

Лекція 4. Реакції преципітації й методи, засновані на реакції преципітації

Умови утворення преципітату імунними комплексами АГ-АТ

Реакції преципітації в розчині

Теорія решітки. Зони утворення решітки

Основні фактори, що впливають на утворення імунопреципітата

Копреципітація

Методи преципітації у розчинах: кільце преципітація

Вимірювання преципітації за розсіюванням світла. Нефелометрія та турбодиметрія

При взаємодії розчинних антигенів з антитілами утворюються високомолекулярні комплекси антиген-антитіло, які випадають у вигляді осаду в розчині, або обумовлюють загальне помутніння середовища, або знаходяться в колоїдному дисперсному стані, або відкладаються у вигляді смуг преципітації в гелі. Використання очищених антигенів дозволяє визначити концентрацію антитіл класів IgM і IgG в досліджуваній пробі. Реакції преципітації ставлять у спеціальних вузьких пробірках. В якості реагентів використовують гіперімунні сироватки, що преципітують, з високими титрами антитіл до гомологічних антигенів. Реакції преципітації дозволяють швидко (протягом кількох секунд) виявляти незначні кількості антигенів (можна виявити антиген у таких малих кількостях, які не виявляються хімічним шляхом). Чутливість реакцій преципітації дорівнюється 0,5 – 1 мкг/мл.

Реакції преципітації в розчині

При додаванні антигену, концентрація якого збільшується, до одній і тій же кількості антитіл, утворюється різна кількість преципітату. Можна побудувати графік, криву преципітації, яка відображає залежність між концентрацією антигену і кількістю преципітату: кількість преципітату зростає із збільшенням концентрації антигену, у зоні еквівалентності (кількість антигену приблизно дорівнює кількості місць зв'язування на антитілах) утворюється максимальна кількість преципітату, при надлишку антигену кількість преципітату зменшується.

Класична реакція преципітації відображена на рис. 6.

У ряді преципітаційних пробірок готують дворазове розведення антитіл, у кожен пробірку додають одну й ту ж кількість антигену. Інкують 3 години. Після інкубації осад у пробірках відділяють центрифугуванням і зважують; у надосадовій рідині визначають зміст антитіл і антигену; їхня наявність або відсутність відзначають відповідно знаком "+" або "-".

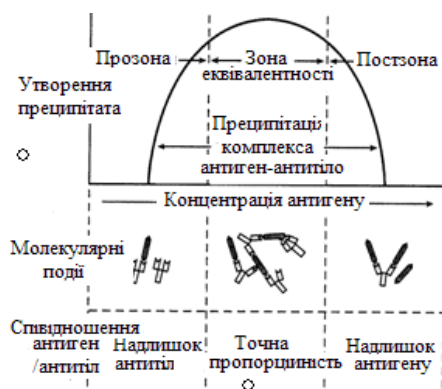


Рис. 6. – Крива преципітації реакції антиген-антитіло.

Згідно рис.6 преципітат утворився той пробірці, у якій не виявляється присутність ні антитіл, ні антигену.

Принципово важливо, що преципітат не утвориться ні в умовах надлишку антитіл, ні надлишку антигену, тобто як надлишок антитіл, так і надлишок антигену розчиняють преципітат.

Теорія решітки. Зони утворення решітки

Утворення комплексами антиген-антитіло преципітатів та аглютинатів пов'язано з формуванням ними решітки.

Решітки – агрегати, антиген-антитіло, які утворюються в

умовах як що

- антиген полівалентний (містить мінімум два ідентичних епітопа);
- перехресно реагує зі специфічними антитілами, які містять два й більше антигензв'язуючих сайта;
- молярне відношення епітопів та антигензв'язуючих сайтів оптимальне (зона еквівалентності).

Зони утворення решітки. Пост зона. Значний надлишок антигену обумовлює наявність вільного антигену в супернатанті. При високому вмісті антигену антитіл недостатньо для зв'язування двох сусідніх молекул антигену з утворенням містків. При наявності тільки феномену сенсibilізації решітки не утворюються.

Надлишок антигену у досліджуваній тест-системі визначає помилково негативну реакцію преципітації. При розведенні антигену реакція стає позитивною.

Незначний надлишок антигену, наявність вільного антигену у супернатанті, визначає можливість утворення субоптимального утворення преципітату.

Зона еквівалентності. Максимальне утворення преципітату здійснюється при еквівалентному співвідношенні специфічних антитіл та антигенів. У супернатанті відсутні антитіла й антиген.

Незначний надлишок антитіл у супернатанті визначає можливість утворення субоптимального преципітату.

Прозона. Значний надлишок антитіл при низькій концентрації антигену виключає можливість утворення містків полівалентними антитілами між сусідніми полівалентними антигенами, тобто утворення решіток та випадання комплексу антиген-антитіло у вигляді преципітату. У супернатанті високий вміст антитіл, антиген відсутній. У практиці визначення антигенів або антитіл цей феномен визначає помилково негативну реакцію преципітації. При розведенні антитіл реакція стає позитивною.

Схема умов формування решітки відображена на рис.7.

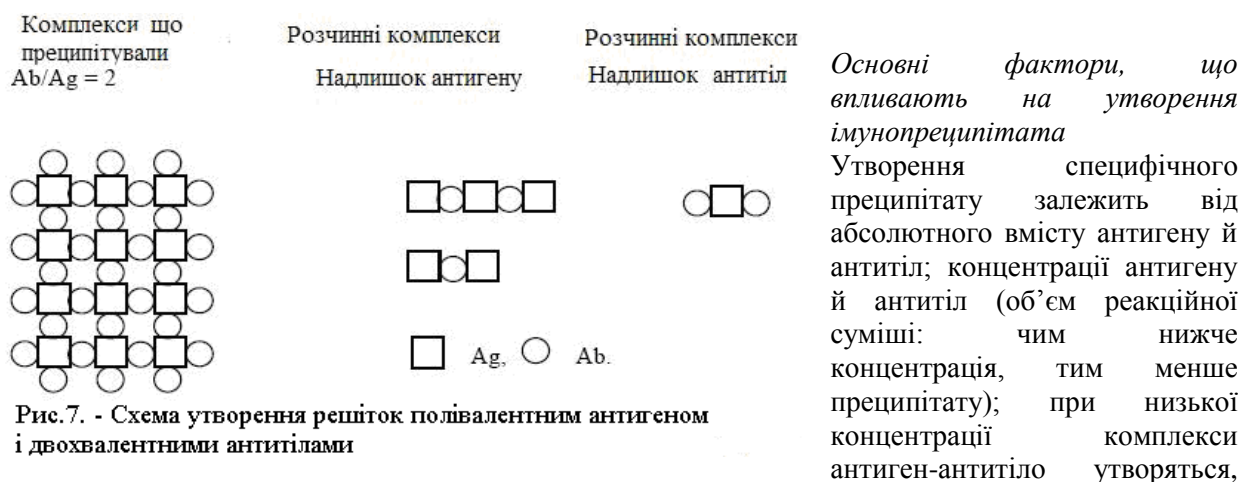


Рис.7. - Схема утворення решіток полівалентним антигеном і двохвалентними антитілами

але не преципітують.

Для кожної конкретної системи антиген-антитіла експериментальним шляхом визначають зону еквівалентності, у межах якої практично весь антиген зв'язаний антитілом; щоб зв'язати весь антиген концентрація антитіла повинна бути більше, ніж у зоні еквівалентності.

Кількість преципітату залежить від тривалості реакції й температури. При 37°C 90 – 95 % преципітація досягається за 1,5 – 3,0 години. Повна преципітація досягається при додатковій інкубації реагентів при 4°C протягом 10 – 20 годин.

Висока концентрація NaCl і інших солей перешкоджає преципітації, а 10% NaCl сприяє розчиненню преципітатів.

Іонний детергент натрію додецил сульфат (ДДС) в концентрації 0,2% гальмує імунопреципітацію на 90%, а у концентрації 0,05% – зменшує копреципітацію.

Неіонні детергенти – тритон x100, твін-20 у концентраціях 0,1 – 1% не впливають на реакції антиген-антитіло, але застосування тритона x100 зменшує ефект ДДС.

Поліетіленгліколь (ПЕГ, м.м.6000) у концентрації 3-4% сприяє преципітації.

Зона рН, оптимальна для утворення імунопреципітата – 6,5 – 8,6, переважніше слабо лужне середовище. Зниження рН за межі 5 приводить до поступового розчинення імунопреципітатів, що раніше утворилися, а підвищення за межі 8,6 – підсилює неспецифічну копреципітацію.

Не специфічні фактори антисироваток і антигенних розчинів впливають на утворення імунопреципітата. Тому варто використати не антисироватки, а виділену з них гама фракцію, а ще краще афінно очищені моноспецифічні сироватки, а антиген необхідно піддати найпростішому очищенню: посвітління, фракціонування.

Копреципітація

Копреципітація – явище залучення в преципітат розчинних антигенів, вихідна концентрація яких є недостатньою для утворення преципітату, при додаванні в середовище антигену у високій концентрації. Наприклад, у середовищі є мічений антиген в низькій концентрації й преципітат не

утворить, додають немічений, холодний носій, у концентрації достатньої для утворення імунопреципітату. Мічений антиген утягується в преципітат, копреципітує.

Методи преципітації у розчинах

Кільцепреципітація. Швидкий метод оцінки ефективності імунізації тварин (1902 рік, Ascoli).

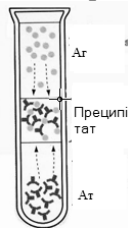


Рис. 8. – Кільцепреципітація

У вузьку пробірку діаметром 0,5 см з нерозведеною сироваткою, що преципітує, в кількості 0,3 - 0,5 мл, тримаючи пробірку в нахиленому положенні, пастерівської піпеткою повільно по стінці нашаровується такий же обсяг антигену. Пробірку обережно, щоб не змішати рідини, ставлять вертикально. При позитивній реакції через декілька хвилин на межі дотику двох рідин з'явиться кільце преципітації. При малих кількостях реагентів реакцію можна проводити в каплях (мікропреципітація). Постановка реакції обов'язково супроводжується контролюми сироватки та антигену.

Облік. Результати реакції враховують у залежності від виду антигену і антитіл через 5 - 10 хв, через 1 - 2 або 20 - 24 години.

Метод преципітації в розчинах широко використовують для визначення концентрації антитіл основних класів.

Вимірювання преципітації за розсіюванням світла. Нефелометрія та турбодиметрія

Оцінку реакції преципітації у розчинах здійснюють:

- 1) візуально або за допомогою лупи, ступінь мутності відзначають кількістю знаків "+";
- 2) за допомогою оптичних методів – нефелометрії або турбодиметрії.

Нефелометрія – вимір інтенсивності світла, розсіяного зваженими частками мутного середовища. Спостереження ведуть збоку, перпендикулярно напрямку основного світлового потоку. Інтенсивність світлорозсіювання визначають за допомогою фотоелемента. Кількість розсіяного світла залежить від кількості та розміру частинок в пучку світла. Вимірюють світло, розсіяне під кутом 90°; лазерні промені є найбільш точними, оскільки вони дозволяють виявити відхилення світла на кілька градусів від початкового шляху. У кінцевій точці нефелометрії реакція завершується, але частки, як правило, випадають з розчину і зменшують розсіювання світла. Кінетична нефелометрія – вимірювання темпу зростання розсіювання відразу після змішування реагентів, цей показник зміни прямо пропорційний концентрації антигену або антитіл.

Нефелометрія дозволяє з високою точністю визначити концентрацію IgG, IgA, IgM, підкласів IgG, C3, C4, фактору В, С-реактивного білка і деяких інших сироваткових білків. Цей метод підходить для визначення білків у низькій концентрації, наприклад IgE, рівень якого в сироватці не перевищує 1 мкг / мл.

В даний час багато лабораторій використовують нефелометрію як стандартний метод кількісного визначення імуноглобулінів.

Турбодиметрія – визначення каламутності або непрозорості розчину. При турбодиметрії здійснюють вимір ослаблення інтенсивності світлового потоку при його проходженні через середовище, що розсіює. Спостереження ведуть по ходу основного потоку світла. Інтенсивність світлового потоку визначають за допомогою фотоелемента. Вимірюють або інтенсивність світлорозсіювання, або ослаблення інтенсивності основного світлового потоку. Мутність водного розчину викликана утворенням комплексів антиген-антитіло, призводять до утворення осаду, чим більше антигену або антитіл в системі, тим вище каламутність. Кількість антигену або антитіл розраховують на основі результатів, отриманих відносно стандартів і контролю.

Принцип постановки тестів. У пробірках, у яких будуть урахувати результати, готують розведення антигену. Додають гомологічну антисироватку, перемішують, інкубують 30 – 40 хв. Вимірюють каламутність. Використається для визначення концентрації імуноглобулінів (IgM, IgG, IgA), C3, ЦРБ і ін.

Достоїнства методів преципітації в розчинах. Простота, недороге встаткування, експресність аналізу.

Недоліки методів прямої преципітації в розчинах. Висока ймовірність неспецифічного включення в преципітат чужорідних компонентів, особливо при низькій концентрації антигену й антитіла, тобто можливість неспецифічної копреципітації.

Метод непридатний для визначення антитіл, що не преципітують: IgA, IgE.

Метод не придатний для дослідження гаптенів – вони не утворюють преципітат.

Ці недоліки значною мірою вдається компенсувати, якщо розчинні комплекси антиген-антитіла преципітувати за допомогою так званих вторинних реагентів. Вторинні реагенти, як правило, це сироватки проти гама-глобулінової фракції (вторинні антитіла) або протеїн А – білок клітинної стінки *St. aureus*. Цей білок зв'язується із глікопротеїдами, у тому числі й з імуноглобулінами декількох видів тварин; 1 молекула білка А зв'язує дві молекули імуноглобулінів. У зв'язуванні з білком А беруть участь Fc-фрагменти імуноглобулінів; антигензв'язуючі області антитіл у процес зв'язування не утягуються.

Чутливість: 0,5 – 1 мкг/мл.