

Celková bílkovina

Specifické proteiny

David Zeman

Laboratoř likvorologie a analýzy proteinů, ÚLD-OKB FN Brno

2023

„Celková bílkovina“

= suma všech bílkovin v analyzovaném materiálu

- Referenční meze:
60 – 85 g/L
- Snížení: ztráty
bílkovin, zejm.
albuminu
- Zvýšení: dehydratace,
paraproteinémie

- **Stanovení:**

- 1) Kjeldahlova metoda
(dovedávna referenční)
- 2) Biuretová metoda (dnes
referenční)

*Stanovení nízkých koncentrací
(moč, likvor):*

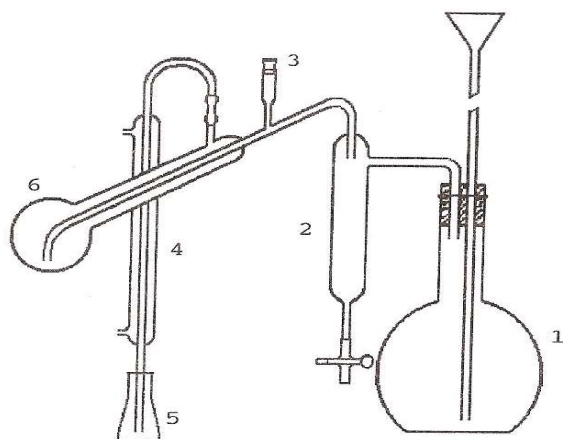
1. Vazba barviva (Coomassie Brilliant
Blue, pyrogallolová
červeně/molybdenan)
2. Turbidimetricky (zákal reakcí s
TCA, benzethonium-chloridem),
popř. nefelometricky (měření
rozptýleného světla)

Kjeldahlova metoda: Parnasův-Wagnerův přístroj pro destilaci amoniaku vodní parou



Kjeldahlova metoda

(obr. z Volka a kol. Analytická chemie II. VŠCHT Praha 1995)



Obr. 6.65. Parnasův-Wagnerův destilační přístroj pro stanovení amoniaku
1 - vyvíječ vodní páry; 2 - kondenzační trubice; 3 - plnicí otvor
4 - chladič; 5 - jímadlo; 6 - destilační baňka

- 1. Izolace sérových bílkovin srážením (oddělení „nebílkovinného dusíku“)
- 2. Katalyzovaná redukční mineralizace varem s koncentrovanou H_2SO_4
- 3. Ze vzniklé amonné soli se působením koncentrovaného NaOH uvolní v uzavřené aparatuře NH_3
- 4. NH_3 se vydestiluje vodní párou do známého objemu odměrného roztoku kyseliny (nejčastěji H_2SO_4) o známém titru (nebo jímáme do slabé kyseliny - H_3BO_3 – a stanovujeme přímo acidimetry)
- 5. Neutralizací vznikne opět amonná sůl a nadbytek kyseliny se stanoví titrací odměrným roztokem hydroxidu

6. Výpočet:

$$n(NH_3) = n(N) = n(H^+) - n(OH^-)$$

7. Přepočet na průměrný obsah

dusíku v bílkovinách (16 %)

Kjeldahlova metoda - reakce

- 1) **Digesce** – varem vzorku v kyselině sírové za přítomnosti katalyzátoru:
$$\text{organický N} + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{vedlejší produkty matrice}$$
- 2) **Destilace**:
 - a) produkt digesce je kvantitativně převeden do destilačního aparátu a v přebytku se přidá NaOH – dojde ke konverzi síranu amonného na volatilní amoniak:
$$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{NaOH} \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{Na}_2\text{SO}_4 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{NaOH}$$
 - b) amoniak je jímán buď do roztoku silné kyseliny, jejíž malý přebytek je poté zpětně titrován standardní zásadou, nebo do kyseliny borité jako dihydrogenboritan amonný:
$$\text{NH}_3 + \text{H}_3\text{BO}_3 \rightarrow \text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3 + \text{H}_3\text{BO}_3$$
- 3) **Titrace**: při destilaci amoniaku do kyseliny borité následuje jediný titrační krok – titrace silnou kyselinou (zprav. H_2SO_4) za použití acidobazického indikátoru se změnou pH mezi 4 a 6 (smíšený indikátor bromkrezolové zeleně s methylčervení):
$$2\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 2\text{H}_3\text{BO}_3$$

Kjeldahlova metoda – finální výpočet koncentrace celkové bílkoviny (CB, TP = total protein)

$$\bullet \text{ TP (g/L) = (V \cdot T \cdot 0.14007 \cdot 6.25) / V_{\text{vzorku}}$$

V = spotřeba titračního činidla v mL na vzorek (přesněji: s odečtením spotřeby titračního činidla na blank);

T = titr titračního činidla (mol/L)

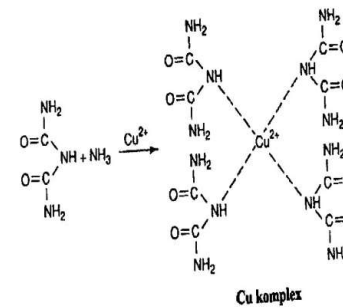
Faktory 0.14007 a 6.25 slouží k přepočtu titračního činidla na N (mg), resp. TP (g/L)

Blíže viz Chromý V et al. *Crit Rev Anal Chem* 2015;45:106-11 a Vinklárková B et al. *Crit Rev Anal Chem* 2015;45:112-18

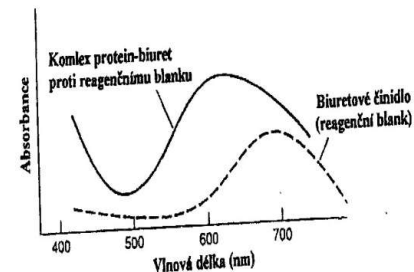
Biuretová reakce

(schéma vpravo z F. Novák: Úvod do klinické biochemie. Karolinum, Praha 2002)

- „Biuret“ vzniká ze dvou molekul močoviny zahřátím za uvolnění amoniaku; není to reagensie, ale sloučenina, která reaguje s Cu^{2+} v alkalickém prostředí analogicky jako peptidová vazba v bílkovinách)



Obr. 6-2 Biuretová reakce



Obr. 6-3 Absorpční spektra biuretového činidla a Cu komplexu

Biuretová metoda

- Reakce Cu^{2+} v alkalickém prostředí s peptidovou vazbou (-CO-NH-) v bílkovinách
- Intenzita vzniklého červenofialového komplexu je úměrná počtu peptidových vazeb
- Fotometrická detekce při 540 – 550 nm
- Interference: lipémie, hemolýza, hyperbilirubinémie (falešně vyšší hodnoty)

Složení činidla:

CuSO_4 , vlnan draselno-sodný (komplexuje Cu^{2+} , který by jinak v alkalickém prostředí vypadl jako $\text{Cu}(\text{OH})_2$), jodid draselný (antioxidant-zabraňuje autoredukci Cu^{2+}), NaOH

Zpravidla end-point stanovení, čas ≥ 8 min (ustálení reakční rovnováhy za 15-30 min; za 10 min dosaženo 95-98 % celkového zbarvení)

Biuretová reakce pro stanovení bílkovin v moči

- Precipitace bílkovin TCA nebo HCl+fosfowolframovou kyselinou v ethanolu
- Koncentrace precipitovaných bílkovin centrifugací
- Rozpuštění bílkoviny a reakce s biuretovým činidlem

Folin-Lowryho metoda

- Kombinace biuretové reakce s činidlem Folin-Ciocalteu
- Činidlo = fosfowolframová + fosfomolybdenová kyselina + alkalický roztok Cu^{2+}
- Pravděpodobně dochází k redukci Cu^{2+} v komplexu s bílkovinou na Cu^+ a následné reakci Cu^+ s Folin-Ciocalteuovým činidlem
- Dochází k redukci molybdenanu resp. wolframanu reakcí s Tyr a Trp (popř. Cys, His) – další barevná reakce výrazně zvyšuje senzitivitu
- Produkce tmavomodrého zbarvení měřeného při 650 nm
- Detekční limit 5 – 10 mg/L
- Interference: EDTA, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Triton X-100

Turbidimetrické stanovení bílkovin reakcí s benzethonium chloridem

(doporučená metoda pro stanovení celkové bílkoviny v moči a likvoru)

- Bílkoviny v alkalickém roztoku reagují s benzethonium chloridem (kvartérní amoniovou solí)
- Vzniklý zákal je stabilní a málo závislý na teplotě
- Větší zákal s albuminem než s globuliny
- Velmi vysoká koncentrace bílkovin \Rightarrow nerovnoměrně rozptýlený zákal \Rightarrow falešně nízké hodnoty !!

Nefelometrické stanovení celkové bílkoviny po precipitaci kyselinou trichloroctovou

(Reiber H. *J Clin Chem Clin Biochem* 1980; 18: 123-127;
Reiber H. *J Biochem Biophys Methods* 1983; 7: 153-160)

- 550 μL 2,4M TCA + 50 μL vzorku za stálého míchání
- Měření rozptýleného světla nefelometricky (kineticky)
- Maximální signál je dosažen za 1-4 min
- Lineární závislost signálu na koncentraci CB v rozsahu 0,04 – 0,9 g/L
- Neinterferuje hemolýza ani lipémie
- Výborná korelace s pracnější Lowryho metodou
- Při zvolené výsledné koncentraci TCA (2,2M) vyrovnaná reakce s albuminem a imunoglobuliny (při nižších koncentracích TCA poskytuje vyšší signál albumin, při vyšších koncentracích TCA imunoglobuliny)
- Výrazně zkalené vzorky (tkáňové homogenáty, frakce membránových bílkovin) lze solubilizovat přidáním 0,1M SDS v 0,1M NaOH

Stanovení bílkovin podle Bradforda (1976)

- Vazba barviva (Coomassie Brilliant Blue G250) na bílkovinu (zejména na *Arg*, méně na *Trp*, *Tyr*, *His*, *Phe* zbytky) způsobí posun absorpčního maxima barviva od 465 k 595 nm
- K vazbě dojde do 2 minut a vzniklé zbarvení je stabilní 1 hodinu
- Výraznější reakce s albuminem než s globuliny
- Při měření koncentrace bílkovin bohatých na *Arg* (např. histony) je nutné použít na *Arg* bohatý standard
- Detergent SDS zeslabuje reakci s albuminem více než reakci s globuliny a nízkomolekulárními proteiny

Marion Mckinley Bradford

(28. 10. 1946 – 3. 5. 2021)



- A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54

Stanovení bílkovin metodou s pyrogallolovou červení a molybdenanem

- Při vazbě bílkovin na směs pyrogallolové červeně s molybdenanem za $\text{pH} = 2,5$ se přesune absorpční maximum od původních 460 nm (samotné činidlo) k 600 nm (580-620 nm – komplex)
- Absorbance při 580-620 nm je v omezeném rozsahu úměrná koncentraci bílkovin v roztoku

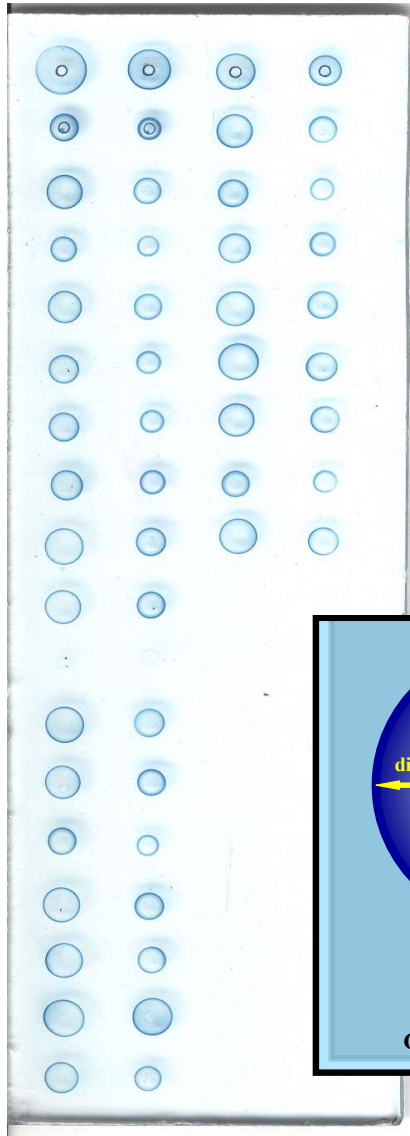
Stanovení jednotlivých plazmatických bílkovin

- V naprosté většině případů **reakce se specifickou protilátkou** (výjimky: albumin, fibrinogen – lze i jiným způsobem)
- **Radiální imunodifúze (RID)** – precipitační metoda (d^2 precipitačního prstence je úměrné koncentraci analytu)
- **Reakce v roztoku** (protilátka vždy v nadbytku!!) – úbytek intenzity záření ze zdroje po průchodu kyvetou s roztokem daný rozptylem světla na imunokomplexech (**turbidimetrie**) nebo měření rozptýleného světla (**nefelometrie**); pro nízké koncentrace (cca 0,5 – 10 mg/L) je specifická protilátka navázaná na latexové částice (nižší detekční limit – viz dále)
- Reakce se značeným třetím reaktantem (pro velmi nízké koncentrace analytu <0,1 – 1 mg/L)

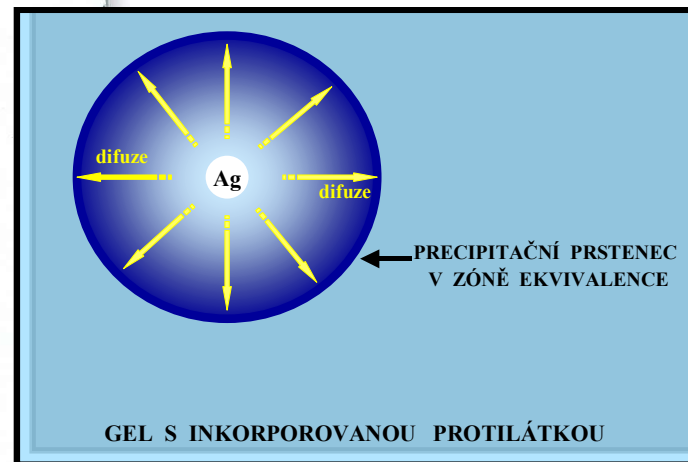
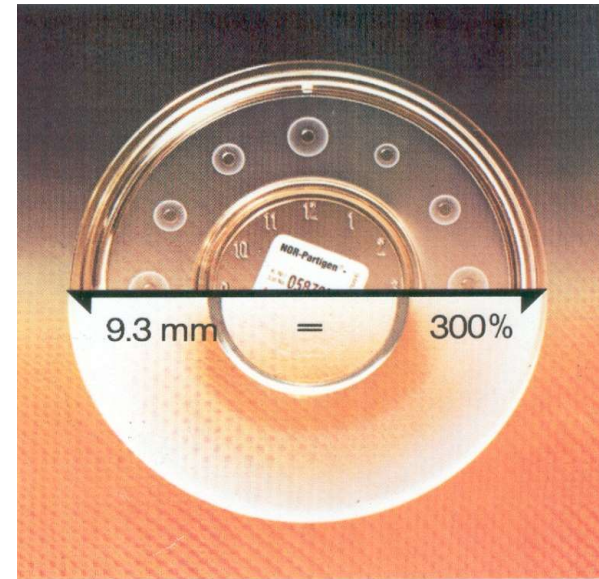
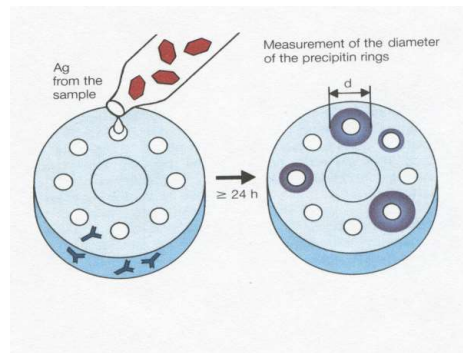
Kvantitativní stanovení: pro koncentrace nad 5 - 10 mg/L

- A) Imunoprecipitační reakce v gelu (RID podle Manciniové)
- B) Elektroimunostanovení (EID) podle Laurella
- C) Imunoprecipitační reakce v roztoku (s turbidimetrickou
nebo nefelometrickou detekcí)

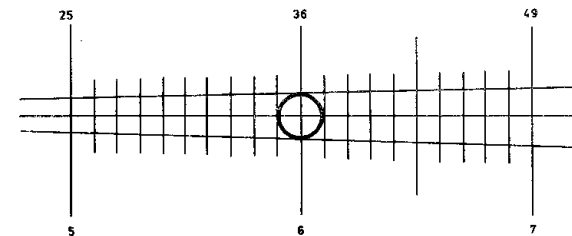
A) Imunochemická reakce v gelu



RID (Manciniová)



Kvantitativní měření

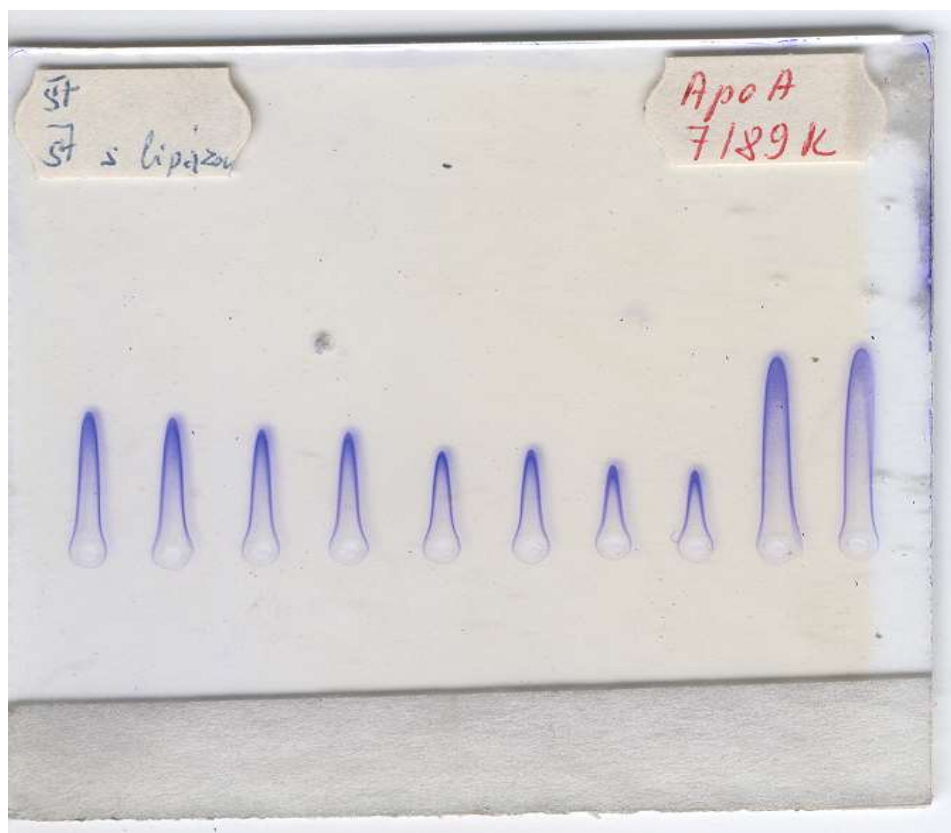


B)

Imunochemická reakce v gelu

Kvantitativní měření

Elektroimunodifuze dle Laurella

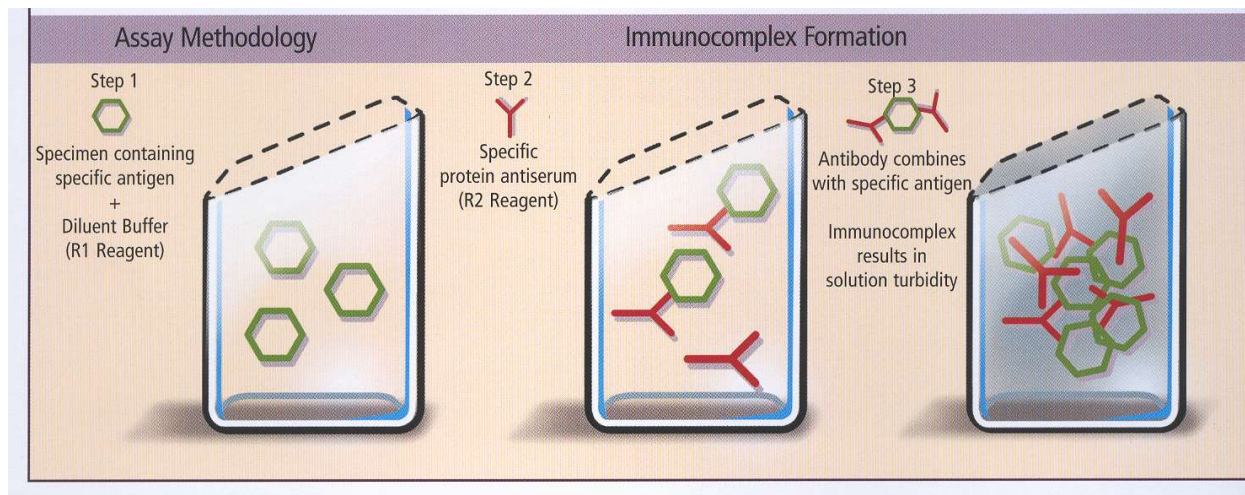


C) **Imunoprecipitace v roztoku:**

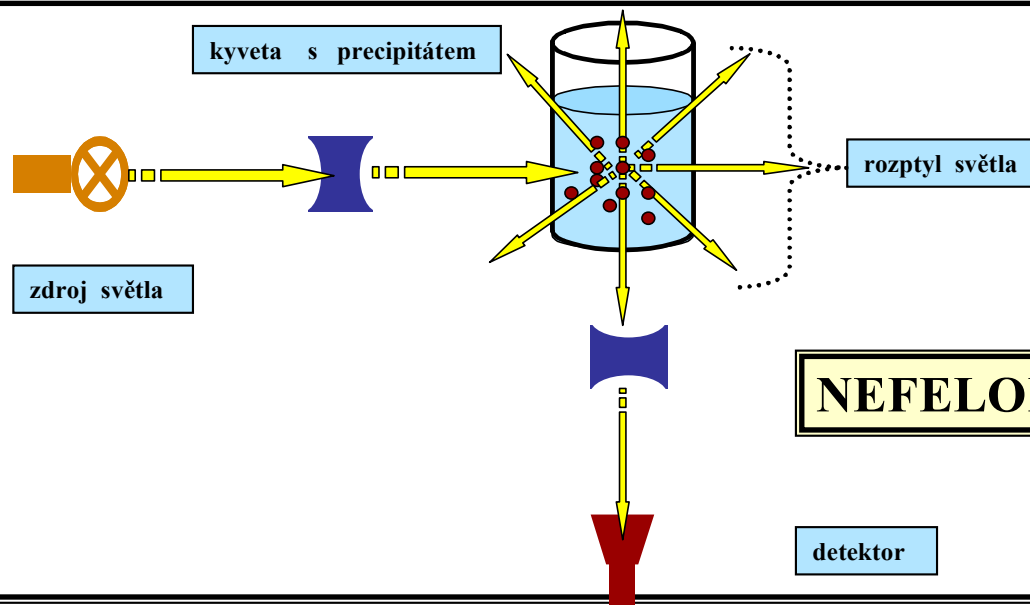
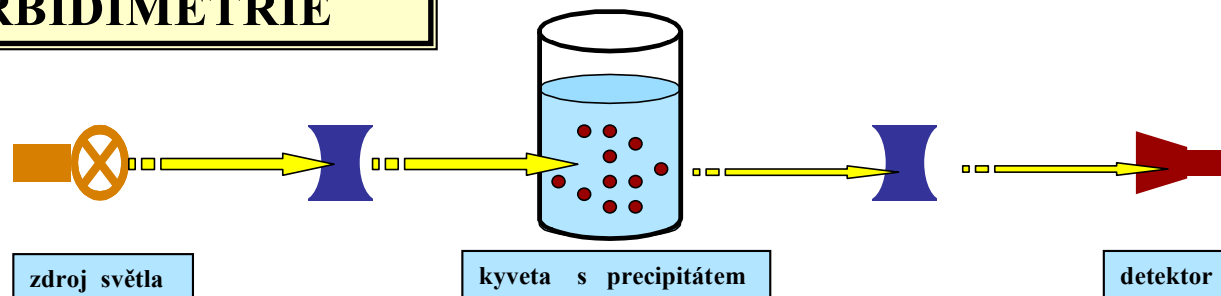
Prostředí: PEG

Detekce: nefelometrie, turbidimetrie

Stanovení koncentrace: IgG, IgA, IgM, proteiny akutní fáze

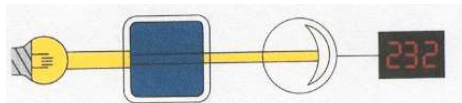


TURBIDIMETRIE



NEFELOMETRIE

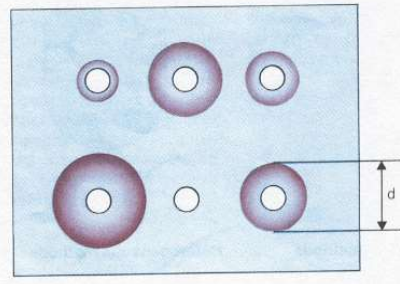
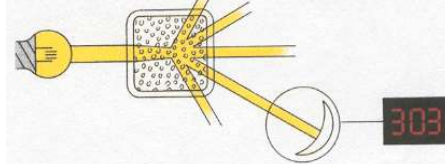
Měřicí techniky



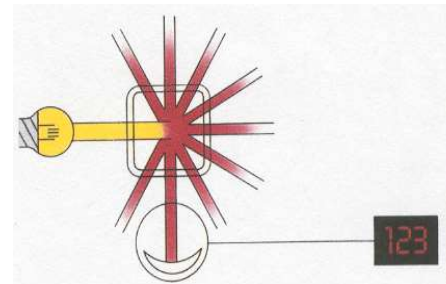
fotometrie



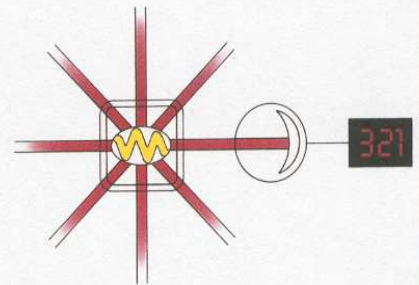
Turbidimetrie
a nefelometrie



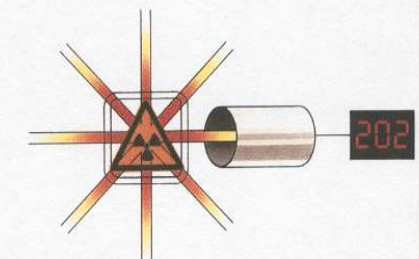
Radiální
imunodifuze



fluorescence



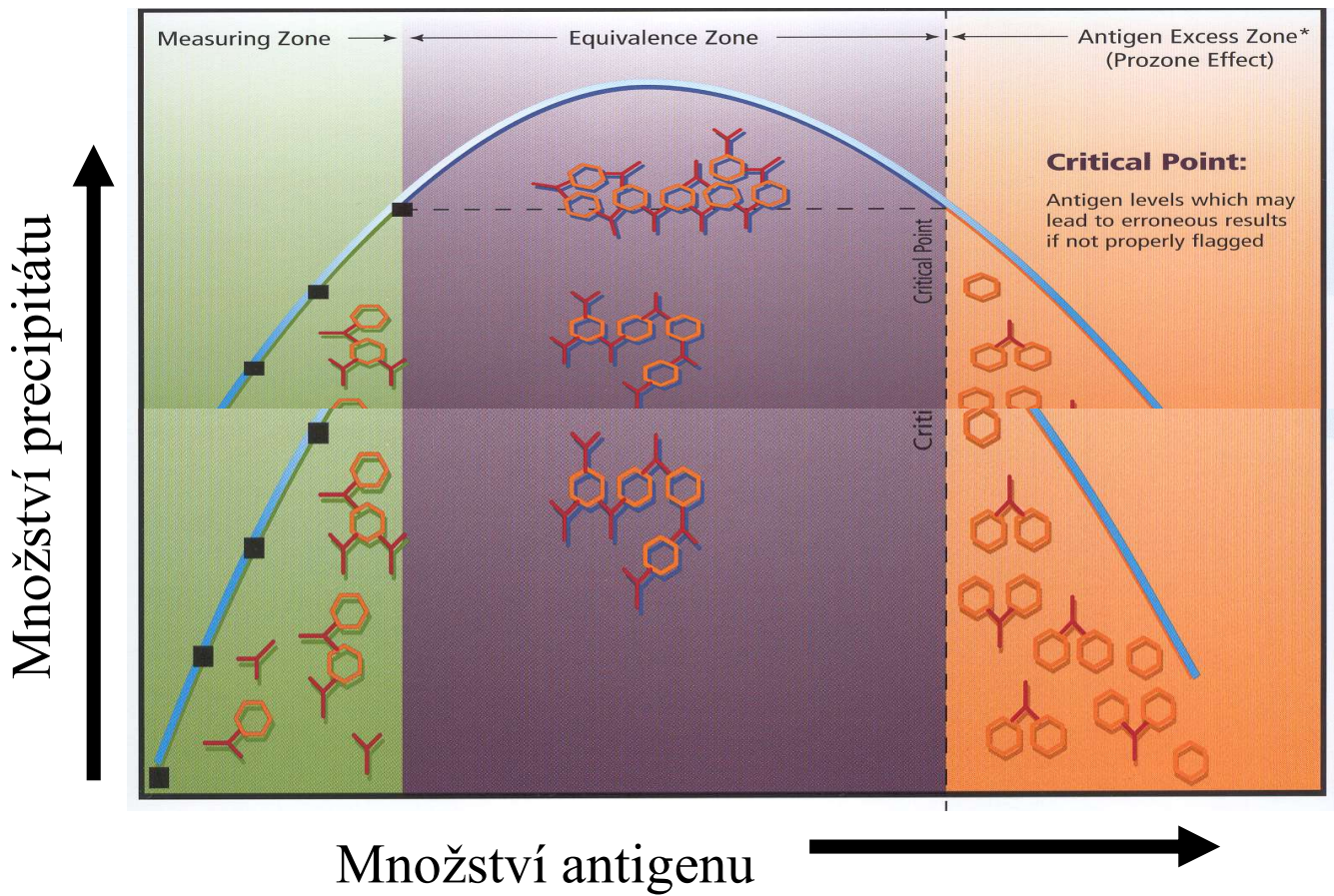
luminiscence



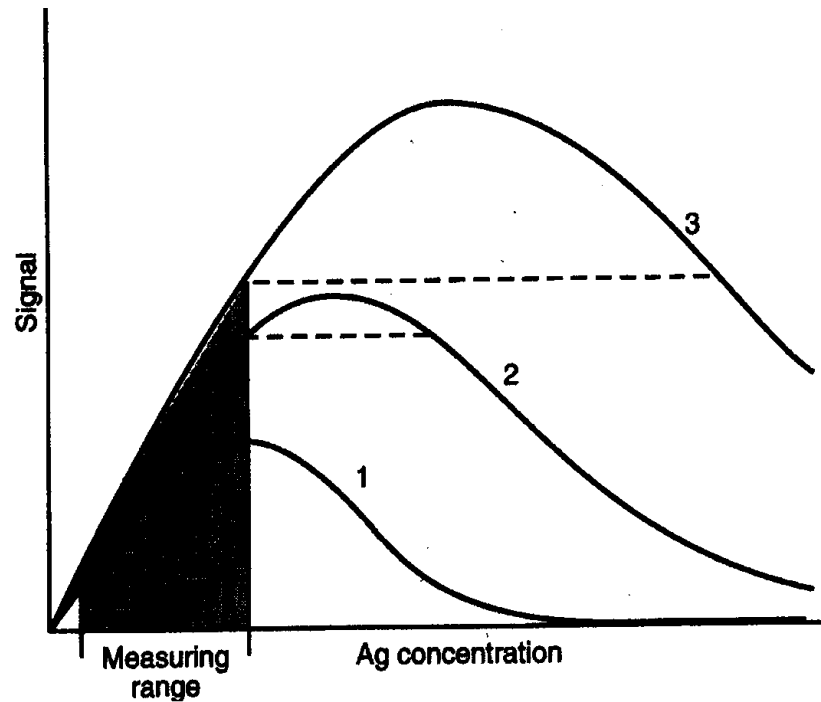
radioaktivita

Heidelbergerova-Kendallová křivka

(Heidelberger M, Kendall FE. A quantitative theory of the precipitation reaction. *J Exp Med* 1935, 62: 697-720)

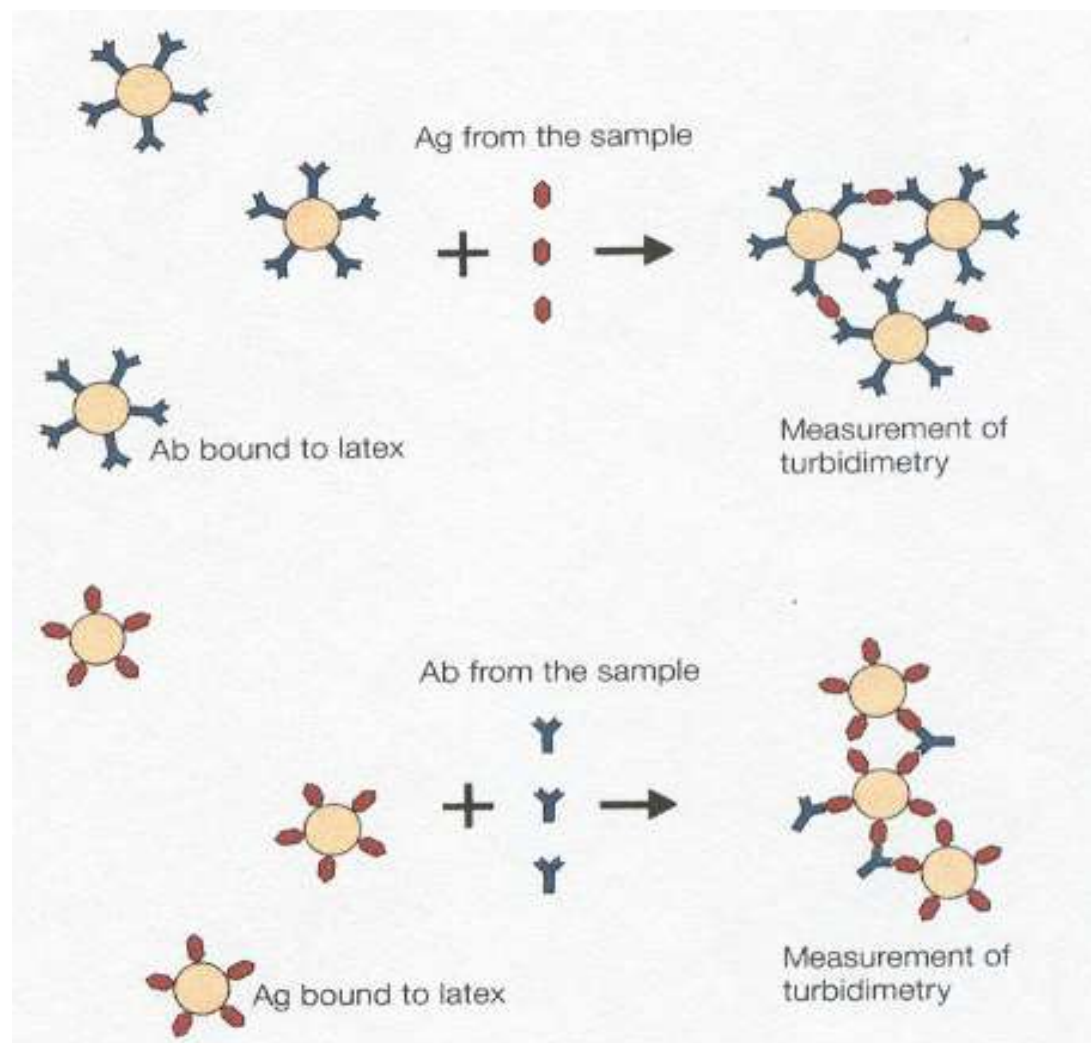


Vliv koncentrace protilátky na zónu „bezpečí“



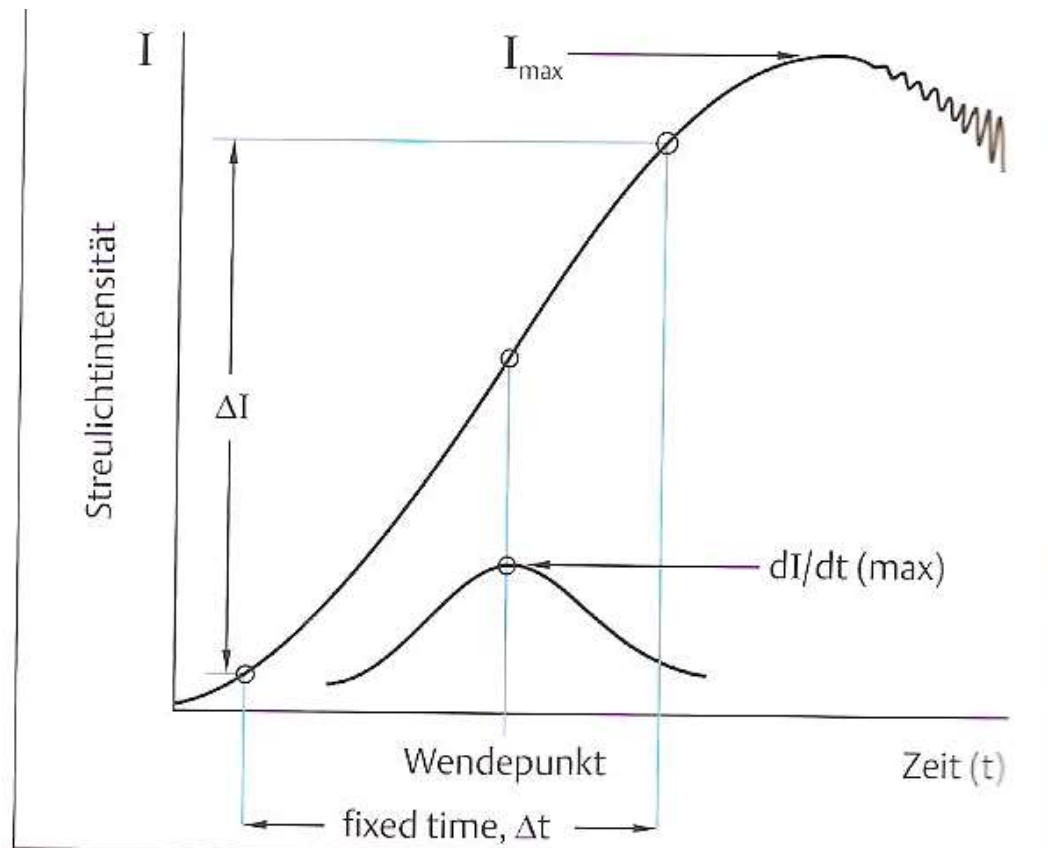
*Figure 19. Dose-response curves illustrating the effect of increasing antibody concentration on the security range (dotted line).
1: Low, 2: Medium, 3: High antibody concentration.*

Využití latexových částic (pro nízké koncentrace analytu)



Kinetika versus end-point stanovení

(obr. z H. Reiber: Methodische Grundlagen der Analytik. In: Wildemann, Oschmann, Reiber (Eds.): Neurologische Labordiagnostik. Thieme, Stuttgart, 2006: p. 20.)



End point nefelometry

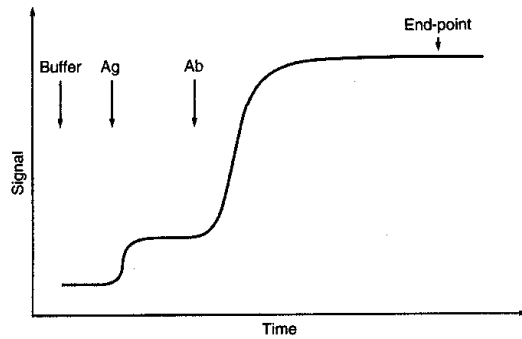


Figure 3. Signal development as a function of time. The addition of buffer, antigen (Ag), and antibody (Ab) to the reaction cuvette is indicated by arrows.

fixní čas

Rate nefelometry

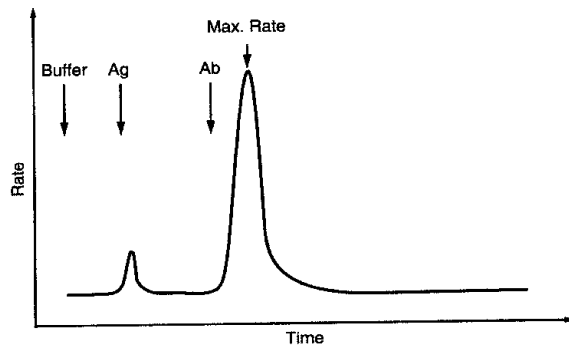
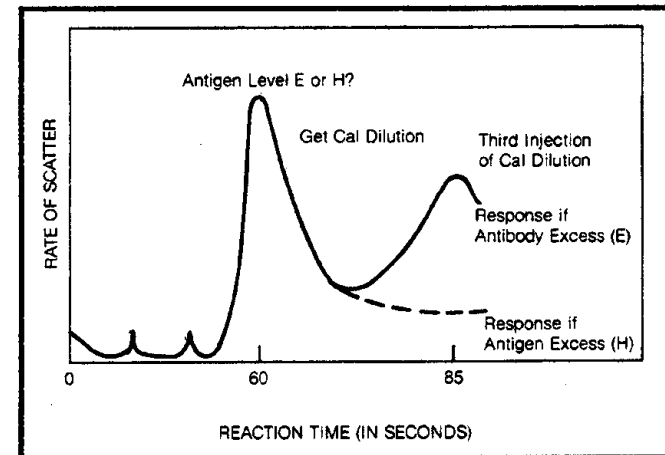
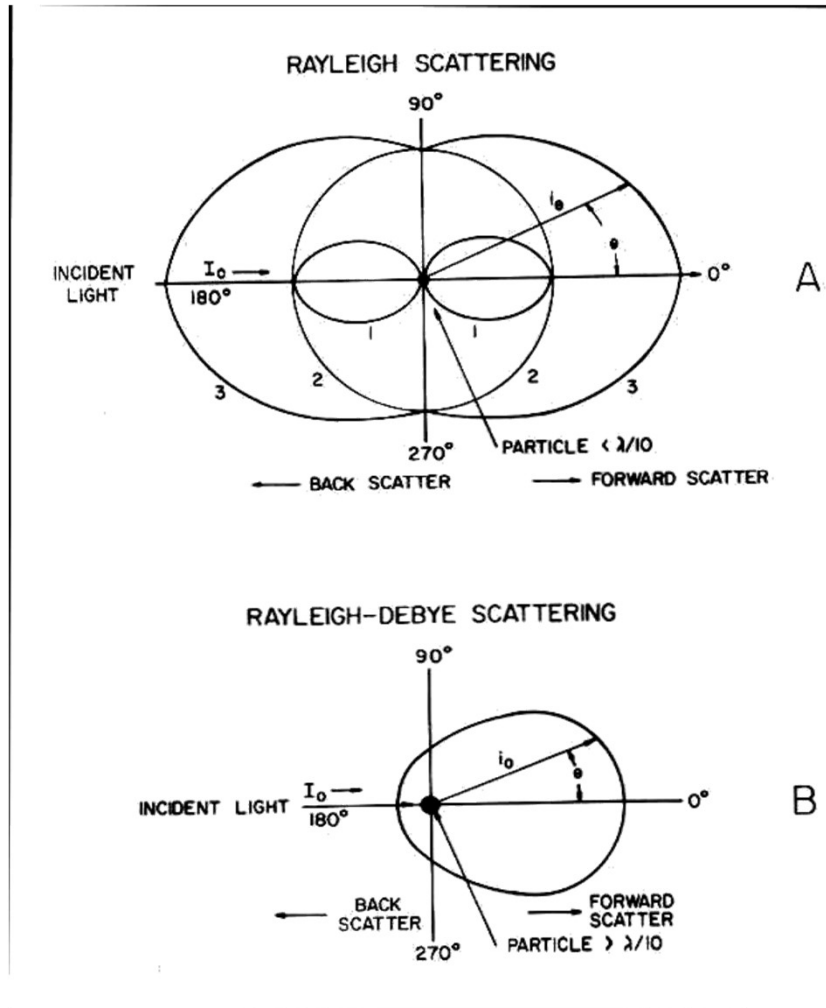


Figure 4. Reaction velocity (rate) as a function of time. The addition of buffer, antigen (Ag), and antibody (Ab) to the reaction cuvette is indicated by arrows.



Vliv velikosti částice a vlnové délky



Lord Rayleigh (1871)

$$I_s = I_0 \cdot 16 \cdot \pi^2 \cdot a \cdot \sin^2 \Theta / \lambda^4 \cdot r^2$$

I_s – intenzita rozptylu

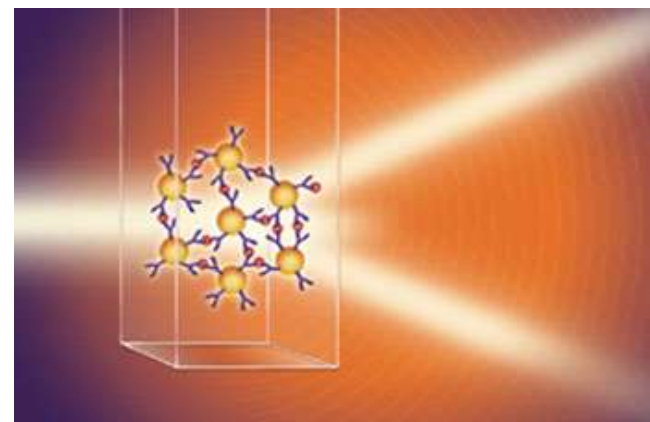
I_0 – intenzita původního paprsku

a – koeficient polarizovatelnosti

Θ – úhel pozorování

λ – vlnová délka

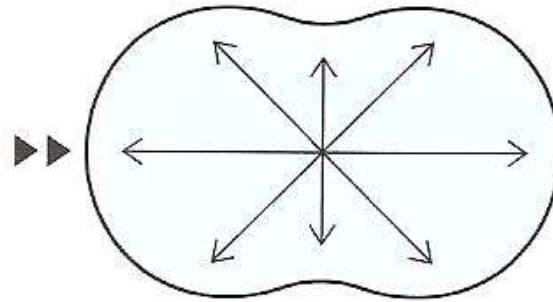
r – vzdálenost od detektoru



Nefelometrie: rozptyl světla na částicích

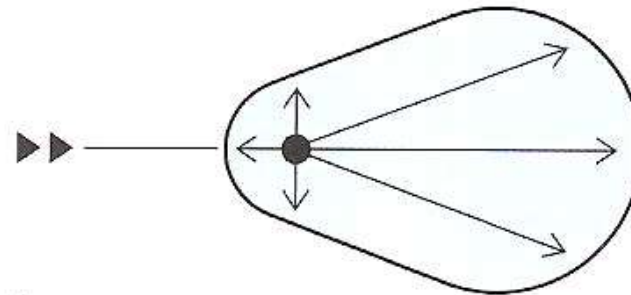
(obr. z H. Reiber: Methodische Grundlagen der Analytik. In: Wildemann, Oschmann, Reiber (Eds.):
Neurologische Labordiagnostik. Thieme, Stuttgart, 2006: p. 20.)

Rayleigh-Streuung
($d \ll \lambda$)



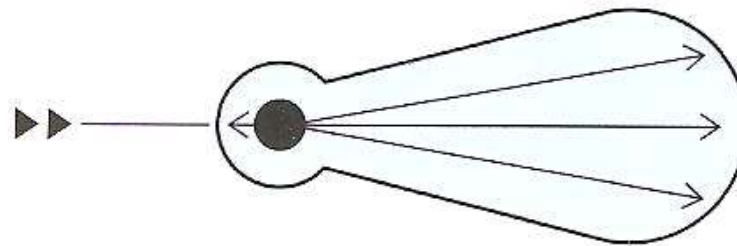
a

Rayleigh-Debye-Streuung
($d \leq \lambda$)



b

Mie-Streuung
($d > \lambda$)



c

▶▶ = einfallender Lichtstrahl
→ = Richtung und Intensität
des Streulichts
d = Partikeldurchmesser
 λ = Wellenlänge

Rozptylové vlastnosti některých běžně vyšetřovaných částic

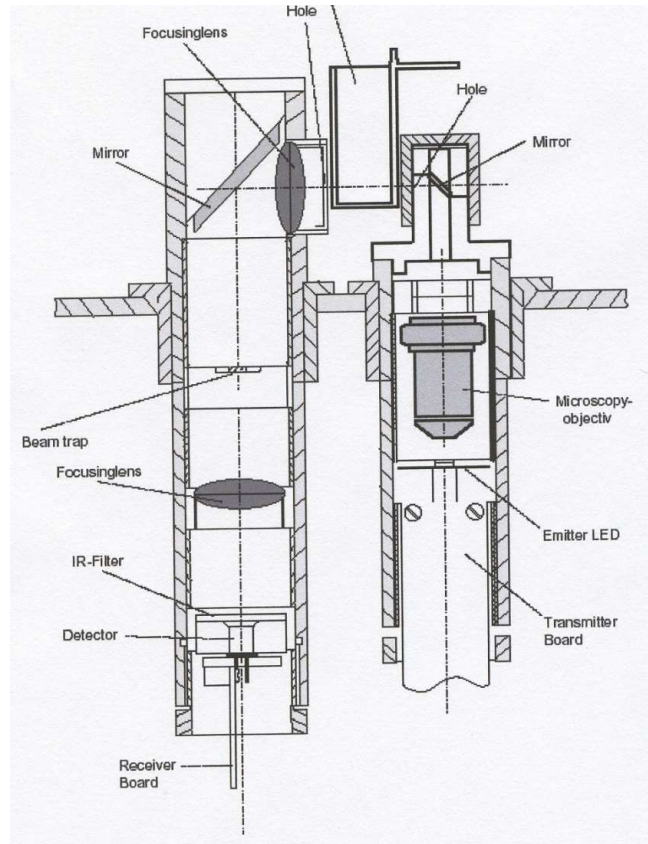
(podle Whicher JT, Price CP, Spencer K. Immunonephelometric and immunoturbidimetric assays for proteins.

Clin Rev Clin Lab Sci 1982; 18(3): 213-260

Poznámka: $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m} = 0,1 \text{ nm}$

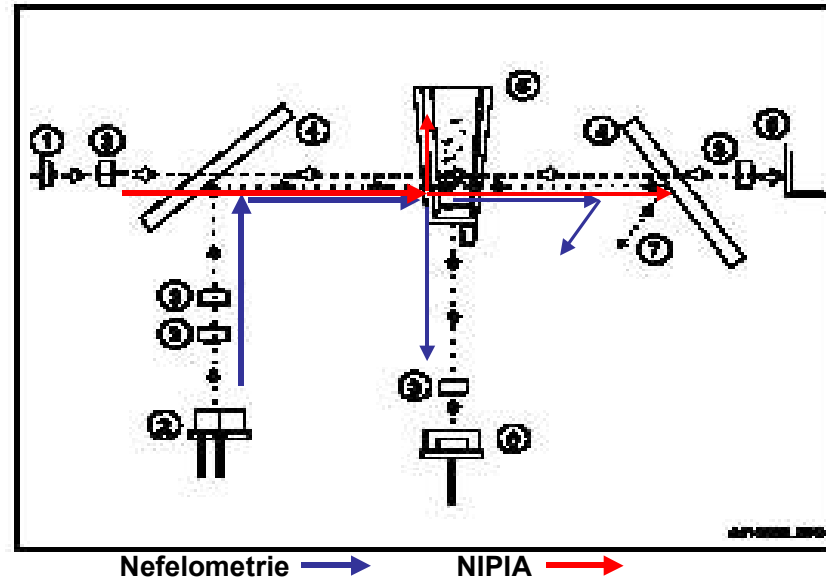
Částice	Průměr d	d/λ	Typ rozptylu
IgG	200 Å	0,07	Rayleighův
IgM	400 Å	0,13	Rayleigh-Debyeův
α-lipoprotein	50 – 150 Å	0,03	Rayleighův
β-lipoprotein	150 – 300 Å	0,06	Rayleighův
albumin	60 · 80 Å	0,02	Rayleighův
chylomikrony	0,2 – 0,45 μm	0,40 – 0,92	Rayleigh-Debyeův
<i>E. coli</i>	0,5 – 3 μm	6	Mieův
<i>B. anthracis</i>	1,25 · 8 μm	17	Mieův
erythrocyty	7,5 μm	18	Mieův

Nefelometr BN 100



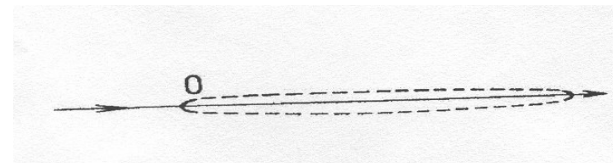
840 nm

Nefelometr Immage 680 nm



NIPIA režim

(near infra-red particle immunoassay)



940nm

Shrnutí

Blíže viz Štern P. Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie. *Klin Biochem Metab* 2006; 14(35), No.3: 146-151 (dostupné na www.cskb.cz)

Turbidimetrie

- snížení intenzity paprsku světla po průchodu mikroheterogenním prostředím roztoku (180°)
- turbidance způsobena: rozptylem, odrazem, absorpcí
- možnost měření citlivými spektrofotometry
- s příchodem stabilních fotometrů s vysokým rozlišením konkuruje v citlivosti nefelometrii v oblasti metod pro imunologickou kvantifikaci sérových proteinů

Nefelometrie

- detekce světelné energie rozptýlené nebo odražené směrem k detektoru, v jiném úhlu než 180°
- často měření v úhlu 90° , jindy v menším úhlu při rozptylu na větších částicích
- metoda volby : vyšší senzitivita (zejm. v end-point provedení) pro detekci nízkých hladin komplexu Ag-Ab

Pojmy absorbance (A) a optická denzita (OD)

- **Absorbance (A)**

- $A = \log(1/T)$
- Zeslabení paprsku po průchodu reakčním prostředím způsobené absorpcí = pohlcením fotonu spojeným s excitací molekuly do vyššího energetického stavu
- Ve zředěných roztocích platí pro A Lambertův-Beerův zákon: $A = \varepsilon \cdot c \cdot l$, tj. lze předpokládat lineární závislost A na koncentraci stanovovaného analytu

- **Optická denzita (OD)**

- $OD = \log(1/T)$
- Zeslabení paprsku po průchodu reakčním prostředím způsobené absorpcí, rozptylem světla aj.
- OD je pojem nadřazený pojmu A
- Pro OD obecně neplatí Lambertův-Beerův zákon, tj. nelze **obecně** předpokládat lineární závislost OD na koncentraci stanovovaného analytu \Rightarrow často třeba vícebodová kalibrace

**Certifikovaný referenční materiál (CRM) na bázi lidského séra:
ERM-DA470k/IFCC**

Protein	Certifikovaná hodnota	nejistota
Alfa2-makroglobulin (A2M)	1,43 g/L	0,06 g/L
Alfa1-kyselý glykoprotein (AAG)	0,617 g/L	0,013 g/L
Alfa1-antitrypsin (AAT)	1,12 g/L	0,03 g/L
Albumin	37,2 g/L	1,2 g/L
C3c	1,00 g/L	0,04 g/L
C4	0,162 g/L	0,007 g/L
Haptoglobin (HPT)	0,889 g/L	0,021 g/L
IgA	1,80 g/L	0,05 g/L
IgG	9,17 g/L	0,18 g/L
IgM	0,723 g/L	0,027 g/L
Transferin (TRF)	2,36 g/L	0,08 g/L
Transthyretin (prealbumin) (TTR)	0,220 g/L	0,018 g/L
Beta2-mikroglobulin (B2M)	2,17 mg/L	0,07 mg/L

Plazmatické bílkoviny: obvyklé referenční meze

Secchiero S, Sciacovelli L, Plebani M. Harmonization of units and reference intervals of plasma proteins: state of the art from an EQA scheme. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(1): 95-

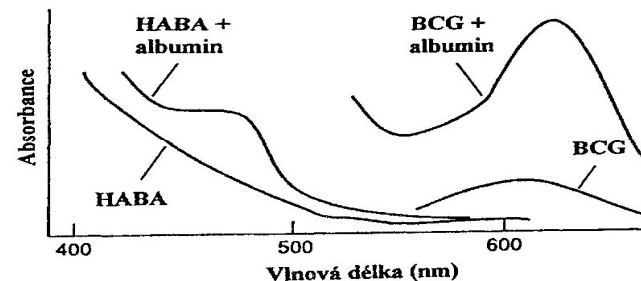
105

Bílkovina	Ref.meze	Bílkovina	Ref.meze
Albumin	35 – 52 g/L	Prealbumin	0,2 – 0,4 g/L
IgG	7 – 16 g/L	AAT	0,9 – 2,0 g/L
IgA	0,7 – 4,0 g/L	AAG	0,5 – 1,2 g/L
IgM	0,4 – 2,3 g/L	A2M	1,3 – 3,0 g/L
C3	0,9 – 1,8 g/L	HPT	0,3 – 2,0 g/L
C4	0,1 – 0,4 g/L	CRP	<5 mg/L

Stanovení albuminu

(schéma vpravo z F. Novák: Úvod do klinické biochemie. Karolinum, Praha 2002)

- Vazba barviva \Rightarrow změna jeho absorpčního maxima: bromkresolová zeleň (BCG); bromkresolový purpur (BCP), 2-(4'-hydroxyazobenzen)benzoová kyselina (HABA)
- BCG: v prostředí o pH 4,2 fotometrické měření při 630 nm: pozitivní interference (α_1 a α_2 -globuliny) se zvyšuje s časem a teplotou \Rightarrow měřit rychle (30 s po smíchání séra s barvivem)
- Reakcí se specifickou protilátkou proti lidskému albuminu (RID, turbidimetrie, nefelometrie)
- Stanovení CB + výpočet koncentrace albuminu z elektroforézy (denzitometrické vyhodnocení) nebo z kapilární elektroforézy



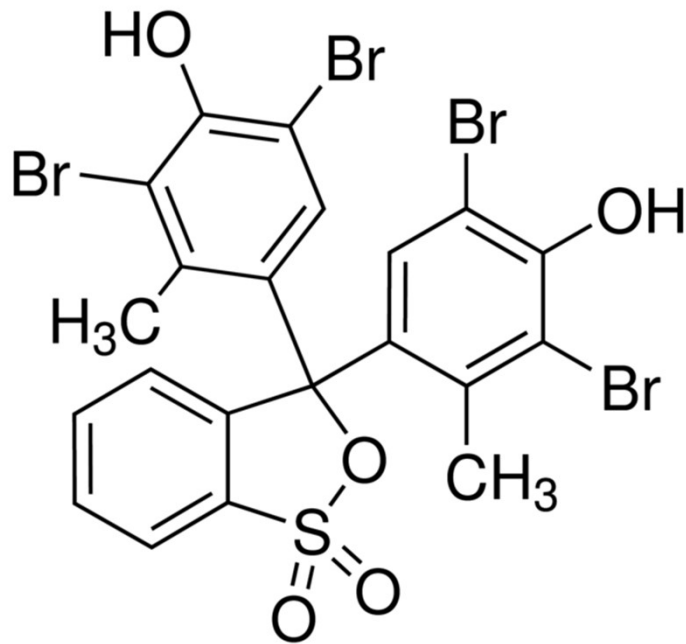
Obz. 6-4 Spektra BCG, HABA a jejich komplexů s albuminem

Barviva využívaná pro stanovení albuminu

Bromocresol green (BCG)

3,3',5,5'-Tetrabromo-*m*-cresolsulfonphthalein

M.w. 698.01



Bromocresol purple (BCP)

5,5'-Dibromo-*o*-cresolsulfonphthalein

M.w. 540.22

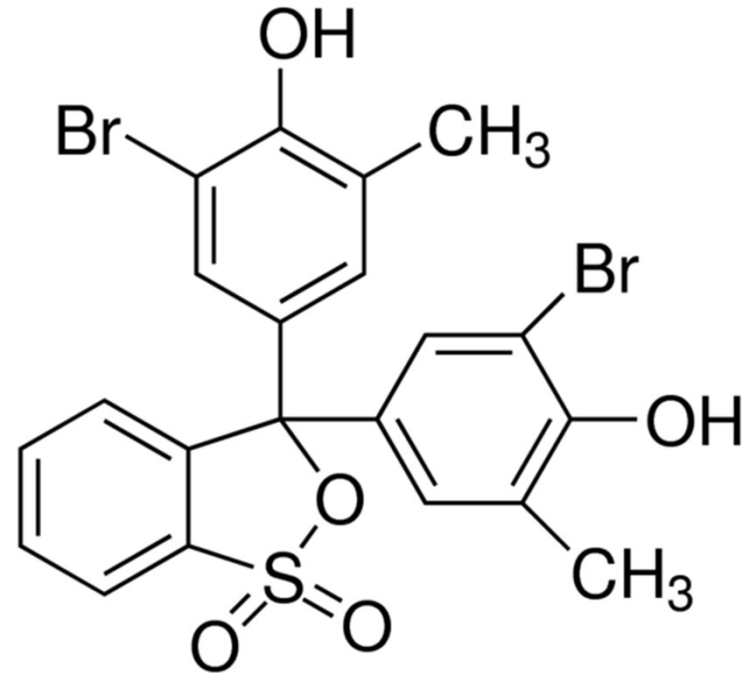
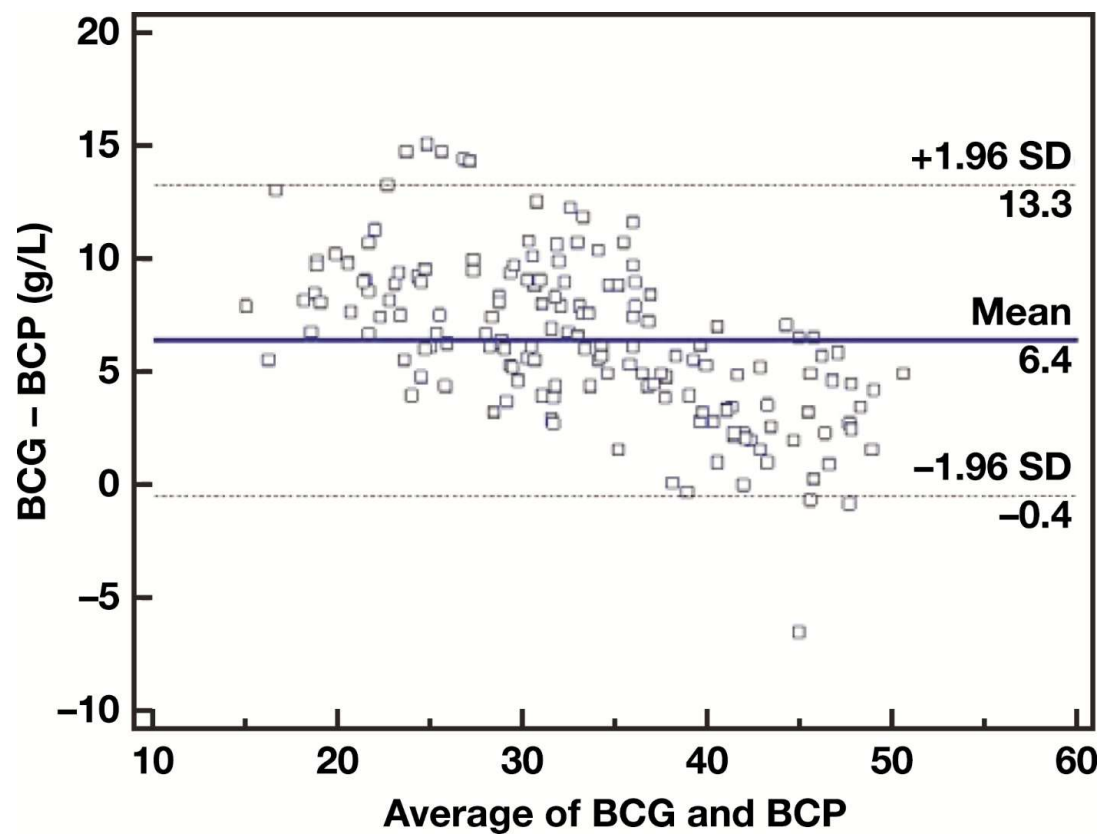


Figure 1 Average and range for albumin values, as tested by bromocresol green (BCG) and bromocresol purple (BCP) ...



Výhody a nevýhody metod pro stanovení koncentrace albuminu v séru/plazmě

Moreira VG et al. *Lab Med*, Volume 49, Issue 4, November 2018, Pages 355–361

Bromkrezolový purpur (BCP)	Bromkrezolová zeleň (BCG)
Podhodnocuje koncentraci albuminu u selhání ledvin a dialyzovaných pacientů	Nadhodnocuje koncentraci albuminu v oblasti nízkých koncentrací, podhodnocuje koncentraci albuminu v oblasti vysokých koncentrací
Specifičtější, protože se váže na lidský albumin a neváže se na globuliny	Interference specifické pro metodu – váže se nejen na albumin, ale také na α 1- a α 2-globuliny
Okamžitá reakce	Delší inkubace zvyšuje vazbu BCG na jiné bílkoviny než albumin
Výsledky v dobré shodě s imunonefelometrií a elektroforézou	Pozitivní bias oproti imunonefelometrii a elektroforéze
Snadno automatizovatelná	Snadno automatizovatelná
Vyžaduje kalibrátory a kontroly na bázi lidského séra (nízká afinita pro non-humánní albumin)	Lze použít zvířecí kontroly a kalibrátory