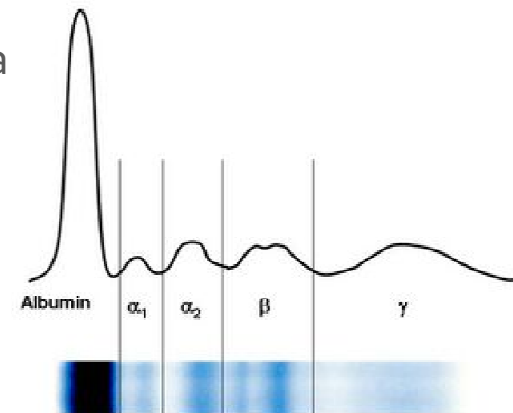


ELEKTROFORETICKÉ METODY, DENZITOMETRIE, REFLEXNÍ A VERTIKÁLNÍ FOTOMETRIE

Mgr. Kateřina Černá Pilátová, Ph.D
Mgr. Nikola Kučeráková

Elektroforetické metody

- Analytické separační metody
- 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



Elektroforetické metody: rozdělení

- **Typy elektroforézy**
 - **Agarózová elektroforéza** – sérové proteiny, hemoglobiny.
 - **Kapilární elektroforéza** – sérové proteiny, HbA_{1c}, hemoglobinopatie, DNA fragmenty.
 - **Isoelektrická fokusace (IEF)** – oligoklonální pásy, izoenzymy.
 - **Polyakrylamidová elektroforéza (PAGE, SDS-PAGE)** – proteinurie, výzkum, proteomika – menší póry, detailnější analýza
 - **2D elektroforéza** (IEF + SDS-PAGE) – proteomika (separace podle náboje a velikosti).

Hlavní typy gelové elektroforézy

Gelová nedenaturační elektroforéza

- *Nativní gelová elektroforéza*
 - probíhá bez denaturačních činidel
 - migrace proteinů gelem závisí na jejich **náboji, velikosti a tvaru**
 - Rozlišovací schopnost (účinnost) elektroforézy je dána velikostí pórů a složením gelu

Gelová denaturační elektroforéza

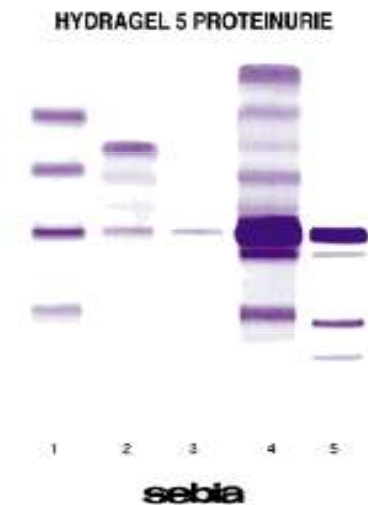
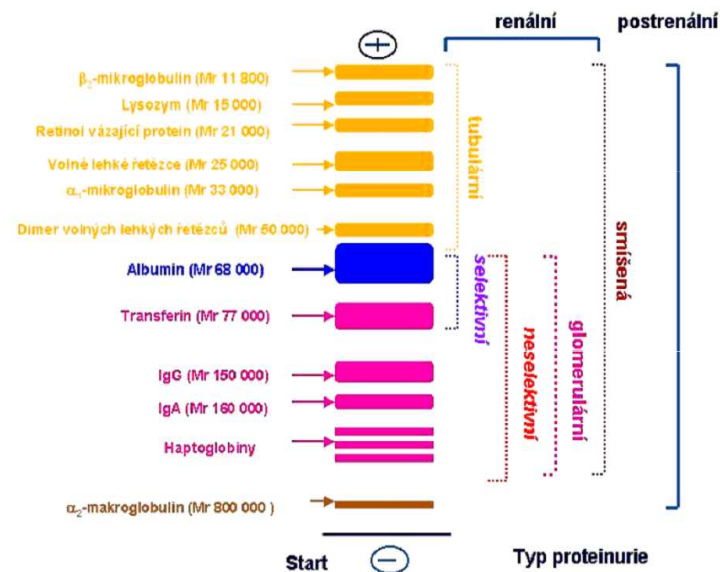
- *SDS gelová elektroforéza*
 - proteiny jsou obvykle denaturovány dodecylsíránem sodným (**SDS**) a redukovány β -merkaptoetanolem
 - Proteiny jsou separovány podle své **molekulové hmotnosti**

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

SDS gelová elektroforéza

- Klinické využití: **analýza proteinurie** (zcela jasně odlišuje bílkoviny tubulární od bílkovin glomerulárního původu).



Elektroforéza bílkovin séra a moče

Nativní gelová
elektroforéza
bílkovin v
moči a séru

Technická
instrumentace

SAS Vitrési (Helena Biosciences)



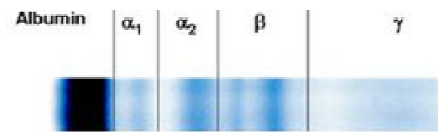
Hydrasys (Sebia)



HYDRASYS (Sebia)

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 amidočerní**
- 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)

HYDRAGEL 30 β_1 - β_2 kit

- **gel**
 - agaróza saturovaná alkalickým roztokem pH 8.6 ± 0.5
 - nosné medium pro elektroforézu
- **pufrované stripy**: slouží jako rezervoár pufru a zajišťují kontakt mezi gelem a elektrodami
- **amidočern** + ředící roztok pro amidočern
- **odbarvovací roztok (destain)**
 - 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

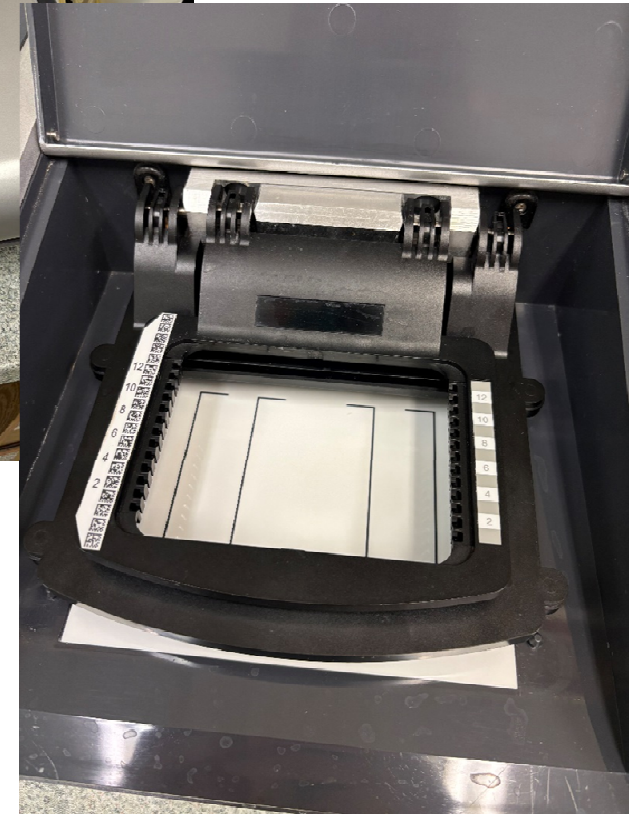
- **Migrace**

- Všechny části migračního rámečku jsou sníženy – stripy s pufrům i aplikátory jsou v kontaktu s povrchem gelu – probíhá **aplikace vzorků do gelu**.
- Nosič aplikátorů vzorků se zvedne, části s elektrodami nesoucí stripy s pufrům 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 ochlazená 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).

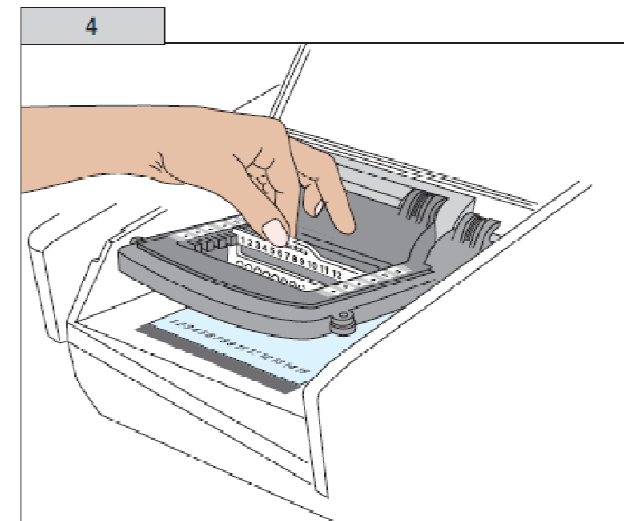
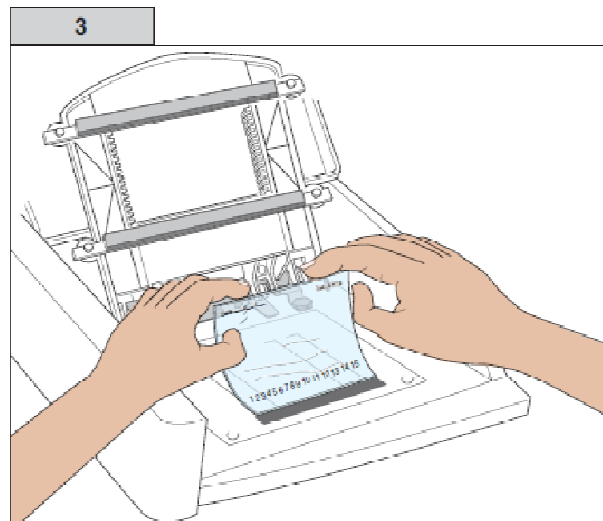
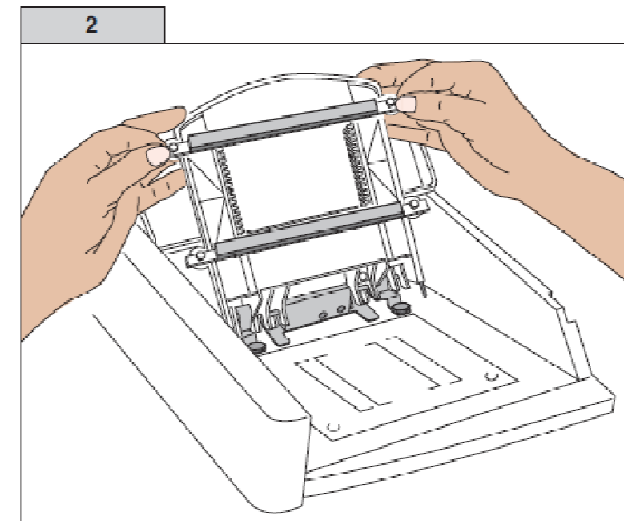
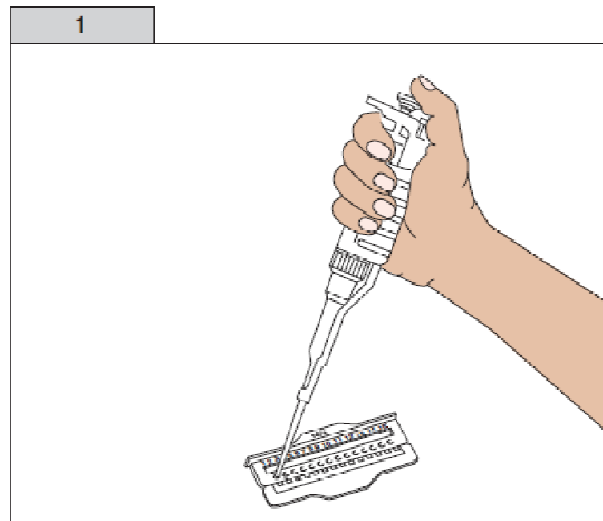
- **Barvení** v barvicím modulu amidočerní.

- **Denzitometrické skenování** nabarvených elektroforetických obrazů / jednotlivých proteinových zón (stanovení procentuálních hodnot) - **elektroferogram**

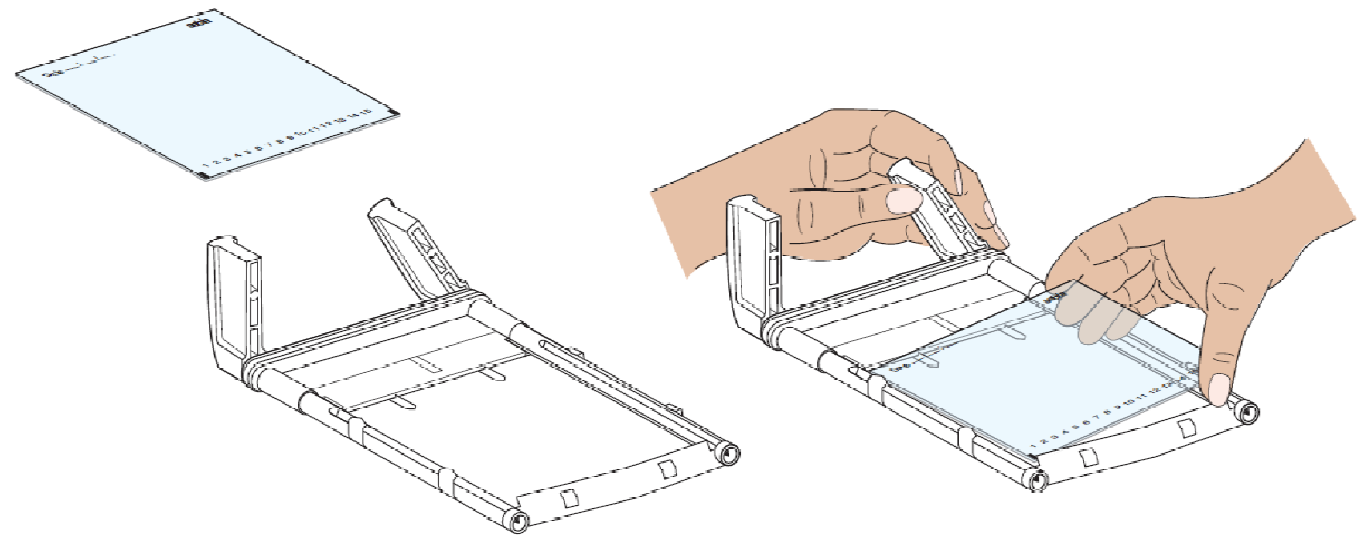
HYDRASYS (Sebia)



HYDRASYS (Sebia)



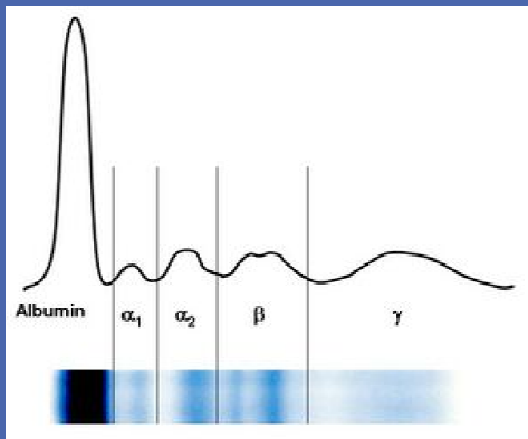
HYDRASYS (Sebia)



Zpracování gelu po separaci

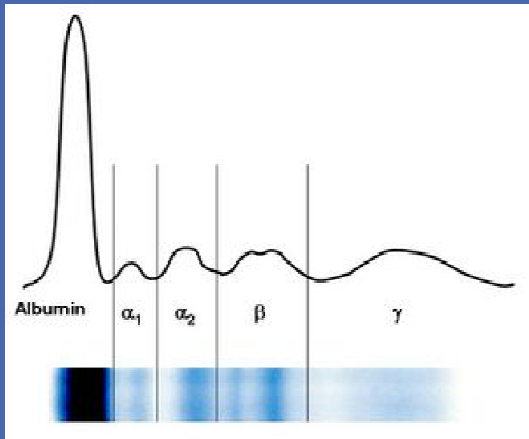
- Po proběhnutí elektroforéze je nutné gel sušit nebo fixovat fixačním roztokem (obsahuje kyselinu, např. kys. octová) - dojde k denaturaci proteinů a jejich **imobilizaci v nosném médiu**, aby se zabránilo difúzi jednotlivých zón.
- Dále je nutné gel obarvit, aby došlo k vizualizaci jednotlivých proteinových 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

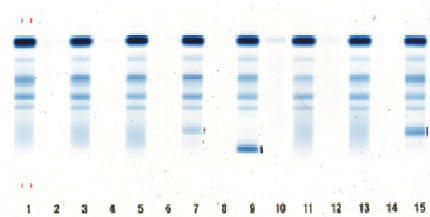


- Po elektroforetické separaci a barvení, je možné kvantifikovat jednotlivé zóny jako procentuální podíl **přímou denzitometrií**.
- **Denzitometr je přístroj, který slouží k vyhodnocení hustoty zbarvení v plošném uspořádání (scanner)**. Jedná se o postup, který je podobný fotometrickému stanovení, zaznamenává měnící se hodnotu absorbance v závislosti na intenzitě zbarvení.
- Při denzitometrii se **měří intenzita záření procházejícího průhlednou plochou**, získává se grafický záznam fotometrovaného úseku.
- **Elektroforetický obraz** 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.
- **Plocha pod křivkou píků** připadající jednotlivým frakcím, je **úměrná relativnímu zastoupení jednotlivých frakcí v dělené směsi**.
- Po zpracování signálu získáme číselné výsledky jednotlivých frakcí – **přepočet z celkové bílkoviny**.

Gelová elektroforéza v klinické praxi (SPE)



- Při elektroforéze sérových bílkovin dochází k rozdělení na frakci albuminu, α_1 , α_2 , β_1 , β_2 a γ -globulinů
- Proteiny migrují v gelu jako pásy (bandy)



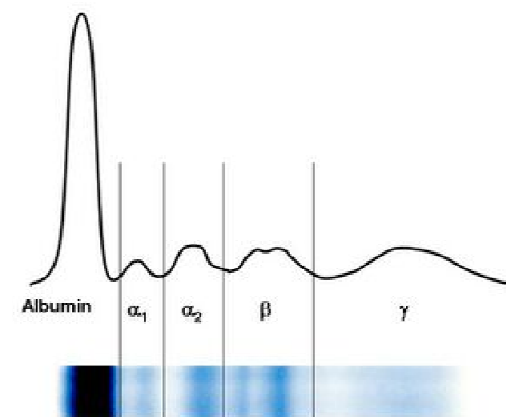
- Stanovení zastoupení jednotlivých frakcí může mít orientační význam při hodnocení stadia zánětlivého procesu (akutní zánět - $\uparrow$ α_1 a později i α_2 ; chronický zánět - $\downarrow$ albumin, $\uparrow$ gamma globuliny)
 - **Vyhodnocování zastoupení jednotlivých zón je dnes z velké části nahrazeno automatizovanými metodami stanovení specifických proteinů!**
 - **Hlavní význam elektroforézy sérových bílkovin: detekce monoklonálních imunoglobulinů (M-proteinu).**

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



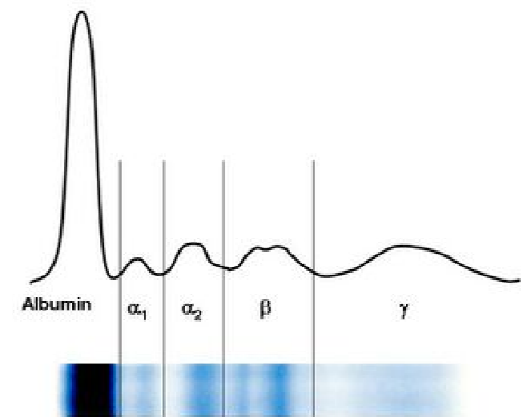
Gelová elektroforéza v praxi (SPE): Frakce

α_1 GLOBULINY

- prakticky jediná bílkovina, která ovlivňuje tvar a intenzitu alfa 1 zóny – **alfa-1-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 **alfa-2-makroglobulin a haptoglobin**.
- Haptoglobin:
 - vazba hemoglobinu z rozpadlých erytrocytů (zabraňuje ztrátám Fe)
 - $\uparrow$ při akutním zánětu a při zátěži
 - $\downarrow$ při rozpadu velkého množství erytrocytů



Gelová elektroforéza v praxi (SPE):

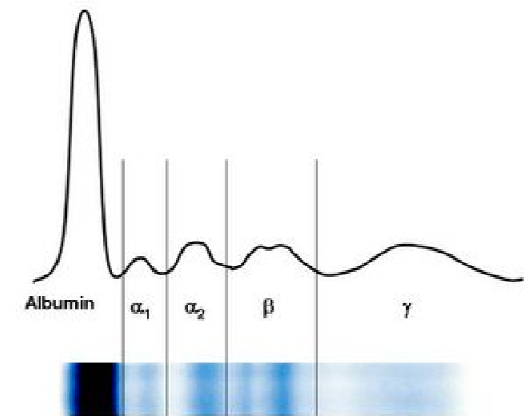
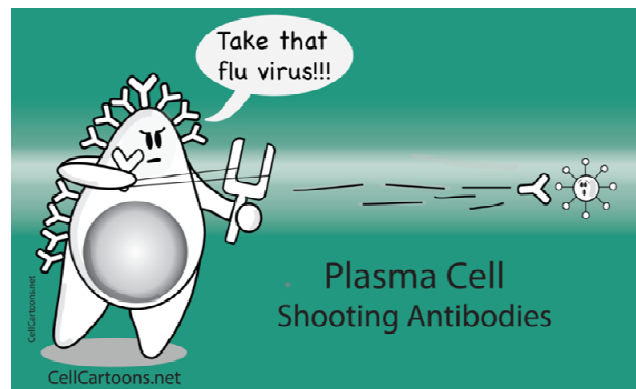
Frakce

β GLOBULINY

- β_1 = **transferin** – vazba a transport železa
- β_2 = **komplement C₃**

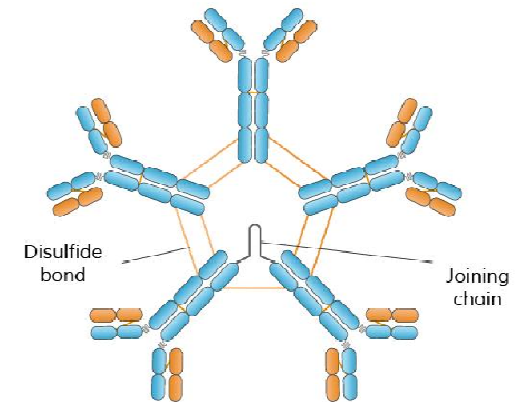
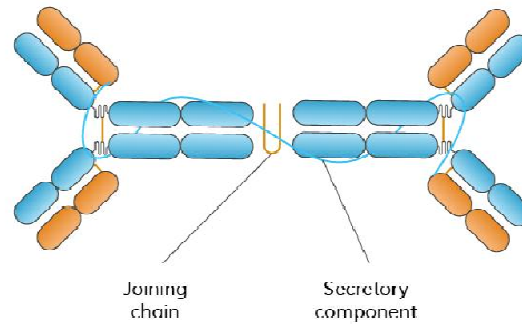
γ GLOBULINY

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



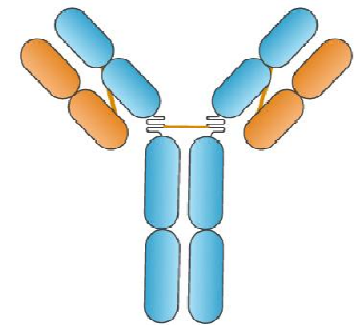
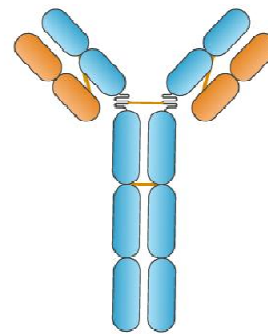
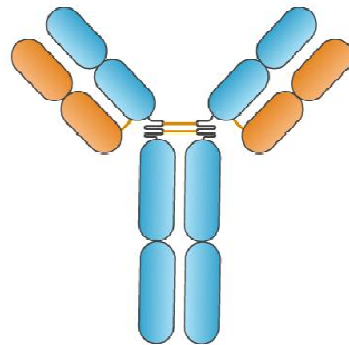
Protilátky: struktura

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



IgA

IgM



IgG

IgE

IgD

Detekce paraproteinů

- Imunoelektroforéza je v současné době používána téměř výhradně k průkazu monoklonálního imunoglobulinu = paraproteinu
- **Paraprotein** (PP, Mlg) je produkován klonem nádorových plasmatických buněk = plazmocytem, plazmocytní myelom
- **Mnohočetný myelom** = nádor vycházející z plasmatických buněk
- **CRAB** symptomy
- **Přítomnost Mlg = výrazný nefyziologický úzký band obvykle v gama zóně**
- Příčinou jasného pruhu je fakt, že se PP pohybuje velmi uniformně, protože každá molekula má stejné aminokyselinové složení (tudíž stejný náboj a molekulovou hmotnost)

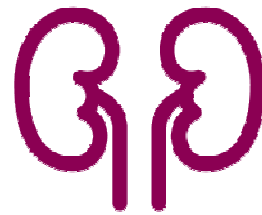
CRAB symptomy

C



High levels of
calcium in the
blood

R



Decreased kidney
(renal) function

A



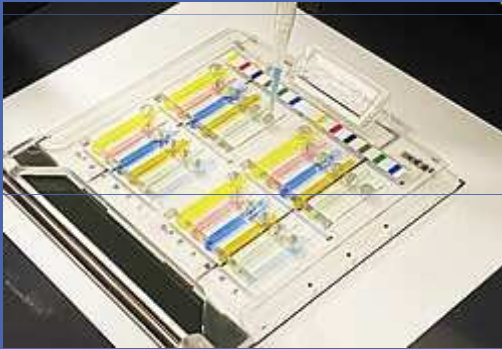
Low amount of
red blood cells
(anemia)

B



Presence of
bone damage

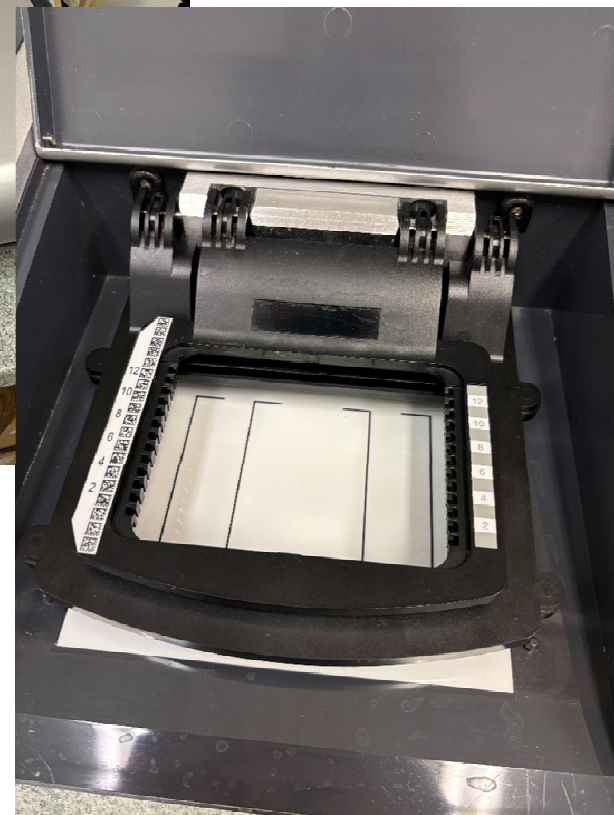
Elektroforéza s následnou imunofixací



Provádí se ve čtyřech krocích:

- **Separace proteinů elektroforézou** na agarózovém gelu.
- **Imunofixace (imunoprecipitace)** proteinů rozdělených elektroforézou – příslušné migrační stopy jsou překryty **jednotlivými antiséry** (anti-IgG, -IgM, IgA, -kappa a – lambda). 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**

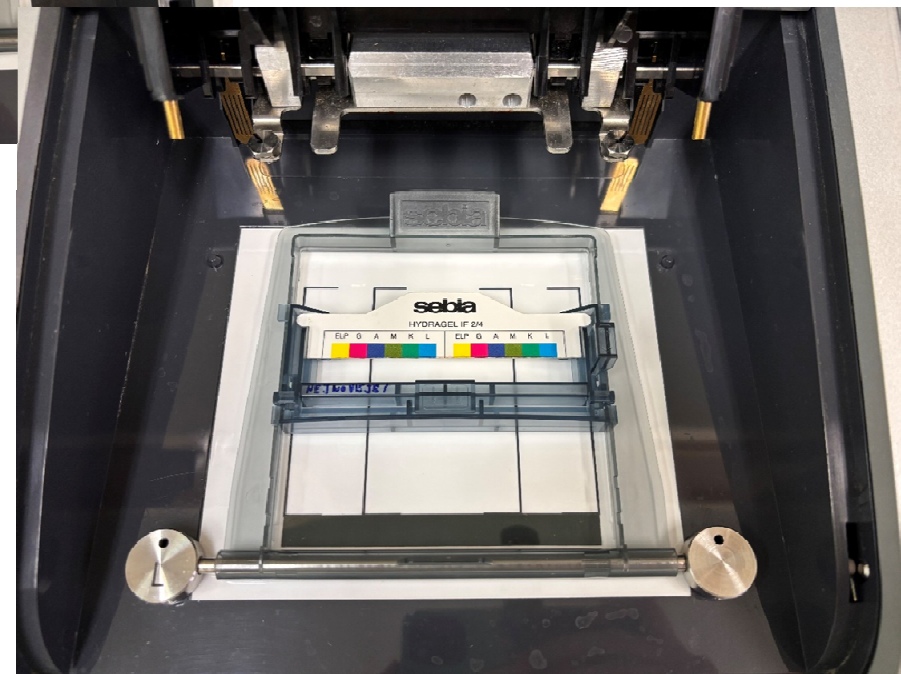
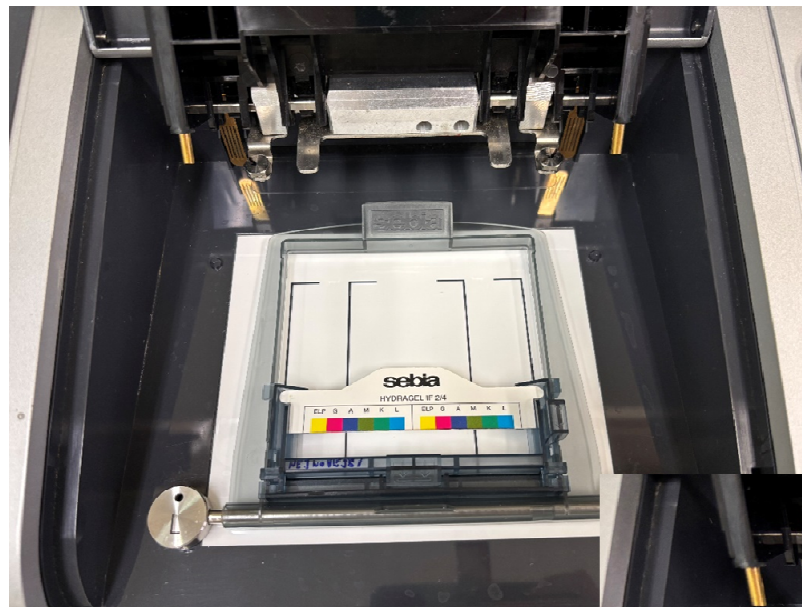
Imunofixace: zpracování



Imunofixace: zpracování



Imunofixace: zpracování



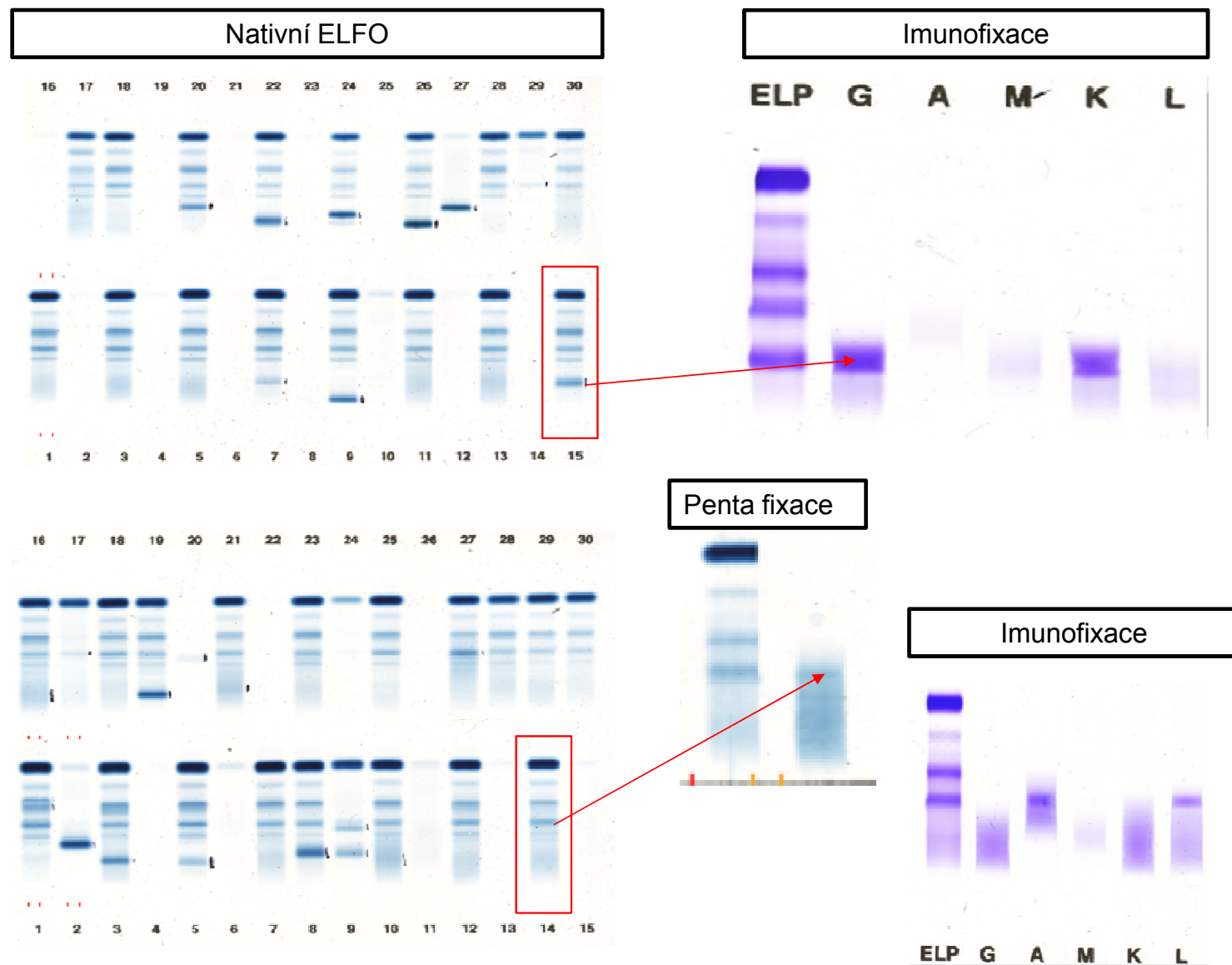
Imunofixace

- **Penta fixace**
 - Do jedné stopy se nanese směs všech pěti antisér: **IgG, IgA, IgM, κ , λ** .
 - Slouží k rychlé orientaci – ukáže, zda v séru je **nějaká monoklonální komponenta**.
 - Pokud se objeví pozitivní pruh, je nutné provést rozlišení jednotlivými antiséry.
- **Plná fixace**
 - Každé antisérum (IgG, IgA, IgM, κ , λ) se aplikuje do samostatné stopy.
 - Umožní **přesně určit třídu a typ lehkého řetězce** monoklonálního imunoglobulinu.
 - Je definitivním potvrzením a typizací M-proteinu.
- **Speciální fixace**
 - Cílená na vzácné nebo atypické monoklonální imunoglobuliny (např. IgD, IgE, heavy-chain disease, čistě lehké řetězce).
 - Detekce terapeutických monoklonálních protilátek

Hodnocení
elektroforézy:

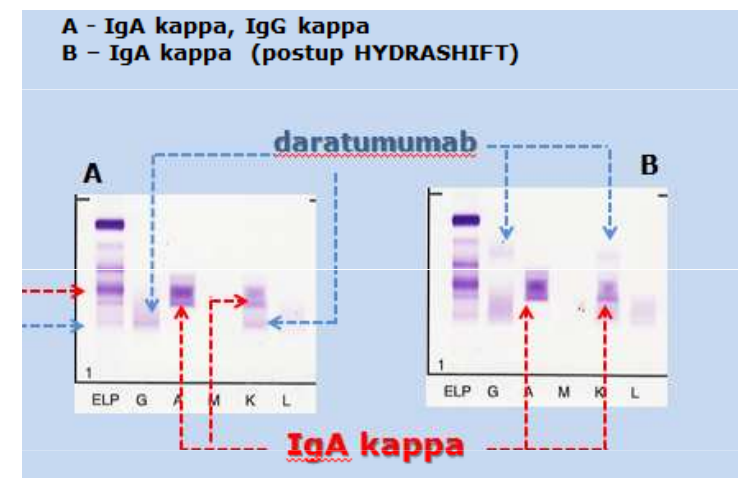
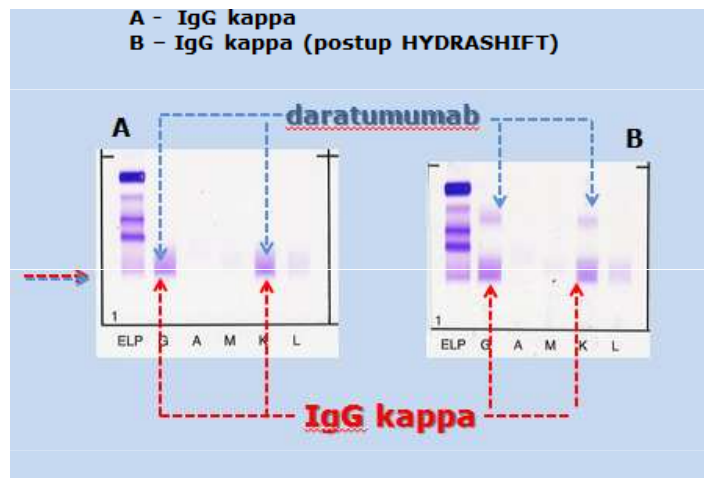
Pentafixace

Imunofixace

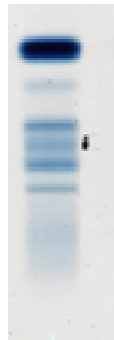


Hodnocení elektroforézy: speciální fixace – terapeutické protilátky

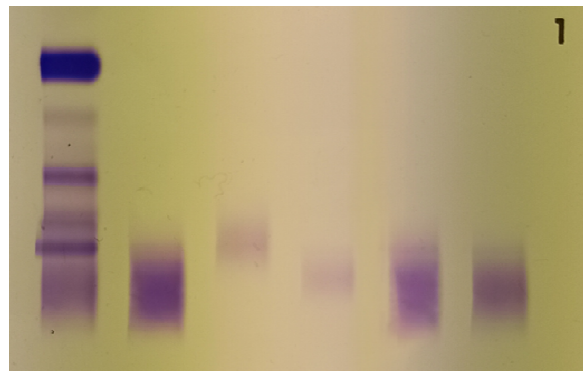
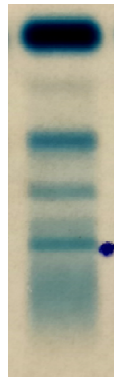
- Terapeutická protilátka může mít stejnou elektroforetickou pohyblivost jako Mlg přítomný v séru pacienta.
- Může simulovat přítomnost patologického Mlg, který ve skutečnosti není přítomen, a tak falešně podhodnocovat odpověď na léčbu.
- Imunofixační postup HYDRASHIFT (SEBIA) s použitím antidaratumumabu provedený na gelu HYDRAGEL IF 2/4 je založen na **vytvoření komplexu daratumumab/antidaratumumab** a jeho posunutí mimo oblast gamaglobulinů.



Hodnocení elektroforézy / imunofixace



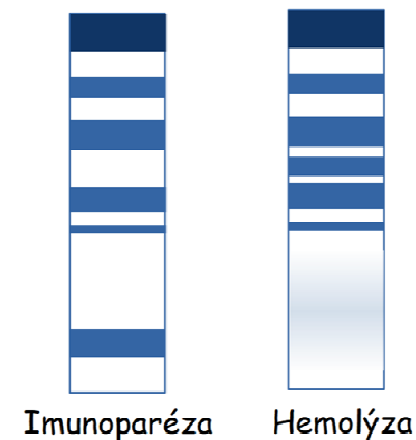
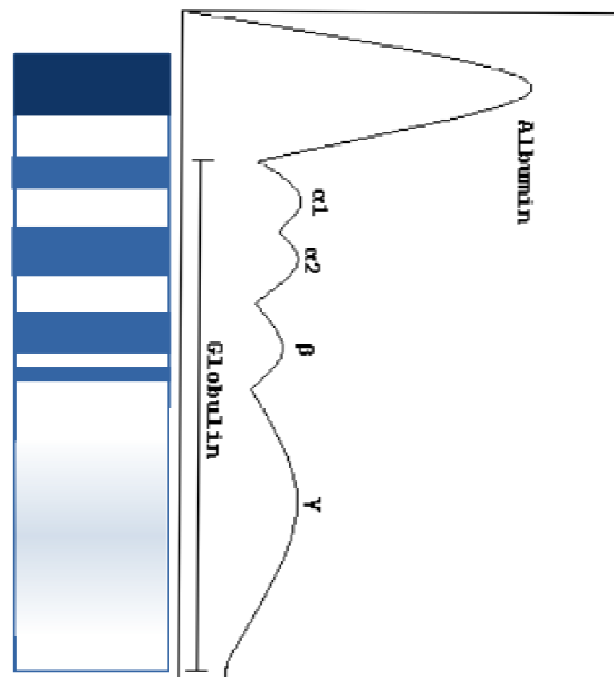
- Hemolýza = 1250 mg/l (norma 0-50)



- Fibrinogen (plazma)

Hodnocení elektroforézy

• NATIVNÍ ELEKTROFORÉZA



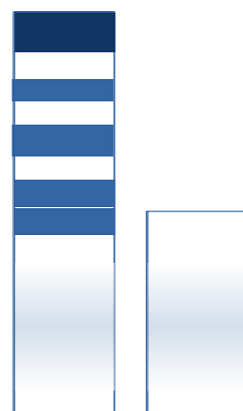
Imunoparéza

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

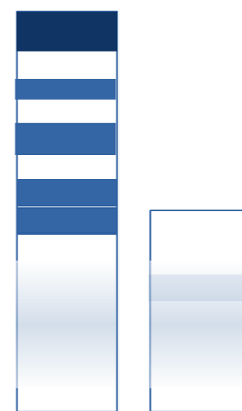
Hemolýza

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

Hodnocení pentafixace



Elfo Pentavalentní
antisérum

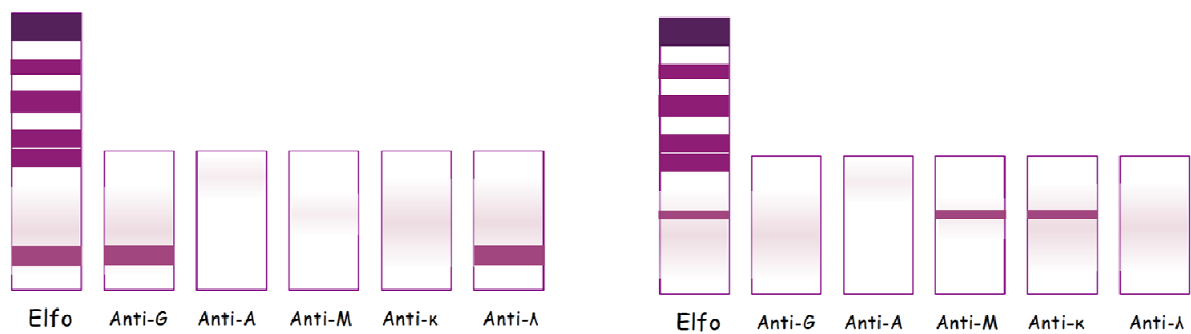
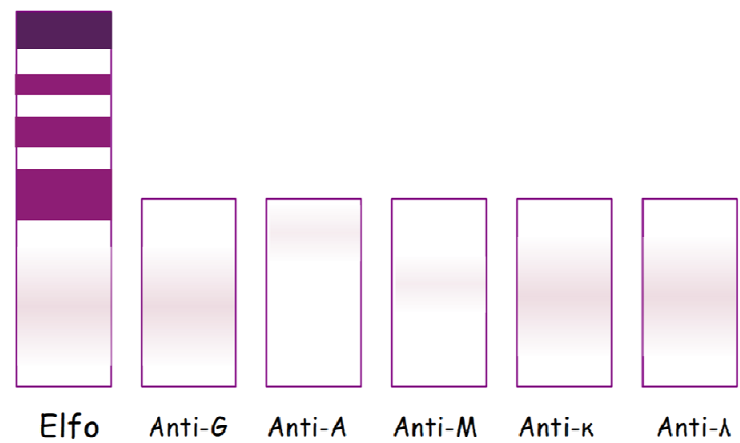


Elfo Pentavalentní
antisérum

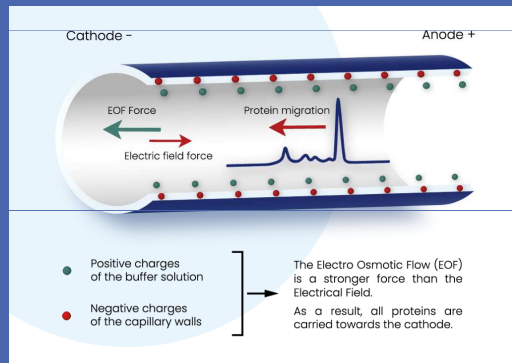


Elfo Pentavalentní
antisérum

Hodnocení imunofixace



Kapilární elektroforéza



Princip

- Separace proteinů v **tenké kapiláře naplněné pufrem** při vysokém napětí.
- Detekce pomocí **UV absorbance** (nejčastěji 200–220 nm).
- Migrace podle **náboje, velikosti a interakce s pufrem**.
- Výsledek: **elektroferogram** = křivka absorbance vs. migrační čas.

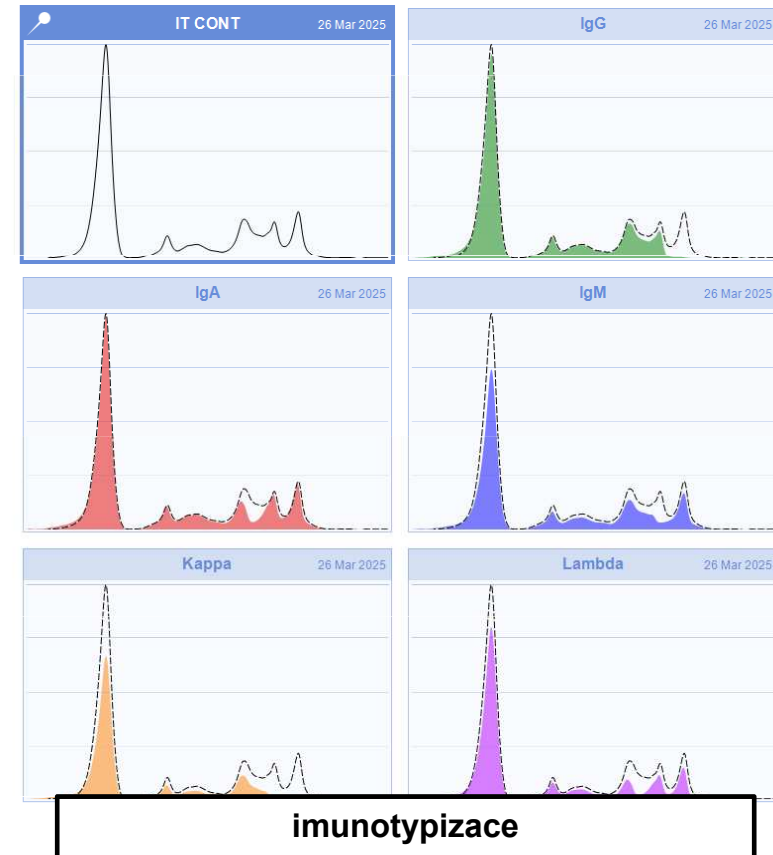
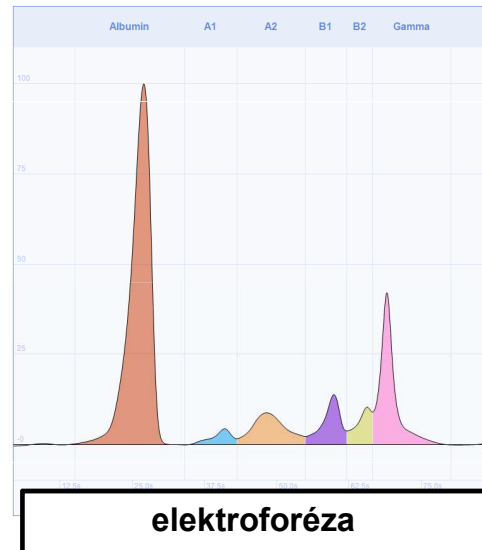


V8 UltraCE, (Helena Biosciences)



Capillarys (Sebia)

Kapilární elektroforéza + imunotypizace



Imunotypizace spočívá v přidání specifických antisér, které naváží monoklonální imunoglobulin, **vytvoří nerozpustný komplex a způsobí vymizení jeho píku v elektroferogramu**, čímž lze určit typ paraproteinu.

Gelová vs. kapilární elektroforéza v klinické praxi

Vlastnost	Agarózová elektroforéza	Kapilární elektroforéza
Princip	Migrace proteinů v agarózovém gelu, barvení a vizualizace pásů	Migrace proteinů v tenké kapiláře při vysokém napětí, detekce UV absorbcí
Výstup	„Gelový obraz“ – barevné pásy + denzitometrická křivka	Elektroferogram – křivka absorbance vs. migrační čas
Čas analýzy	30–60 minut	< 10 minut
Automatizace	Spíše manuální (nanášení vzorku, barvení, sušení)	Plně automatizovaná, minimální zásah obsluhy
Rozlišení	Nižší, frakce se mohou překrývat	Vysoké, ostré píky, možnost $\beta 1/\beta 2$
Citlivost	Nižší – malé M-komponenty nemusí být vidět	Vysoká citlivost k detekci M-komponent
Přehlednost	Vizualizace pásů vhodná pro výuku	Jen křivka – méně názorné pro laiky
Cena	Nižší (gel, barviva)	Vyšší (přístroj + reagenční sety)
Použití	Rutinní screening, výuka – hl. monoklonální gamapatie,	Moderní screening, sledování monoklonálních gamapatií, glykovaný hemoglobin

Izoelektrická fokusace (IEF)

Izoelektrická fokusace (IEF)

- 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 (IEF)

- Proteiny vykazují značné rozdíly v izoelektrických bodech: většina má pI v pH 4 – 7.
- Obecně by se vzorky neměly aplikovat na místo, 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: klinické aplikace

- **Oligoklonální pásy (OCB) v mozkomíšním moku**
 - IEF + imunofixace → detekce intratekální syntézy IgG.
 - Zásadní vyšetření v diagnostice RS.
- **Průkaz β -2-transferinu**
 - Marker mozkomíšního moku (likvorhea do ucha/nosu).
 - IEF oddělí transferrinové isoformy → β -2-transferin je specifický pro CSF.

Izoelektrická fokusace: Detekce oligoklonálních pásů (OCB)



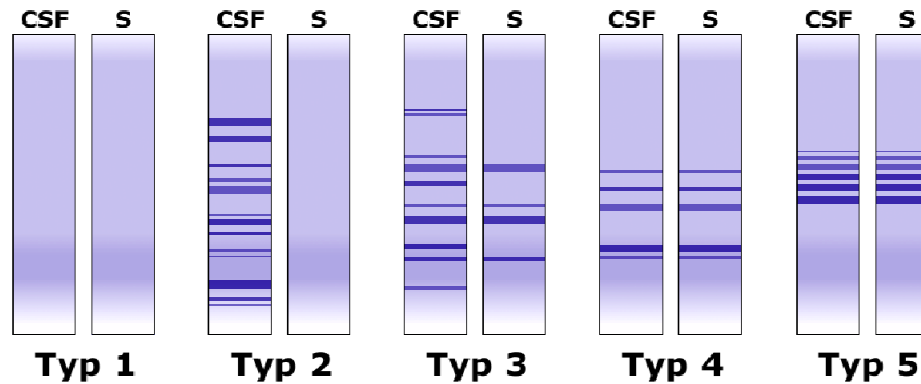
- Slouží k průkazu intratekální syntézy IgG v CNS, což je zásadní v diagnostice a diferenciální diagnostice roztroušené sklerózy a dalších chronických zánětlivých onemocnění CNS.
- Oligoklonální pásy (OCB) nacházíme u více než 95 % pacientů s **roztroušenou sklerózou** (nejsou specifické pro roztroušenou sklerózu, ale jsou součástí diagnostických kritérií – diseminace v čase).
- Dále lze pásy prokázat u chronických zánětů CNS, při **neuroborrelióze, neurosyfilis** atd.

Izoelektrická fokusace: hodnocení



- Metoda zahrnuje **izoelektrofokusaci na agarózovém gelu, následovanou immunofixací s anti-IgG antisérem** značeným enzymem (např. peroxidáza, zvyšuje citlivost).
- Vzorky **CSF a séra odebrány současně!!!** 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 OCB



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 OCB

- 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 CSF; počet a lokalizace proužků nemá diferenciálně diagnostický význam.

Izoelektrická fokusace: Průkaz 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-transferrin.**
- 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

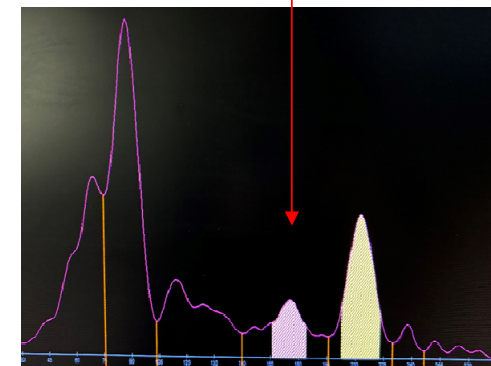
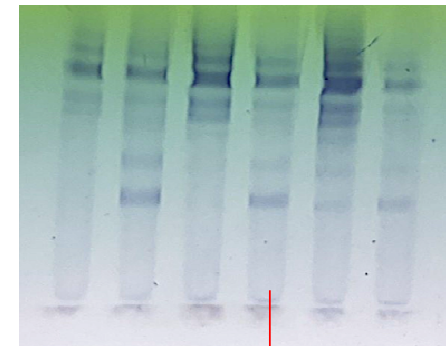
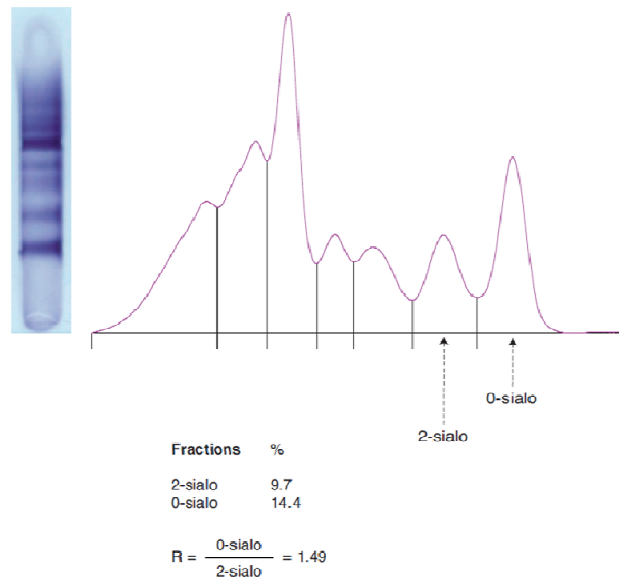
Beta-2 transferrin

- Detekce pomocí **IEF na agarózovém gelu + imunofixace anti-transferrinovými protilátkami**
- **Zlatý standard** pro průkaz likvoru v biologických sekretech
- Beta-2 transferrin je desialylovaná forma transferinu a nachází se pouze v likvoru, perilymfě a sklivci oka (ani v séru, ani v slzách,).
- Přítomnost beta-2 transferrinu lze pokládat za specifický průkaz likvoru nebo jeho příměsi.
- Ze sérového transferrinu se v likvorových prostorech působením neuraminidáz odštěpují zbytky kyseliny sialové → vzniká asialotransferrin (β_2 -transferrin).
- Vyhodnocení:
 - Vizuální pozorování elektroforetického záznamu umožňuje detekci desialylované frakce transferinu (neboli 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)



ELFO + IEF: Příklady dalších aplikací

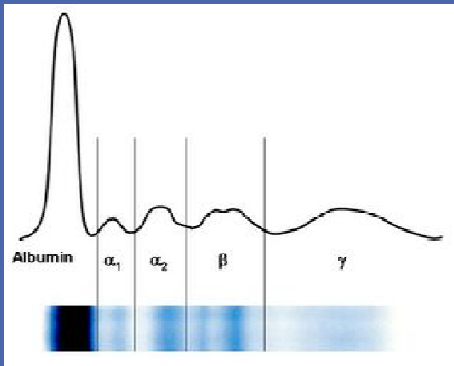
- **Iso-ALP (izoenzymy alkalické fosfatázy)**
 - **Metoda:** agarózová elektroforéza + inhibice/lektiny
 - **Princip:** rozlišení isoenzymů ALP (kostní, jaterní, placentární, intestinální) podle mobility a reakce s lektinem
 - **Klinicky:** diferenciální diagnostika zvýšené ALP (hepatopatie vs. osteopatie)
- **Frakce hemoglobinu**
 - **Metoda:** agarózová elektroforéza
 - **Princip:** separace HbA, HbA₂, HbF a patologických variant (HbS, HbC, HbE) podle náboje/mobility
 - **Klinicky:** diagnostika hemoglobinopatií a talasemií
- **CDT (carbohydrate-deficient transferrin)**
 - **Metoda:** izoelektrická fokusace + imunofixace / kapilární zónová elektroforéza
 - **Princip:** transferrin se separuje podle počtu sialových kyselin (tetrasialo vs. disialo/asialo formy)
 - **Klinicky:** marker chronického abúzu alkoholu (zvýšený podíl disialo- a asialo-transferrinu)

Denzitometrie, reflexní a vertikální fotometrie

- **Metody kvantitativního hodnocení elektroforetických a fotometrických výsledků**
 - Denzitometrie
 - Reflexní fotometrie
 - Vertikální fotometrie

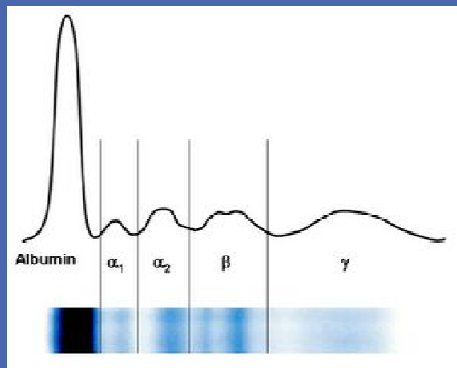
Metoda	Princip	Typické použití	Poznámka
Denzitometrie	Absorpce barvených pásů	Elektroforézy	Potřeba barvení
Reflexní fotometrie	Odraz světla od povrchu	Testovací proužky, POCT	Nižší přesnost
Vertikální fotometrie	Průchod světla skrz vzorek	Suchá chemie, mikrodestičky	Nutnost přesné optiky

Denzitometrie



- Optická metoda, která se zabývá měřením optické hustoty
- Měření intenzity zbarvení pásů po elektroforéze (např. proteinů, lipoproteinů).
- Světelný paprsek prochází barveným gelem/filmem → absorbance je úměrná koncentraci.
- 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.

Reflexní fotometrie

- **Ulbrichtova koule (integrační koule)**
 - **Proč se používá:** světelný signál odražený od reagenční plochy je slabý → koule zajišťuje jeho zachycení a zesílení.
 - **Princip:** dutá koule s vnitřním povrchem potaženým vysoce odrazivým difuzním materiálem (dříve síran barnatý, dnes spíše teflon/PTFE).
 - **Jak funguje:** světlo ze zdroje se uvnitř mnohonásobně rozptýlí a rovnoměrně dopadá na reagenční plošku; veškeré odražené světlo je pak směřováno na detektor.
 - **Výsledek:** přesné a stabilní měření odraženého záření, nezávislé na směru odrazu.
 - **Současnost:** princip integrační koule se stále využívá, dnes je zabudován v optických modulech moderních analyzátorů (suchá chemie, reflexní fotometrie).

Reflexní fotometrie



- **Močová analýza – Urinalysis Hybrid Diuri FUS-3000Plus**

Stanovené parametry: pH, nitrity, bílkovina, glukóza, ketony, bilirubin, urobilinogen, leukocyty, krev

Postup:

- vzorek moči se nanese na diagnostický proužek,
- jednotlivé zóny proužku obsahují imobilizovaná činidla, která reagují s analyty,
- vzniká barevná reakce úměrná koncentraci analytu.

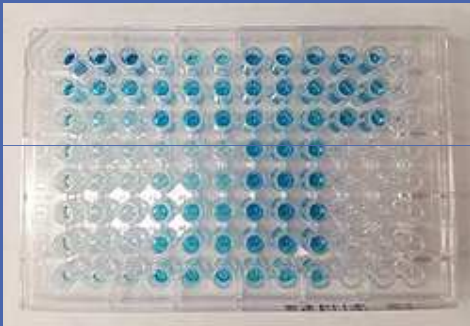
Detekce:

- intenzita odraženého světla se měří při 4 vlnových délkách (525, 572, 610, 660 nm),
- vyšší koncentrace analytu → více absorbovaného světla → výraznější zbarvení zóny.

Vyhodnocení:

- CCD kamera snímá proužek,
- software vyhodnotí intenzitu barvy a vypočítá koncentraci každého parametru.

Vertikální fotometrie



- Světelný paprsek prochází optickým prostředím ve vertikálním směru.
- Využití: pro měření absorbance v jamkách mikrotitračních destiček (ELISA)
- Speciální vertikální spektrofotometry - ELISA reader
- Vztah mezi změřeným signálem (absorpcí) a koncentrací se určuje kalibrací. Obvykle se změří absorbance 6 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.

Hlavní části detekčních systémů

Metoda	Zdroj světla	Vzorek / ploška	Detektor (optický modul)	Princip měření
Denzitometrie	Halogenová/ LED lampa	Gel s obarvenými pásy	Fotodioda	Absorbance – tmavší pás = vyšší koncentrace
Reflexní fotometrie	LED	Reagenční ploška proužku	Ulbrichtova koule + CCD kamera / fotonásobič	Odražené světlo – vyšší koncentrace = menší odraz
Vertikální fotometrie	LED / halogen	Kyveta, jamka, ploška suché chemie	Detektor pod vzorkem	Procházející světlo (Lambert– Beerův zákon)

Děkuji za
pozornost