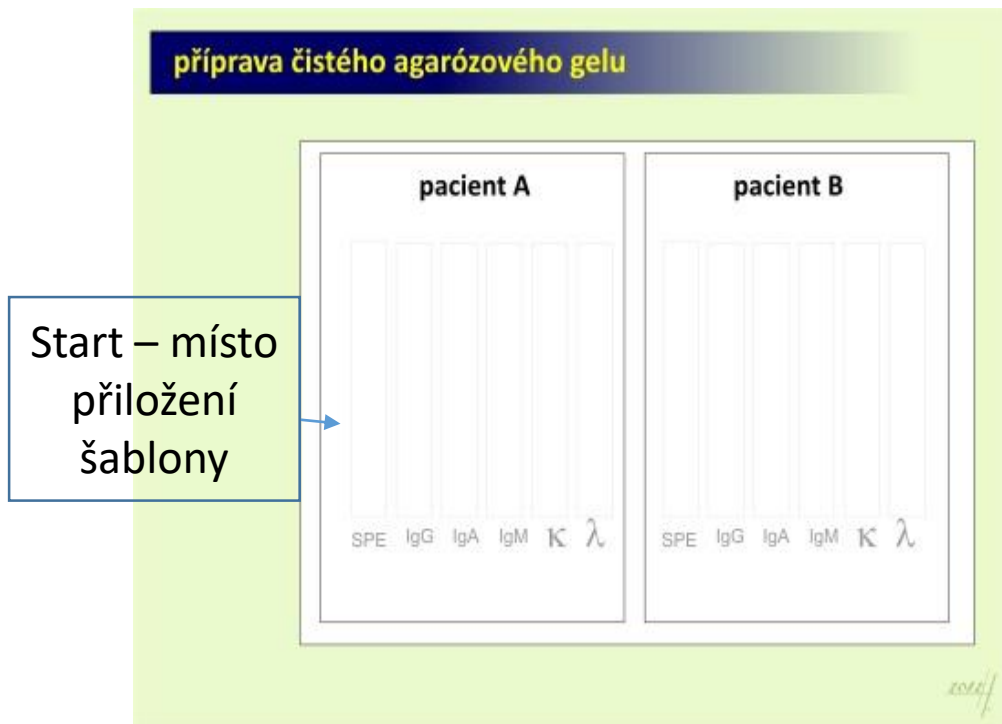
Ohraničený band v γ - globulinové oblasti = pacienti k dovyšetření imunofixací

Monoklonální gamapatie

- Onemocnění s výskytem monoklonálního imunoglobulinu v séru
 - Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS)
 - Mnohočetný myelom
 - Plazmocytom
 - Waldenströмова makroglobulinemie
 - AL amyloidóza
 - Nemoci těžkých řetězců
- **Imunofixace slouží k:**
 - Diferenciální diagnostice gamapatie
 - Sledování vývoje onemocnění v čase
 - Sledování terapie
 - Vyšetření **séra + moči** současně!!

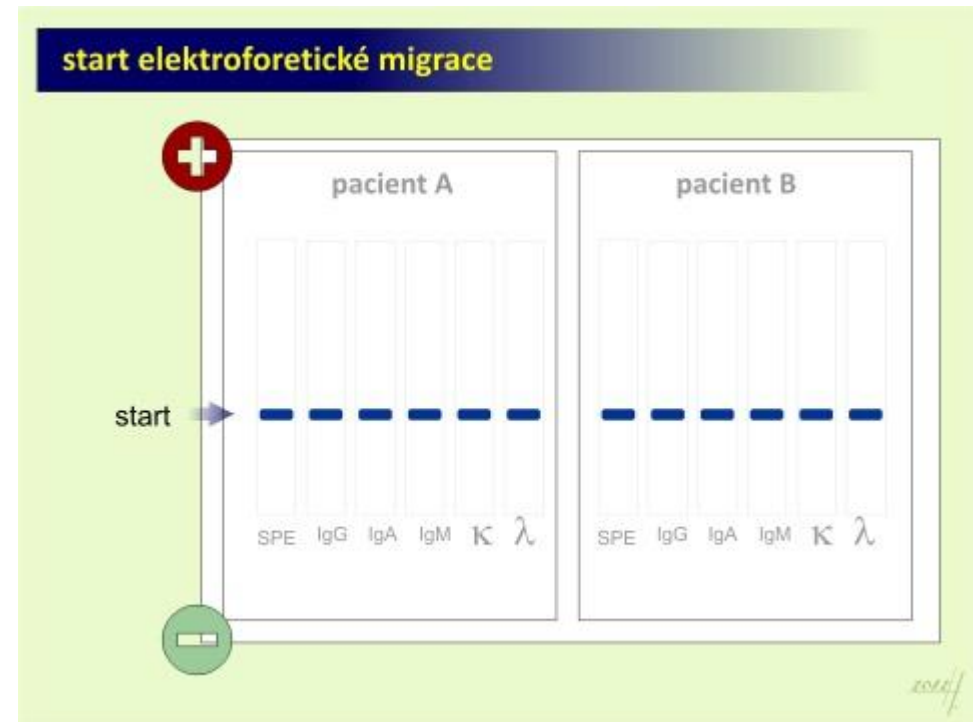
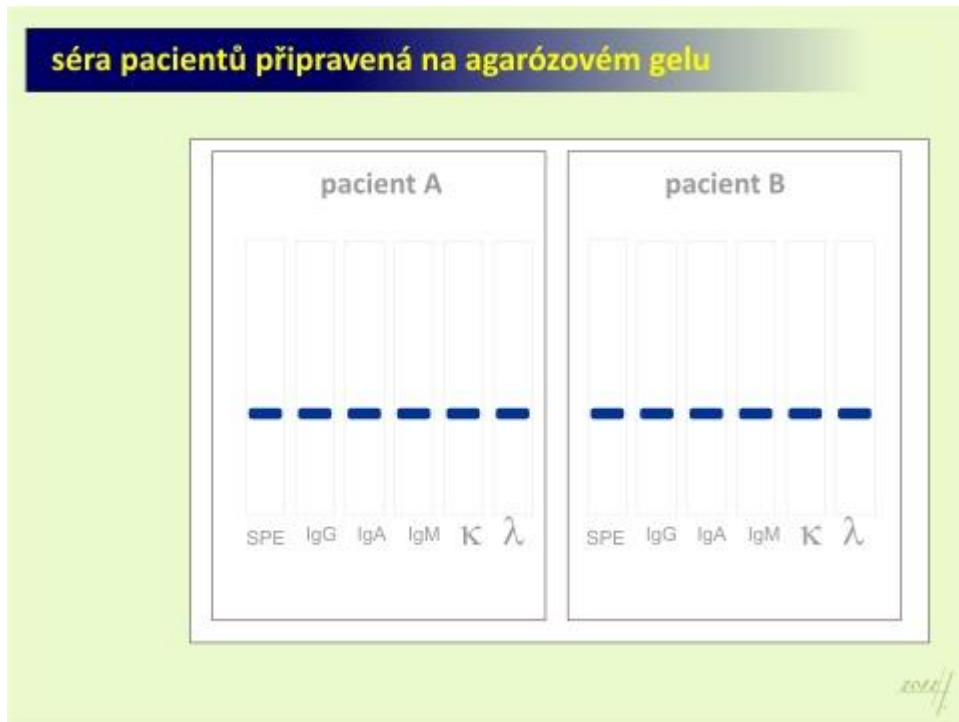


Imunofixace - zpracování



Na agarózový gel se na pozici start nanesou pomocí šablony séra pacientů (**1 pacient = 6 drah**)
Šablona = umělohmotný proužek s vyřezanými tvory který se přiloží na vyznačené místo na gelu pro start

Agarózový gel před elektroforetickým rozdělením



elektroforetická separace proteinů v alkalickém pH



směr
pohybu



start



směr
pohybu



pacient A

pacient B

rychlost pohybu je závislá
na velikosti molekuly a síle náboje

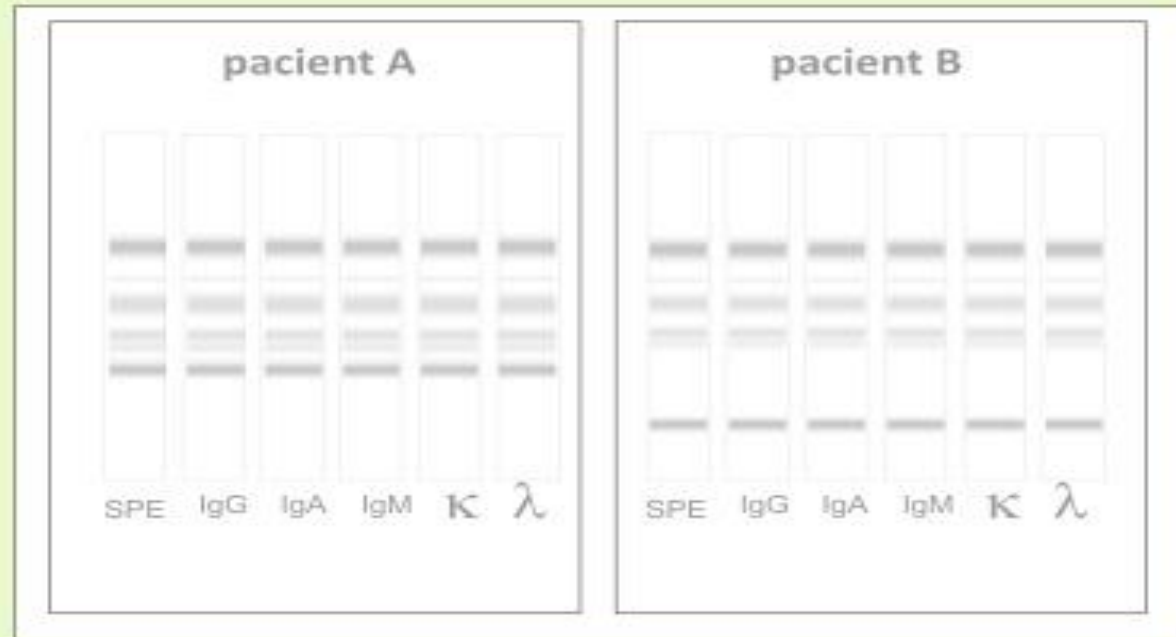
SPE IgG IgA IgM K λ

SPE IgG IgA IgM K λ

2014/

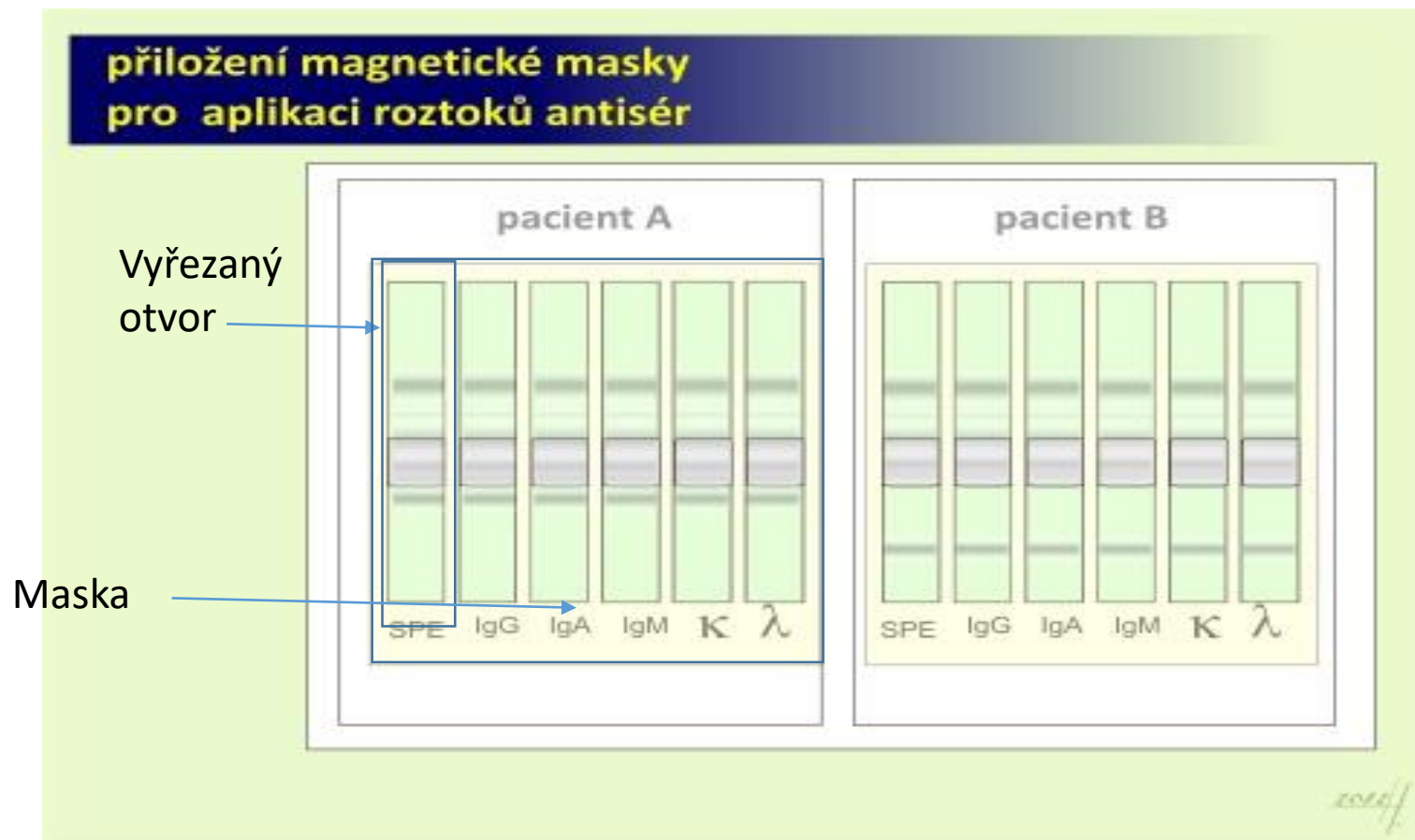
Agarózový gel po elektroforetickém rozdělení

separované imunoglobulinové molekuly

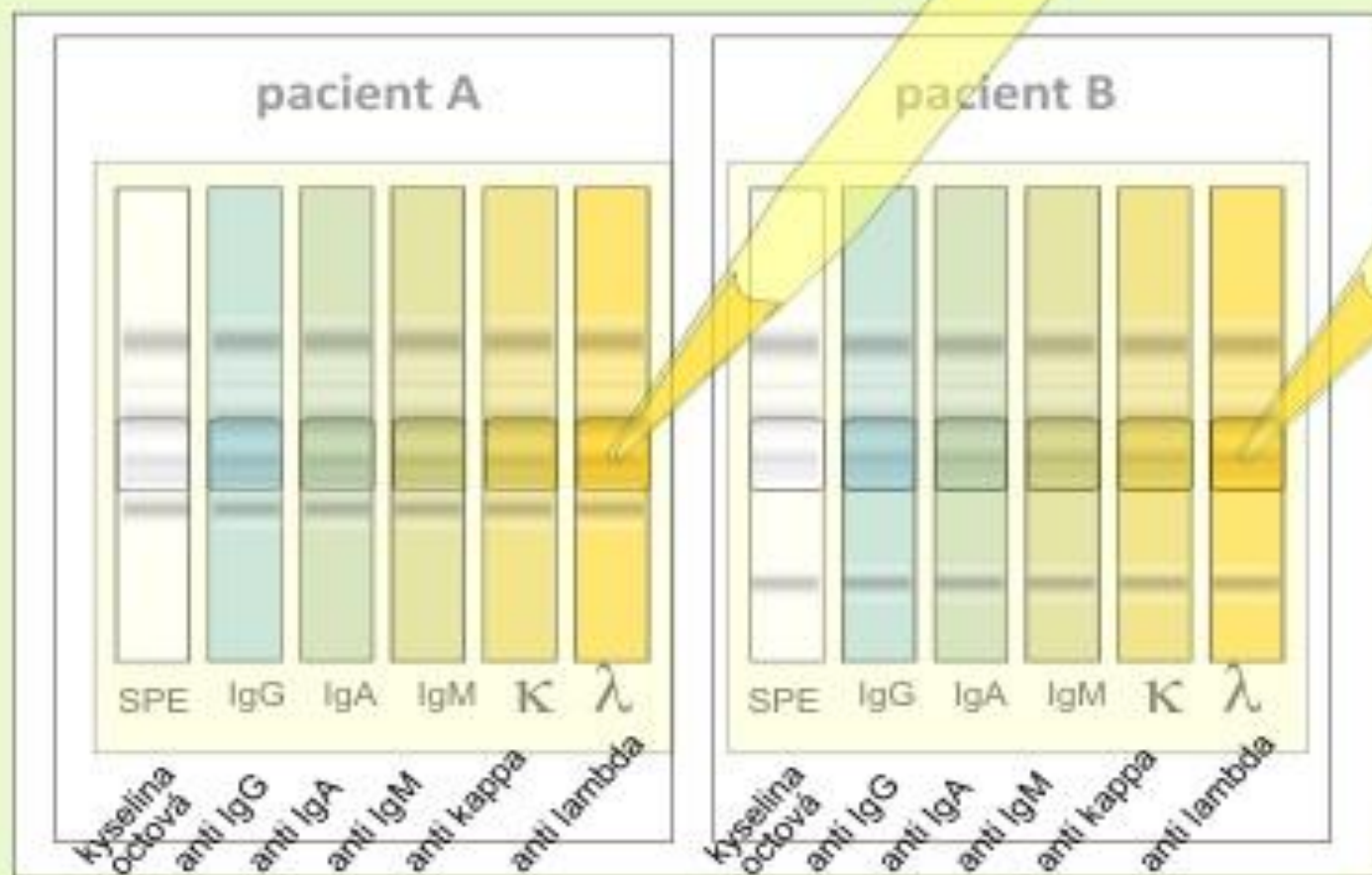


2024/4

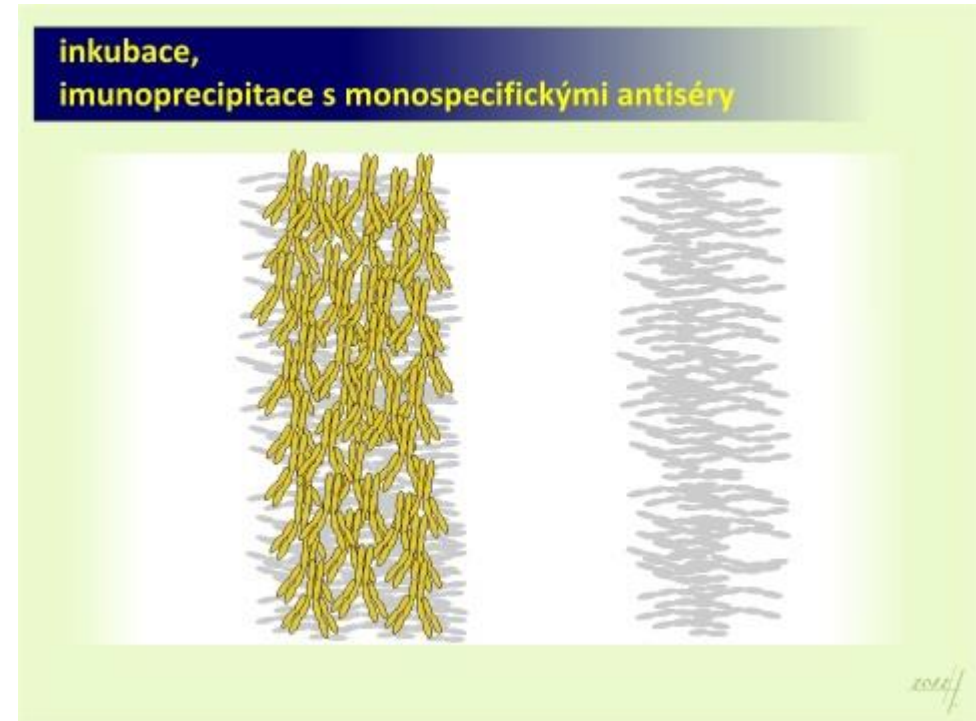
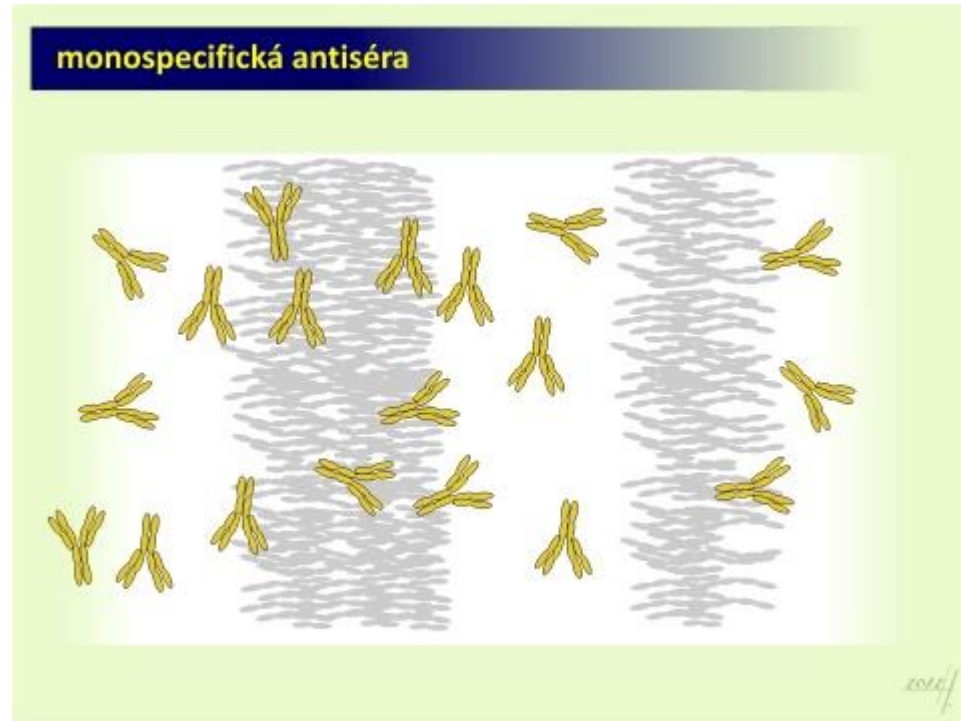
Na agarózový gel se po elektroforetickém rozdělení vzorků séra se přiloží maska
- umělohmotná fólie s vyřezanými otvory tak, aby se na jednotlivé linie dalo aplikovat příslušné antisérum



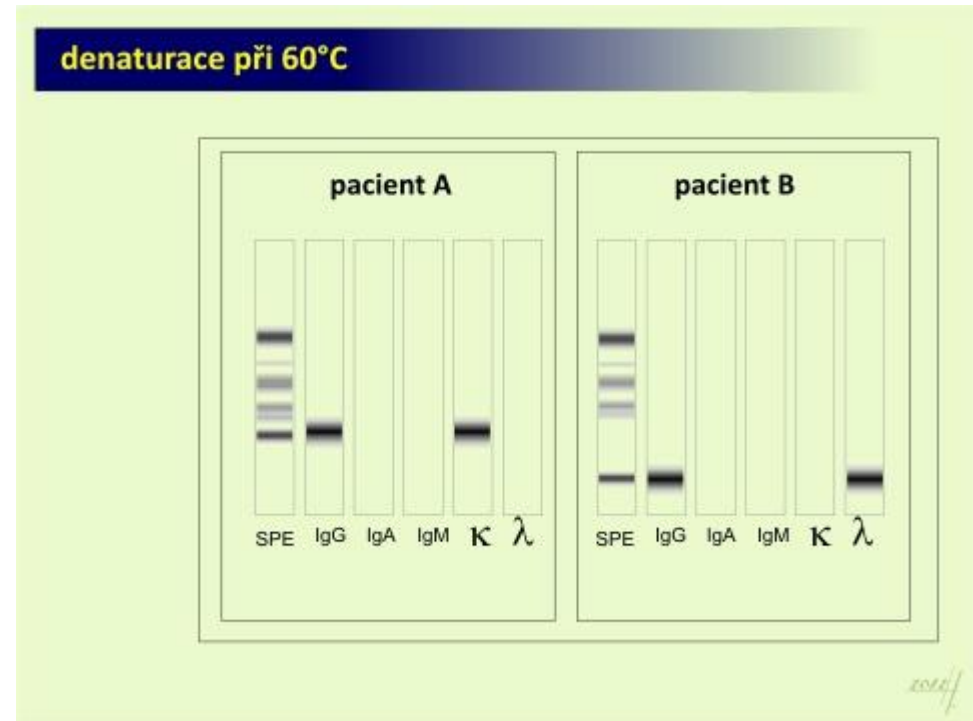
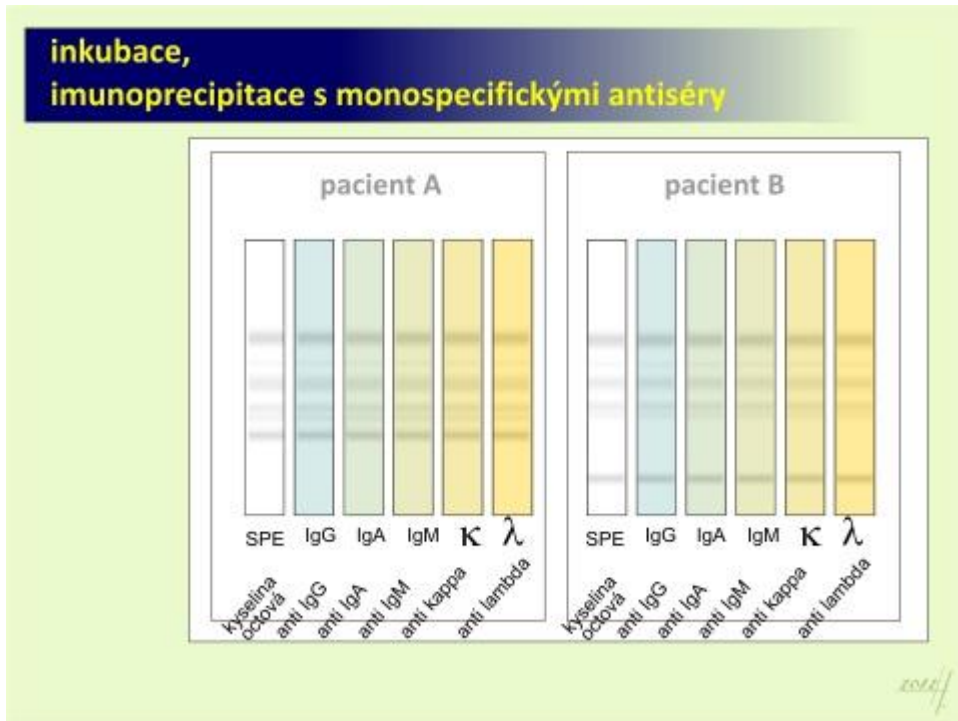
aplikace monospecifických antisér



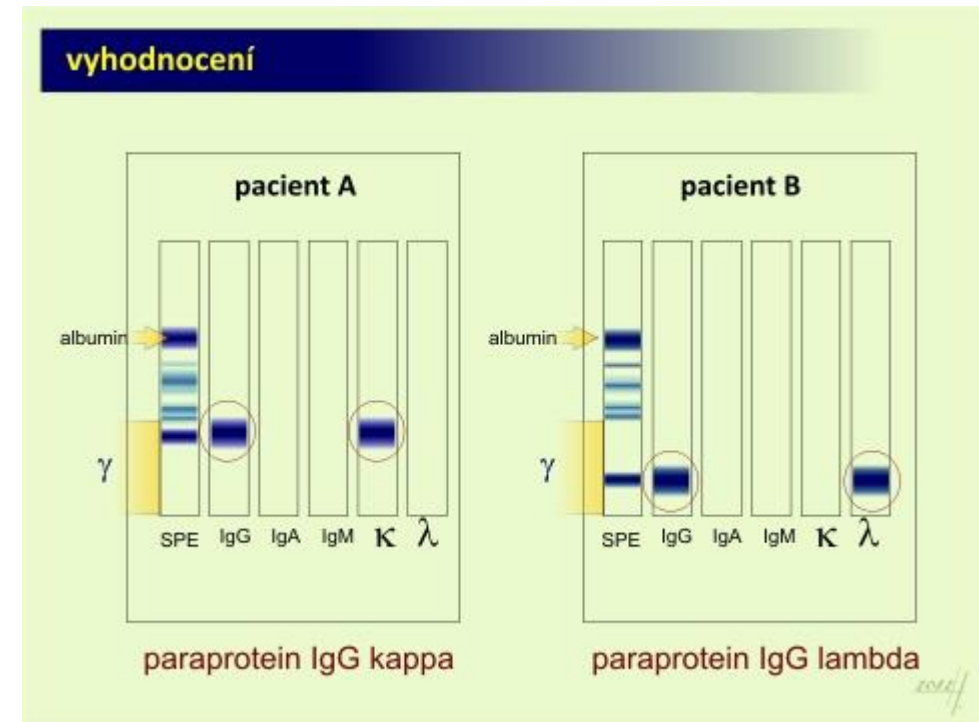
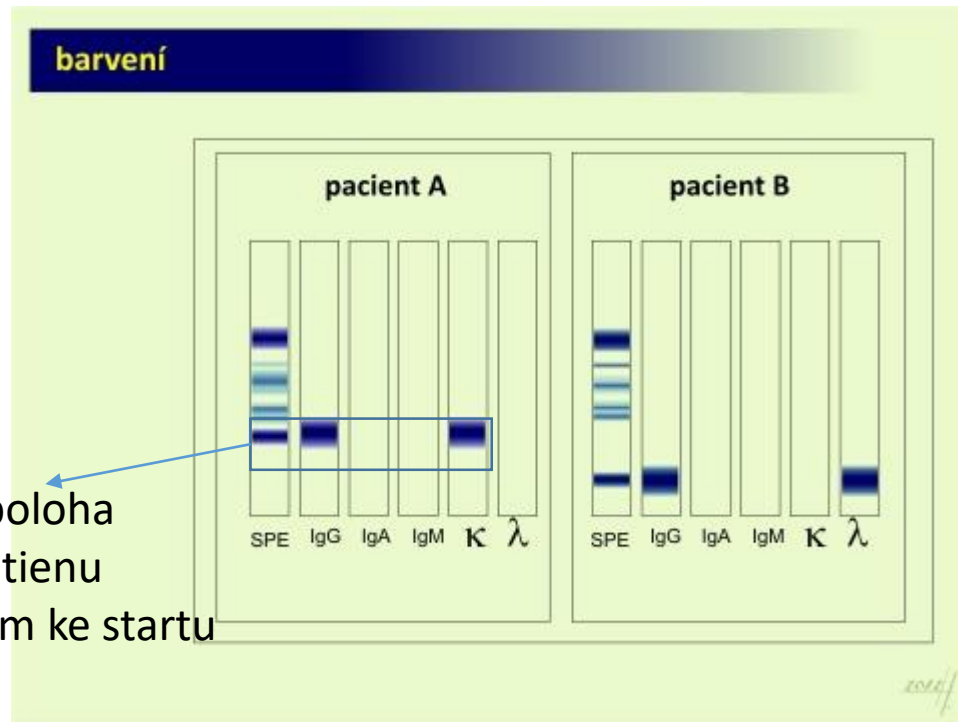
Při inkubaci s monospecifickými antiséry dochází k jejich vazbě na příslušné molekuly imunoglobulinů a dochází k precipitaci



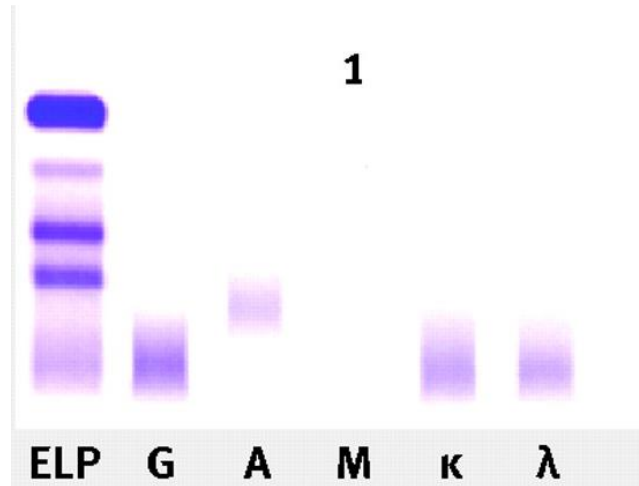
Po uplynutí inkubační doby se celý gel zahřeje na 60°C, čímž dojde k denaturaci vzniklých precipitátů a jejich přilnutí k podkladové membráně gelu.



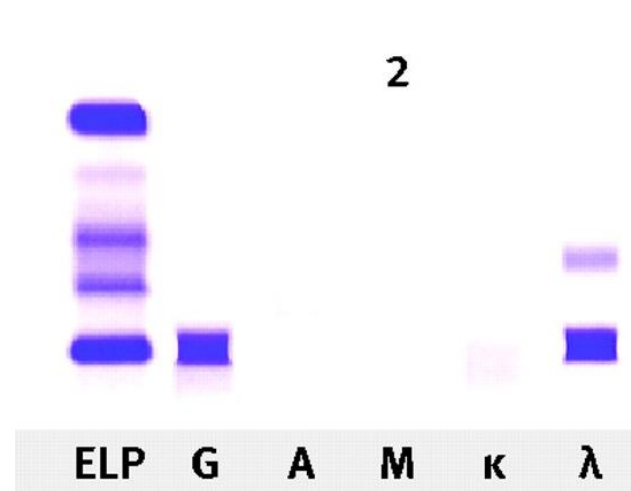
- Pro vyhodnocení se provádí barvení imunofixovaných vzorků a poté jejich vyhodnocení.
- Pokud vyšetřované sérum nebo moč pacienta obsahují zmnožený jeden klon imunoglobulinů nebo jen jejich část – κ nebo λ řetězce - vytvoří se ohraničený proužek tzv. band (paraprotein)
- Při vyhodnocování platí pravidlo, že band –paraprotein- v původním elektroforetickém rozdělení musí mít ve všech pruzích stejnou polohu ve vzdálenosti od startu.



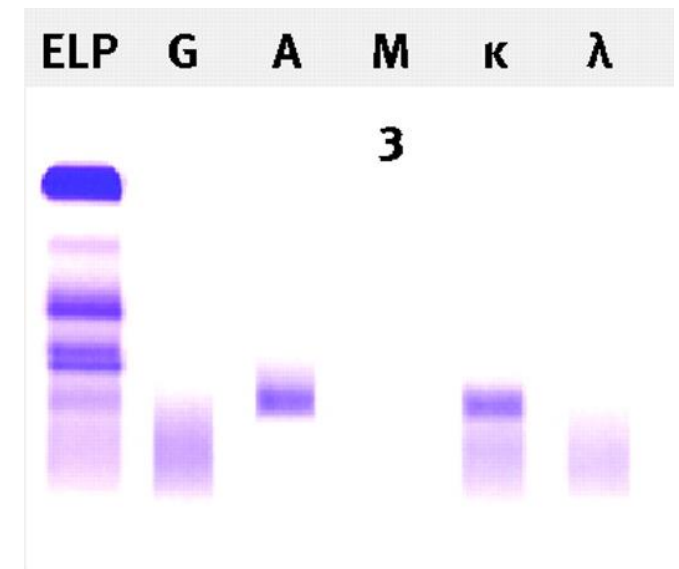
Imunofixace – odečítání výsledků



Polyklonální Ig – zdravý člověk

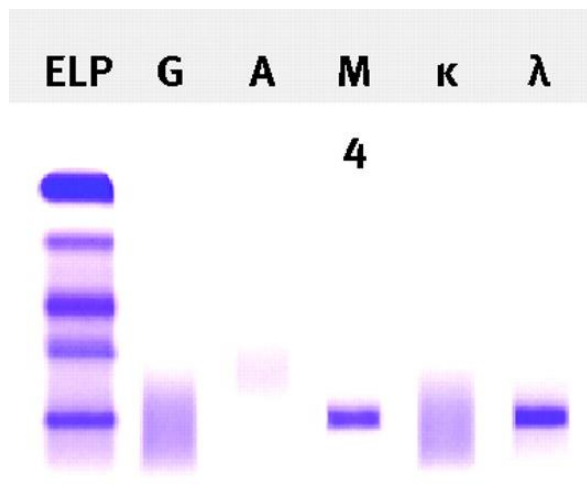


Pacient s paraproteinem IgG λ
a lehkými řetězci λ

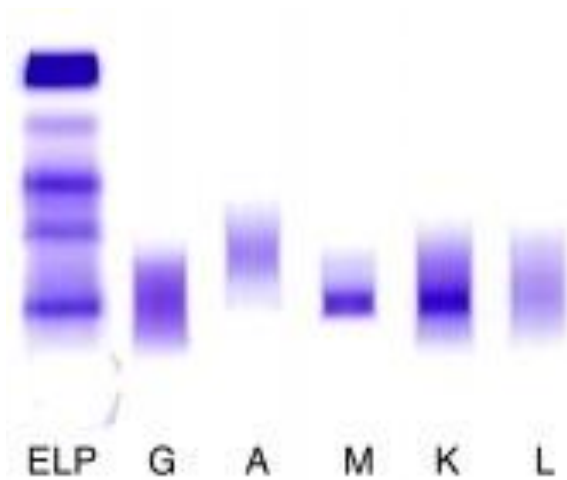


Pacient s paraproteinem IgA κ

Imunofixace – odečítání výsledků



Pacient s paraproteinem IgM λ

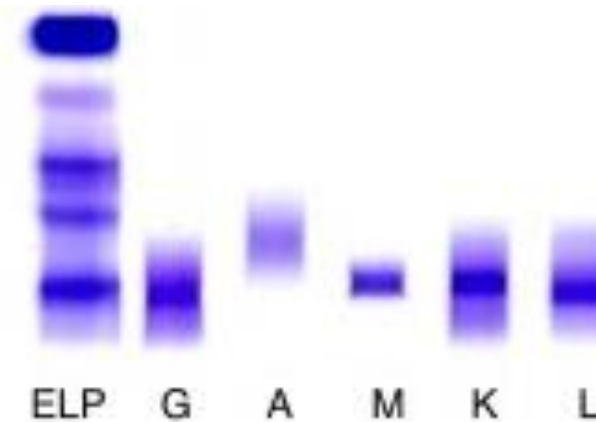


Pacient s paraproteinem IgM κ



Volné lehké řetězce λ

Biklonální gamapatie
IgG κ + IgM λ



Modifikace elektroforézy reakcí Ag-Ab – historické metody

Výroba polyklonálních protilátek

1975

Výroba monoklonálních protilátek

Metody kvalitativní

Imunoelektroforéza (dle Graba a Williamse)

Protisměrná elektroforéza

Metody kvantitativní

Raketková imunoelektroforéza (dle Laurella)

Dvourozměrná elektroforéza

Tyto metody jsou v dnešní době zastaralé a využívají se pouze výzkumně (pocházejí z dob, kdy nebyl znám proces výroby monoklonálních protilátek a používala se tedy pouze polyklonální směsná antiséra)

Imunoelektroforéza

- 2 fáze:
 - 1) Rozdělení proteinů klasickou ELFO
 - 2) Aplikace polyspecifického antiséra do podélně vykrojeného žlábků v gelu → difuze do gelu
- V místě ekvivalentní koncentrace obou složek se vytvoří obloukovitá precipitační linie

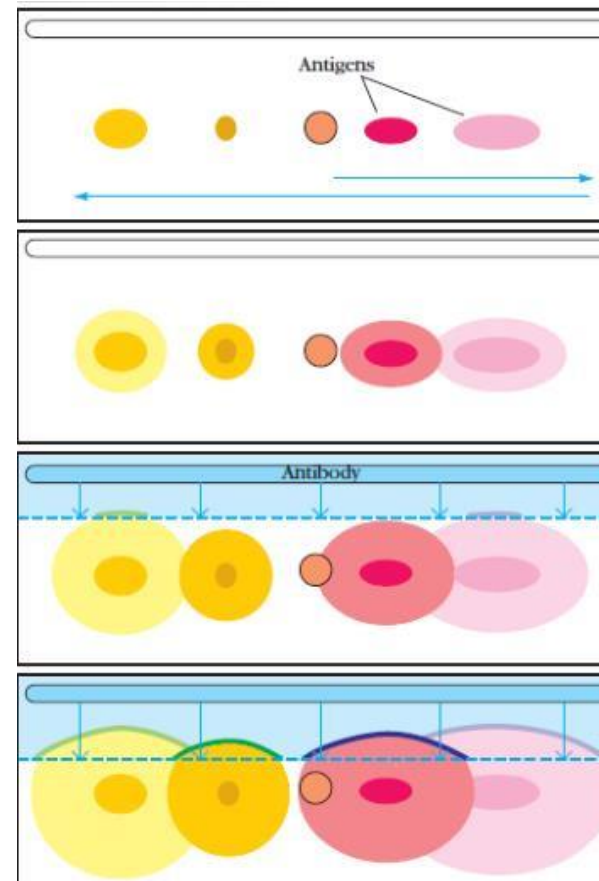


Figure:
Immunoelectrophoresis of an antigen mixture.

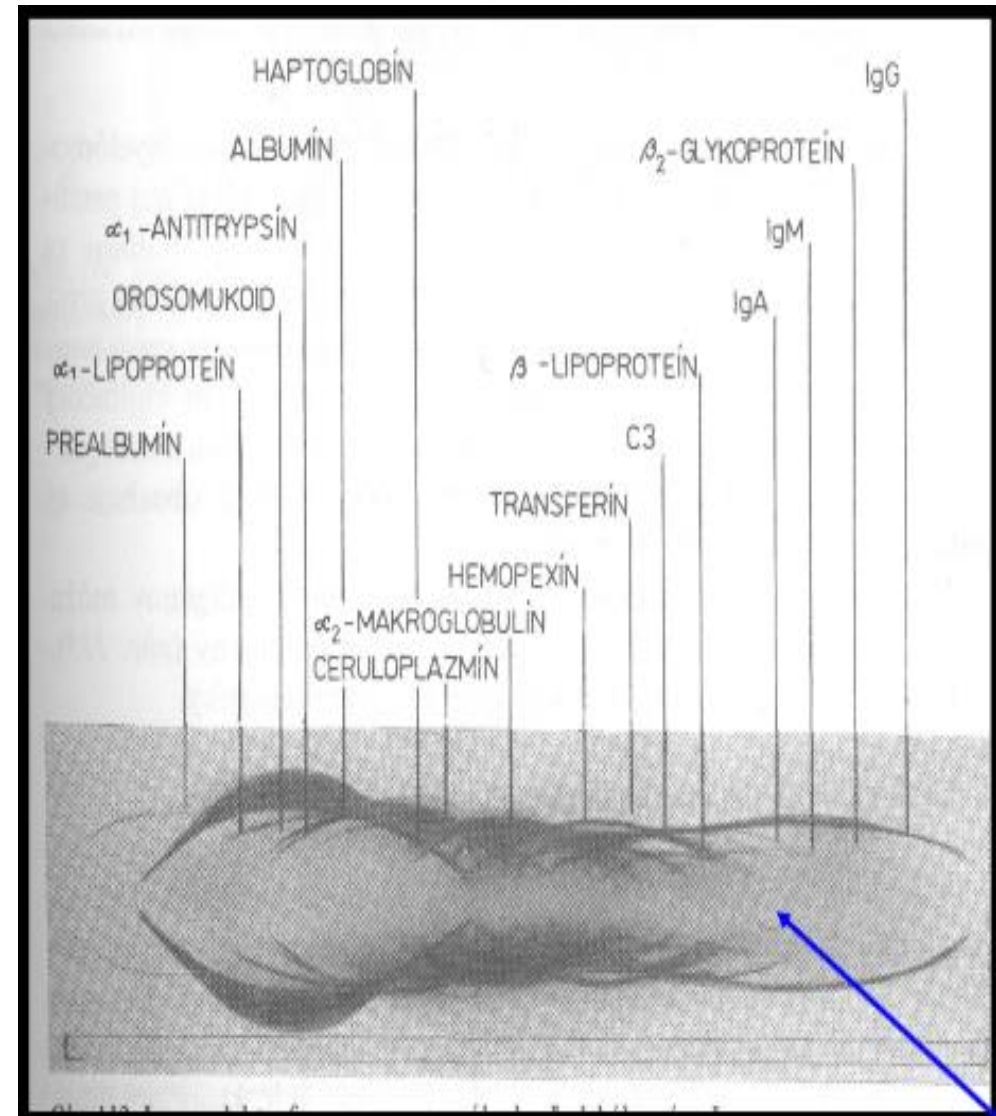
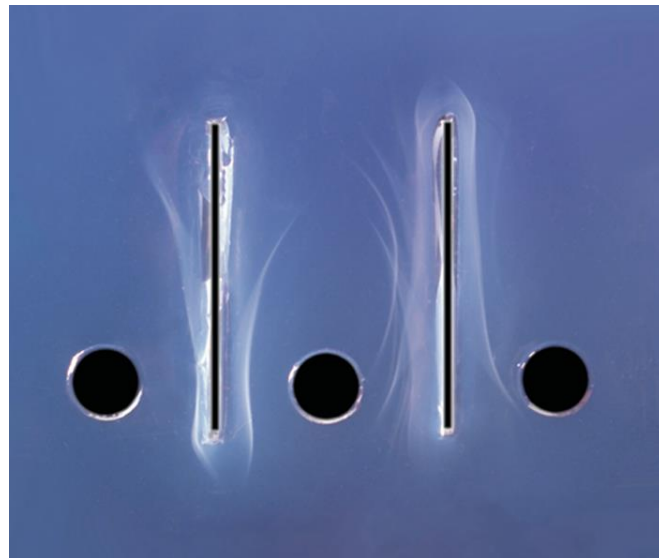
-An antigen preparation (orange) is first electrophoresed, which separates the component antigens on the basis of charge.

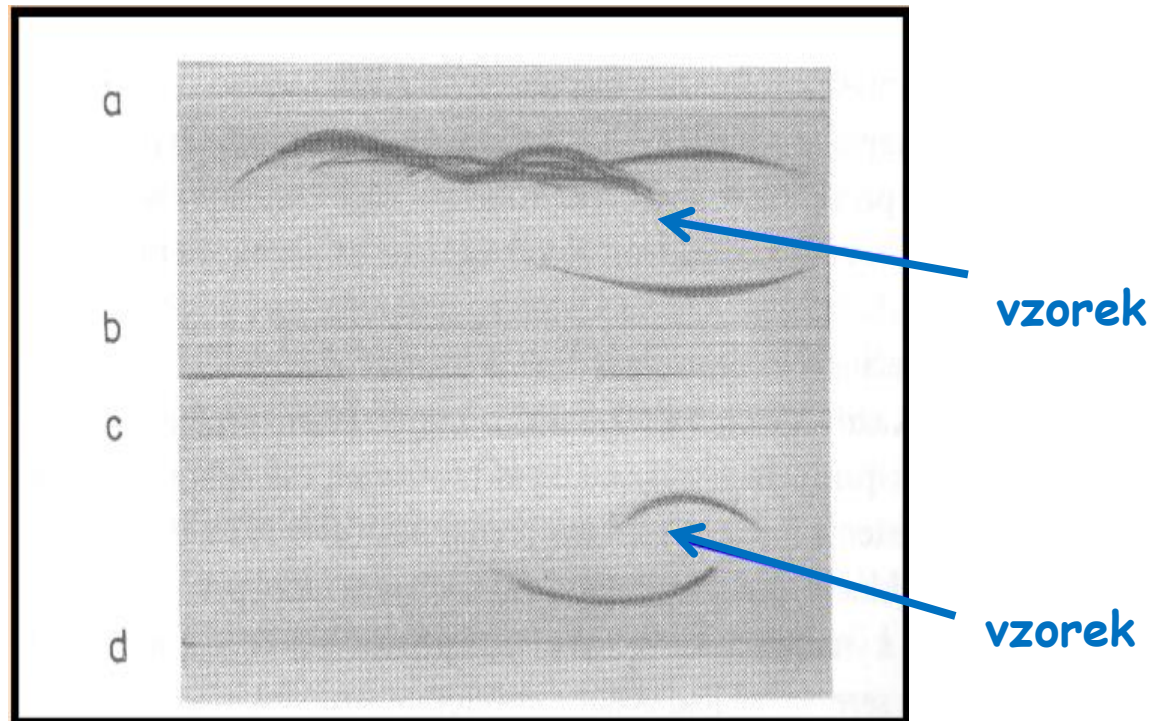
-Antiserum (blue) is then added to troughs on one or both sides of the separated antigens and allowed to diffuse.

-In time, lines of precipitation (colored arcs) form where specific antibody and antigen interact.

Imunoelektroforeogram normálního lidského séra

- Použito **polyspecifické antisérum** → až 35 precipitačních obloučků (každý oblouček = 1 protein)
- Obloučky mají charakteristický tvar a umístění na imunoelektroforeogramu





Nevýhody:

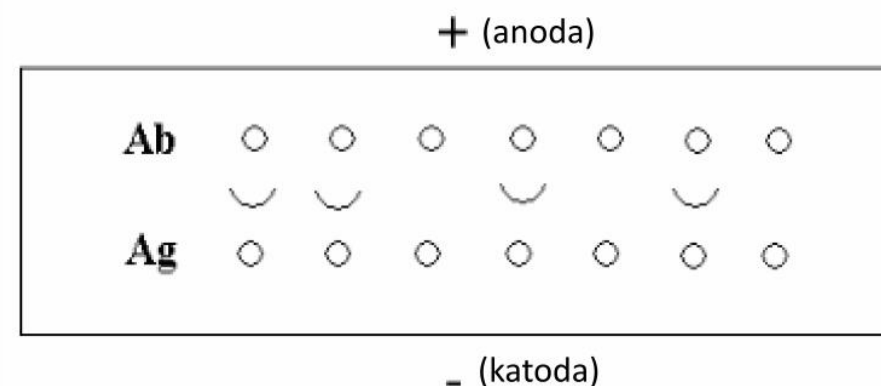
- Díky difuzi velmi zdlouhavé zpracování
- Okometrické odečítání
- Výsledky pouze kvalitativní
- Nutná zkušenost odečítajícího – různé monografie, atlasy

Imunoelektroforegram normálního lidského séra:

| | |
|----------|----------------------------------------------------------|
| žlábek a | polyspecifické antisérum proti lidským sérovým proteinům |
| žlábek b | monospecifické antisérum anti - IgG |
| žlábek c | monospecifické antisérum anti - IgM |
| žlábek d | monospecifické antisérum anti - IgA |

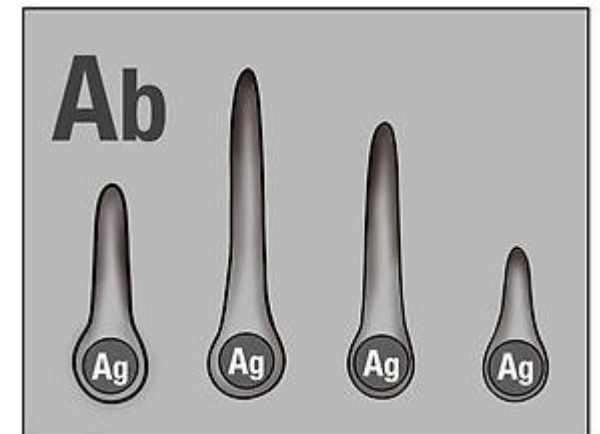
Protisměrná elektroforéza

- Imunodifuze urychlená el. polem (výsledek za 30 min)
- Využívá opačných pohybů Ag a Ab v el. poli
- 2 jamky
 - Jedna blíže anodě – pipetujeme protilátku
 - Druhá blíže katodě – pipetujeme antigen
- V el. poli se bude antigen pohybovat k anodě a protilátka ke katodě → v místě ekvivalentní koncentrace obou složek se tvoří precipitát
- Kvalitativní průkaz antigenů s anodickou pohyblivostí

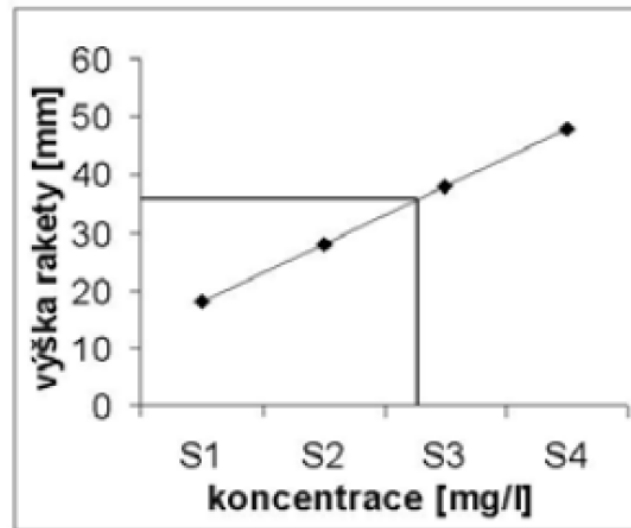
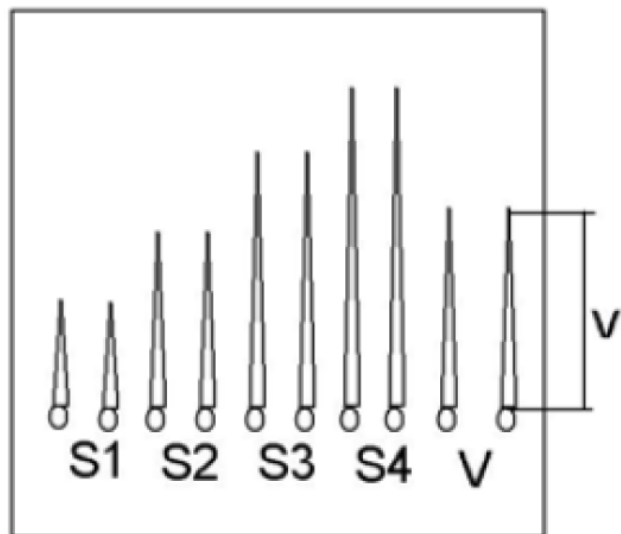


Raketková imunoelktroforéza

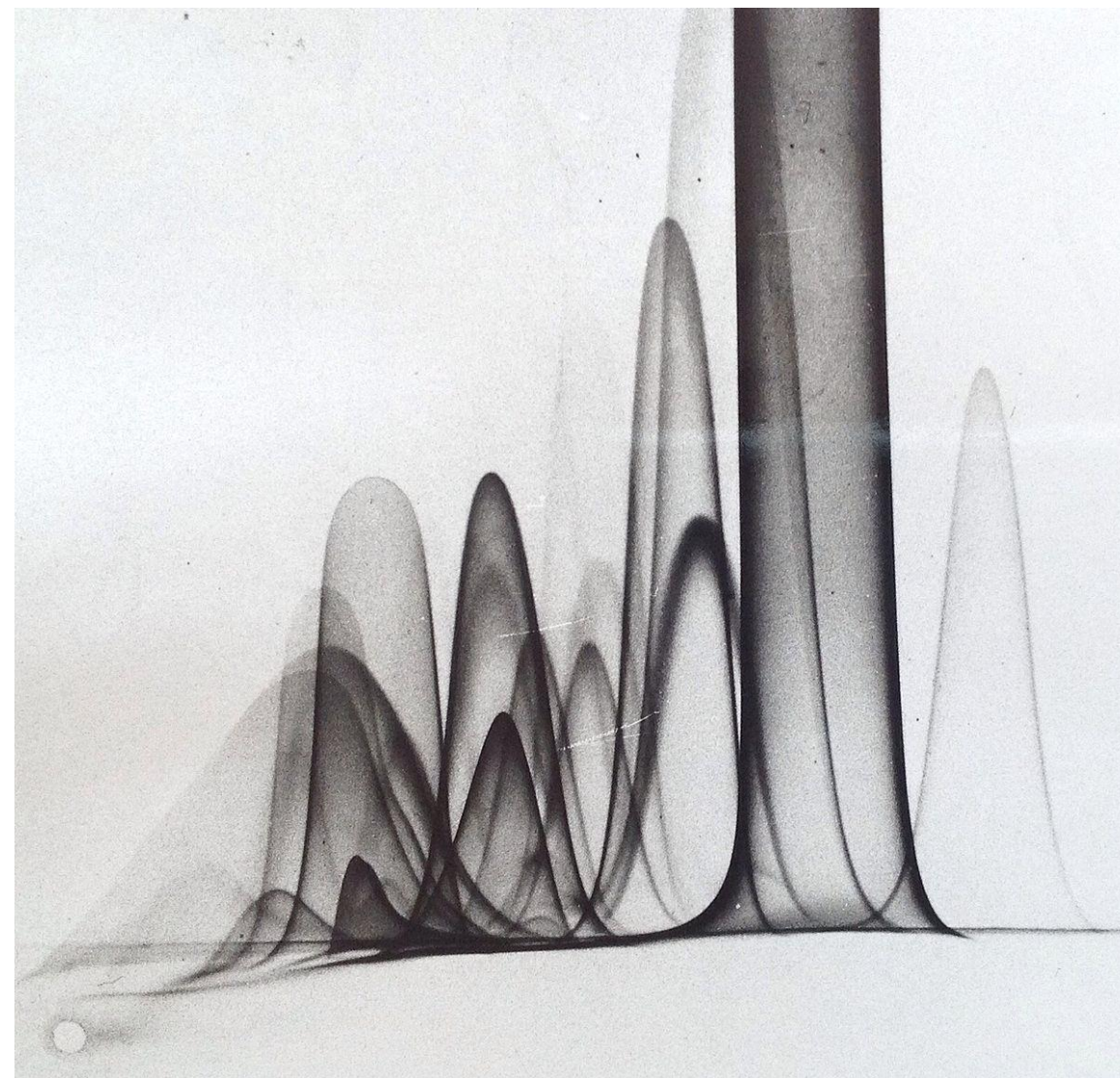
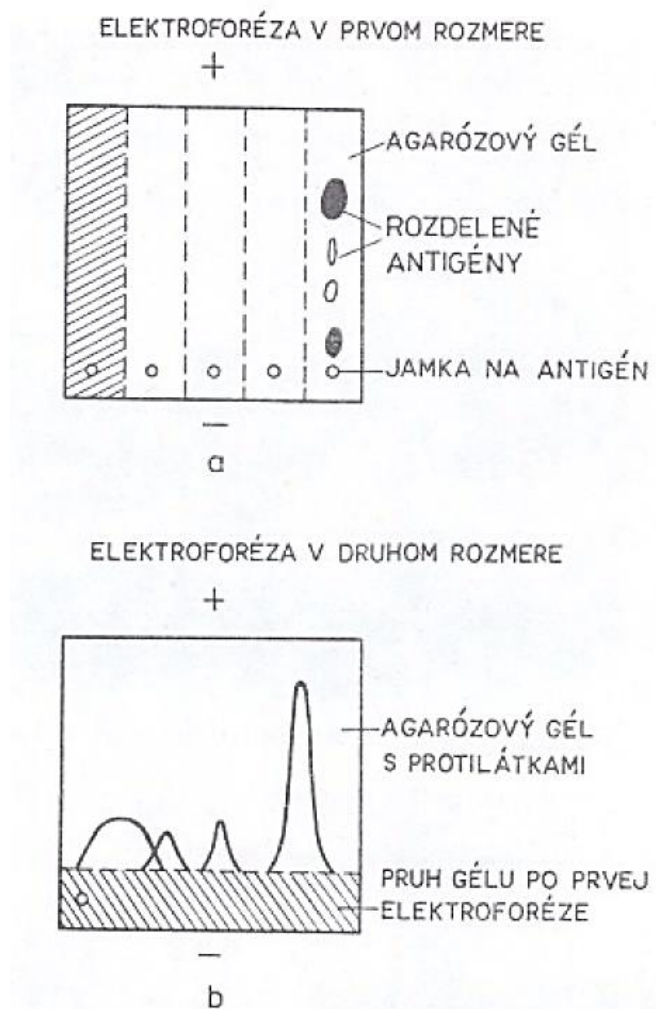
- Umožňuje kvantitativní hodnocení, citlivost od 0,1 mg/l
- Imunodifuze probíhající v el.poli
- Rozdíl od předchozí metody – protilátka (antisérum) se přimíchá do agarózového gelu
- Migrace proteinů – střetávají se s molekulami protilátky v gelu – v místě ekvivalentní koncentrace obou složek se tvoří precipitát
- Díky pohybu proteinů získává tvar píku – „raketky“



Raketková imunoelektroforéza



Dvourozměrná (2D) elektroforéza



Dvourozměrná (2D) elektroforéza

- Kombinace elektroforézy s raketkovou imunoelektroforézou
- Krok 1: klasická elektroforéza séra
- Krok 2: Po ELFO slouží gel s rozdělenými proteiny jako start elektroimunodifuze – gel se otočí kolmo a k němu se doplní nový gel (obsahující polyvalentní antisérum) → elektroimunodifuze probíhá ve směru kolmém na gel se separovanými proteiny
- Vznik píků, jejichž plocha / výška je úměrná koncentraci daného proteinu
- Poloha píku charakterizuje druh antigenu
- Lidské sérum – touto metodou lze stanovit až 50 různých proteinů