

P. Schneiderka, Ústav patologické fyziologie LFUP a OKB FN Olomouc

Elektroforéza bílkovin, imunofixace a isoelektrická fokusace

Úvod

Metody dělení látek ze směsi podle jejich odlišné pohyblivosti v elektrickém poli jsou známy již více než sto let. Elektroforéza bílkovin se však dočkala většího rozmachu teprve koncem 30.let minulého století na základě objevu tzv. volné elektroforézy švédským vědcem Arne W.K.Tiselie (1902-1971, nositel Nobelovy ceny za chemii z r. 1948) (Obr. 1 **foto Tiselie**) a po 2. světové válce potom rozvojem elektromigračních technik v různých nosičích. Kombinací elektroforézy a imunodifúze se výrazně rozšířila oblast aplikací této metody v klinické laboratorní diagnostice. Elektroforetické metody patří dodnes k základním metodám v rutinní laboratorní praxi a jsou široce využívány také ve výzkumu, zejména k analýze proteinů a nukleových kyselin.

Princip metody a "volná" elektroforéza

Ve stejnosměrném elektrickém poli se mohou k některé z elektrod pohybovat pouze částice nesoucí náboj. Aminokyseliny a bílkoviny jsou amfolyty, tj. látky schopné tzv. vnitřní ionizace v závislosti na pH prostředí. U koloidních částic bílkovin rozptýlených v roztoku elektrolytu pochází náboj jednak z disociace ionizovatelných skupin ($-\text{COOH}$ a $-\text{NH}_2$) a jednak z adsorpce iontů rozpouštědla.

Výklad vzniku potenciálového rozdílu mezi částicí a rozpouštědlem se opírá o teorii "elektrické dvojvrstvy". Vnitřní část této dvojvrstvy je dána disociací částice nebo pevně vázanými adsorbovanými ionty rozpouštědla. Obklopuje je vnější vrstva složená z iontů opačného náboje zčásti pevně vázaných, zčásti difuzní. O rychlosti pohybu částice rozhoduje velikost potenciálového rozdílu mezi pevně vázanou a difuzní složkou dvojvrstvy, který se nazývá elektrokinetický potenciál.

Při volné elektroforéze byly elektrody přímo zavedeny do roztoku směsi bílkovin a vhodného pufru v kyvetě tvaru U. V elektrickém poli došlo k migraci (posunu) jednotlivých složek směsi, přičemž faktorem, který dočasně bránil opětovnému promíchání, byl pouze rozdíl hustoty složek směsi oproti samotnému elektrolytu. K hodnocení výsledku dělení se používalo sledování indexu lomu.

Pro technickou náročnost a mnohé další nevýhody volné elektroforézy byly postupně vyvinuty metody, při nichž je stabilizujícím médiem, nosičem, porézní prostředím. Materiálem tohoto nosiče mohou být např. celulóza (filtrační papír, acetylcelulóza) nebo nejrůznější gely (škrob, agar, agaróza, polyakrylamid).

Elektroforéza na nosičích

Nejstarším nosičem pro elektroforézu sérových bílkovin byl chromatografický papír. Při **papírové elektroforéze** byl proužek papíru předem navlhčen barbitalovým pufrům o pH 8,6 a roztok vzorku se na start nanášel pipetou v podobě čárky. Konce papíru byly potom ponořeny do oddělených elektrodových nádob naplněných stejným pufrům a elektroforéza probíhala obvykle při napětí 300 V a intenzitě okolo 1,8 mA/proužek po dobu cca 6 h.

Na tomto nosiči při pH 8,6 probíhalo dělení podle velikosti náboje: záporně nabitě ionty bílkovin se pohybovaly různou rychlostí od startu směrem k anodě. Po fixaci kyselinou octovou, usušení proužku (fixace bílkovin) a obarvení, např. bromfenolovou modří nebo amidočerní 10B, bylo možno vizuálně identifikovat maximálně 5 frakcí: albumin, alfa 1, alfa 2, beta a gama globuliny. Existovaly také kvantitativní modifikace, kdy se papír s jednotlivými obarvenými zónami rozstříhal, frakce se z ústřížků eluovaly vhodným rozpouštědlem a intenzita zbarvení se měřila fotometricky. Jiný způsob kvantifikace spočíval v měření absorbance obarvených frakcí elektroforeogramu reflexní fotometrií. Tento způsob se využívá dodnes pro kvantifikaci frakcí na jiných nosičích.

Dalšími variantami byla vysokovoltová elektroforéza (při 1000 až 10 000 V), kontinuální elektroforéza (pro preparativní účely) nebo kombinace vysokovoltové elektroforézy s chromatografií (elektrochromatografie).

Poněkud lepší separační vlastnosti než papírová elektroforéza poskytuje příbuzný nosič, **acetylcelulóza**. Práce s acetylcelulóзовými proužky je podobná jako při papírové elektroforéze, ale podmínky dělení jsou příznivější (menší objem vzorku, nižší napětí i intenzita proudu) a doba migrace je

významně kratší (30 minut). Po fixaci kyselinou octovou a obarvení vykazuje elektroforeogram 5 ostřeji separovaných frakcí než při papírové elektroforéze. Acetylcelulózové proužky lze projasňovat, a proto pro účely kvantitativního hodnocení navíc přibývá denzitometrie.

Dlouho používanými nosiči jsou dále **agar** a později **agaróza**. Jedná se o přírodní materiály připravované z mořských řas. Agar se skládá z agarózy a agaropektinu. Agar nachází nejširší uplatnění v mikrobiologii jako základ pevných živných půd, v imunologii jako gelové médium pro imunoprecipitační reakce a imunoelektroforézy a v potravinářství jako základ barevných ozdobných gelů. Rozvařením vzniká gel obsahující podle účelu jen malý podíl agaru (obvykle 10 - 20 g/l) a zbytek je kapalná fáze. Tento gel musí spočívat na vhodné podložce. Kompletní agar je jako nosič pro elektroforézu méně vhodný, protože jeho agaropektinová složka obsahuje řadu kyselých disociovatelných skupin, které způsobují fenomen zvaný elektroendosmóza. Výsledkem je tok pufu směrem ke katodě a zpomalení migrace aniontů k anodě, nebo dokonce jejich unášení na katodickou stranu od startu.

Agaróza je neutrální polysacharid, galaktan, u něhož se elektroendosmóza téměř neuplatňuje **vzorec agarózy??**. Řídká prostorová síť tohoto gelu umožňuje kvalitní separaci i pro vysokomolekulární látky. Používá se dodnes a v rutinních elektroforézách sérových bílkovin se při ní oddělí 6 frakcí: albumin, alfa 1, alfa 2, beta 1, beta 2 a gama globuliny.

Elektroforéza na **škrobovém gelu schéma řetězců amylozy ??** byla vyvinuta především pro své dobré dělicí schopnosti. Nosič se připravuje z částečně hydrolyzovaného škrobu nabobtnáním (rozvařením) v pufu a nalitím do pevné formy. Vzniká opět řídká prostorová síť, v níž dělení probíhá jak podle velikosti náboje, tak podle relativní molekulové hmotnosti. Při elektroforéze bílkovin séra na škrobovém gelu můžeme získat 20 - 25 frakcí. Vzhledem k pracnosti a nestandardnosti přípravy gelu však tato metoda nenalezla širší uplatnění.

Polyakrylamidový gel (PAAG) vzorec polyakrylamidu?? vzniká polymerací akrylaminu v reakci s N,N'-metylenbisakrylamidem. Vytvoří se prostorová síť, v níž se velikost pórů může měnit změnou koncentrací obou reaktantů. Dělení probíhá jak na základě velikosti náboje (hlavně řídké gely), tak na základě velikosti molekuly (koncentrovanější gely). Bílkoviny krevního séra lze na tomto nosiči separovat až na 30 i více frakcí. Podle způsobu provedení rozeznáváme PAAG elektroforézu diskovou (v trubičkách), kapilární, tenkovrstevnou, dvojrozměrnou a SDS-PAAG elektroforézu (viz dále). Polyakrylamidový gel může být také nosičem při izoelektrické fokusaci a při izotachoforéze. Všechny tyto metody se dodnes uplatňují ve výzkumu a některé z nich i při rutinních elektroforézách sérových bílkovin.

Při SDS gelové elektroforéze se do polyakrylamidového gelu přidává dodecylsulfát sodný (SDS, Na-laurylsulfát) a merkaptoethanol. Tato činidla udělí migrujícím molekulám při daném pH stejný náboj a přeruší jejich disulfidové vazby. Důsledkem je, že se molekuly dělí především podle své relativní molekulové hmotnosti.

Další typy a modifikace elektroforézy

V metodě zvané **kapilární elektroforéza** se separace provádí v kapiláře naplněné buď samotným elektrolytem (kapilární zónová elektroforéza, CZE) nebo gelem (kapilární gelová elektroforéza, CGE). Při dělení látek metodou CZE se využívá elektroosmotického toku, zatímco při CGE je tento fenomén gelovým prostředím potlačen. Elektroosmotický tok je spontánní tok kapaliny v kapiláře, který vzniká na základě náboje na vnitřní stěně kapiláry. Vnitřní povrch kapiláry nese fixní záporný náboj a spolu s kationty roztoku se vytvoří elektrická dvojvrstva. Kapalná fáze se pohybuje směrem ke katodě a nabitě i nenabitě částice jsou unášeny různou rychlostí až k detektoru.

Izoelektrická fokusace je separační metoda využívající existence izoelektrického bodu (pI) molekuly. Izoelektrický bod je hodnota pH, při níž je molekula elektroneutrální. Separacním médiem je gel, v němž je předem připraven gradient pH. Nabitě částice z rozdělované směsi putují až do místa odpovídajícího jejich pI a zde se zastaví. Metoda se používá buď samotná, např. pro analýzu proteinů v liquoru, nebo v kombinaci s elektroforézou v tzv. dvourozměrné elektroforéze. **(obrázek?)**

Dvourozměrná elektroforéza je tenkovrstevná gelová elektroforéza, při níž se na čtvercové plotně v jednom směru rozdělí molekuly na principu izoelektrické fokusace a po skončení se v kolmém směru provede SDS-PAAG elektroforéza. Metoda má výborné separační vlastnosti a používá se pro analýzu i velmi složitých proteinových směsí s kvalitativním hodnocením. **(obrázek?)**

Kombinace elektroforézy a imunoprecipitace se využívá v **imunoelektroforéze**. Na gelové plotně (nejčastěji agar 10 – 15 g/l ve vhodném pufru o pH okolo 8,6 ponechaný ztuhnout na skleněné podložce) se z krouhlých startů elektroforeticky rozdělí směs bílkovin a poté se z podélných žlábků nechá difundovat směs protilátek proti jednotlivým složkám dělených bílkovin. Za určitou dobu inkubace vzniknou precipitační linie, které se vizuálně hodnotí po vysušení a obarvení gelové plotny. Metoda je náročná na standardní provedení a interpretaci a její výsledky se hodnotí pouze kvalitativně. (obrázek?)

Také **imunofixace** je kombinací elektroforézy a imunoprecipitace. Elektroforéza proteinů séra nebo moči se provádí v gelu obsahujícím vedle sebe specifické protilátky jak proti těžkým řetězcům imunoglobulinů (běžně jsou k dispozici anti-IgA, -IgG a -IgM), tak zvláště proti lehkým imunoglobulinovým řetězcům kappa a lambda. (obrázek?)

Specifický způsob kombinace elektroforézy a dalších technik byl využit v tzv. **blotovacích metodách** (blot = skvrna). První z nich popsal v r. 1975 E.M.Southern a dostala po něm název **southern blotting**. Jednalo se o přenos fragmentů DNA po agarózové elektroforéze na nitrocelulóзовou fólii, hybridizaci s RNA, která byla označena radionuklidem a detekci autoradiografií. Analogická metoda pro detekci RNA byla pojmenována **northern blotting**.

V r. 1979 byly popsány blotovací metody pro analýzu proteinů, protein blotting, dnes známé pod názvem **western blotting**. Jejich principem je rozdělení směsi bílkovin elektroforézou v PAA nebo agarózovém gelu, přenos frakcí na nitrocelulóзовou fólii, reakce se specifickou protilátkou a detekce produktu druhou protilátkou značenou fluoresceinem, peroxidázou nebo radionuklidem.

Použití elektroforézy v klinické laboratorní diagnostice

Pro orientační posouzení patologických změn sérových bílkovin při různých chorobných stavech se dosud běžně požaduje elektroforéza bílkovin séra na acetylcelulóze nebo na agaróze spolu s kvantifikací denzitometrickým vyhodnocením obarvených frakcí.

Elektroforeogram zde poskytuje několik typických obrazů:

- Při **akutním zánětu** bývají zvýšeny tzv. pozitivní reaktanty akutní fáze (alfa-1-antitrypsin, orosomukoid, haptoglobin, ceruloplazmin, CRP, C3-komplement), což se projeví zvýšením alfa-1 a alfa-2-globulinů, příp. mírným snížením zóny albuminu. Globuliny gama zůstávají v normě. Příklad: akutní fáze infekčních onemocnění.
- **Chronický zánět** má zvýšenu jen gama-globulinovou frakci. Chronický aktivní zánět má typické znaky akutního zánětu spolu se zvýšenými gama-globuliny. Příklad: chronická revmatoidní artritida v aktivním stádiu.
- **Hepatální typ** elektroforeogramu s nízkou proteosyntézou má snížené zóny albuminu, alfa-1, alfa-2 a beta-globulinů, ale zvýšenou frakci gama-globulinů. Příklad: jaterní fibróza a cirhóza.
- Naproti tomu **nefrotický typ** elektroforeogramu má snížený albumin a zvýšené alfa-2 a beta-globuliny. Gama-globuliny mohou být v normě nebo mírně sníženy. Příklad: u nefrotického syndromu dochází ke ztrátám bílkovin, zvláště albuminu, močí. Zvyšují se bílkoviny s velkou Mr, např. alfa-2-makroglobulin a mohou se více syntézovat imunoglobuliny.
- U primární nebo sekundární **hypogamaglobulinémie** se pozoruje snížená frakce gama-globulinů.
- Největší význam tohoto typu elektroforéz spočívá v diagnostice **monoklonálních gamapatií**. Slabší nebo výraznější zóna paraproteinu se vyskytuje nejčastěji v oblasti beta nebo gama-globulinů. Současně může být oslabena albuminová a alfa-globulinová frakce. Přítomnost paraproteinu, tzv. M.gradient, lze na elektroforeogramu hodnotit většinou pouhým okem, tj. bez denzitometrické kvantifikace.

Diagnostická informační hodnota tohoto typu elektroforéz (s výjimkou monoklonálních gamapatií) dnes ztrácí na významu, neboť jsou běžně k dispozici specifická kvantitativní stanovení jednotlivých sérových bílkovin. Jednoduchá elektroforéza se často provádí právě pro vyhledání paraproteinu.

V pozitivním případě potom následuje typizace paraproteinu **imunofixací**.

Monoklonální protein (M-protein, M-gradient, paraprotein) může být tvořen jak kompletními molekulami imunoglobulinů, tak samotnými lehkými nebo těžkými řetězci. Indikací k vyšetření monoklonálního paraproteinu v séru a/nebo v moči je podezření na monoklonální gamapatii nejasného významu (MGUS), mnohočetný myelom, plasmocytom, maligní lymfoproliferativní onemocnění (chronická lymfatická leukémie, maligní lymfom, Waldenströмова makroglobulinémie), nemoc

těžkých řetězců a primární AL amyloidóza. Reakce paraproteinu se specifickými protilátkami proti lehkým a těžkým řetězcům odhalí jeho příslušnost k třídě imunoglobulinů a složení jeho řetězců, což umožní diagnostiku a usnadní léčebnou rozvahu.

Dalším častým elektroforetickým vyšetřením je **isoelektrická fokusace** mozkomíšního moku (viz dále videosekvence Izoelektrická fokusace). Klinický význam tohoto vyšetření spočívá v detekci intrathekální produkce globulinů.

Elektroforézy isoenzymů??

Videosekvence „Isoelektrická fokusace“ (zkrátit název!)

V klinických laboratořích patří elektroforézy mezi poměrně častá, sériově prováděná vyšetření. V minulosti se pro tento účel používalo množství různých, často improvizovaných zařízení a odlišných nosičů s různým separačním potenciálem. Dnešní snaze o standardizaci laboratorních technologií vyhovuje fakt, že celosvětově existuje jen několik výrobců komerčně nabízejících pro elektroforetické metody jak příslušná zařízení a pomůcky, tak i veškerý spotřební materiál. V Evropě mezi nimi dominuje firma Sebia, poskytující přístroje a materiály pro elektroforézy, imunofixace (**sem zařadit foto elfo séra a foto imunofixace**) a izoelektrické fokusace proteinů a pro elektroforetické separace lipoproteinů a některých isoenzymů.

V tomto videoklipu jsou na úvod demonstrovány komerční soupravy pro elektroforézu proteinů séra a pro imunofixaci spolu s výslednými elektroforeogramy. Dále pak jsou stručně zachyceny základní kroky postupu při isoelektrické fokusaci (IEF) vzorků mozkomíšního moku (CSF) pomocí přístroje Hydrasis Focusing a příslušných pomůcek a činidel (Sebia, Francie).

Komerční souprava pro tuto metodu obsahuje agarózové fólie (plotny), houbičky pro elektrodové knoty, nanášecí hřebeny, masku pro antisérum, přřezy filtračního papíru, roztoky 2 pufrů, diluent pro vzorky CSF a roztok antiséra proti IgG.

Nejprve se zvlhčují houbičkové knoty příslušnými pufrů. Poté se v označených mikrozkomavkách připraví zředěné vzorky mozkomíšního moku pacientů, a ty se pipetují do jednotlivých pozic 18místného nanášecího hřebenu. Do okamžiku aplikace na gel se hřeben uchovává ve vlhké komůrce.

Následuje navlhčení podkladové desky na pultu přístroje ethylenglykolem pro lepší přilnutí plotny (**zkrátit zvlhčování 2:00 – 2:30**). Na pult se položí agarózová plotna a přikryje se fólií proti odpařování a zvlhčení gelu. Do zlábků se umístí navlhčené knoty, komora se uzavře a spustí se příprava gradientu pH.

Po ukončení přípravy gradientu pH v agarózovém gelu se odstraní krycí fólie a na start se umístí nanášecí hřeben se vzorky mozkomíšního moku pacientů. Spustí se vlastní isoelektrická fokusace.

Jakmile je IEF ukončena, aplikuje se na povrch agarózové plotny roztok protilátky proti IgG. Provádí se to pomocí speciální masky, jejímž pohybem se antisérum rovnoměrně rozprostře po celém povrchu agarózového gelu. Následuje inkubace během níž vzniknou precipitační linie produktů reakce mezi IgG v CSF a anti-IgG protilátkou.

Po automatickém obarvení a promytí gelu, což není ve videoklipu zachyceno, je možno hodnotit a interpretovat výsledný obraz. Hodnocení separovaných frakcí (proužků) se provádí kvalitativně pouhým okem. (**Na konec zařadit foto isoelektricky separovaných bílkovin**)

Doporučená literatura

Doležalová V. a kol.: Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii. IDVPZ Brno 1995, ISBN 80-7013-198-5

Paulová H., Bochořáková H.: Elektroforéza proteinů. Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů. Dostupné na <http://portal.lf3.cuni.cz>

Ritchie R.F., Navolotskaia O.: Serum proteins in clinical medicine. Vol. I & II. Foundation for Blood Research, Scarborough Maine, USA., 1996

Tichý M.: Laboratorní analýza monoklonálních imunoglobulinů (paraproteinů). FINIDR s.r.o., Český Těšín 1997

Další zdroje:

<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Elektroforéza>

<http://cs.wikipedia.org/wiki/Elektroforéza>

<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200610/hypertext/AJAZE.htm>

<http://biolab-kt.cz/slp/HVEZDAAAZH.htm>