

Лекція 7. Імуноелектрофорез. Види імуноелектрофорезу

Принцип методу

Зональний електрофорез

Ракетний імуноелектрофорез

Електрофорез з імунофіксацією (ІФЕ)

При дослідженні складних сумішей антигенів, молекулярні маси яких близькі, дослідження наявності окремих антигенів проводять з використанням імуноелектрофорезу. Імуноелектрофорез сполучає поділ антигенів в електричному полі за значенням заряду молекули з імунопреципітацією у гелі.

Всі методи імуноелектрофорезу засновані на електрофоретичній міграції антигенів у гелі, що може містити або не містити антитіла й на специфічній імунопреципітації антигенів при взаємодії з відповідними преципітуючими антитілами. У кожній конкретній системі антиген-антитіло утворюються відповідні преципітати. Площа, займана цими преципітатами, пропорційна співвідношенню антиген-антитіло.

Таким чином, методи імуноелектрофорезу застосовні як для імунологічної ідентифікації, так і кількісного визначення антигенів і (або) антитіл.

В імуноелектрофорезу число молекул антитіл, що з'єднується з молекулами антигену, називають еквівалентною кількістю. Еквівалентна кількість – кількість антигену, що приєднується до певної кількості антитіл з утворенням максимальної кількості преципітату. Чіткість преципітату при електрофорезі забезпечується міграцією антитіл в область преципітату з навколишнього гелю. Розподілення та форма смуг преципітації при розподілу білків сироватки в ІЕФ аналізу є відносно стабільними і відтворюваними. Будь-яке відхилення є ненормальним. Ці відхилення можуть бути виявлені шляхом оцінки таких особливостей смуг преципітації як: позиція преципітату; спотворення кривизни або дуги преципітату; щільність і відносне подовження смуги; скорочення (гальмування), проріджування або подвоєння

Таким чином, методи імуноелектрофорезу застосовні як для імунологічної ідентифікації, так і кількісного визначення антигенів і (або) антитіл.

ІЕФ являє собою надійний і точний метод виявлення білків, їхніх структурних аномалій та зміни концентрації

Зональний електрофорез

Зональний електрофорез - напівкількісний метод, що дозволяє розділити суміш білків в залежності від їх молекулярної маси і електричного заряду. Суть методу полягає в наступному: досліджувану суміш білків на носії (наприклад, пластині з гелем, папір, ацетат целюлози) поміщають у камеру

для електрофорезу, заповнену буферним розчином і підключену до джерела постійного струму.

При електрофорезі білків сироватки звичайно виходить 5 основних смуг, які відповідають фракціям альбуміну, α_1 -, α_2 -, β - і γ -глобулінів (рис. 13).



Рис.13. - Зональний електрофорез сироватки з денситограмою

Імуноглобуліни мігрують переважно у фракцію γ -глобулінів, хоча також присутні у фракціях α_2 - і β -глобулінів. Відносний вміст кожної фракції сироваткових білків можна оцінити за допомогою денситометра. За допомогою зонального електрофорезу можна досліджувати не тільки сироватку, але й інші біологічні рідини, наприклад СМР (спинномозкова рідина) і сечу. Цей метод дозволяє оцінити білковий склад досліджуваної проби і виявити моноклональні антитіла, хоча він недостатньо чутливий для визначення моноклональних антитіл у низькій концентрації на ранніх стадіях мієломної хвороби.

Зональний імуоелектрофорез

Суть методу полягає в наступному: 1) проводять електрофоретичної розділення білків в гелі; 2) [] після закінчення електрофорезу в гелі паралельно на \perp правлінню електрофорезу вирізують борозенки; 3) в борозенки вносять антитіла (антисироватки), наприклад до важких (α -, μ -, γ -, ϵ -, δ -) або легких (λ -, κ -) ланцюгів імуноглобулінів.

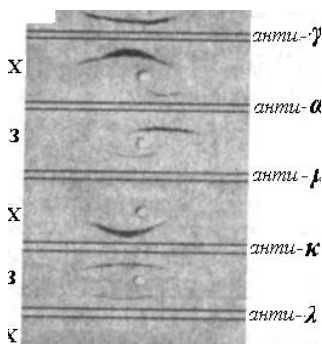


Рис.1. – Імуоелектрофорез сироватки здорової людини (З) та хворої (Х) на моноклональну гамопатію, що супроводжується підвищенням рівня γ - та κ -ланцюгів. Антитіла γ - та κ -ланцюгам утворюють більш ширші дуги преципітації з сироваткою хворого, ніж сироваткою здорової людини.

Ці антитіла і розділені при електрофорезі білки дифундують назустріч один одному. У тих місцях, де антитіла зв'язуються з білками, утворюються дуги преципітації (рис.14). Імуоелектрофорез дозволяє оцінити лише якісний склад досліджуваної суміші білків. Оцінка результатів дослідження вимагає високої кваліфікації. Найчастіше цей метод застосовується для виявлення і характеристики моноклональних антитіл.

Відмінний скринінг-тест, для того щоб виявити наявність аномальних білків, таких як при мієломі, макроглобулінемія Вальденстрема, злюкисних лімфомах та інших лімфопроліферативних захворюваннях. Зональний імуоелектрофорез відмінний скринінг-тест, для того щоб виявити наявність аномальних білків, таких як при мієломі, макроглобулінемії Вальденстрема, злюкисних лімфомах та інших лімфопроліферативних захворюваннях.

Ракетний імуоелектрофорез

Цей метод аналізу являє собою простий, швидкий (2 – 4 години), добре відтворюваний метод визначення даного білка в декількох зразках білкової суміші. Розбавлені розчини зразків, які підлягають порівнянню, вносять у лунки, розташовані в ряд. Електрофорез ведуть в агарових гелі, що містить моноспецифічну антисироватку. Ідентифікацію білка проводять за утворенням піку преципітації у формі ракети, а кількісне визначення можна робити за висотою піку.

Висота піка пропорційна концентрації антигену, що визначається.

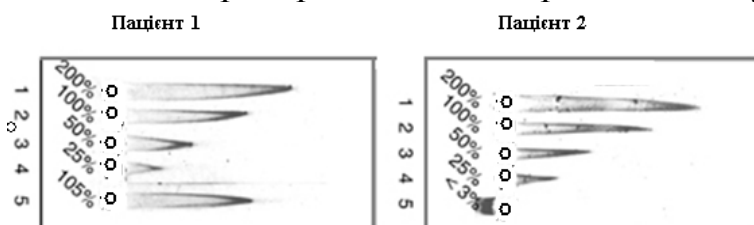


Рис. – 2. – Ракетний імуноелектрофорез.

На рис.2 відображено визначення фактору Н – регуляторного білку в системі комплементу. У лунках 1- 4 розведення моноспецифічної сироватки до Н фактору (стандарт), у лунці 5 – досліджувана сироватка. Відповідно до отриманих даних у сироватці пацієнта 1 фактор Н відсутній, у пацієнта 2 його вміст складає 105 %.

Електрофорез з імунофіксацією (ІФЕ)

Частіше всього електрофорез з імунофіксацією (ІФЕ) застосовують в діагностиці моноклональних гамопатій – стан, в якому один клон плазматичних клітин дає підвищений рівень одного класу імуноглобулінів.

При діагностиці моноклональних гамопатій важливо виявити наявність у сироватці крові моноклональних антитіл відповідного класу, а у сечі - κ- або λ- легких ланцюгів (білки Бенс-Джонса).

Для виявлення моноклональних антитіл проводять ІФЕ. ІФЕ являє собою двоступеневу процедуру з використанням електрофорезу білка у чистому гелю агарози на першому етапі та імунопреципітації на другому.

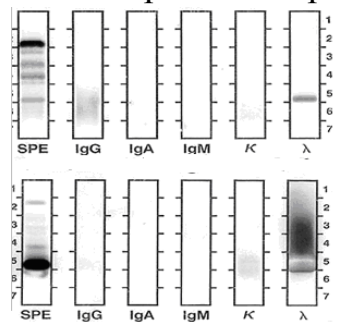


Рис.- Виявлення моноклональних антитіл з використанням ІФЕ

Рис. 3. – Виявлення моноклональних білків у сироватці крові та сечі за допомогою електрофорезу з імунофіксацією.

На першому етапі багатоканальною піпеткою в лунки гелю вносять досліджувану рідину пацієнта (краще як що це буде 4-5 канальна піпетка, що дозволяє одразу зробити 4-5 паралельних фореграм) і проводять електрофорез.

Другий етап. По закінченню електрофорезу вирізають кожну фореграму і на кожну смужку гелю накладають змочені в розчині анти-κ, анти-λ, анти-IgG, анти-IgM паперові смужки (Ватман № 1)[]; накривають вологою

полімерною плівкою, поміщають у вологу камеру, інкубують протягом 1 години. За цей час антитіла з паперу дифундують у гель і утворюють імунні комплекси з тими антигенами, які присутні у гелі. Потім гель агарози ретельно висушують між листами фільтрувального паперу, відмивають від білків, що не зв'язались, знову просушують і забарвлюють Coomassie Brilliant Blue R або іншими барвниками для білка. У місцях локалізації відповідних моноклональних білків (антигенів), що утворили імунопреципітат, спостерігаються пофарбовані у синій колір плями (рис. 16). Відповідно до даних рис.16 при електрофорезі білків сироватки крові у γ -фракції виявляється М-градієнт – наявність моноклонального імуноглобуліну (SPE). При імунофіксації встановлено, що моноклональні білки представлені G-імуноглобулінами с превалюванням легких ланцюгів типу λ . При паралельному проведенню електрофорезу з імунофіксацією сечі (рис., нижні гелі) виявляється високий рівень λ -ланцюгів. Таким чином, за допомогою ІФЕ встановлено G λ тип мієломи. Встановлення типу гамопатії важливо для лікаря гематолога.

Досліджуватися може сироватка, сеча, спинномозкова рідина та інші рідини тіла.

Застосування ІФЕ. ІФЕ використовується з метою встановлення наявності (або відсутності) та ідентифікації парапротеїнів, виявлення підвищення або зниження рівня різних груп білків у сироватці крові й сечі. Частіше ІФЕ призначають для виявлення й ідентифікації моноклональних антитіл (надмірна продукція одного класу імуноглобулінів).

Моноклональний білок може виявлятися й у сечі й у сироватці, а може тільки в сечі. Наприклад, білок Бенс Джонсона – легкий ланцюг імуноглобулінів може виявлятися тільки в сечі. Невелика молекула цього білка легко фільтрується нирками й надходить у вторинній сечі.

Електрофорез білків сечі може бути призначений для оцінки стану нирок при цукровому діабеті й, автоімунних захворюваннях. Не призначається електрофорез при запальних інфекціях сечових шляхів

Джерела помилок при імуноелектрофорезі:

1. застосування струм у неправильному напрямку;
2. некоректний рН буфера;
3. некоректний час поділу;
4. сума перерахованих помилок.