

Лекція 5. Методи преципітації в гелях (методи імунодифузії в гелі)

Основний принцип імунопреципітації у гелі

Фактори, що впливають на утворення імунопреципітатів у гелі

Методи імунодифузії в гелі

Одновимірна дифузія за Уоденом

Радіальна імунодифузія за Мнчині

Подвійна імунодифузія за Оухтерлоні

Можливості методів

Імунопреципітація в гелі – варіант імунопреципітації в розчинах, у яких гель виконує функцію підтримуючого середовища.

Імунопреципітація в гелі заснована на дуже простому принципі. У товщі гелю існує водна фаза, через яку легко дифундує більшість макромолекул (м.м. може перевищувати 10^6). Коли полідетермінантний складний антиген переміщується в зону, яка містить антитіла, то при оптимальному співвідношенні концентрацій антигену і антитіл утворюються видимі лінії преципітації. Реакцію зазвичай проводять на розташованих горизонтально тонких пластинах агарового гелю на скляних підложках. Для реакцій простий і подвійний дифузії антигени і антитіла вносять у лунки, вирізані в гелі навпроти один одного.

Головне достоїнство методів імунопреципітації в гелях – висока розв'язувальна здатність виявлення комплексів антиген – антитіла, дуже просте устаткування, тобто доступність.

Основний принцип імунопреципітації у гелі

У товщі гелю, через його осередки у водній фазі легко дифундують молекули антигенів й антитіл з м.м. до 10^6 , зустрічаються один з одним і утворюють імунопреципітат у зоні еквівалентності. Імунопреципітати проявляються як видимі оком білі смуги. Швидкість дифузії залежить від:

- розміру часток;
- температури;
- концентрації гелю;
- гідратації гелю;
- взаємодії реагентів з гелем.

Кожна індивідуальна система антиген-антитіло утворить свою смугу преципітації. Реакцію проводять у горизонтально розташованих 1,5 мм пластинах 1 % розчину агарового гелю на скляних підложках. Залежно від принципів створення градієнтів концентрації антигену й антитіл у гелі розрізняють два основних варіанти імунодифузії:

- проста дифузія – коли концентраційний градієнт створюється тільки для одного з реагентів, а зміст іншого постійний, він вноситься в гель при його готуванні;
- подвійна дифузія – коли обидва реагенти дифундують у чистий гель.

Залежно від можливих напрямків дифузії реагентів обидва варіанти підрозділяються на одновимірні, двовимірні, комбіновані.

Феномен, який полягає в тому, що при одночасній дифузії в гелі розчинних антигенів і антитіл утворюються смуги преципітації в зоні їх оптимального співвідношення звуть імунодифузія.

Фактори, що впливають на утворення імунопреципітатів у гелі

Фактори, що впливають на утворення імунопреципітата в гелі ті ж, що й у водно-сольових розчинах, але ця реакція має ряд специфічних особливостей. Перш за все, немає необхідності емпірично визначати зону еквівалентності послідовно змішуючи різні розведення антигену й антитіл, тому що в гелі титрування здійснюється мимовільно за рахунок дифузії реагуючих речовин назустріч один з одним у підтримуючому середовищі. У гелі формуються градієнти концентрації антигенів і антитіл, з'являється можливість перехреста градієнтів і формування смуги преципітації там, де концентрації пари антиген-антитіла еквівалентні.

У суміші антигенів і антитіл смуги преципітації утворюються кожною парою. Якщо в системі концентрація антигену = концентрації антитіл, то при інкубації лінія преципітації не міняє положення й згодом її інтенсивність наростає. Якщо концентрація антигену \gg концентрації антитіл або навпаки, то первинна смуга преципітації, утворена в зоні перехреста градієнтів концентрацій, буде зміщатися в напрямку дифузії реагенту, концентрація якого більше. Якщо імунопреципітат розчинний у надлишку реагенту, то первинний преципітат буде повністю розчинятися: формується мігруюча смуга преципітації із щільним фронтом і пухким хвостом.

На формування смуги преципітації в гелі впливають:

локальна концентрація, концентрація у місці нанесення антигену й антитіл;

- напрямок та швидкість дифузії антигену та антитіл;
- відстань між точками нанесення реагентів;
- форма й площа стартових лунок визначають як вихідну конфігурацію фронту дифузії, так характер формування концентраційних градієнтів у гелі.

Підтримуюче середовище повинне відповідати наступним вимогам. Гель повинен бути прозорим і однорідним.

Структура гелю не повинна перешкоджати дифузії молекул антигену й антитіл.

Гель повинен бути імунохімічно інертним і не містити домішок, що зв'язують антиген або антитіла.

Гель повинен бути стабільним протягом тривалого часу в широкому діапазоні рН і температур.

Всім цим вимогам відповідає 1% гель агарози, що до всього характеризують легкість і швидкість готування гелів будь – якої товщини й розміру осередків. Через осередки такого гелю можуть проходити молекули з м. м. 200 кДа.

Агароза – препарат агару, очищений від мукополісахаридів (агаропектини), які екранують антигенні детермінанти й послабляють взаємодію антиген-антитіла. У порівнянні з агаром, гель агарози більше прозорий, але й більше тендітний.

Оптимальна температура стабільності гелю – кімнатна, припустимий діапазон рН 7,0 – 9,0; нижче 6,5 преципітати розчиняються, а вище 8,6 спостерігається неспецифічна копреципітація.

Кількість смуг преципітації відображує мінімальне число різних систем антиген-антитіла.

Подвоєння смуг, розщеплення смуг може бути пов'язане з:

- надлишком антигену, що переміщається за лінію преципітації;
- низькими концентраціями антигену;
- гетерогенністю молекулярних форм антигену;
- різкими коливаннями температур;
- невідповідністю за сольовим складом, іонній силі й рН між гелем, розчинами антигену або антитіл;
- повторне внесення у лунки гелю розчинів антигену або антитіл.

Методи імунодифузії в гелі

Одновимірна дифузія за Уоденом

Антитіла додаються в гель агарози, що поміщений в пробірку, розчин антигену нашаровується поверх шару гелю, антиген дифундує вниз в гель. Якщо антитіла в гелі вступають в реакцію з антигеном, що додається, в гелі утворюється преципітат. Реакція якісна, дозволяє виявити наявність антитіл, як що антиген відомий, або антигену, як що відома специфічність антитіл.

Антитіла додаються в гель агарози, що поміщений в пробірку, розчин антигену нашаровується поверх шару гелю, антиген дифундує вниз в гель. Якщо антитіла в гелі вступають в реакцію з антигеном, що додається, в гелі утворюється преципітат. Реакція

якісна, дозволяє виявити наявність антитіл, як що антиген відомий, або антиген, як що відома специфічність антитіл.

Метод радіальної імунодифузії за Манчینی

Агар містить моноспецифічні антитіла, а радіально в гель дифундує антиген, зустрічаючись із антитілами формує імунний комплекс; комплекси антиген-антитіла утворюють преципітат. У міру віддалення від лунки концентрація антигену поступово падає, поки не стає еквівалентної концентрації антитіл у агарі. При цьому утворюється добре помітне кільце преципітації. Чим вище концентрація внесеного антигену, тим більше діаметр кільця. Якщо у реакції використовується декілька стандартів з відомою концентрацією антигену, то шляхом порівняння або споруди калібрувальної кривої можна проводити кількісне визначення антигену в зразках.

Реакція може перебігати протягом декількох днів. Кількісна оцінка: розмір кільця пропорційний кількості антигену при рівних обсягах препаратів у лунці.

Для побудови каліброваної кривої використовують стандартні розчини розведення антигену, концентрація розведень може відрізнятись в 10 - 20 разів і досягати 5 мкг/мл. Облік ведуть у вологих гелях. Схема постановки РІД відображена на рис.8.

При постановці РІД необхідно досягти стаціонарності преципітату, тобто стану, коли при подальшій експозиції розмір кільця не змінюється. Саме на цій стадії має місце лінійна залежність між концентрацією антигену й діаметром кільця (квадратом діаметра) преципітату. Стаціонарність преципітату може сформуватися за 1 – 10 діб (білкові антигени). Час досягнення стаціонарності преципітату залежить від м.м. антигену, розміру лунки, концентрації антигену, концентрації антитіл у гелі, афінності антигену й антитіл, температури. При 37⁰С стаціонарність преципітату досягається швидше, але границя преципітату менш чітка, розпливчата, підсилюється неспецифічна "помилкова" преципітація.

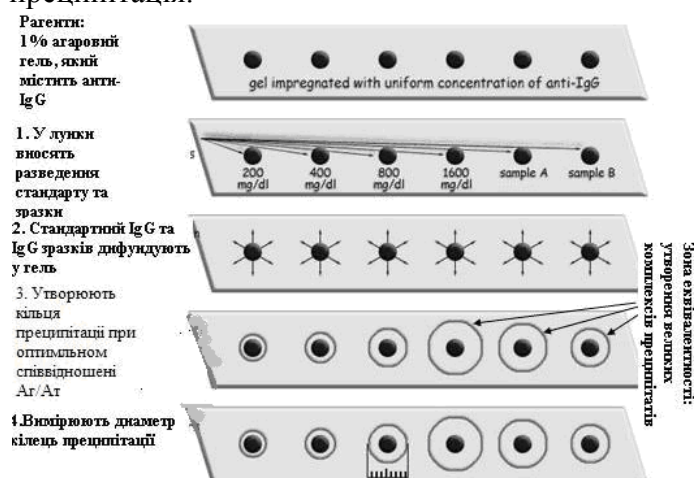


Рис. 8 .- Схема визначення імуноглобулінів (IgG) за Манчینی

Калібрований графік для кожного імуноглобуліну, що визначається, будується щораз при постановці реакції. Його можна будувати у двох варіантах: на ординаті – концентрація антигену, що визначається, у мг/мл, на абсцисі – квадрат діаметра кільця в мм; або на ординаті квадрат діаметру кільця в мм, на абсцисі – концентрація стандартного імуноглобуліну в мг/мл (рис.9).

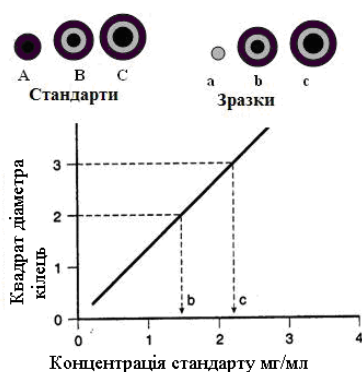


Рис. 2. – Принцип побудови каліброваного графіка в РІД при визначенні концентрації антигену

Як що в гель вносять антиген, то говорять про зворотну РІД – ЗРІД.

Застосування РІД. Визначення концентрації індивідуальних антигенів у розчині – будь яких антигенів при наявності специфічних антитіл.

Це простий і надійний метод кількісної оцінки імуноглобулінів (включаючи підкласів IgG), компонентів комплементу (наприклад, С3, С4, фактора В) та інших білків сироватки. Існують готові набори, що дозволяють визначити антиген в низькій концентрації - не більше 3 мкг / мл. Визначаючи зміст імуноглобулінів, необхідно враховувати, що зміна їх властивостей може спотворювати результати дослідження. Так, якщо в сироватці містяться мономірні IgM (наприклад, при макро-глобулінемії Вальденстрема, атаксії-телеангіектазії), рівень буде штучно завищений, оскільки мономерний IgM дифундує швидше, ніж пентамірний. Присутність ревматоїдного фактора в досліджуваній пробі, навпаки, штучно знижує рівень IgG оскільки імунні комплекси, що складаються з IgG і ревматоїдного фактора, дифундують повільніше, ніж незв'язаний IgG. Сироватка багатьох хворих з дефіцитом IgA містить антитіла до білків тваринного походження, наприклад, до козячих імуноглобулінів, тому при використуванні козячих антитіл для визначення рівня IgA в цьому випадку виходять завищені результати.

Метод подвійній імунодифузії за Оухтерлоні

Принцип: у лунки, вирізані у чистому 1% агаровому або агарозному гелі, поміщають антиген і антисироватки, які дифундують назустріч один одному. У тій ділянці гелю, де їх співвідношення еквівалентні, утворюється видимий преципітат. Якщо аналізу піддається суміш антигенів, то утворюється кілька ліній преципітації. Якщо сусідні лунки містять один і той же антиген, то лінії преципітації зливаються. Якщо антигени різні, то утвориться або так звана шпора, що свідчить про часткове спорідненість антигенів, або, у разі неспоріднених антигенів, лінії преципітації будуть перетинатися. Варіанти смуг преципітації у гелі за методом подвійної імунодифузії відображені на рис. 3-5

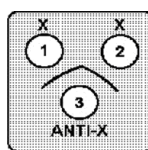


Рис. 3. – Схема смуг преципітації при ідентичності антигенів у 1 та 2 лунках.

Преципітація має вигляд безперервної лінії у куті між двома лунками. Відсутня шпора, цей тип реакції називають смуга ідентичності.

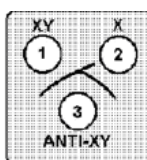


Рис. 4. – Схема смуг преципітації при частковій ідентичності антигенів у 1 та 2 лунках.

Якщо розчин з антигенами X і Y поміщений у лунку 1, розчин тільки з антигеном X поміщений в лунку 2, антисироватка, що містить антитіла, специфічні як до X, так і до Y, поміщена в лунку 3, формується реакція шпори. Це вказує, що два антигени в лунках 1 і 2 однакові, але вміст лунки 1 має антигенну специфічність, що відсутній у лунці

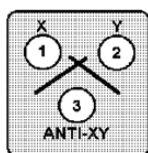


Рис. 5 – Схема смуг преципітації при не ідентичності антигенів у 1 та 2 лунках

Якщо антигени в лунках 1 і 2 різні, а антисироватка в лунці 3 специфічна для кожного з них, то формуються перехресні лінії преципітації, як відображення не ідентичності досліджуваних антигенів.

Застосування методу подвійної радіальної імунодифузії

Метод подвійної імунодифузії – важливий тест для визначення преципітуючих властивостей, приблизного титру й специфічності антисироваток до розчинних антигенів.

1. Стандартний спосіб визначення специфічності антисироваток.
2. Тест на ідентичність антигенів, визначення чистоти антигену й антигенних взаємозалежностей між молекулами.
3. Для приблизного визначення концентрації антигену.
4. Для якісного аналізу спектра антигенів у біологічних об'єктах.
5. Для контролю ефективності імунізації тварин.

6. Для орієнтовного визначення титру моноспецифічних сироваток.

Якщо використовуються антисироватки з гарними преципітуючими властивостями, то можна визначити антиген у концентрації 5 мкг/мл.

Переваги методу. Це єдиний унікальний простий метод вивчення взаємодії антигену зі специфічними антитілами.

Недоліки методу подвійної імунодифузії у гелі. Відносно низька чутливість у порівнянні з методом аглютинації та ІФА, значна тривалість.

При дослідженні сумішей антигенів утворюються лінії преципітації які перекриваються й накладаються один на одного, що утрудняє аналіз.

В клініці метод застосовується в діагностиці автоімунних захворювань для виявлення автоантитіл до ядерних антигенів, що екстрагуються. Хоча по чутливості метод подвійної радіальної імунодифузії поступається багатьом кількісним методам, технічно він простий, не вимагає високо очищених антитіл, специфічний і може використовуватися при проведенні масових досліджень.