

Elektroforéza bílkovin v séru

Jedním ze základních screeningových vyšetření je **elektroforéza sérových bílkovin**.

Princip elektroforézy sérových bílkovin

 Podrobnější informace naleznete na stránce *Elektroforéza*.

Elektroforéza (ELFO) je založena na pohybu nabitých částic v elektrickém poli. Stanovované látky musí mít charakter iontů nebo amfolytů. Bílkoviny patří mezi amfolyty, které mohou nabývat kladného i záporného náboje v závislosti na pH pufru, při kterém elektroforéza probíhá. Je-li směs nabitých částic vystavena působení elektrického pole, začnou se molekuly látek pohybovat. Pohyblivost bílkovin je ovlivněna těmito faktory:

- charakterem dělené látky (velikost náboje, tvar a velikost molekul, relativní molekulová hmotnost);
- vlastnostmi prostředí, ve kterém dělení probíhá (hodnota pH, iontová síla, napětí, proud).

Pozitivně nabitě molekuly proteinů se lépe adsorbují než negativně nabitě molekuly, a proto při elektroforéze proteinů jsou využívány negativní náboje. Izoelektrický bod většiny sérových bílkovin je v oblasti slabě kyselé při pH 5–6. Proto v prostředí alkalického pufru, nejčastěji pH 8,6, budou u sérových bílkovin převažovat záporné náboje a jejich pohyb bude s různou rychlostí směřovat k anodě. Albumin vykazuje nejvyšší negativní náboj a tím i nejrychlejší pohyblivost k anodě.

Elektroforéza může probíhat na různých nosičích. Historicky nejstarším byl chromatografický papír. V klinicko-biochemické praxi se nejčastěji setkáváme s elektroforézou **na acetátcelulózových foliích nebo na agarózovém gelu**. Při elektroforéze, která využívá jako nosič papír nebo acetátcelulózu, putují molekuly bílkovin roztokem pufru, který je vně nosiče. Molekuly se tedy dělí především podle svého náboje. Podobně se budou dělit bílkoviny i v málo koncentrovaném agarózovém gelu.

Pomocí elektroforézy se bílkoviny krevního séra rozdělí obvykle na 5–6 frakcí – **albuminovou, α_1 , α_2 , β , γ frakce** se někdy rozliší na β_1 a β_2 . S výjimkou albuminů jsou další frakce tvořeny vždy skupinou bílkovin, které mají přibližně stejnou elektroforetickou pohyblivost.

Provedení

Kapka séra je přidána na sklíčko s elektroforetickým **agarózovým gelem** a rozprostřena po „startovní čáře“, kolmo na směr budoucího elektrického pole. Poté je vystavena účinkům **elektrického pole** v elektroforetické vaně. Vlivem elektrického pole začínají proteiny **migrovat** v agarózovém gelu.

Po uplynutí určité doby (např. 30 minut při napětí 120 V) se bílkoviny v gelu denaturují („fixují“), zpravidla působením alkoholů (metanolu) a kyselin (kyseliny octové). Tím se zabrání jejich difuzi nebo vymytí z gelu v dalších krocích. Poté se bílkoviny obarví vhodným organickým barvivem (např. amidočerní). Poloha jednotlivých frakcí a koncentrace bílkovin v nich se poté hodnotí pomocí denzitometrie.

Více informací o elektroforéze formou on-line videa najdete např. na stránkách Masarykovy Univerzity (http://portal.med.muni.cz/player_ext.php?lid=17&link=elfo_pro_480.flv%7CLF).

Hodnocení elektroforézy sérových bílkovin

Rerenční hodnoty jednotlivých elektroforetických frakcí

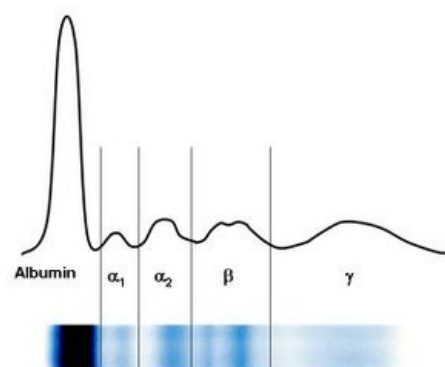
Název frakce	Hodnoty v relativních %	Hodnoty v g/l
Albumin	55–69	35–44
α_1	1,5–4	1–3
α_2	8–13	5–8
β	7–15	4–10
γ	9–18	5–12

Charakteristika jednotlivých frakcí

Zóna prealbuminu

V této oblasti se pohybuje prealbumin (transthyretin), jehož zóna je však velmi diskrétní a těžko hodnotitelná.

Zóna albuminu



Elektroforéza plazmatických bílkovin a denzitometrický záznam

Albumin vytváří poměrně širokou a z obou stran dobře ohraničenou zónu. Při poklesu koncentrace albuminu pod 30 g/l je patrné její oslabení. Vzácně pozorované zdvojení frakce je projevem genetické strukturní odchylky albuminu u heterozygotů – bisalbuminemie nebo vzniká při navázání cizorodé substance na albumin, např. penicilinu.

Interzóna mezi albuminem a α_1 -globuliny

Slabé homogenní zbarvení této oblasti je podmíněno α_1 -lipoproteiny. Podobnou elektroforetickou pohyblivost vykazuje také α_1 -kyselý glykoprotein, ale zbarvení zóny ovlivňuje minimálně.

Zóna α_1 -globulinů

Zónu α_1 -globulinů ovlivňuje především α_1 -antitrypsin. Při akutních zánětech je zřetelné zesílení. Klinicky významná je genetická variabilita α_1 -antitrypsinu, která se v elektroforéze může často zřetelně projevit oslabením, někdy až vymizením jeho zóny se současnou změnou pohyblivosti.

Interzóna mezi α_1 a α_2 -globuliny

Obvykle je celá slabě homogenně zbarvená.

Zóna α_2 -globulinů

Na vytváření této zóny se podílejí především dvě bílkoviny – α_2 -makroglobulin a haptoglobin. Změny koncentrace α_2 -makroglobulinu nemají velký diagnostický význam. Haptoglobin vytváří 6 fenotypů, které se liší elektroforetickou pohyblivostí. Elektroforetické vyšetření neumožňuje rozlišení fenotypů haptoglobinu.

Interzóna mezi α_2 a β_1 -globuliny

Normálně se barví pouze slabě. Při hemolýze vznikají komplexy hemoglobin-haptoglobin, které v této oblasti vytvářejí samostatnou zónu.

Zóna β_1 -globulinů

Tvar a intenzita zbarvení zóny β_1 -globulinů je ovlivněna prakticky pouze transferinem. Intenzita zóny dobře koreluje s celkovou vazebnou kapacitou plazmy pro železo. Při anemii z nedostatku železa a v těhotenství se zvyšuje syntéza transferinu a intenzita zóny se zesílí. Další protein s β_1 -elektroforetickou pohyblivostí, hemopexin, se špatně barví používanými barvivami a změny v jeho koncentraci se v elektroforéze neprojevují.

Interzóna mezi β_1 a β_2 -globuliny

V této oblasti nalézáme imunoglobulin IgA, který podmiňuje homogenní zbarvení zóny. Dále zde vytváří typickou linii β -lipoprotein, jejíž přítomnost závisí na jeho koncentraci.

Zóna β_2 -globulinů

Na vytváření zóny β_2 -globulinů se podílí C3 složka komplementu. Podle intenzity zbarvení se dá těžko odhadnout koncentrace C3.

Zóna γ -globulinů

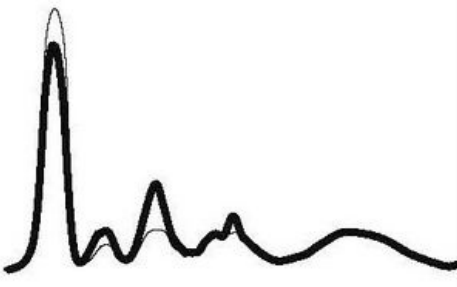
Charakter zóny γ -globulinů je ovlivněn koncentracemi čtyř podtříd imunoglobulinu IgG. Zvýšení IgG se projeví intenzivnějším zbarvením a rozšířením zóny v obou směrech. Imunoglobulin IgM leží blíže startu. Samostatné nebo současné zvýšení koncentrace IgM pomocí elektroforézy nerozpoznáme.

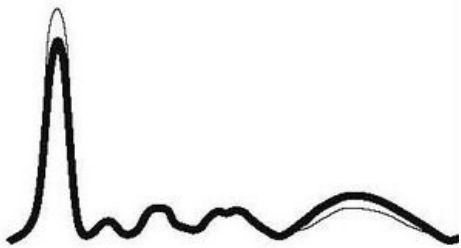
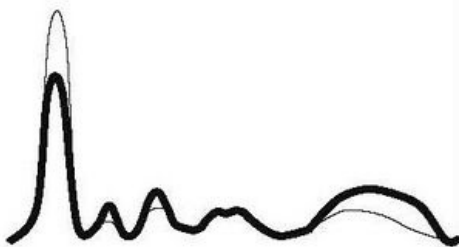
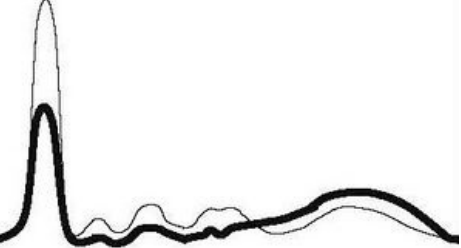
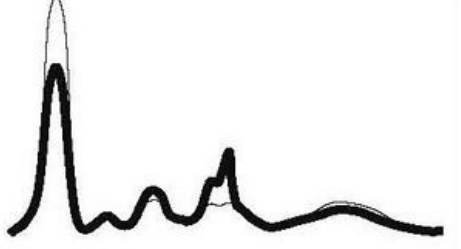
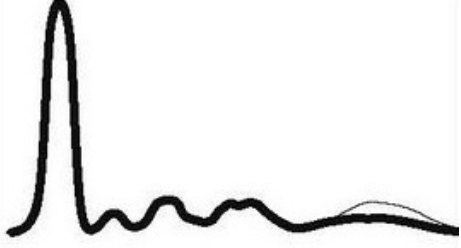

Klinické využití

Elektroforéza sérových bílkovin (ELFO) se provádí zejména, zjistíme-li patologický výsledek celkové bílkoviny, nebo potřebujeme-li podrobnější informaci o sérových bílkovinách. Zvláště cenné je pro průkaz:

- **dysproteinemie** – změna koncentrace a kvalitativního složení jednotlivých bílkovin v séru,
- **paraproteinemie** – charakterizována přítomností monoklonálních imunoglobulinů.

ELFO u některých patologických stavů

Typ elektroforeogramu	Komentář	Alb	α_1	α_2	β	γ	Výskyt (příklad)
Akutní zánět	<ul style="list-style-type: none">▪ zvýšení pozitivních reaktantů akutní fáze (α_1-antitrypsinu, orosomukoidu, haptoglobinu, ceruloplazminu, CRP, C3)▪ pokles negativních reaktantů akutní fáze						<ul style="list-style-type: none">▪ akutní fáze infekčních onemocnění▪ akutní poškození tkáně (infarkt myokardu, chirurgický výkon)▪ větší popáleniny

		N	↑	↑		N	
Chronický zánět	<ul style="list-style-type: none"> polyklonální zmnožení imunoglobulinů 		↓ nebo N	N	N	N	↑
Chronický aktivní zánět	<ul style="list-style-type: none"> zvýšení α-globulinů svědčí o reaktivaci procesu 		↓	↑	↑	N	↑
Hepatální typ	<ul style="list-style-type: none"> vážné proteosyntéza v hepatocytech nadměrná tvorba imunoglobulinů někdy se neoddělí β a γ frakce (tzv. β-γ můstek - při zvýšení IgA) 		↓	↓	↓	↓	↑
Nefrotický typ	<ul style="list-style-type: none"> výrazné ztráty bílkovin močí (převládají renální ztráty albuminu) zvýšení bílkovin s největší Mr - α₂-makroglobulinu a β-lipoproteinu 		↓	N	↑	↑	↓ nebo N
Hypogamaglobulinemie	<ul style="list-style-type: none"> pokles v oblasti γ globulinů 		N	N	N	N	↓
Monoklonální gamapatie	<ul style="list-style-type: none"> homogenní vrchol kdekoli v oblasti β až γ¹ 		↓	↓	↓	↑	↑

Odkazy

Související články

- Plazmatické bílkoviny

- Elektroforéza
- Dysproteinemie

Externí odkazy

▶ Video o elektroforetických metodách používaných v klinické biochemii pro vyšetření bílkovin v séru a moči (https://el.lf1.cuni.cz/elektroforeticke_metody/)