

## ÚLOHA 7: Dvojitá radiální imunodifúze podle Ouchterlonyho

### Princip

Ouchterlonyho modifikace imunodifúze probíhá na skleněné destičce v agarózovém gelu, do kterého se vysekají jamky podle šablony. Do jamek se pak nanáší Ag a Ab. Ty difundují radiálně do gelu a v místě střetu vytvářejí charakteristické precipitační linie, které lze vizualizovat obarvením (např. barvení bílkovin amidočerní). Podle jejich počtu lze stanovit počet přítomných dvojic Ag a Ab. Když kolem jedné jamky s Ab vysekáme podle různých šablon několik jamek a do nich napipetujeme různé Ag, můžeme podle tvaru obloučků a jejich propojení určovat identitu, příbuznost nebo odlišnost Ag. Lze také porovnávat vzájemnou molekulovou hmotnost Ag a Ab. Protože Ag a Ab difundují kolem jamek radiálně, nazývá se tato metoda dvojitá radiální imunodifúze.

### Výhody a nevýhody

Metoda je snadná na provedení a výsledky jsou dobře patrné. Nevýhodou je dlouhá čekací doba na vyhodnocení výsledků.

### Chemikálie a roztoky

1. Antigen - Komerční lidské sérum obsahující známé množství IgG (*Orion Diagnostica*)
2. Protilátka - Komerční prasečí sérum s anti-IgG protilátkami (*Orion Diagnostica*)
3. Fyziologický roztok  
 $0,85 \text{ g NaCl} + 100 \text{ ml dH}_2\text{O}$
4. Agaróza v práškové formě
5. Borát-fosfátový pufr (pH 6,8)  
 $25,99 \text{ g H}_3\text{BO}_3 + 2,4 \text{ g NaOH} + 2,04 \text{ g KH}_2\text{PO}_4 + 1\ 000 \text{ ml dH}_2\text{O}$
6. Barvicí roztok  
 $225 \text{ ml CH}_3\text{OH} + 25 \text{ ml CH}_3\text{COOH} + 0,25 \text{ g amidočerni 10B}$
7. Odbarvovací diferenciací roztok  
 $\text{CH}_3\text{OH} : \text{CH}_3\text{COOH} - 10:1$

Vzorek: Komerční lidské sérum obsahující neznámé množství IgG.

### Přístroje a pomůcky

Skleněné plotny 5 x 5 cm, skleněná pipeta, korkovrt napojený na vývěvu, Petriho misky na vlhkou komůrku, filtrační papír, vyvažovací podložka pro nalévání skleněných ploten, vodováha, vaříč, vodní lázeň.

### Postup (vlastní práce)

1. Připravíme skleněné plotny s agarózovým gelem:
  - a. vyvážíme podložku na nalévání do vodorovné polohy
  - b. skleněnou plotnu (5 x 5 cm) očistíme alkoholem a necháme oschnout
  - c. připravenou skleněnou pipetu několikrát propláchneme horkou vodou
  - d. na plotnu naneseeme skleněnou pipetou 2,4 ml 1% roztoku agarózy v borát-fosfátovém pufru
  - e. gel necháme několik minut zatuhnout na kalibrované vodorovné ploše.

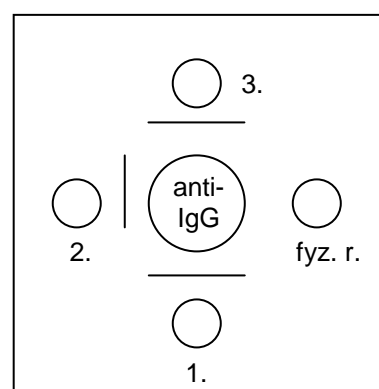
2. Připravíme si různá ředění séra se známým množstvím IgG pro kalibraci:
  - a) do zkušavky 1. napipetujeme 2  $\mu$ l séra a 18  $\mu$ l fyziologického roztoku
  - b) do zkušavek 2. a 3. napipetujeme 10  $\mu$ l fyziologického roztoku
  - c) ze zkušavky 1. přeneseme 10  $\mu$ l do zkušavky 2., zamícháme a přeneseme 10  $\mu$ l do zkušavky 3. a opět zamícháme:

Označení zkušavky	1.	2.	3.
Fyziologický roztok	18 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Antigen (sérum)	2 $\mu$ l	-	-

10  $\mu$ l      10  $\mu$ l

Ředění:	10x	20x	40x
Celkový objem:	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l

3. Do gelu podle šablony vysekáme 5 jamek.
4. Do jamek naneseeme:
  - a) do prostřední jamky 30  $\mu$ l antiséra
  - b) do tří okolních jamek 10  $\mu$ l různých ředění séra s IgG
  - c) do čtvrté jamky 10  $\mu$ l fyziologického roztoku



#### Dále pokračuje vyučující

5. Skleněnou plotnu vložíme do vlhké komůrky a necháme inkubovat v lednici 48 hodin.
6. Po skončení inkubace pereme skla nejvýše 2 minuty ve fyziologickém roztoku, zabalíme je do filtračního papíru navlhčeného fyziologickým roztokem a přes noc sušíme při pokojové teplotě.
7. V dalším cvičení sejmeme ze sklíček papír, skla opereme pod tekoucí vodou a barvíme barvicím roztokem do dostatečného obarvení linií. Pozadí odbarvíme diferenciačním roztokem. Nakonec opereme v destilované vodě a usušíme bez papíru.

#### Hodnocení

Vizuálně vyhodnotíme výsledek:

- a) mezi jamkou s protilátkou (antisérem) a jamkou s fyziologickým roztokem by se neměla objevit žádná precipitační linie
- b) mezi jamkami s antigeny (různými ředěními séra) a jamkou s protilátkou (antisérem) by se měly vytvořit různě ostré precipitační linie v závislosti na různém ředění
- c) pokud se vytvoří ostrá precipitační linie, která se nerozmývá na žádnou stranu, došlo k vyrovnání koncentrací IgG a anti-IgG

#### Výstup

Do protokolu uveďte:

- 1) Oskenovaný obrázek sklíčka s precipitačními liniemi (dodá vyučující).
- 2) Shrnutí, zda a jak se projevil rozdíl koncentrace séra s IgG a antiséra a jestli při některém ředění bylo dosaženo stejné koncentrace IgG a anti-IgG.