Protokol č.

Imunodifuze

Materiál: gel (1,2% agarosa), Borat-fosfátový pufr, automatické pipety, sklíčko, inkubátor, fyziologický roztok, destilovaná voda, varné sklo, vařič, protilátky Ab (SwaHu: Swine antibody against Human serum, HAHu: Horse Antibody against Human serum), antigeny Ag (Lyonorm, Human control serum), mikrozkumavky typu Eppendorf

Teorie: Imunodofuze je jednou z nejstarších imunochemických metod. Dnes tuto metodu nahradily v rutinních laboratořích automatizované systémy nefelometrické a turbidimetrické. Výhodou této metody je velká jednoduchost, nevýhodou velká pracnost, vyžaduje určitou zručnost a má poměrně omezený rozsah při kvantitativním měření. Princip metody je založen na tvorbě komplexů antigen-protilátka v prostředí agarozoveho gelu po difuzi.

Existuje několik modifikací této metody: např. podle **Ouchterlonyho** a podle **Manciniové**, jež jsou nejčastěji využívány.

Modifikace podle **Ouchterlonyho** je založena na difuzním protisměrném pohybu molekul antigenu a protilátky. V místě setkání antigenu a protilátky vzniká v gelu precipitát, který je důkazem přítomnosti hledaného antigenu nebo protilátky (kvalitativní stanovení).

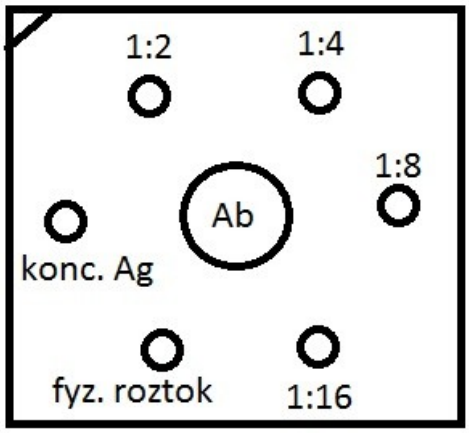
Modifikace podle **Manciniové** je založena na radiální difuzi antigenu v gelu s rozpuštěnou protilátkou nebo na radiální difuzi protilátky v gelu s rozpuštěným antigenem. V gelu vznikají precipitační prstence. Gel se nechá ve vodní lázni vytemperovat na teplotu 56°C, aby nedošlo k denaturaci protilátky. Následně se přidá protilátka, která se důkladně vmíchá do gelu (kvalitativní i kvantitativní).

Cíl: Připravit precipitační linie v gelu po difuzi protilátky a antigenu

Postup:

1. Připravte 1,2% agarosový gel (agarosa + borat-fosfátový pufr)
2. Očistěte sklíčka 95% etanolem
3. Automatickými pipetami opatrně napipetujte gel na sklíčko (2,4ml na sklíčko) a nechte gel ztuhnout
4. Pomocí odsávačky a šablony vytvořte v gelu jamky podle obrázku 3
5. Připravte si ředění antigenu 1:0, 1:2, 1:4, 1:8 a 1:16

6. Napipetujte 64µl protilátky do centrální jamky a 32µl antigenů do krajních jamek podle obrázku č.1. Ouchterlonyho destička
7. Nechte inkubovat při teplotě 37°C 24 hodin
8. Operte skla ve fyziologickém roztoku (nejvýše 2min), dále by se měla skla několik dní sušit pro dlouhodobé uchování gelu, což mi nepotřebujeme, takže sušení vynecháme
9. Barvěte amidočerní (75ml CH_3OH, 8ml CH_3COOH, 0,08g amidočerni), pak promyjte v diferenciačním roztoku (CH_3OH : CH_3COOH = 10:1)
10. Nakonec promyjte v dest. vodě



Obr. č. 1: Ouchterlonyho destička

Vyhodnocení: Ředění Ag a Ab jsou ekvivalentní tehdy, nachází-li se precipitační linie uprostřed mezi jamkami Ag a Ab.