Opisana metoda stanowi uzupełnienie metod zamieszczonych w rozdziale VIII podręcznika „Laboratoryjne metody diagnostyczne".

ILOŚCIOWE OZNACZENIE FRAKCJI BIAŁKOWYCH METODĄ IMMUNODYFUZJI RADIALNEJ

ALICJA KENDZIOREK

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie

I. Zasada metody

Metoda immunodyfuzji radialnej oparta jest na reakcji precypitacji, przebiegającej pomiędzy antygenem i przeciwciałem. Jeden z dwóch składników reakcji, z reguły przeciwciało, zostaje równomiernie wymieszany ze zbuforowanym żelem agarowym. Antygen dyfundując promieniście (radialnie) do żelu z małego zbiorniczka tworzy ze znajdującym się w żelu homologicznym przeciwciałem pierścień precypitacyjny. Średnica precypitatu jest proporcjonalna do stężenia antygenu.

II. Odczynniki

1. Bufor barbituranowy: rozpuścić 1,84 g kwasu dwuetylobarbiturowego $C_8H_{12}N_2O_2$ c.cz. 184,2 w około 700 ml wody destylowanej (w razie potrzeby lekko podgrzać). Do otrzymanego roztworu dodać 10,30 g sodowego dwuetylobarbituranu $C_8H_{11}N_2O_3Na$ c.cz. 205,2 i wymieszać do rozpuszczenia. Dopełnić wodą destylowaną do 1000 ml. pH buforu powinno wynosić 8,6, w razie potrzeby doprowadzić do właściwego pH za pomocą kwasu dwuetylobarbiturowego lub sodowego dwuetylobarbituranu. Do przygotowania agaru bufor ten należy rozcieńczyć w stosunku 1 : 2 wodą destylowaną.

2. Agar, np. Special Agar Noble Difco: odważyć 1 g sproszkowanego czystego agaru i zawiesić w 100 ml rozcieńczonego 1 : 2 roztworu buforu barbituranowego. Pozostawić do napęcznienia przez noc, a następnie ogrzewać w łaźni wodnej do całkowitego rozpuszczenia. Dla konserwacji dodać na gorąco sodowego azydku NaN_3 cz., c.cz. 65,01 w stosunku 1 : 1000. Zastygły żel agarowy przechowywać w małych porcjach (aby zapobiec wielokrotnemu rozgrzewaniu i wykrzepianiu agaru, co nie jest wskazane) w zamkniętych naczyniach w temperaturze 4°C przez 2—3 miesiące.

3. Surowice odpornościowe monowalentne (syn. immunosurowice, antysurowice) prod. Wytwórni Surowic i Szczepionek „Biomed".

4. Wzorcowa (metrykowana) surowica ludzka (np. firmy Behringwerke). Surowica ta zawiera frakcje białkowe w stężeniu zbliżonym do wartości fizjologicznych. Jako surowicy wzorcowej można także użyć jakiejkolwiek surowicy, w której uprzednio oznaczono w laboratorium referencyjnym stężenia poszczególnych frakcji białkowych.

5. Roztwór barwiący: w 500 ml wody destylowanej rozpuścić 5,0 g rtęciowego chlorku $HgCl_2$ c.cz. 271,5. Następnie do roztworu dodać 5,0 g kwasu octowego lodowatego CH_3COOH c.cz. 60,01 i rozpuścić 0,5 g czerni amidowej 10B. Dopełnić wodą destylowaną do objętości 1000 ml.

6. Roztwór kwasu octowego CH_3COOH cz., c.cz. 60,0; 0,5 mol/l: 30 ml kwasu octowego lodowatego rozcieńczyć wodą destylowaną do końcowej objętości 1000 ml.

III. Postępowanie

1. Przygotowanie płytek: istnieją dwie metody przygotowania płytek z immunosurowicą:

a) poprzez zmieszanie immunosurowicy z żelem agarowym. Do żelu agarowego (którego potrzebna objętość wynosi 0,1 ml/cm^2 płytki) ogrzanego do temperatury 56°C dodać odpowiednią ilość immunosurowicy (patrz niżej). Dobrze wymieszać, szybko wylać na uprzednio odtłuszczone szkiełko (zanurzone w etanolu, wypłukane wodą i wysuszone) i rozprowadzić równomiernie po jego powierzchni. Tak przygotowaną płytkę zostawić do zastygnięcia (na około 1/2 godziny),

b) poprzez wcieranie immunosurowicy w powierzchnię żelu agarowego. Sposób poleca się szczególnie w wypadku małej liczby badań, gdy do badania wystarczy powierzchnia agarowa jednego lub kilku szkiełek podstawowych.

Na szkiełko podstawowe odmierzyć 2 ml gorącego agaru i rozprowadzić równomiernie po jego powierzchni. Płytki zostawić do zastygnięcia (około 1/2 godziny). Po tym czasie na powierzchnię agaru odmierzyć odpowiednią objętość immunosurowicy i wcierać ją równomiernie po całej powierzchni agaru za pomocą zagiętej bagietki szklanej, aż do całkowitego wessania się immunosurowicy. Tak przygotowane płytki można przechowywać przez kilka dni w temperaturze 4°C w wilgotnej komorze.

2. Dobieranie odpowiedniej proporcji immunosurowic.

Objętość immunosurowicy należy dobrać i sprawdzić doświadczalnie ponieważ każda seria immunosurowic ma inne miano przeciwciał. Należy dobrać taką objętość immunosurowicy, żeby średnica pierścienia precypitacyjnego była łatwa do odczytania (w granicach od 3 do 12 mm dla danego zakresu stężeń).

Używając immunosurowic przeciw immunoglobulinom produkcji Wytwórni Surowic i Szczepionek „Biomed", dobre wyniki dają następujące ich ilości w przeliczeniu na 1 ml agaru:

około 0,075 ml surowicy anty IgG,
około 0,1 ml surowicy anty IgA,
około 0,05 ml surowicy anty IgM.

3. Nanoszenie wzorców i materiału badanego.

W uprzednio przygotowanych płytkach wyciąć zbiorniczki o średnicy 3 mm w odległości nie mniejszej niż 1 cm od siebie. Do trzech pierwszych zbiorniczków odmierzyć pipetą Hamiltona lub inną dokładną mikropipetą standardy:

do pierwszego — wzorcową surowicę, rozcieńczoną roztworem chlorku sodowego 0,15 mol/l w stosunku 1 : 2, w ilości 1 µl (końcowe stężenie wynosi 1/2 stężenia metrykalnego),

do drugiego — wzorcową surowicę nie rozcieńczoną w ilości 1 µl (stężenie równe stężeniu metrykalnemu),

do trzeciego — wzorcową surowicę nierozcieńczoną w ilości 2 µl (stężenie dwa razy większe niż metrykalne).

Do następnych zbiorniczków nanieść po 1 µl materiału badanego.

4. Inkubacja

Płytki pozostawić do inkubacji w temperaturze pokojowej w wilgotnej komorze, przy czym czas inkubacji dla IgG i IgA wynosi 24 godz, a dla IgM — 72 godz. Dla innych frakcji białkowych czas inkubacji trzeba sprawdzić doświadczalnie (szybkość dyfuzji zależna jest m. in. od temperatury i wielkości cząsteczki).

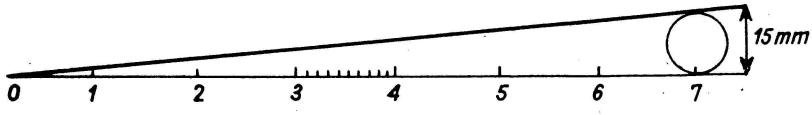
5. Ujawnienie pierścieni precypitacyjnych.

Po inkubacji płytki zanurzyć na 24 godz. w 0,9% roztworze NaCl. Po tym czasie płytki wyjąć i suszyć pod bibułą Whatman Nr 1 w temperaturze pokojowej lub w

cieplarce. Następnie zdjąć ostrożnie bibułkę, a płytki barwić przez 15 min. roztworem barwiącym (II/5). Nadmiar barwnika wypłukać roztworem kwasu octowego (II/6).

6. Odczytywanie wyników

Odczytać średnice pierścieni precypitacyjnych z dokładnością do 0,1 mm (najlepiej za pomocą specjalnego szablonu firmy Behringwerke). Szablon taki można wykonać samemu (ryc. 1).



Ryc. 1. Sposób wykonania szablonu do odczytywania średnic pierścieni precypitacyjnych z dokładnością do 0,1 mm. Poprowadzić linię poziomą długości ok. 30 cm i podzielić ją na piętnaście równych odcinków, zaś każdy z tych odcinków jeszcze na dziesięć. Następnie z punktu odpowiadającemu wartości 15 poprowadzić prostopadłą linię wysokości 15 mm. Górny punkt tej linii połączyć z 0 skali poziomej. W celu zmierzenia średnicy pierścienia precypitacyjnego należy płytkę umieścić na sporządzonym szablonie w taki sposób, aby obwód pierścienia znalazł się dokładnie pomiędzy dwoma liniami szablonu, jak pokazano na rysunku. Średnicę jej w mm wyznacza punkt zetknięcia obwodu ze skalą szablonu. Ze względu na grubość płytki, przy mierzeniu średnicy pierścieni należy położyć płytkę na szablonie zawsze powierzchnią agarową.

IV. Sporządzanie wykresu kalibracyjnego

Mając zmierzone średnice i znając stężenie użytych trzech roztworów wzorcowych dla badanego parametru, należy sporządzić wykres kalibracyjny.

Ażeby uzyskać liniową zależność pomiędzy średnicą pierścienia precypitacyjnego a stężeniem antygenu wykres można sporządzić dwoma sposobami:

a) odkładając na osi rzędnych logarytm ze stężeń antygnu, a na osi odciętej średnice pierścieni precypitacyjnych,

b) odkładając na osi rzędnych stężenie antygen, a na osi odciętych kwadraty średnic pierścieni precypitacyjnych.

Znając średnicę pierścienia precypitacyjnego dla badanego materiału, odczytuje się na osi rzędnych odpowiadające mu stężenie.

V. Wartości prawidłowe

Immunoglobuliny klasy IgA — 800—1500 mg/dl
immunoglobuliny klasy IgA — 50— 200 mg/dl
immunoglobuliny klasy IgM — 40— 120 mg/dl
immunoglobuliny klasy IgD — 1— 40 mg/dl

VI. Odtwarzalność metody

Współczynnik zmienności nie może przekraczać 10%.

PIŚMIENNICTWO

1. *Mancini G., Carbonara A. O.:* Immunochem., 1965, 2, 235.