

Protokol

Imunodifuze podle Ouchterlonyho

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

Teorie: Imunodifuze 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 agarozového gelu po difuzi.

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

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 denuraci protilátky. Následně se přidá protilátka, která se důkladně vmíchá do gelu (kvalitativní i kvantitativní).

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).

Cíl: Připravit precipitační linie určité intenzity v gelu po difuzi protilátky a antigenu a popsat děj precipitace.

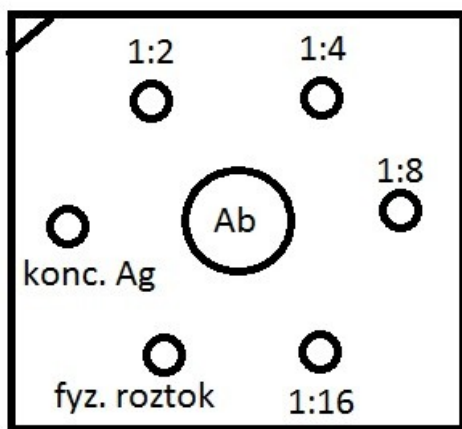
Postup:

1. Připravte 1,2% agarosový gel ve vodní lázni (agarosa + borat-fosfátový pufr) 6ml/dvojice
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 č.1
5. Připravte si ředění antigenu do krajových otvorů 1:0, 1:2, 1:4, 1:8 a 1:16

6. Napipetujte 64 μ l protilátky do centrální jamky a 32 μ l antigenů v určitém ředění do krajních jamek podle obrázku č.1. Ouchterlonyho destička
7. Nechte inkubovat při lab. teplotě 24-48 hodin
8. Operte skla ve fyziologickém roztoku (nejvýše 2min), dále by se měla skla několik dní sušit pro dlouhodobé uchování gelu, což my nepotřebujeme, takže sušení vynecháme

Barvení

9. Barvěte amidočerní (75ml CH₃OH, 8ml CH₃COOH, 0,08g amidočerní), pak promyjte v diferenciačním roztoku (CH₃OH : CH₃COOH = 10:1)
10. Nakonec promyjte v dest. vodě



Obr. č. 1: Ouchterlonyho destička

Vyhodnocení: Pokud odpovídá hledaný antigen Ag protilátce Ab, vznikne precipitační linie a naopak. Ředění Ag a Ab jsou ekvivalentní tehdy, nachází-li se precipitační linie uprostřed mezi jamkami Ag a Ab.