

IMUNOANALÝZA

elektroforetické separační metody

3. ročník Klinická biologie a chemie

Princip elektroforézy I.

SeparáčnÍ metoda využívající různé pohyblivosti různých iontů (složek směsi) ve stejnosměrném (homogenním) elektrickém poli.

Pohyblivost iontů závisí na:

- použitém elektrolytu (kapalnÉ fázi)
- chemické vlastnosti a porozita nosiče

Většinu biologicky zajímavých látek lze ve vodném prostředí převést na **elektricky nabitÉ částice**.

Metodika: disociace, změna pH, adsorpce iontů jiného druhu, chemickou vazbou - tvorbou tzv. ionogenních komplexů.

Princip elektroforézy II.

Použití

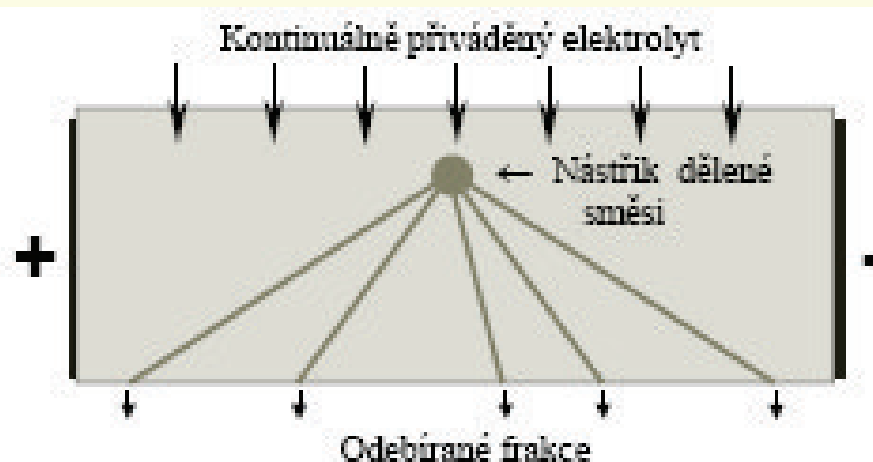
1. pro účely analytické i preparativní.
2. k separaci velkých molekul (proteiny nebo NK)
3. k separaci menších molekul (cukry, peptidy nukleotidy)

Faktory ovlivňující pohyblivost látky

1. Celkový povrchový náboj separované látky
2. Velikost a tvar molekuly
3. Porosita gelu
4. pH a složení elektrolytu

VOLNÁ ELEKTROFORÉZA

Kontinuální zónová elektroforéza
(volná, beznosičová)



- Elektroforéza s pohyblivým rozhraním; možnost oddělení pouze nejpomalejších a nejrychlejších iontů. Nejstarší, dnes již velmi málo používaná metoda.
- Výhody: značný výkon; malé ztráty, účinné dělení.
- Použití: dělení tkáňových extraktů, bílkovin, živých buněk i jejich částí, čištění syntetických hormonů pro genetické inženýrství v beztlížném stavu – až 5x větší čistota než v podmínkách pozemských laboratoří.

Elektroforéza na nosičích I.

provádí se na hydrofilních porézních nosičích, nerozpustných ve vodě, s minimální adsorpční schopností, zabraňuje zpětnému mísení rozdělených složek

Nosiče

- neklížený papír (tzv. chromatografický)
- acetát celulózy
- škrob (nezgelovatělý)
- celulóza
- agarózový gel
- polyakrylamidový gel

Papírová elektroforéza – nosičem elektrolytu je chromatografický papír – analýza bílkovin; dělení nízkomolekulárních látek, aminokyselin

Elektroforéza na tenké vrstvě – nosičem elektrolytu (H_2O + pufr) je vrstva silikagelu nebo škrobu na skleněné podložce.

Gelová elektroforéza – vliv porozity gelu na separaci částic

Elektroforéza na nosičích II.

Kombinovaná elektroforéza –

dělení je využito (kromě el.náboje) ještě dalších odlišností – např. velikosti a molární hmotnosti iontů. Nosičem elektrolytu je obvykle gel, při dělení je využito možností gelové chromatografie (porozita gelu)

př. SDS-PAGE elektroforéza – dělení látek podle Mr

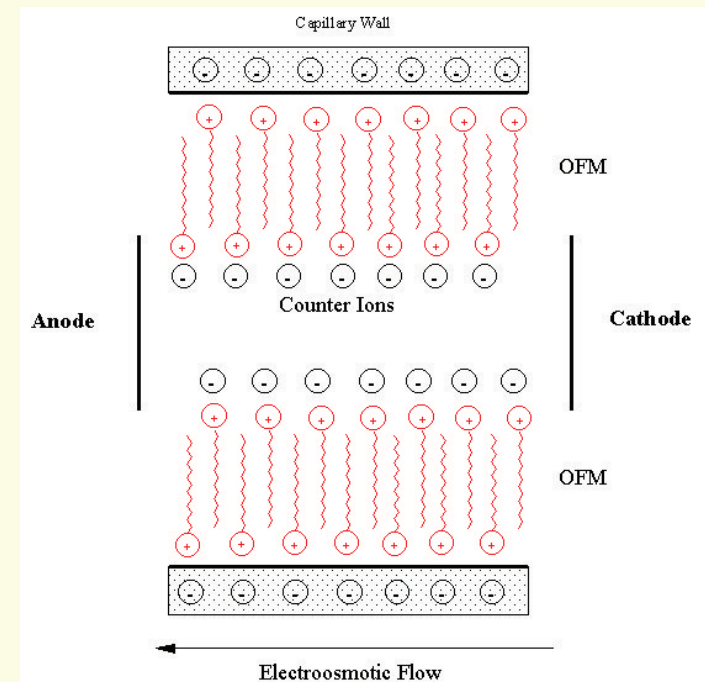
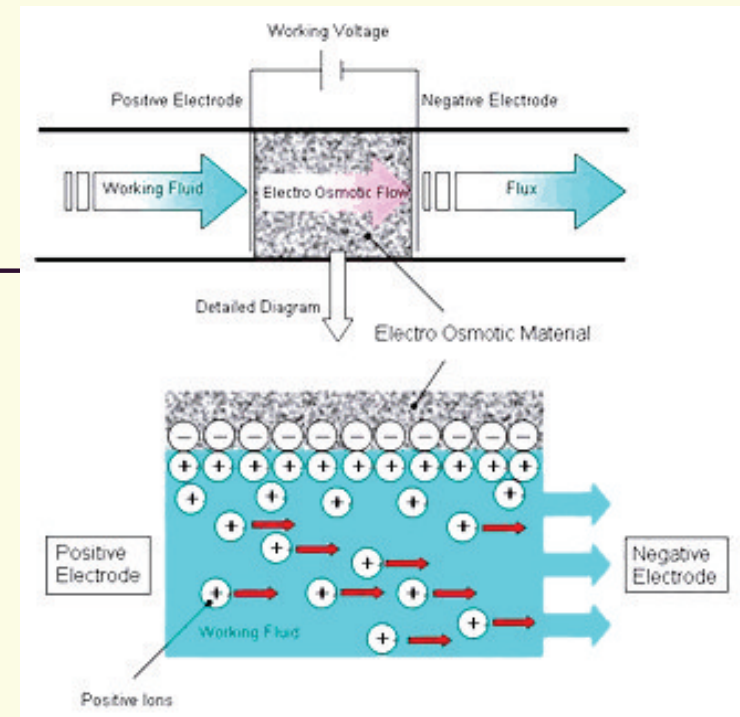
Kapilární elektroforéza

metoda využívající pohybu elektricky nabitých látek v elektrickém proudu rozpuštěných ve vodivém médiu, kapilára naplněná elektrolytem nebo gelem, doprovodným jevem je

elektroendoosmotický tok

Elektroendoosmóza

- na vnitřním povrchu kapiláry v místě styku s vodivým roztokem vzniká elektrická dvojvrstva
- pevná část (stěna kapiláry) je nabitá nepohyblivým plošným záporným elektrickým nábojem
- z kapalně části se kladné ionty připojí ke stěně kapiláry (dvojvrstva), ionty se pohybují k anodě
- pohyblivá vrstvička se žene kapilárou a strhne sebou celý průřez kapaliny v kapiláře
- roztok putuje kapilárou celý najednou (u elektroforézy putují jen ionty).



MODIFIKACE GELOVÉ ELEKTROFORÉZY

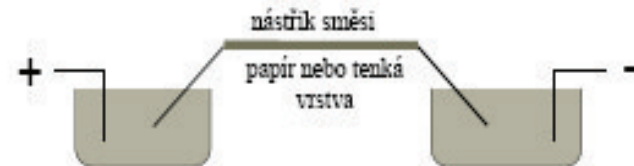
Elektroforéza s gradientem porozity

Izoelektrická fokusace – gradient pH v gelu – dělení bílkovin podle jejich izoelektrického bodu (použití pro diagnostické klinické analýzy, k dělení buněk a virů).

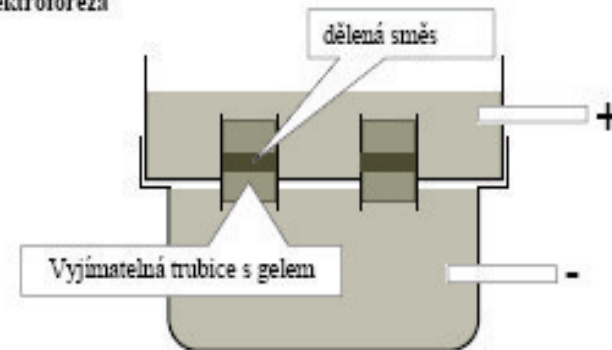
Izotachoforéza – pohyb zón stejnou rychlostí (různé elektrolyty v katodovém a anodovém prostoru).

METODIKA

Papírová nebo tenkovrstevná elektroforéza



Gelová elektroforéza



KOMBINOVANÉ ELEKTROFORETICKÉ METODY (zvýšení účinnosti separace, citlivosti detekce)

2D elektroforéza – kombinace izoelektrické fokuzace s gelovou chromatografií

Elektrochromatografie – dvourozměrná – jeden směr chromatografie, druhý směr elektroforéza,

Elektrodialýza,

Elektroultrafiltrace,

Elektrodesorpce – eluce složek afinitní chromatografie elektrickým polem.

Blotting

Zónová elektroforéza pro separaci plasmatických proteinů (acetátcelulóza)

Dělení proteinů závisí na:

- typu a počtu ionizovatelných skupin postranních řetězců (R) aminokyselin
- velikosti celkového náboje proteinu (kladného nebo záporného)

Je-li pH roztoku, ve kterém elektroforéza probíhá větší, než je pI , protein má celkový (?) náboj.

Je-li pH roztoku, ve kterém elektroforéza probíhá nižší, než pI , protein má celkový (?) náboj.

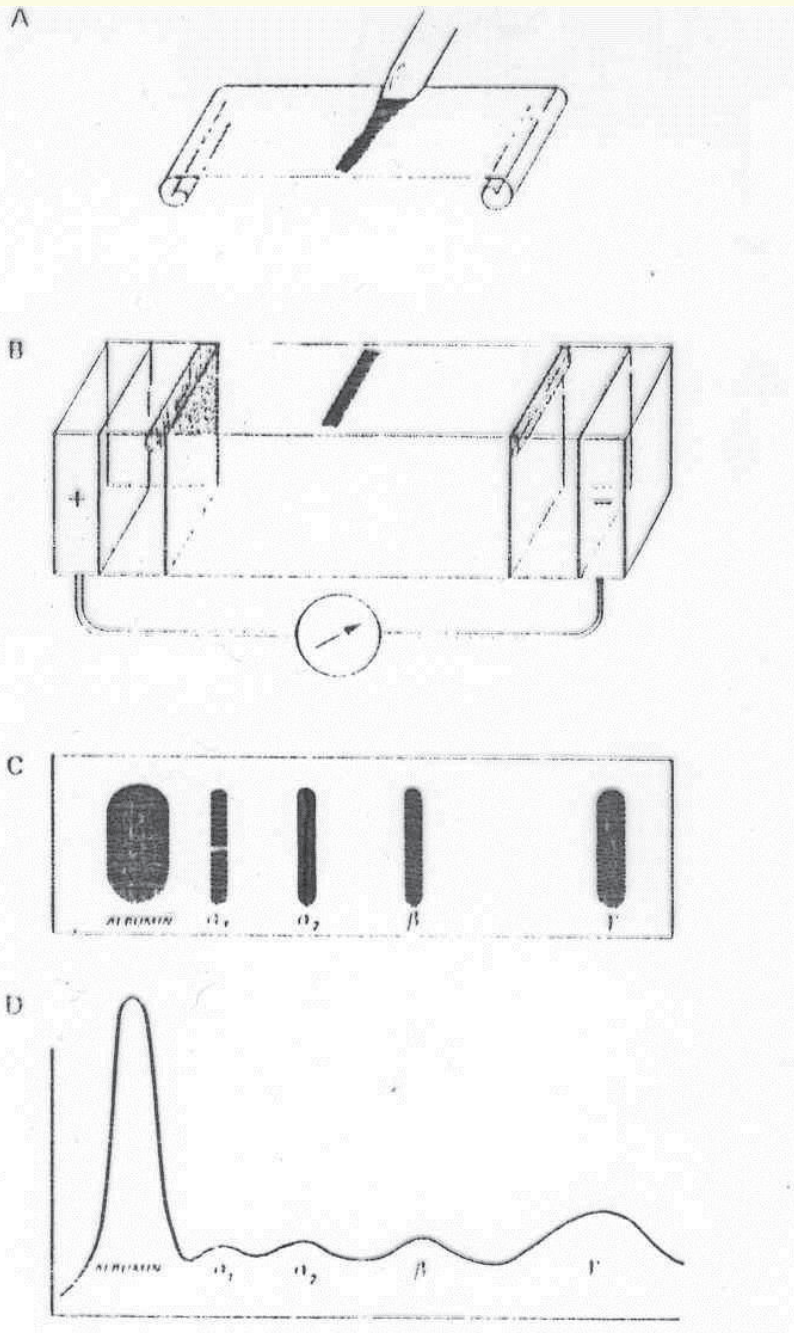
Odpovídá-li pH roztoku, ve kterém elektroforéza probíhá pI , protein se nepohybuje.

Proužek acetátcelulózy

Elektroforéza

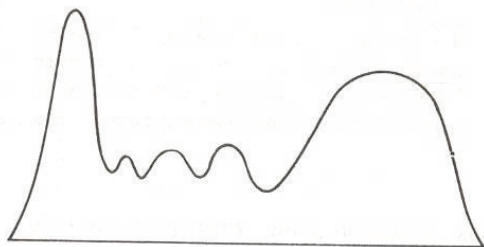
Rozdělené proteiny

Densitogram
(densita je přímo úměrná koncentraci)



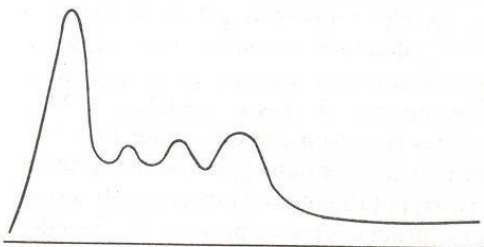
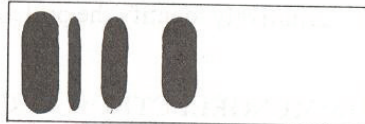
Použití zónové elektroforézy v klinické praxi

Polyclonal hypergammaglobulinemia



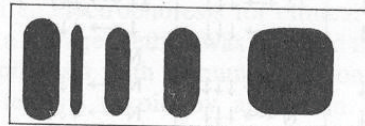
Hypergammaglobulinemie

Hypogammaglobulinemia

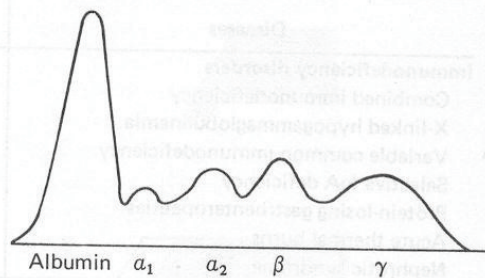


Hypogammaglobulinemie

Normal serum



Alb. a₁ a₂ β γ



Albumin a₁ a₂ β γ

Normální sérum

Gelová elektroforéza

Gely tvoří přechod mezi pevným a kapalným stavem, 99% je voda. Vytváří se trojrozměrná síť, póry slouží jako molekulové síto. Velikost pórů odpovídá velikosti proteinů a nukleových kyselin.

Agaróza - síť tvořená dlouhými cukernými polymery vázanými nekovalentními vodíkovými můstky a hydrofóbními vazbami.

Akrylamid – síť monomerů akrylamidu ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) spojených kovalentními příčnými vazbami pomocí N,N'-methylenbisaakrylamidu ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$), vytváří dlouhé řetězce.

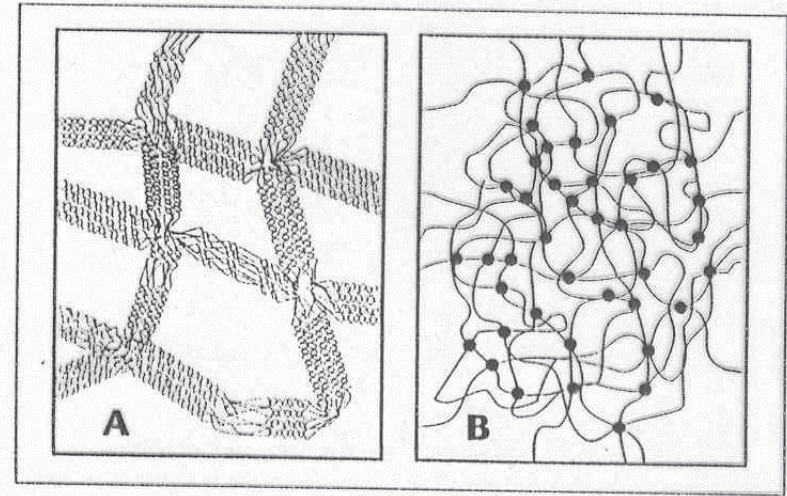
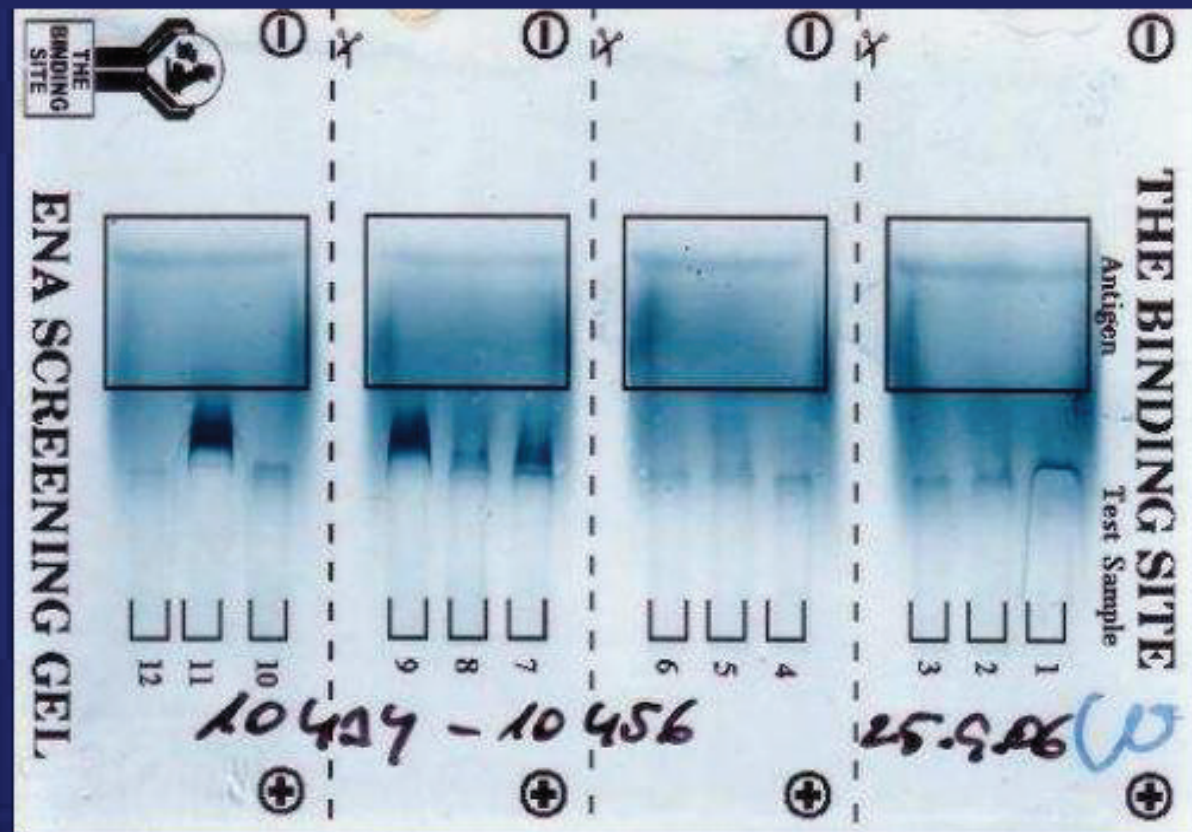


Figure 1.5. Agarose and acrylamide gels. (A) Agarose gels form by non-covalent hydrogen and hydrophobic bonds between long sugar polymers. (B) Acrylamide gels have covalent cross-links (•) between polymer strands.

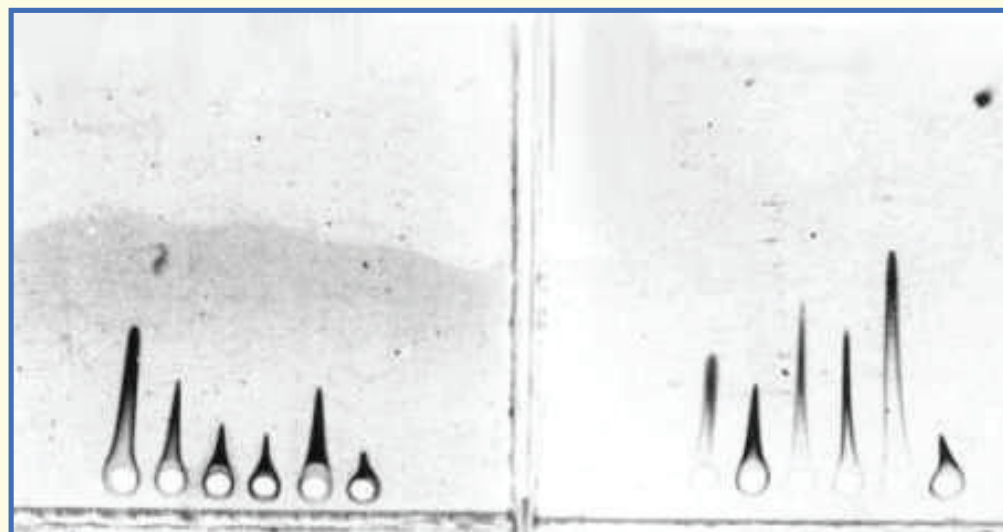
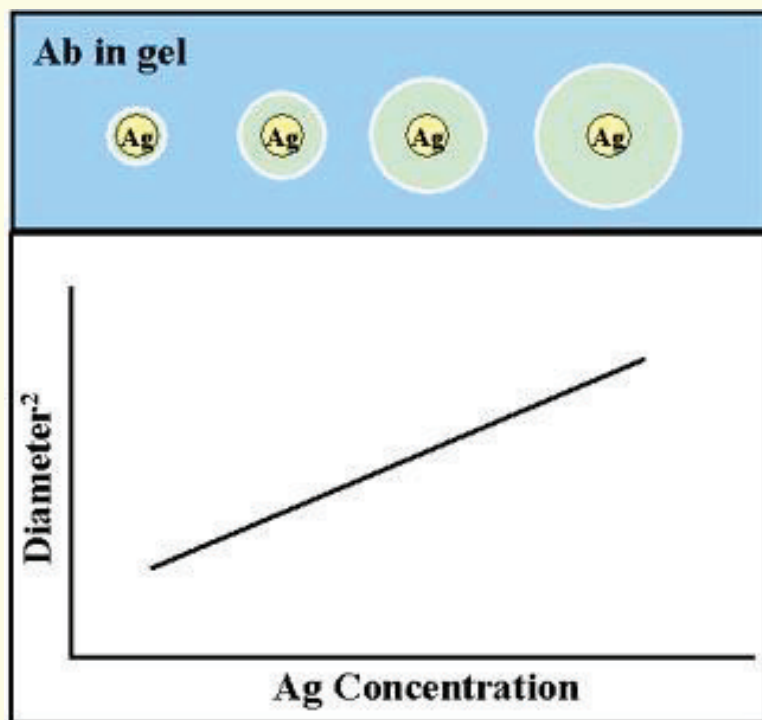
Protisměrná imunoelktroforéza

- ENA screen
- Migrace antigenu a protilátky při elektroforézě proti sobě



Raketková elektroforéza

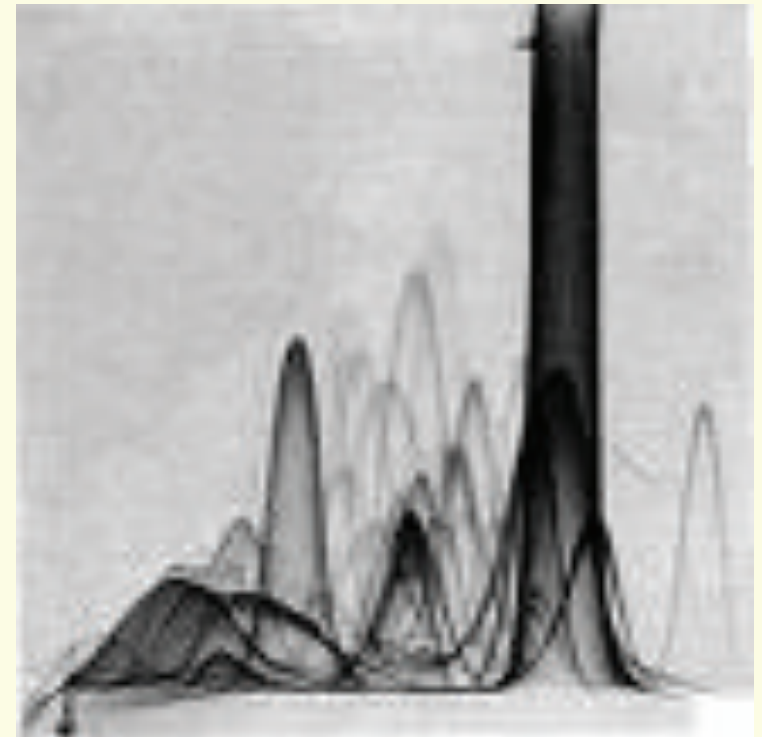
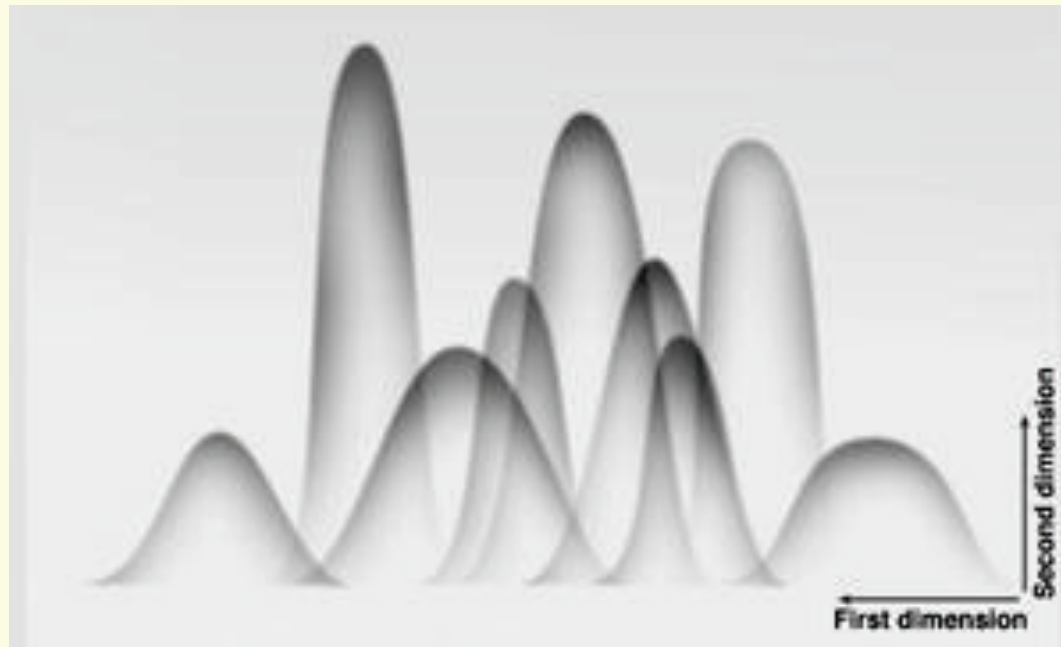
■ Mancini + elektroforetická separace



Dvourozměrná imunoэлектрофорéza

kombinací elektroforézy a raketkové imunoэлектрофорézy.

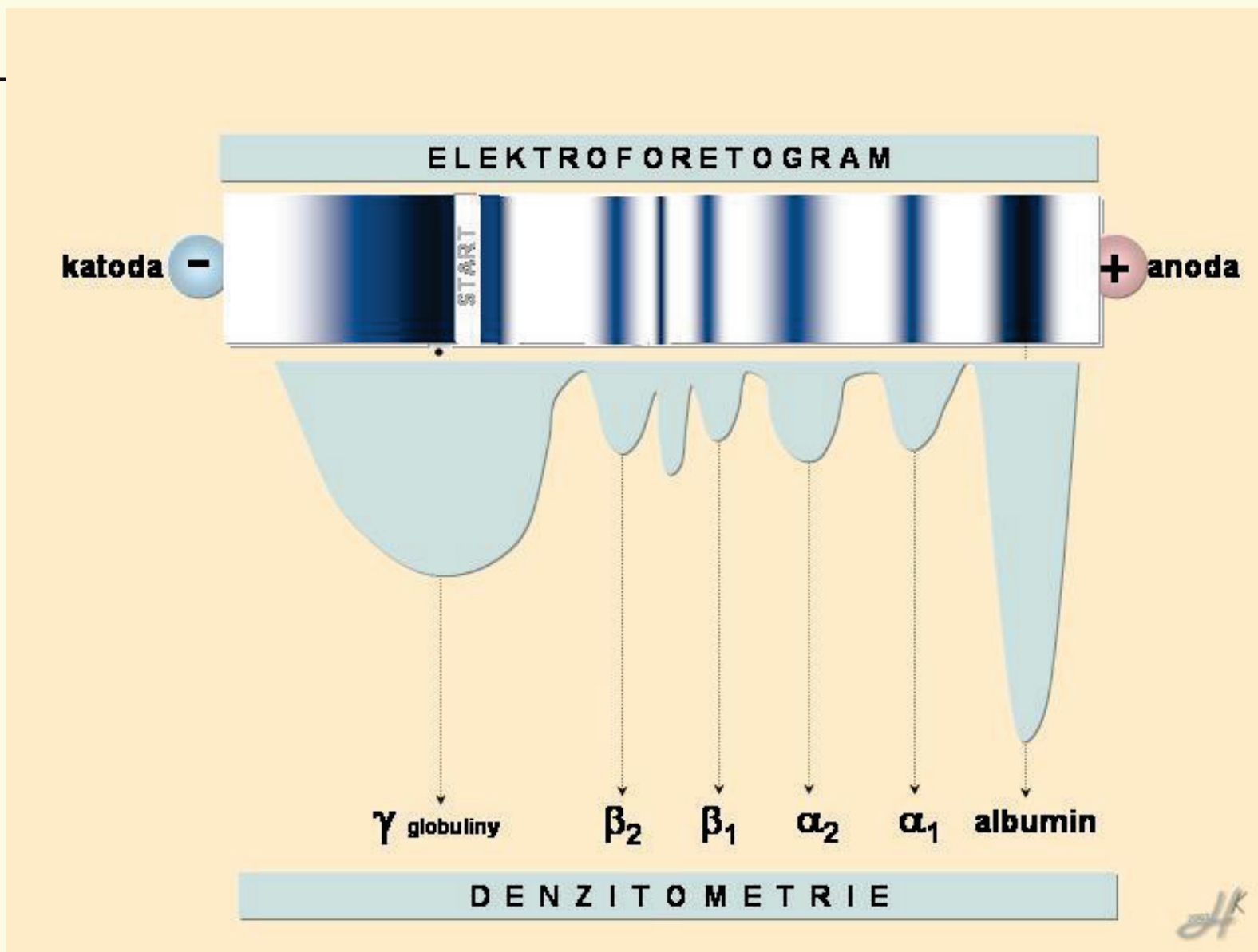
- a) Gelovou elektroforézou se rozdělí směs antigenů.
- b) Odříznutý proužek gelové vrstvy s rozdělenými antigeny se přenesse na novou desku, plocha se doplní gelem s protilátkou, vloží se napětí



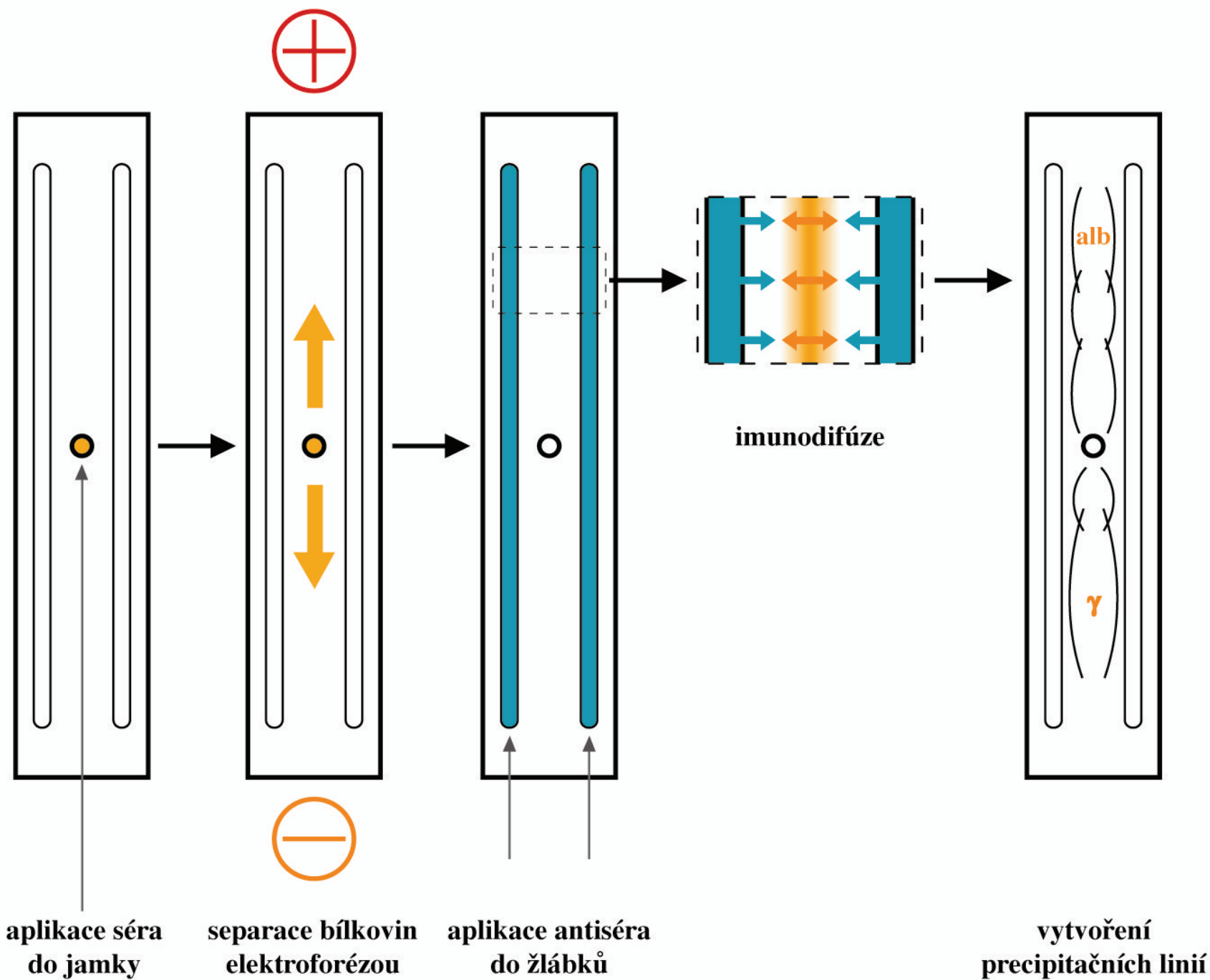
IMUNOELEKTROFORÉZA

- proteiny mají el. náboj
- podle náboje se rozdělí v elektrickém poli
(*albumin, α , β , γ -frakce*)
- orientační informace o změnách
v kvantitativním zastoupení jednotlivých frakcí
- možnost denzitometrické kvantifikace

ELEKTROFORÉZA

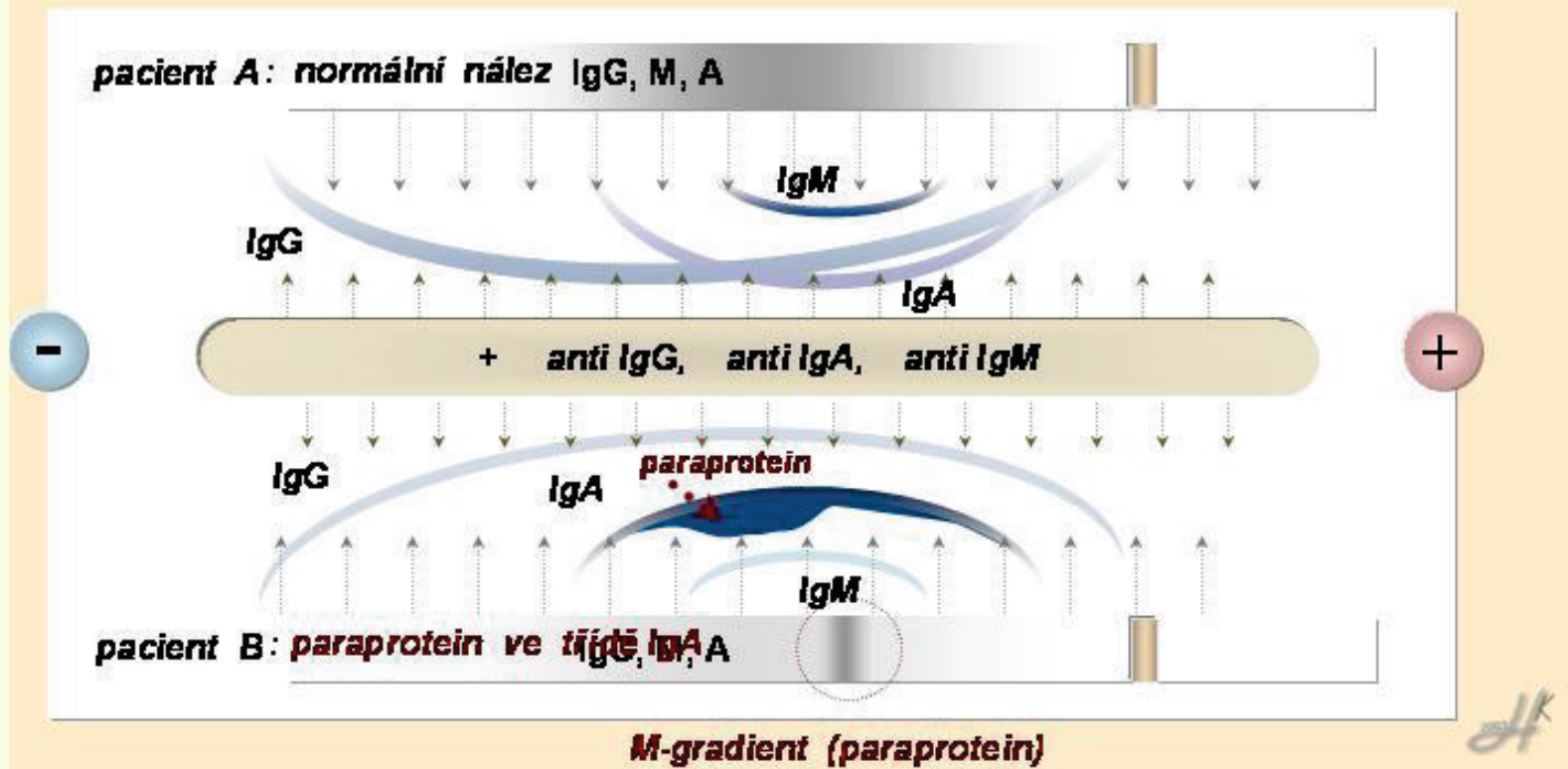


Imunoelektroforéza



I M U N O E L E K T R O F O R É Z A

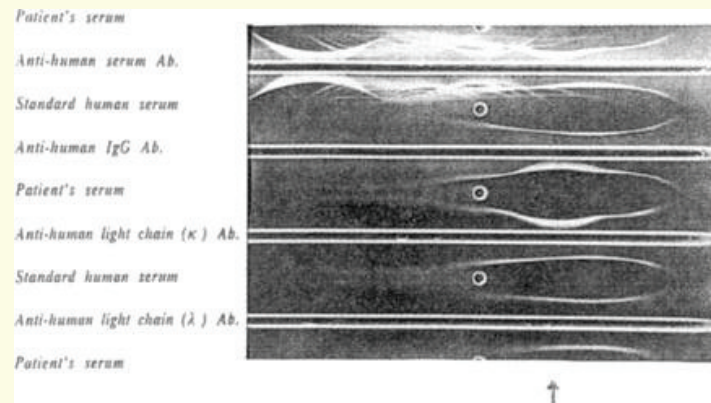
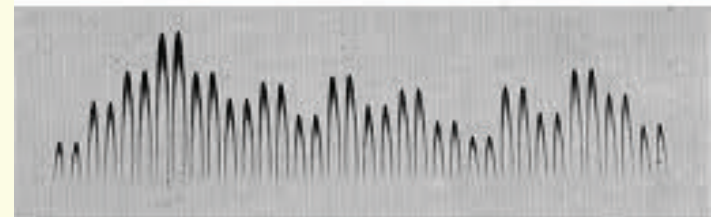
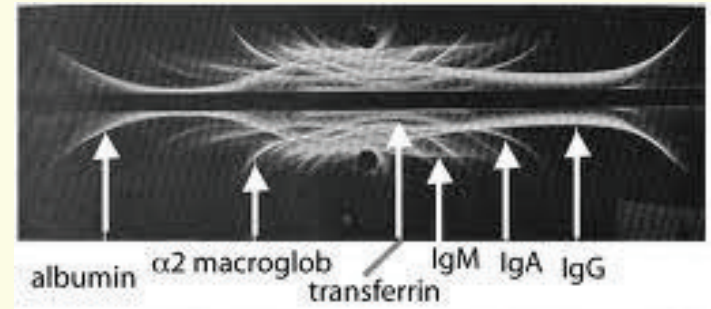
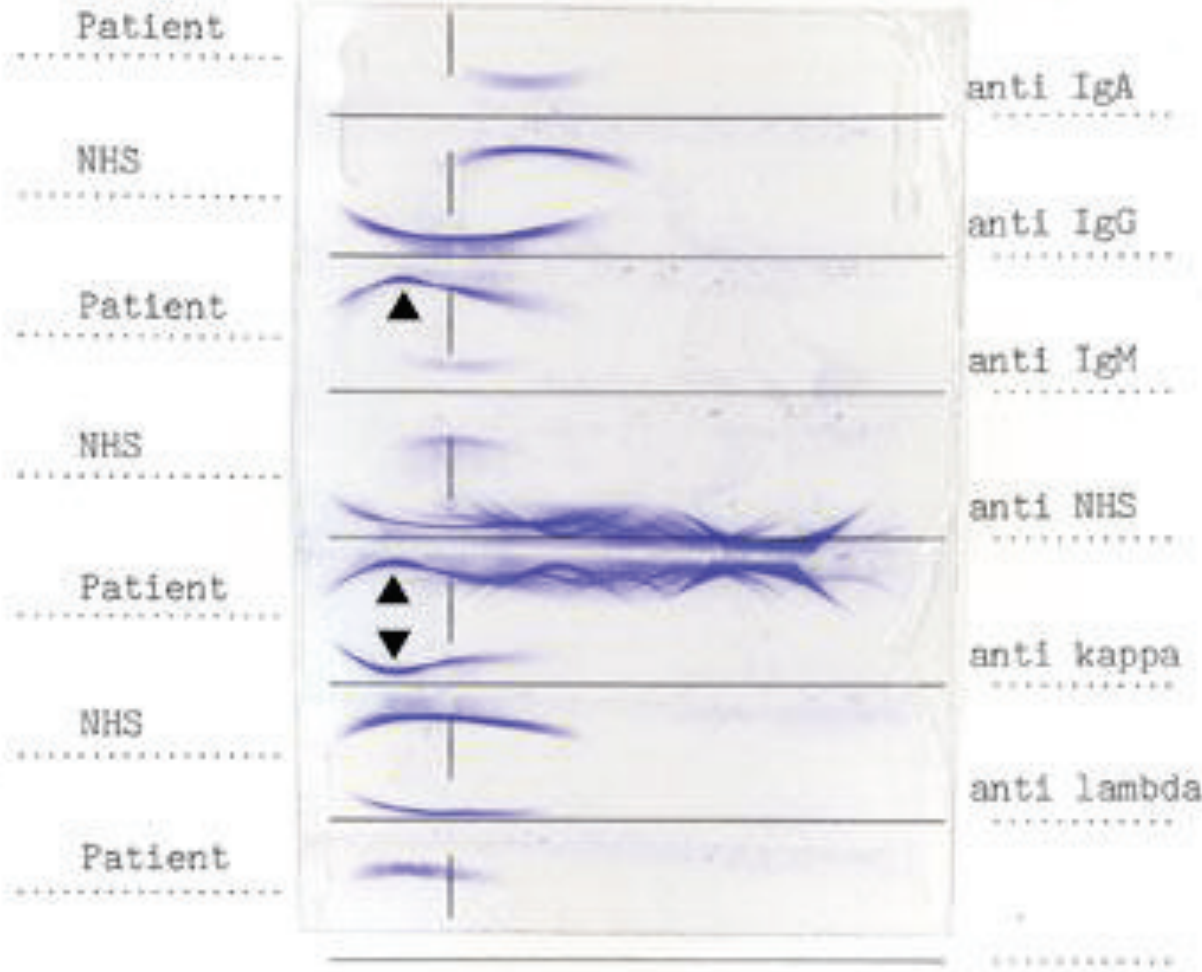
1. elektroforetické rozdělení sérových Ig
2. difuze a precipitace
3. obarvení precipitačních linií a hodnocení



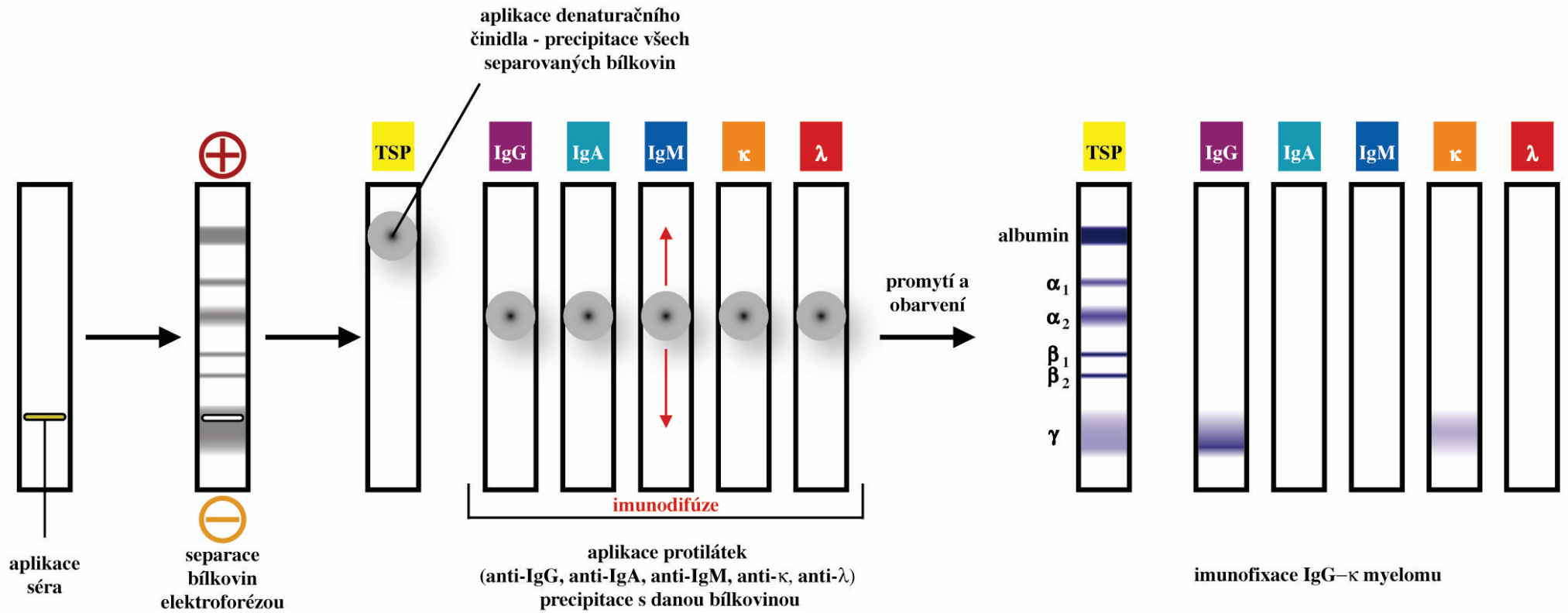
HUNTER IMMUNOLOGY UNIT

IEP INDEX 470

DATE 26.5.94

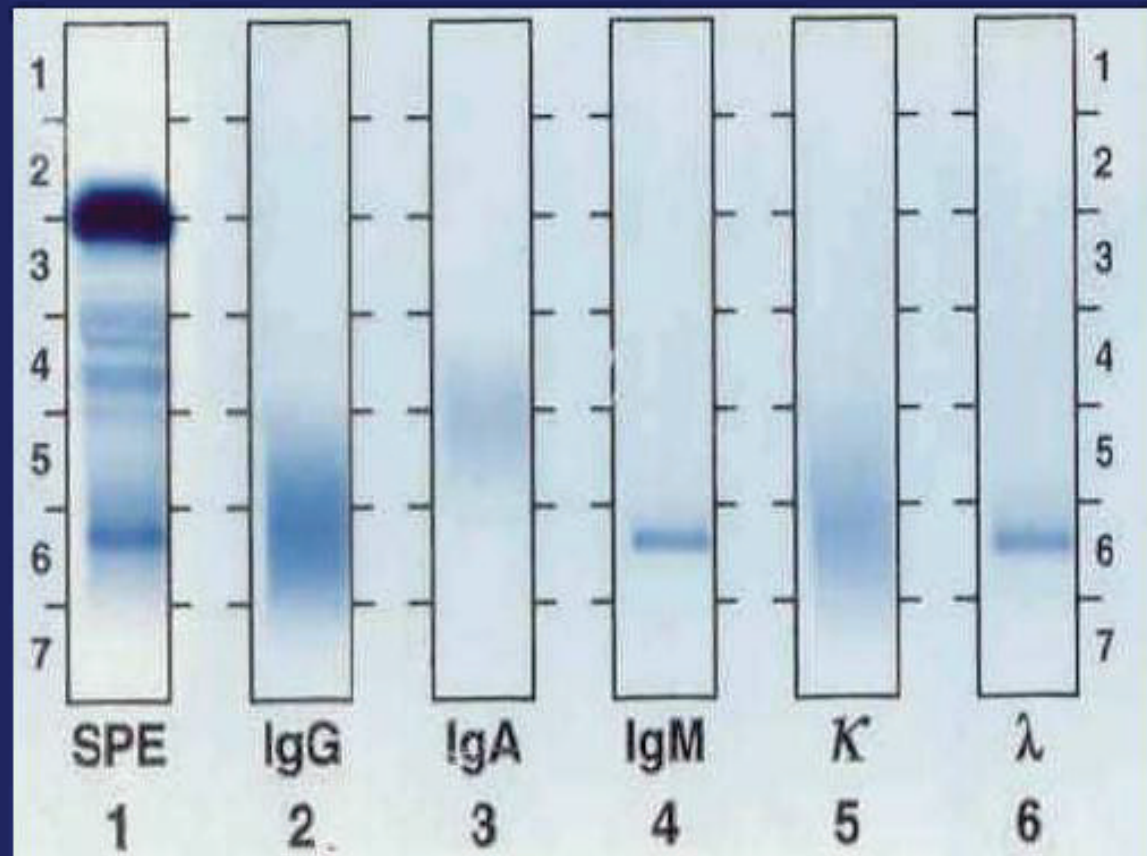


IMUNOFIXACE



Imunofixační elektroforéza

- Gamapatie
- Elektroforetická separace proteinů na gelu
- Immunoprecipitace s monospecifickými antiséry

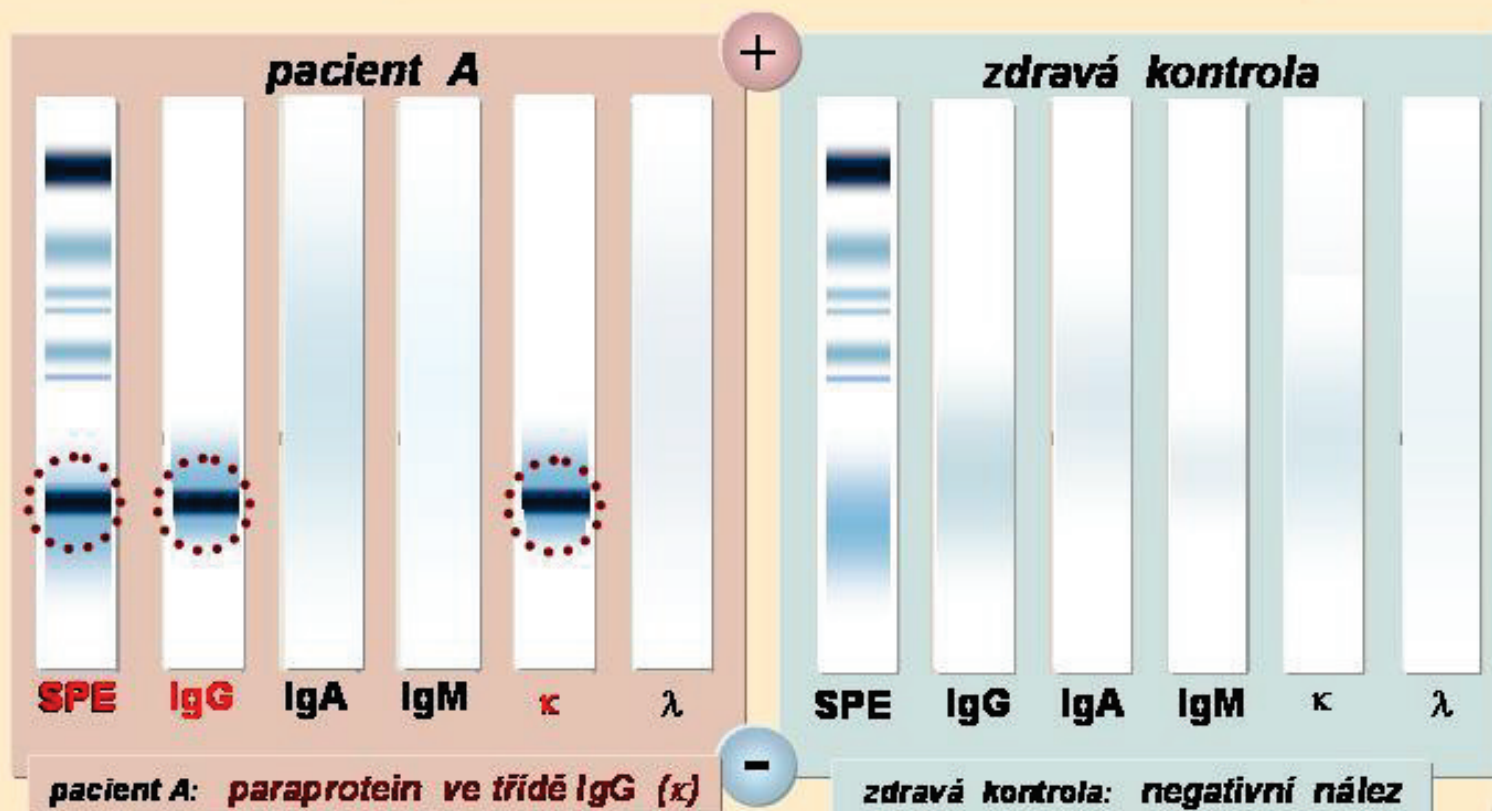


IMUNOFIXACE

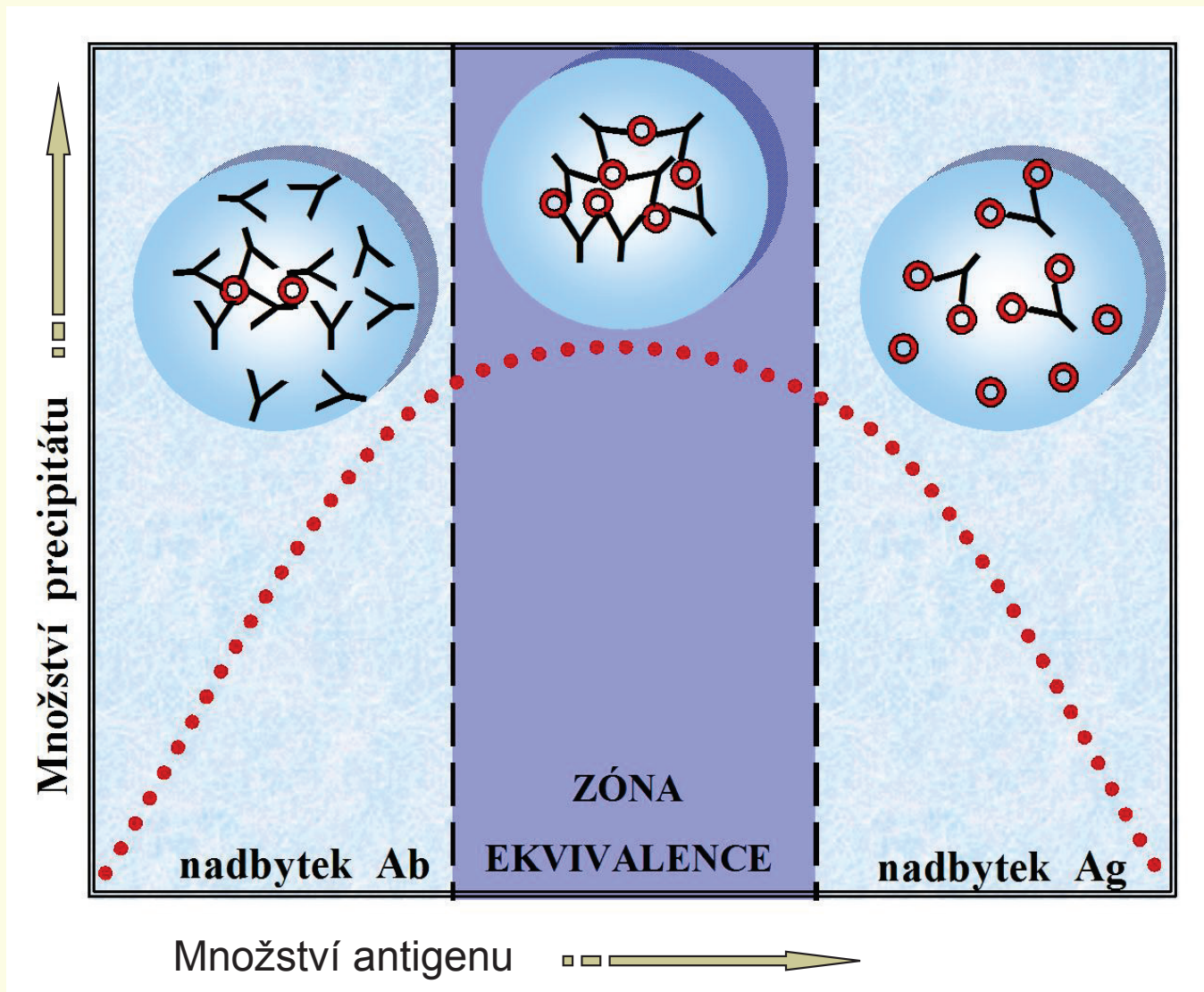
1. elektroforetické rozdělení sérových Ig

2. imunofixace - reakce sérových Ig s anti Ig

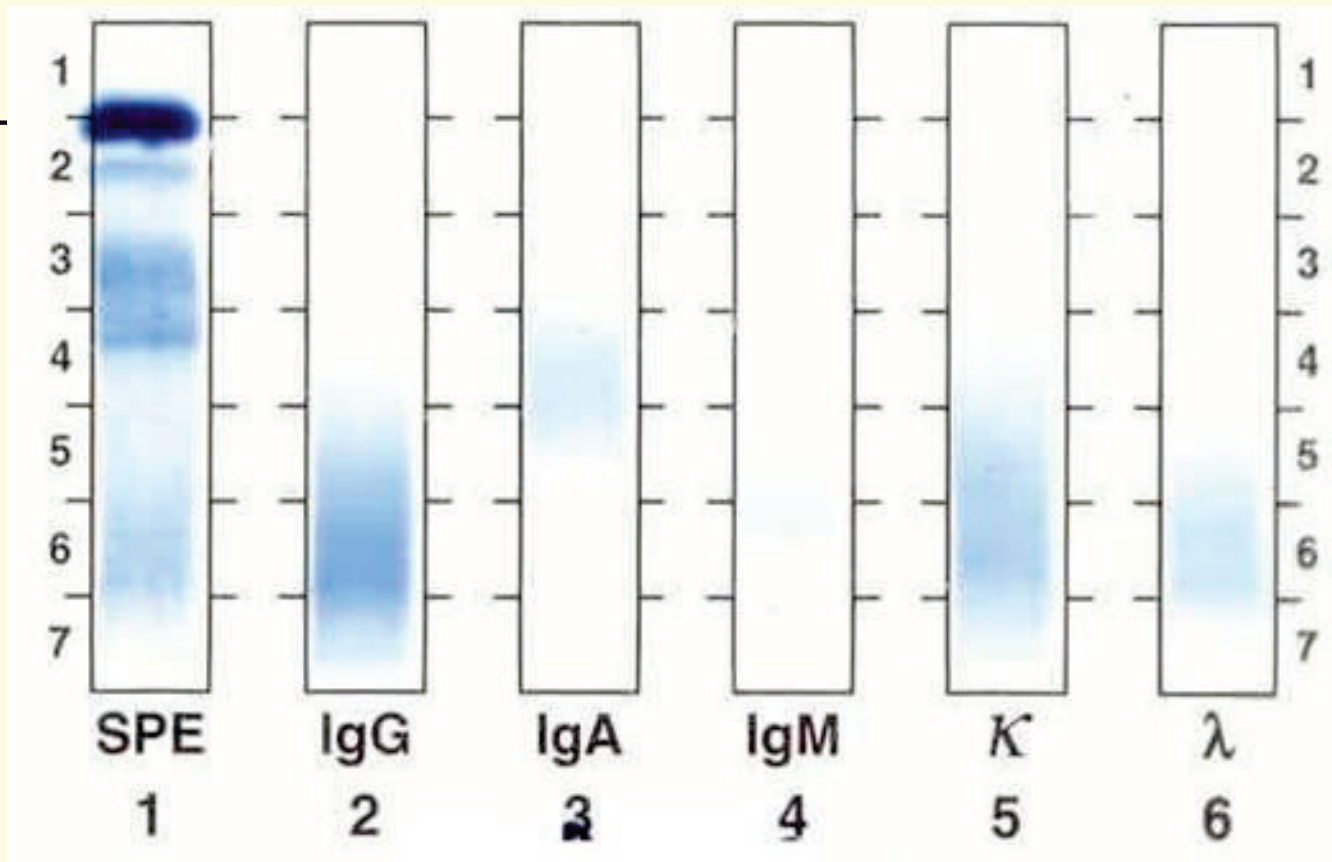
3. promytí, barvení



PRECIPITAČNÍ KŘIVKA

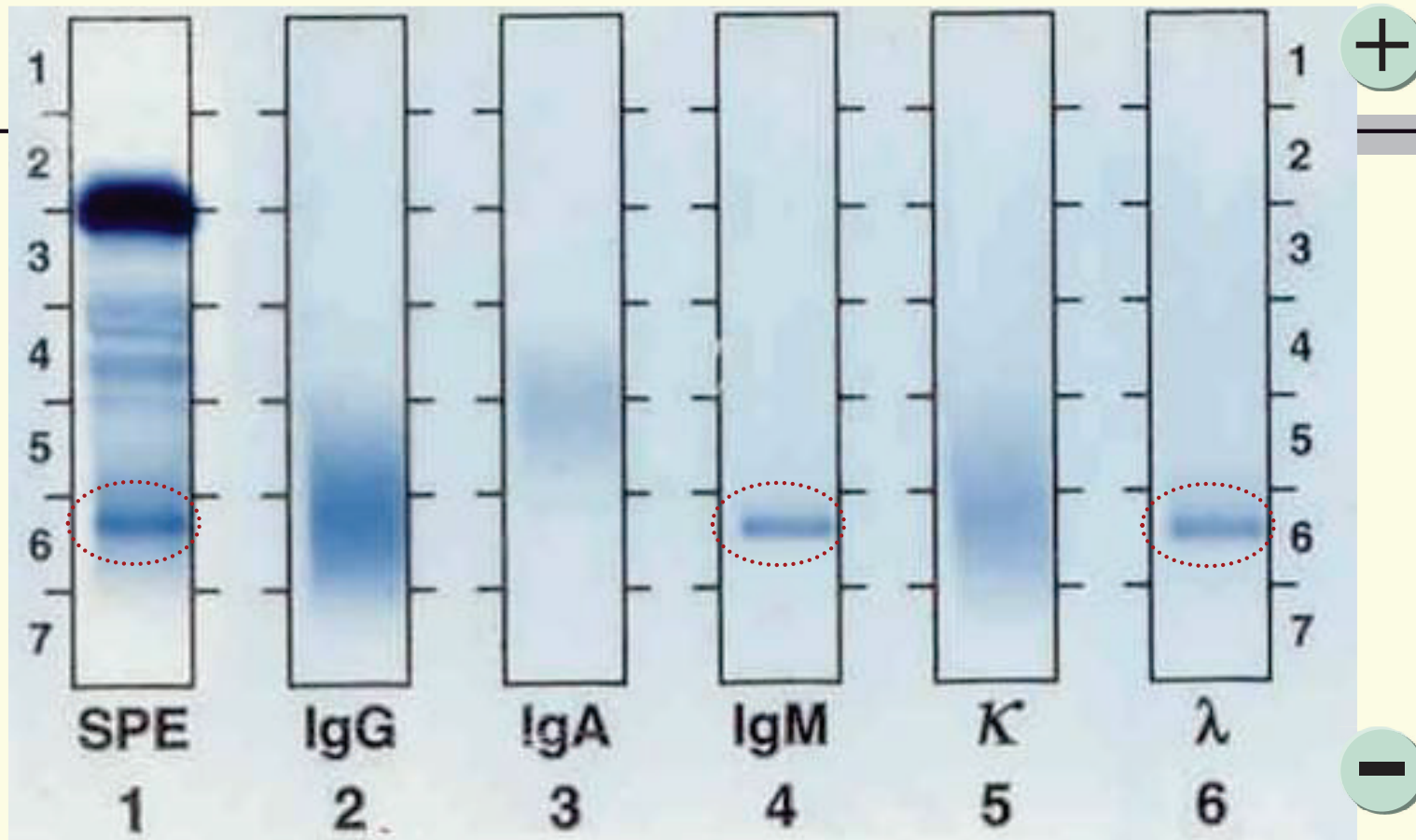


IMUNOFIXACE VZORKU SÉRA ZDRAVÉ OSOBY



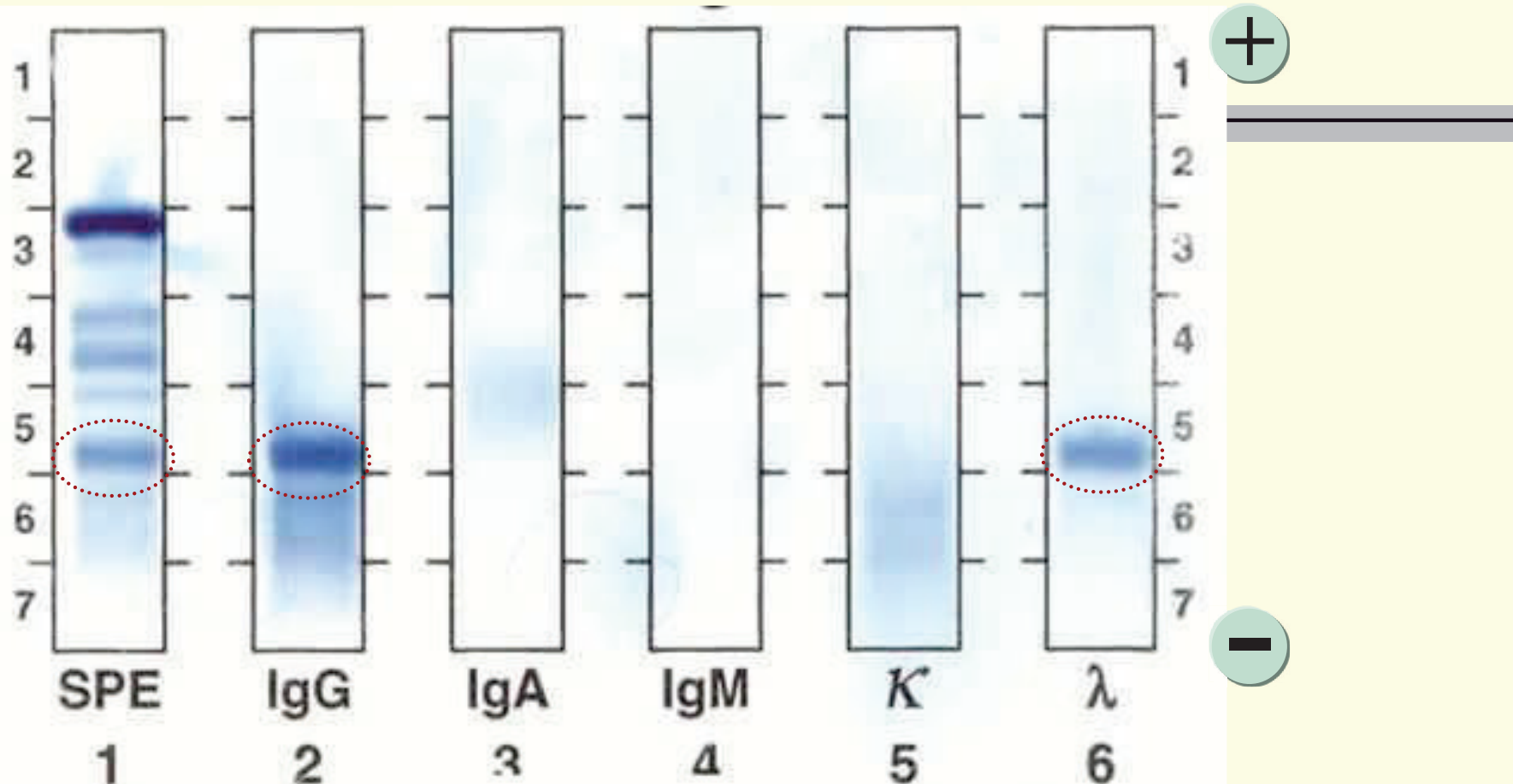
LEGENDA: sloupec č. 1: elektroforéza séra
další sloupce: imunochemický průkaz jednotlivých
těžkých a lehkých řetězců
imunoglobulinů,
je zřetelná polyklonální produkce

IMUNOFIXACE VZORKU SÉRA NEMOCNÉHO S PARAPROTEINEM IgM λ



LEGENDA: sloupec č. 1: monoklonální pruh na pozici 6
sloupec č. 4 a 6: imunochemický důkaz
přítomnosti paraproteinu IgM λ

IMUNOFIXACE VZORKU SÉRA NEMOCNÉHO S PARAPROTEINEM IgG λ

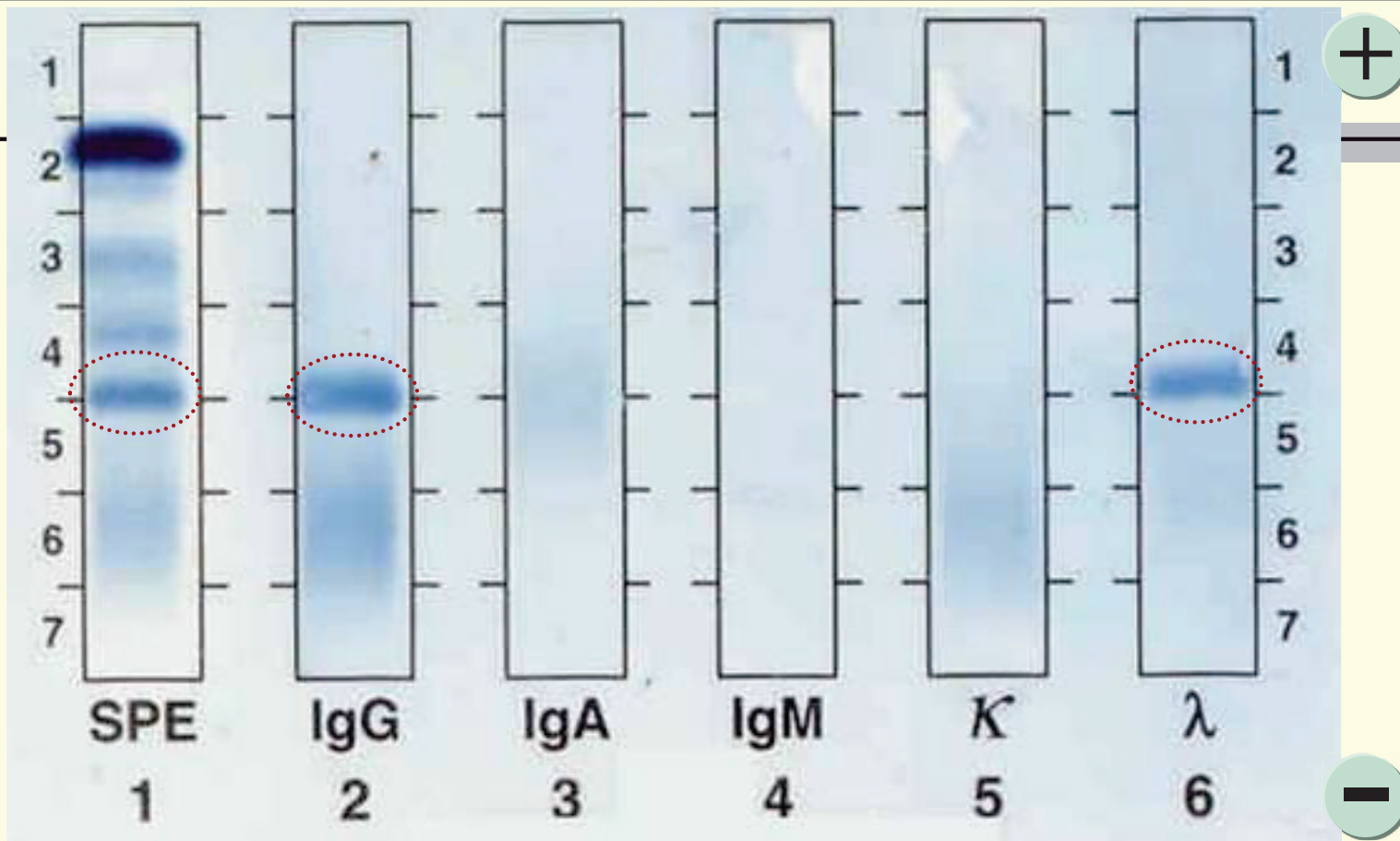


LEGENDA: sloupec č. 1: monoklonální pruh na pozici 6

sloupec č. 2 a 6: imunochemický důkaz
přítomnosti paraproteinu IgG λ

INTERPRETACE: susp. mnohočetný myelom IgG λ

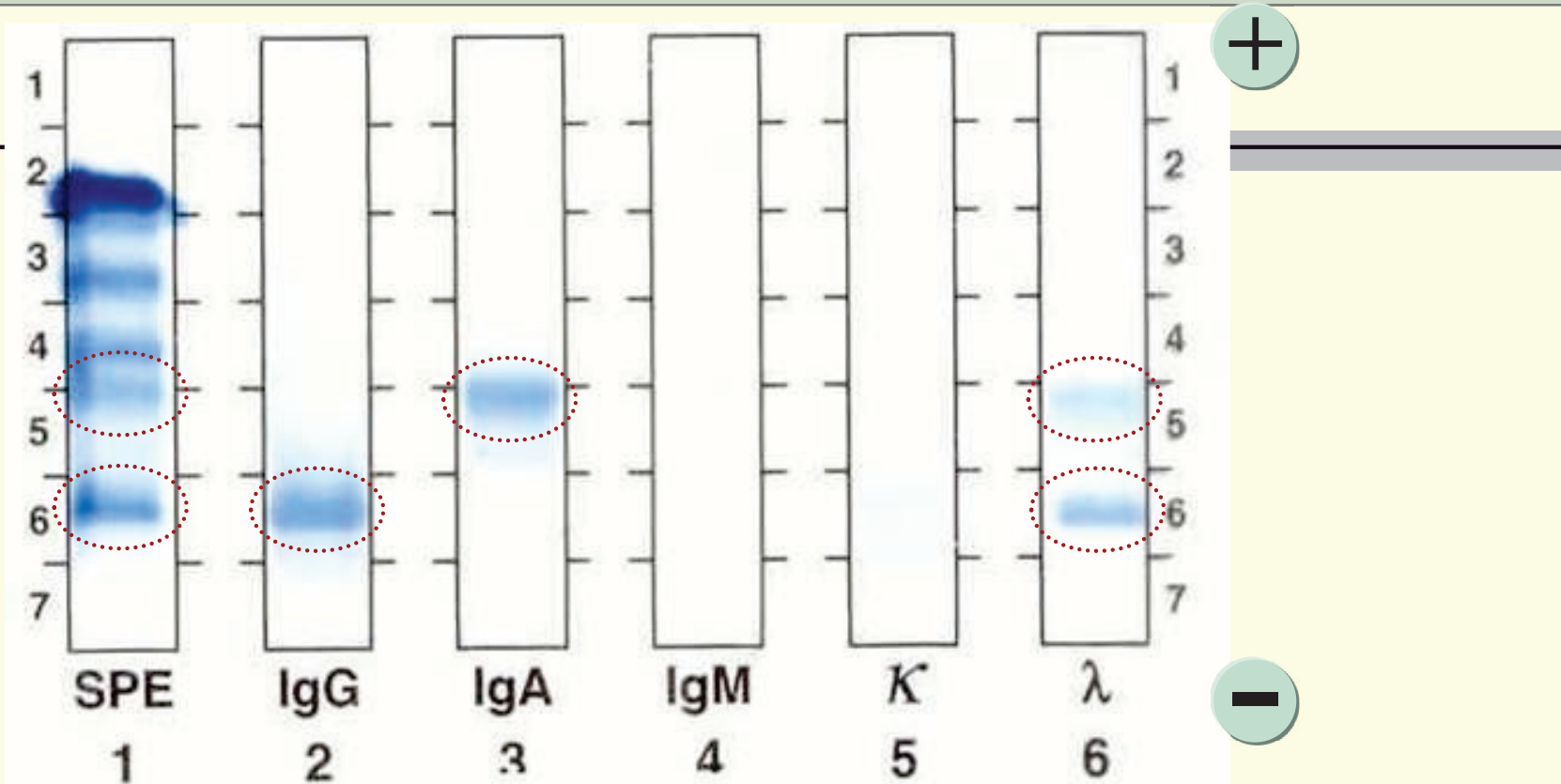
IMUNOFIXACE VZORKU SÉRA NEMOCNÉHO S PARAPROTEINEM IgG λ



LEGENDA: sloupec č. 1: monoklonální pruh na pozici 4
sloupec č. 2 a 6: imunochemický důkaz
přítomnosti paraproteinu IgG λ

INTERPRETACE: paraprotein IgG λ

IMUNOFIXACE VZORKU SÉRA NEMOCNÉHO S PARAPROTEINY IgG λ a IgA λ



LEGENDA: sloupec č. 1: monoklonální pruhy na pozici 4 a 6
sloupec č. 2 a 6: imunochemický důkaz přítomnosti paraproteinu IgG λ
sloupec č. 3 a 6: imunochemický důkaz přítomnosti paraproteinu IgA λ

INTERPRETACE: dva paraproteiny IgG λ , IgA λ

KOMENTÁŘ: přítomnost dvou klonů myelomových buněk

Dva hlavní typy gelové elektroforézy

Nativní gelová (nedenaturační) elektroforéza

- Probíhá bez denaturačních činidel.
- Proteiny migrují gelem podle svého celkového náboje velikosti a tvaru a podle velikosti pórů v gelu.

SDS gelová elektroforéza

- Proteiny jsou denaturovány dodecylsíránem sodným (SDS) a β -merkaptoetanolem (zruší disulfidické vazby).
- Pohyblivost závisí na molekulové hmotnosti polypeptidových řetězců (M_r)
- Vhodná pro analýzu makromolekulárních komplexů.

SDS – denaturační činidlo a detergent, proteiny obaluje a denaturuje proteiny dostanou tyčinkovitý tvar a při pH 7 – 10 mají všechny stejný náboj (-) a migrují k anodě

SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

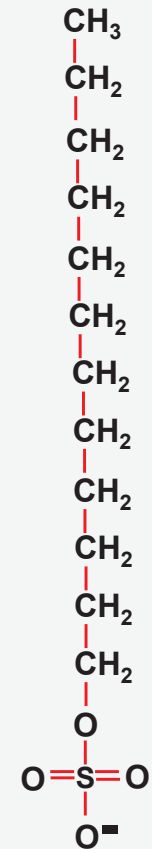
- **SDS** (Sodium Dodecyl Sulfate) aniontový detergent

- solubilizuje a denaturuje proteiny

- dodává proteinům negativní náboj

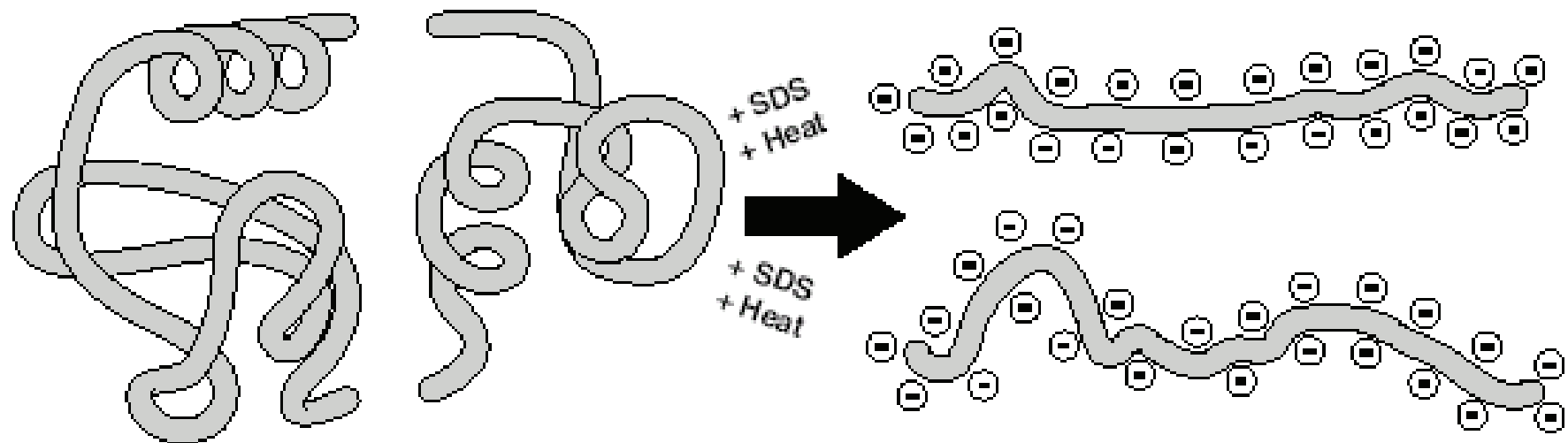
Většina proteinů váže SDS ve stejném poměru, asi 1,4 g SDS/g proteinu

- **Zvýšená teplota** denaturuje proteiny



SDS

Denaturované proteiny mají vláknitý tvar a stejný záporný náboj daný vazbou SDS – migrace tedy závisí pouze na jejich molekulové hmotnosti



Proč používat akrylamidový gel k separaci proteinů?

1. Akrylamidový gel: pevná a inertní matrix
2. Ideální pro separaci proteinů
3. Menší velikost pórů než u agarosy
4. Proteiny jsou menší než intaktní chromoz. DNA

Gel je vytvořen polymerací akrylamidu a N',N'-methylenbisakrylamidu zahájenou volnými radikály vzniklými při rozkladu persíranu amonného.

Molekulová hmotnost proteinů

velikost měřena v daltonech (Da) či kilodaltonech (kDa)

Dalton = jednotka atomové hmotnosti

= přibližně se rovná hmotnosti atomu H

($1,66 \times 10^{-24}$ g)

= definován také jako 1/16 hmotnosti atomu O

Průměrná aminokyselina = 110 Da

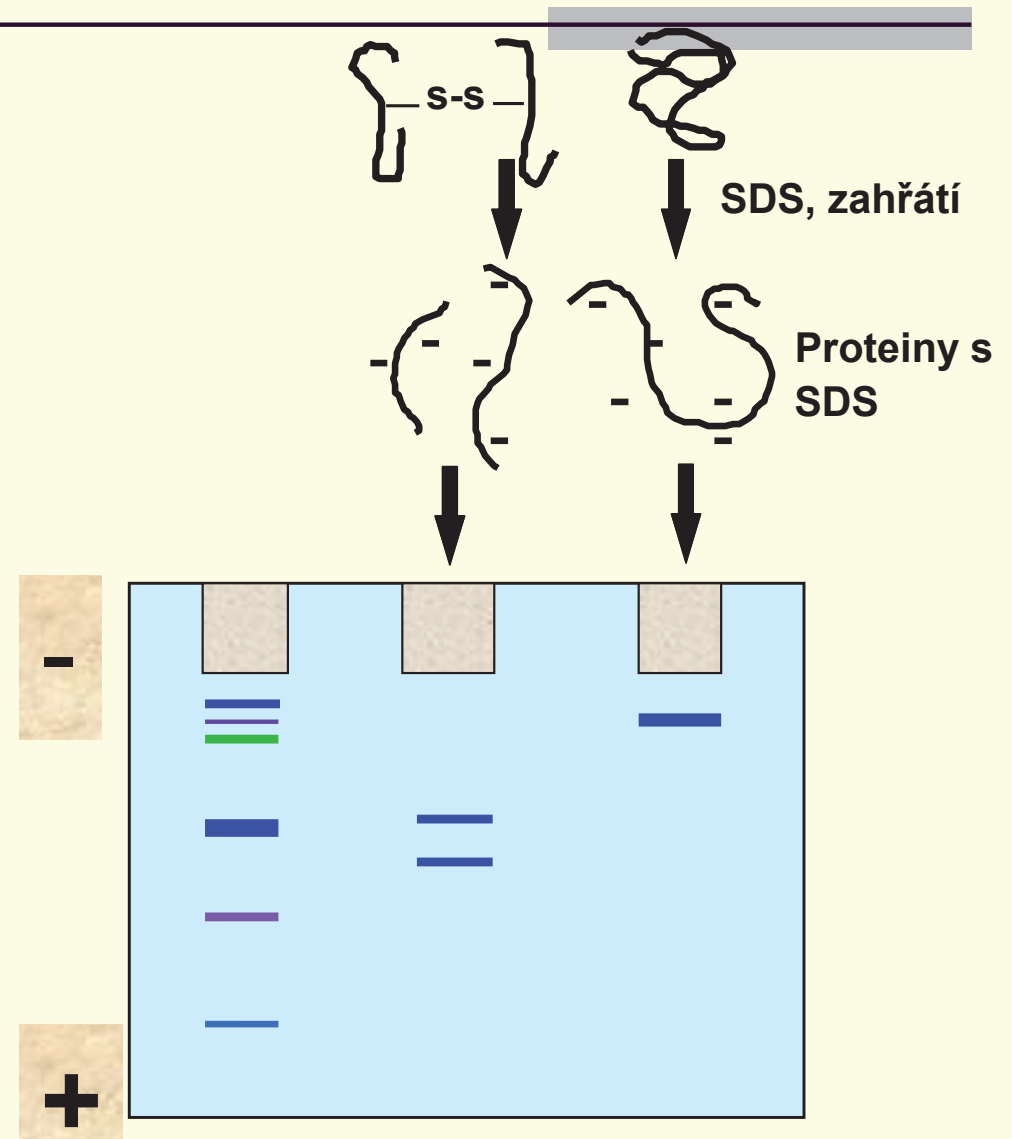
Průměrný nukleotidový pár = 649 Da

Jak funguje SDS-PAGE?

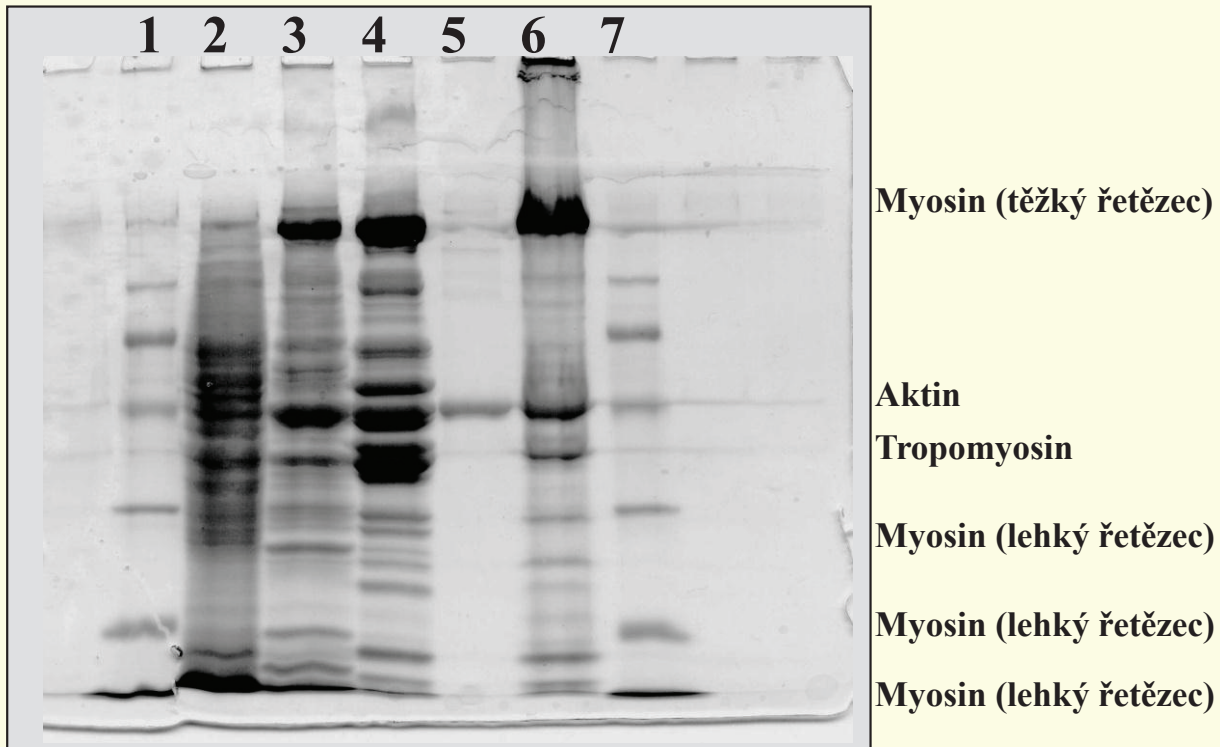
- Negativně nabité proteiny se pohybují ke kladné elektrodě

- Menší proteiny se pohybují rychleji

- Proteiny se rozdělují podle velikosti (molekulové hmotnosti)



Separace tkáňových proteinů v PAAG



1. Molekulový marker

2. Játra

3. Srdce

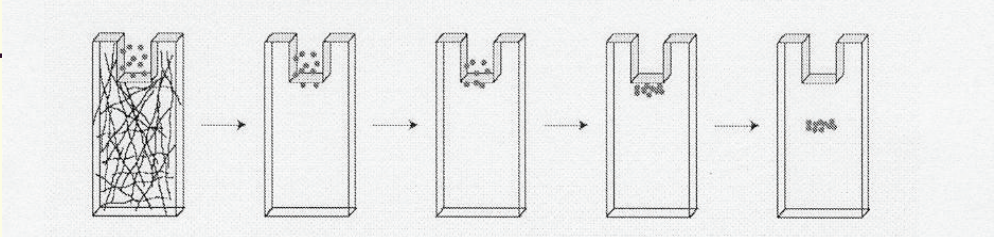
4. Sval

5. Aktin

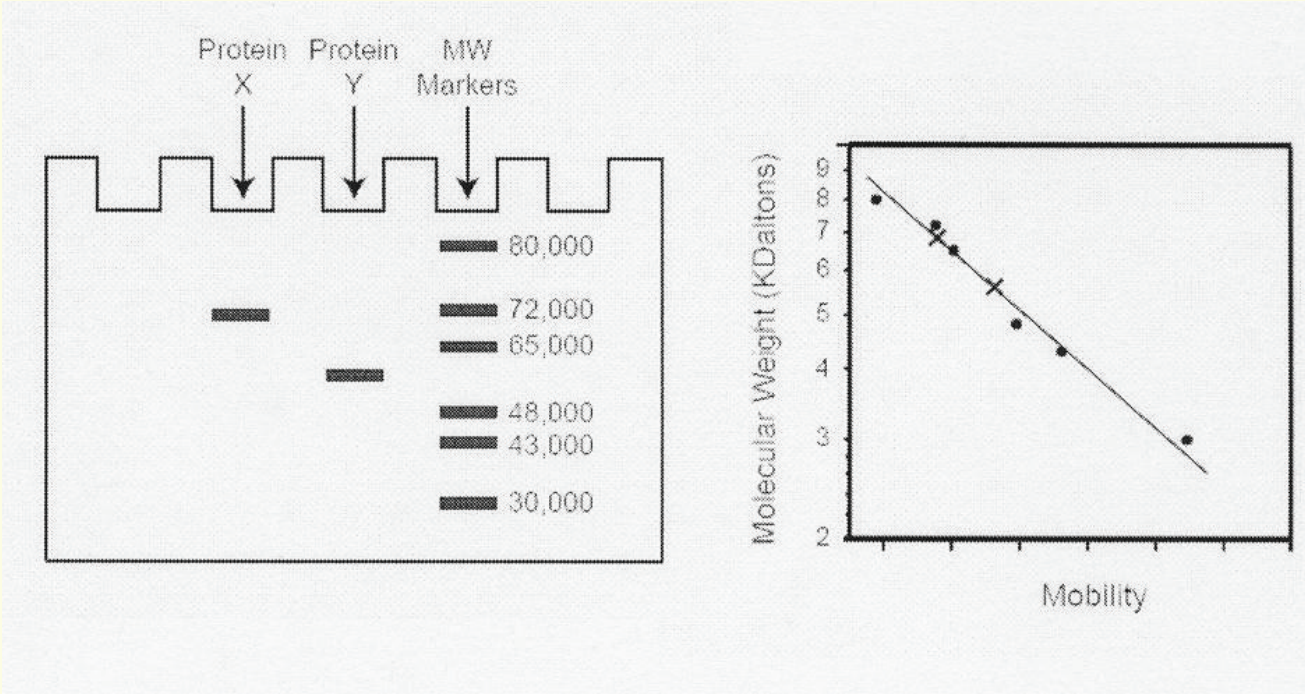
6. Myosin

7. Marker

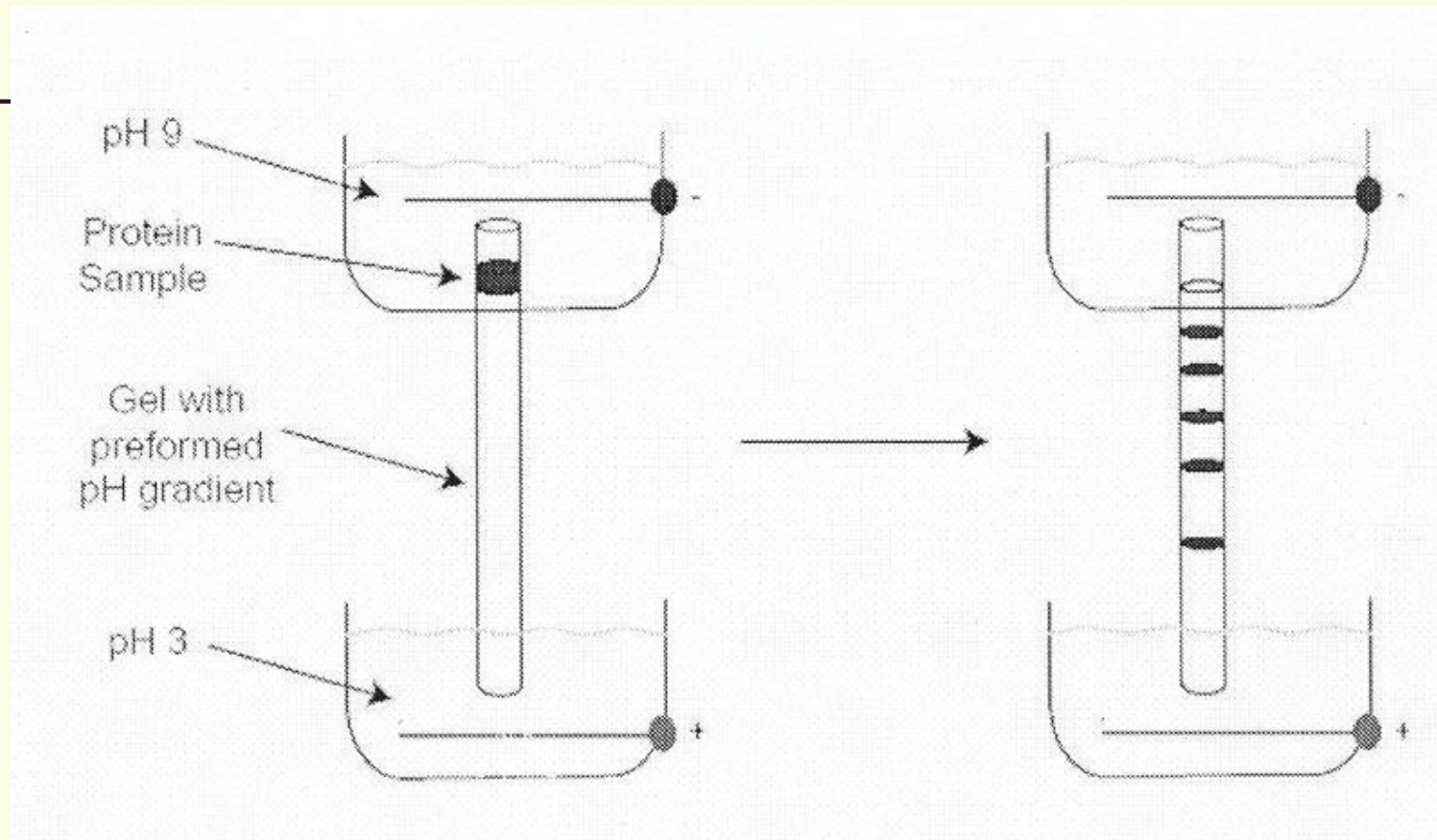
Nanesení vzorku



Určování molekulové hmotnosti proteinů



Izoelektrická fokusace



**Proteiny se dělí v gelu s pH gradientem.
Migrují do bodu, kde nemají žádný povrchový náboje
(pH odpovídá danému izoelektrickému bodu pI)**

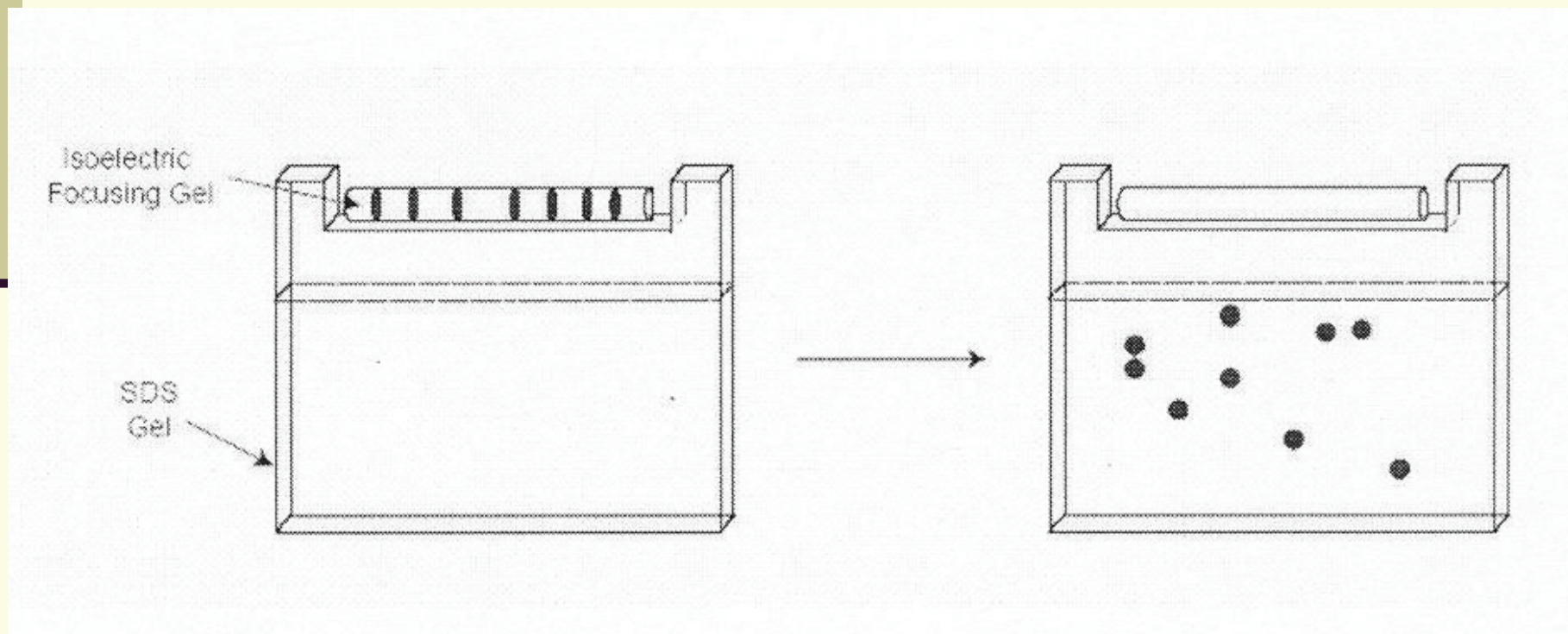
Dvozměrná (2D) elektroforéza proteinů

Umožňuje rozlišení až 10 000 proteinů.

Proteiny se nejprve rozdělí podle jejich pI v gradientu pH.

Po separaci v prvním rozměru je provedena elektroforéza v gelu.

Proteiny migrují ve druhém rozměru v závislosti na své velikosti.



Izoelektrická fokusace

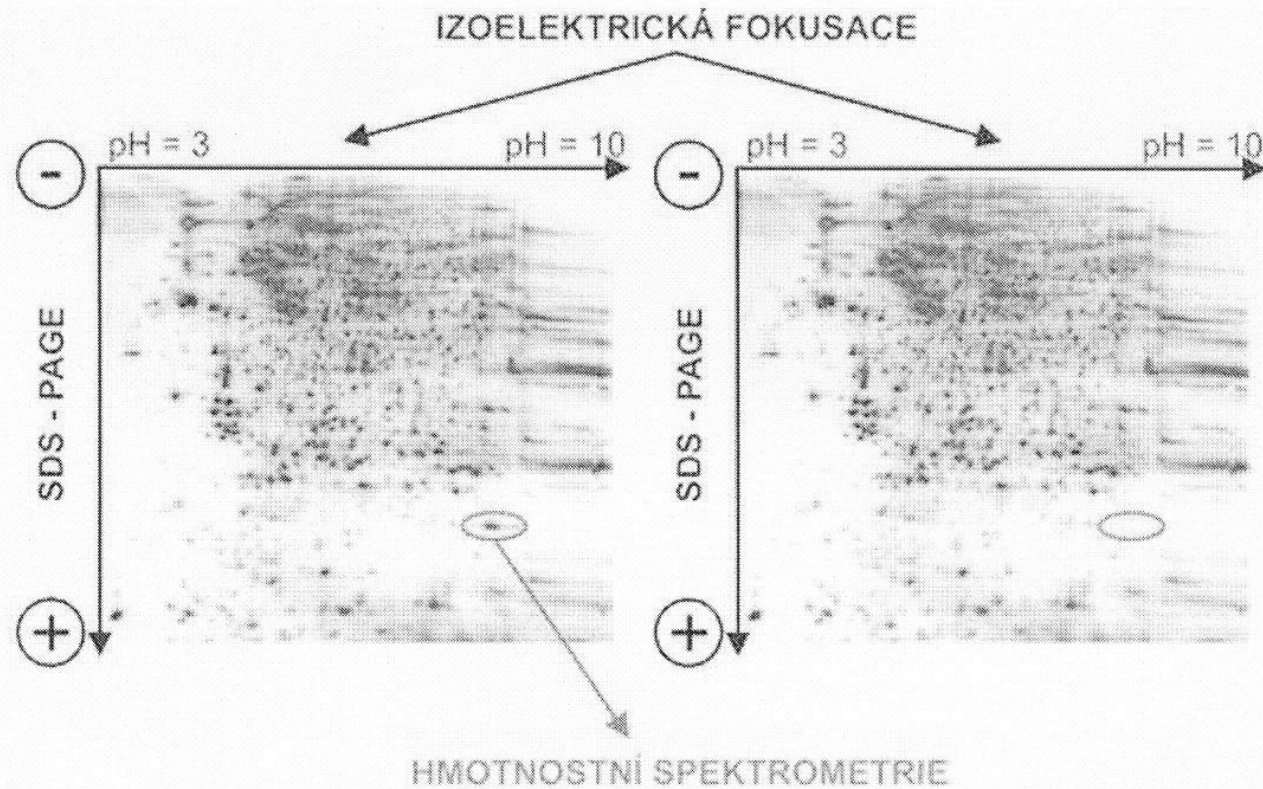


Při nízkém pH jsou proteiny nabitě kladně a putují ke katodě

Při určité hodnotě pH proteiny ztrací svůj náboj (= isoelektrický bod proteinu) a již se nepohybují

Při vysokém pH jsou proteiny nabitě záporně a putují k anodě





Obrázek 2. Dvojměrná (2D) elektroforéza. Po izoelektrické fokusaci v pH gradientu v elektrickém poli následuje elektroforetická separace v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE...sodium dodecylsulphate - polyacrylamide gele electrophoresis). Vizualizace proteinů je možná po obarvení (na obrázku použita Coomassie blue).

Výsledné „mapy“ proteinů se porovnávají s kontrolními vzorky (pacienti s konkrétním onemocněním a zdraví pacienti).

Po „vyříznutí“ oblasti vykazující odlišnost je provedena analýza hmotnostní spektrometrií.

Western blot (imunoblot)

Technika na bázi elektroforézy a enzymové reakce (ELISA)

1. fáze: klasická SDS-PAGE

Antigen nanesen do polyakrylamidového gelu a separován v elektrickém poli dle molekulární hmotnosti proteinů.

2. fáze: blotování

Gel z elektroforézy se následně přiloží na nitrocelulóзовou membránu. Na blotovacím zařízení dojde působením elektrického proudu k **přeblotování** proteinů z gelu do membrány.

Na membráně vznikne jakoby „kopie“ proteinů separovaných na gelu.

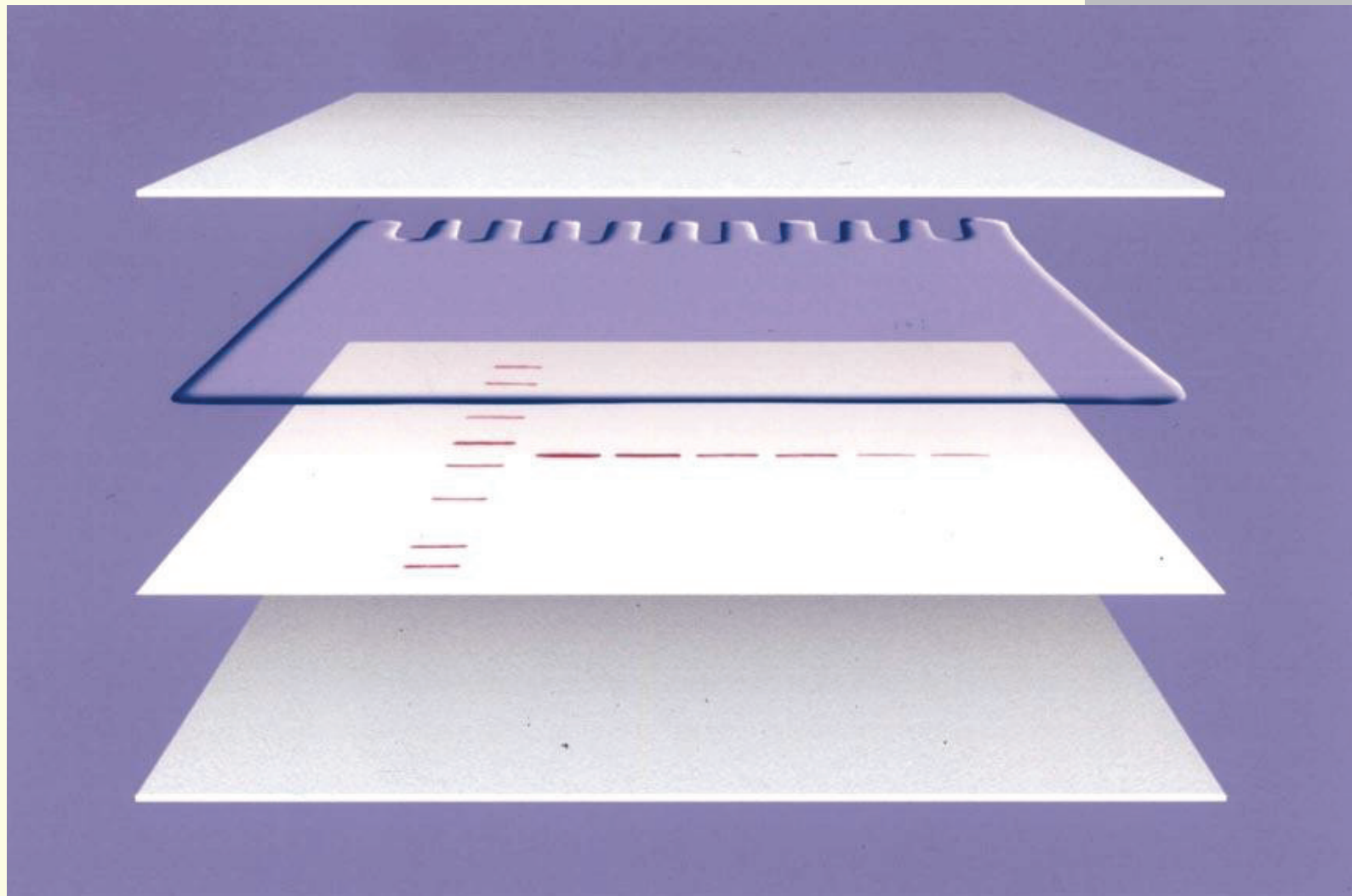
3. fáze: vyvíjení (stejně jako ELISA)

Membrána nechá inkubovat s testovaným sérem (protilátkami).

Po promytí membrány se přidává konjugát (neboli protilátky proti druhově specifickým protilátkám značené enzymem).

Po inkubaci s konjugátem a promytí se přidá substrát „bandy“, na něž se navázaly specifické protilátky se obarví (viz obrázek **SDS-PAGE**).

Sestava při blotování



Imunochemická detekce antigenu na membráně po přenosu

