



# IMUNOELEKTROFORETICKÉ METODY

# Imunoelektroforetické metody

## kombinace metod

elektroforetických + imunodifúzních

### gel:

- ✓ agarozový (1 - 2 %)
- ✓ agarový gel

pufry: 0,025 M – pH 8-9

veronalový

borátový

Tris-barbitalový

tris-Tricinový



**Bakteriostatická látka:**

0,02 % azid sodný

0,01 % mertiolát

## **Rozdělení metod** (podle pracovního postupu)

- 1. Klasická imunoelektroforéza podle GRABARA a WILLIAMSA**  
(pouze kvalitativní údaje)
- 2. Raketová imunoelektroforéza**  
(pouze kvantitativní údaje)
- 3. Střetná (protisměrná) imunoelektroforéza**  
(pouze kvalitativní údaje)
- 4. Dvojrozměrná (křížová) imunoelektroforéza**  
(kvalitativní i kvantitativní údaje)

# Imunoelektroforéza podle Grabara a Williamse

zónová elektroforéza + Ouchterlonova metoda

## Dvě fáze:

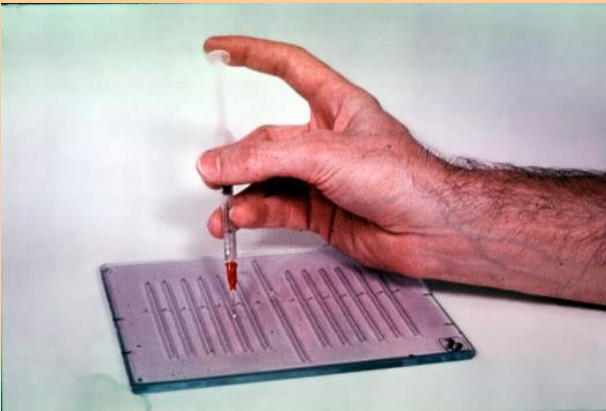
- ✓ Antigen se rozdělí působením stejnosměrného proudu
- ✓ Ve směru dělení se vyřežou podélné žlábký, do kterých se napipetuje antisérum a nechá se difundovat proti sobě

výsledek: precipitační obloučky, které se odečítají

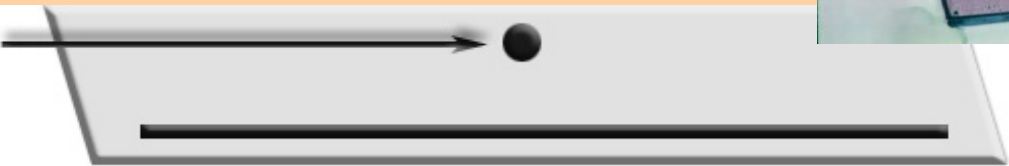
-přímo okem



-po obarvení



1. Add serum to well



2. Electrophorese serum proteins



3. Add antiserum to slot



4. allow time for diffusion of:  
• serum proteins  
• Ab's in antiserum



5. stain gel & read precipitin lines



# Využití imunoelektroforézy podle Grabara a Williamse

- ❖ v klinických laboratořích zkoumání sérových proteinů a jejich změn při různých chorobách

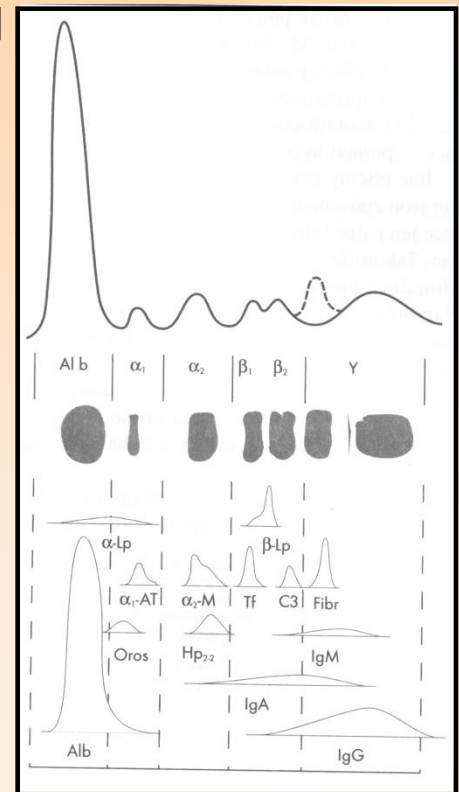
## zónová elektroforéza:

rozdělení proteinů krevního séra 5-6 frakcí

## imunoelektroforéza:

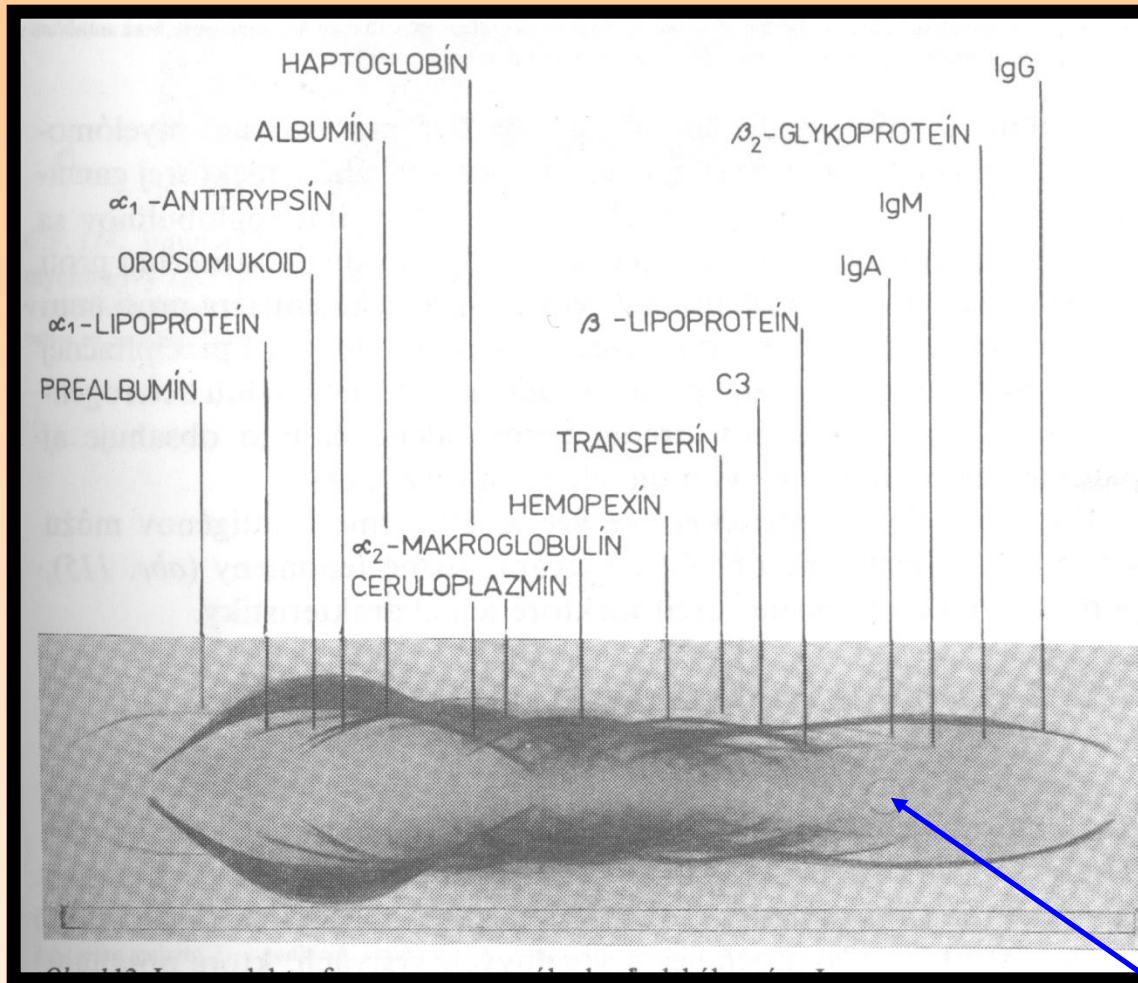
až 35 precipitačních obloučků při použití polyspecifického antiséra (každý oblouček = 1 protein)  
má charakteristický tvar a umístění na imunoelektroforegramu

- ❖ zjišťování některých gamapatií
- ❖ poruchy v biosyntéze imunoglobulinů

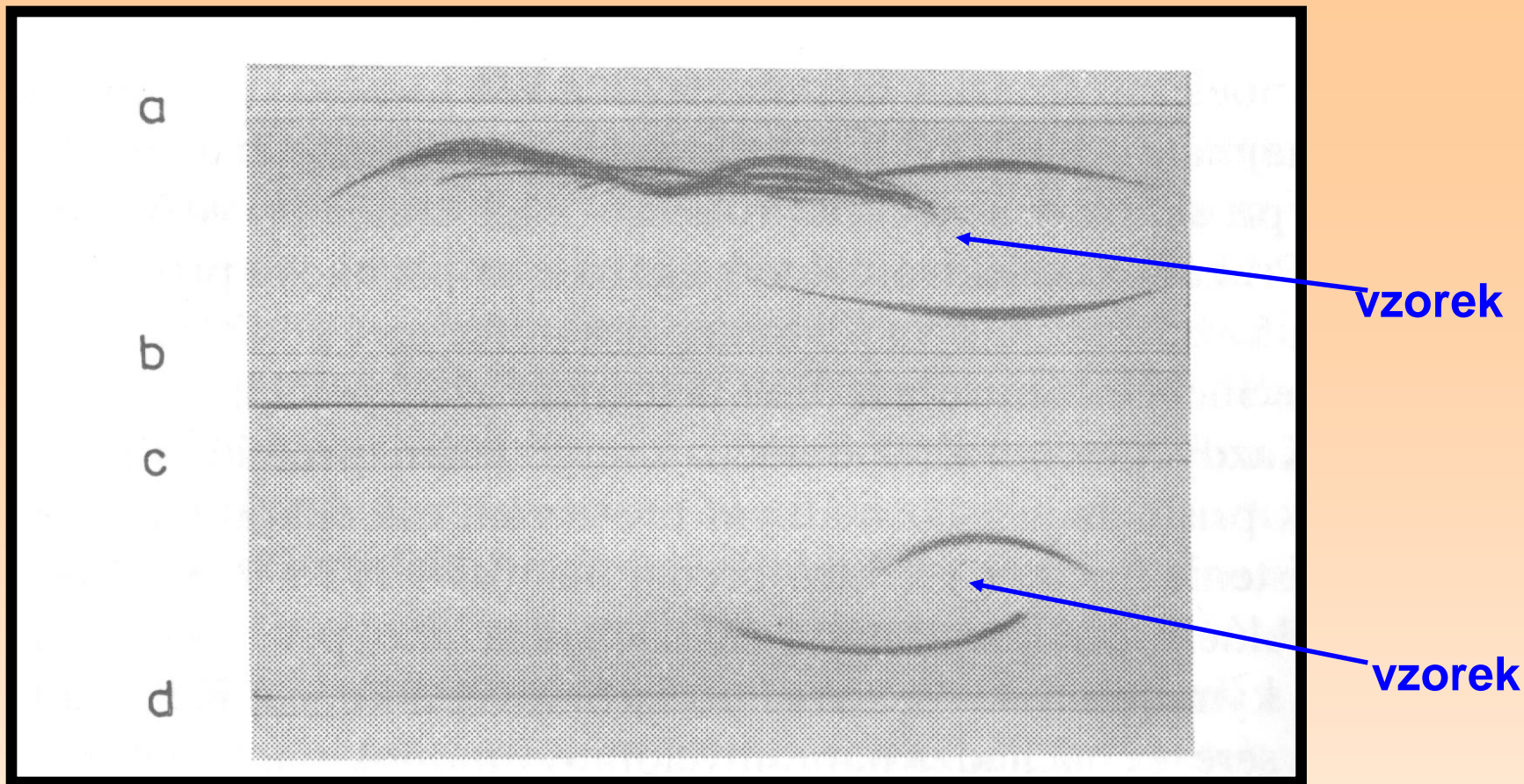


# Imunoelektroforegram normálního lidského séra

Ve žlábkku je králičí antisérum proti lidským sérovým proteinům



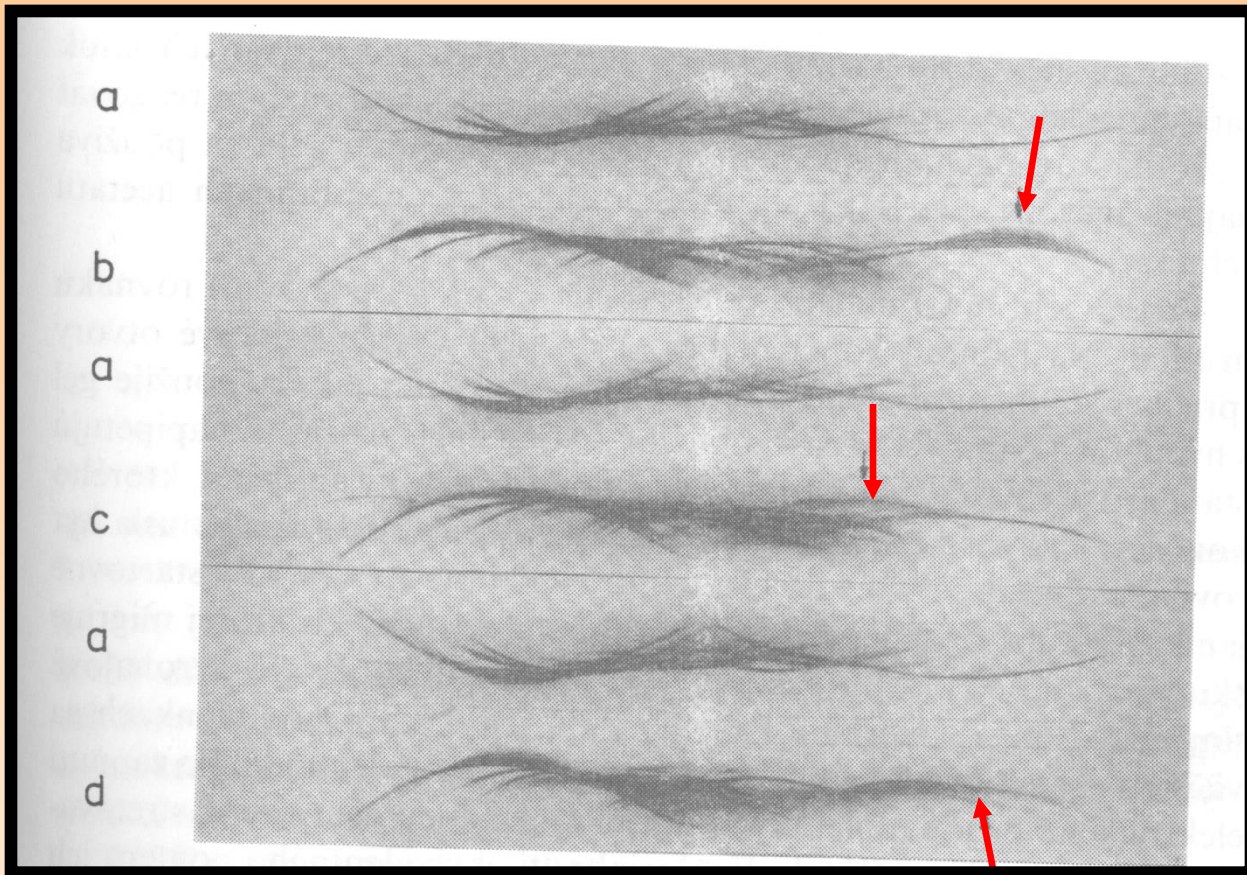
vzorek



## Imunoelektroforegram normálního lidského séra:

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





Imunoelektroforegramy **normálních** lidských sér (a) a sér obsahujících **myelómový IgG** (b), **myelómový IgA** (c) a **Waldenströmův makroglobulin IgM** (d)

Ve žlábcích je polyspecifické antisérum proti lidským sérovým proteinům. Monoklonové (patologické) imunoglobuliny jsou vyznačeny šipkou.

# Raketová imunoelektroforéza (RIEF)

## rocket immunoelectroforesis

Jednoduchá radiální imunodifúze urychlovaná stejnosměrným elektrickým proudem.

1966 C.B Laurell

gelová vrstva obsahující monospecifické precipitující Ab

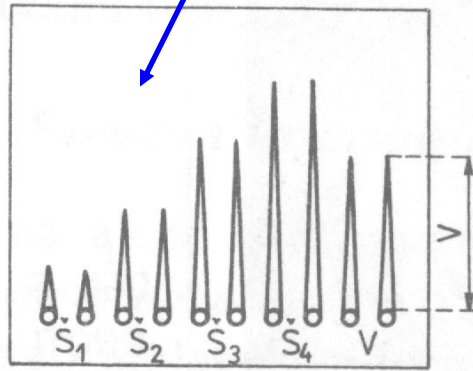
gel: agarosa  
membrána acetátu celulosy

elektrolyt: veronalové pufrы s mírně alkalickým pH  
většina antigenů se pohybuje k anodě

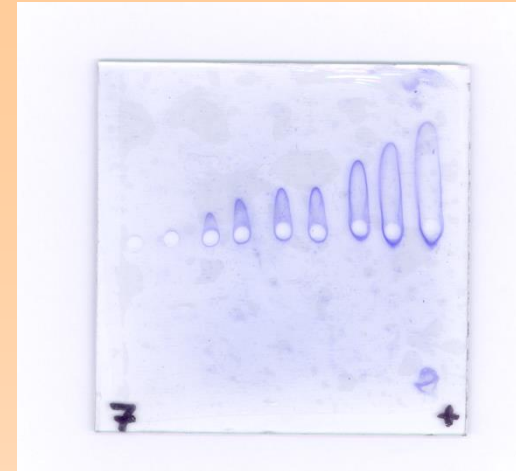
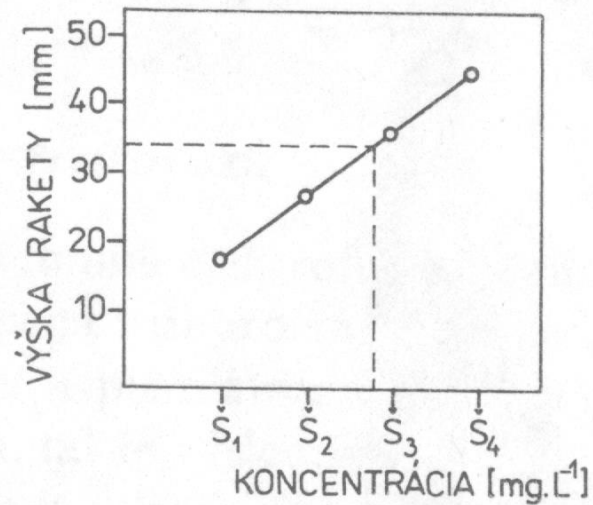
afinitní elektroforéza, při které se ze směsi rozdělovaných látek vychytává jen antigen, který může biospecifickou vazbou reagovat s protilátkou nacházející se v gelu

Ab v gelu

a



b



**Molekuly Ag migrují do gelu, kde se setkávají s Ab.**

**Dosažení ekvivalentního poměru:**

**vznik precipitačních útvarů podobných raketám.**

**Výška rakety je přímo úměrná koncentraci Ag.**

**Parametry elektroforézy: 10 až 15 V/cm (bez chlazení)**

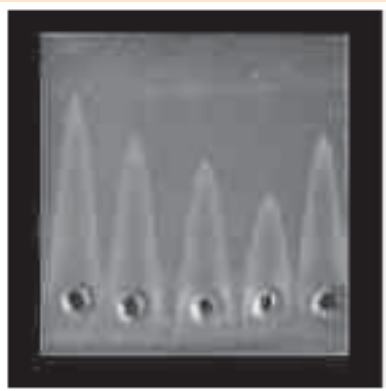
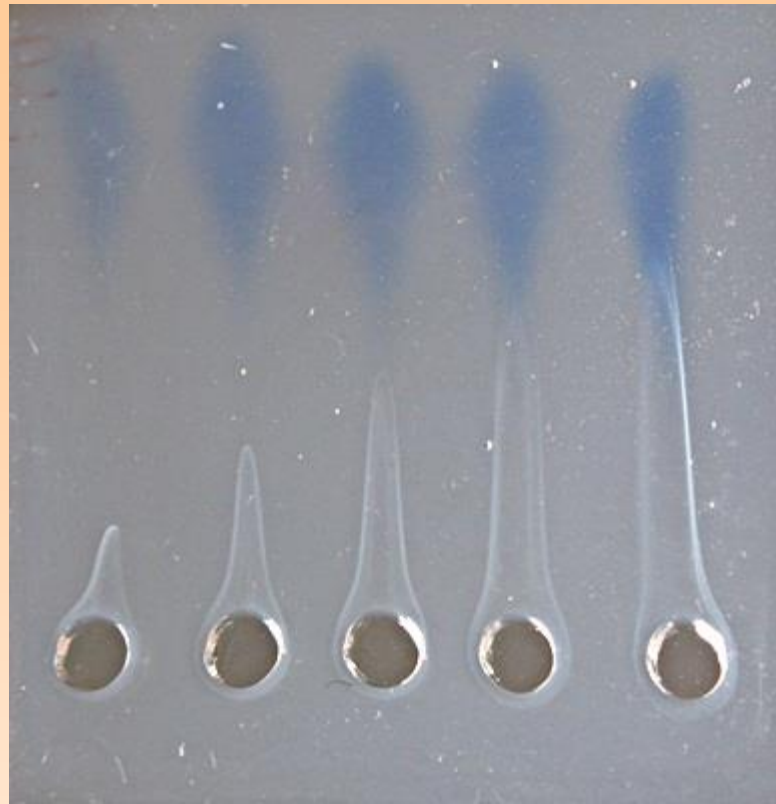
**čas 30 až 180 min**

**Detekce:**

**1. Přímou**

**2. Zbarvení (Coomassie Blue, Amidočern B)**

**3. 0,5 % kyselina fosfomolybdenová**



## RIEF metoda je výhodná

- ✓ stanovení makromolekul, proti kterým lze připravit monospecifické Ab
- ✓ migrují v agarozovém gelu

50 x citlivější jak RID

Stanovení 0,2 až 0,1 mg/l antigenu do 2 hodin.

Velmi málo pohyblivé antigeny (IgM,  $\alpha_2$ -makroglobulin)  
lze zvýšit pohyblivost **karbamylací** (reakce s KCNO)

Obráceně lze RIEF použít na zjištění **koncentrace**  
**Ab v séru**, když do gelu přidáme antigen

# Spojité raketová imunoelktroforéza *fused rocket immunoelectrophoresis*

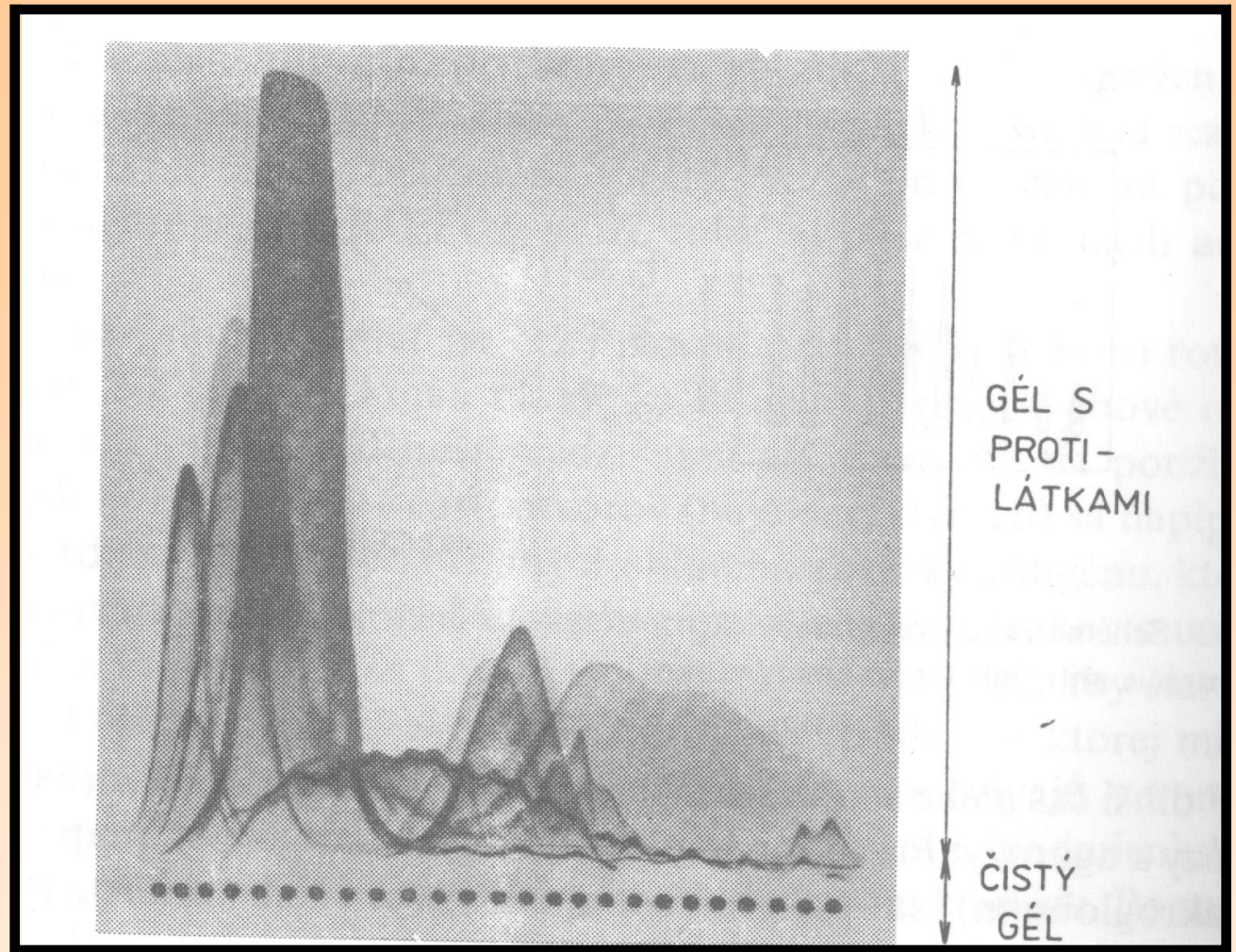
Proteiny rozdělené do jednotlivých frakcí různými chromatografickými technikami:

## 2 různé gely:

- ✓ Čistá agarosa, kde dvě řady jamek - vzorky jednotlivých frakcí
- ✓ Horní široký gel s polyspecifickými Ab proti proteinům

## Výsledek:

- ✓ spojitě precipitační linie, které vytvářejí vrcholy různých tvarů.
- ✓ každý vrchol patří jednomu proteinu, koncentraci lze určit podle výšky



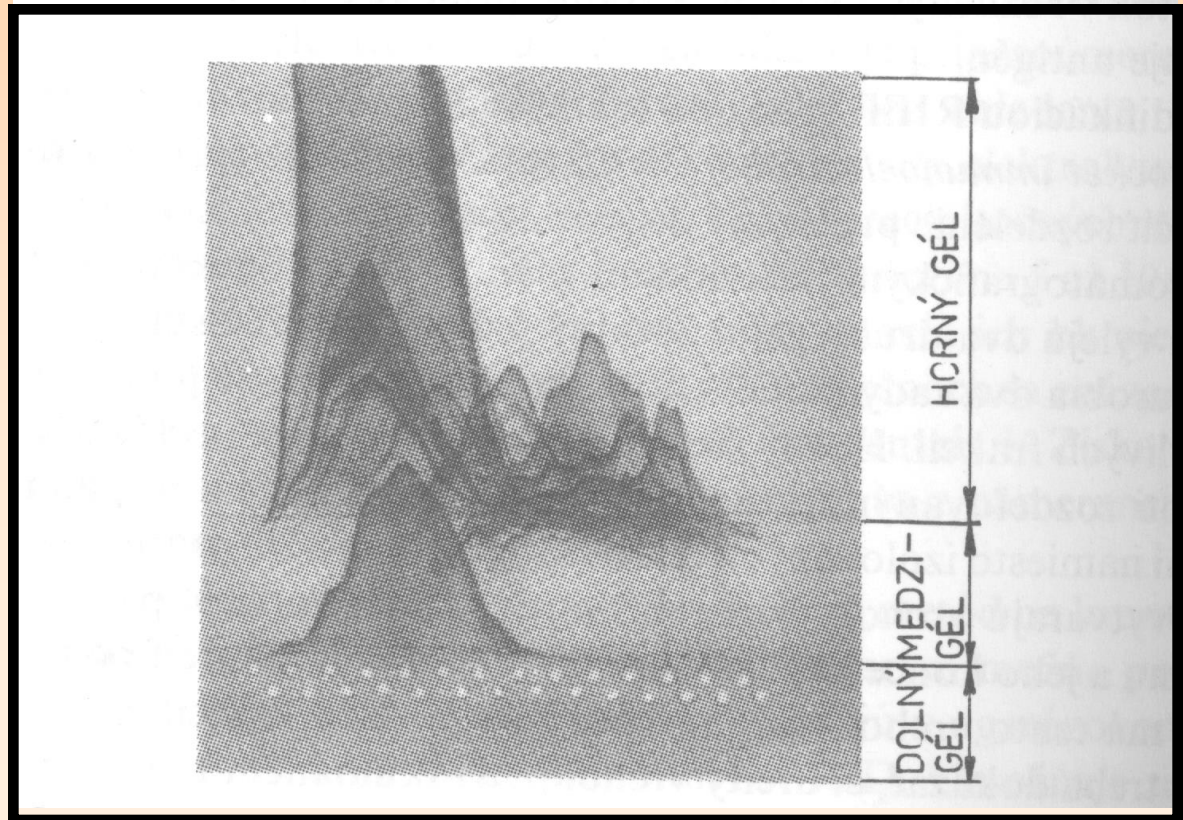
## **Spojitá raketová imunoэлектрофорéza**

**frakcí získaných po gelové chromatografii lidského séra  
na sloupci Sephadexu G-200.**

## Určení konkrétního proteinu:

mezi gel čisté agarozy a agarosy s polyspecifickými Ab, zařadíme gel se specifickou protilátkou proti zkoumanému proteinu.

Hledaný protein, pak vytvoří svůj vrchol v mezivrstvě, ostatní přes ní volně předifundují a vytvoří precipitační linie až ve třetí vrstvě s polyspecifickými Ab.

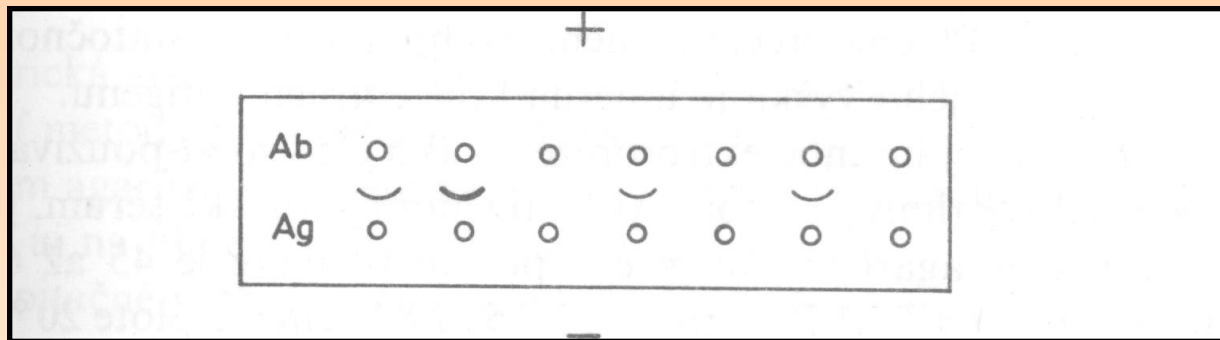




## Střetná imunoelektroforéza (protisměrná) *counter immunoelectrophoresis*

Obměna jednorozměrné dvojité imunodifuze

Pohyb molekul Ag a Ab urychluje stejnosměrný elektrický proud. Výsledek je možno odečítat už za 30 min.



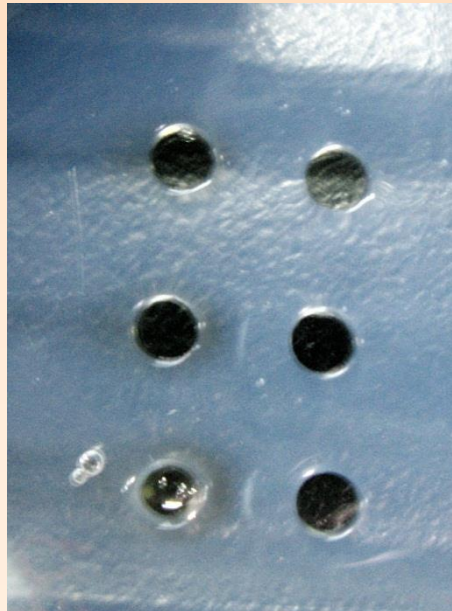
Na podložním sklíčku v agarozovém gelu 1 - 1,5 %  
ve veronalovém pufru pH 8,6  
průměr jamky: 2-3 mm, vzdálenost 4-5 mm,  
vzdálenost mezi řadami: 6 - 10 mm



**Detekce:** volným okem  
po zbarvení

**Ab migrují ke katodě, lze použít jen pro důkaz Ag,  
které mají anodickou pohyblivost**

**Využití:** využívá se pro rychlý kvalitativní důkaz Ag

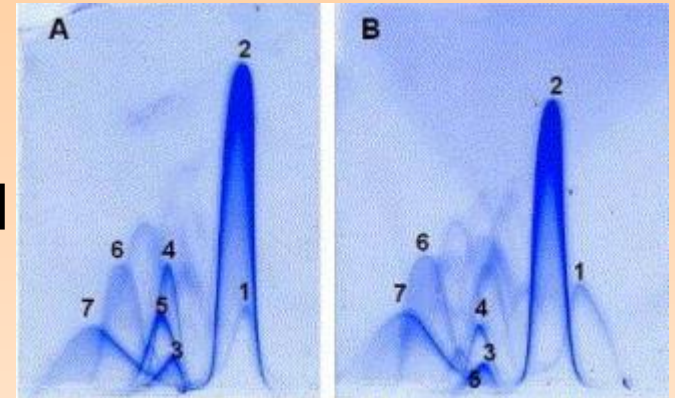


# Dvojrozměrná (křížová) imunoelektroforéza *crossed immunoelectrophoresis*

**Kombinace** zónové elektroforézy a raketové imunoelektroforézy

1965 LAURELL, LAURELLOVÁ

1966 CLARKE H.G.M., FREEMAN

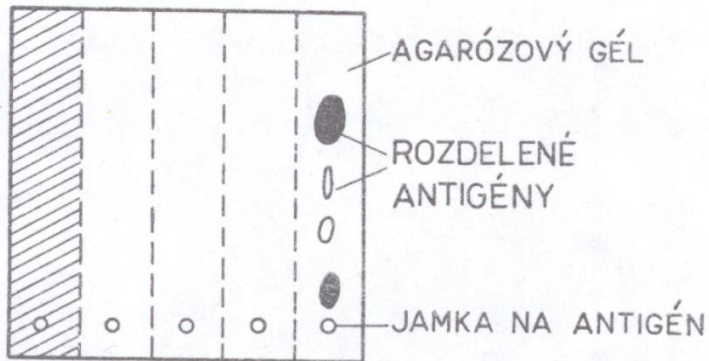


**dva směry:**

- ✓ rozdělení Ag v agarozovém nebo PAGE vyřeže se úzký pás gelu (při 8,5 x 8,5 asi 2 x 8,5 cm), který se přiloží ke kraji skla
- ✓ doplní se gelem se specifickými Ab a elektroforéza probíhá kolmo na první směr dělení

ELEKTROFORÉZA V PRVOM ROZMERE

+

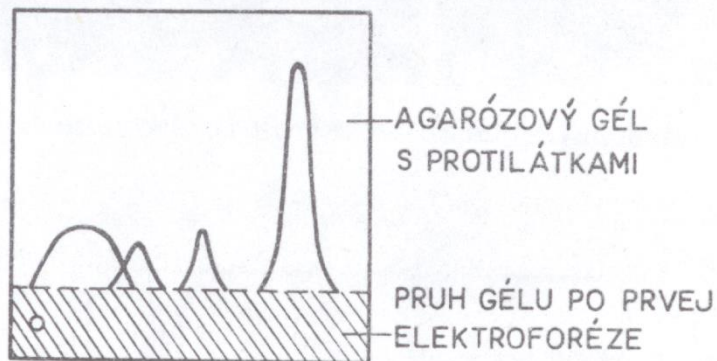


-

a

ELEKTROFORÉZA V DRUHOM ROZMERE

+



-

b

Ag migrují do gelu s Ab a vytvářejí v zónách ekvivalence široké **precipitační rakety** nebo vrcholy:

- ✓ umístění rakety charakterizuje druh antigenu.
- ✓ **plocha vrcholu** při dostatečném čase elektroforézy a také **výška** jsou úměrné koncentraci Ag.

**Elektrolyt:** veronalový pufr  
1. rozměr. 45 až 60 min  
2. rozměr: 2 až 2,5 hod  
**Napětí:** 5 až 8 V/cm při 20°C

**Význam:** nejvýhodnější imunochemická metoda na analýzu směsi antigenů.

V lidském séru lze touto metodou rozdělit až 50 různých proteinů.

Pokud v 1. rozměru použijeme IEF, pak lze zjistit ještě více.

**Citlivost:** 0,1 až 1,0 mg/l.

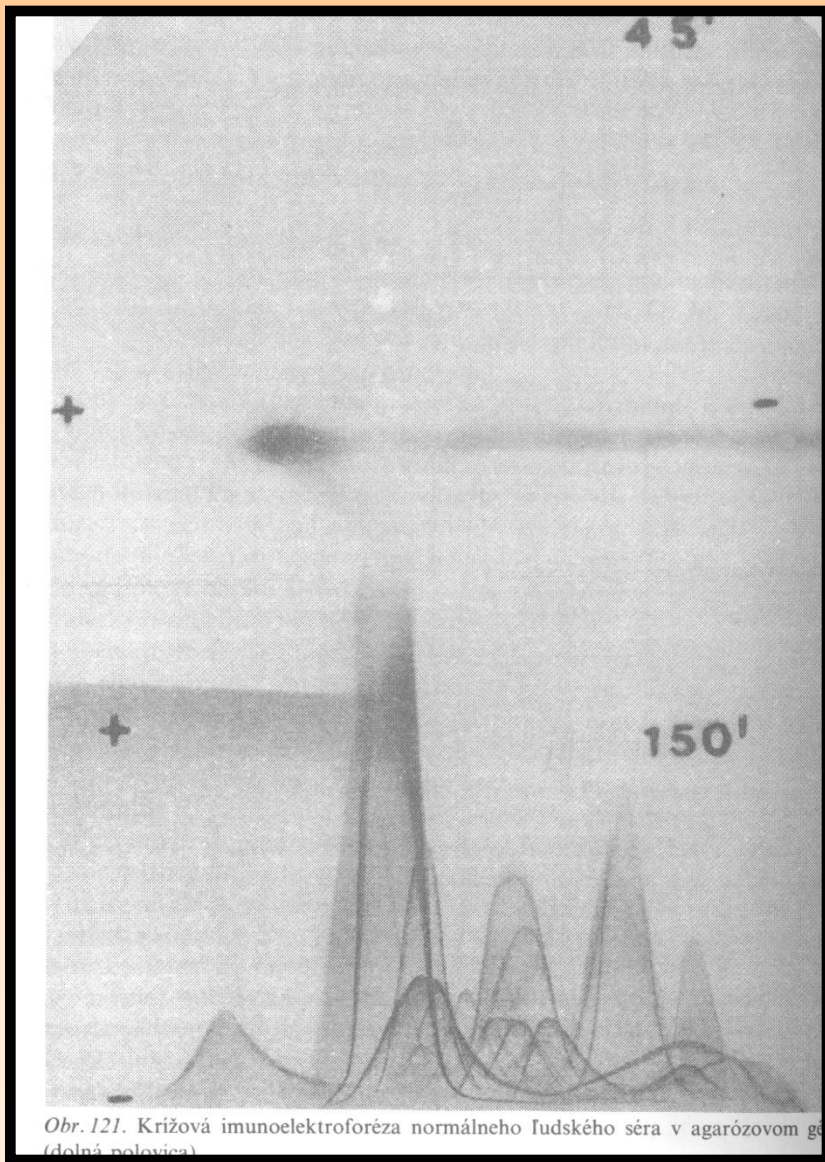
**Jiný gel:** acetát celulosy (Cellogel)

## Vyhodnocení:

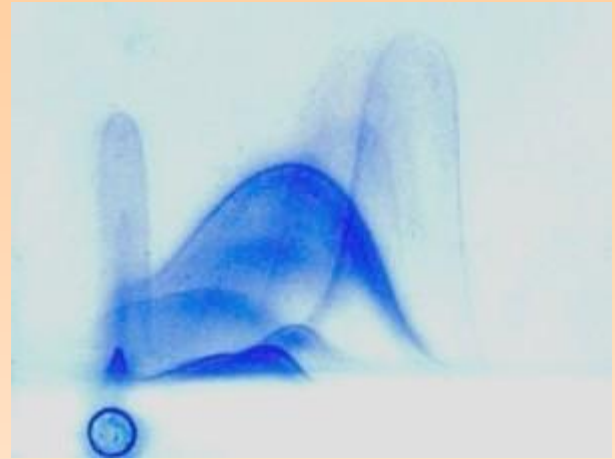
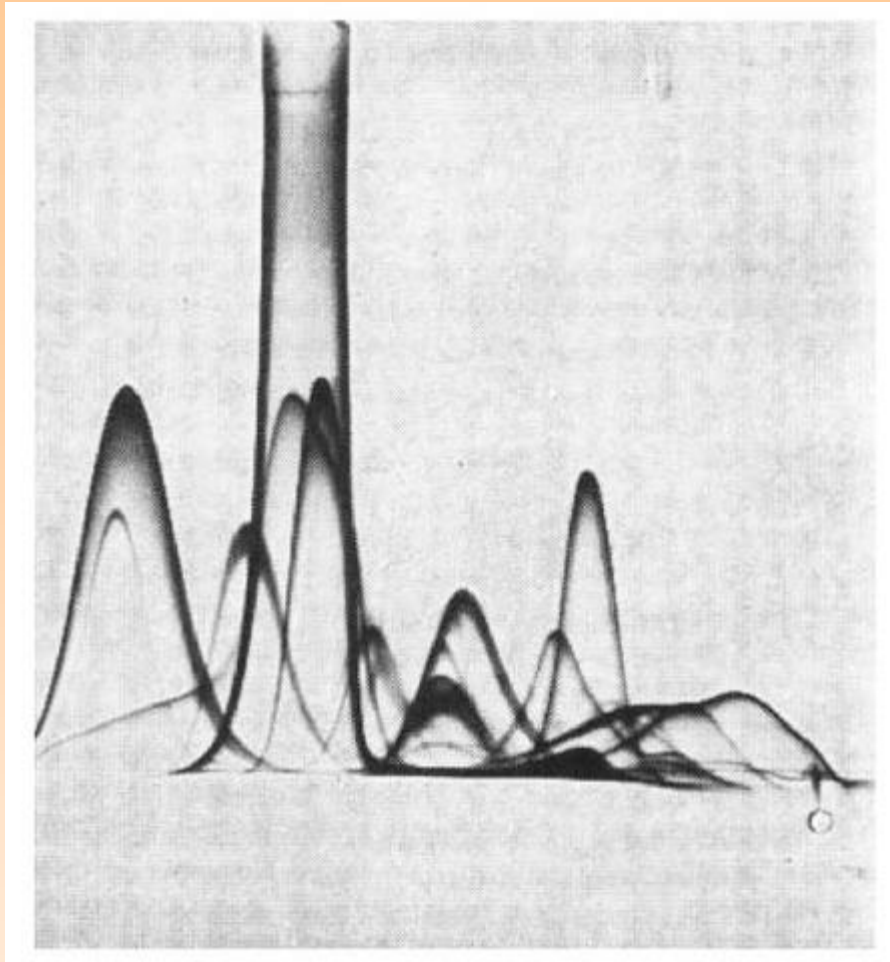
**protínání nebo splývání precipitačních vrcholů = lze usuzovat na příbuznost nebo nepříbuznost Ag**

### **identifikace se provádí:**

- ✓ **porovnáním polohy a tvaru vrcholů se vzorkem známého antigenu, který se podrobil křížové imunoэлектрофорéze za stejných podmínek**
- ✓ **pomocí specifických antisér**
- ✓ **specifických barvení Ag**
- ✓ **použitím čistých Ag jako vnitřní standard**

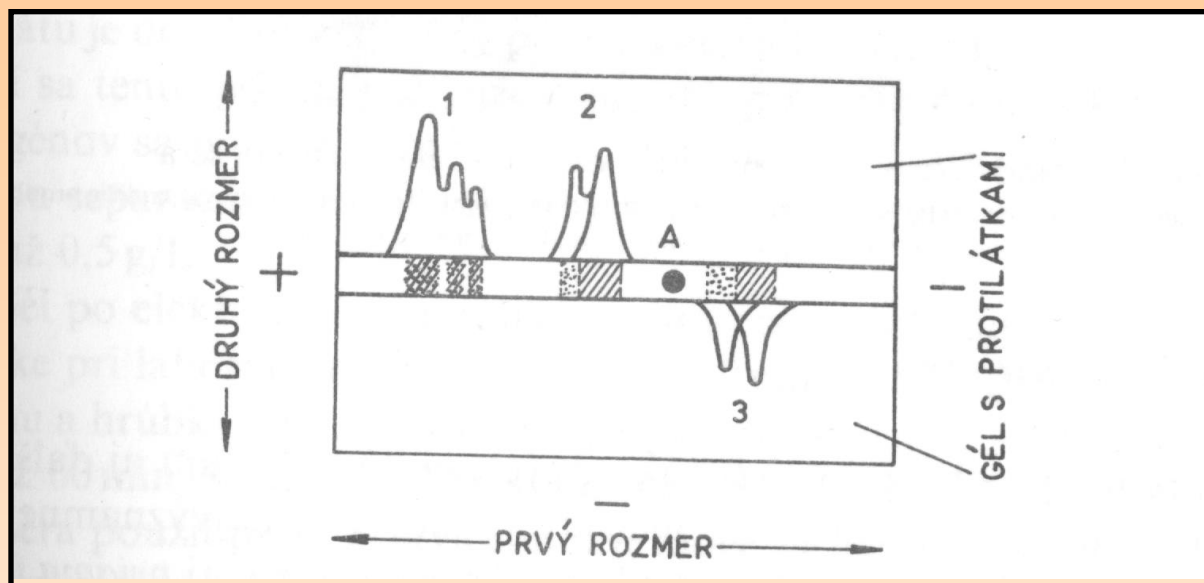


Obr. 121. Křížová imuno elektroforéza normálního lidského séra v agarózovém gélu (dolná polovica)



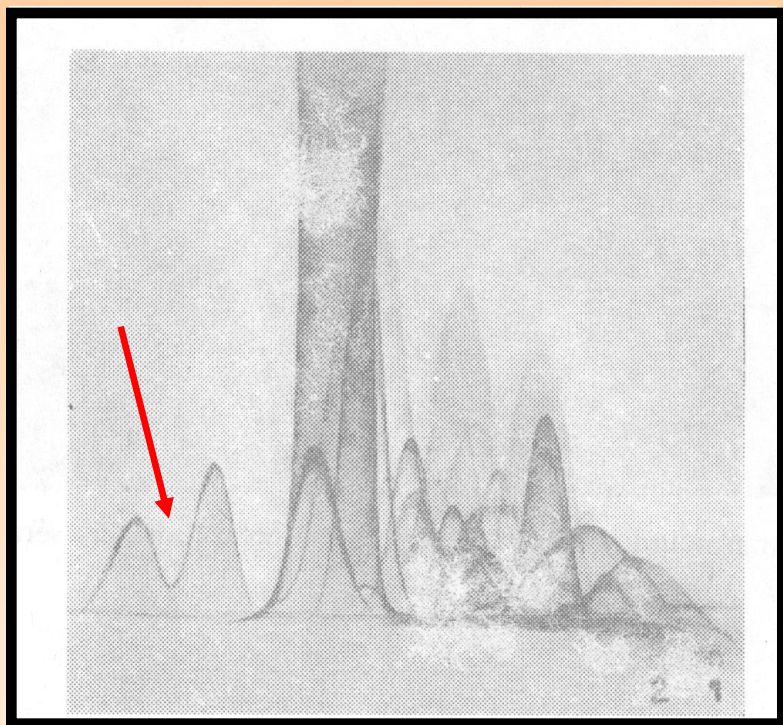


# Precipitační fenomény při dvojrozměrné imunoelktroforéze



- 1 identické antigeny s anodovou pohyblivostí
- 2 částečně identické antigeny s anodovou pohyblivostí
- 3 neidentické antigeny s kationtovou pohyblivostí

# Tandemová dvojrozměrná imunoelektroforéza



Čistý Ag se může aplikovat do druhé jamky vznikne tandemová dvojrozměrná imunoelektroforéza, v které jeden stejný Ag (přítomný v obou jamkách vytvoří dvojici (tandem) precipitačních vrcholů se znaky identity

jamka **1** - lidské sérum, jamka **2** - prealbumin

Horní gel: protilátky proti lidským sérovým proteinům.

**Dvojvrchol prealbuminu** se znaky identity je označen šipkou

## Imunofixace

- zónová elektroforéza
- izoelektrická fokusace
- izotachoforéza

- agarozový gel
- polyakrylamidový gel
- acetylcelulozový gel

**Pomocí imunofixace se detekují jen některé rozdělené antigeny**

**Na povrch gelu se aplikují specifické protilátky, které difundují do gelu. Po ukončení migrace se gel promyje puřem (odstraní se neprecipitované antigeny) a pak se detekuje imunokomplex.**

## Detekce nerozpustných imunokomplexů:

- ✓ **barviva na proteiny**
- ✓ **reakce se sekundární protilátkou**
  - **enzym**
  - **radioizotop**

## Provedení imunofixace:

- ✓ antisérum s vysokým titrem monospecifických Ab
- ✓ jen na tu část gelu, kde se předpokládá Ag  
(rozetřít po gelu nebo navlhčit acetylcelulózový papír Ab)
- ✓ na jeden vzorek asi 0,02 - 0,2 ml antiséra (poměr Ag:Ab)  
(krevní sérum zředit na 0,1 - 0,5 g/l proteinů)

## Doba inkubace s Ab:

agarozové gely (1 až 5 mm)	30 - 60 min
polyakrylamidové	až 2 h

## promývání gelů:

odstranění nespecifických proteinů

- fyziologickým roztokem	agarozové gely (16 - 24 h)
	PAGE-gely (48 - 72 h)

## **Použití imunofixace:**

**Zkoumání polymorfizmu proteinů,  
(genetická fenotypizace)  
které se vyskytují v nízkých koncentracích  
a dají se těžko detekovat**

- složky komplementu (C2, C3, C4, B)**
- proteinasové inhibitory ( $\alpha_1$ -antitrypsin)**
- některé sérové glykoproteiny**

# Immunoblotting

(imunopijákové metody)

Metoda, která umožňuje **přenos molekul** z mobilní fáze (gelu) do pevné fáze (nitrocelulosová membrána)

Přenos:           - difuzí  
                      - stejnosměrným el. proudem

## Detekce na membráně:

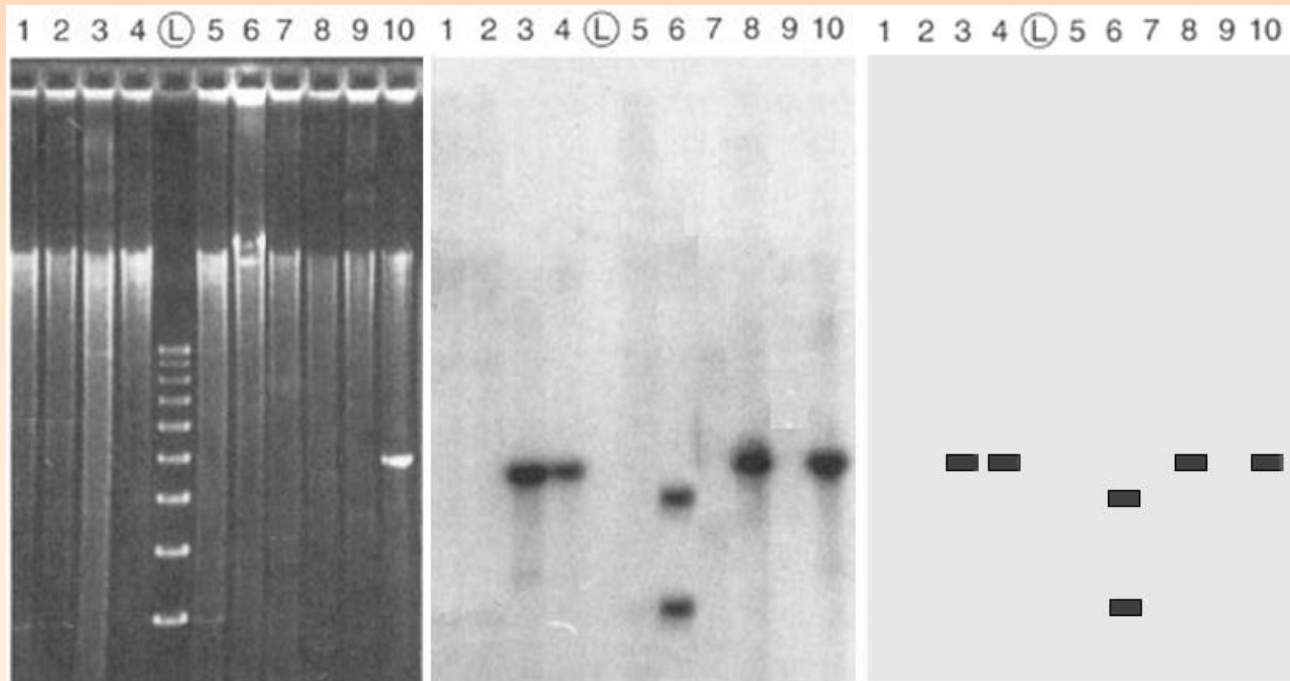
- ✓ barevné reakce
- ✓ autoradiografie
- ✓ specifickými protilátkami (**immunoblotting**)

# Historie

**1975 SOUTHERN** přenos fragmentů DNA z agarozového gelu na nitrocelulosoovou membránu pomocí kapilárních sil (hybridizace s radioaktivní RNA a detekce autoradiograficky).

Homologní úseky DNA byly detekovány jako ostře ohraničené pruhy na radiogramu

Metoda „**Jižní pijákování**“ (southern blotting)





**1977 ALVINE J.C.** vylepšení metody  
místo nitrocelulosy DBM  
(diazobenzylmethylovaný papír)  
lépe se kovalentně váží malé fragmenty  
DNA nebo RNA

Metoda „**Severní pijákování**“ (northern blotting)

**1979 RENART J. a TOWBIN H.** metodu upravili  
pro analýzu proteinů (immunoblotting).

**1981 BURNETTE W.N.** Detekce imobilizovaných Ag pomocí specifických Ab a radioaktivně značený protein A (funkce druhého ligandu).

Metoda „**Západní pijákování**“ (Western blotting)

## Výhody immunoblottingu

- ✓ lehká proveditelnost
- ✓ vysoká citlivost a specifčnost (detekce jednoho proteinu ze směsi)
- ✓ detekce a analýza na kopii

## Etapy metody:

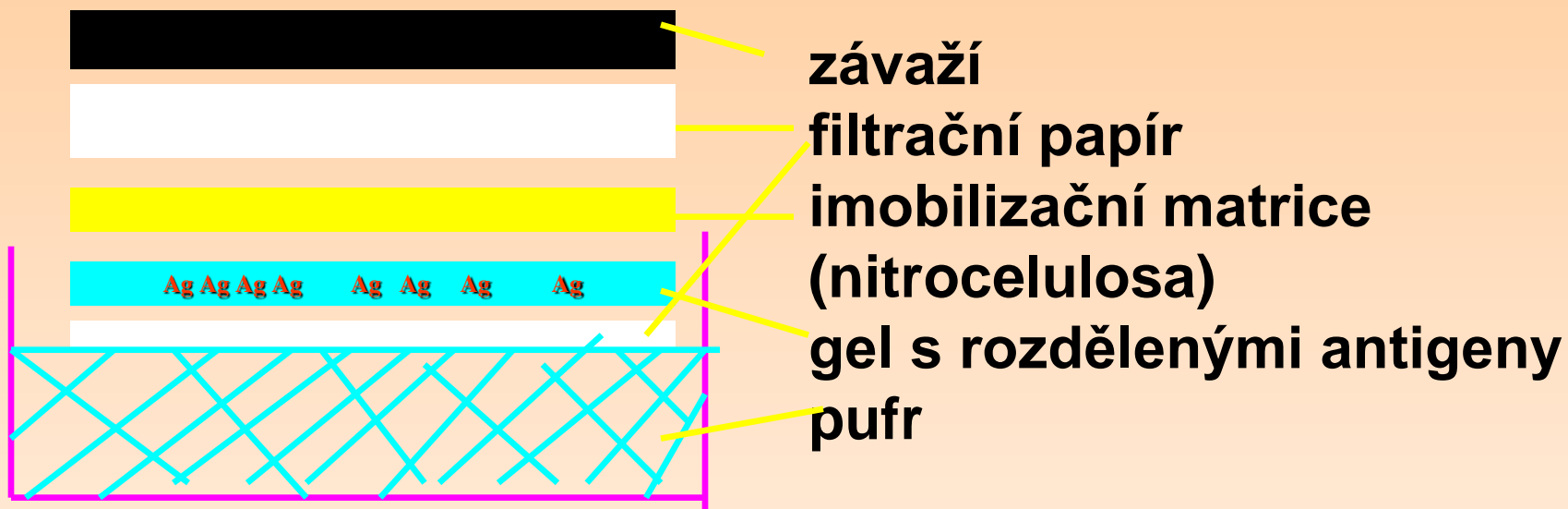
- ✓ Směs antigenů se rozdělí pomocí jednorozměrné (SDS-elektroforéza) dvojrozměrné elektroforézy izoelektrickou fokusací
  - v agarozovém gelu
  - v polyakrylamidovém gelu
- ✓ Po skončení se gel vloží do blottovací aparatury a uskuteční se přenos antigenů na vhodnou matici
- ✓ Nasycení (zablokování) nespecifických vazbových míst (aby se zamezilo nespecifickým interakcím mezi detekční sondou a maticí)
- ✓ Vizualizace detekční sondy (radiograficky, barevná reakce, fluorescenčně)

## Přenos proteinů:

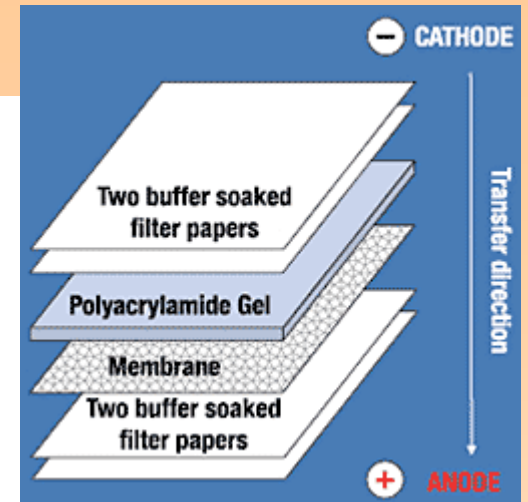
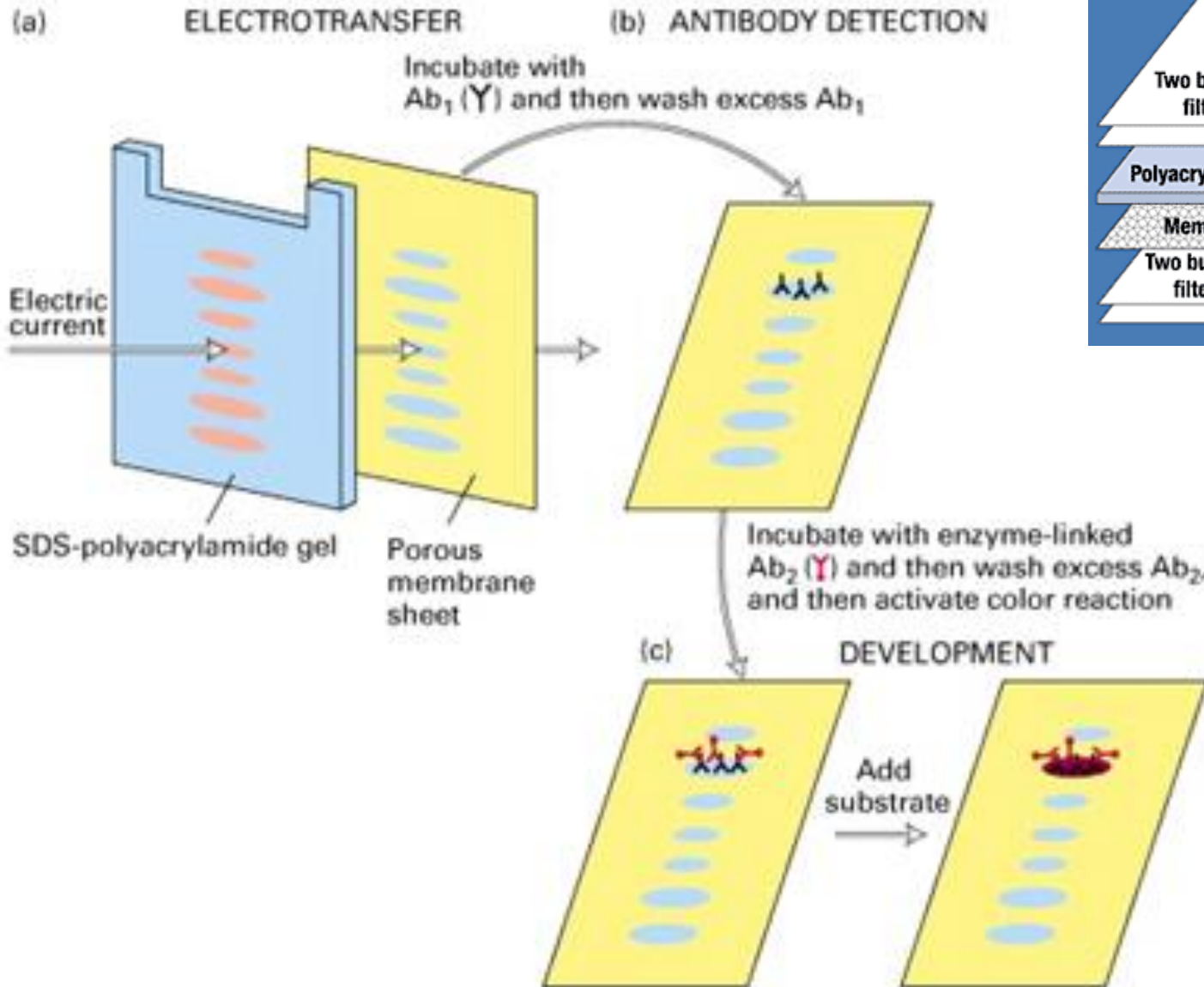
- ✓ jednoduchá difúze (málo efektivní)
- ✓ kapilární tlak
- ✓ negativní tlak (vakuové pijakování)
- ✓ elektroforetickými silami (elektropijakování)

Ize získat i několik kopií a s každou uskutečnit jinou detekční reakci.

# Zařízení na blotting Ag kapilárním tlakem



# WESTERN BLOTTING



## Membrány pro blottování

- ✓ **nitrocelulosa** ( $80 \text{ mg/cm}^2$ )
- ✓ **diazobenzoxymetylovaný papír (DBM)** (kovalentní vazba  $10\text{-}20 \text{ mg/cm}^2$ )  
nevýhoda vždy se musí diazotovat
- ✓ **PVDF membrány**  
(1990 Timmons, Dunbar)



Po přenosu proteinů na PVDF membránu je  **lze detekovat:**

- ✓ barevné reakce s proteiny
- ✓ pomocí specifických protilátek

Před aplikací specifických protilátek je třeba membránu inkubovat s blotujícím činidlem (BSA, želatina, odtučněné mléko, Tween 20, hemoglobin ethanolamin)

**PVDF: polyvinyliden difluorid**

## Detekce proteinů na membráně

- ✓ **přímé nespecifické barvení**
- ✓ **přímé specifické značení (prvním ligandem)**
- ✓ **nepřímé specifické značení**



## ✓ **přímé nespecifické barvení**

Amidočerň 10B, Coomassie Blue R 250

(citlivost 0,5 - 1  $\mu\text{g}$  proteinu)

stříbrné barvení (4 až 10 ng), koloidní zlato (50 pg)

## ✓ **přímé specifické značení (prvním ligandem)**

specifická protilátka nebo ligand, který už má značku  
(radioizotop, fluorochrom, enzym)

## ✓ **nepřímé specifické značení**

používají se dva až tři ligandy, první ligand se specificky  
naváže jen na analyzovaný protein

druhý ligand (sekundární protilátka) má značku nebo

druhý ligand protein A (specificky reaguje s Fc doménami  
protilátky)

na detekci třetí ligand

## Značení protilátek

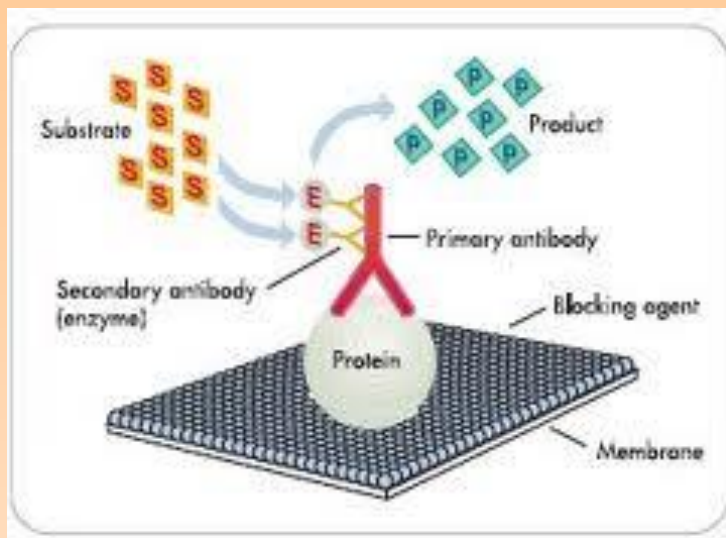
konjugát s enzymy: **peroxidasa HRP**  
**alkalická fosfatasa (ALP)**

substráty pro tyto enzymy musí tvořit barevné precipitující produkty (na rozdíl od ELISA metod)

**substráty pro HRP**      **diaminobenzidin**  
**4-chlor-1-naftol**

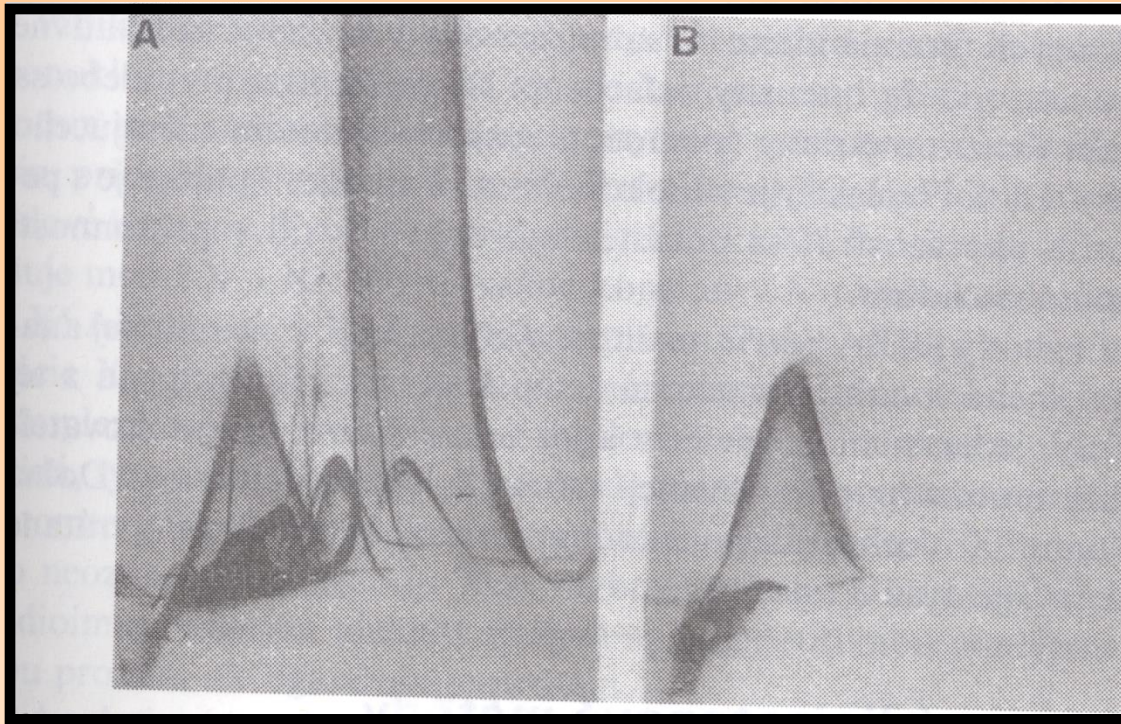
**substrát pro ALP**      **5-brom-4-chlorindoxyfosfát**  
**(nitrotetrazoliová modř)**

**detekční limit:**      **1 ng/mm<sup>2</sup>**



**O 2-3 řády citlivější je použití  
luminiscenčních a fluorescenčních  
detekčních technik**

**Emitované světlo lze zachytit např. film**



## Identifikace vrcholu získaného pomocí křížové imuno elektroforézy imunoblottingem

A- Křížová imuno elektroforéza v agarozovém gelu

B- Otisk na nitrocelulosové membráně po reakci s myší monoklonální protilátkou proti lidskému IgM, po detekci pomocí sekundární protilátky značené peroxidasou (kozí proti myší Ab)

# DOT BLOTTING

**Protein aplikuje přímo na membránu bez počáteční elektroforetické separace.**

**Detekce je stejná jako u Western blottingu.  
Pro kvalitativní a semikvantitativní stanovení.**

