

Plazma fehérjék vizsgálata, fehérje analitikai módszerek

Kőszegi Tamás

**PTE KK Laboratóriumi Medicina
Intézet**

A fehérje paradoxon

Fehérje újdonsképződés - vesztes naponta

75g bevitel

300g - szervezet összes fehérjeszintézis

75g - izom

70g - emésztő enzim

20g - vérplazma

20g - fehérvérsejt

8g - hemoglobin

2g - bőr

200g - újrahasznosítás

10g vesztes

A vérplazma összetétele - a fehérje paradoxon

Eredet: sejtalkotó

termék (pl. export fehérjék májból)

Molekuláris sajátság: monoklonális - albumin

poliklonális - globulinok

A vérplazma fehérjék sorsa

Biológiai féléletidő: képződés - elimináció

**gyors: alvadási faktorok, hormonok,
akut fázis fehérjék, biológiai
válaszmódosítók**

lassú: albumin, immunglobulinok

Plazma fehérjék mennyiségi mérése

Kisózás, kicsapás - gravimetria

UV elnyelés - 280nm, 220nm

Fluoreszcencia - aromás aminosavak

Fotometria - Biuret reakció (összes fehérje)
- brómkrezol zöld (albumin)

Referencia tartomány **totál protein: 60-80g/l**
albumin: 35-45g/l

Plazma fehérjék mennyiségének információs értéke

Hiperproteinémia: kiszáradás

myeloma multiplex

**Hipoproteinémia: víztér növekedés
csökkent szintézis
fokozott veszteség**

**Hipalbuminémia: csökkent szintézis
fokozott veszteség**

Nem nutríciós paraméterek!

Egyedi fehérjék analízise

Fehérje elválasztási technikák

**Oszlop kromatográfia: gélszűrés, ioncserés,
affinitás
HPLC (peptidek)**

**Elektroforézis: szabad (kapilláris)
papír, keményítő, agar,
agaróz, cellulóz acetát,
poliakrilamid**

Elektroforézis alapjai

Amfoter jellegű aminosavak:

monoamino monokarbonsav

monoamino dikarbonsav

diamino monokarbonsav

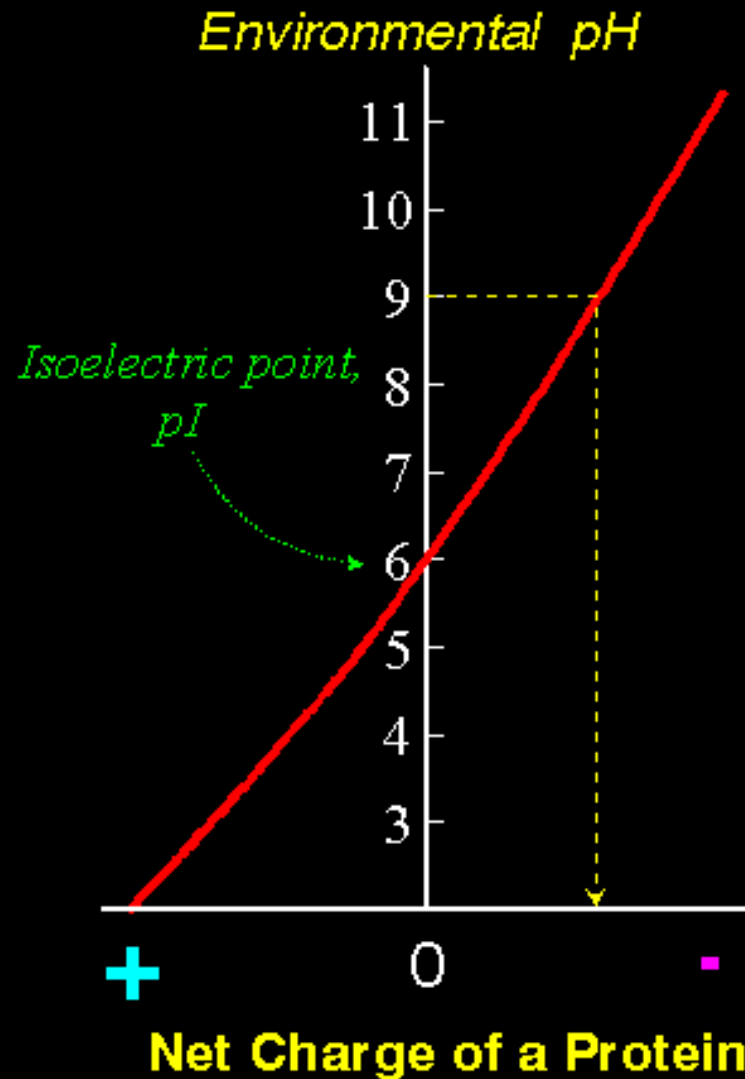
Poszttranszlációs módosulások!

Izoelektromos pont, disszociáció (albumin)

Futtató közeg, fixálás, festés

töltés-molekulatömeg

Charge of a protein



Fehérje elektroforézis



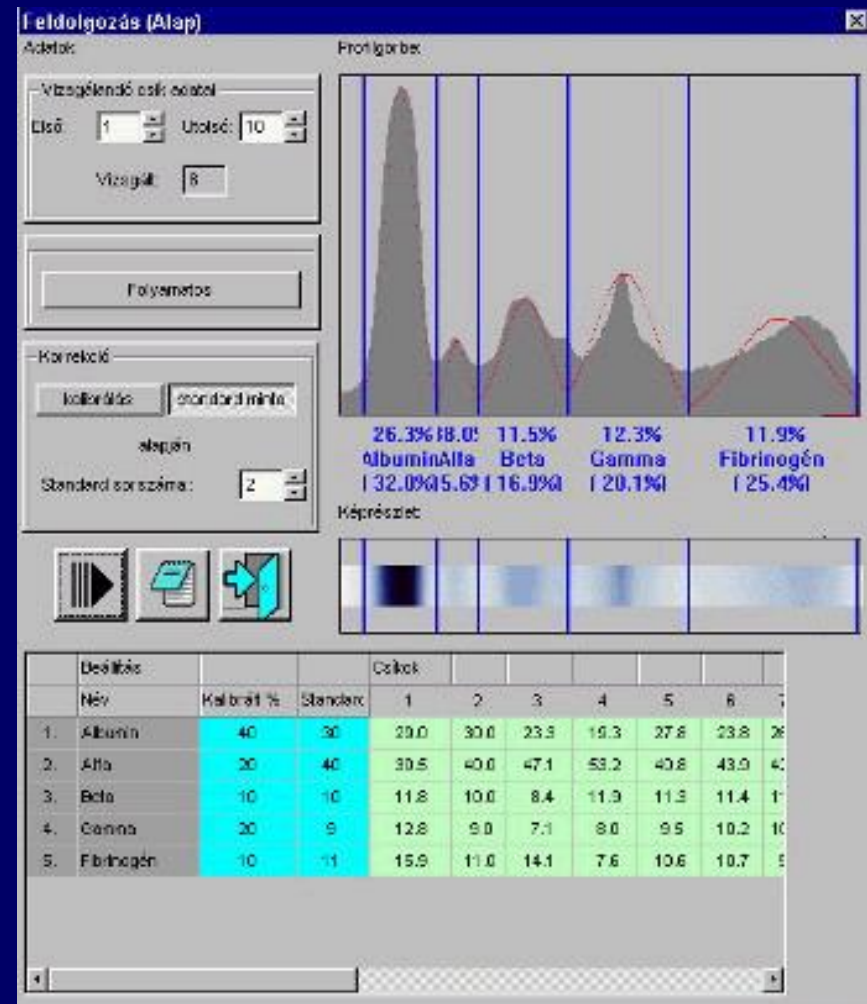
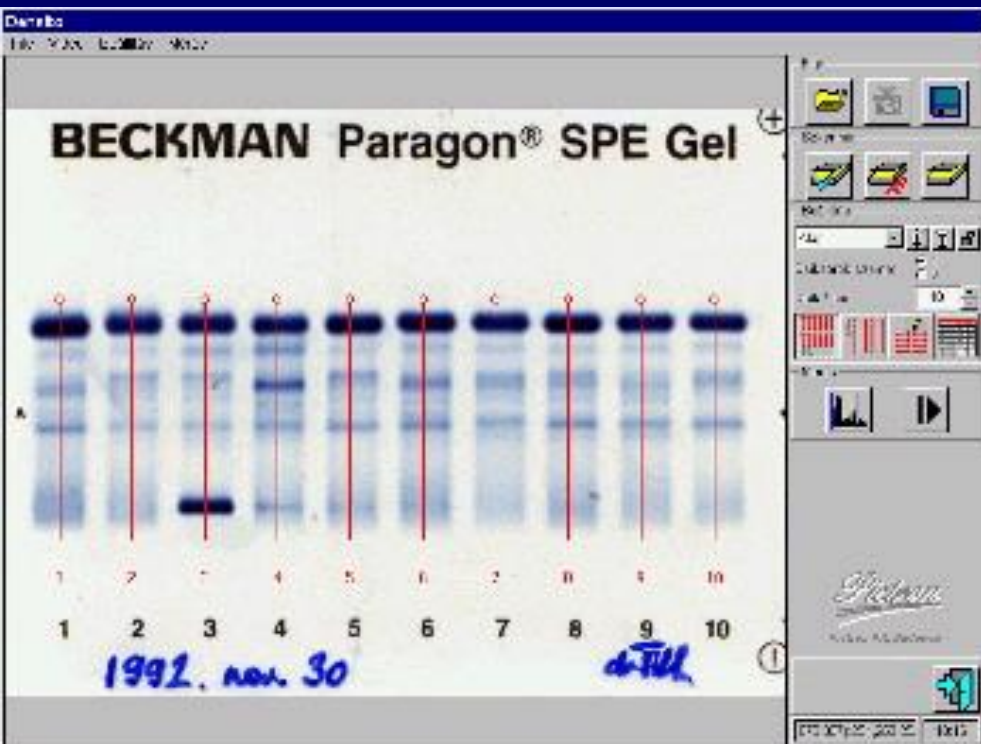
Nitrocellulóz membrán

Amido fekete

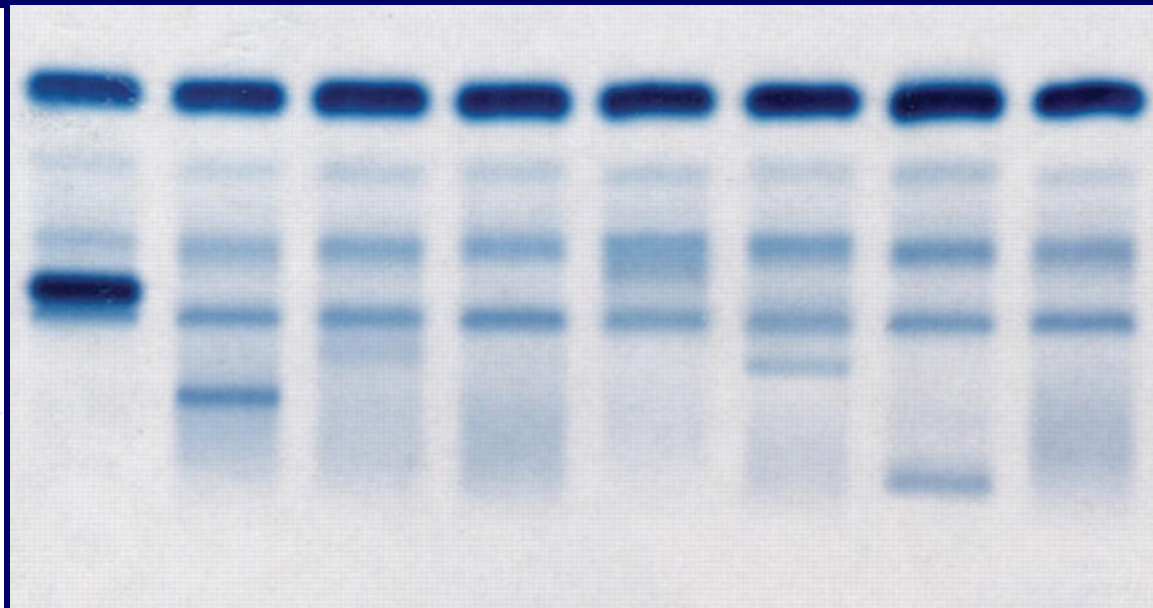
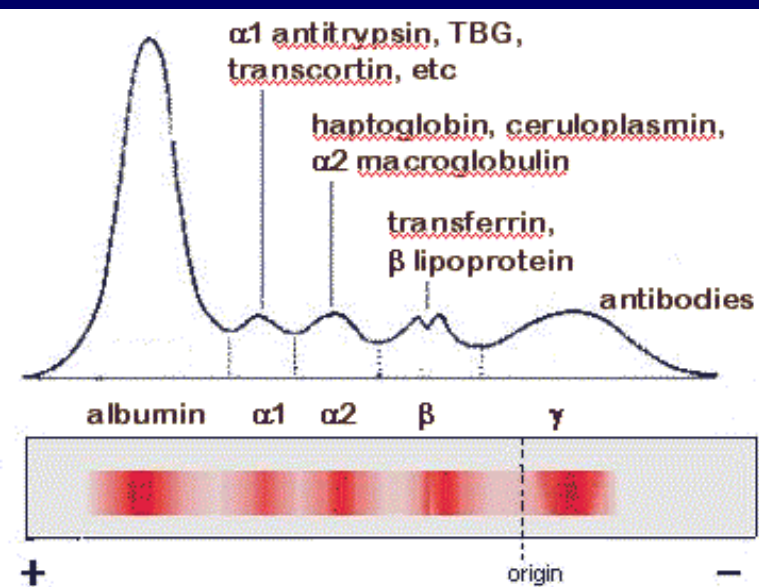
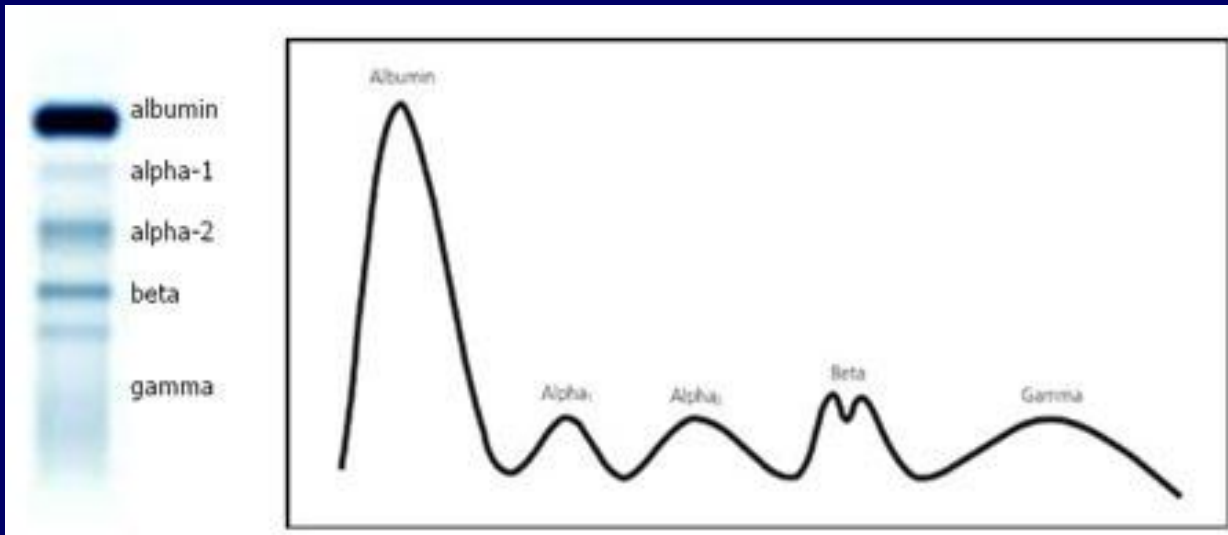
Ponceau S

Fehérje elektroforézis

Denzitometriás értékelés



Fehérje elektroforézis



Immunfixáció

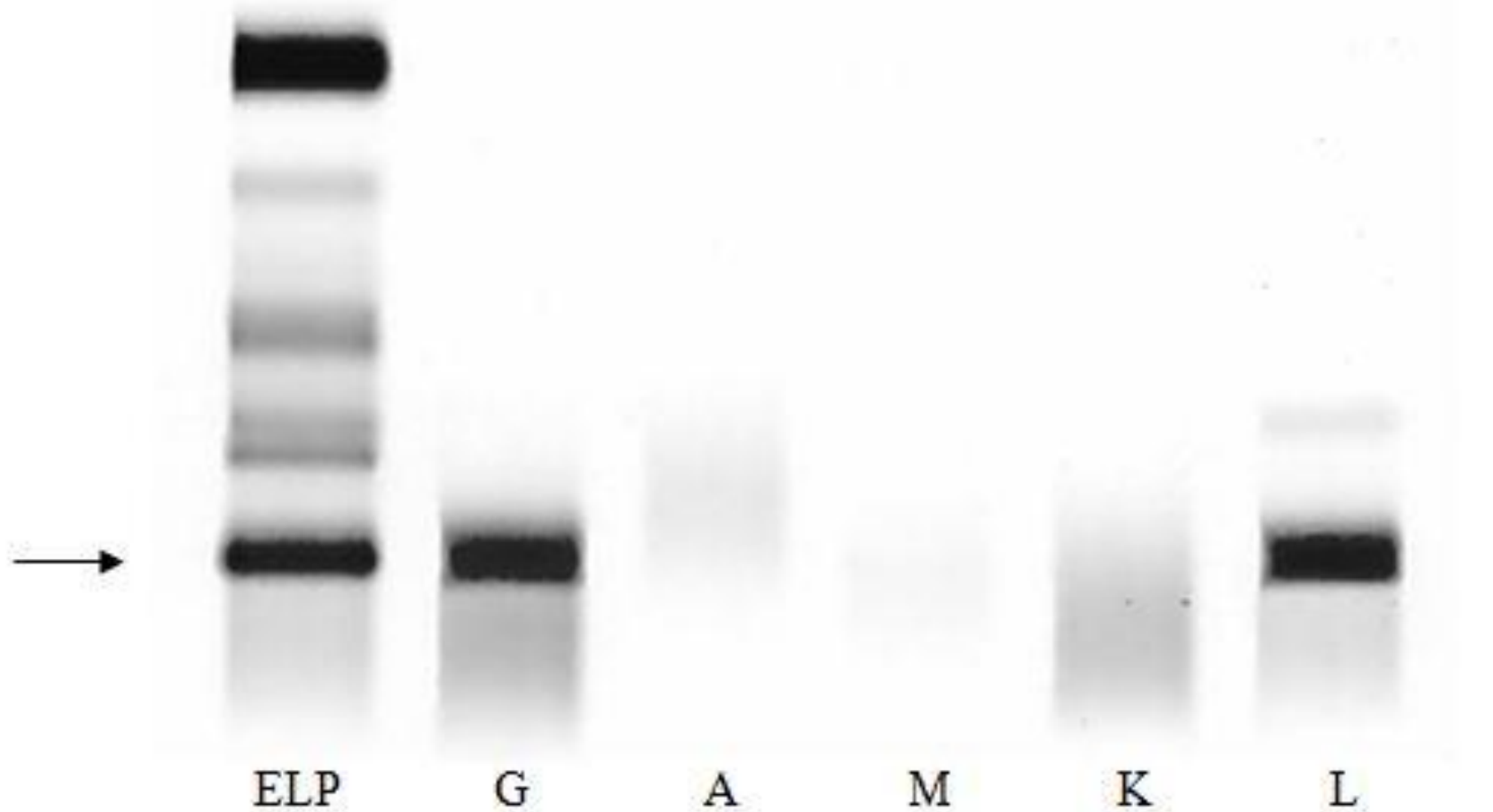


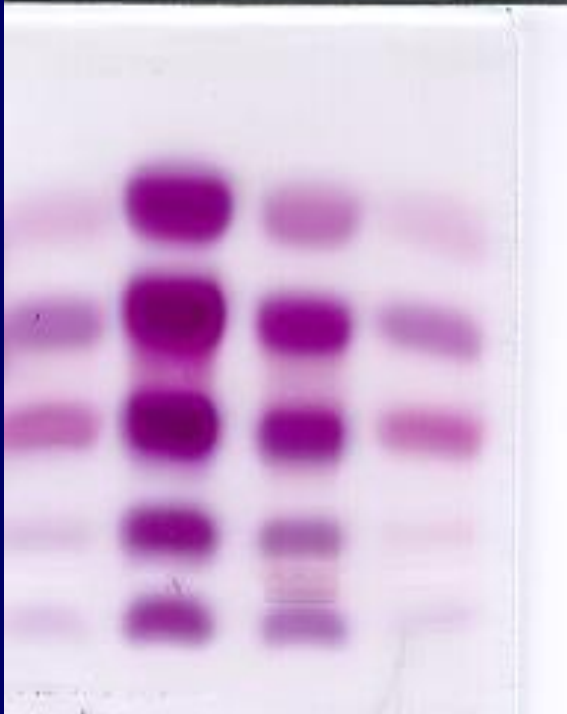
Figure 1

+



LDH izoenzim vizsgálat Agaróz gél

-

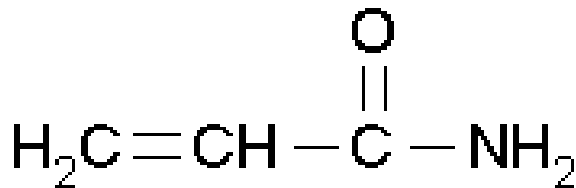


LDH 1
2
3
4
5

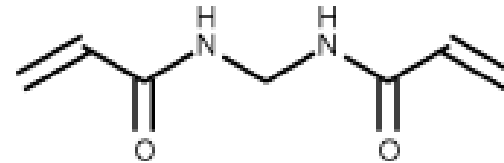
Fehérje elektroforézis

Poliakrilamid gél

Acrylamide



Bis, [N,N'-methylene-bis(acrylamide)]

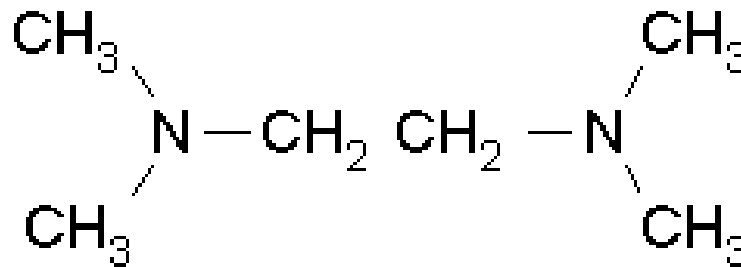


TEMED

Ammonium persulfate

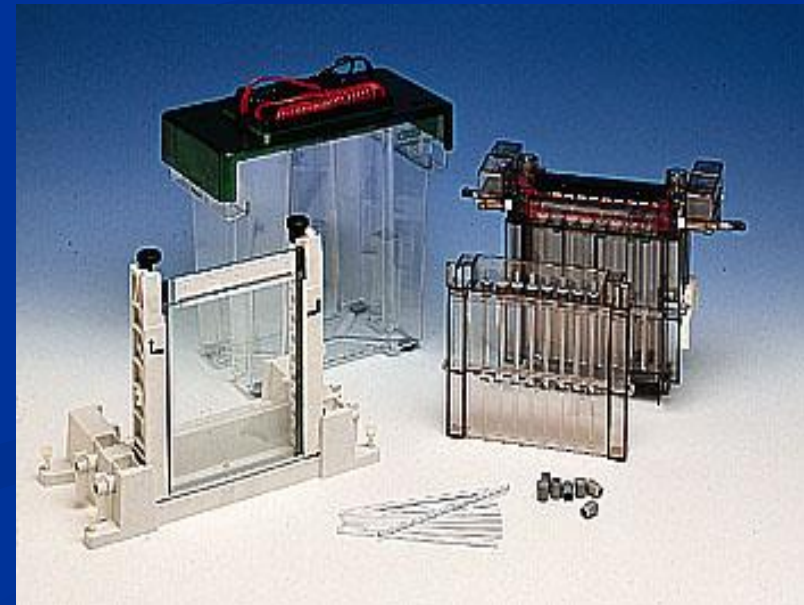
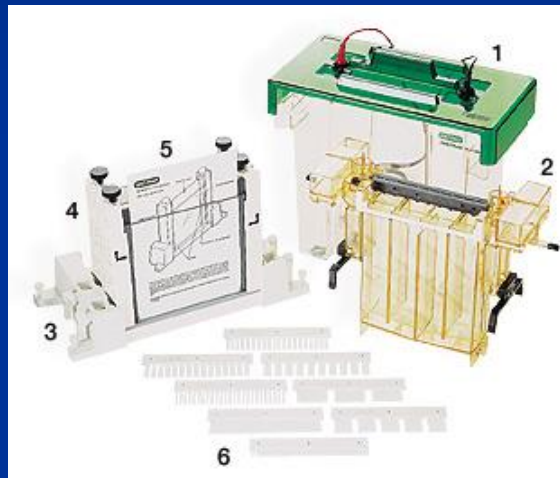


(tetramethylethylenediamine)

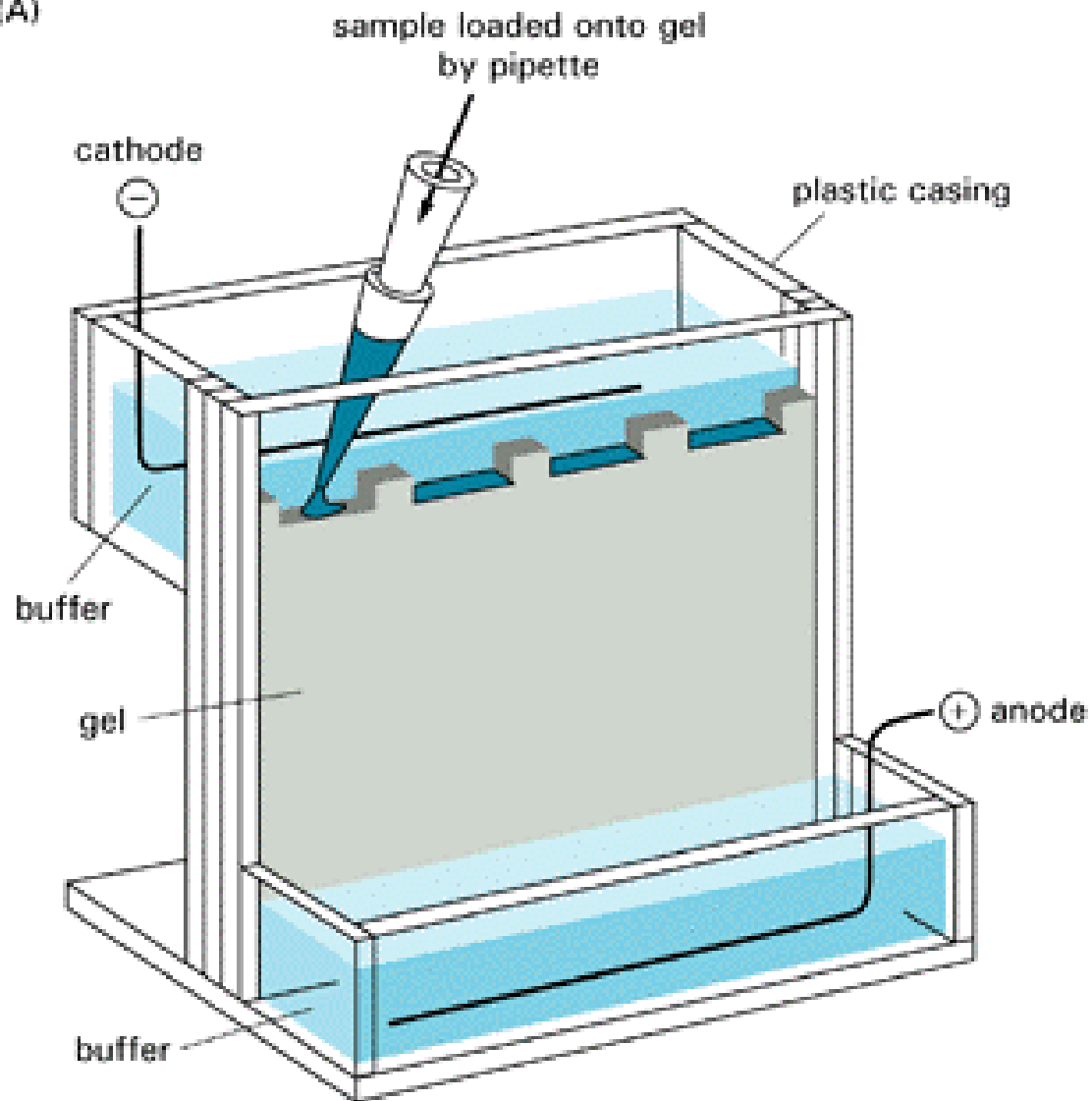


Choice of electrophoretic system

Bio-Rad

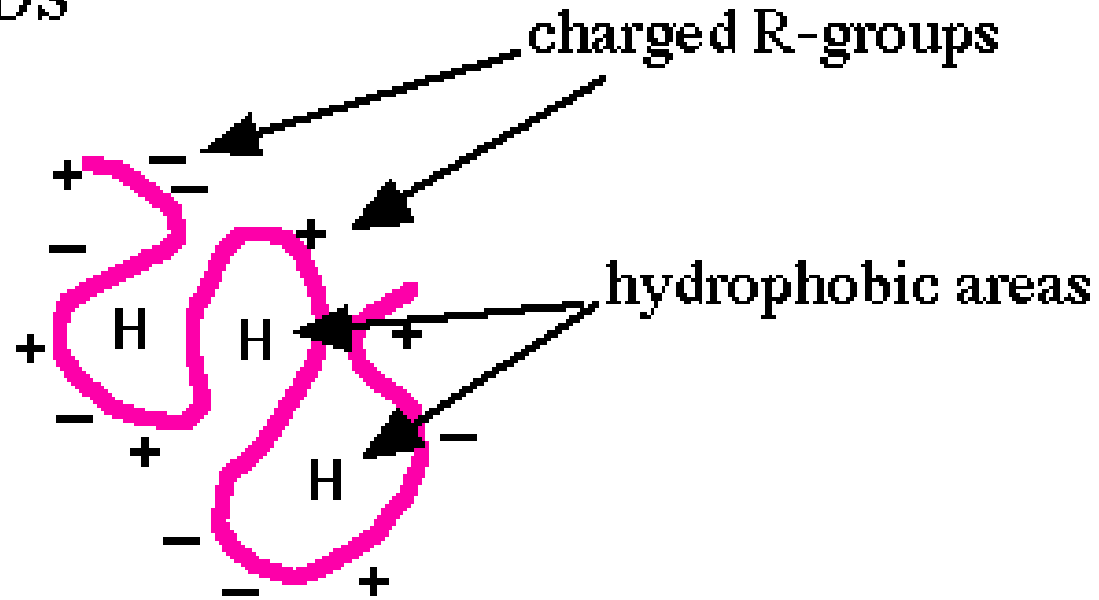


(A)

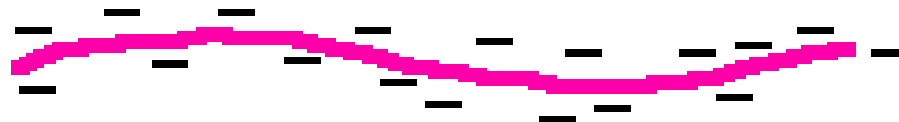


Denaturálás

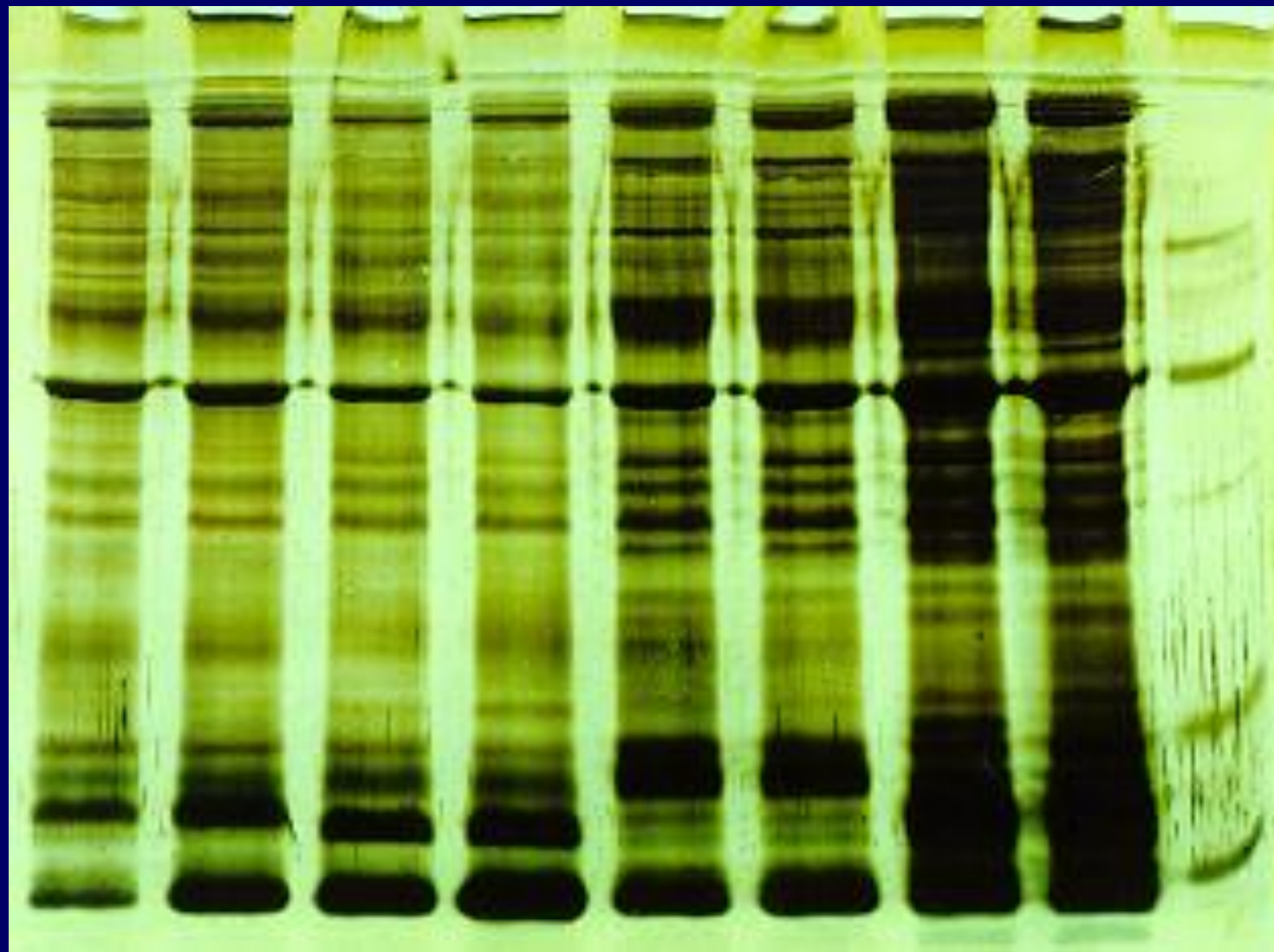
BEFORE SDS



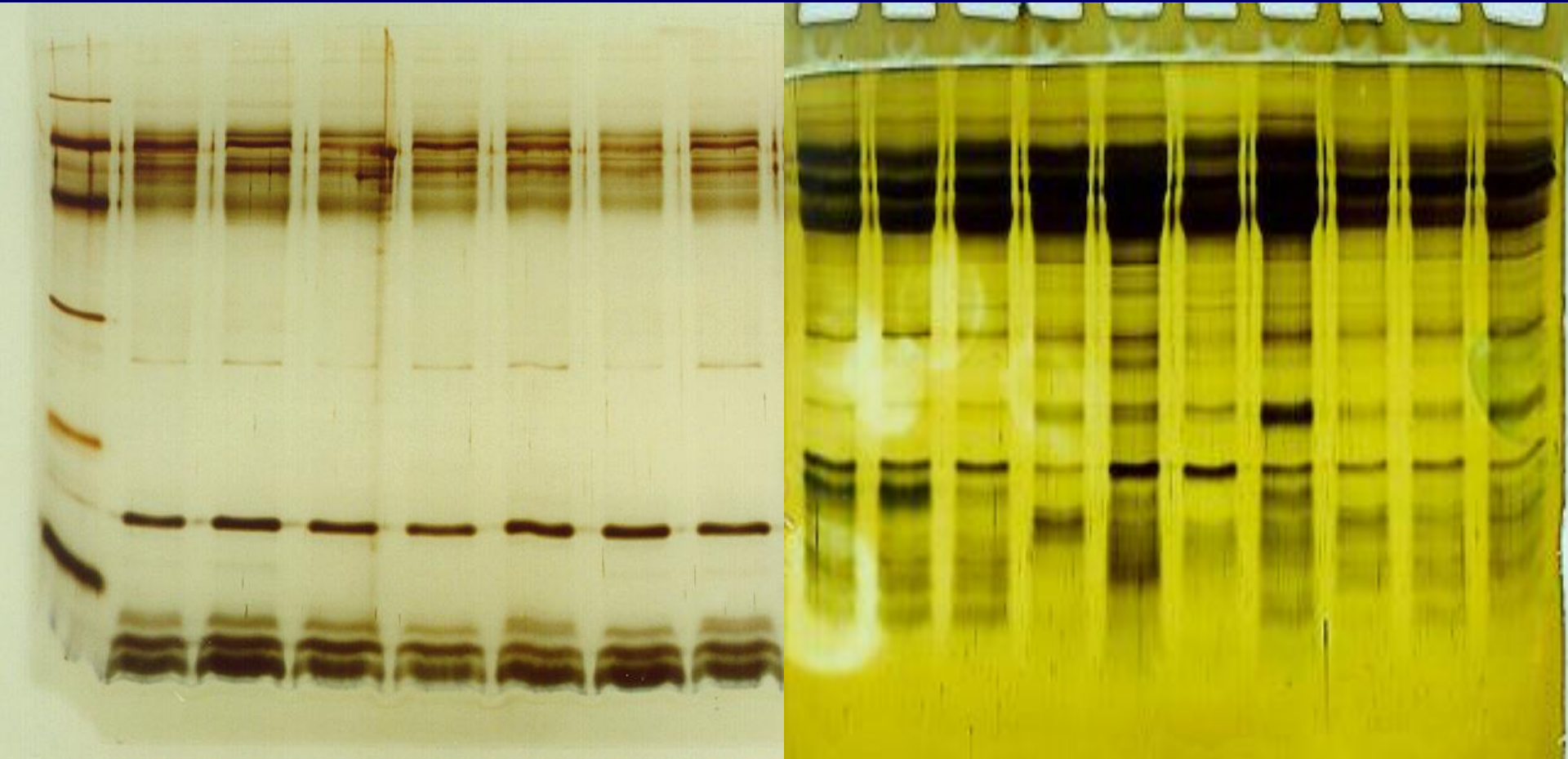
AFTER SDS



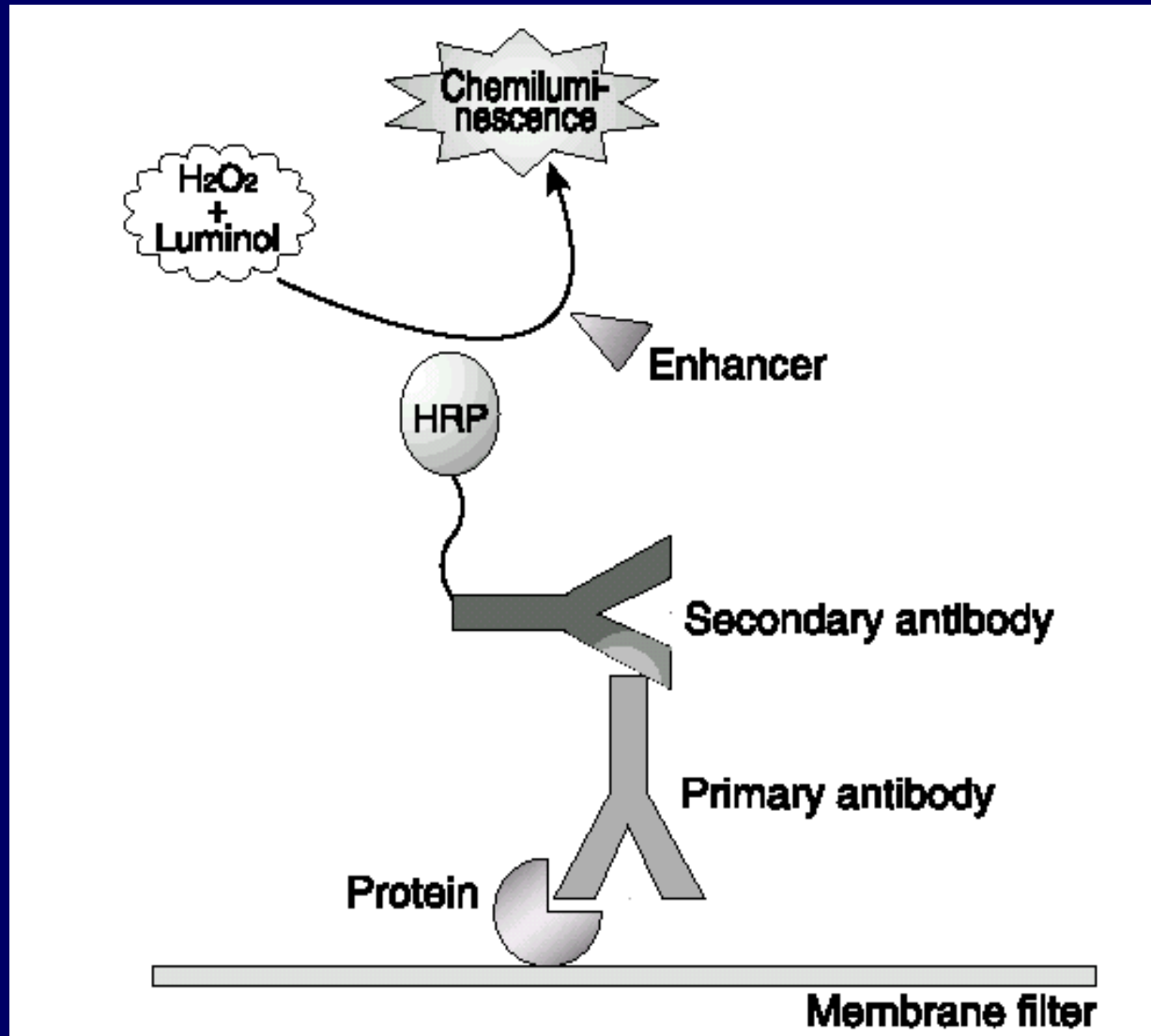
Humán vérlemezkék SDS-PAGE képe



Egészségesek és daganatos betegek fehérje mintázata



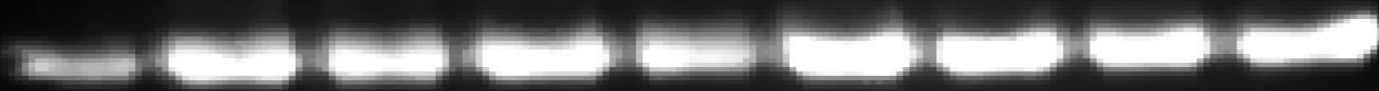
Immunoblot módszer alapjai



Dot blot kemilumineszcenciás detektálása



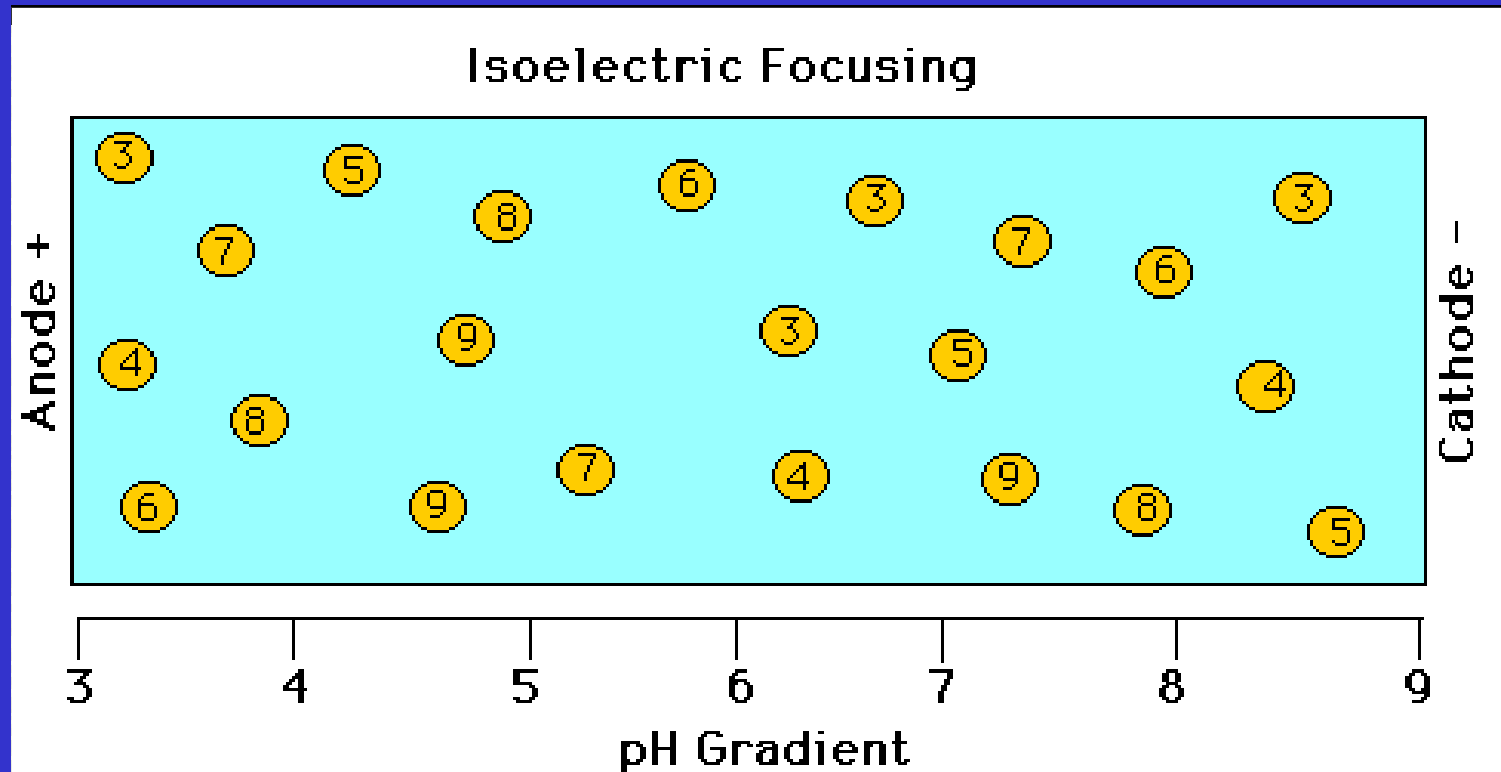
Orosomucoid kimutatása kemilumineszcenciás detektálással



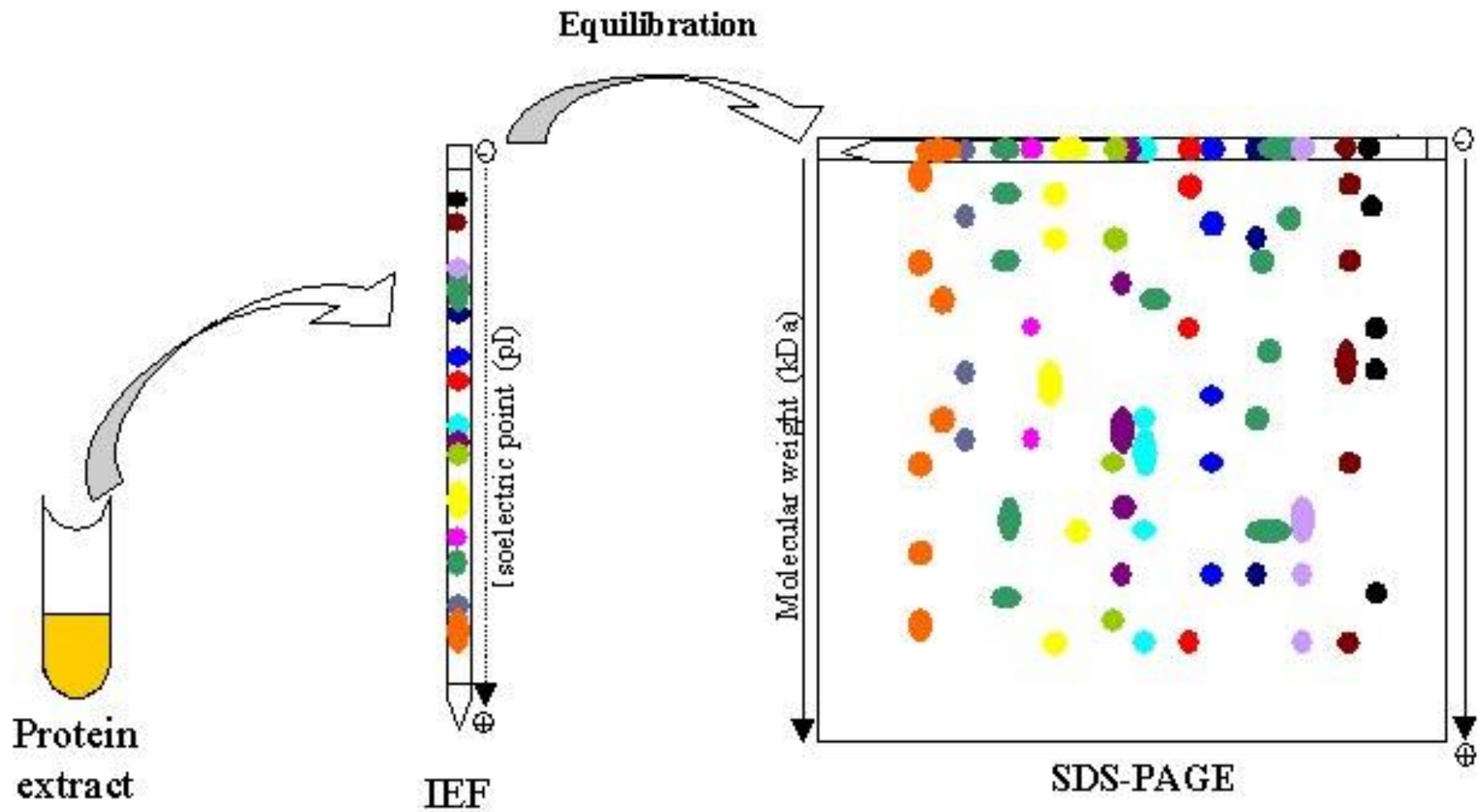
Anti-human (rabbit) orosomucoid glycoprotein

HRP labeled anti-rabbit IgG

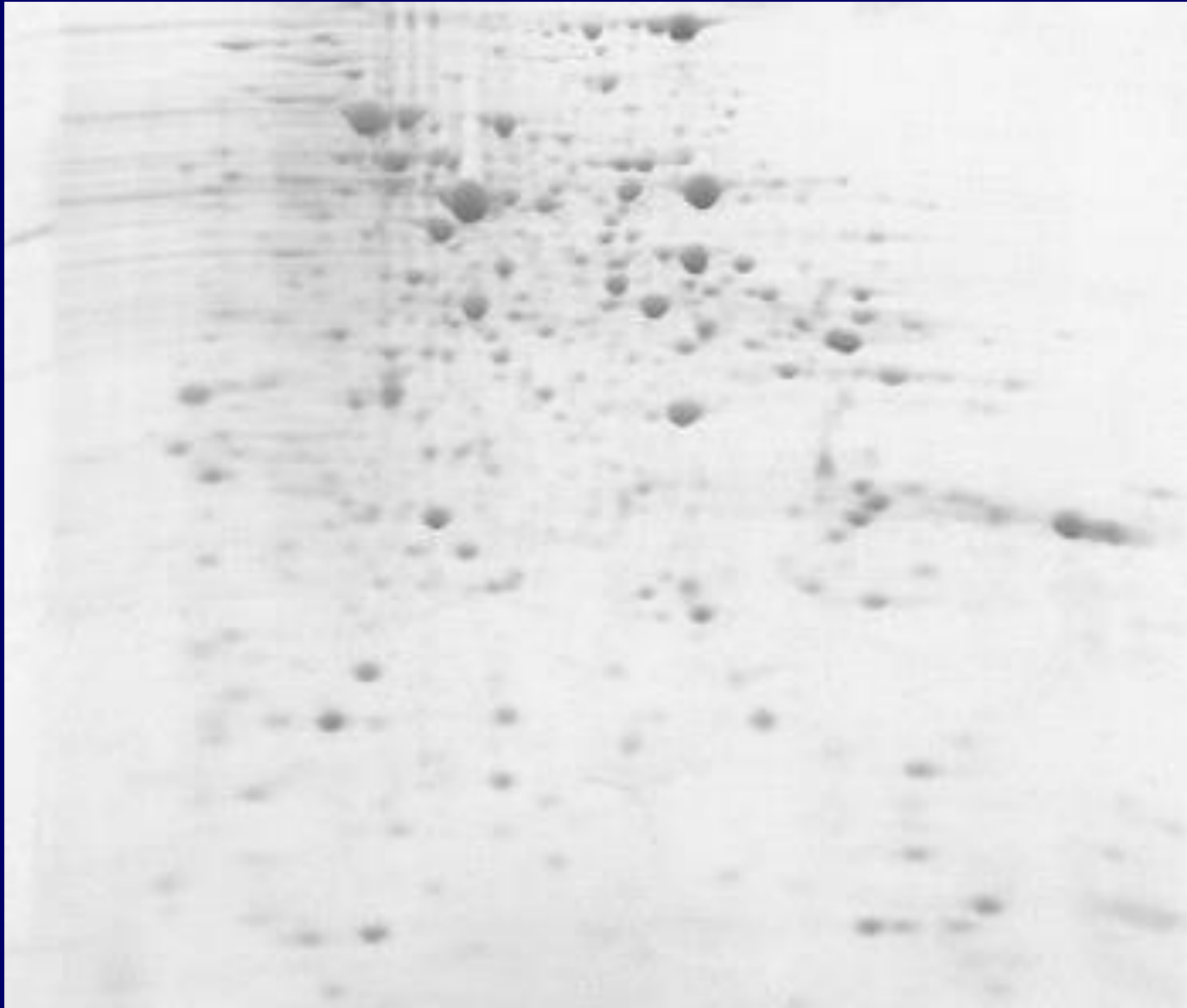
Izoelektromos fókuszálás



2D elektroforézis elve



2D elektroforézis



Egyedi fehérjék mennyiségi mérése

Immun diffúzió

Rakéta immun elfo

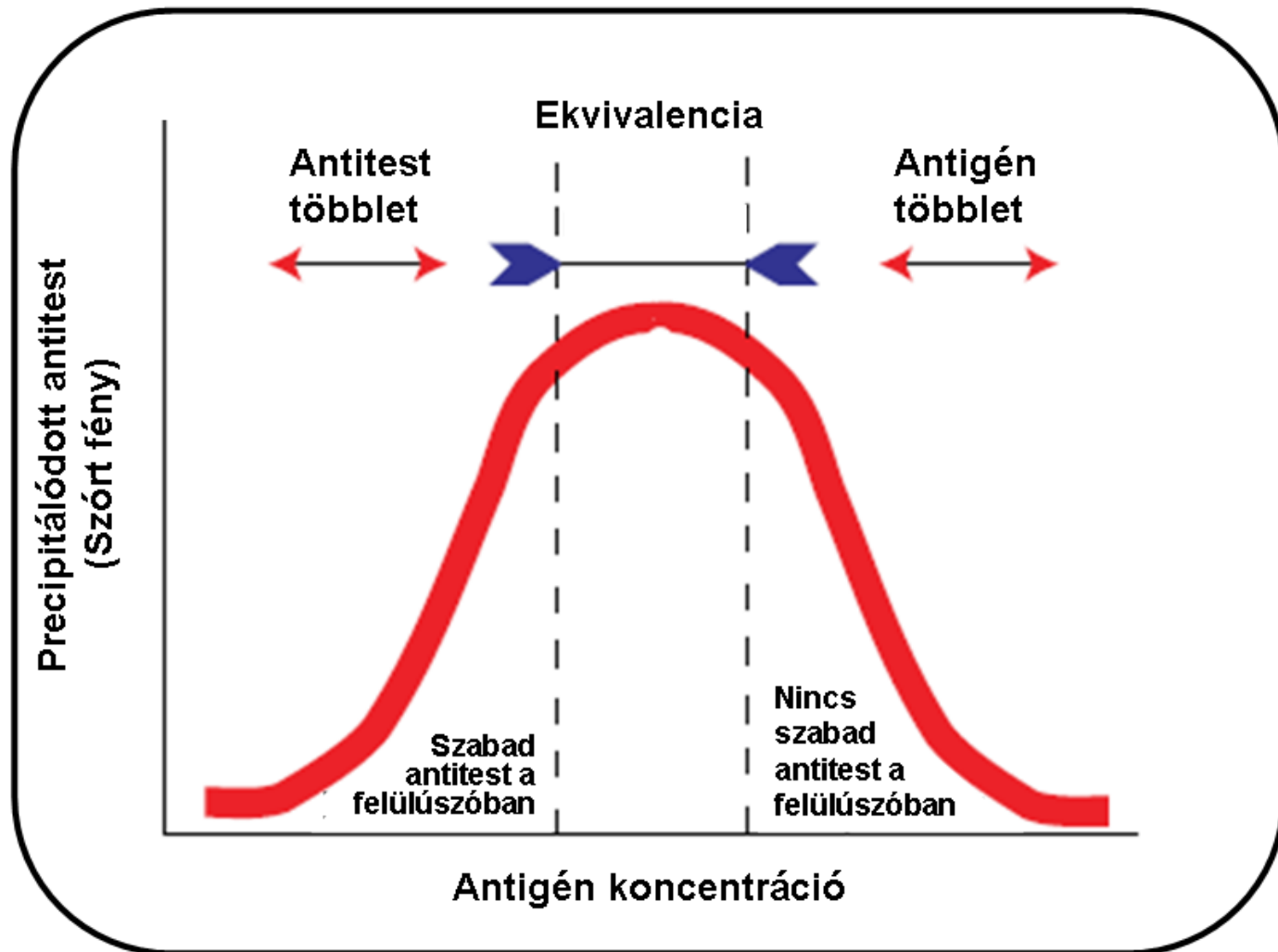
Antigén-antitest reakció detektálása, mennyiségi analízise



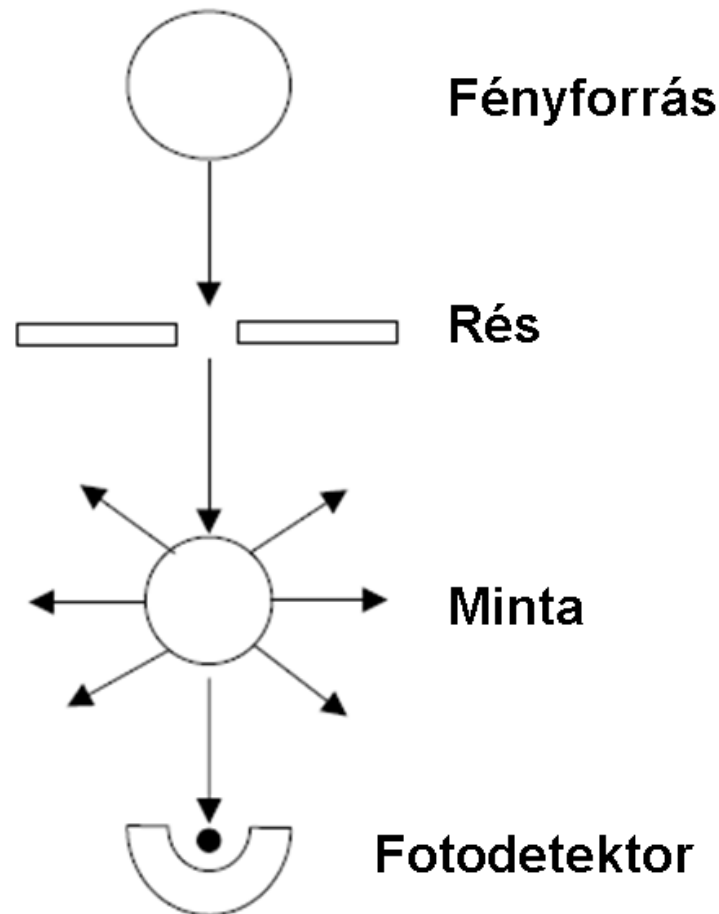
Egyedi fehérjék automatizált mérése

- **Immun turbidimetria**
- **Nefelometria**
- **Immuno esszék**

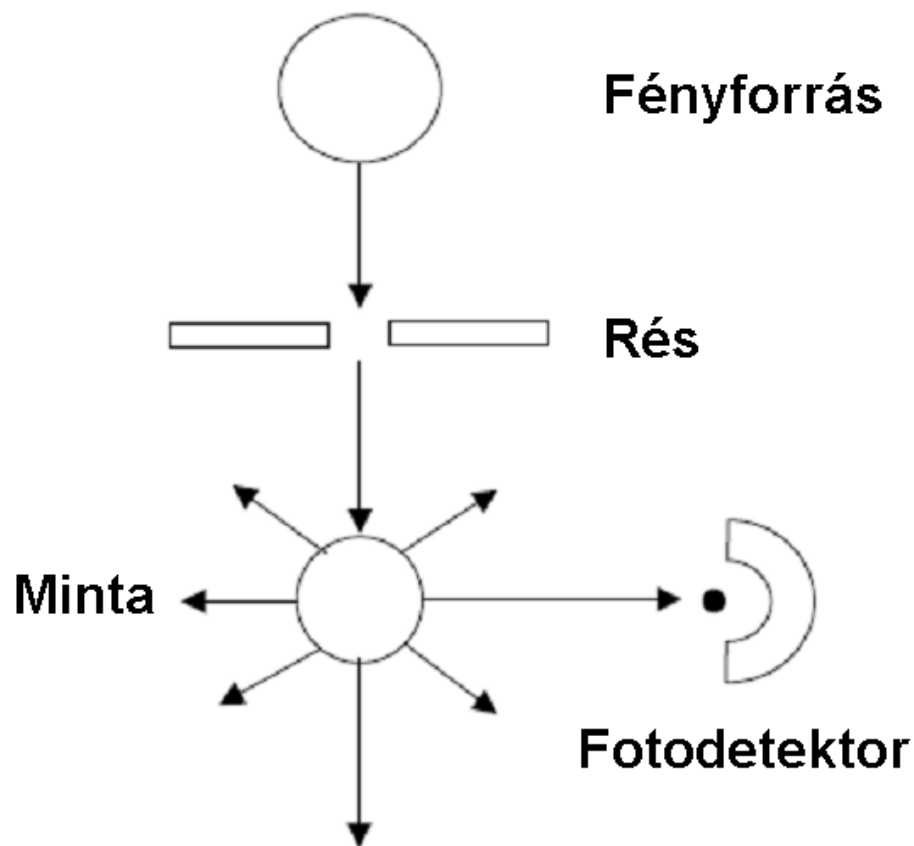
Immun turbidimetria



Immuniturbidimetria mérési elve



Immun-nefelometria mérési elve



Részecske-erősített immun mérés

