

Bílkoviny

Úvod

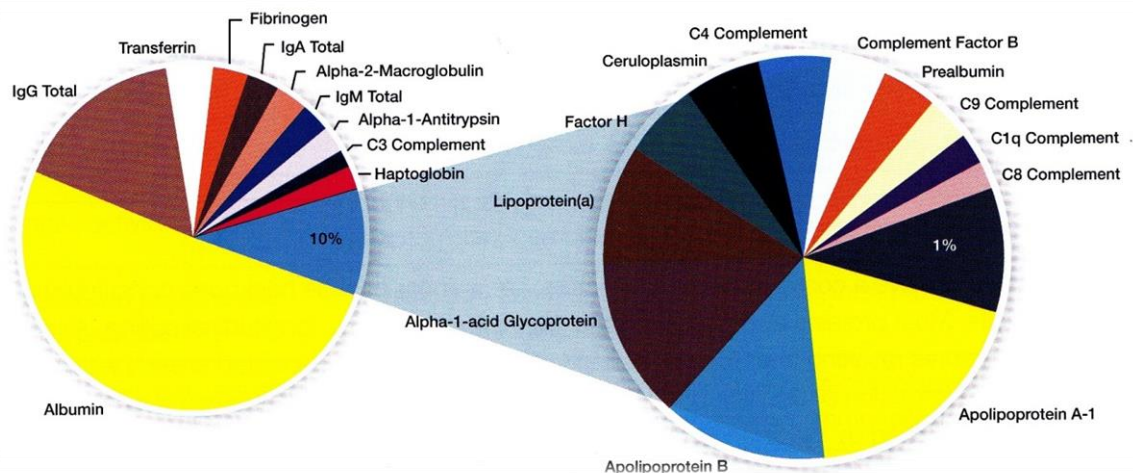
V lidském těle se nachází asi 500 000 různých druhů a forem proteinů. Jejich studiem, tzn. identifikací a kvantifikací všech proteinů v organismu, poznáním jejich struktury a biochemických vlastností, úlohou v buňce, orgánech i celém organismu, studiem změn těchto parametrů za fyziologických i patologických okolností se zabývá *proteomika (proteomics)*. Je to obrovská vědní oblast širokého záběru, jejíž význam stále roste. Výzkumný projekt, který se celou problematikou zabývá se nazývá HUPO (*Human Proteome Organization - Organizace humánní/lidské proteomiky, resp. zabývající se lidskou proteomikou; Internetová adresa je <http://www.hupo.org/>*).

V tomto textu se omezíme pouze na některé bílkoviny nacházející se v lidském těle. Předmětem našeho zájmu budou především bílkoviny krevní plazmy.

Bílkoviny krevní plazmy

Plasma obsahuje několik stovek, možná i několik tisíc proteinů, biologická funkce je však známa pouze u menší části z nich. Kromě albuminu a C-reaktivního proteinu jsou to glykoproteiny, s obsahem sacharidů mezi 10 – 25%.

Největší část obsahu plazmatických bílkovin tvoří albumin, dále pak imunoglobulin G a zbytek s víceméně stejným (menším) podílem tvoří transferin, fibrinogen, imunoglobuliny A a M, alfa-1-antitrypsin, složka komplementu C3 a haptoglobin. Asi 10% celkového obsahu plazmatických proteinů je rozděleno mezi lipoprotein (a) a apolipoprotein A1, které představují největší podíl této části plazmatických bílkovin, apolipoprotein B, kterého je o něco méně a v menších množstvích faktor H, ceruloplasmin, složku komplementu C4, komplement faktor B, složky komplementu C8, C9, C1q a prealbumin. Jedná se hrubý odhad obsahu nejdůležitějších plazmatických bílkovin, jejich obsah v plazmě se dynamicky mění, závisí na rychlosti syntézy a katabolismu a distribuci bílkovin mezi intravazální a extravazální tekutinu. Na následujícím obrázku je ukázáno poměrné zastoupení hlavních bílkovin v plazmě v grafické formě.



Převzato z edukačního materiálu fy Abbott, *Learning Guide Protein*

Význam bílkovin krevní plazmy

- **Udržování osmotického tlaku bílkovin** (tj. koloidně osmotického = onkotického tlaku), což je důležité zejména v krevní kapiláře, jejíž stěna propouští vodu i ionty a prakticky nepropouští bílkoviny, tedy osmotický tlak v kapiláře je dán zejména osmotickým tlakem bílkovin, na kterém se podílí z asi 70% albumin; význam pro udržení tekutin v krevním řečišti, zabránění vzniku otoků
- **Transport** řady látek, především látek nerozpustných ve vodě, případně i léků (*prealbumin, albumin, ceruloplasmin, transferin, apoproteiny, transkordin, protein vázající thyroxin = TBP*)
- **Obrana proti infekci** (imunoglobuliny = specifická humorální imunita a komplement = nespecifická humorální imunita)
- **Hemokoagulace a fibrinolýza** (koagulační faktory a faktory zajišťující rozpouštění trombu)
- **Funkce enzymů a inhibitorů**
 - enzymy (v plazmě jsou aktivní např. cholinesteráza a ceruloplasmin)
 - inhibitory proteáz bránící napadení poškozených a zanícených tkání proteolytickými enzymy (patří sem např. α_1 -antitrypsin, α_1 -antichymotrypsin a α_2 -makroglobulin)
- **Speciální funkce**, např. ochrana před volnými radikály, resp. zábrana jejich tvorby (*albumin, ceruloplasmin, haptoglobin, hemopexin*)

Metody stanovení celkových bílkovin

1. Podle Kjeldahla (referenční metoda)
2. Pomocí Folinova a Ciocalteuova činidla (Folin-Ciocalteu)
3. Biuretovým činidlem (biuret)
4. Přímá fotometrie v UV oblasti
5. Turbidimetrie
6. Vazbou barviva (pyrogallollová červeň)

Poznámka: metody 4., 5. a 6. jsou vhodné pro stanovení nízkých koncentrací proteinů (např. v moči, likvoru...)

Stanovení celkových bílkovin podle Kjeldahla

Princip: Po mineralizaci organické dusíkaté látky varem s koncentrovanou kyselinou sírovou se *dusík* přítomný ve formě různých funkčních skupin převede na *amoniak*, který zůstane vázán ve formě *síranu amonného*, alkalizací se amoniak ze síranu uvolní a stanoví se **titračně**.

a. mineralizace (kjeldahlizace)

Ke vzorku se přidá

- kyselina sírová + peroxid vodíku nebo
- kyselina chloristá nebo
- katalyzátor (tzn. směs síranu měďnatého, selenu a síranu draselného)

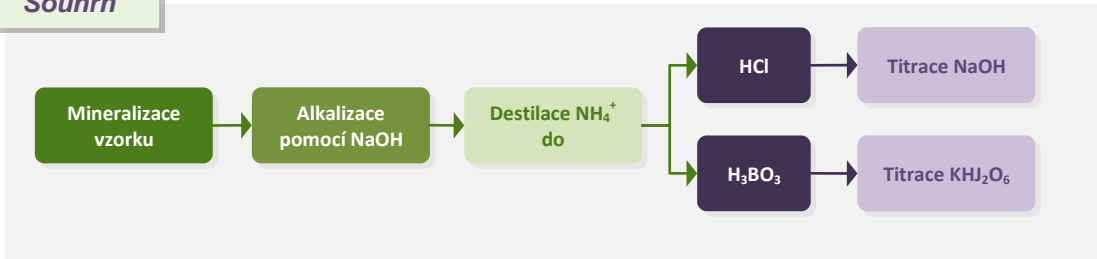
a vzorek se zahřívá na pískové lázni nebo elektrické plotně; kyselina sírová mineralizuje bílkoviny (obsah černá uhlíkem z organických látek), oxidační činidla převádějí uhlík na oxid uhličitý (mineralizovaná směs se odbarví). Odbarvení obsahu a husté bílé dýmy oxidu sírového avizují (oznamují) konec mineralizace. Dusík z organických látek dává s kyselinou sírovou *síran amonný*.

b. stanovení amonného iontu titračně:

Po alkalizaci obsahu mineralizační baňky louhem sodným se uvolněný amoniak destiluje s vodní parou do

- HCl + titrace nadbytku kyseliny louhem sodným, za použití metylčerveně jako indikátoru, *nebo* do
- H₃BO₃ + titrace KHJ₂O₆ (tj. KJO₃.HJO₃; kyselý jodičnan draselný), což je přesnější než titrace louhem

Souhrn



Poznámka: Existují i jiná uspořádání metody

Hodnota koncentrace bílkovin se vypočte pomocí empirického faktoru:

$$N_{\text{bílč}} \times 6,25 = \text{bílkoviny [g/l]},$$

kde **N** je hodnota stanoveného dusíku a 6,25 je empirický faktor: $100/16 = 6,25$ (bílkoviny obsahují v průměru 16% dusíku); v literatuře lze nalézt i jiné hodnoty přepočítávacího faktoru (obsah dusíku v jednotlivých bílkovinách se různí)

Stanovení bílkovin krevního séra kjeldahlizací je komplikovanější o to, že v krvi jsou přítomny i dusíkaté látky nebílkovinného původu. Je proto zapotřebí stanovit celkový dusík v krvi, poté vysrážet bílkoviny, např. kyselinou trichloroctovou a v supernatantu také stanovit dusík. Dusík bílkovin pak bude rozdílem mezi dusíkem celkovým a nebílkovinným:

Dusík plazmatických bílkovin = celkový dusík (plná krev) - nebílkovinný dusík (supernatant)

Metoda je obecně zdlouhavá a vyžaduje digestoř. V běžné praxi (klinické biochemie) se v podstatě nepoužívá, slouží však stále jako metoda referenční pro definici referenčních materiálů.



Kjeltec 8400

Dříve používaná rutinní mineralizační metoda

Vysrážené bílkoviny se mineralizovaly s kyselinou sírovou a

- vzniklý *síran amonný* se stanovil fotometricky při použití *Nesslerova činidla* ($K_2[HgI_4] = HgI_2 \cdot 2KI$) [tetrajodortuňatan draselný]
- uvolněný amoniak* reagoval za katalýzy nitroprussidem sodným s fenolovým činidlem (fenolátem sodným) *Berthelotovou reakcí* za vzniku modrého zbarvení vhodného k fotometrii.

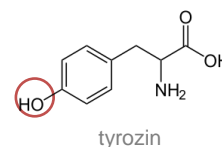
Existují moderní automaty na stanovení dusíku Kjeldahlovou metodou, které poskytují spolehlivé výsledky, a to poměrně rychle. Příkladem přístroje může být např. *Kjeltec 8400* firmy **FOSS**, učený pro analýzu potravin (podrobnosti lze nalézt [zde](#)).

Fotometrické stanovení bílkovin podle Folina

Činidlo se nazývá *fenolické*, protože se používá ke stanovení fenolů.

Princip: Fenolický hydroxyl tyrosinu z bílkoviny redukuje fosfomolybdenany a fosfowolframany činidla za vzniku modrého zbarvení (*wolframová a molybdenová modř*), které se fotometruje.

Standard: tyrozin (1 g bílkoviny obsahuje cca 16 mg tyrozinu)



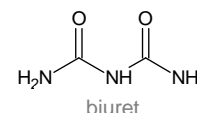
Stanovení bílkovin biuretovým činidlem

Princip: Tvorba fialově zbarvených komplexů mědi s bílkovinou

Reakce není specifická jenom pro bílkoviny, reagují i peptidy, počínaje tripeptidy (je nutná přítomnost minimálně dvou peptidických vazeb). Vhodné pro stanovení bílkovin v séru, v moči jedině po vysrážení a rozpuštění bílkovin (existují však přijatelnější metody – viz dříve), pro bílkoviny v mozkomíšním moku se nehodí.

Nejjednodušší takto stanovitelnou látkou je BIURET – odtud název metody. Biuret vzniká tepelnou přeměnou močoviny ($NH_2-CO-NH_2$).

Standard: albumin.



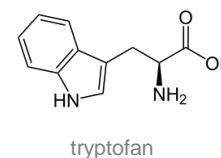
Stanovení bílkovin přímou fotometrií při 280 (260) nm

Princip: Aromatické kruhy tyrosinu a tryptofanu (ty jsou standardně zastoupeny ve většině proteinů) absorbují při 280 nm. Takto lze stanovit většinu bílkovin.

Interferují např. nukleové kyseliny, které ale absorbují více při 260 nm.

Interferenci lze potlačit zavedením korekčních faktorů.

Metoda je, při odpovídající instrumentaci, vhodná pro stanovení malých množství bílkovin.



Turbidimetrické stanovení bílkovin

Princip: Měření zákalu po denaturaci bílkovin kyselinou sulfosalicylovou, trichloroctovou, benzethoniumchloridem aj.

Dříve bylo velmi používáno tzv. *Extonovo činidlo*, jehož základem je kyselina sulfosalicylová. Moderním činidlem je *benzethoniumchlorid*.

Stanovení bílkovin s využitím vazby barviva na bílkoviny

Princip: Barvivo (*Coomasie modř*, *Ponceau červeně*, *pyrogallolová červeně*, *bromkresolová modř* aj.) se váže na bílkovinu, dojde ke změně zbarvení, měří se úbytek absorbance. V principu se jedná o stejný jev, jaký je popsán u průkazu bílkovin v moči diagnostickým proužkem, proteinovou chybu acidobazického indikátoru Standard: lidské sérum se známým obsahem bílkovin

Koncentrace celkových bílkovin v krevní plazmě (krevním séru) se pohybuje mezi 62 – 82 g/l.

Klinické poznámky

↓ **Hypoproteinémie** – příčiny: převodnění pacienta, malnutriční stavy, snížení koncentrace jedné nebo několika málo bílkovin (např. ztráta albuminu při nefrotickém syndromu, nedostatečná tvorba albuminu u těžkých hepatopatií aj. = celková hypoproteinémie)

↑ **Hyperproteinémie** – příčiny: dehydratace pacienta, zvýšení koncentrace jedné nebo několika málo bílkovin (např. polyklonální či monoklonální [hyperimmunoglobulinémie](#))

(↓ = snížené hodnoty, ↑ = zvýšené hodnoty)

Elektroforéza bílkovin

Princip Elektroforézou se rozumí **pohyb (nabitých) koloidních částic nebo iontů v homogenním stejnosměrném elektrickém poli**

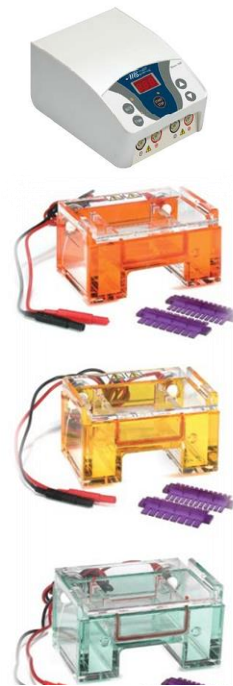
V podstatě lze rozlišit elektroforézu volnou, tj. v roztoku a elektroforézu na nosičích. V současné době se nejvíce používá tzv. elektroforéza zónová neboli *na nosičích*: elektroforeticky zkoumaná látka se pohybuje v pórovitém prostředí (agarový gel, agarosový gel, škrobový gel, polyakrylamidový gel, proužky z acetylované celulózy).

Pohyblivost jednotlivých částic (iontů) je ovlivňována

- napětím
- procházejícím proudem
- složením použitého pufru (*pH, iontová síla, použitý pufrový systém, čili přítomné ionty*),
- do jisté míry i použitým prostředím (*např. putování bílkovinných frakcí v agaru či agaróze se do značné míry blíží elektroforéze volné; v agaru se uplatňuje tzv. elektroendosmóza, která strhává některé frakce zpětným tokem ke katodickému konci a proto start musí být uprostřed nosiče, na rozdíl např. od elektroforézy na acetylované celulóze apod.*)
- velikostí molekuly testovaného iontu (*ve většině případů je prostředí tvořeno tzv. molekulovými sítě, typickými příklady jsou škrob a polyakrylamidový gel*). [Technické parametry v hodinách instrumentální analýzy].

V českých zemích je jedním z nejpoužívanějších komerčně dostupných nosičů *Hydragel* (firma *Sebia*), což jsou agaróзовé gely určené pro různé typy dělení (bílkovin v plazmě, v moči, v mozkomíšním moku; lipoproteinů; isoenzymů LD aj.) Viz též [WEB Sebia](http://www.sebia.com). Současným trendem je přechod na kapilární elektroforézu.

Kdo má rád hry, může si pohrát s vcelku zdařilým grafickým znázorněním vertikální gelové elektroforézy v polyakrylamidovém gelu o různých koncentracích na internetové adrese http://people.rit.edu/pac8612/electro/Electro_Sim.html; jediným požadavkem je angličtina, ale i bez ní to lze zvládnout, a připojení na Internet.

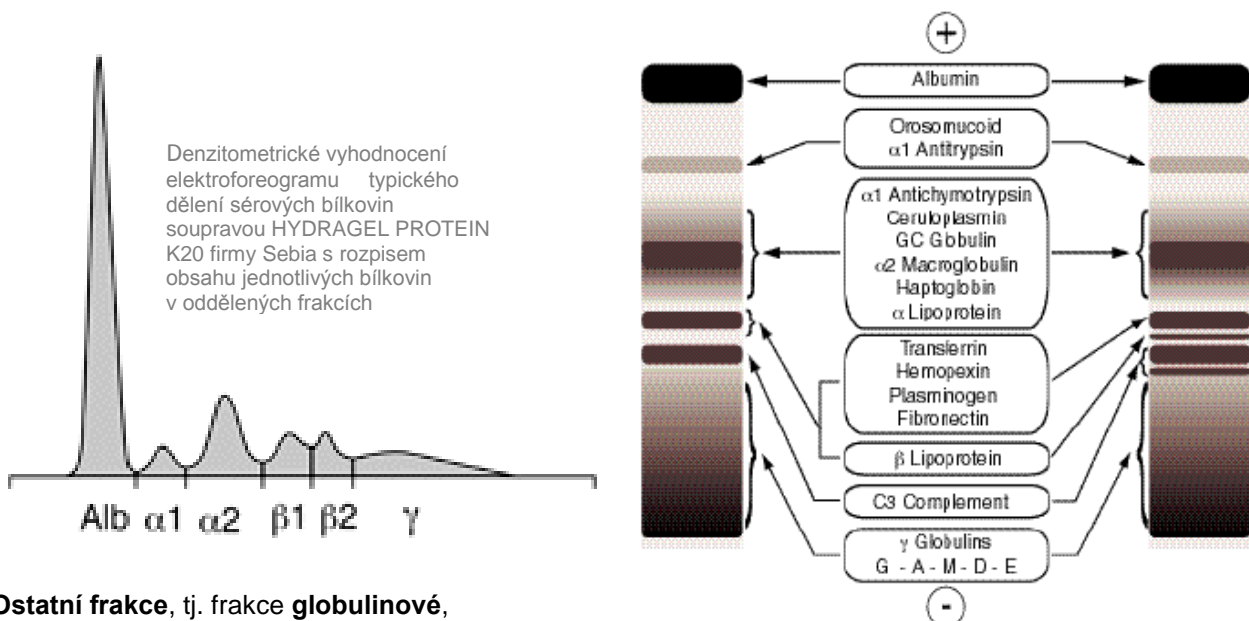


Ukázka zdroje a elektroforetických van z nabídky firmy BioTech a.s.

Rozdělení na frakce

Elektroforéza na fóliích z acetátcelulózy nebo v agarózovém gelu dělí bílkoviny krevního séra na 5 až 6 frakcí: **albumin** a **čtyři (až pět) frakcí globulinů** – α_1 , α_2 , β (β_1 a β_2) a γ . **Frakce albuminu** je tvořena **jedinou bílkovinou** (někdy je před albuminem patrná frakce prealbuminu, tj. *transthyretinu*).

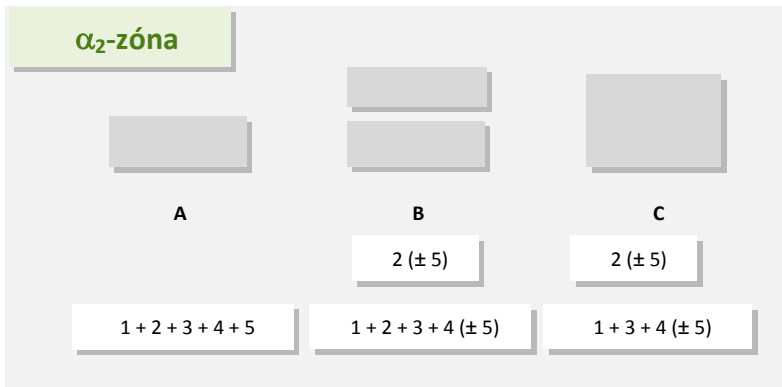
Elektroforeogram



Ostatní frakce, tj. frakce globulinové,

obsahují **větší množství bílkovin:**

- α_1 -globuliny: α_1 -lipoprotein, orosomukoid, α_1 -antitrypsin
- α_2 -globuliny: α_2 -makroglobulin, ceruloplasmin, haptoglobin, pre- β -lipoprotein
- β -globuliny: transferin, fibrinogen, C-reaktivní protein, β -lipoprotein
- γ -globuliny: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE



Rozkreslení možných tvarů dělení *alfa-2 zóny* (obrázky převzaty z, ev. upraveny podle firemních materiálů firmy A. L. Instruments a z www.sebia.com)

- 1 = α_2 -makroglobulin
- 2 = haptoglobin
- 3 = ceruloplasmin
- 4 = GC globulin
- 5 = α_1 -lipoprotein



Rozdělení sérových proteinů do pěti frakcí na Hydragelu firmy Sebia

Elektroforetické typy

Na základě dlouholetých zkušeností s elektroforézou bílkovin krevního séra na konkrétním nosiči lze z *charakteru rozdělení frakcí*, tj. z určitého *elektroforetického typu* (vymizení frakcí, objevení se nových frakcí, jiný vzájemný poměr frakcí atd.) usuzovat na určité skupiny chorob či stavů.

Nárůst (\uparrow , $\uparrow\uparrow$ atd. podle intenzity nárůstu) či pokles (\downarrow , $\downarrow\downarrow$...) jednotlivých frakcí lze hodnotit vizuálně nebo pomocí jednoúčelového fotometru, tzv. *denzitometru*, který výsledky vydá číselně i ve formě křivky.

ELFO typ	Elektroforetická frakce					
	Albumin	Globuliny				
		α_1	α_2	β_1	β_2	γ
1. Typ akutního zánětu	\downarrow	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow$	N	(\uparrow)	N
2. Typ chronického zánětu	\downarrow	\uparrow	\uparrow	N	N	$\uparrow\uparrow$ *)
3. Typ chronické hepatopatie	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\uparrow
4. Typ nefrotického syndromu	$\downarrow\downarrow$	N	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow$	\downarrow
5. Typ malnutrice	$\downarrow\downarrow\downarrow$	(\uparrow) N	(\uparrow) N	(\downarrow)	N	N
6. Typ monoklonální hyperimmunoglobulinémie	\downarrow	Kdekoli úzký proužek monoklonálního imunoglobulinu; γ -frakce může zcela vymizet				
7. Vzácnější nálezy	Viz dále popis "Vzácnější nálezy"					

*) široký pruh γ -globulinů různých typů = *polyklonální hyperimmunoglobulinémie*

Legenda: N = nezměněno, \uparrow = zvýšeno, \downarrow = sníženo [v obou případech počet šipek označuje sílu změny], (\uparrow) = může být zvýšeno

1. Typ akutního zánětu

Celková bílkovina je normální, lehké snížení albuminu, vzestup α_1 - a α_2 -globulinů, případně i β_2 -globulinů.

Akutní rozsáhlý zánět, především bakteriální. Nález je u všech akutních stavů (po operacích, úrazech, infarktu myokardu apod.). Akutní hepatitida. Aktivní zánět u revmatoidní artritidy, u rychle rostoucích malignit (zhoubných nádorů).

2. Typ chronického zánětu

Pokles albuminu. Vzestup α_1 - a α_2 -globulinů (menší než u typu ad 1.), výrazný vzestup γ -globulinů (široký pruh γ -globulinů na elektroforeogramu). Jedná se o tzv. polyklonální hyperimmunoglobulinémii. Chronické infekční choroby, zánětlivá onemocnění pojiva, autoimunitní choroby, maligní nádory



Automat HYDRASYS 2
Elektroforéza proteinů; firma Sebia

3. Typ chronické hepatopatie

Pokles albuminu, α_1 -, α_2 - a β -globulinů (tj. bílkovin tvořených játry). Vzestup γ -globulinů (především IgA, který se nalézá mezi γ a β globuliny a tvoří tzv. **β - γ můstek** mezi těmito frakcemi, γ -globulinová frakce nasedá přímo na frakci β -globulinů)
Těžká fibróza až jaterní cirhóza, chronická hepatitida.

4. Typ nefrotického syndromu (ztráty bílkovin)

Velký pokles albuminu. Pokles γ -globulinů.
Nárůst α_2 - a β -globulinů. (Ztráty především bílkovin s malou molekulou)
Nefrotický syndrom (chronická glomerulonefritida, postižení ledvin při systémových onemocněních, diabetická glomeruloskleróza, amyloidóza, některá infekční onemocnění)

5. Malnutriční typ

Celková bílkovina výrazně snížena. Velký pokles albuminu a β_1 -globulinů.
Chybění aminokyselin, z toho vyplývající porucha syntézy bílkovin.

6. Monoklonální hyperimmunoglobulinémie

Nižší koncentrace albuminu. Někde (tj. kdekoli) mezi α_1 - až γ -globuliny se nachází úzký proužek monoklonálního imunoglobulinu.
Nádorové onemocnění mnohočetný myelom. Waldenströмова makroglobulinémie, hemoblastózy, karcinom, plazmocytom aj. S věkem výskyt paraproteinů roste, ve stáří se i u zdravých lidí objevují benigní monoklonální imunoglobuliny, a to bez klinických příznaků onemocnění.

7. Vzácnější nálezy

Bisalbuminémie (zdvojení frakce albuminu), *analbuminémie* (chybí frakce albuminu), *deficit α_1 -antitrypsinu* (chybí α_1 -frakce), *atransferinémie* (pokles β_1 -globulinů), *hypogamaglobulinémie* (dědičný či získaný defekt syntézy imunoglobulinů).

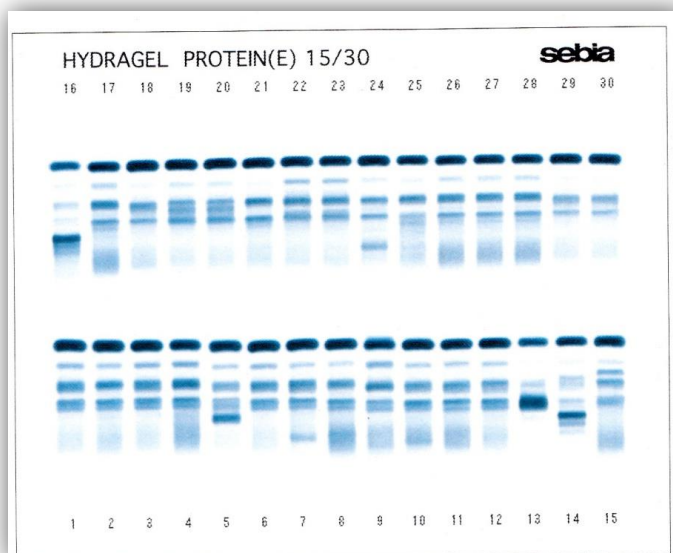
Hemolytické sérum – projevy při elektroforéze:

- posun α_2 -globulinů ke katodě
- zvýšení β_2 -globulinů)
- fibrinogen (proužek mezi β - a γ -globuliny),
- zvýšení β -lipoproteinů (LDL; intenzivní proužek v β -oblasti)

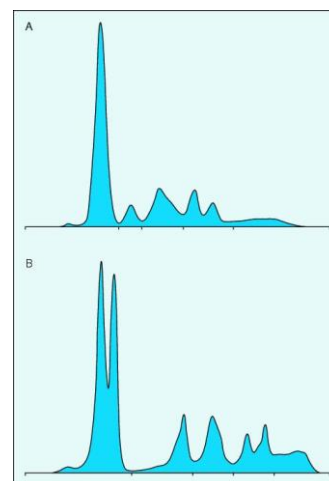


Přístroj pro kapilární elektroforézu od firmy Beckman-Coulter

Moderním trendem v oblasti elektroforézy bílkovin je využívání *kapilární elektroforézy*, což je v podstatě volná elektroforéza. Svými dělicími vlastnostmi se blíží metodám chromatografickým, je jednodušší a méně nákladná.



Různé elektroforetické typy, Agarosový gel, Hydrigel Protein(e) 15/30, firma Sebia



Hereditární bisalbuminémie

- A. Klasické dělení na Hydrigel Proteine
B. Dělení pomocí kapilární elektroforézy Capillarys® Sebia

Jednotlivé bílkoviny krevní plazmy

Prealbumin (transthyretin)

Jaterní transportní protein pro *hormony štítné žlázy*, molekulová hmotnost 55 000, váže i transportní bílkovinu pro vitamín A (zábrana ztrátám do moči)

↓ = porucha proteosyntézy v játrech u těžkých hepatopatií nebo proteinové malnutrice

Albumin

Představuje více než polovinu plazmatických bílkovin, tvoří se v játrech, molekulová hmotnost 68 000, ze 75% se podílí na onkotickém tlaku (osmotický tlak bílkovin) plazmy, transportní bílkovina pro nekonjugovaný bilirubin, neesterifikované mastné kyseliny, hormony štítné žlázy, vápník, hořčík, zinek a jiné minerály. Váže i některé léky. Součást extracelulárního antioxidantního systému v ochraně proti volným radikálům.

↓ = snížená syntéza u těžké hepatopatie či proteinové malnutrice, zvýšený katabolismus u akutních zánětů a nádorů v akutních stavech (negativní reaktant akutní fáze – viz str. 10-9), zvýšené ztráty ledvinami (nefrotický syndrom), do GIT, kůží ap., převodnění (hyperhydratace), v těhotenství (nárůst tělní tekutiny)

Metody stanovení albuminu

- **Bromokresolový purpur – BCP** (5,5'-dibrom-o-kresolsulfoftalein) tvoří s albuminem ve slabě kyselém prostředí za přítomnosti povrchově aktivních látek komplex vhodný k fotometrickému stanovení (603 nm), dochází k přeměně barvy ze žluté (barvivo) na zelenou (komplex)
- **Bromkresolová zeleň - BCG** (3,3',5,5'-tetrabrom-*m*-kresolsulfoftalein) se váže na albumin a vytvořený komplex se stanovuje fotometricky při 628 nm
- malá množství albuminu (např. v moči) se stanovují imunochemicky

Referenční hodnoty: 35 – 53 g/l (metoda s BCG, fa Erba Lachema s.r.o.)

Alfa₁-globuliny

Alfa₁-inhibitor proteáz (API)

Jaterní glykoprotein nazývaný též α_1 -antitrypsin (AAT), inhibitor proteolytických enzymů (elastázy, kolagenázy) uvolňovaných při zánětlivé reakci. Hlavní podíl α_1 -globulinové frakce.

↑ = akutní záněty a akutní závažné stavy, těhotenství

↓ = těžké hepatopatie, dědičný defekt tvorby API (důsledkem může být cirhóza jater, dále se rozvíjí plicní enfyzém)

Alfa₁-kyselý glykoprotein (orosomukoid)

Jaterní glykoprotein, fyziologická funkce není známa. Koncentrace stoupá u akutních stavů, klesá při poruše proteosyntézy v játrech

↑ = akutní stavy

↓ = porucha proteosyntézy v játrech

Alfa₁-fetoprotein

Tumorový marker, použití v prenatalní diagnostice. O AFP je pojednááno zvlášť v kreditním kurzu věnovaném biomarkerům.

Alfa₁-lipoprotein

Součást HDL2 a HDL3, v menší míře i HDL1 (viz kreditní kurz *Lipidy*)

Alfa₁-mikroglobulin

Molekulová hmotnost 26 000. Při snížení glomerulární filtrace stoupá v séru. V moči se nalézá při tubulární poruše (tubulární proteinurie) a v současnosti je považován za nejvhodnější ukazatel poruchy tubulárních funkcí ledvin. Má pravděpodobně fyziologickou protektivní funkci (imunoregulační, imunomodulační).

↑ = snížení glomerulární filtrace (podobně ostatní mikroproteiny)

Alfa₂-globuliny

Alfa₂-makroglobulin

Molekulová hmotnost 820 000, inhibitor *endoproteáz* (trypsinu, chymotrypsinu, plazminu aj.)

↑ = nefrotický syndrom, chronické hepatopatie, v dětském věku

↓ = akutní pankreatitida

Haptoglobin

Jaterní glykoprotein složený ze čtyř řetězců (tetramer) dvou typů a několika variant. Pevně váže hemoglobin a komplex je rychle vychytán buňkami RES z krevního oběhu. Zabraňuje tvorbě nebezpečného hydroxylového radikálu

↑ = akutní stavy

↓ = poruchy proteosyntézy v játrech, intravaskulární hemolýza (velmi nízké až nulové hodnoty haptoglobinu)

Ceruloplazmin

Protein s osmi atomy mědi v molekule. Transport mědi. Oxidázová aktivita (zábrana vzniku nebezpečného hydroxylového radikálu)

Ke vzniku volných hydroxylových radikálů vede např. tzv. **Fentonova reakce**:



Role ceruloplazminu spočívá v tom, že katalyzuje oxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+} a zmíněnou Fentonovu reakci tak inhibuje:



↑ = postupný nárůst v těhotenství

↓ = genetická porucha způsobující nedostatečnou tvorbu ceruloplazminu, tzv. hepatolentikulární degenerace (Wilsonova choroba)

Ferritin

Zásobní bílkovina pro železo, nachází se v játrech, ve slezině, kostní dřeni a střevní sliznici. Tumorový marker.

Proteiny transportující hormony

Např. *transkortin* přenáší k kortizolu, *globulin vázající tyroxin* (tj. thyroxin-binding globulin, TBG).

Beta-globuliny**Transferin**

Jaterní β_2 -globulin, molekulová hmotnost 76 500, může vázat dva atomy železa (Fe^{3+}), transportní bílkovina pro železo

↑ = nedostatek železa v organismu (při malnutrici nedojde ke zvýšení);

↓ = přebytek železa v organismu (hemosideróza, hemochromatóza, osteomyelofibróza aj.), porucha proteosyntézy v játrech, akutní zátěž organismu

Bezsacharidový transferin – transferin se sníženým podílem cukerné složky (*carbohydrate-deficient transferin, CDT*), nachází se u alkoholiků (dg význam pouze u mužů).

Hemopexin

β_2 -globulin vázající hem, podobná funkce jak u haptoglobinu

↑ = hemolytická anémie

↓ = akutní stavy

Složky komplementu C3 a C4

Komplement = 11 proteinů, patří k faktorům nespecifické humorální imunity (aktivuje se např. vazbou antigenu a protilátky, výsledkem je lýza bakterií či jiných buněk)

↑ = akutní zátěž

↓ = tvorba imunokomplexů (např. autoimunitní choroby)

Beta-lipoprotein

β_2 -globulin, lipoprotein (LDL) (viz kreditní kurz *Lipidy*)

Beta₂-mikroglobulin

Mikroprotein, molekulová hmotnost 11 800, součást HLA systému na povrchu buněk, produkt myeloidních a lymfoidních buněk, tumorový marker (odráží proliferaci buněk tohoto původu)

↑ = v moči – poruchy tubulu, v séru - pokles glomerulární filtrace

C-reaktivní protein (CRP)

Precipituje C-polysacharid pneumokoků (odtud název). Jaterní protein. Bílkovina akutní fáze s nejrychlejší a nejvýraznější reakcí ze všech bílkovin akutní fáze, zvl. u bakteriálních infekcí (viz kreditní kurz *Biomarkery*)

↑ = akutní zánět, akutní stavy (revmatické choroby, malignity, stres, pooperační stavy apod.)

Fibrinogen

Plazmatická bílkovina, molekulová hmotnost 340 000, při elektroforéze putuje mezi beta- a gama-globuliny. Uplatňuje se při hemokoagulaci (viz hematologie); rizikový faktor aterosklerózy

↑ = akutní stavy (např. zánětlivé choroby pojiva)

↓ = těžké hepatopatie (nedostatečná syntéza), diseminovaná intravaskulární koagulopatie = DIC (zvýšená spotřeba)

Gama-globuliny

Největší podíl této frakce tvoří imunoglobuliny (zasahují však až do frakce beta a zčásti i do frakce alfa₂), tvořené buňkami lymforetikulárního systému, protilátky při reakci s antigenem.

IgG

Tvoří největší podíl plazmatických imunoglobulinů. Odpověď na rozpustné antigeny (toxiny a produkty lýzy bakterií), procházejí fetoplacentární bariérou a novorozenec má vysokou hladinu IgG. Ta klesá, nejnižší je mezi 3. - 6. měsícem. Vlastní tvorba IgG začíná již před narozením dítěte.

IgA

Vyskytují se v plazmě jako monomer, na povrchu sliznic (GIT, spojivky, dýchací cesty) jako dimer, neprocházejí fetoplacentární bariérou, ochrana sliznic před bakteriální infekcí.

IgM

V plazmě jsou ve formě pentameru, molekulová hmotnost 970 000, rychlá reakce na bakteriální a virovou infekci (později je jejich tvorba vystřídána tvorbou IgG protilátek).

IgD

Nachází se jako membránový protein (spolu s IgM) v membránách zralých B-lymfocytů. Ve velmi omezeném množství existuje i ve vylučované formě (monomer) a lze ho nalézt ve velmi nízkých koncentracích v krevním séru. Jeho funkcí je (pravděpodobně) předat signál B-lymfocytům, aby se aktivovaly, čímž se stanou připraveny zaujmout své místo v imunitním systému při obraně organismu.

IgE

Tzv. reagíny u alergiků, reagují s alergeny, přitom se uvolňují mediátory alergické reakce z mastocytů (např. histamin).

Stavy s nadbytkem a nedostatkem imunoglobulinů

↓ = *hyp imunoglobulinémie*: fyziologicky u novorozenců a kojenců, dědičné poruchy syntézy všech tříd = agamaglobulinémie (důsledkem jsou těžké bakteriální infekce), nebo jen některých = dysgamaglobulinémie (u některých typů se vyskytuje porucha buněčné imunity)

↑ = *hyperimmunoglobulinémie*: *polyklonální*, vznikají protilátky různých typů, na elektroforeogramu široký pruh v oblasti gama-globulinů (chronické záněty, chronická hepatopatie, automimunitní choroby); *monoklonální*, tvoří se jediný typ Ig, úzký pruh na elektroforeogramu (viz dále *paraproteiny*)

Monoklonální imunoglobuliny (paraproteiny) jsou produktem jednoho klonu (kmene) proliferačních buněk B-lymfocytové řady. Jejich molekula je tvořena těžkými řetězci pouze jedné třídy (případně podtřídy) a lehkými řetězci jednoho antigenního typu. Paraproteiny jsou obvykle složeny z *kompletních molekul* a nacházejí se v pořadí, v jakém jsou koncentračně v krvi zastoupeny jednotlivé imunoglobuliny, tj. IgG, IgA, IgM, IgD a IgE. Jiné názvy pro tyto proteiny jsou *myelomové proteiny* nebo *M-proteiny*. Jsou-li tyto proteiny zjištěny v krevním séru/plazmě jedná se o *monoklonální gamapatii (monoklonální hypergamaglobulinemii)*. Některé paraproteiny jsou tvořeny z *nekompletních molekul* monoklonálních imunoglobulinů. Tvoří je lehké řetězce kappa nebo lambda. Příkladem je *Bence-Jonesova bílkovina*. Vyskytují se i paraproteiny s nekompletní molekulou tvořené pouze těžkými řetězci (*Franklinova choroba*).

Monoklonální gamapatie se dělí na *primární* a *sekundární*. Primární monoklonální gamapatie mají svůj původ v autonomní transformaci a proliferaci (*novotvoření, bujení, chorobný růst*) plazmatických buněk, sekundární jsou způsobeny autoimunitními, infekčními, metabolickými a toxickými onemocněními.

Klasickými metodami vyšetřování monoklonálních gamapatií je vedle *standardní elektroforézy* také *elektroforéza imunofixační* a *turbidimetrické či nefelometrické vyšetření sérových hladin volných lehkých řetězců*.

Novou analytickou metodou v diagnostice a hodnocení průběhu monoklonálních gamapatií je **HEVYLITE METODA** (HLC – *Heavy Light Chain*, čili těžké a lehké řetězce). V metodě se využívají protilátky specifické proti *junkčním* (tj. týkajících se tzv. „pantů“) epitopům umístěným mezi konstantními doménami těžkých a lehkých řetězců molekul imunoglobulinu. Tyto protilátky umožňují separátní rozpoznání a kvantifikaci lehkých řetězců κ a λ . Stupeň klonality se obecně určuje z poměru/indexu κ / λ . *Hevylite* v rámci jedné třídy imunoglobulinů (např. IgG) umožňuje separátní kvantitativní vyhodnocení (např. IgG κ a IgG λ), což dává podobné možnosti jako výše uvedený index.

Polyklonální gamapatie. Pokud je antigenním podnětem aktivováno více klonů plazmatických buněk, dochází ke zvýšení koncentrace imunoglobulinů příslušejících více třídám, pak se hovoří o *polyklonální gamapatii* (*polyklonální hypergamaglobulinemii*).

Nález paraproteinu je třeba vždy považovat za významný, i když se, poměrně řídké (1-3%), vyskytuje i u zdravých jedinců ve věku <50 roků. Ve starším věku se, díky poklesu imunitní kontroly, jeho frekvence výskytu zvyšuje, ve věku >75 let až na 3 - 10%. V současné době je výskyt monoklonální gamapatie považován za významný premaligní marker, protože u 20 – 25% nosičů paraproteinu dojde po 1 až více letech k malignímu zvratu. Výskyt paraproteinu v podstatě signalizuje nekoordinovanou proteosyntézu.

Zájemce o více podrobností z problematiky paraproteinů odkazují na výbornou monografii profesora Tichého: *Tichý, M., Laboratorní analýzy monoklonálních imunoglobulinů (paraproteinů), FINIDR, s.r.o., Český Těšín, 1997*



Elektroforéza séra v agarosovém gelu (HYDRAGEL) s nálezem paraproteinu.

2 pacientská séra dělená v duplikátu. Sérum v pozicích 3 a 4 má výrazný paraprotein.

Paraprotien (IgA s hodnotou 58 g/l !)

Imunochemické metody stanovení bílkovin

Imunochemické metody jsou moderní vysoce citlivé a specifické metody, vhodné pro stanovení *jednotlivých* bílkovin krevní plazmy. **Principem je reakce mezi antigenem a specifickou protilátkou.**

Úvod

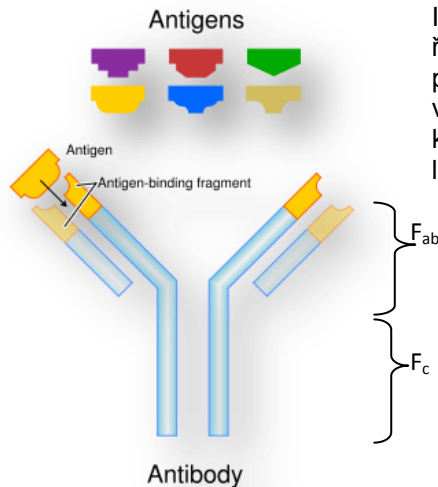
Antigen (imunogen, kompletní antigen): Vysokomolekulární látka (protein, polysacharid, lipoprotein, lipopolysacharid, glykoprotein; mikroorganismy; viry; apod.) mající ve své molekule několik vazebných míst pro navázání protilátky (tzv. *epitopů*) a je schopna vyvolat tvorbu protilátek. Antigeny vyvolávají imunitní odpověď v reaktivním organismu, namířenou specificky proti použitému antigenu. Nejlepší antigení vlastnosti mají bílkoviny.

Poznámka: V literatuře se lze s pojmem antigen setkat v poněkud odlišných významech:

- *Jednak jako s výrazem pro sloučeniny, které sice reagují s protilátkami, ale samy nejsou imunogenní. V tomto případě se pro látky, které mohou vyvolat imunitní odpověď (buněčnou, humorální, nejčastěji obě), užívá výraz imunogen. Pak platí, že je každý imunogen antigenem, ale opačně to neplatí.*
- *Moderní prameny mluví zcela opačně, tj. pojem imunogen se vůbec nepoužívá a používá se výraz antigen v původním významu, tedy jako označení pro látku schopnou vyvolat imunitní odpověď organismu.*

Epitop: část molekuly antigenu, která se účastní vlastní reakce s protilátkou; tato část (makro)molekuly (epitop) se váže ve vazebném místě protilátky nebo na buněčný receptor buněk T; dříve se nazývala "antigení determinanta"; epitopů může být v molekule imunogenu několik, např. na molekule vaječného albuminu se jich nachází 5, na molekule thyroglobulinu se nachází 40 epitopů.

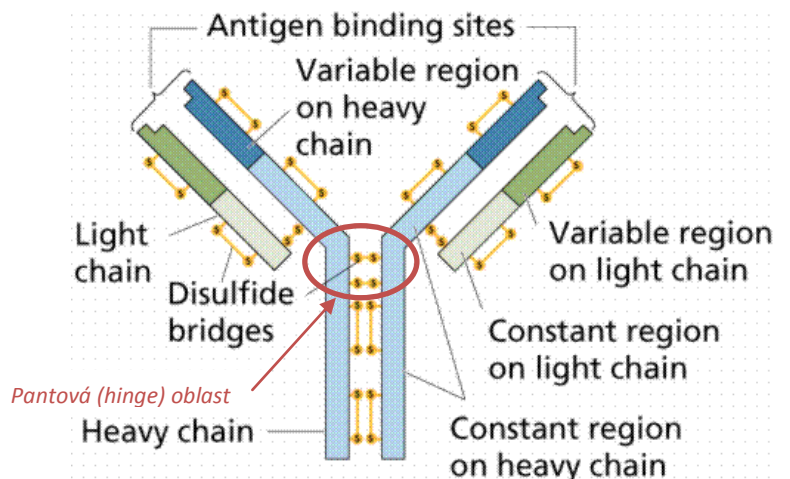
Hapten (nekompletní antigen): Jakákoliv nízkomolekulární látka, která nemůže vyvolat tvorbu protilátek, ale která s produkty imunitní odpovědi může specificky reagovat. I když sama o sobě nemůže vyvolat tvorbu protilátek, může „vysytit“ vazebné oblasti protilátek a tím zabránit reakci antigen-protilátka



Pomůcka k obrázkům - slovník:

antibody = protilátka
 antigen/s = protilátka/y
 antigen-binding fragment = část/fragment
 vazající antigen
 binding sites = vazebná místa
 variable/constant region =
 variabilní/konstantní oblast
 light/heavy chain = lehký/těžký řetězec
 disulfide bridges = disulfidové můstky

Protilátky: Immunoglobuliny, které se dělí do 5 tříd: IgG, IgA, IgM, IgD a IgE. Všechny imunoglobuliny obsahují dvě dvojice polypeptidových řetězců, které jsou v molekule uspořádány symetricky, molekula protilátky má tvar písmene Y - viz obrázek: oblast Fab obsahuje vazebná místa, která se liší u různých protilátek. Oblast Fc je konstantní částí řetězce v rámci protilátkové třídy. Rozlišují se řetězce lehké (L, od *light* = lehký) a těžké (H, od *heavy* = těžký). Existuje pět variant těžkých řetězců označených γ , α , μ , δ , ϵ - odtud pět tříd imunoglobulinů (tj. G, A, M, D, E, viz výš) a dvě varianty lehkých řetězců označených κ , λ - podle nich se řadí protilátky do dvou *antigenních typů* K a L. V imunoglobulinech jsou seskupeny vždy dva lehké a dva těžké řetězce. Podle dalších odlišností ve struktuře jednotlivých řetězců lze rozlišovat ještě podtřídy a podtypy imunoglobulinů. Všechny imunoglobuliny obsahují cukernou složku, jsou to tedy glykoproteiny.



Dohoda: Antigenem může být i protilátka (je to bílkovina!). Proto se v laboratorní praxi většinou označuje jako antigen určovaná (stanovovaná) bílkovina. Protilátka proti určované bílkovině (antigenu) se nachází v antiséru.

Antiséra: Jsou to séra s obsahem specifických protilátek proti příslušnému antigenu. Připravují se imunizací zvířat opakovaným parenterálním (mimo trávicí trubici, např. injekčně) podáváním antigenu.

Komerční séra proti lidským sérovým bílkovinám („antihumánní séra“) bývají

- **monovalentní** (obsahují jednu protilátku proti konkrétní sledované bílkovině) a
- **polyvalentní** (obsahují protilátky proti mnoha bílkovinám).

Protilátky mohou být

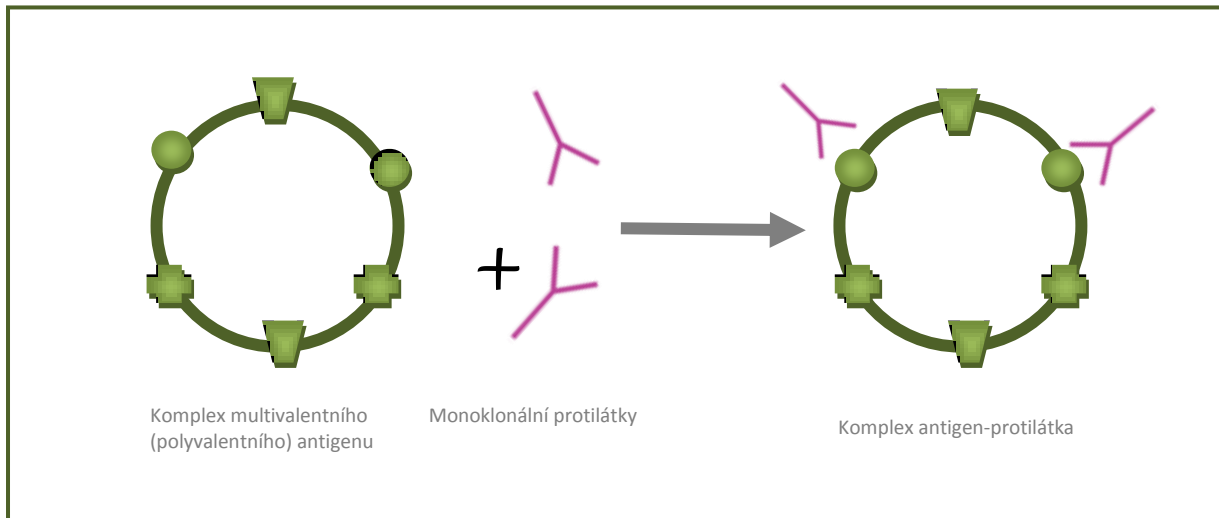
- **monoklonální**, tzn., že pocházejí z jednoho klonu buněk, vyráběné metodami genetického inženýrství (viz str.13). Molekuly protilátek jsou stejné struktury bez variant, tvoří je jedna třída řetězců H a jeden typ řetězců L. Jsou vysoce specifické pro *jeden epitop* na multivalentním antigenu.
- **polyklonální** (produkt více klonů buněk) tvoří směs protilátek reagujících se stejným antigenem, ale s různými epitopy

V laboratorní praxi se používají k detekci antigenů jak monoklonální, tak polyklonální protilátky, přičemž oba typy mají své přednosti v konkrétních aplikacích.

Pokud se jedná o detekci protilátek v séru pacienta, pravděpodobně půjde o polyklonální protilátky produkované imunitním systémem pacienta.

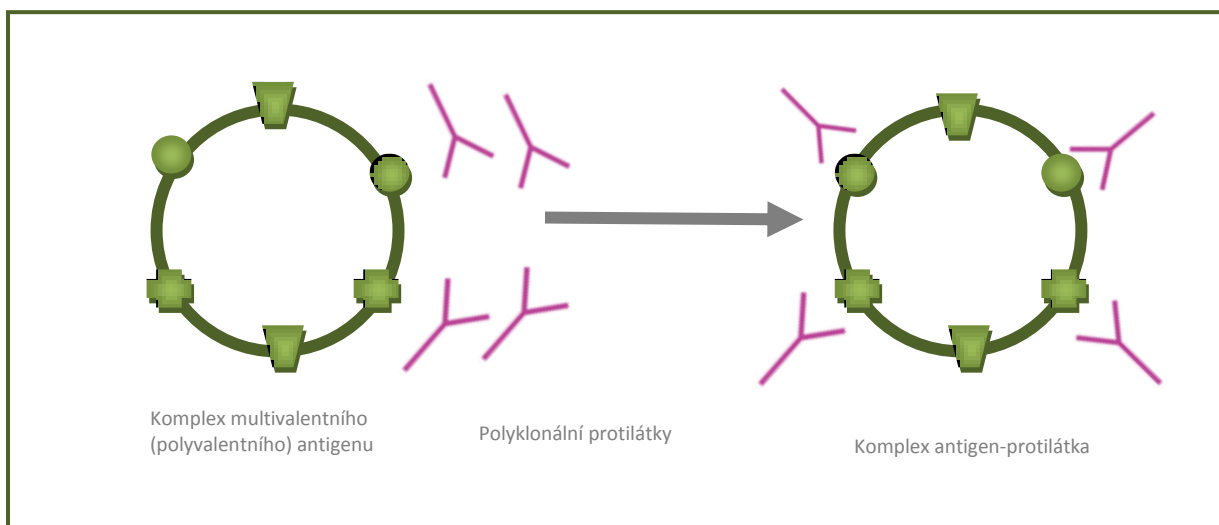
Reakce multivalentního antigenu (s více epitopy) s monoklonální protilátkou

Specifita monoklonálních protilátek k jednomu epitopu



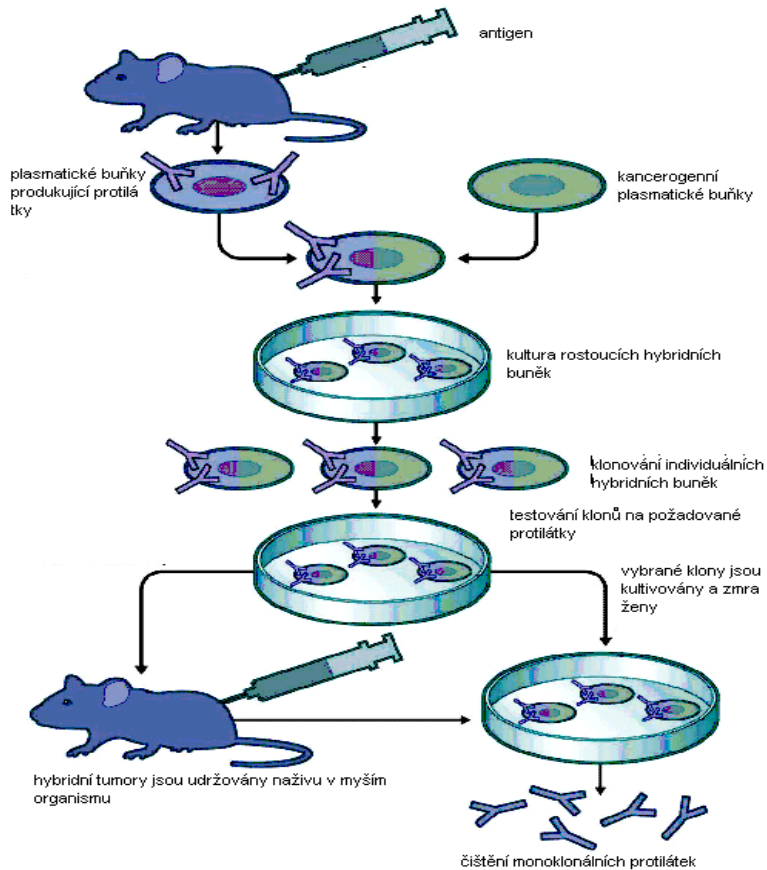
Reakce multivalentního antigenu (s více epitopy) s polyklonální protilátkou

Mnohočetná specifita polyklonálních protilátek k více epitopům jednoho antigenu



Monoklonální protilátky se liší od polyklonálních protilátek vysokou specifitou k jednomu epitopu na multivalentním antigenu, jak je ukázáno na obrázku výš. Jsou produkovány jednou buněčnou linií a buněčnými liniemi myších myelomů, za využití hybridizační technologie (*hybridoma technology*).

Hybridomy (hybridomas) jsou nádorové (tumorové) buňky produkující protilátky v mnoha kopiích identické molekuly protilátky a snadno rostoucí v podmínkách laboratorních buněčných kultur.



Postup přípravy monoklonálních protilátek

Celý postup sestává z několika kroků:

Vpravení specifického antigenu do hostitelského organismu (myš); B-buňky začnou (omezenou dobu) produkovat příslušnou protilátku

Izolace B-buněk (z myší sleziny)

Spojení (fúze) B-buněk se specifickým typem tumorových buněk, které se neustále dělí (snadno rostou v tkáňové kultuře), ale neprodukují protilátky; po fúzi začnou protilátky produkovat

Izolace úspěšných hybridů (fúzané buňky), které produkují protilátky se specifitou proti uvažovanému antigenu (a v tkáňové kultuře se množí)

Obrázek je převzat (a přizpůsoben) z edukačního materiálu firmy ABBOTT

Reakce mezi antigenem a protilátkou: Slouží ke kvalitativní a kvantitativní detekci antigenů a protilátek. Jedná se o reakci rozpustného antigenu a rozpustné protilátky.

Výsledkem reakce mezi antigenem a protilátkou může být

- zákal
- vazba bez změny koloidního stavu (senzibilizace)
- aglutinace a
- precipitace

Aglutinace: Antigen se při setkání se specifickou protilátkou shlukuje v dobře viditelné vločky nebo zrníčka (tzv. aglutinát). Aglutinát je tvořen hlavně *antigenem*.

Precipitace: Antigen tvoří s protilátkou komplexy, které po dosažení větších rozměrů vypadnou z roztoku (precipitují). Precipitát je tvořen především *imunoglobulinem* (protilátkou). Množství precipitátu je závislé na kvantitativním poměru antigenů a protilátek – existuje optimální koncentrace, kdy se tvoří precipitát, a mimo kterou dochází k rozpouštění (resp. netvoření) precipitátu.

Imunoprecipitační reakce může obecně probíhat v *gelovém prostředí* nebo v *roztoku*. Ještě v nedávné době reakce v gelovém prostředí tvořila základ většiny specifických metod stanovení jednotlivých proteinů. Dnes má větší význam reakce v roztoku, i když metody založené na reakci v gelovém prostředí opuštěny nebyly – lze jejich pomocí stanovit nižší hladiny bílkovin než reakcí v roztoku. Imunoprecipitační reakce má svá úskalí – precipitát se tvoří při optimálním množství obou komponent – antigenu a protilátky. Při nadbytku některé z těchto složek se při určité koncentraci začne precipitát rozpouštět (*hook efekt = efekt prohnutí křivky do háku; hook = hák; prozon efekt*). Závislost tvorby precipitátu na vzrůstající koncentraci (např.) antigenu při neměnném množství (v tomto případě) protilátky vyjadřuje tzv. *imunoprecipitační křivka*. Po vzrůstajícím nárůstu precipitátu dojde ke stagnaci tvorby a posléze k jeho rozpouštění.

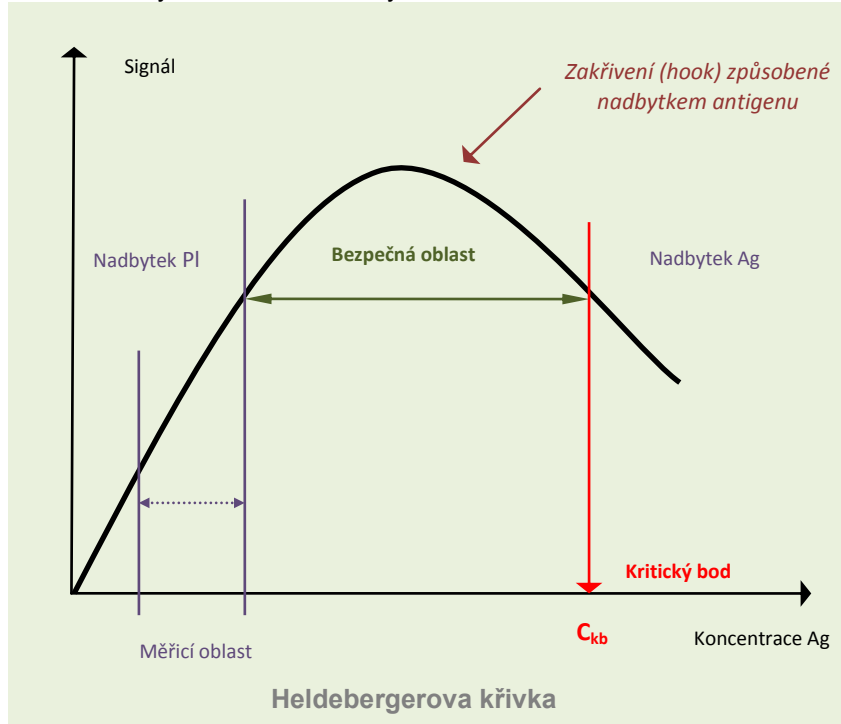
Jedna hodnota koncentrace precipitátu tak odpovídá dvěma koncentracím antigenu!

Měřicí oblastí je lineární část na vzrůstající straně grafu (viz obrázek). Je to lineární část nacházející se v oblasti **nadbytku protilátky**. Následuje **zóna ekvivalence** a posléze oblast **nadbytku antigenu**.

Koncentrace antigenu, při níž začíná oblast nadbytku antigenu (tj. bod na křivce odpovídající poslednímu bodu měřicí oblasti) se nazývá **kritický bod**.

Kritický bod je nutno při zavádění metody důkladně ošetřit, tzn., je třeba provést taková analytická opatření, aby nedošlo k omylu při odečítání vyšších koncentrací antigenu (aby nedošlo k mylnému odečtení nízké koncentrace, zatímco se jednalo o vysokou koncentraci antigenu a rozpouštění precipitátu!).

To jsou omezení turbidimetrických a nefelometrických metod.



Imunoprecipitační křivka (Heldebergerova křivka)

Charakteristický tvar křivky – závislost tvorby precipitátu na množství antigenu přidávaného k neměnnému množství protilátky.

Na svislé ose je vynesena koncentrace vzniklého precipitátu resp. signál odpovídající této koncentraci (např. naměřená turbidance), na vodorovné ose je vyneseno vzrůstající množství antigenu.

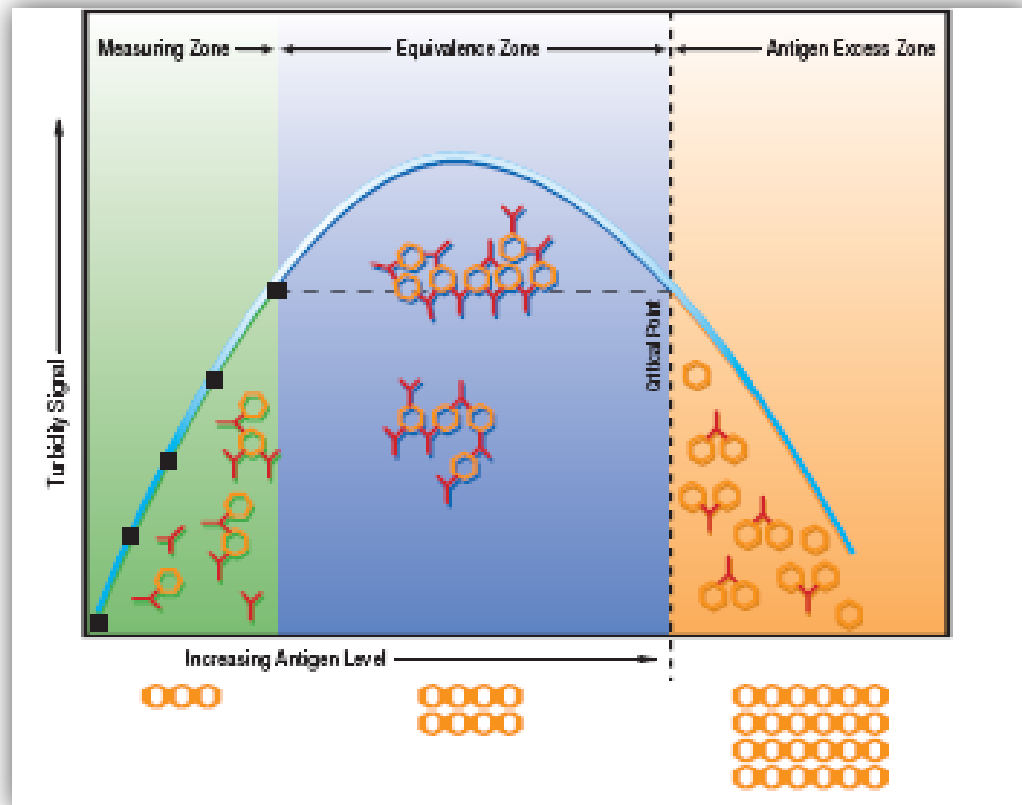
Měřicí oblast: koncentrace antigenu, které lze bez problémů změřit; dolní a horní limit měřicí oblasti odpovídají nejnižším a nejvyšším kalibračním koncentracím (rozsahu kalibrační křivky)

Bezpečná oblast: až do koncentrace označené na schématu jako C_{kb} , tedy koncentrace antigenu v kritickém bodu je zřejmé, že koncentrace stanovované bílkoviny (antigenu) je vyšší, než horní limit měřicí oblasti; vzorek se v tomto případě naředí tak, aby se koncentrace pohybovala v měřicí oblasti; od koncentrace v kritickém bodu to zřejmé není.

Řešení problémů s imunoprecipitační křivkou: Jednou z možností řešení je sestavení **3D křivky**, kde třetím rozměrem je rychlost tvorby precipitátu (tj. čas): platí, že nikdy nejsou všechny tři hodnoty totožné a tak se dá odlišit oblast za kritickým bodem.

Rychlost tvorby precipitátu a jeho případné rozpouštění tzn. pokles turbidance v čase (tzv. *prozon efekt*) sledují u *homogenních zákalových metod* (str. 10-20) i moderní automaty. Při detekci prozon efektu jednak vydají hlášení a také (podle nastavení) mohou původní vzorek naředit, či vzít ho do analýzy menší množství a analýzu zopakovat.

Prozon efektu u *vazebných testů* (str. 10-22) se jejich konstruktéři brání např. dvoustupňovým uspořádáním (dvoustupňovým formátem) metody, kde se využívají promývací kroky k odstranění nadbytečného antigenu.



Obrázek imunoprecipitační křivky převzatý z edukačního materiálu fy Abbott *Learning Protein*

Imunoprecipitační reakce v gelovém prostředí

Obrazový materiál v tomto odstavci označený (UP) byl převzat z WEB Univerzity Palackého, Biochemického oddělení, oboru molekulární biochemie, <http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/BAM/Imunometody.pdf>

Princip: Antigen a protilátka difundují do gelového prostředí (kterým je nejčastěji agarózový gel) různou rychlostí. Rychlost difúze závisí na koncentracích antigenu a protilátky, jejich fyzikálně chemických vlastnostech a na struktuře a vlastnostech gelového prostředí. V místě optimální koncentrace vytvoří precipitační oblouk, který se pro lepší zviditelnění barví.

Imunodifúze dvojitá

do gelu difundují obě složky; princip *kvalitativních* metod, kdy se pomocí různých protilátek pátrá po povaze stanovované bílkoviny (antigenu)

Metody založené na dvojitě imunodifúzi (kvalitativní metody)

- dvojitá radiální imunodifúze (podle Ouchterlonyho)
- imuno elektroforéza (*Grabar a Williams*)
- protisměrná imuno elektroforéza

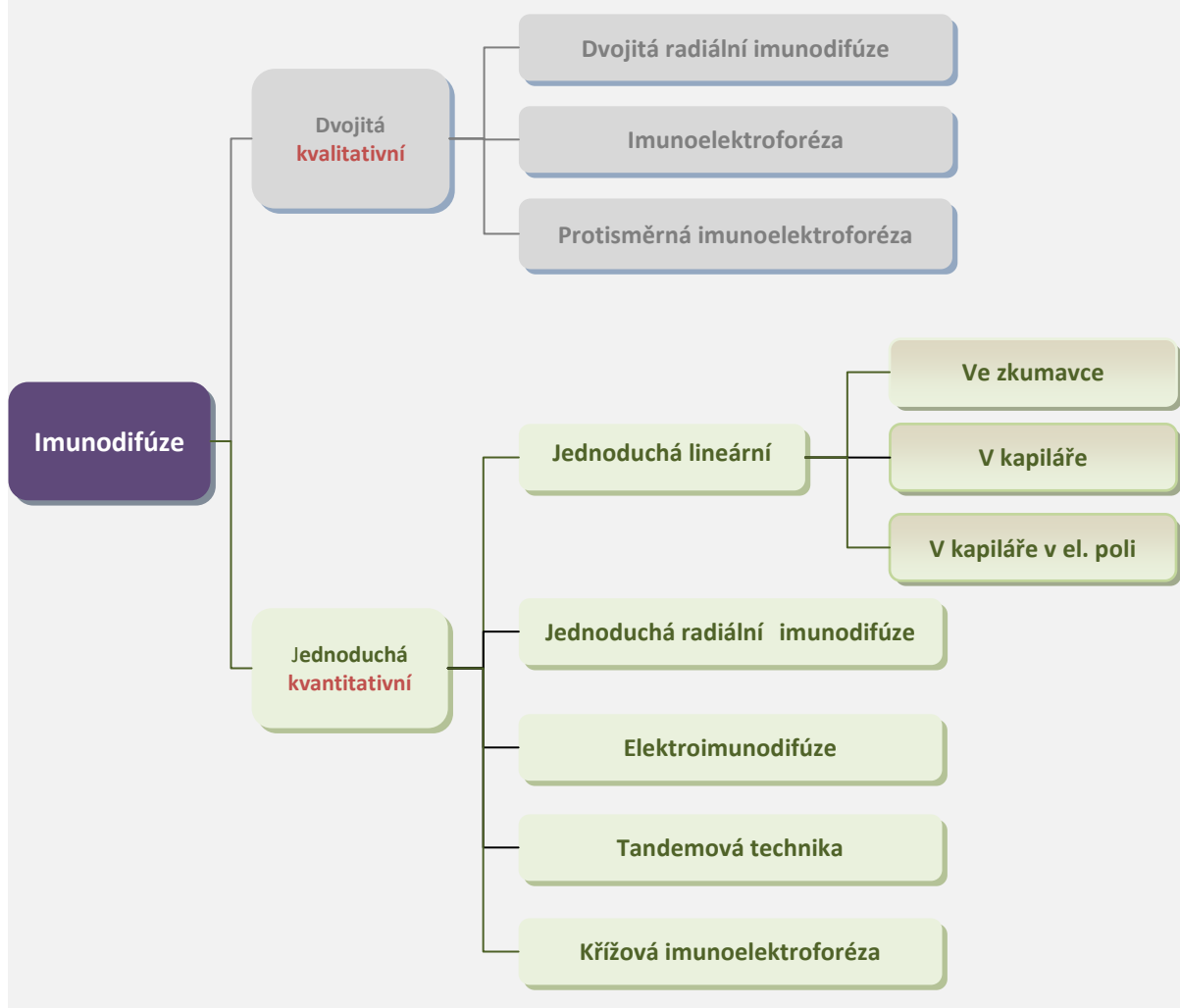
Imunodifúze jednoduchá

do gelu difunduje pouze jedna složka (obvykle antigen), druhá je obsažena v gelu; princip *kvantitativních* metod, kdy se stanovuje množství známe bílkoviny (v gelu je protilátka proti konkrétní bílkovině).

Metody založené na jednoduché imunodifúzi (kvantitativní metody)

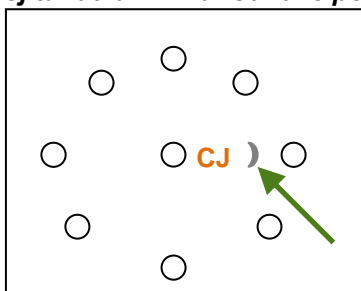
- jednoduchá lineární imunodifúze
 - ve zkumavce (*Oudin*)
 - v kapiláře (*Oudin*, modifikace *Hitzig a Schwick*)
 - v kapiláře v elektrickém poli (imuno elektro migrace)
- jednoduchá radiální imunodifúze (*Manciniová*)
- elektroimmunodifúze neboli raketová imuno elektroforéza a její varianty (*Laurell*)
- kvantitativní překračující imuno elektroforéza čili tandemová technika (*Krøll*)
- dvourozměrná překračující neboli křížová imuno elektroforéza (*Clarke a Freeman*)

Metody založené na imunoprecipitační reakci v gelovém prostředí



Stručné popisy jednotlivých metod

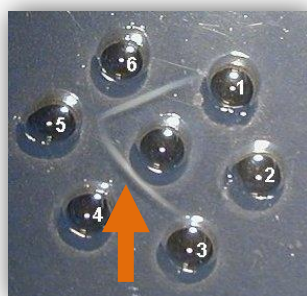
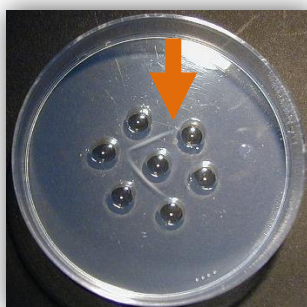
Dvojitá radiální imunodifúze podle Ouchterlonyho



Na podložní skříčko čtvercového tvaru se nalije gel (agarový, agarózový). Do středu se vyhloubí centrální jamka (CJ) a kolem ní jamky periferní. Do centrální jamky se umístí protilátka proti sledovanému antigenu a do periferních jamek antigen (vzorek). Obě složky difundují do gelu (kruhově čili radiálně kolem jamek) a v místě střetu s optimální koncentrací antigenu a protilátky se vytvoří precipitační proužek.

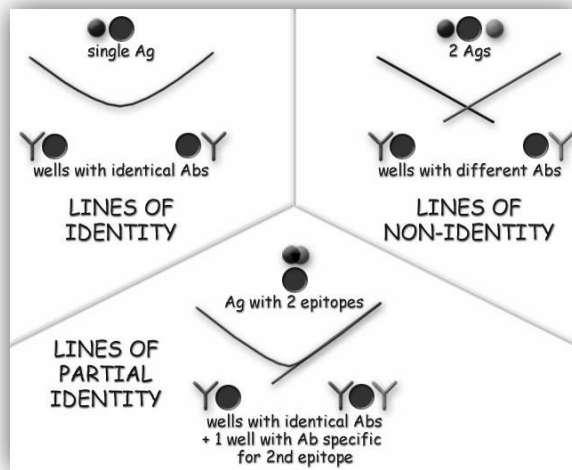
Vysvětlivka: Šipka na obr. ukazuje pozitivní precipitaci = precipitační proužek

Se simulací procesu je možno si pohrát [zde](#).



Na fotografiích jsou vidět reakce vzorků/sé.

Detail obrázku vpravo ukazuje identickou precipitaci v jamkách č. 4 a č. 6 proti hovězímu albuminu v centrální jamce

**Pomůcka k obrázku:**

single Ag = jeden antigen

2 Ags = dva antigeny

wells with identical Abs = jamky se stejnými protilátkami

wells with different Abs = jamky s rozdílnými protilátkami

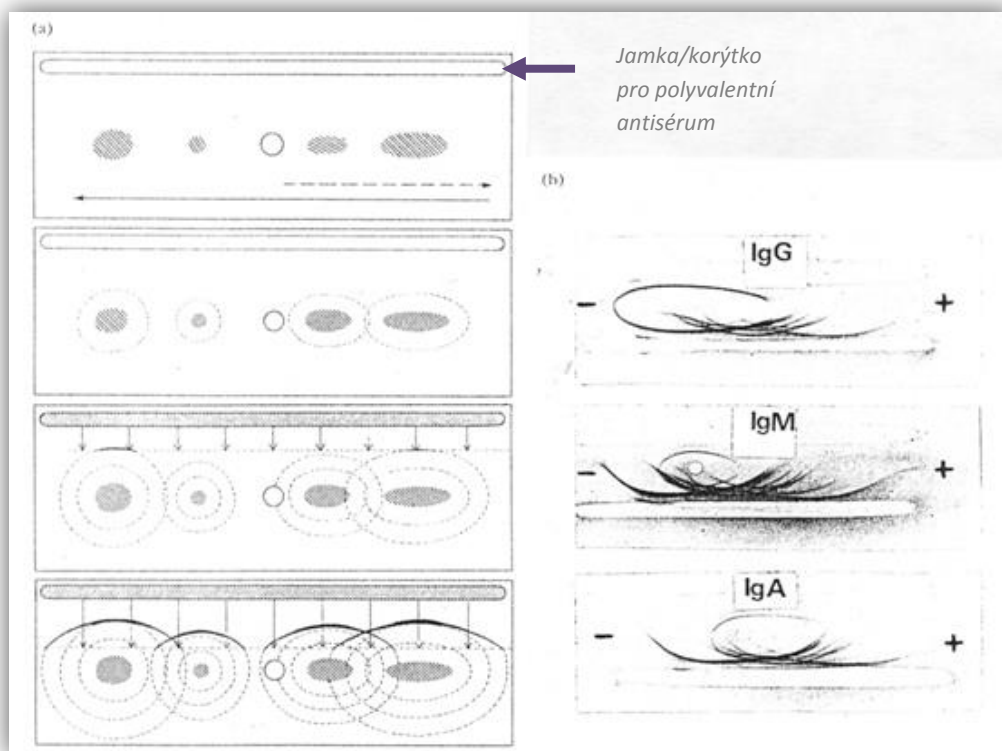
Ag with 2 epitopes = antigen se dvěma epitopy

wells with identical Abs + 1 well with Ab specific for 2nd epitope = jamky se stejnými protilátkami + 1 jamka s protilátkou specifickou pro druhý epitop

LINES OF IDENTITY, NON-IDENTITY, PARTIAL IDENTITY = precipitační linie značící identitu, neidentitu, částečnou identitu antigenů

Imunoelektroforéza

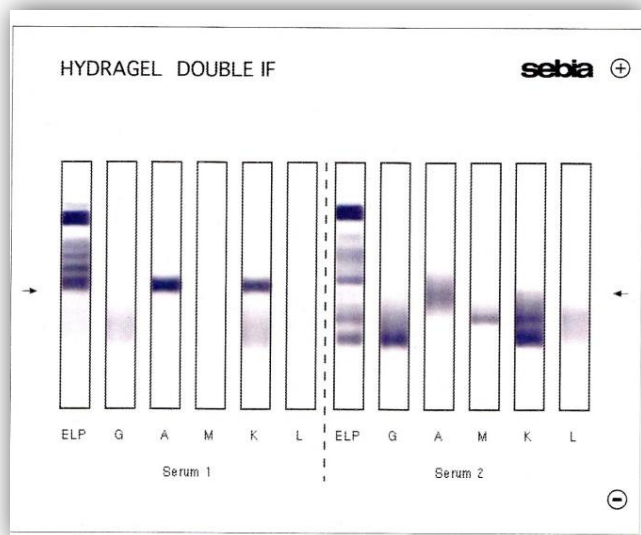
Kombinace elektroforézy v agarovém gelu a dvojité imunodifúze. Po proběhlé elektroforéze se podél dělicí dráhy vyhloubí jamka ve formě proužku a naplní se polyvalentním sérum. Rozdělené frakce bílkovin difundují, rovněž tak polyvalentní sérum. V místě střetu s optimálními koncentracemi antigenu a protilátky se vytvoří precipitační proužek. Na následujícím obrázku je v části a) znázorněna agarová elektroforéza: putování frakcí jak zásluhou elektrického pole, tak elektroosmózy, dále difúze jednotlivých frakcí, difúze polyvalentního séra a nakonec tvorba precipitačních obloučků. V části b) jsou fotografie výsledků po vizualizaci imunoelektroforézy

**Imunofixace**

Elektroforéza se často kombinuje s tzv. *imunofixací* - po elektroforetickém rozdělení je na gel s rozdělenými frakcemi bílkovin aplikováno příslušné antisérum. Je-li přítomen antigen, vytvoří se na místě, kde se nachází, precipitát, který se následně barví. Precipitát je „fixován“ v gelu a ostatní proteiny lze z gelu vymýt. Používají se séra polyvalentní, monovalentní, případně specifická proti jednotlivým typům řetězců, takže je možno bílkoviny přesně identifikovat



Na vedlejším schématu elektroforeogramu bylo „použito“ monovalentní antisérum proti IgG



Zdvojená fólie Hydrigel pro imunofixaci.

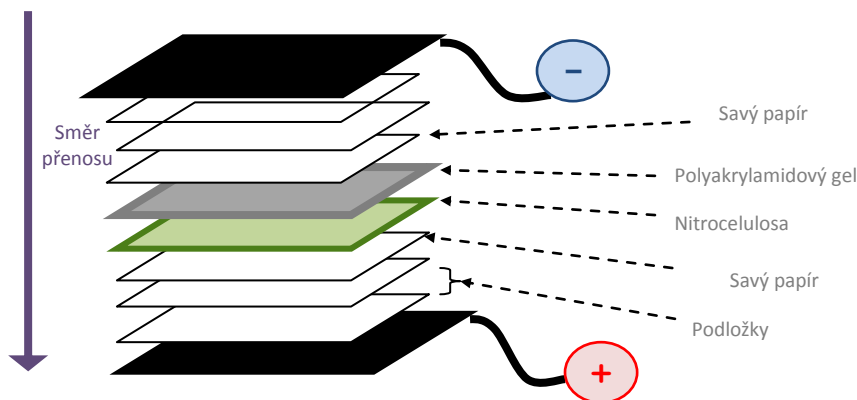
Sérum 1: monoklonální gamapatie IgA kappa.

Sérum 2: biklonální gamapatie IgG kappa a IgM kappa.

Western blotting (přenos)

Je variantou imunofixace. Ne vždy lze přímo aplikovat antisérum (protilátku) na dělicí gel buď z technických důvodů (např. to nelze aplikovat na polyakrylamidový gel, který denaturuje bílkoviny), či proto, že antigenu na vytvoření precipitátu je málo. V těchto případech se přenesou příslušný protein z dělicího media na pevnou fázi, kde je fixován buď kovalentními vazbami (pevnou fází je papír aktivovaný cyanogen bromidem nebo *m-nitrobenzoyloxymethylbromidem*) nebo adsorpčními silami (nitrocelulóza papír nebo membrány na bázi nylonu). Přenos se děje kapilárními silami pomocí savého papíru, případně elektroforeticky. Pevná fáze se potom inkubuje s příslušnou protilátkou, značenou enzymem nebo radioizotopem. Citlivost těchto metod je 10 – 100x vyšší než při prosté imunofixaci se stanovením proteinu.

Schéma uspořádání při Western blotting



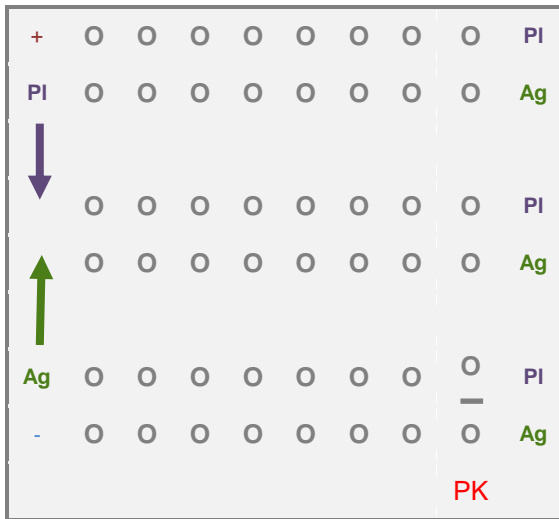
Poznámka: „blot“, angl. znamená skvrnu, ale také vysátí (savým papírem), čili název „blotting“ je jasný. Pojem „western“ tj. „západní“ je slovní hříčkou: prakticky totožnou metodu pro fixaci a vizualizaci DNA, vymyslel sir Edwin Mellor Southern (na obrázku), který rozvinul i technologie DNA mikroarray a za svůj přínos v medicínském výzkumu obdržel prestižní ocenění Alberta Laskera. „Southern“ je česky „jižní“, takže příbuzné techniky byly postupně pojmenovávány podle světových stran. „Northern“ (severní) přenos (blotting) je určen pro studium genových expresí pomocí detekce RNA, „eastern“ blotting se používá k analýze posttranslačních modifikací a k detekci karbohydrátových epitopů, „southwestern“ (jihozápadní) blotting je kombinací „southern“ a „western“ přenosu a užívá se k charakterizaci proteinů vázajících DNA.



Edwin Mellor Southern

Protisměrná imunoelktroforéza

V gelu na podložním sklíčku se vyhloubí řady jamek. Vždy do řady blíže katodě se umístí antigen (vzorek), do řady blíže anodě se umístí protilátka. Vlivem *elektroendosmózy* putují protilátky v agarovém (agarózovém) gelu ke katodě, antigeny (pokud jsou přítomny) putují „normálně“ k anodě. V místě střetu s optimálními koncentracemi antigenu a protilátky se vytvoří precipitační proužek.



Vysvětlivky:

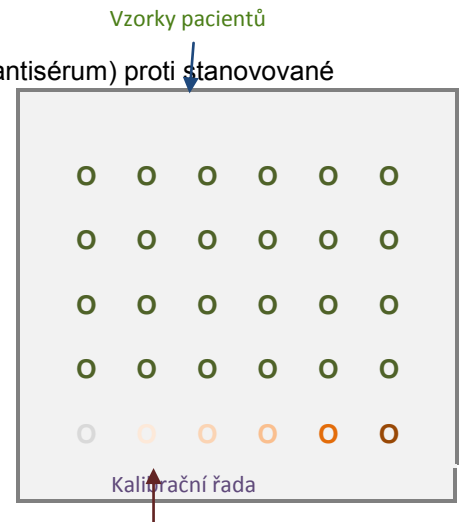
PI = protilátka

Ag = antigen, šipky znázorňují směr putování příslušné bílkoviny

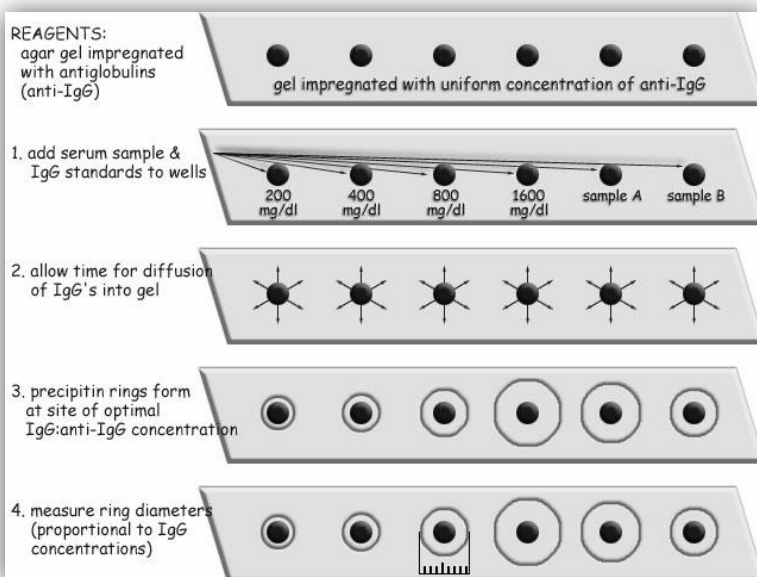
PK = pozitivní kontrola, vodorovná čárka znázorňuje precipitační linii u pozitivní kontroly (ve skutečnosti se jedná spíše o oblouček)

Jednoduchá radiální imunodifúze

Do gelu se při jeho přípravě přidá specifická protilátka (monovalentní antisérum) proti stanovované bílkovině (antigenu). Do gelu na podložním sklíčku se vyhloubí řady jamek. Do první řady se umístí antigen o vzrůstající koncentraci (kalibrační křivka), do ostatních se umístí vzorky. Bílkoviny (radiálně) difundují kolem jamek za tvorby precipitační zóny (na obrázku vlevo jsou znázorněny pouze jamky, precipitační zóny ne, ty jsou znázorněny na schématu níže). Velikost zóny, přesněji čtverec jejího průměru (D), je úměrný koncentraci antigenu. Závislost D^2 na koncentraci antigenu (kalibrační graf) se získá z hodnot naměřených v první řadě se známými koncentracemi stanovovaného antigenu



Postup při jednoduché radiální imunodifúzi



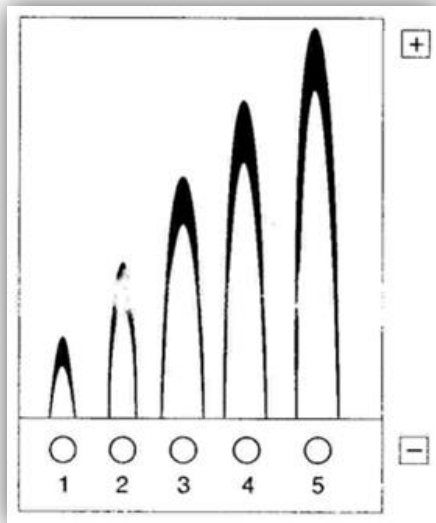
Pomůcka k obrázku

Reagencie – agarový gel s obsahem anti-IgG

- do jamek se nepipetují vzorky séra (sample A a B) a standardní roztoky (200 – 1600 mg/dl)
- ponechá se čas difusi molekul IgG do gelu
- v místech optimální koncentrace IgG:anti-IgG se tvoří precipitační prstence
- měření průměru (D) prstenců (D je úměrné koncentraci IgG ve vzorku)

Elektroimunodifúze

(přesněji elektromimunoprecipitace) čili raketová (raketková) technika (podle Laurella)



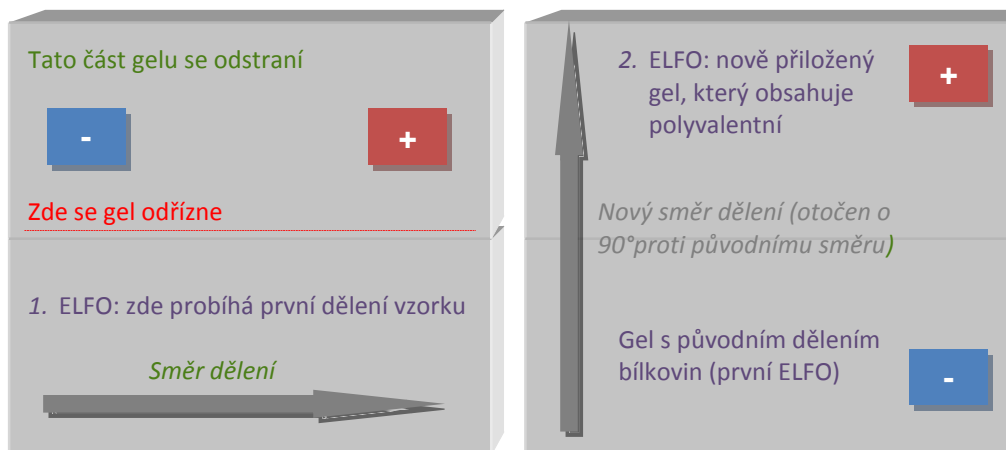
Kombinace jednoduché *radiální imunodifúze* s elektroforézou (ta slouží k urychlení imunoprecipitace).

V gelu je přítomna protilátka, v gelu vlivem elektrického stejnosměrného napětí putuje antigen. Tvoří se komplex antigen-protilátka, putujícího antigenu je však přebytek, takže dochází k soustavnému rozpouštění tohoto komplexu až do okamžiku, kdy je veškerý antigen vyvážen specifickou protilátkou. Výsledkem je obraz ve tvaru raketky (kosmické). Raketky mají velikost podle koncentrace příslušného antigenu ve vzorku.

Kalibrace se provádí podobně jako u jednoduché radiální imunodifúze pomocí známých koncentrací stanovovaného antigenu (několik jamek – obvykle 5 – slouží pro kalibraci, ostatní pro vzorky)
(UP)

Dvojměrná čili tzv. křížová neboli překračující imunoelktroforéza

Kombinace elektroforézy v agarovém gelu s elektroimunoprecipitací, čili aplikace raketkové techniky na sérum předem frakcionované pomocí elektroforézy.

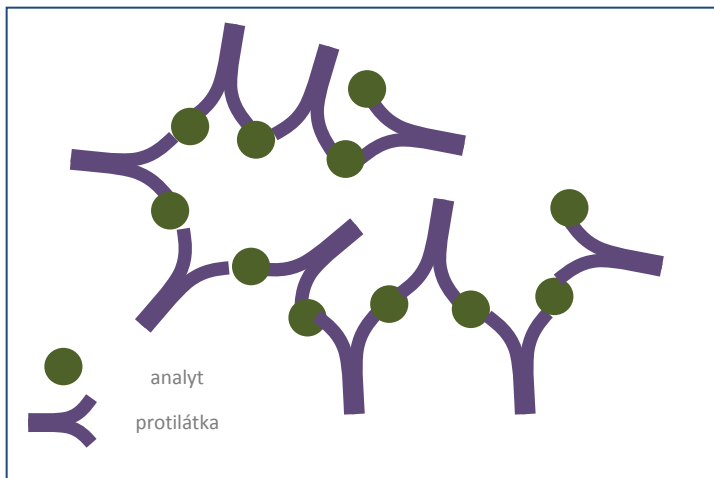


Imunoprecipitační reakce v roztoku

Princip: Zředěný roztok antigenu reaguje s vhodně zředěnou protilátkou za tvorby zákalu (imunoprecipitátu). Reakce se vyhodnocuje turbidimetricky nebo nefelometricky (existuje řada speciálních fotometrů a nefelometrů zkonstruovaných právě k tomuto účelu). Jedná se o velmi moderní metody vhodné i k automatizaci.

Turbidimetrie

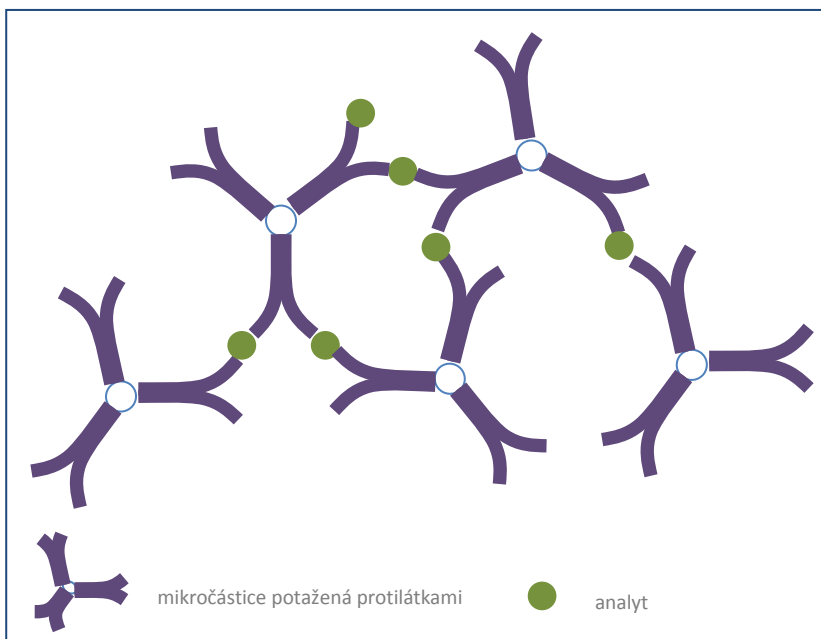
Turbidimetrie



Reakčním prostředím je pufr s obsahem polyethylenglykolu (PEG), který podporuje tvorbu suspenze (zákalu). Používají se protilátky různých výrobců (Dako, Orion aj.). Podle použitého pufru a protilátky se aplikují metody na jednotlivé přístroje. Závislost [turbidance](#) na koncentraci stanovované bílkoviny je obecně nelineární a kalibrace vyžaduje řadu standardů, většinou pěti. Vzhledem k mnoha okolnostem ovlivňujícím imunoprecipitační reakci, je zavádění metod obtížné, vlastní využití již zavedené metody je však obvykle snadnou a rutinní záležitostí.

PETIA

Particle Enhanced Turbidimetric Immunoassay (PETIA)



Zesílení turbidance je možné dosáhnout pomocí mikročástic.

Mikročástice lze „potáhnout“ protilátkami (viz obrázek vlevo).

Při reakci těchto mikročástic s analytem dochází k tvorbě zesíťovaného kompaktního precipitujícího komplexu a k naměření vyšších hodnot turbidance.

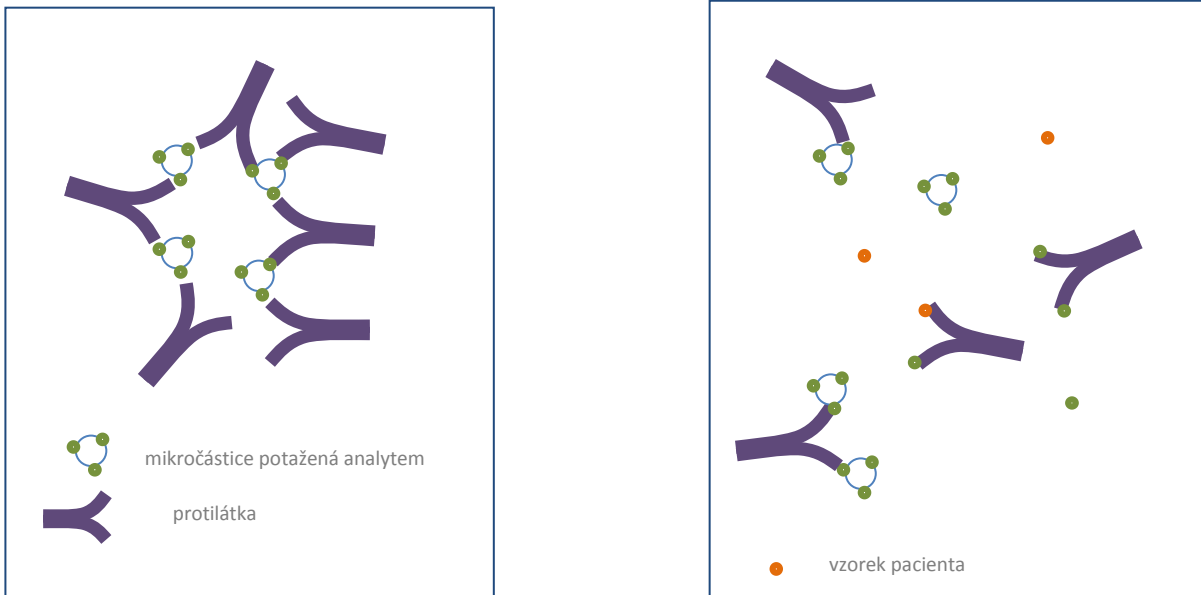
Takto je pomocí (mikro)částic (*particles*) posíleno (*enhanced*) turbidimetrické imunostanovení (*turbidimetric immunoassay*).

Molekuly, příliš malé na to, aby samy o sobě mohly s protilátkami tvořit nerozpustné komplexy lze „upevnit“ na mikročástice, zvětšit tímto způsobem jejich velikost a „posílit“ (*enhance*) tak metodu (v daném případě inhibici turbidimetrického stanovení (*turbidimetric inhibition immunoassay*)). Mikročástice „potažené“ malými molekulami (analytem) tvoří s protilátkami zesíťované, nerozpustné komplexy. Je-li však ve vzorku pacienta přítomen analyt, soupeří tento s analytem na mikročasticích o vazebné místo na protilátce a protože sám není schopen tvorby komplexů, ruší (inhibuje) tuto tvorbu. Výsledná turbidita je mnohem nižší, než by byla bez volného analytu. Toto uspořádání je typické pro stanovení léků.

Turbidimetrické imunometody mají svá omezení, především směrem k nízkým, ale i vysokým koncentracím stanovované bílkoviny. Hodí se pro omezený počet použití, v rutinní praxi však mají bohaté zastoupení. Příkladem je stanovení v séru např.: IgG, IgA, IgM, C3, C4, prealbuminu, transferinu, orosomukoidu aj., v moči mikromnožství albuminu (tzv. [mikroalbuminurie](#)).

PETINIA

Particle Enhanced Turbidimetric Inhibition Immunoassay (PETINIA)

**Vazebné testy**

Princípem vazebných testů je opět reakce *analytu s vazebným proteinem*, kterým je nejčastěji *protilátka*. Analyt nebo vazebný protein jsou určitým způsobem označeny, aby bylo možno prokázat vytvořený *komplex antigen-protilátka*, resp. *analyt-vazebný protein*. Jednotlivé analytické metody nesou název podle charakteru detekčního prvku použitého k průkazu interakce (vzájemného působení) analytu a vazebného proteinu. Detekční prvek se volí podle charakteru značení zúčastněného reaktantu. Všechny vazebné testy používají ke kalibraci standardy, s jejichž reakcí v systému je srovnávána reakce stanovované látky. V současné době existuje řada vazebných testů, rutinně používaných ke stanovení biologicky významných sloučenin – hormonů, nádorových markerů, farmak, alergenů a protilátek podílejících se na alergických reakcích organismu. Jejich škála se stále rozšiřuje.

Spíše než s pojmem „vazebný test“ se lze v literatuře i v praxi setkat s pojmem „ligandové techniky“ (z latinského *ligare*, svazovat), o analytu se v této souvislosti mluví jako o *ligandu*, nebo s obecným pojmem *imunoanalýza*, *imunostanovení*, *imunoesej*, *immunoassay* apod.

Vazebné testy lze např. rozdělit

1. podle *uspořádání testu* na
 - nekompetitivní a
 - kompetitivní
2. podle *nutnosti oddělit vytvořený komplex antigen-protilátka* na
 - heterogenní a
 - homogenní

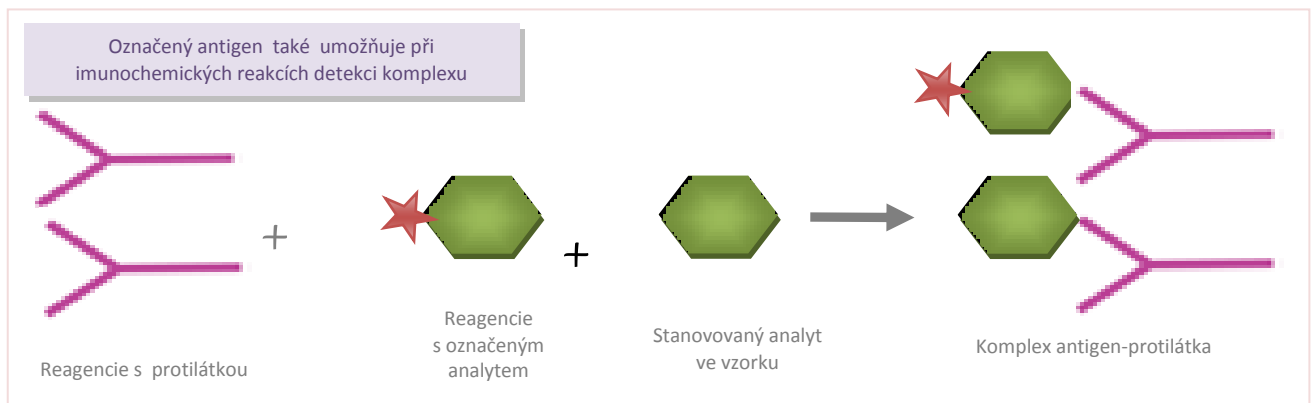
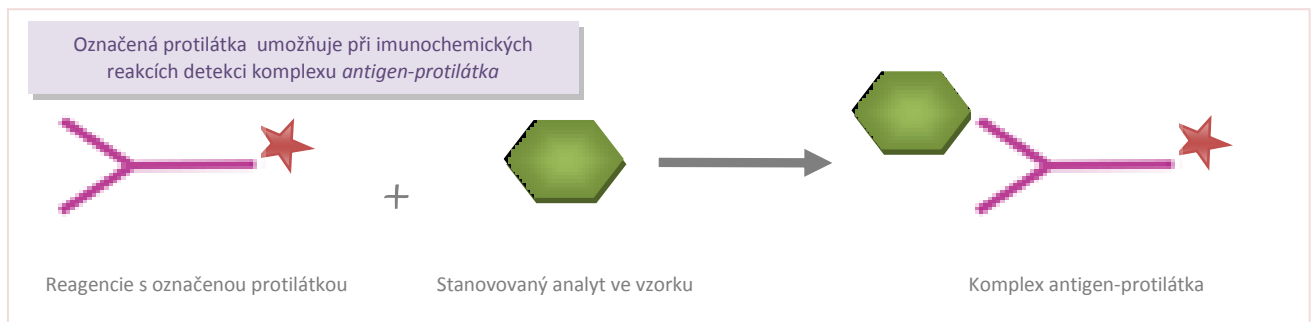
Ať už se jedná o jakékoliv uspořádání testu, aby bylo možno stanovení provést, je u všech těchto imunoanalýz nutno používat značené antigeny nebo protilátky, které slouží jako tzv. **labels** (k identifikaci vytvořeného komplexu antigen-protilátka (*Ag-PI*)).

label (angl.), [leib_e], štítek, nálepka, etiketa, visačka

Ke značení antigenů či protilátek se používají

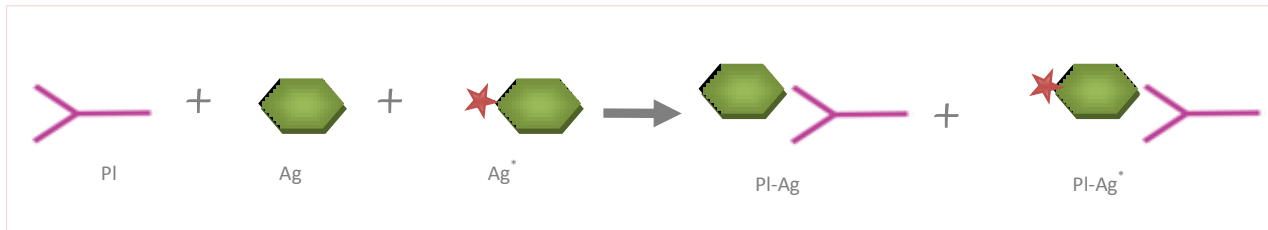
1. *Radioaktivní zářiče*, např. ^{125}I (izotop jódu). Metody se nazývají *RIA (radio immunoassay)* a patří mezi klasické imunometody
2. *Enzymy* (alkalická fosfatáza, peroxidáza, β -galaktozidáza), které po přidání substrátu do reakční směsi katalyzují reakci, na jejímž konci je barevná látka vhodná k fotometrii. Tyto metody se nazývají *EIA (enzyme immunoassay)*
3. *Fluorescenční látky*, které po ozáření světlem jedné vlnové délky emitují světlo o větší vlnové délce než je světlo iniciační. Emitované světlo se fluorimetricky měří. Použití fluorescenčního indikátoru se objeví v názvu konkrétní metody, např. *FPIA (Fluorescence Polarization Immunoassay)*
4. *Chemiluminiscenční látky, bioluminiscenční látky, elektrochemiluminiscenční látky* – moderní metody, kdy k emisi světla dochází po chemické nebo elektrochemické iniciaci, případně po působení specifického enzymu (luciferáza). Názvy jednotlivých metod obvykle zohledňují způsob značení i provedení testu – např. *CMA (Chemiluminescent Magnetic Immunoassay)*

Schématy znázorňující značení protilátek a antigenů ve vazebných testech



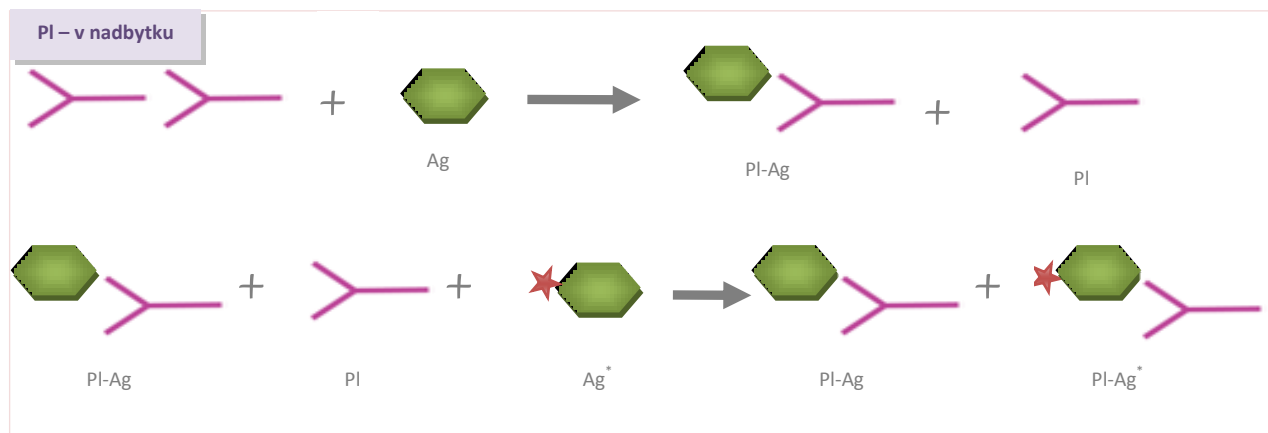
Při *kompetitivním* (soutěživém) uspořádání soupeří značený a neznačený antigen o vazebné místo na specifické protilátce. V praxi to znamená, že do reakční směsi s limitovaným množstvím protilátky se přidá ke stanovovanému antigenu antigen značený. Během inkubace se tvoří komplexy *antigen-protilátka* jak se značeným, tak s neznačeným antigenem. Převažuje ta forma komplexu, které formy antigenu (značený x neznačený) bylo více. Platí zde přímá úměra: čím více (neznačeného) antigenu ve vzorku, tím více komplexu s neznačeným antigenem a méně komplexu se značeným antigenem (více značeného antigenu zůstane nezreagováno v reakční směsi).

Jednostupňová kompetitivní imunoanalýza



Dvoustupňová kompetitivní imunoanalýza

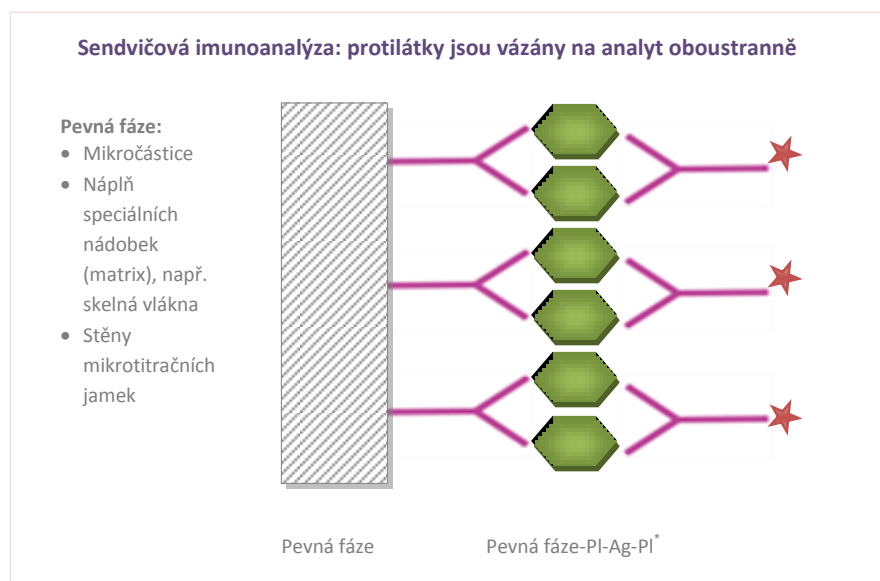
U dvoustupňové kompetitivní analýzy se přidává nadbytek protilátky (vzhledem k antigenu). Nejprve se s protilátkou inkubuje stanovený antigen, značený antigen se přidává v druhém kroku. Dvoustupňová metoda je citlivější než jednostupňová



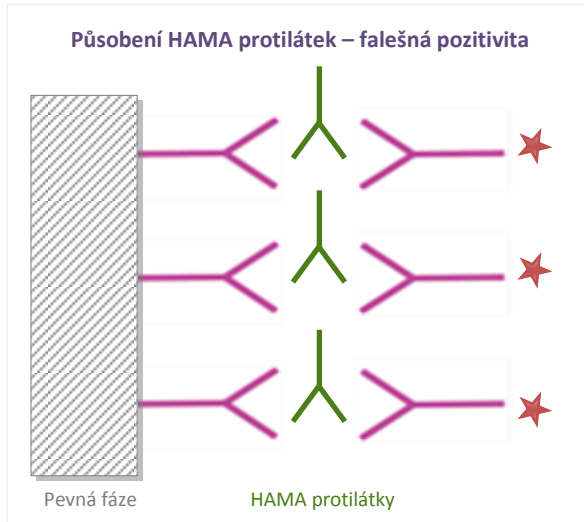
Při *nekompetitivním* (tzv. *sendvičovém*) uspořádání je analyt vázán mezi dvě vysoce specifické protilátky (jako plátek masa mezi dvěma chleby – „sendvič“). Jedna z nich je vázána na pevnou fázi (stěnu zkumavky, jamku destičky, mikročástici), druhá je značená a přidává se až k vytvořenému komplexu. Opět platí, že čím více antigenu ve vzorku, tím více antigenu v komplexu a tím více značené protilátky v následném „dvojitém“ komplexu.

Poznámka: „sendvič“ je v podstatě plátek masa mezi dvěma krajci chleba; název pochází od jistého Angličana jménem John Montagu, čtvrtý Earl ze Sandwich, který údajně tak miloval šachy, že se od nich nechtěl ani na chvíli odtrhnout, ani jít k obědu a v zájmu ušetření času „vynalezl“ tohle rychlé občerstvení (Ivan Crha, Dědeček na scestí a dalších 300 míchaných nápojů). Jsou i jiná, i když obdobná vysvětlení (<http://en.wikipedia.org/wiki/Sandwich>).

Nekompetitivní sendvičová imunoanalýza



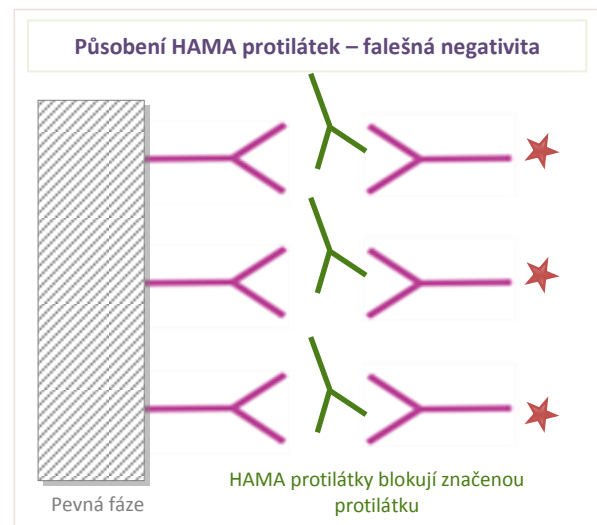
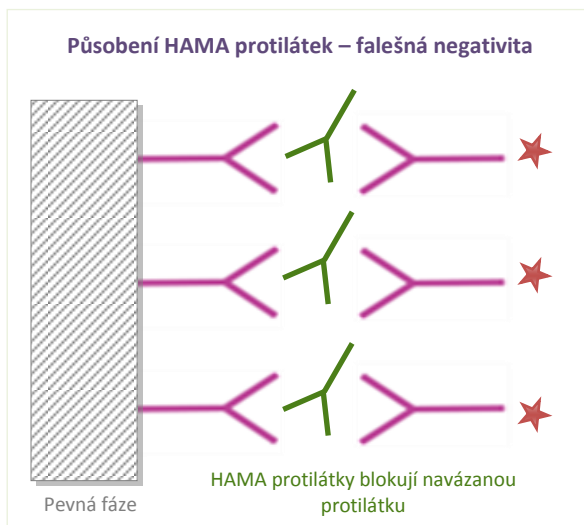
Sandwichové uspořádání u imunoesejí, které používají myší monoklonální protilátky, je poměrně citlivé na přítomnost lidských protilátek proti myším antigenům (*Human Anti-Mouse Antibodies, HAMA*), které mohou být příčinou jak falešně zvýšených (pozitivních), tak falešně snížených (negativních) výsledků. Tyto protilátky (HAMA) se mohou vyskytovat v lidské krvi jako důsledek expozice organismu myším antigenům. Příčiny expozice jsou různé – může to být v důsledku léčby některých typů rakoviny, kdy se používají myší monoklonální protilátky, ale také jako imunologická odpověď organismu na expozici přímo myši, pokud s ní pacient nějakým způsobem přijde do styku, přičemž se nevylučuje ani expozice environmentální.



Falešná pozitivita

HAMA protilátky se vážou jak na protilátky upoutané na pevné fázi (např. mikročástici), tak na značenou protilátku, což se projevuje, jakoby vznikl komplex z protilátek a analytu přítomného v pacientském vzorku.

Falešná negativita



Zábranou těmto jevům slouží různé techniky

- dvoustupňové uspořádání, aby interferující látky se mohly vymýt
- použití blokátorů, které obsadí vazebná místa na HAMA, ke snížení či eliminaci interference

Blokátory jsou jedinečné pro každou metodu (assay) a mohou to být např. detergenty, čištěné proteiny a zvířecí séra.

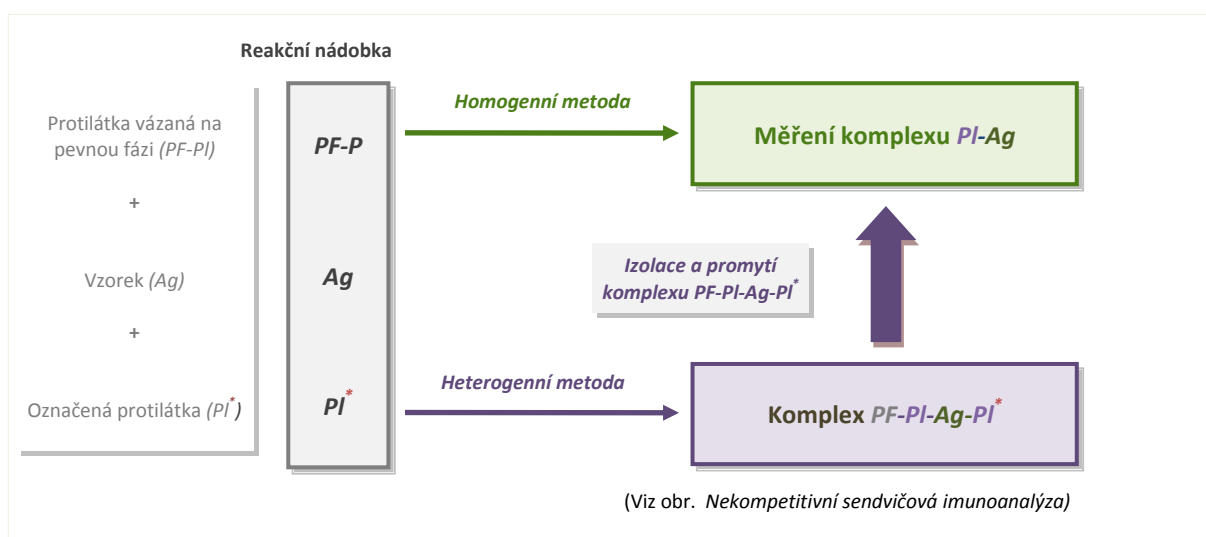
Homogenní metody jsou ty metody, kdy před stanovením **není nutno** komplex *antigen-protilátka* oddělit

Heterogenní metody jsou metody, kdy je **potřeba** komplex *antigen-protilátka* před stanovením oddělit a promýt.

Existují různé možnosti oddělení komplexu. Mezi klasické patří např.

- metoda dvojí protilátky: ke komplexu se přidá další protilátka (proti použité protilátce), která tvoří velký komplex antigen-protilátka-protilátka, což jsou velké částice snadno oddělitelné (filtrací, centrifugací apod.)
- někdy stačí pouhá centrifugace
- oddělení pomocí různě koncentrovaných roztoků polyetylénglykolu (PEG): komplexy (= velké částice) precipitují, menší částice zůstanou v roztoku
- oddělení pomocí iontoměničů
- použití molekulových sítí
- imobilizace komplexu na skelných vláknech
- **metody pevné fáze:**
 - protilátka je navázána na stěny polystyrenových zkumavek, antigen se naváže na tyto fixované protilátky, nezreagovaný antigen se vylíje s roztokem
 - protilátka je navázána na polystyrenové kuličky (na zlaté částice, latexové aj.), komplex částice-protilátka-antigen lze snadno oddělit centrifugací
 - sendvičové metody: na komplex pevná fáze-protilátka-antigen (např. zlatá částice-protilátka-antigen) se naváže další, (radioaktivně) značená protilátka – vzniká komplex pevná fáze-protilátka-antigen-protilátka, jehož aktivita se měří
 - protilátkou jsou potaženy ferromagnetické částice - po iniciaci magnetického pole se částice s navázanými komplexy imobilizují na elektromagnetu, resp. na stěně reakční nádoby přilehlé k magnetu

Homogenní a heterogenní imunoanalýza



Radioimunoanalýza (RIA)

Ke značení je užit **radioizotop**. Prvním vazebným testem bylo radioimunostanovení – RIA, popsané v roce 1959 *Bergsonem* a *Yalovou* pro stanovení hladin inzulínu při použití lidských protilátek proti inzulínu.

Princip: Soutěžení dvou forem molekuly antigenu (neznačené a značené radioaktivním prvkem) ve vazbě na specifickou protilátku. Molekuly se na protilátku vážou v poměru svých koncentrací. Heterogenní kompetitivní analýza.

Značení: ^{125}I (izotop jódu, γ -zářič, nejčastější použití); **T** (tritium, β -zářič)

Schéma obecného postupu:

1. Připraví se řada zkumavek se základními roztoky (puřem, roztokem protilátky, roztokem značeného antigenu – objemy a koncentrace jsou ve všech zkumavkách stejné).
2. Vyčlení se zkumavky pro kalibraci (např. prvních pět – podle počtu kalibračních vzorků). Do těchto zkumavek se přidá kalibrační materiál – neznačený antigen – ve stoupající koncentraci: v první zkumavce nejnižší koncentrace kalibrátoru atd. až po poslední, kde je koncentrace standardu nejvyšší.
3. Zbývající zkumavky jsou určeny pro vzorky – do těch se přidá vhodně zředěný biologický materiál (sérum, moč), ve kterém se má stanovit příslušný antigen.
4. Inkubace všech zkumavek (obvykle přes noc) – tvoří se komplex antigen-protilátka: pokud jsou ve zkumavce obě formy antigenu soutěží spolu o vazebné místo na protilátce a vážou se v poměru svých koncentrací
5. Kvantitativní oddělení komplexu antigen-protilátka od nezareagovaných antigenů, užívají se různé metody
6. Detekce = měření radioaktivity – je možný dvojí způsob:

- a. měří se radioaktivita vzniklých (a oddělených) komplexů antigen-protilátka: v tomto případě se vzrůstající koncentrací antigenu ve vzorku klesá naměřená radioaktivita (v komplexu antigen-protilátka je větší podíl neznačeného antigenu)
 - b. měří se radioaktivita podílů s nezreagovanými antigeny: se vzrůstající koncentrací antigenu radioaktivita vzrůstá (v podílu po oddělení komplexu antigen-protilátka zůstává se vzrůstající koncentrací antigenu ve vzorku více antigenu značeného, protože neznačený je v komplexu – srovnej ad 6. a.)
7. Vyhodnocení výsledků

Poznámka: Kalibrace je nutná u každé série měření – vyplatí se proto zpracovávat pokud možno velké série vzorků

Imunoradiometrická analýza (IRMA)

Izotopem je označen vazebný protein (vazebné reagens), kterým je nejčastěji specifická protilátka. RIA metody jsou postupně opouštěny. I když jsou relativně levné, nedávají nejpřesnější výsledky, radioaktivní izotop má omezenou trvanlivost, metody vyžadují speciální přístroje a pracoviště musí být vybaveno pro práci s radioizotopy

Enzymoimunoanalýza (EIA)

Ke značení je užit **enzym**.

Princip: Do komplexu antigen-protilátka vstupují antigen nebo protilátka značené účinným enzymem. Množství stanovované bílkoviny se určuje z výsledků reakce enzym + substrát = (barevný) produkt.

Značkovací enzym: peroxidáza (POD), alkalická fosfatáza (ALP), aj.

EMIT: Enzym immunoassay technique

(EMIT; technika enzymového imunostanovení)

Princip: O vazebné místo na specifické protilátce soutěží molekuly antigenu z analyzovaného vzorku a přidané molekuly antigenu značeného enzymem. Po skončené kompetici (soutěži) se přidá substrát, který podléhá reakci katalyzované volnými nezreagovanými molekulami enzymu vázaného na antigen.

Enzymoimunochemické reakce u EMIT:

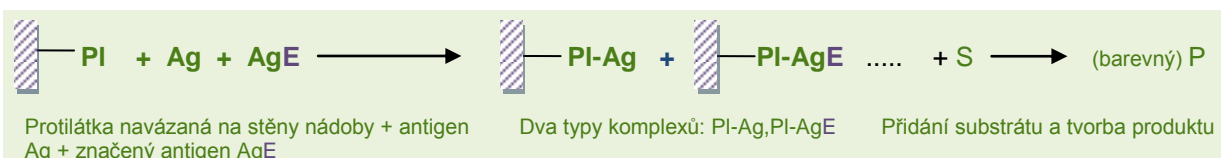
1. antigen	+	protilátka	→	[antigen-protilátka]	+	substrát	[neaktivní]
2. antigenE	+	protilátka	→	[antigenE-protilátka]	+	substrát	[neaktivní]
3.		antigenE			+	substrát	[aktivní]

Ze schématu vyplývá, že komplex [antigen-protilátka] nekatalyzuje reakci substrátu, rovněž tak nekatalyzuje reakci enzymem značený antigen v komplexu [antigenE-protilátka]. Enzym navázaný na antigen (volný) tuto reakci katalyzuje. Reakce je volena tak, že ze substrátu vzniká barevný produkt vhodný k fotometrii. Intenzita výsledného zbarvení je úměrná koncentraci volného značeného antigenu. Se vzrůstající koncentrací antigenu ve vzorku intenzita výsledného zbarvení vzrůstá. Závislost má obecně nelineární charakter. Kalibrace se provádí se známými koncentracemi antigenu (je to podobné jako u RIA).

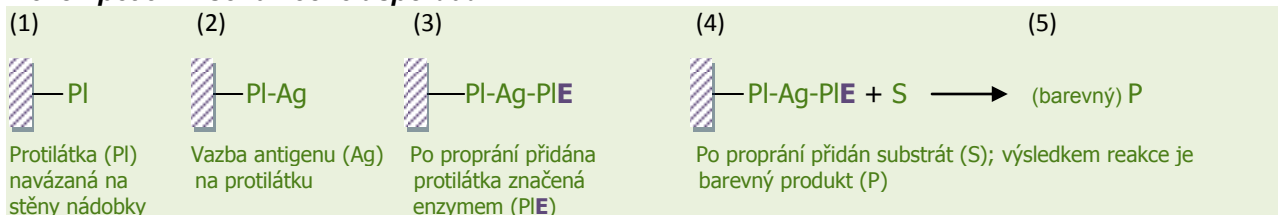
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assays

(ELISA; analýzy s navázaným enzymem za využití imunosorpce)

- I. **Princip kompetitivního uspořádání:** protilátka je pevně vázána na stěny zkumavky, enzym vázaný na antigen neztrácí v komplexu [antigenE-protilátka] aktivitu. O vazebné místo na protilátce soutěží značený antigen a antigen ze vzorku (neznačený). Zastoupení obou forem antigenu na protilátce odpovídá jejich relativním koncentracím. Přebytek značeného antigenu (který nezreagoval) se vylíje a po přidání substrátu se změní intenzita zbarvení vytvořeného barevného produktu. Intenzita zbarvení je úměrná množství navázaného značeného antigenu. Čím vyšší koncentrace stanovovaného antigenu (ze vzorku), tím nižší intenzita zbarvení.



- II. **Princip nekompetitivního sendvičového uspořádání:** na protilátku navázanou na stěnách reakční nádoby (1) se naváže antigen ze vzorku (2). Po promytí se přidá protilátka značená enzymem, která se naváže na komplex (3). Po dalším promytí se přidá substrát (4). Výsledná intenzita zbarvení je úměrná koncentraci antigenu ze vzorku (4).

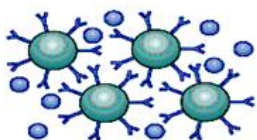
Nekompetitivní sendvičové uspořádání

Pracovní postup a kalibrace jsou podobné jako u RIA metod, pouze vyhodnocení je fotometrické. Tyto metody jsou pro rutinní praxi vhodnější proto, že není potřeba nákladných zařízení a může se pracovat v běžné laboratoři. Rovněž expirační doba souprav je delší než u RIA.

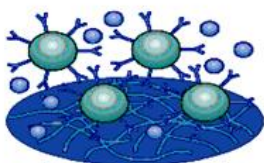
EIA metody se většinou provádějí v mikroměřítku ve speciálních nádobkách uspořádaných do tzv. *mikrotitračních destiček*. Toto provedení obvykle vyžaduje koupi speciálního fotometru (readeru) a promývačky (washer), ušetřené náklady za makroprovedení jsou však mnohem větší, takže jednorázová investice se vyplatí. V současnosti navíc existují automaty, které celý proces podstatně zjednodušují. Jak RIA, tak EIA metody jsou svou podstatou omezeny na stanovení látek do určité minimální koncentrace. Např. u EIA metod je nutná poměrně vysoká koncentrace enzymu (tudiž i komplexu se značeným proteinem), aby se vytvořilo fotometrovatelné množství barevné látky. Nově objevené principy detekce imunoanalytické metody zcitlivují až o několik řádů, takže lze stanovovat i látky doposud nestanovitelné. Provedení však vyžaduje podstatně složitější techniku, tj. jednoúčelové automatické analyzátoři. Na těchto analyzátořích lze pochopitelně provádět i metody typu EIA.

MEIA: Microparticle Enzyme Immuno Assay

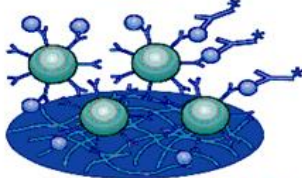
Jedná se o nekompetitivní imunoanalýzu se separací komplexu, s jednou protilátkou neznačenou, vázanou na mikročástice a s jednou protilátkou značenou enzymem. Jde tedy o stanovení heterogenní, patřící mezi EIA metody se sendvičovým uspořádáním. Pro snazší separaci komplexu jsou použity latexové mikročástice. Separace probíhá na matici (*matrix*) ze skelných vláken (speciální nádobka). Značícím enzymem je alkalická fosfatáza (ALP). Substrátem pro enzym je 4-methylumbelliferylfosfát (MUP), který po odštěpení fosfátu pomocí ALP poskytuje fluorescenční látku 4-methylumbelliferon (MU) jejíž fluorescence (zářivý tok) se proměřuje. Použití fluorescenčního indikátoru metodu oproti běžné fotometrii zcitlivuje.



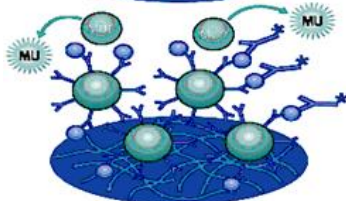
Mikročástice potažené protilátkou proti analytu/antigenu jsou inkubovány spolu se vzorkem a tvoří se reakční směs



Část reakční směsi je přenesena na „matrix“ ze skelných vláken



V dalším kroku je přidán „konjugát“, tj. roztok s protilátkami proti analytu/antigenu značenými alkalickou fosfatázou. Vytvoří se komplex s mikročásticemi s navázaným analytem („sendvič“).



Následuje přidání substrátu MUP (*4-methylumbelliferyl fosfát*). Enzym ALP odštěpí ze substrátu fosforečnou skupinu, zbylý MU (*4-methylumbelliferyl*) je fluorescenční látkou. Měří se fluorescenční tok, jehož intenzita je přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku.

Poznámka: v tomto případě řešil výrobce přístroje oddělení komplexu [antigen-protilátka] filtrací přes skelné vlákno. Jiné řešení přinášejí v tomto ohledu např. přístroje firmy DPC Immulite 2000 a Immulite 2500, kde se tento komplex odděluje centrifugací. Nové přístroje firmy Abbott (Architect) přinášejí obměněnou techniku, a to s použitím magnetických částic (místo skelného vlákna se užije magnetické pole) a protilátky značené patentovanou akridinovou solí (viz „Chemiflex technologie [str.30](#))

Stručný souhrn jednotlivých kroků při analýze MEIA:

- Pacientský vzorek se stanovovaným antigenem se přidá k latexovým částicím s navázanými protilátkami proti tomuto antigenu. Latexové částice se inkubují spolu s antigenem přítomným v pacientském vzorku. Během inkubace dojde k vazbě antigenu na protilátky a k tvorbě komplexu *antigen-protilátka*.
- Reakční směs se přenesne na matrix se skelnými vlákny.
- Přidá se protilátka s navázaným enzymem (ALP), tzv. *konjugát*. Dojde k vazbě značených protilátek na komplex *neznačená protilátka-antigen*. Následuje promytí.
- Přidá se substrát. Pomocí enzymu (ALP) dojde k odštěpení fluorescenční látky (MU) a množství zářivé

Fluorimetrické metody (FIA)

Ke značení je užitá *fluorescenční sloučenina*. FIA metody jsou citlivější než EIA metody. Příkladem je

FPIA – Fluorescence Polarization Immunoassay

Homogenní kompetitivní fluorescenční imunoanalýza s využitím polarizovaného světla. Antigen ze vzorku (Ag) a přidaný antigen značený fluoresceinem (AgF) soutěží o vazebné místo na protilátce (PI). Výsledkem je směs komplexů PI-Ag a PI-AgF. Tyto komplexy budou ve směsi v poměru, v jakém byly původní antigeny. Jinými slovy, čím více bylo antigenu v pacientském vzorku, tím více bude ve výsledné směsi komplexů obsažena forma PI-Ag a opačně.

Reakce se provádí v jednom roztoku a nevyžaduje promývací krok pro oddělení nenavázaných značených protilátek. Pro zjištění výsledku využívá FPIA tři principů: **fluorescence, rotace molekul v roztoku a polarizované světlo**

Fluorescence

Fluorescein navázaný na antigenu po ozáření světlem 490 nm emituje světlo o vlnové délce 520 nm, jehož aktivita se měří. Fluorescenční záření ovšem emituje jak fluoresceinem značený antigen v komplexu, tak značený antigen v roztoku. K vzájemnému rozlišení je využito *rotace molekul a polarizovaného světla*.

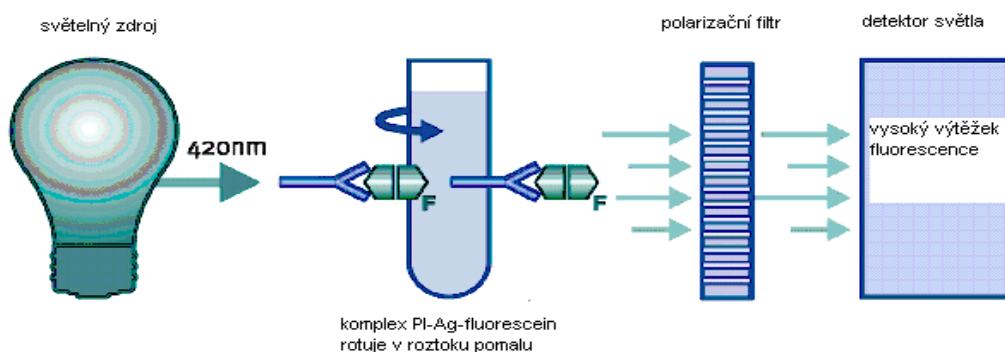
Rotace molekul

Malé molekuly rotují v roztoku mnohem rychleji než molekuly velké. Této skutečnosti je využito pro rozlišení malých molekul představovaných v daném případě antigenem s fluoresceinem od molekul velkých, kterými jsou zde komplexy antigenu s protilátkou. AgF rotuje v roztoku mnohem rychleji, než komplex PI-AgF.

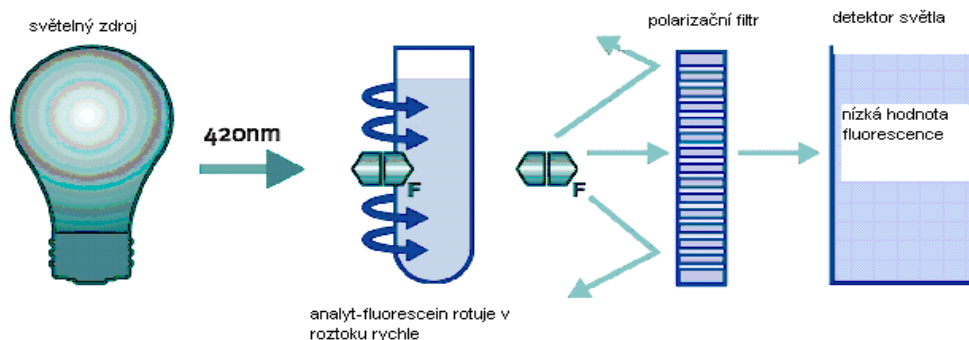
Polarizované světlo

Vlny polarizovaného světla kmitají pouze v jedné rovině. Osvítí-li se malé molekuly AgF tímto světlem, záření absorbují a díky své rychlé rotaci emitují sekundární záření v rovině odlišné od roviny světla excitačního, tj. emitují fluorescenční záření nepolarizované. Polarizačním filtrem, který je součástí uspořádání metody, projde pouze malé množství světla, takže celkový světelný výtěžek bude malý, fluorescenční signál bude malý. Naopak velké molekuly PI-AgF díky své pomalé rotaci emitují fluorescenční záření ve stejné rovině v jaké bylo absorbováno budící záření, tedy výsledkem je emitované polarizované světlo, které po průchodu polarizačním filtrem dopadne na detektor. Intenzita tohoto světla odpovídá obsahu značené protilátky v komplexu. Protože se jedná o kompetitivní uspořádání platí, že čím nižší výtěžek fluorescence, tím vyšší obsah (stanovovaného) antigenu v původním vzorku.

Pomalá rotace komplexu *protilátka-značený antigen* a z toho vyplývající vysoký výtěžek fluorescence rotace komplexu



Rychlá rotace značeného analytu a z toho vyplývající nízký výtěžek fluorescence



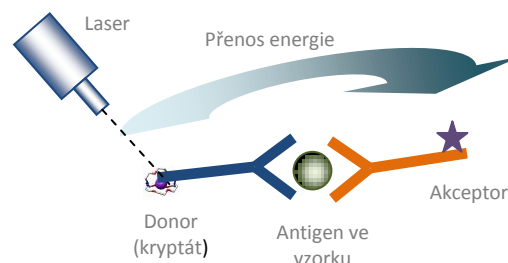
Obrázky jsou převzaty z edukačního materiálu fy ABBOTT

TRACE technologie

Firma Thermo Scientific využila vědeckého bádání Jean-Marie Lehna (viz kreditní kurz věnovaný elektrolytům) v oboru kryptandů a podobných látek, za které obdržel Nobelovu cenu. TRACE je anagramem relativně dlouhého názvu *Time Resolved Amplified Cryptate Emission*, což snad lze přeložit jako *Časově rozložená zesílená kryptátová emise*. Jedná se zde o vyslání signálu emitovaného z imunokomplexu po časové prodlevě způsobené nezářivým přenosem energie z donoru na akceptor.

Schéma vpravo snad bude srozumitelnější než popis.

Po ozáření laserem excituje donor navázaný na první protilátku dlouhotrvající záření, které může vyvolat krátkodobé záření akceptoru navázaného na druhou protilátku pouze tehdy, je-li donor akceptoru nablízku, tj. v imunokomplexu. Fluorescenční signál akceptoru je měřen. Technologie je využita v přístroji B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact PLUS.



B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact PLUS



Jean-Marie Lehn

Luminiscenční metody

Ke značení je užitá látka schopná za určitých okolností emitovat světlo.

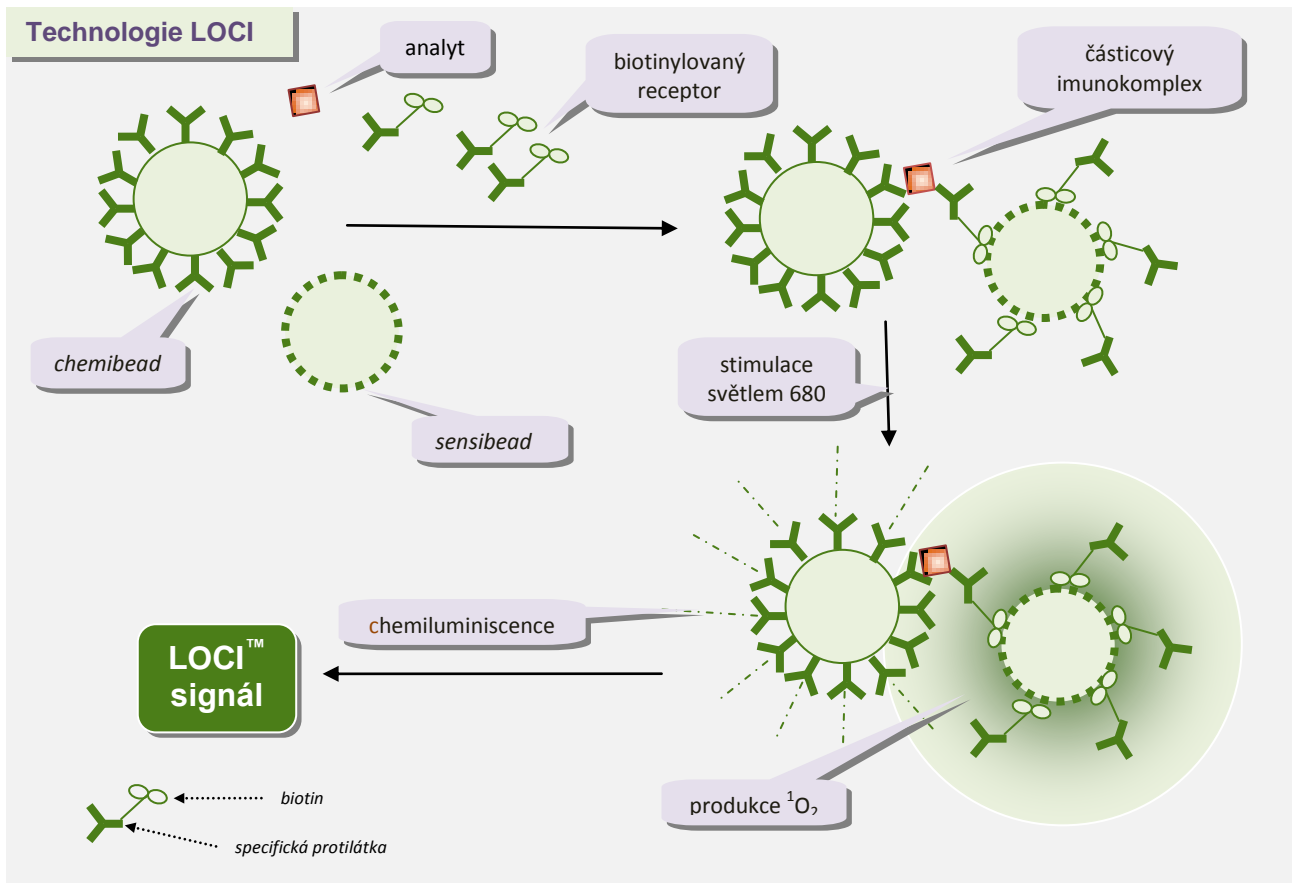
- **Chemiluminiscenční metody (CLIA):** emise světla je výsledkem *chemiluminiscenční reakce při oxidaci vhodných látek* – intenzita světla je úměrná množství značeného proteinu v komplexu
- **Bioluminiscenční metody:** emise světla je aktivována *specifickým enzymem*, jakým je např. luciferáza; bioluminiscenční metody využívají tento systém
- **ECL (elektrochemiluminiscence):** vysoce reaktivní látky, které emitují světlo, se tvoří/generují ze stabilních prekurzorů na povrchu elektrody

Příklady chemiluminiscenčních technologií

Technologie LOCI™

používaná v analyzátoch Siemens Dimension®

LOCI® technologie využívá sílu chemiluminiscenčního signálu a přivádí ji na nové úrovně citlivosti. LOCI® technologie používá dva typy syntetických mikročastic – citlivou částici (*sensibead*) potaženou streptavidinem a s obsahem fotocitlivé látky a chemickou částici (*chemibead*) potaženou protilátkou specifickou pro metodu a s obsahem fotocitlivé látky. Je přidán ještě třetí reagent ve formě biotinylované protilátky specifické pro metodu. Reaktanty se vážnou s analytem za tvorby imunokomplexů vázaných s částicí. Ozáření tohoto komplexu světlem o vlnové délce 680 nm uvolňuje ze *sensibead* singletový kyslík, který difunduje do navázaného *chemibead* a spouští chemiluminiscenci. Blokovací vrstva kolem každé částice minimalizuje možnost nespecifické vazby.



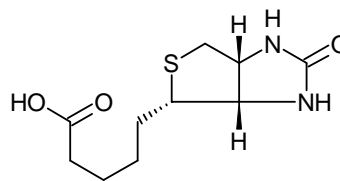
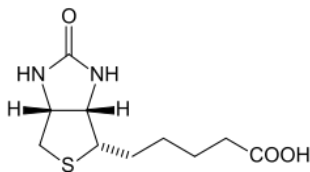
Chemibeads, jsou latexové kuličky (200 nm) obsahující olefinovou sůl, která reaguje se singletovým kyslíkem za tvorby 1O_2 aduktu, který se rozkládá a generuje chemiluminiscenční signál. Kuličky obsahují také akceptor fluorescenční energie, který mění emisní záření na 612 nm. Blokovací vrstva kolem kuličky izoluje značku a minimalizuje potenciální nespecifické vazby. V sandwichovém formátu jsou záchytné protilátky vázány na povrch *chemibead*.

Sensibeads, jsou latexové kuličky (200 nm) obsahující fotosenzitivní sůl, která absorbuje světlo o vlnové délce 680 nm a generuje singletový kyslík (1O_2). Blokovací vrstva kolem kuličky izoluje značku a minimalizuje potenciální nespecifické vazby. Streptavidin, navázaný na povrch částice, se váže se biotinylovaným receptorovým reagentem. To přivádí zdroj singletového kyslíku (*sensibead*) do blízkosti receptoru singletového kyslíku (*Chemibead*), čímž se vytvoří párový imunokomplex z částic, aby se mohl generovat LOCI™ signál.

Biotinylované receptory, jsou reagenty specifické pro analyt, typicky se jedná o biotinylované protilátky. Slouží jako část mostu mezi *chemibead* a *sensibead* v párovém imunokomplexu z mikročastic.

Biotinylace

Biotin se nazývá také vitamín H, koenzym R či vitamín B₇).



Dva (různě pojaté) vzorce biotinu

Je to koenzym karboxyláz a zúčastňuje se syntézy mastných kyselin a aminokyselin izoleucinu a valinu. Rovněž se účastní v glukoneogenezi

Biotinylace se rozumí vnesení biotinylových skupin do molekul, resp., je to proces při kterém se biotin kovalentně naváže na protein, nukleovou kyselinu nebo další molekuly. Biotinylace může probíhat chemicky nebo enzymaticky. Vzhledem k tomu, že biotin má malou molekulu, nenarušuje biotinylace přirozené funkce biotinylované molekuly.

Biotin se extrémně silně váže na *streptavidin* a *avidin*.

Streptavidin je protein o velikosti 60 kDa, který byl purifikován z bakterie *Streptomyces avidinii*. Je to *homotetramer*, který má vysokou afinitu k biotinu (vitamin B₇). Vazba biotinu na streptavidin patří mezi nejsilnější nekovalentní interakce jaké jsou v přírodě známy.

Streptavidin se extenzivně používá v molekulární biologii a bionanotechnologiích, protože streptavidinový-biotinový komplex je velmi odolný vůči organickým rozpouštědlům, denaturačním činidlům, detergentům, proteolytickým enzymům, extrémním teplotám a pH.

Avidin je bílkovina separovaná z vaječného bílku, je to rovněž známá látka vázající se s biotinem. Má přibližně 30% sekvenční identitu se streptavidinem, ale sekundární, terciární a kvartérní struktury má se streptavidinem téměř identické. Má vyšší afinitu k biotinu, ale nižší, pokud je již na biotin navázaná jiná molekula, proto je streptavidin lepším vazebným činidlem pro biotin než avidin.

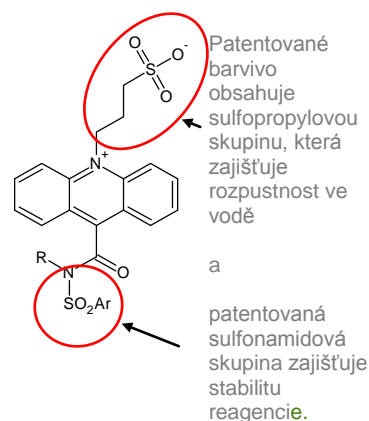
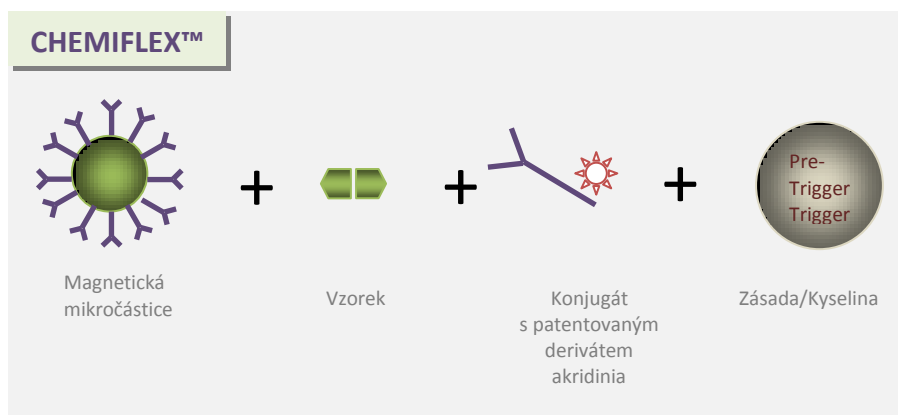
Vazba biotinu na zmíněné látky je rychlá a vysoce specifická, proto jsou tyto interakce využívány v mnoha biotechnologických oblastech k izolaci biotinylovaných molekul. Tyto izolace je možné provádět v různých prostředích, díky tomu, že vazba se streptavidinem a avidinem odolává extrémním teplotám, extrémnímu pH a proteolýze.

Na protein, který je předmětem zájmu, lze navázat několik molekul biotinu a tedy i několik molekul avidinu či streptavidinu, což vede ke zvýšení citlivosti detekce daného proteinu.

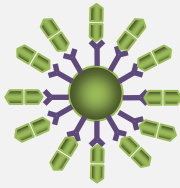
Na biotin navázaný např. na komplex *vazebný protein-analyt* lze dále navázat avidin/streptavidin značený enzymem, radioizotopem, fluorescenční látkou, kovem či jinak. Takto dojde k navázání detekčního prvku („nálepky“) a citlivost metody se zvýší (metoda s biotin/avidinovým komplexem má např. asi 1000x vyšší citlivost než RIA).

ChemiFlex® technologie

používaná v analyzátoch Abbott Architect. Jako „nálepka“ slouží patentovaný akridinový derivát. technika se nazývá *chemiluminiscenční magnetické imunostanovení (Chemiluminescent Magnetic Immunoassay) – CMIA*.

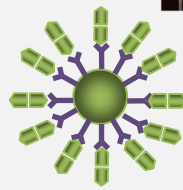


CHEMIFLEX™

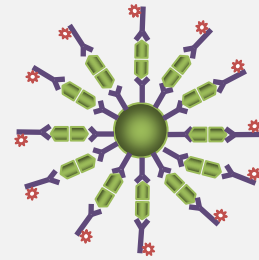


V první fázi dojde k vazbě antigenu ze vzorku s protilátkou na paramagnetické částici.

Uspořádání může být i opačné, navázán může být i virus.



Následuje přitažení částice magnetem a odmytí nezreagovaných komponent.



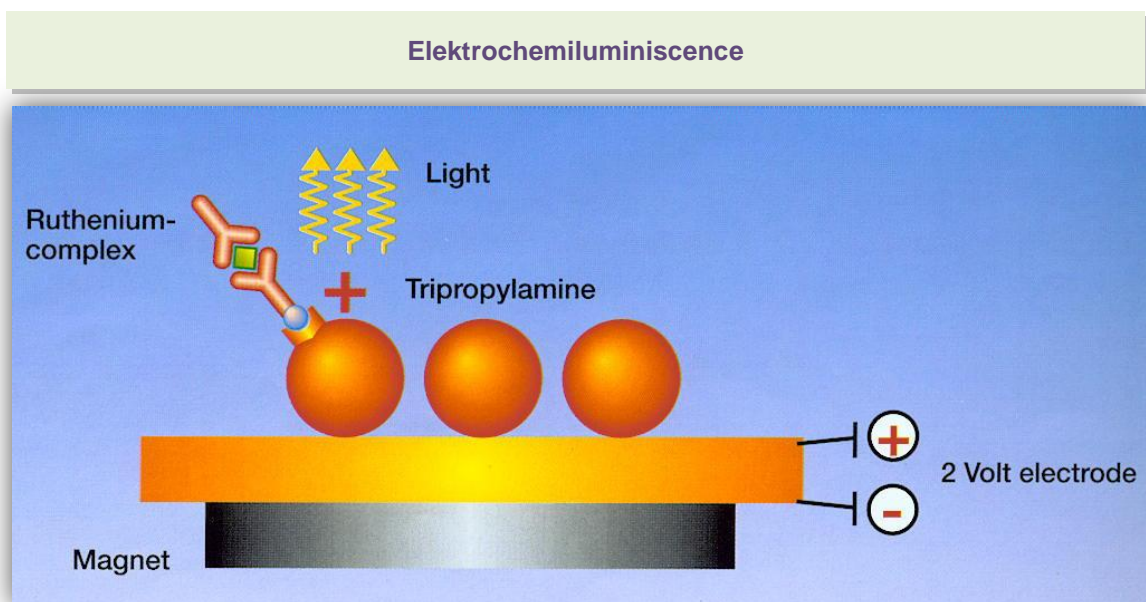
Stav po přidání akridiniového konjugátu
Následuje promytí a přidání peroxidu vodíku (*pre-trigger*), který zabrání předčasné emisi světla a odštěpí akridiniové barvivo z konjugátu. Poté je přidán hydroxid sodný (*trigger*) a vzájemným působením peroxidu a louhu na akridinium dojde k oxidaci chemiluminiscenční látky za tvorby N-methylakridonu a emise světla.

V tomto případě jsou mikročástice (fero)magnetické, takže promývací krok (odstranění nezreagovaných konjugátů) je usnadněn vytvořením magnetického pole (zachytí se pouze magnetické částice, nezreagované součásti se vymyjí). Jedná se o nekompetitivní sandwichovou techniku (viz str. 10-24), kde množství měřeného signálu je přímo úměrné množství analytu přítomného ve vzorku. Použitá chemiluminiscenční „nálepka“ (akridiniový derivát) produkuje silnou světelnou emisi, tudíž metoda vykazuje i vysokou citlivost. Chemiluminiscenční látka produkuje světlo, je-li kombinována s *trigger* reagensii (z angl. *trigger* = *spouštět*, *spouštěcí mechanismus*; *spustit*, *aktivovat*, *vyvolat* *vzbudit*; *odpálit*).

Elektrochemiluminiscence (ECL, ECLIA)

Zde se využívá přeměny vysoce stabilního prekurzoru na povrchu elektrody na vysoce reaktivní prvek. Vysoce reaktivní prvky reagují navzájem za tvorby světelného záblesku.

ELECSYS (automat od firmy ROCHE, dříve Boehringer Mannheim GmbH) využívá jako prekurzory *tripropylamin (TPA)* a komplex *ruthenium(II)-tri(bipyridyl)[Ru(bpy)2+]*. TPA slouží k zabezpečení elektrodového děje, vlastní chemiluminiscenční „nálepkou“ je rutheniový komplex. Konečný chemiluminiscenční produkt se tvoří během detekce. Spíše než chemicky je chemiluminiscenční reakce iniciována elektricky, vložením napětí na roztok se vzorkem. Reakce je přesně kontrolována, protože se nemusí přidávat dodatečné reagensy a není nutno míchat roztokem. Metoda je poněkud komplikovanější a náročnější na přístrojové vybavení, ale přináší zvýšení citlivosti a specifity stanovení.



(z materiálů fy Roche)

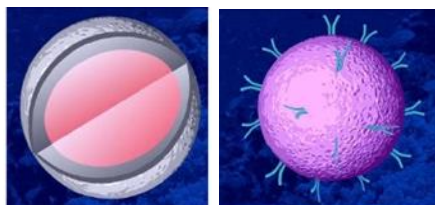
Multiplexové technologie

Současné provedení několika testů v „jedné zkumavce“ se nazývá *multiplex*, *multiplexing*.

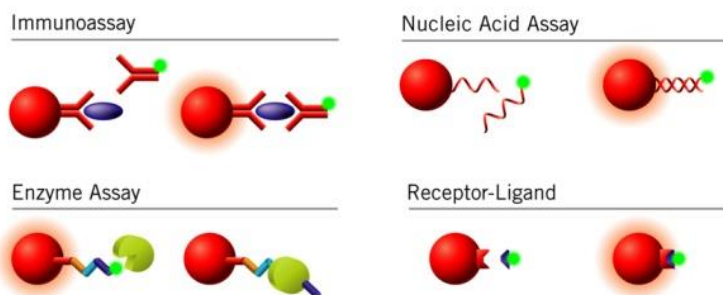
xMAP technologie

xMAP technologie je produktem firmy Luminex, jejímž hlavním sídlem je Austin v Texasu.

xMAP technologie používá polystyrenové mikročástice (*beads*, *microspheres*) o velikosti 5,6 μm , které jsou napuštěny červeným a infračerveným fluoroforem. Různý poměr obou barviv umožňuje získat až 100 různých odstínů, tedy až 100 různých mikročástic. Každá tato částice je spektrálně unikátní, je jednoznačně rozeznatelná, což umožňuje současné provedení (*multiplexing*) až 100 různých testů v jednom reakčním objemu. Mikrosféra má dvojí funkci, slouží jako pevná fáze i jako identifikátor.



Schématické znázornění vybarvení mikrosféry (vlevo) a (vpravo) potažení mikrosféry vazebným partnerem



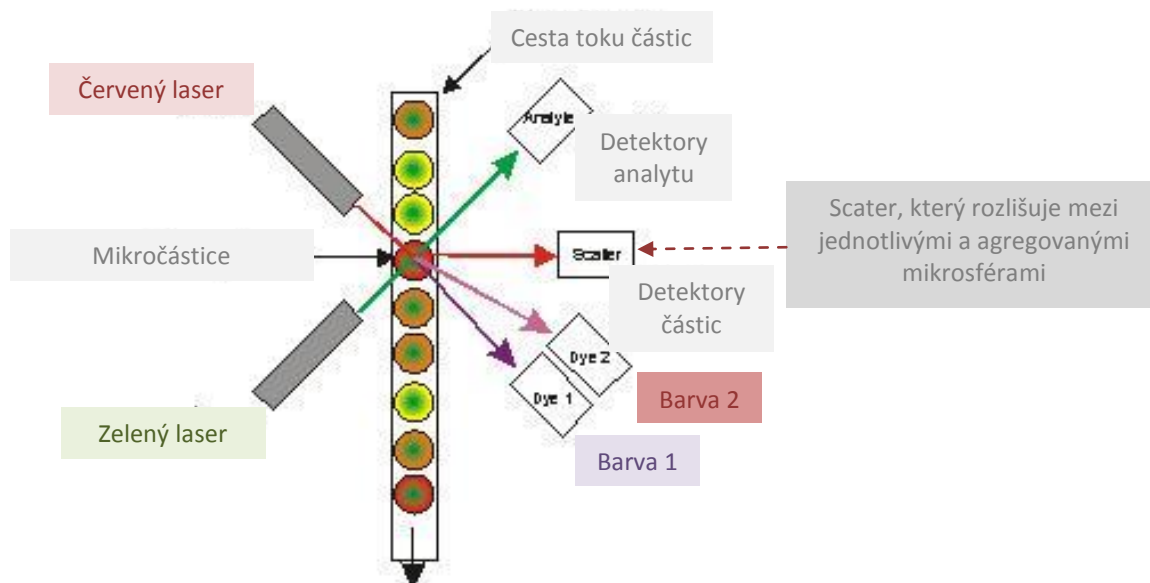
Využití technologie je velmi flexibilní: na obrázku jsou znázorněny možnosti pro imunoeseje, metody stanovení nukleových kyselin, enzymů a metody na bázi vazby receptor-ligand. Na obrázku je také vidět, značení druhé protilátky (konjugátu), hybridizační sondy a ligandu. U enzymového stanovení je to značený substrát, resp. substrátový analog.

Provedení je možné na mikrodestičkách (ELISA) či zcela automatizované s využitím průtokového cytometru.

Průtokový cytometr detekuje jednotlivé mikročástice. Každá částice nese v podstatě dva kódy, tj. svou vlastní barvu, která identifikuje analyt a fluorescenční signál *fykoerithrinu*, fotosyntetického barviva vázaného prostřednictvím streptavidinu na příslušného vazebného partnera.

Vlastní detekce je umožněna použitím duálního laseru. Zelený laser (532 nm; „assay“ laser) se používá k excitaci PE-barviva (*PE = PhycoErythrin*, fykoerithrin). Červený laser (635 nm) se používá k excitaci barviva uvnitř mikrosféry.

Detektory jsou čtyři a identifikují mikrosféry (analyt) a PE-fluorescenci (kvantita).



Firma Bio-Rad využila tuto technologii v automatickém analyzátoru BioPlex 2200.



V tomto provedení je k dispozici až 25 odstínů, tedy 25 různých mikrosfér, na které mohou být navázány unikátní antigeny (test na stanovení protilátek).

Assay Microspheres

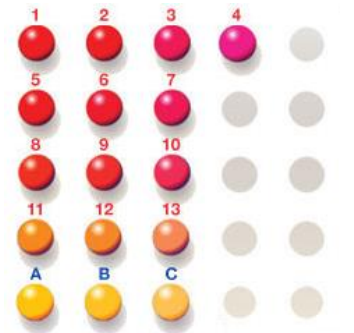
- 1 dsDNA
- 2 Chromatin
- 3 Ribosomal P
- 4 SS-A (52 kD)*
- 5 SS-A (60 kD)*
- 6 SS-B
- 7 Sm
- 8 Sm/RNP
- 9 RNP (A)*
- 10 RNP{ (68)*
- 11 Scl-70
- 12 Jo-1
- 13 Centromere B

Obsazení mikrosfér

1 – 13: testovací mikrosféry (seznam metod, resp. protilátek proti antigenům, jež jsou lokalizovány na konkrétních mikrosférách, je zcela vpravo.)

A, B, C: QC mikrosféry

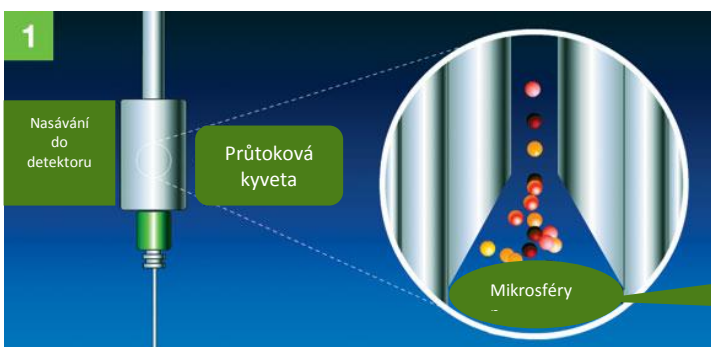
- A: SVB – sféra určená k verifikaci séra,
- B: SB – sféra s vnitřním standardem
- C: RBB – sféra pro blank reagentie.



Konkrétní provedení pro ANA test (současné stanovení 13 antinukleárních protilátek pomocí specifických antigenů)

(jediná) reagentie použitá pro stanovení těchto analytů

Poznámka: Minimální počet měření 150 pro každý analyt oproti klasickému jednomu měření v imunoanalýze značně posiluje kvalitu výsledku.



Každý analyt má vyčleněno minimálně 150 mikrosfér, tj. minimálně 150 výsledků na jeden analyt, 100 000 měření za minutu.

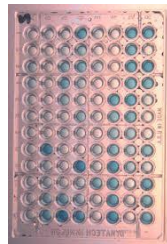
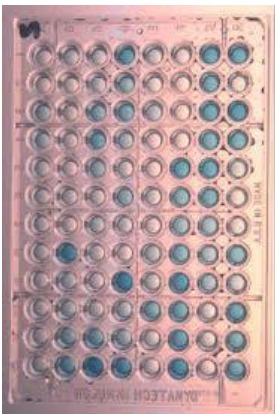
Mikrosféry se jednotlivě pohybují v řadě za sebou průtokovým cytometrem

Mikroarraye a biočipy

Proteomika a genomika přináší do praxe laboratorních pracovníků miniaturizaci a nové pojmy jako *biočip*, *mikroarray* a podobně. O tématu je také pojednáno v kreditním kurzu věnovaném problematice DNA/RNA, zde je stručná zmínka o přínosu z oblasti proteomiky.



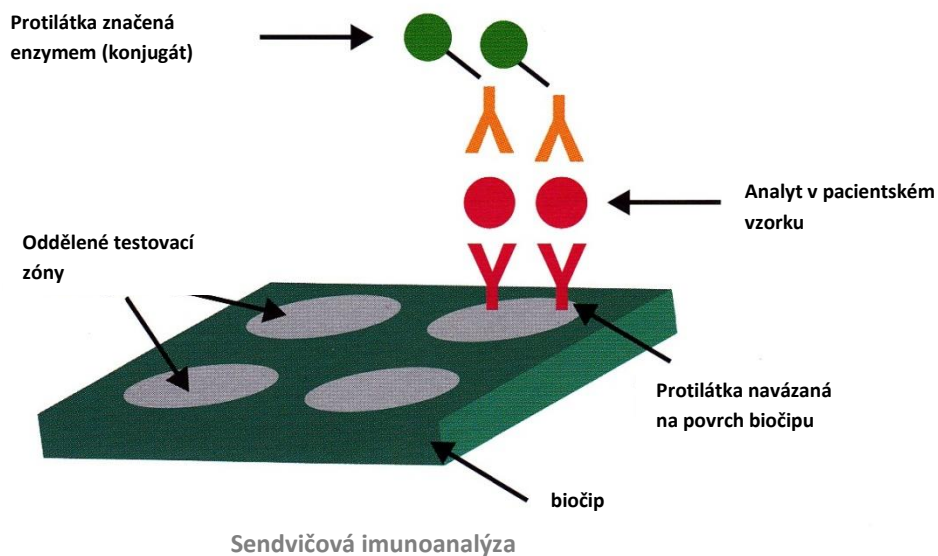
Biočip, mikroarray, je představován malou destičkou (např. o rozměrech 9 x 9 mm; *fa Randox*, viz obrázek vlevo), na které jsou navázány buď protilátky (pokud se v biologickém vzorku pátrá po antigenu), nebo opačně antigeny (pokud se v biologickém materiálu pátrá po protilátce). Celá destička připomíná počítačový „chip“, odtud název „biočip“ případně „mikroarray“, tj. mřížka miniaturních rozměrů. Po navázání příslušného protipólu, inkubací a promytí následuje vizualizace výsledku, podobná metodám EIA. Na malé ploše je možno vedle sebe navázat několik typů protilátek/antigenů a vytvořit tak přímo *panel* určitých markerů (koronárních, tumorových, kostního metabolismu aj.). Lze tak pacientovi současně stanovit několik analytů ve stejném čase a na malém prostoru (další typ *multiplexové* analýzy). V současnosti se tyto metody pomalu ale jistě začínají prosazovat, i když ceny prozatím nejsou optimální. Dá se ale předpokládat snížení ceny s jejich nasazením do terénu ve větším měřítku. Dokladem těchto trendů je např. řada analyzátorů *Evidence* fy *Randox*



Jako názornou pomůcku pojmu „array“ si můžeme představit ELISA destičku s vizualizací proběhlých reakcí při pohledu shora, jak je naznačeno na uvedených obrázcích. Každá destička představuje v podstatě mřížku tvořenou různobarevnými body, které odpovídají jednotlivým jamkám/cisternám s navázanými protilátkami/antigeny a s výslednou reakcí jednotlivých vzorků. Směrem dolů, postupným zmenšováním obrázku dospějeme, alespoň myšlenkově, k „mikrodestičce“, čili jakémusi „čipu“.

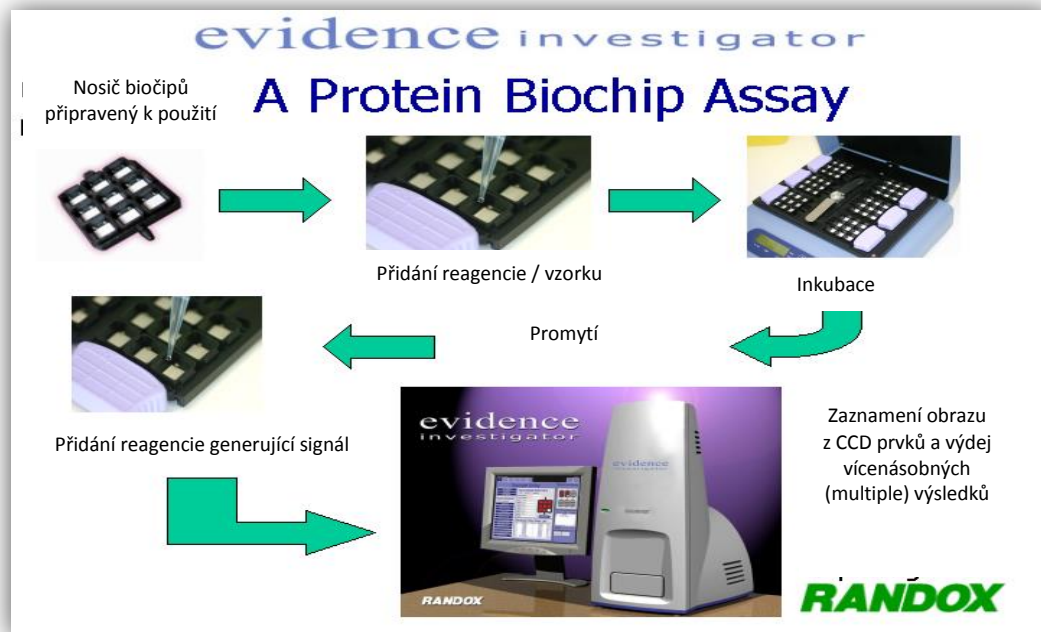
Skutečná výroba mikročipů probíhá jinak, i když uvedená představa může být užitečná. Postup výroby mikročipu z oblasti DNA technologií je zmíněn v příslušném kreditním kurzu. Nutno dodat, že např. řada analyzátorů *Evidence* fy *Randox* umožňuje jak proteinovou analýzu, tzn. stanovení antigenu pomocí protilátky navázané na příslušné místo mikročipu, či stanovení protilátky pomocí antigenu navázaného na příslušné místo mikročipu, kompetitivní i sandwichovou imunoanalýzu tak i SNP (*single nucleotide polymorphism*) genotypizaci, tzn. měření variací polymorfismu způsobeného změnou/mutací jednoho nukleotidového páru na specifickém lokusu, stanovení genové exprese (RNA expresi), detekci patogenů a detekci mutací vše, jak bylo uvedeno, v multiplexovém spořádání.

Biočip fy Randox pro sandvičovou imunoanalýzu (*sandwich immunoassay*) – schéma uspořádání



Na stránkách www.bio-rad.com a www.randox.com je možno najít další i edukační materiál o nových přístrojích a metodách z této oblasti.

Algoritmus stanovení na proteinovém biočipu v poloautomatu
Evidence[®] Investigator



<http://www.slideshare.net/medicoshow/antinuclear-antibodies-by-bioplex-2200>



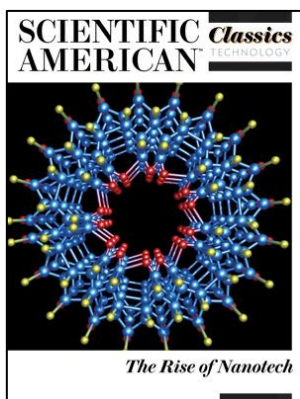
RANDOX
ENGINEERING

Plně automatický analyzátor fy Randox využívající technologii biočipových polí (*Biochip Array Technology*).

Tento přístroj umožňuje testování v oblastech

- klinické imunochemie
- forenzní a klinické toxikologie
- výzkumu
- kontroly potravin
- kontroly zbytkových drog

Poměrně rozsáhlou nabídku testů (*arrayí pro daný účel*), lze nalézt na adrese: <http://www.randox.com/evidence-evolution-test-menu.php>



Se zajímavým přístupem k problematice přišli vědci z Univerzity v Cambridgi: tenká vrstva křemene je pokryta protilátkou; ke krystalu se přidá virus, který se naváže na protilátku; zavede se vysokofrekvenční proud a krystal osciluje, přičemž zmítá komplexem virus (antigen)-protilátka; při vhodné frekvenci dojde k odtržení viru a je slyšet charakteristický zvuk; aby došlo k roztržení tohoto komplexu, je třeba vystavit komplex síle, která je přibližně desetimilionkrát větší než je zemská přitažlivost; to odpovídá frekvenci $1,4 \cdot 10^7$ kmitů za sekundu; metodou se nezjišťují protilátky, ale přímo (pomocí specifických protilátek) virus; metoda má ještě asi 3 roky do komerčního využití; společnost, která se zabývá komerčním využitím této metody se nazývá AKUBIO a byla založena přímo k tomuto účelu; stručně řečeno - metoda umožňuje slyšet přítomnost viru (event. bakterií) ve vzorku (krve).

(Scientific American, české vydání, březen 2002, str. 11 – 12)

Užitečné internetové adresy:

Přehled imunoanalytických metod např. na adresách:

<http://szumak.xf.cz/download/imu-met.pdf>

<http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/BAM/Imunometody.pdf>

<http://che1.lf1.cuni.cz/html/imuno.pdf>

Elektroforetické techniky:

http://www.sci.muni.cz/LMFR/proteomika2005/Bi8202_2005_ELFO.pdf

<http://sweb.cz/biochemie/x/metody/elektroforeza.htm>

http://www.pmfhk.cz/Prednasky/separacni_metody.pdf

Obsáhlý atlas proteinové elektroforézy

[http://www.google.cz/url?url=http://www.pathology.ecu.edu/Public/faculty/epbookpict.pdf&rct=j&sa=X&ei=IAXsT7XDLIWW-wa2w-](http://www.google.cz/url?url=http://www.pathology.ecu.edu/Public/faculty/epbookpict.pdf&rct=j&sa=X&ei=IAXsT7XDLIWW-wa2w-20BQ&ved=0CHUQ2wQ4KA&q=elektrofor%C3%A9za+b%C3%ADkovin&usq=AFQjCNHkhcBZMwUcg367T0qnit1FPCLuLw)

[20BQ&ved=0CHUQ2wQ4KA&q=elektrofor%C3%A9za+b%C3%ADkovin&usq=AFQjCNHkhcBZMwUcg367T0qnit1FPCLuLw](http://www.google.cz/url?url=http://www.pathology.ecu.edu/Public/faculty/epbookpict.pdf&rct=j&sa=X&ei=IAXsT7XDLIWW-wa2w-20BQ&ved=0CHUQ2wQ4KA&q=elektrofor%C3%A9za+b%C3%ADkovin&usq=AFQjCNHkhcBZMwUcg367T0qnit1FPCLuLw)

Biočipové technologie:

<http://www.randox.com/Biochip%20Immunoassays.php>

Imunochemický a biochemický analyzátor:

<http://www.drg-diagnostics.de/65-1-Equipment+DRGHYBRiDXL.html>

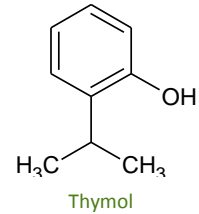
Zákalové reakce

Principem je tvorba zákalů vysrážením části plasmatických bílkovin některými činidly (thymol, ale i voda), umožněná změnou stability plasmatických bílkovin za patologických stavů. Z řady zákalových reakcí se nejdéle udržela (zvl. na pracovištích s infekčními klinikami) *thymolová zákalová reakce (TZR)*, ale velmi pravděpodobně se ani ta, už dnes nikde neprovádí.

Činidlem je nasycený vodný roztok thymolu v pufru (TRIS + kyselina jablečná), případně nasycený alkoholický koncentrát thymolu (**PLIVA-Lachema Diagnostika**).

Za tvorby zákalu reagují β - a γ -**globuliny** (je to tedy reakce pouze s uvedenými frakcemi bílkovinného spektra plasmatických bílkovin), **cholesterol** a **fosfolipidy**, zhruba ve stejném poměru; zákal je ovlivněn mnoha faktory (Hb, bilirubin, lipidy; teplotou, pH, iontovou silou apod.)

Standard: Suspenze síranu barnatého v kyselině sírové a chloridu barnatého připravená za přesně definovaných podmínek (objem, koncentrace, teplota, čas). Výsledek udávaly tzv. Shankovy a Hoaglandovy jednotky: S-H, většinou v rozsahu 0 – 20, vyšší hodnoty se uváděly „> 20“]

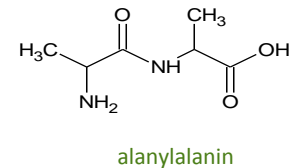
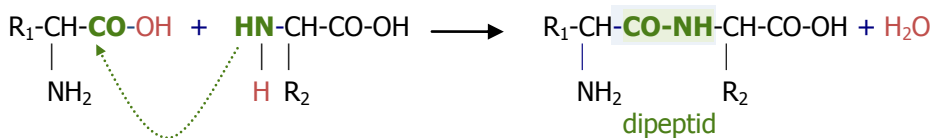


Klinické poznámky:

Pozitivita reakce vypovídá o změnách ve složení plasmatických bílkovin při nemocech jater, ledvin, kostní dřeně, plic, bakteriální endokarditidě, aj.

Stručné opakování z obecné biochemie

Peptidická vazba (speciální případ vazby amidické)- vazba mezi aminoskupinou jedné aminokyseliny a karboxylovou skupinou druhé aminokyseliny: vzniká amid = peptid



Peptidy – amidy kyselin, acylaminokyseliny (glycylglycin, glycylalanin, alanylglycin atd.); do 10 aminokyselin– dipeptid, tripeptid,, nonapeptid, dekaeptid

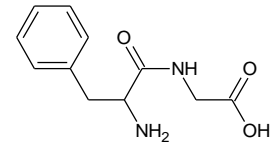
Oligopeptidy - nad 10 aminokyselin

Polypeptidy - větší množství aminokyselin (neostrá hranice)

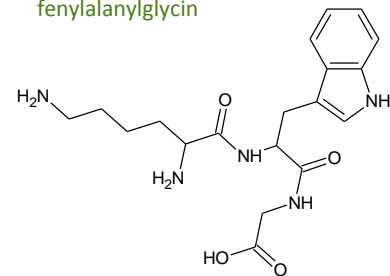
Proteiny (makropeptidy, bílkoviny) – nad 100 aminokyselin

Přirozeně se vyskytující peptidy:

- **Glutathion** (γ -glutamylcysteylglycin): zúčastňuje se redoxních pochodů
- **Peptidové hormony**:
 - pankreatu (insulin, glukagon)
 - hypothalamu (thyoliberin)
 - hypofýzy (ACTH, ocytocin, vasopresin)
- **Antibiotika**: penicilin, gramicidin, azaserin, chloramfenikol, aktinomycin, valinomycin
- **Jedy**: falloidin (7 aminokyselin), amanitin – jedy z hub



fenylalanylglycin



lysyltryptofanylglycin

Bílkoviny (z řeckého *πρωτεϊνο* = zaujímám první místo): 100 až několik tisíc aminokyselin

Jednoduché bílkoviny

- **skleroproteiny**: (fibrilární bílkoviny), nerozpustné, vláknitá struktura, podpůrné a strukturální látky (kolagen, keratin, elastin)
- **sféroproteiny** (globulární bílkoviny): rozpustné ve vodě či solných roztocích, kulovité molekuly, dělí se na histony, albuminy a globuliny

Složené (konjugované) bílkoviny

- metaloproteiny
- fosfoproteiny
- lipoproteiny
- nukleoproteiny
- glykoproteiny
- chromoproteiny

Primární struktura = pořadí (sekvence) aminokyselin v bílkovinném řetězci, je dána geneticky

Sekundární struktura = způsob uspořádání bílkovinného řetězce

- struktura skládaného listu
- α -šroubovice (α -helix)
- mnoho proteinů obsahuje obě tyto struktury

Terciární struktura = způsob uspořádání řetězce v prostoru

Kvartérní struktura = způsob složení molekuly z bílkovinných podjednotek (srovnej např. se strukturou hemoglobinu)

Poznámka: Sekundární, terciární a kvartérní struktura se někdy zahrnují pod pojem konformace řetězců

Vazby, které drží konformaci řetězců

- vodíkové můstky (nejdůležitější vedlejší valence): např. **CO-----HN**
- disulfidická vazba (nejdůležitější hlavní valence): cys – **S – S** – cys
- iontové vazby (např. histidinové zbytky mohou tvořit komplex se zinkem $[\text{Zn}^{2+}]$, který stabilizuje dvojitou molekulu aj.)
- hydrofobní vazby (uvnitř molekul)

Fyzikální a chemické vlastnosti molekul

Bílkoviny tvoří pravé roztoky (monodispersní), tj. v roztoku jsou přítomny jednotlivé molekuly – velikost molekul však odpovídá velikosti agregátů molekul koloidů – některé vlastnosti roztoků bílkovin jsou proto shodné s vlastnostmi polydispersních roztoků (koloidních roztoků) anorganických či organických látek.

Sol – název pro roztok globulárních bílkovin o normální viskozitě

Gel – název pro gelovité roztoky o velké viskozitě, či pro rosoly: vláknité a nitřovité makromolekuly jsou navzájem zesíťovány a v meziprostorách je voda

Denaturace – strukturní změny v molekule bílkoviny, při nichž dochází ke ztrátě biologických vlastností, snižuje se rozpustnost a mění se chemické a fyzikální vlastnosti

Příprava čistých bílkovin a zkoumání jejich čistoty

Příprava

Nejstarší separační metodou bílkovin je zřejmě srážení, které může probíhat nevratně (ireverzibilně) či vratně. Při reverzibilním srážení lze nepoškozené bílkoviny znovu převést do roztoku a dále je zkoumat. Nevratné srážení slouží k odstranění balastních bílkovin.

Srážení

- *ireverzibilně* za denaturace (kyselina trichloroctová, chloristá, octan uranylu)
- *reverzibilně* neutrálními solemi (síran amonný, síran sodný, síran hořečnatý) nebo organickými rozpouštědly (alkohol, aceton)

Výbornou dělicí technikou je i chromatografie, především chromatografie vylučovací (na molekulových sítích), případně kombinovaná s elektroforézou (izoelektrická fokusace apod.) a moderní HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

Po objevu polyakrylamidového gelu jako výborného nosiče pro různé typy elektroforetického dělení, se zařadila mezi klasické separační metody bílkovin v biologickém materiálu *dvourozměrná polyakrylamidová elektroforéza*.

K detekci rozdělených bílkovin se používají *citlivé barvicí a fluorescenční metody*.

Moderní metody jsou složitější. K detekci a kvantifikaci proteinů slouží *Automatizovaná tandémově hmotnostní spektrometrie za použití ICAT reagentů (Isotope Coded Affinity Tags – izotopy značené afinitní tagy; tag = nálepka, značka, visačka, ocásek, poutko, označení)*. Stručný popis (v angličtině) této metody lze nalézt např. na adrese: <http://dir.niehs.nih.gov/proteomics/emerg2.htm>.

Dalším systémem umožňujícím detekci, kvantifikaci a navíc i sekvenaci (určení pořadí aminokyselin v peptidu) vybraných peptidů je hmotnostní spektrometrie *MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole time-of flight mass spectrometry - ionizace laserem za přítomnosti matrice [MALDI] v kombinaci s detektorem doby letu [TOF])*. Stručný popis metody (v češtině) je možno nalézt na adrese <http://www.vesmir.cz/clanky/clanek/id/1008>.

Zkoumání čistoty bílkovin

je možné za použití např. těchto metod: chromatografie, [elektroforetické metody](#), sérologické metody aj.

Poznámka ke chromatografickým metodám

Poprvé popsal principy (adsorpční) chromatografie ruský vědec M.S.Cvět roku 1905, kdy zkoumal a dělil barvy květů (!). Protože dostával krásné barevné skvrny, nazval metodu chromatografie (v řečtině chróma znamená barva a grafein psát).

Fyzikálně-chemicky se jedná o

postupné ustavování fázových rovnováh součástí analyzované směsi mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, které jsou relativně vůči sobě v pohybu (obecně: jedna fáze je *stacionární* – bez pohybu, např. oxid hlinitý, celulóza, druhá je *mobilní* – kapalina či plyn).

Podle **charakteru mobilní fáze** se dělí chromatografie na chromatografii

- kapalinovou a
- plynovou.

Podle **uspořádání** lze rozlišovat chromatografii

- sloupcovou čili kolonovou
- papírovou
- na tenké vrstvě.

Dalším rozlišením je rozdělení podle **dělicího principu**.

Dělicími principy jsou

- koeficient rozpustnosti (*rozdělovací chromatografie*)
- koeficient adsorpce (*adsorpční chromatografie*)
- velikost molekuly (*vylučovací či permeační chromatografie, též zvaná chromatografie na molekulových sítích, či gelová chromatografie*)
- výměna iontů (*iontově výměnná či ionexová chromatografie*)
- vazba na *ligandy* - malé molekuly vázající se na určitý protein (*afinitní chromatografie; typ adsorpční chromatografie*).

Podle **podmínek provedení** se rozeznává chromatografie

- *izokratická (za konstantních podmínek)*
- *gradientová (mění se např. iontová síla, pH nebo složení elučního/vymývacího pufru).*

Za zmínku stojí ještě *separační chromatografie*, využívaná i v průmyslovém měřítku pro (kvantitativní) přípravu různých látek.

Výčet metod není úplný.

Některé pojmy ze spektrofotometrie

Absorbance: $A = \log \frac{I_0}{I}$,

tzn., absorbance je definována jako logaritmus podílu intenzity světla do roztoku vstupujícího a intenzity světla z roztoku vystupujícího.

Turbidance: $T = \log \frac{I_0}{I} = \frac{r^3}{r^4 + k\lambda^4} \cdot cd = \tau \cdot c \cdot d$,

kde r = střední poloměr částic, λ = vlnová délka primárního záření, k = konstanta závislá na měřicím uspořádání, c = koncentrace látky, d = vzdálenost od pozorovatele, τ = turbiditní koeficient pro koncentraci "c" v molech/l a pro danou teplotu. Průběh je lineární pouze pro velmi zředěné roztoky a v omezeném rozsahu.

Kontrolní otázky

1. Jaký význam mají bílkoviny krevní plazmy?
2. Jaké jsou metody stanovení celkových bílkovin? Liší se nějak jejich použití z hlediska zpracovávaného systému (typu vzorku)? Jak? Dokázali byste vybrat vhodnou metodu podle zpracovávaného materiálu?
3. Která metoda je referenční pro stanovení celkových bílkovin, jak se jmenuje, jaký je její princip?
4. Dokážete si uvědomit co alespoň přibližně znamená nález s koncentracemi celkových bílkovin mimo referenční meze? Jak se tyto stavy nazývají?
5. Co je to elektroforéza, jak se rozděluje, co je principem? Jak se dělí bílkoviny krevní plazmy/krevního séra při rutinní elektroforéze (např. na agarosovém gelu)?
6. Jste schopni stručně definovat pojem „elektroforetický typ“? K čemu slouží?
7. Víte které bílkoviny se nacházejí v jednotlivých frakcích a jaké mají vlastnosti?
8. Jaký je princip imunochemických metod? Jaká je jejich základní kladná vlastnost?
9. Dokážete definovat pojmy „protilátka“, „antigen“, „epitop“, „hapten“. Je vám jasný rozdíl mezi „monovalentním“ a „polyvalentním antisérem“, mezi „monoklonální“ a „polyklonální protilátkou“?
10. Jaká prostředí se používají pro imunochemická stanovení na principu imunoprecipitační reakce?
11. Rozumíte Heldebergerově křivce? Co vyjadřuje? Dokážete popsat jednotlivé oblasti a podat k tomu komentář? Co je to kritický bod? Co to znamená pro laboratorní praxi a jak se vyrovnat s touto vlastností imunochemických metod?
12. Dokážete vystihnout podstatu jednotlivých imunochemických metod (v gelovém prostředí) popsaných v tomto textu? K čemu byste tyto metody použili? V jakém vztahu k těmto metodám (z hlediska indikace vyšetření) je elektroforéza zmíněná v otázce č. 5?
13. Víte proč některé metody obsahují ve svém názvu pojmy „western“ „southern“ apod.? Má to vztah ke světovým stranám?
14. Chápete rozdíl mezi metodami „PETIA“ a „PETINIA“? Co je to za metody?
15. Jaký typ metod jsme si popsali pod pojmem „vazebné testy“? Chápete rozdíl mezi „soutěživým“ a „nesoutěživým“ uspořádáním? Jaký je rozdíl mezi „heterogenní“ a „homogenní“ metodou?
16. Jaký je rozdíl v použití fluorescenční látky v metodě MEIA a FPIA? Obě používají fluorescenci, přesto se každá jmenuje jinak. Proč?
17. Jaký je význam mikročástic v těchto testech? Proč „magnetické“ částice?
18. Na jakém principu je založena CLIA? Pochopili jste průběh LOCI?
19. Co je to TRACE technologie?
20. Jak funguje CHEMIFLEX?
21. Co jsou to *multiplexové technologie*?
22. Pochopili jste xMAP technologii?
23. Jak chápete pojem „biočip“, „biomikroarray“ apod.?
24. Zopakujte si, co jsou to vlastně bílkoviny, jaké mají vlastnosti atd.
25. Dokážete stručně a jasně definovat pojem „absorbance“?

OBSAH:

Úvod.....	1
Bílkoviny krevní plazmy	1
Význam bílkovin krevní plazmy.....	1
Metody stanovení celkových bílkovin.....	2
Stanovení celkových bílkovin podle Kjeldahla	2
Fotometrické stanovení bílkovin podle Folina	3
Stanovení bílkovin biuretovým činidlem	3
Stanovení bílkovin přímou fotometrií při 280 (260) nm	3
Turbidimetrické stanovení bílkovin	3
Stanovení bílkovin s využitím vazby barviva na bílkoviny	3
Klinické poznámky	3
Elektroforéza bílkovin	4
Jednotlivé bílkoviny krevní plazmy.....	6
Imunochemické metody stanovení bílkovin	10
Úvod	10
Imunoprecipitační reakce v gelovém prostředí	15
Metody založené na dvojité imunodifúzi (kvalitativní metody).....	15
Metody založené na jednoduché imunodifúzi (kvantitativní metody)	15
Stručné popisy jednotlivých metod	16
Dvojitá radiální imunodifúze podle Ouchterlonyho	16
Imunoelektroforéza	17
Imunofixace	17
Western blotting (přenos)	18
Protisměrná imunoelektroforéza	19
Jednoduchá radiální imunodifúze	19
Elektroimunodifúze	20
Dvojměrná čili tzv. křížová neboli překračující imunoelektroforéza	20
Imunoprecipitační reakce v roztoku	20
Turbidimetrie	21
PETIA.....	21
PETINIA	22
Vazebné testy	22
Radioimunoanalýza (RIA).....	26
Enzymoimunoanalýza (EIA)	27
EMIT: Enzym immunoassay technique	27
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assays	27
MEIA: Microparticle Enzyme Immuno Assay	28
Fluorimetrické metody (FIA)	29
TRACE technologie	30
Luminiscenční metody	30
Technologie LOCI™	31
ChemiFlex® technologie	32
Multiplexové technologie	34
xMAP technologie	34
Mikroarraye a biočipy	35
Zákalové reakce	39
Stručné opakování z obecné biochemie	40
Kontrolní otázky	43