

Stanovení asialo- transferinu v mozkomíšním moku metodou HPLC

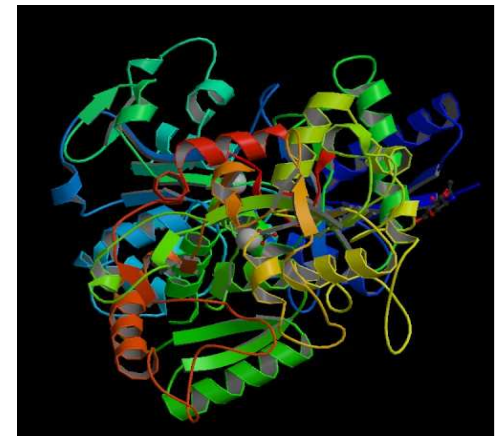
Pracovní den ČSKB Brno 10.11.2010

J. Gottwaldová, M. Dastych

OKBH FN Brno

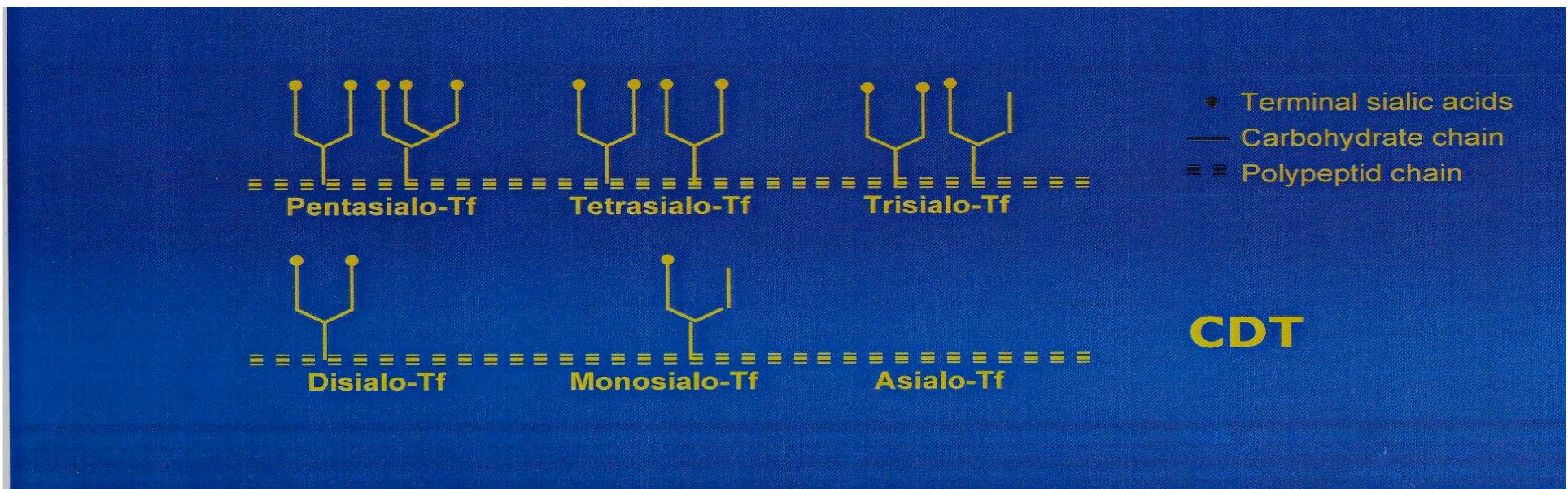
Transferrin

- transportní glykoprotein pro železo, váže 2 atomy Fe^{3+}
- syntéza v játrech, $M_r=80$ kDa
- struktura: 2 oligosacharidové řetězce (679 AK), konce jednotlivých řetězců zaujímají negativně nabitě zbytky sialové kyseliny



Transferrin

- zbytky kyseliny sialové umožňují separaci transferrinu na několik izoformem
- železem saturovaný transferrin může být separován do nejméně šesti izoformem, a-, mono-, di-, tri-, tetra- a pentasialo.





Asialotransferin

- beta2-trf, carbohydrate-free transferin
- syntéza asialo-trf z transferinu v mozku pomocí neuraminidázy
- nachází se převážně v mozkomíšním moku - specifický marker pro CSF
- využití při detekci likvorey v biologickém materiálu (nejčastěji tekutina z uší nebo nosu)



Význam stanovení asialotransferinu v CSF

- Stanovení asialo-trf v CSF je považováno za za vysoce senzitivní a specifické pro diagnostiku pacientů CACH (childhood –onset ataxia), známá také jako vanishing white matter disease (VWM), mutace na 3q27 locusu
- Současné diagnostické metody: stanovení asialotransferinu v CSF pomocí 2 – DGE/MS/MS
- Asialotransferin je snížen 0,5-5% (Vanderberg) v porovnání s kontrolní skupinou (8-35%)



Význam stanovení asialotransferinu v CSF

- Změny asialotransferinu v CSF jsou popisovány při jiných onemocněních CNS- roztroušená skleróza, Parkinsonova nemoc, Alzheimerova choroba.



Cíl práce

Využít metodu HPLC pro stanovení CDT v séru, která měří relativní množství jednotlivých izoform transferinu v poměru k celkovému transferinu (% plochy pod peakem) pro stanovení asialotransferinu v likvoru



Stanovení metodou HPLC - systém Bio-Rad Variant™

- **Princip**

gradientový HPLC systém, dělení na koloně s výměnou aniontů

- **Chromatografie**

pro analýzu nastříkovááno 100 µl supernatantu, doba separace 6.5 min

- **UV/VIS detekce** při 460 nm – vysoce specifické, detekuje selektivně výhradně železem saturované transferiny



Stanovení asialo-transferinu v mozkomíšním moku

Úprava vzorku CSF před analýzou:

- zakoncentrování vzorků CSF (10-20x)– podle hodnoty celk. TRF (na koncentraci asi 0,2 g/l) , zkumavky Vivaspin 2 (Santorius), při g / po dobu 10 min.
- stanovení TRF/CSF nefelometricky na IMMAGE 800, diagnostickou soupravou TRU Beckman Coulter
- 150 µl vzorku +450 µl reagenčního mixu: saturace transferinu ve vzorku Fe^{3+} a eliminace lipoproteinů



Stanovení asialo-transferinu v mozkomíšním moku

Analytické znaky metody

Opakovatelnost : 6,8% (n=20)

% CV stanovena měřením směsného likvoru v sérii

Reprodukovatelnost : 10 % (n=20)

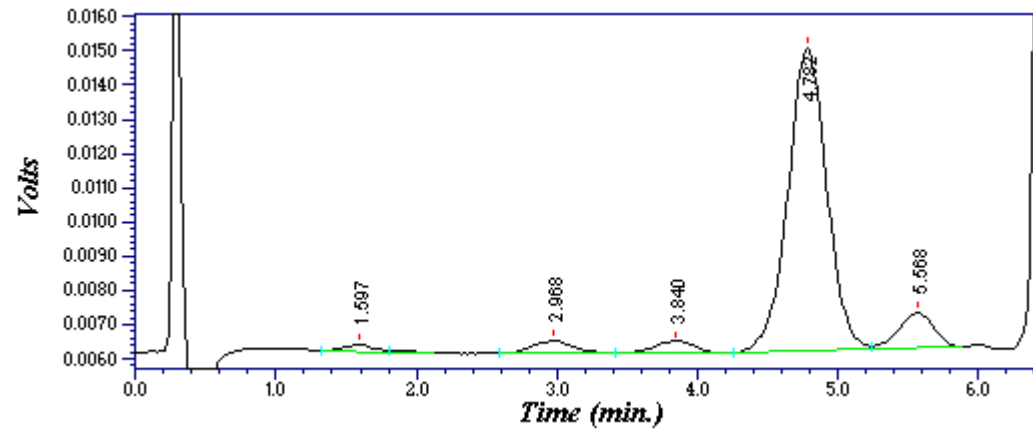
% CV stanoveno měřením směsného likvoru během 20 dní

Stabilita směsného likvoru: 2 měsíce, při -20°C

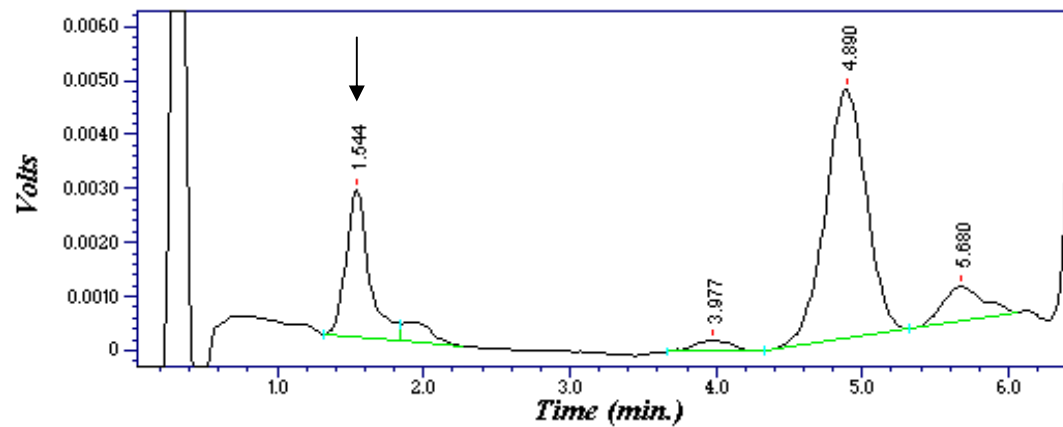
Stupeň zakoncentrování vzorku v rozsahu 10-50x neměl vliv na % asialotransferinu: CV=7,2%

HPLC chromatogram v séru a mozkomíšním moku

sérum



likvor





Identifikace peaku - asialotransferin

Při analýze zakoncentrovaného směsného likvoru jsme jímali frakci odpovídající asialotransferinu mezi 1,2 – 1,8 minutou analýzy

Identifikace peaku

- pomocí elektroforézy s následnou imunofixací
- metodou MALDI-TOF MS/MS

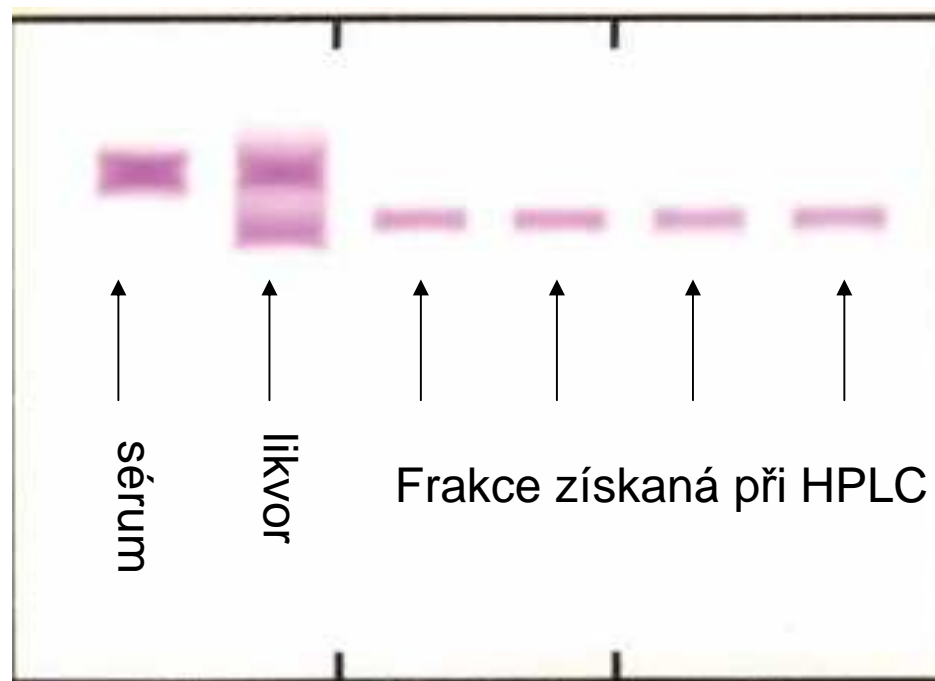


Identifikace peaku pomocí elektroforézy s následnou imunofixací

- Získaná frakce
 - separace na agarózovém gelu (Hydrogel 3 CSF SEBIA, poloautomat HYDRASYS SEBIA)
 - imunofixace s antisérem značeným peroxidázou (ANTI-TRANSFERIN –PER, SEBIA)
 - Detekční limit: 350 µg/l
- Vyhodnocení: v analyzované vzorku jsme detekovali asialo-transferin

Identifikace peaku pomocí elektroforézy s následnou imunofixací

Elektroforeogram





Výsledky stanovení

Analýza 60 vzorků CSF- s normální hodnotou transferinu, normální cytologický a biochemický nálezn v CSF, bez známek neurologického onemocnění

- 23 mužů : 22-68 let
- 37 žen: 18-68 let

Stanoveno referenční rozmezí: 8,8% - 41,6%
(průměr±SD)

(srovnatelné s 2DGE metodou: 8,0%-35.0%,
Vanderberg)



Souhrn

- Komerčně dostupná HPLC metoda pro stanovení % CDT v séru je použitelná pro stanovení asialotransferinu v likvoru
- Výhody: nenáročná na provedení, rychlá a dostupná
- Peak odpovídající asialo- izoformě transferinu byl identifikován pomocí imunofixace a hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF MS/MS)
- Stanovený referenční interval (8,7-41,6%) se shoduje s literárními údaji (Vanderberg, 2-DGE)



Publikace

Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory
investigation, 2010,70: 87-91:

Determination of asialotransferin in the cerebrospinal fluid with the HPLC method

Milan Dastych, Jana Gottwaldová, Michal
Pohludka, Petr Přikryl, Miroslava Beňovská

Děkuji za pozornost