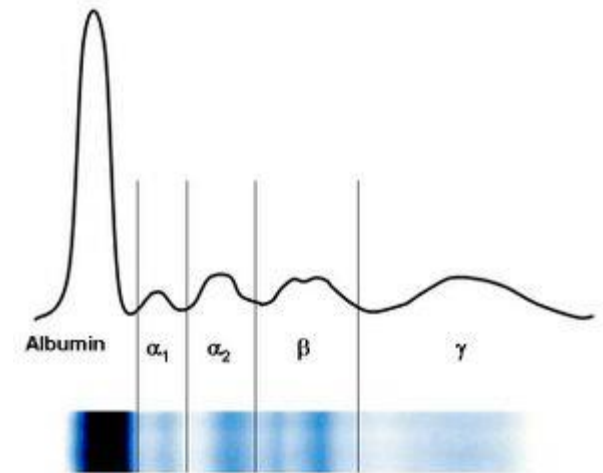


ELEKTROFORETICKÉ METODY, DENZITOMETRIE, REFLEXNÍ A VERTIKÁLNÍ FOTOMETRIE

Mgr. Nikola Kučeráková

Elektroforéza

- je analytická separační metoda
- k dělení látek dochází díky jejich rozdílné pohyblivosti vlivem vnějšího elektrického pole (stejnosměrný el. proud)
- Rychlost migrace proteinů závisí na těchto faktorech:
 - Elektrický náboj molekuly
 - Velikost a tvar molekuly – větší se pohybují pomaleji
 - Síla elektrického pole
 - Vlastnosti nosného média
 - Teplota
- Proteiny s rozdílnou pohyblivostí migrují v gelu jako pásy (bandy).



Hlavní typy gelové elektroforézy

Gelová nedenaturační elektroforéza

- *Nativní gelová elektroforéza*
 - probíhá bez denaturačních činidel
 - migrace proteinů gelem závisí na jejich **náboji, velikosti a tvaru**
 - citlivost elektroforézy je dána charakterem póru gelu

Gelová denaturační elektroforéza

- *SDS gelová elektroforéza*
 - proteiny jsou denaturovány dodecylsíránem sodným (**SDS**) a β -merkaptoetanolem
 - Proteiny jsou separovány podle své **molekulové hmotnosti**

SDS gelová elektroforéza

- **SDS** je **anionaktivní detergent**, který nese poměrně vysoký náboj, a proto ve vazbě na bílkovinu vyrovnává nábojové rozdíly bílkovin, které se potom pohybují v gelu **jen podle velikosti**.
- Vzorek proteinu se zpracuje s **tzv. vzorkovým pufrem** - obsahuje SDS a redukční činidlo β -merkaptoethanol.
- Působením těchto látek dojde k rozrušení kvarterní, terciární a do značné míry i sekundární struktury.
- Všechny bílkoviny váží SDS v konstantním poměru, asi 1,4 g SDS na 1 g bílkoviny, a tím charakteristicky mění svou konformaci.
- Výsledné komplexy SDS-bílkovina:
 - mají stejnou hodnotu povrchového náboje
 - konformace bílkovin se do jisté míry unifikuje

Nativní gelová
elektroforéza

Technická
instrumentace

SAS Vitrési (Helena)



Hydrasys (Sebia)



HYDRASYS Sebia (Francie)

HYDRAGEL 30 β_1 - β_2 kit

- elektroforetické rozdělení bílkovin lidského séra a moči do šesti hlavních frakcí na alkalicky pufovaných agarózových gelech o pH 8,6.
 - Separované bílkoviny jsou obarveny roztokem amidočerni
 - Vyhodnocení je buď vizuální nebo denzitometrické (relativní kvantifikace jednotlivých zón).
-
- 30 SPE vzorků na gel
 - poloautomatizovaný systém
 - manuální kroky: Manipulace se vzorky, gely, vkládání reagensů a nastavení přístroje k uvedení do chodu
 - automatické kroky: nanesení vzorků, elektroforetickou migraci, sušení, barvení, odbarvování, a konečné osušení gelové plotny

HYDRASYS Sebia (Francie)

HYDRAGEL 30 β_1 - β_2 kit

- gel
 - agaróza saturovaná alkalickým roztokem pH 8.6 ± 0.5
 - nosné medium pro elektroforezu
- pufované stripy: slouží jako rezervoár pufru a zajišťují kontakt mezi gelem a elektrodami
- amidočernň + ředící roztok pro amidočernň
- odbarvovací roztok
 - odstranění přebytečné množství barvičky a odbarvuje se pozadí agarózové plotny
 - vyplachování barvicího prostoru po promývacím kroku
- promývací roztok - čištění barvicího modulu

HYDRASYS Sebia (Francie)

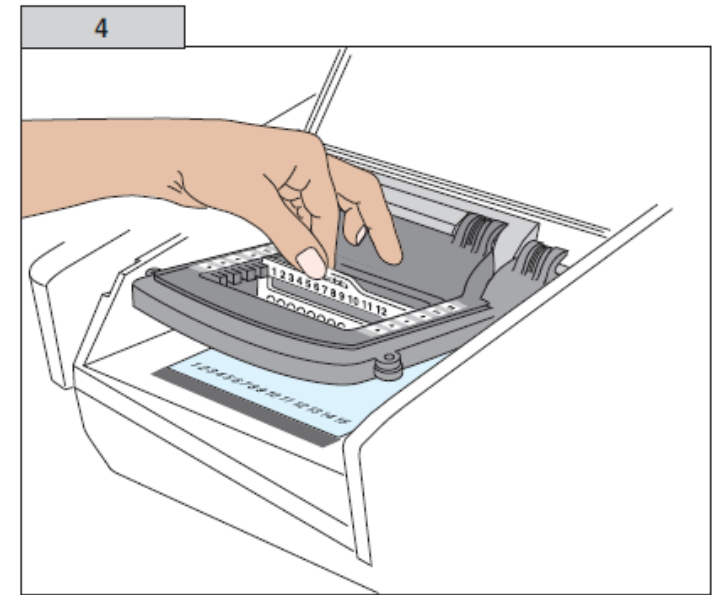
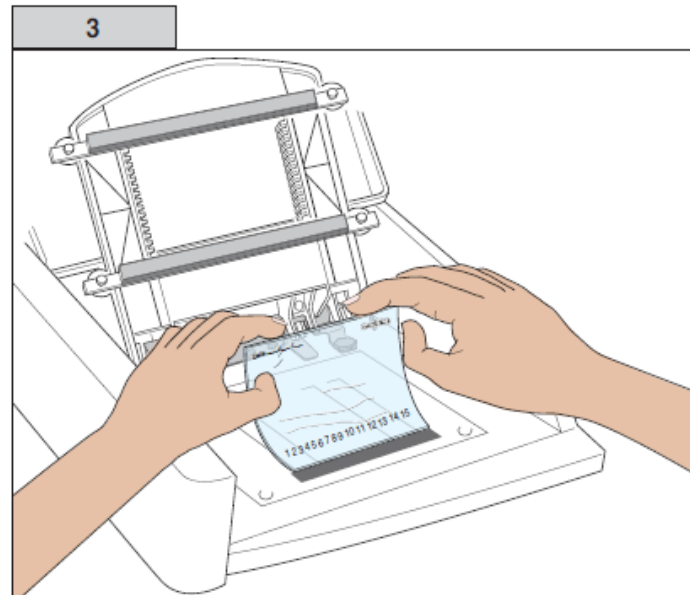
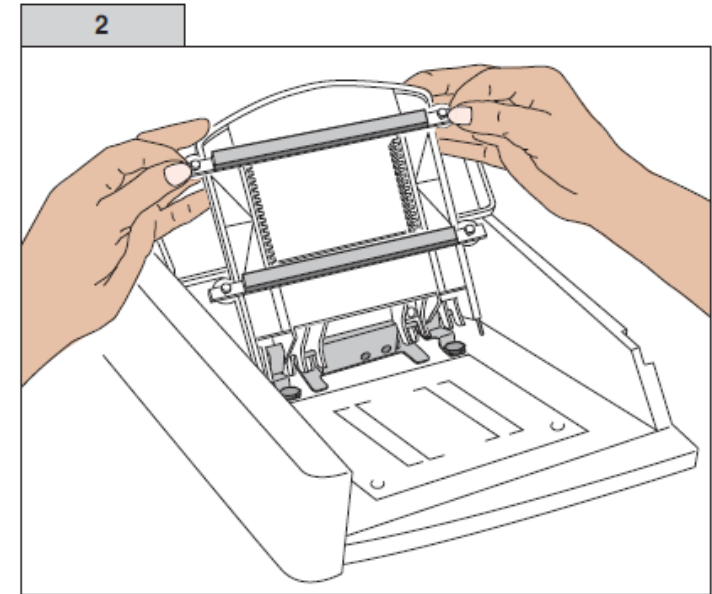
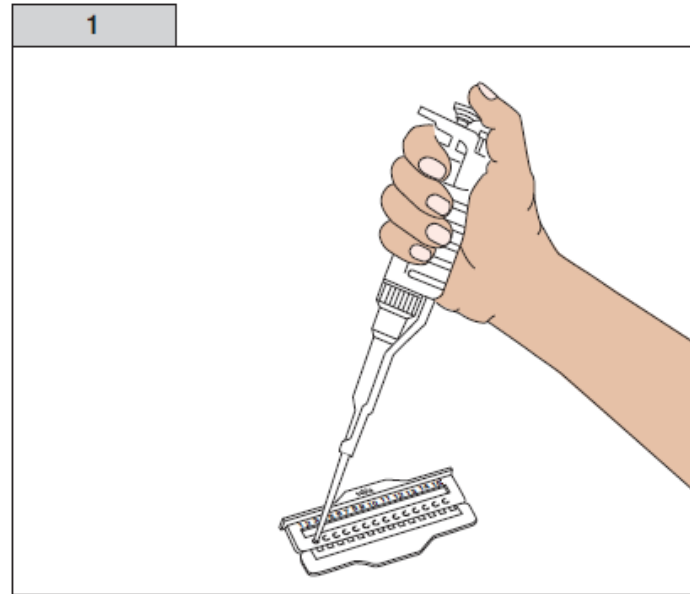
HYDRAGEL 30 β_1 - β_2 kit

- migrace
 - Všechny části migračního rámečku jsou sníženy – stripy s pufrem i aplikátory jsou v kontaktu s povrchem gelu – probíhá aplikace vzorků do gelu.
 - Nosič aplikátorů vzorků se zvedne, části s elektrodami nesoucí stripy s pufrem zůstávají v kontaktu s povrchem gelu.
 - Proběhne migrace při konstantních 20 W, 20 °C, 7 min
 - zvednutí nosiče elektrod, odpojení elektrod
 - Teplota migrační plochy stoupá až na 65 °C na dobu 10-ti minut, po kterou se gel suší
 - Migrační plocha je ochlazena na 50 °C a slyšitelné pípnutí signalizuje odjištění víka migračního modulu. Teplota se udržuje na 50 °C až do otevření
 - víka. Potom teplota klesá na 20 °C (v necelých 5-ti minutách)
- Barvení v barvicím modulu amidočerní.
- Denzitometrické skenování nabarvených polí elektroforegramů (procentuálních hodnot) jednotlivých proteinových zón.

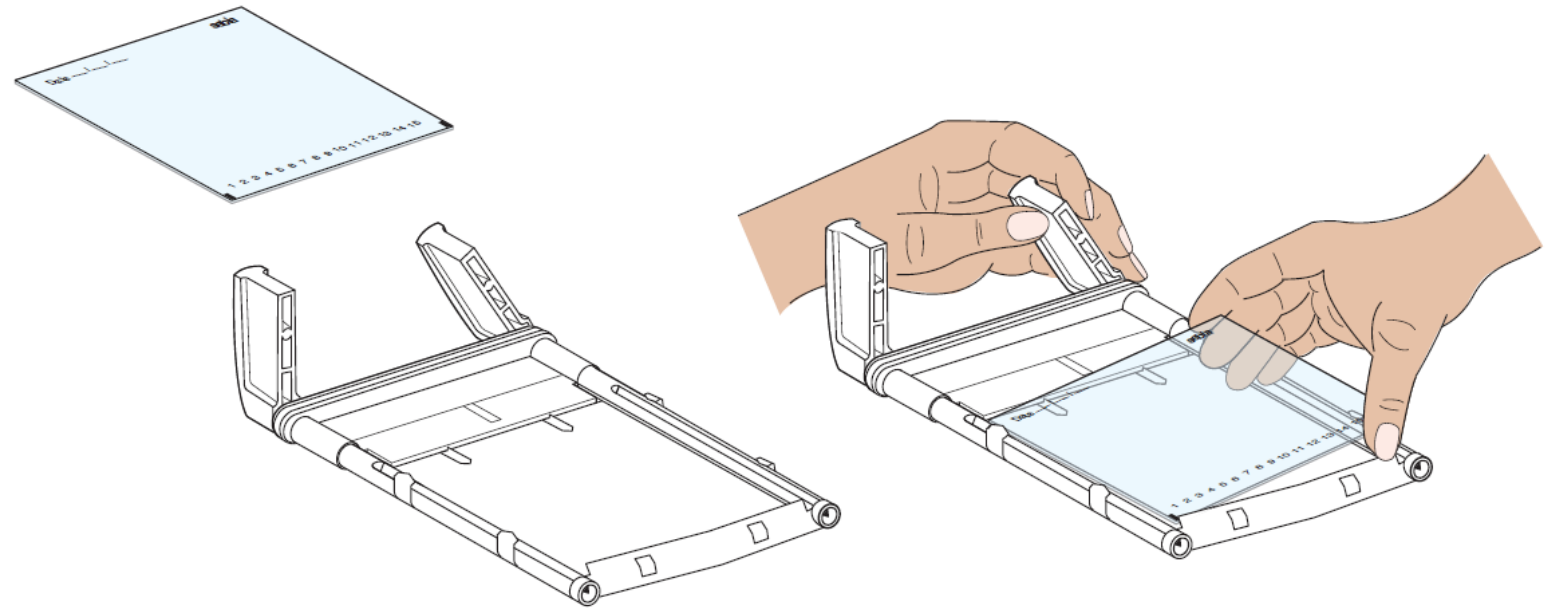
HYDRASYS

Sebia

(Francie)



HYDRASYS Sebia (Francie)



Zpracování gelu po separaci

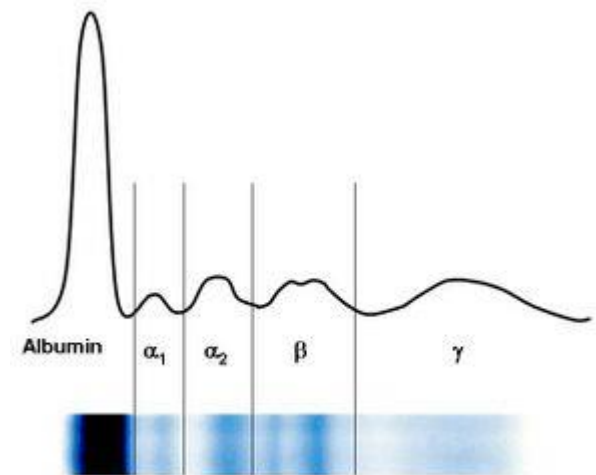
- Po proběhnutí elektroforéze je nutné gel sušit nebo fixovat fixačním roztokem (obsahuje kyselinu, např. kys. octová) - dojde k denaturaci proteinů a jejich imobilizaci v nosném médiu, aby se zabránilo difúzi jednotlivých zón.
- Dále je nutné gel obarvit, aby došlo k vizualizaci jednotlivých proteinových frakcí. Po promytí přebytku barviva, se gel suší. Barvy – amidočern, kyselá violet,...
- Množství barviva, které se během barvení váže na proteiny závisí na mnoha faktorech. Je ovlivněno typem proteinu nebo stupněm denaturace při fixaci.

Vyhodnocení: Detekce a kvantifikace

- Po elektroforetické separaci a barvení, je možné kvantifikovat jednotlivé zóny jako procentuální podíl přímou denzitometrií.
- Denzitometr je přístroj, který slouží k vyhodnocení hustoty zbarvení v plošném uspořádání. Jedná se o postup, který je podobný fotometrickému stanovení, zaznamenává měnící se hodnotu absorbance v závislosti na intenzitě zbarvení.
- Při denzitometrii se měří intenzita záření procházejícího průhlednou plochou, získává se grafický záznam fotometrovaného úseku.
- Plocha pod křivkou těchto píků připadající jednotlivým frakcím, je úměrná relativnímu zastoupení jednotlivých frakcí v dělené směsi.
- Elektroforeogram se automaticky posunuje nad štěrbinou, kterou prochází světlo zvolené vlnové délky (400 – 700 nm), v místě frakcí dochází k částečné absorpci záření – to se projeví při dopadu na detektor.
- Po zpracování signálu získáme číselné výsledky jednotlivých frakcí.

Gelová elektroforéza v praxi (SPE)

- při běžné elektroforéze se sérum rozdělí na frakci albuminu, α_1 , α_2 , β_1 , β_2 a γ -globulinů
- proteiny migrují v gelu jako pásy (bandy)
- stanovení zastoupení jednotlivých frakcí může mít orientační význam při hodnocení stadia zánětlivého procesu (akutní zánět - $\uparrow \alpha_1$ a později i α_2 ; chronický zánět - $\downarrow$ albumin, $\uparrow$ gamma globuliny)

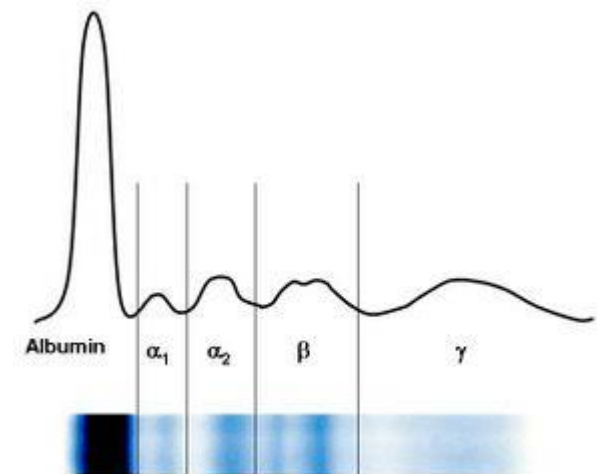


Gelová elektroforéza v praxi (SPE):

Frakce

ALBUMIN

- 55-65 % z celkových proteinů plasmy
- denně produkce v játrech až 12 g
- elipsoidní tvar – nezvyšuje viskozitu plasmy
- funkce:
 - proteinová rezerva (zdroj AMK)
 - transport – bilirubin, hem, steroidní látky, kovy, léky
 - vazba vody – ztráty albuminů při poruchách ledvin vedou k přestupu vody do tkání → otoky



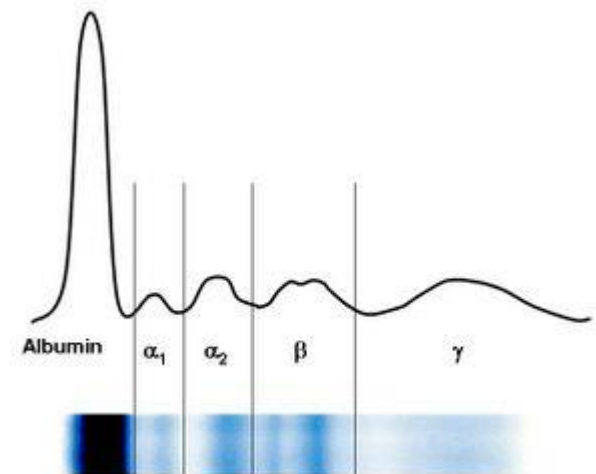
Gelová elektroforéza v praxi (SPE): Frakce

α_1 GLOBULINY

- prakticky jediná bílkovina, která ovlivňuje tvar a intenzitu alfa 1 zóny – alfa1-antitrypsin
 - chrání před enzymy zánětlivých buněk, inhibitor proteáz
- dále kyselý alfa-1 globulin, transkortin, transkobalamin

α_2 GLOBULINY

- intenzitu a morfologii bandu ovlivňují stejným dílem alfa2-makroglobulin a haptoglobin
- Haptoglobin:
 - vazba hemoglobinu z rozpadlých erytrocytů (zabraňuje ztrátám Fe)
 - ↑ při akutním zánětu a při zátěži
 - ↓ při rozpadu velkého množství erytrocytů



Gelová elektroforéza v praxi (SPE):

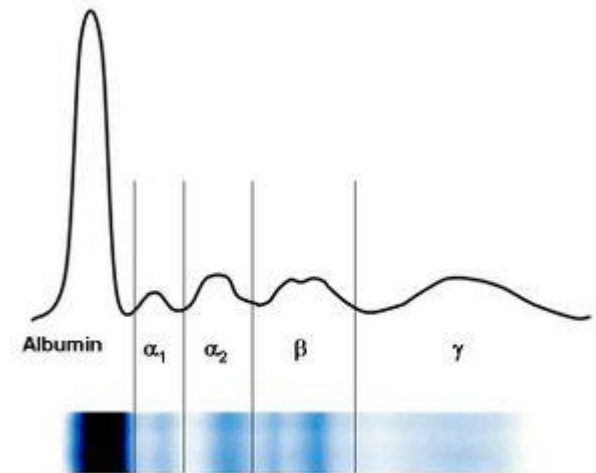
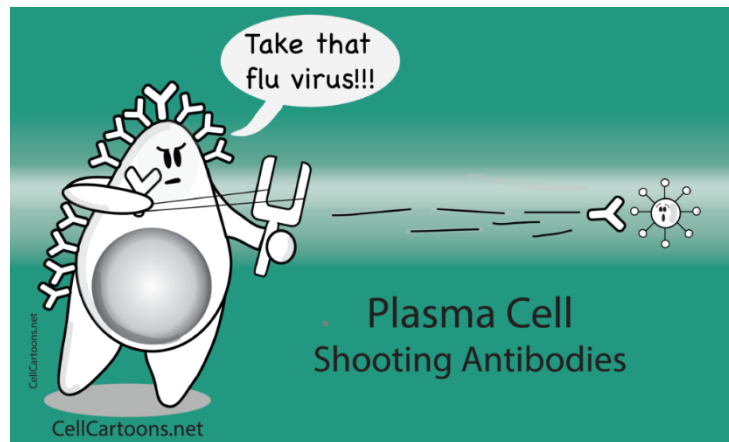
Frakce

β GLOBULINY

- B1 = transferin – vazba a transport železa
- $\beta_2 = C_3$

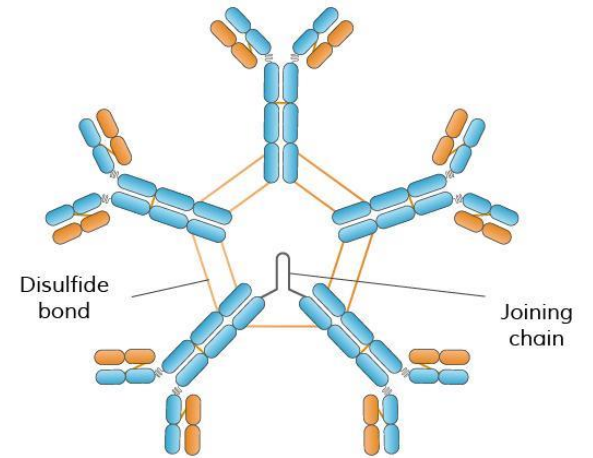
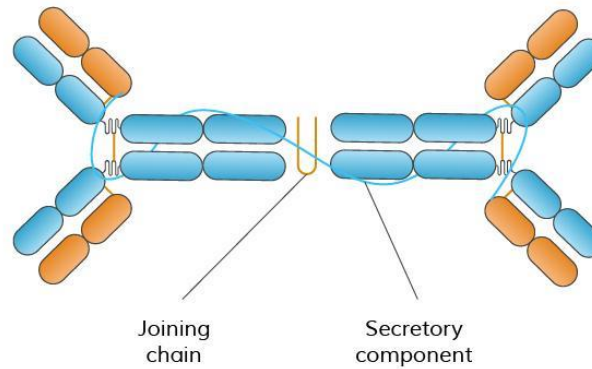
γ GLOBULINY

- IgG, IgM, IgA, IgD, IgE
- lehké řetězce $\kappa\lambda$
- Produkovány B-lymfocyty (plazmatickými buňkami)



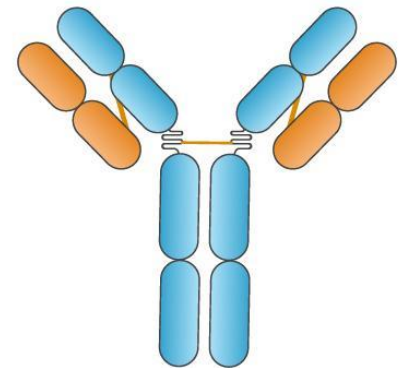
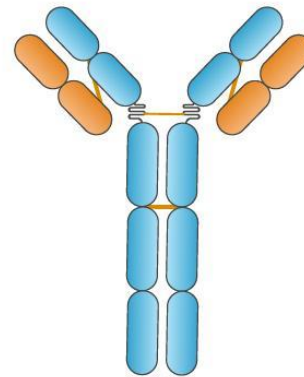
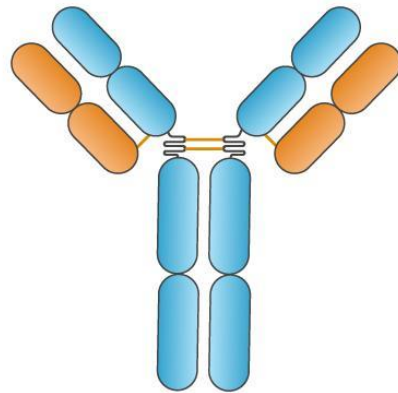
Protilátky: struktura

- Light (L) chain
- Heavy(H) chain
- Disulfide bond
- Joining (J) chain



IgA

IgM



IgG

IgE

IgD

Detekce paraproteinů

- imuno elektroforéza je v současné době používána téměř výhradně k průkazu monoklonálního imunoglobulinu = paraproteinu
- **paraprotein** (PP, Mlg) je produkován klonem nádorových plasmatických buněk = plazmocytom, plazmocytární myelom
- **Mnohočetný myelom** = nádor vycházející z plasmatických buněk
- **CRAB** symptomy
- přítomnost Mlg = výrazný nefyziologický band obvykle v gama zóně
- příčinou jasného pruhu je fakt, že se PP pohybuje velmi uniformě, protože každá molekula má stejné aminokyselinové složení (tudíž stejný náboj a molekulovou hmotnost)

CRAB symptom

C



High levels of
calcium in the
blood

R



Decreased kidney
(renal) function

A



Low amount of
red blood cells
(anemia)

B



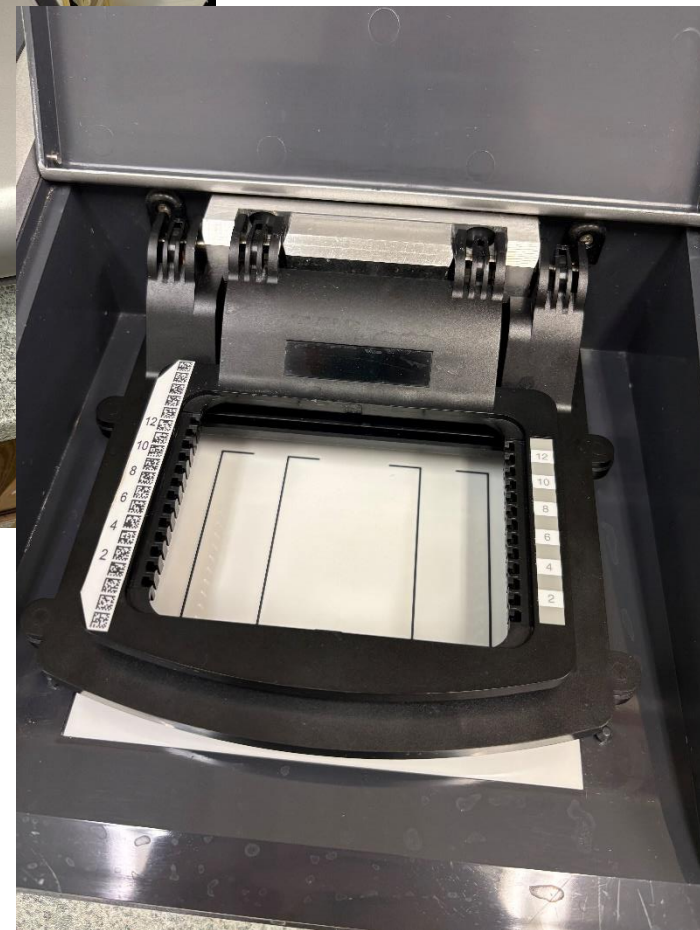
Presence of
bone damage

Elektroforéza s následnou imunofixací

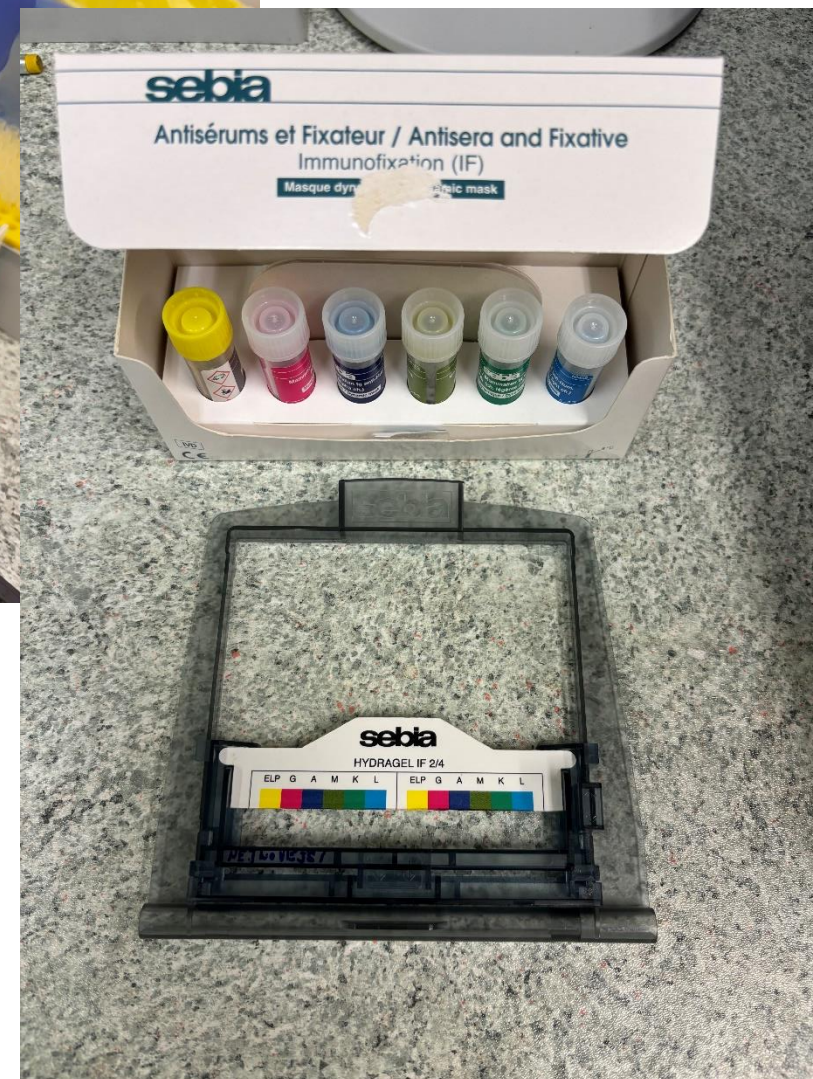
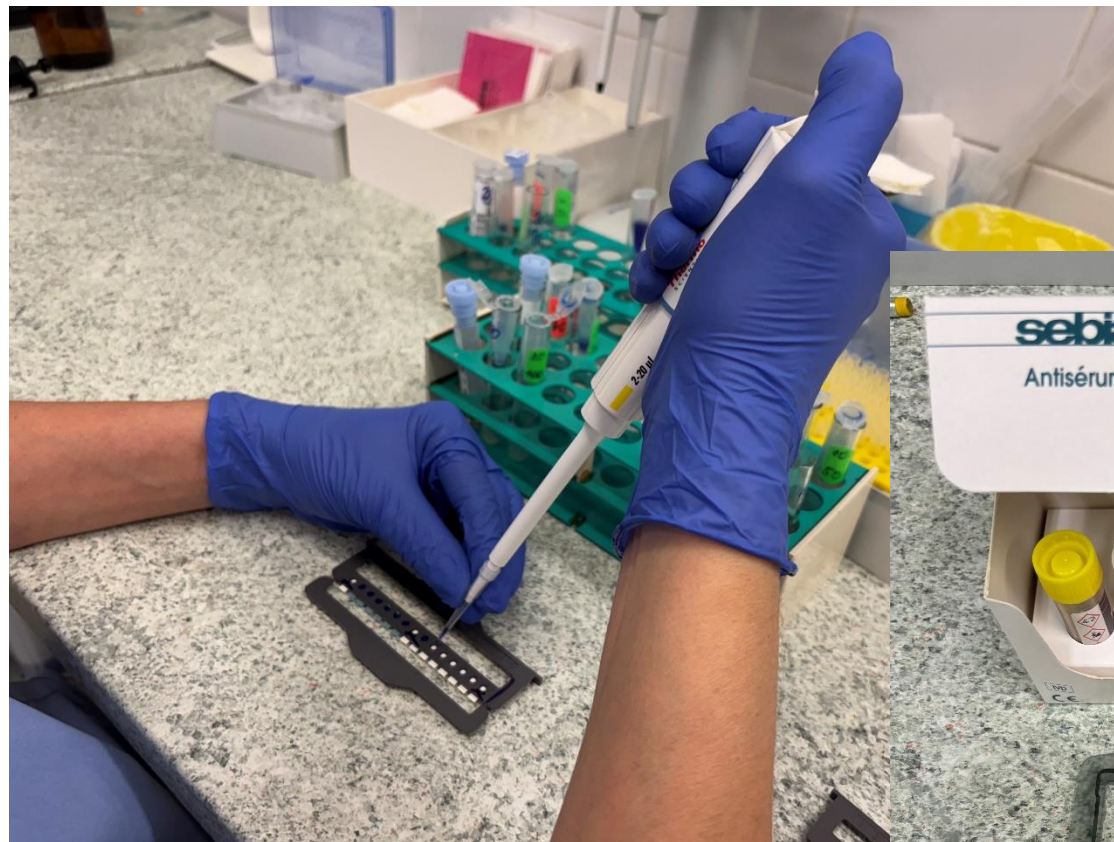
Provádí se ve čtyřech krocích:

- Separace proteinů elektroforézou na agarózovém gelu.
- Imunofixace (imunoprecipitace) proteinů rozdělených elektroforézou – příslušné migrační stopy jsou překryty jednotlivými antiséry. Antiséra difundují do gelu a precipitují přítomné antigeny. Proteiny v referenční stopě jsou fixovány fixačním roztokem.
- Neprecipitované, rozpustné proteiny jsou z gelu odstraněny odsátím a promytím. Komplex antigen- protilátka zůstává v gelové matrix.
- Precipitované proteiny jsou vizualizovány obarvením

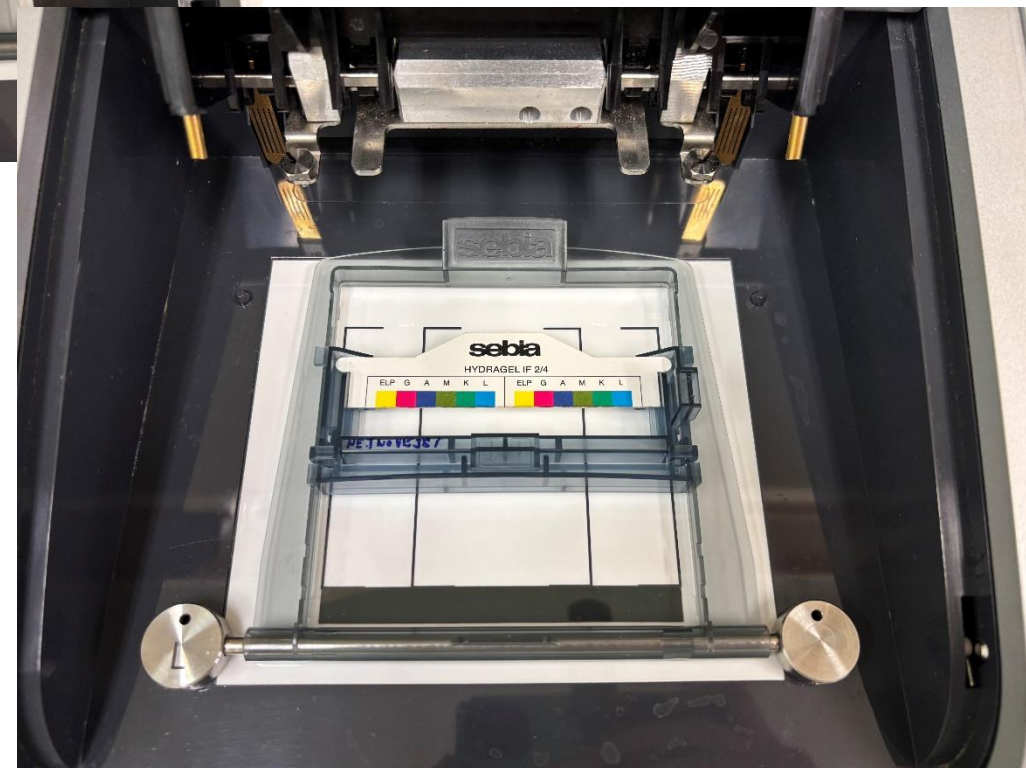
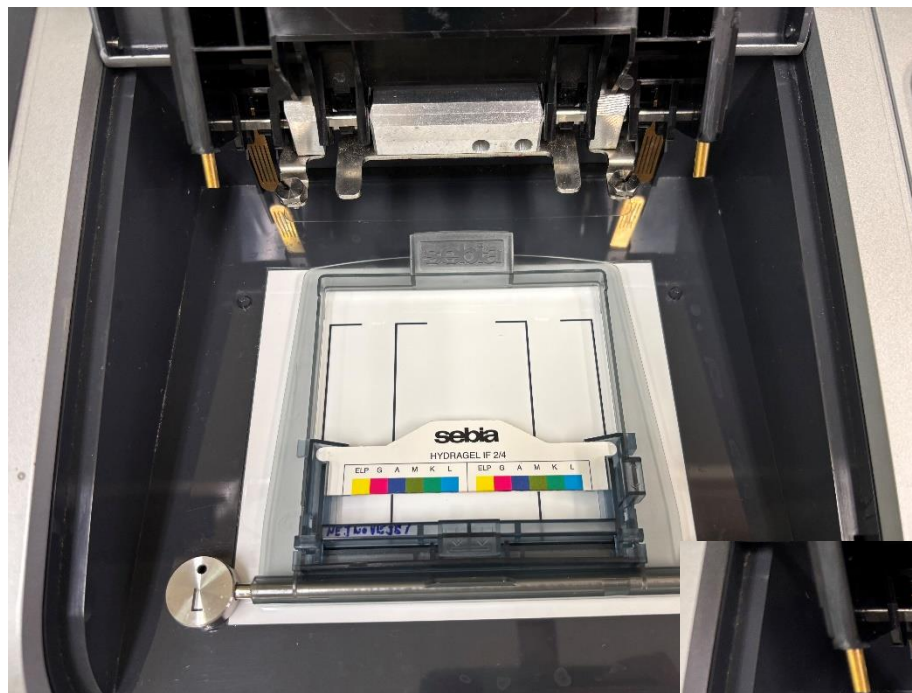
Gelová elektroforéza: zpracování



Imunofixace: zpracování



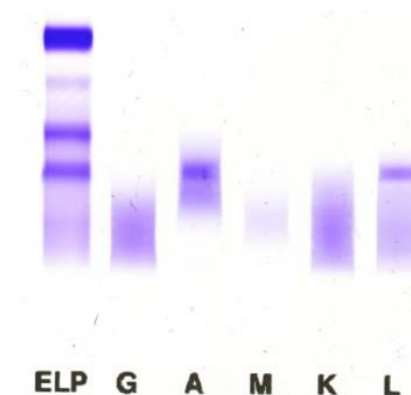
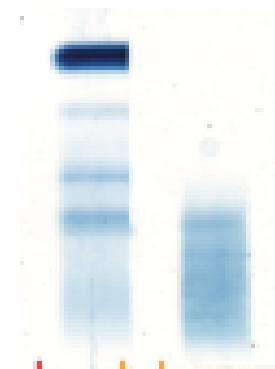
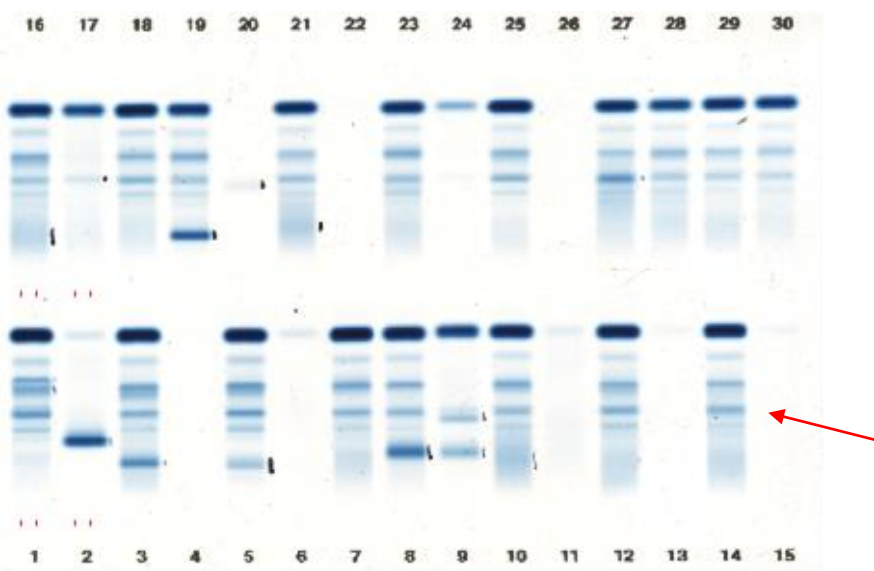
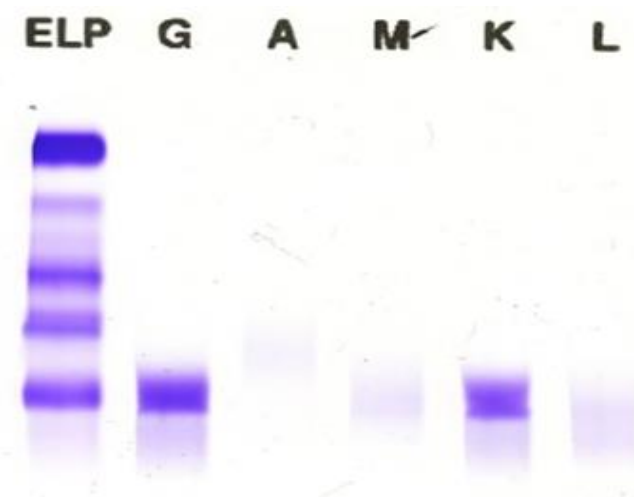
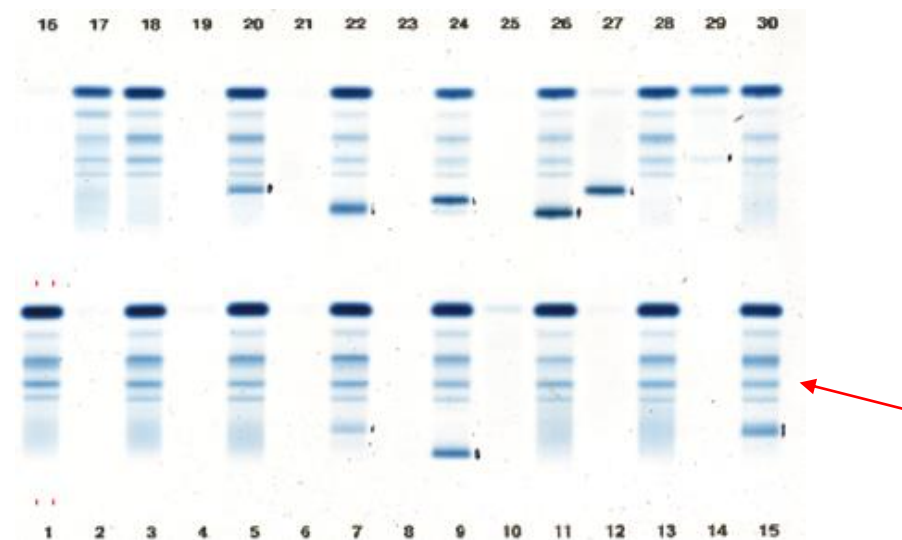
Imunofixace: zpracování



Hodnocení
elektroforézy:

Pentafixace

Imunofoxace

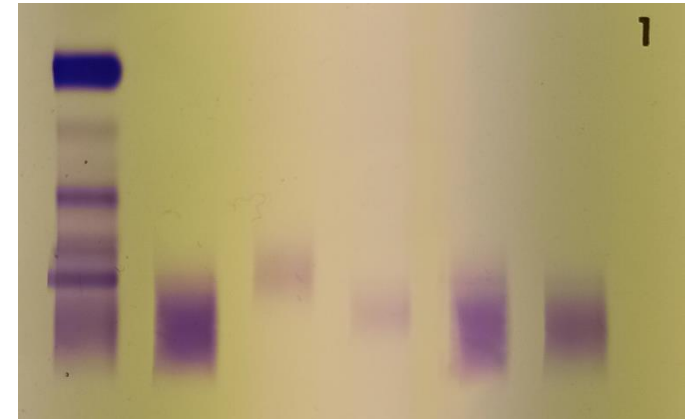
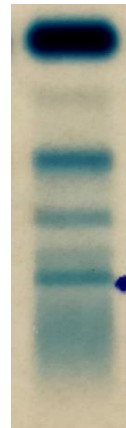


Hodnocení elektroforézy

- Hemolýza = 1250 mg/l (norma 0-50)

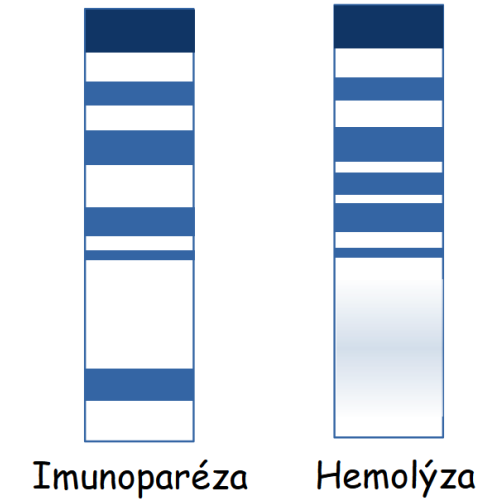
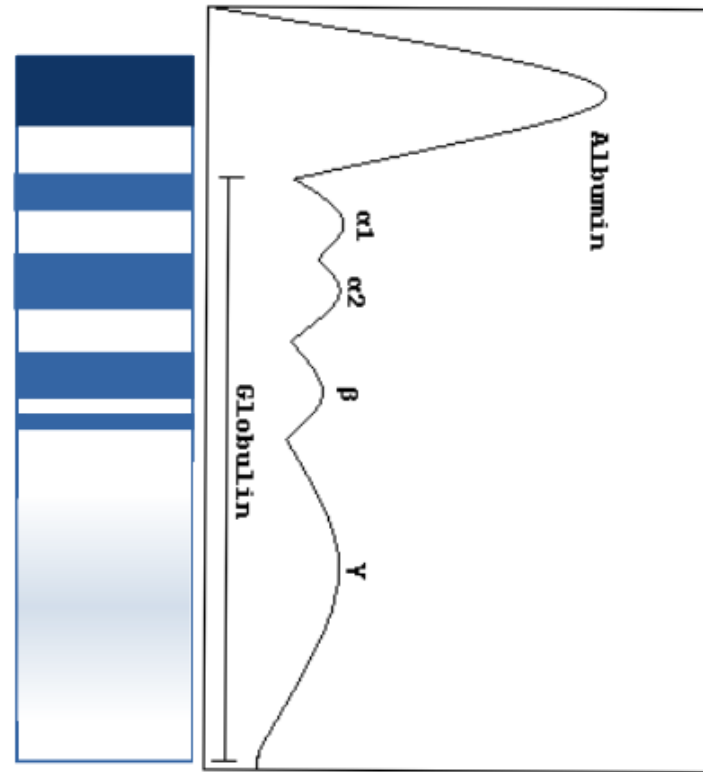


- Fibrinogen (plazma)



Hodnocení elektroforézy

● NATIVNÍ ELEKTROFORÉZA



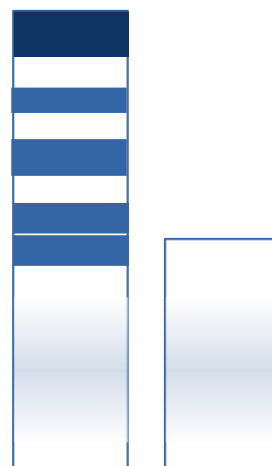
Imunoparéz a

- izolované zvýšení jednoho typu imunoglobulinu (paraproteinu) se současným snížením ostatních imunoglobulinů

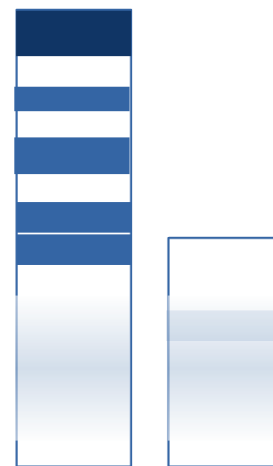
Hemolýza

- při silné hemolýze se vytváří samostatný band mezi α_2 a β_1 zónou

Hodnocení pentafixace



Elfo Pentavalentní
antisérum

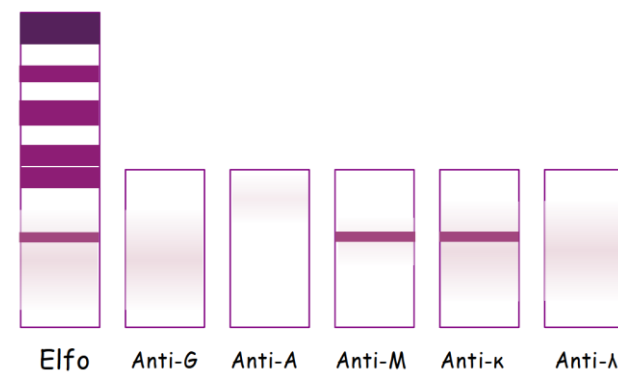
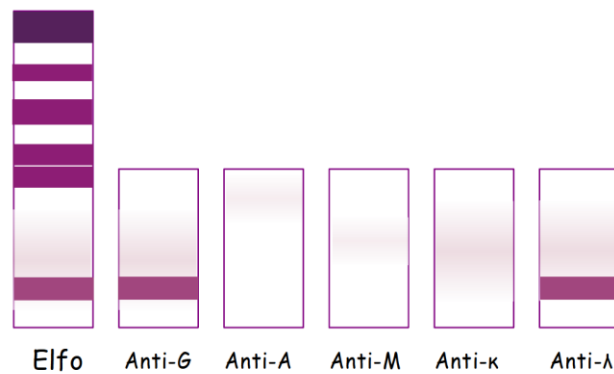
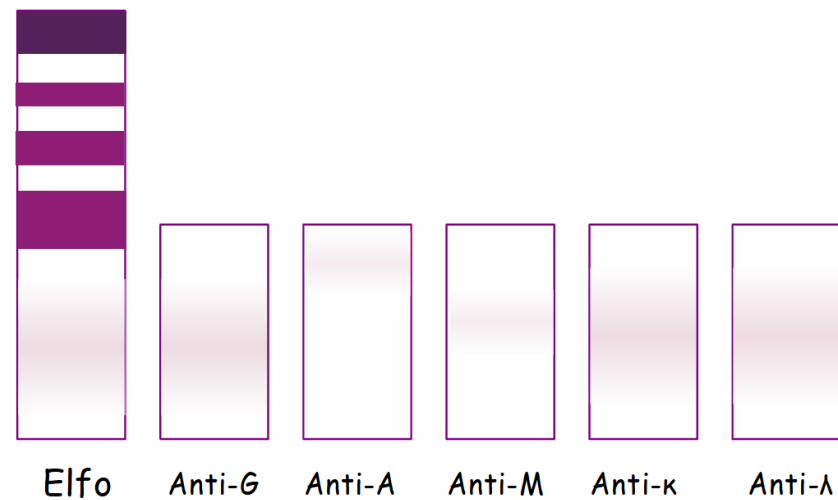


Elfo Pentavalentní
antisérum



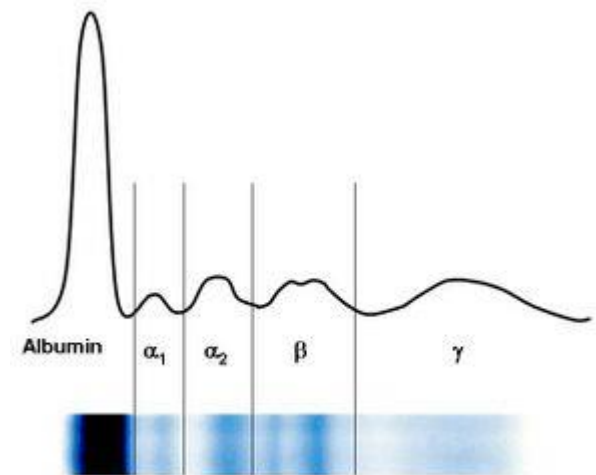
Elfo Pentavalentní
antisérum

Hodnocení imunofixace



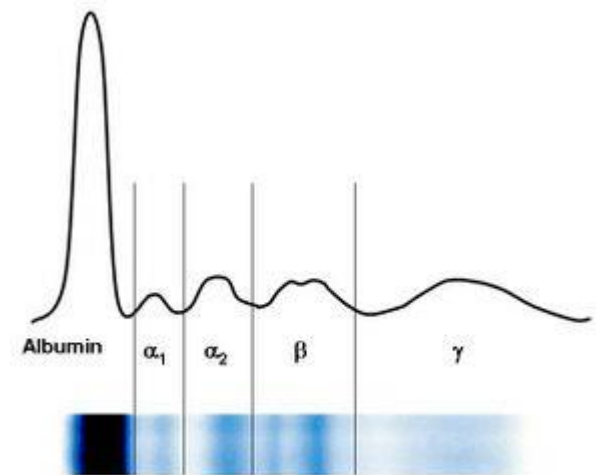
Denzitometrie

- Optická metoda, která se zabývá měřením optické hustoty
- Denzitometr zaznamenává měnící se hodnotu absorbance v závislosti na intenzitě zbarvení
- Měření intenzity záření procházejícího **průhlednou plochou**, získává se grafický záznam fotometrovaného úseku.
- Jednotlivé frakce dělené směsi tvoří na záznamu v ideálním případě souměrné křivky zvonovitého tvaru. Plocha těchto píků připadající jednotlivým frakcím, je úměrná relativnímu zastoupení jednotlivých frakcí v dělené směsi



Denzitometrie

- V místě frakcí dochází k částečné absorpci záření – to se projeví při dopadu na detektor
- Po zpracování signálu získáme číselné výsledky jednotlivých frakcí
- Kvantitativní vyhodnocení jednotlivých frakcí získaných elektroforetickým dělením bílkovin v biologickém materiálu
- Vedle grafického výstupu (křivka elektroforeogramu) , vypočítává software denzitogramu procentuální zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí



Reflexní fotometrie

- Měření intenzity záření odraženého od **neprůhledné** (homogenně zbarvené) podložky.
- Hodnotí se poměr intenzity dopadajícího světla a světla odraženého od barevné plochy
- Použití: suchá chemie, močová analýza, denzitometrické hodnocení tenkovrstevných chromatografů
- Reflexní fotometr: Přístroj slouží ke kvantitativnímu vyhodnocení reakcí probíhajících na pevné fázi se suchými činidly po jejich aktivaci vodou obsaženou v měřeném vzorku.
- Měří se intenzita záření odraženého od homogenně zbarvené podložky.

Reflexní fotometrie

Ulbrichtova koule

- světelný výtěžek odraženého světla je poměrně malý -> používá se bílý kulový reflektor - Ulbrichtova koule
- dutá koule jejíž vnitřní povrch je potažen vysoce reflexním materiálem (síran barnatý)
- Světlo ze zdroje se po vstupu do koule mnohonásobně odráží od stěn a jako dokonale difuzní dopadá na reagenční plošku
- fokusuje veškeré odražené světlo z reagenčního políčka na fotonku

Reflexní fotometrie

Močová analýza

- Urinalysis Hybrid Diuri FUS-3000Plus

Princip chemické analýzy je reflexní fotometrie. Chemickou analýzou se stanovuje pH, nitrity, bílkovina, glukóza, ketony, bilirubin, urobilinogen, leukocyty a krev. Po napipetování vzorku moče na diagnostický proužek močové analyty reagují s činidly imobilizovanými na jednotlivých zónách a vybarví se v závislosti na koncentraci jednotlivých komponent. Sleduje se odražené záření paralelně při čtyřech vlnových délkách 525, 572, 610 a 660 nm. Neodražené světlo je absorbováno. Čím je koncentrace parametrů v jednotlivých zónách vyšší, tím více světla je absorbováno a zóna proužku se více vybarví. CCD kamera zachytí snímky všech zón. Software kvantitativně vyjadřuje reflektanci každé zóny.



Vertikální fotometrie

- světelný paprsek prochází optickým prostředím ve vertikálním směru
- Využití : pro měření absorbance v jamkách mikrotitračních destiček (ELISA)
- speciální vertikální spektrofotometry - ELISA ready
- Vztah mezi změřeným signálem (absorpcí) a koncentrací se určuje kalibrací. Obvykle se změří absorbance 6-ti standardních roztoků o známé vzrůstající koncentraci
- Z kalibrační křivky (naměřené hodnoty absorbance standardů na ose y, hodnoty koncentrace na ose x) se odečte hodnota koncentrace neznámého vzorku

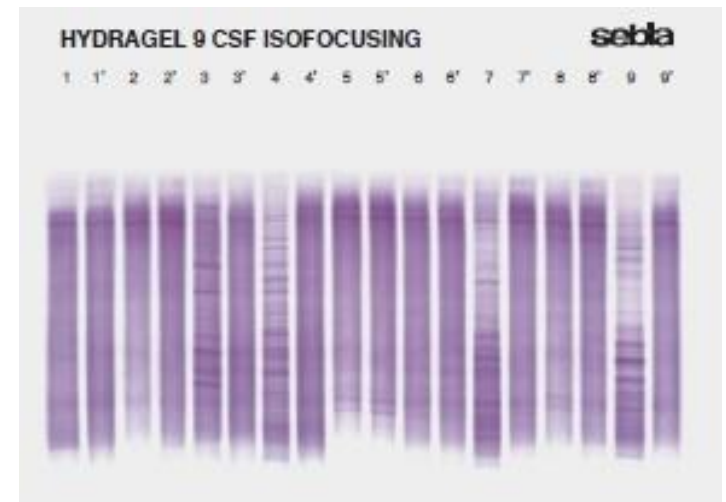


Izoelektrická fokusace

- elektroforetická separační metoda, při níž dochází k dělení biomolekul **v gradientu pH** dle jejich izoelektrického bodu
- gradientu se dosahuje pomocí amfolytů obsahujících směsi NH_2^+ a $-\text{COOH}^-$, které se ve stejnosměrném elektrickém poli seřadí podle svého izoelektrického bodu a vytvoří tak gradient pH (cca 5-10)
- **izoelektrický bod** = hodnota pH při níž je pro danou látku vyvážen počet kladných a záporných nábojů, takže se **molekula jeví navenek jako neutrální** = izoelektrické pH = pI
- pI je hodnota pH, při které se molekuly vlivem elektrického pole nepohybují
- dělené látky v průběhu IF putují do svých izoelektrických bodů, kde fokusují = koncentrují se

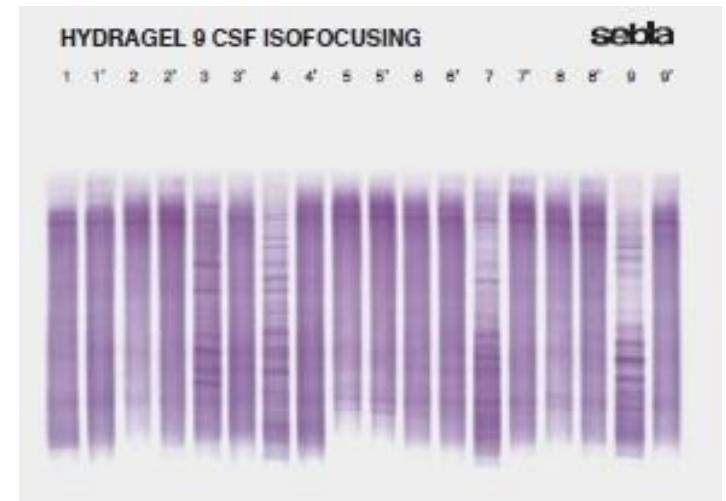
Izoelektrická fokusace

- proteiny vykazují značné rozdíly v izoelektrických bodech: většina má pI v pH 4 – 7
- obecně by se vzorky neměly aplikovat na plochy, kde se očekává jejich fokusace
- aby se proteiny chránily před působením extrémních hodnot pH, neměly by se aplikovat blíže než 1 cm od elektrod
- proteiny můžeme před extrémy pH chránit také tím, že gradient pH vytvoříme před aplikací vzorku (pre-migrace)

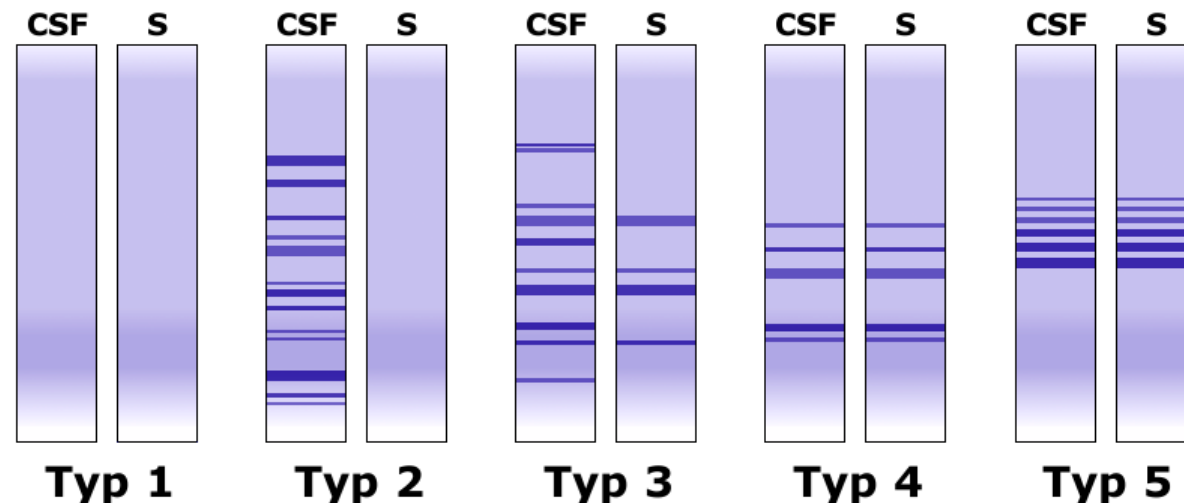


Izoelektrická fokusace: použití

- Přítomnost intrathekálního IgG je významnou informací k diagnóze zánětlivého onemocnění CNS, jehož příčinou je např. rostroušená skleróza. Oligoklonální pásy nacházíme u více než 95 % těchto pacientů.
- Oligoklonální proužkování není ani diagnostické ani specifické pro toto onemocnění, ale je široce používáno jako podpůrná informace a považováno za základní vyšetření dle konsenzu Evropské komise pro sklerózu multiplex. Potvrzuje diagnózu u pacientů s klinickými příznaky choroby a pomáhá při diagnostice pacientů s nepřesvědčivými klinickými projevy.
- Dále lze pásy prokázat u chronických zánětů CNS, neuroborelióze, neurosyfilis atd.



Izoelektrická fokusace: hodnocení



Typ 1 – v séru i v moku pouze polyklonální IgG – normální nález;

Typ 2 – oligoklonální proužky pouze v likvoru – lokální syntéza IgG (např. u roztroušené sklerózy);

Typ 3 – oligoklonální proužky v likvoru a další oligoklonální proužky v likvoru i v séru – lokální syntéza IgG a produkce protilátek v organismu (systémové onemocnění)

Typ 4 – identické oligoklonální proužky v séru i moku (tzv. „zrcadlový“ obraz proužků v séru a v likvoru – dochází k průniku protilátek z krve do likvoru) – systémová imunitní aktivace bez lokální syntézy IgG v CNS;

Typ 5 – identické monoklonální proužky v séru i moku v krátkém úseku pH gradientu, jde o přítomnost monoklonálního paraproteinu v likvoru sérového původu (myelom, monoklonální gamapatie) – paraproteinový obraz.

Izoelektrická fokusace: hodnocení

- Metoda zahrnuje izoelektrofokusaci na agarózovém gelu, následovanou immunofixací s anti-IgG antisérem.
- Vzorky CSF a séra od téhož pacienta jsou pak vizuálně porovnány.
- Citlivost metody dovoluje analýzu CSF bez předchozího zahušťování.
- K potvrzení intratékální syntézy Ig je nutno analyzovat sérum a mozkomíšní mok paralelně ve stejných koncentracích, aby byl demonstrován rozdíl v distribuci IgG.
- Fyziologicky mají imunoglobuliny v séru i mozkomíšním moku polyklonální charakter a vyjadřují heterogenitu individuálních protilátek produkovaných jako odpověď na nejrůznější antigeny, s nimiž se jedinec setkal.

Izoelektrická fokusace: hodnocení

- Intratékálně produkované protilátky se vyznačují pouze omezenou (oligoklonální) heterogenitou, což se při izoelektrické fokusaci projeví jako izolované proužky, které nejsou patrné při analýze séra.
- Z toho vyplývá nutnost provádět současně analýzu imunoglobulinů likvoru i séra.
- Srovnává se přítomnost či nepřítomnost identických pruhů IgG v séru a moku; počet a lokalizace proužků nemá diferenciálně diagnostický význam.

Detekce likvorey

- **Likvoreia** = výtok mozkomíšního moku/likvoru, k němuž dochází při poranění lebky
- Někdy je důležité určit, zda u pacienta po úrazu hlavy je sekret vytékající z nosu jen zánětlivý exsudát z nosní sliznice nebo mozkomíšní mok
- V takovém případě se jedná o závažný stav s komunikací likvorových cest a nosní dutiny, ohrožující pacienta přestupem bakteriální flóry na mozkové blány (meningy)
- Likvor může odtékat např. z dutiny nosní či ucha
- Pro průkaz 2 specifické parametry: beta-trace protein, beta-2-transferin
- Srovnání hladin v séru pacienta a v jiné biologické tekutině (sekrety, výtoky z nosu, tekuté, nebo nasáté do tamponů)

Beta-trace protein

- Prostaglandin D syntáza
- V likvoru jsou koncentrace 20-30 x vyšší než v séru
- U nás stanovení nefelometricky (Atellica, Siemens)
- BTP v sekretu:
 - $< 0,7$ mg/l – přítomnost likvoru nepravděpodobná
 - $\geq 1,3$ mg/l – přítomnost likvoru pravděpodobná
 - $0,7-1,29$ mg/l -> poměry
- BTP sekret/sérum < 2 - přítomnost likvoru nepravděpodobná
- BTP sekret/sérum ≥ 2 - přítomnost likvoru nepravděpodobná

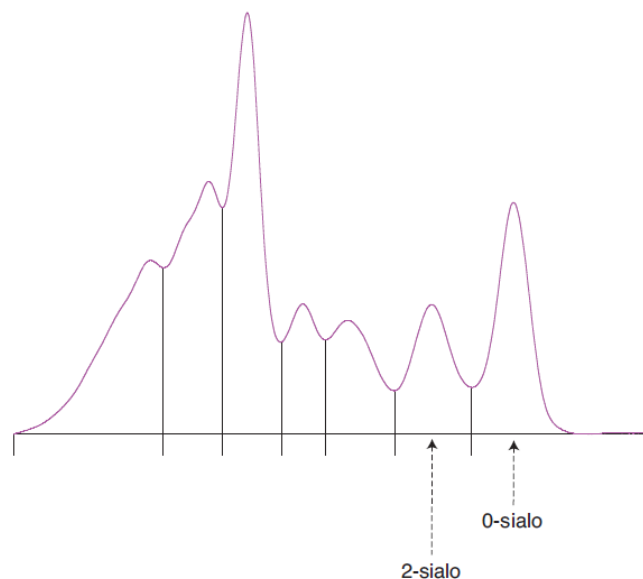
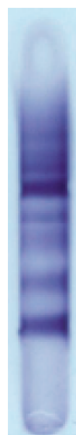
Beta-2 transferin

- Detekce pomocí elektroforézy, Sebia, Hydrasys
- Beta-2-transferin je desializovaná forma transferinu a nachází se pouze v likvoru (ani v séru, ani v slzách,). Přítomnost beta-2-transferinu lze pokládat za specifický průkaz likvoru nebo jeho příměsi
- Ze sérového transferinu se v likvorových prostorech odštěpí zbytky kyseliny sialové (mozkovou neuraminidázou), vzniká asialotransferin
- Vyhodnocení:
 - Vizuální pozorování elektroforetického záznamu umožňuje detekci desialylované frakce transferinu (nebo-li o-sialo frakce) ve vzorcích sekretu.
 - Když je desialylovaná frakce transferinu více vizualizovaná, než frakce disialo transferinu, je vzorek pozitivní.

Beta-2 transferin: hodnocení

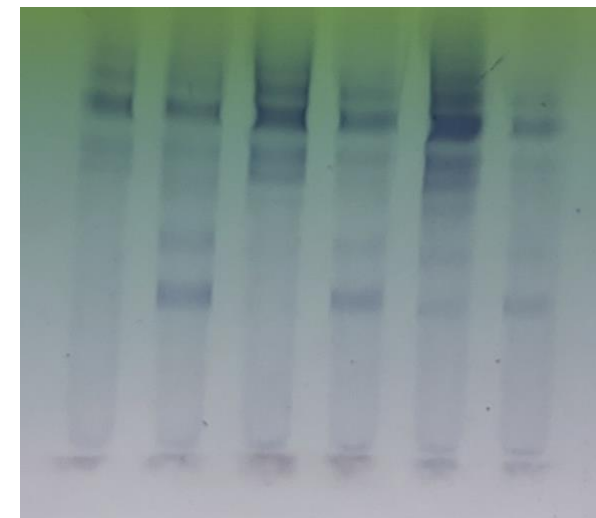
- Vizuální pozorování elektroforetického záznamu umožňuje detekci desialylované frakce transferinu (nebo-li o-sialo frakce) ve vzorcích sekretu.
- Když je desialylovaná frakce transferinu více vizualizovaná, než frakce disialo transferinu, je vzorek pozitivní.

Cerebrospinal fluid sample (= positive control)

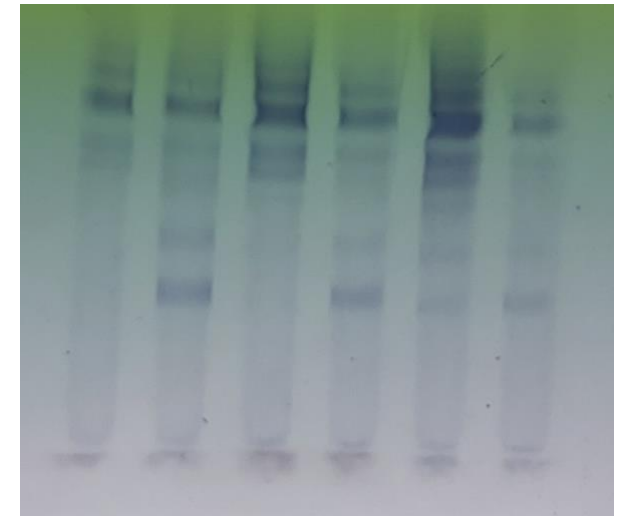
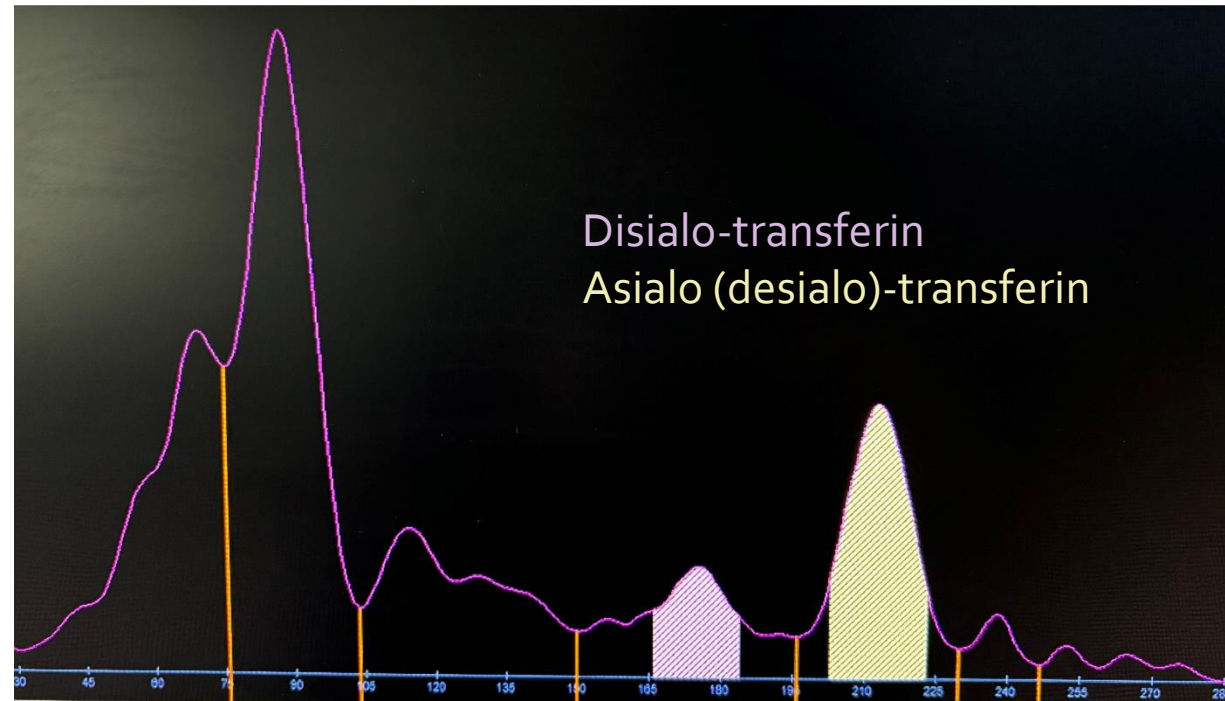


Fractions	%
2-sialo	9.7
0-sialo	14.4

$$R = \frac{0\text{-sialo}}{2\text{-sialo}} = 1.49$$



Beta-2 transferin: hodnocení



Děkuji za
pozornost