



ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Минздрава России
Медико-биологический факультет
Кафедра иммунологии

Методы выявления антигенов и антител

Подготовила:
Мелькова Анастасия
МБФ, 3.4.01

Иммунодиффузия в геле

- Явление иммунопреципитации в гелях широко используется в целом ряде важных методик, которые широко применяются для изучения антител, а также для обнаружения и количественного определения растворимых антигенов.

- В толще гелей существует водная фаза, через которую легко диффундирует большинство макромолекул . Когда полидетерминантный сложный антиген перемещается в зону, содержащую антитела, то при оптимальном соотношении концентраций взаимодействующих компонентов образуются видимые линии преципитации. Реакцию обычно проводят в расположенных горизонтально тонких пластинах агарового геля на стеклянных подложках. Для реакций простой и двойной диффузии антигены и антитела вносят в лунки, вырезанные в геле напротив друг друга .

Известны различные **модификации метода** иммунодиффузии:

- а) иммуноэлектрофорез (комбинация электрофоретического разделения белков по заряду с двойной диффузией и иммунопреципитацией в геле);
- б) ракетный и двумерный электрофорез (электрофоретическое разделение антигенов в геле агарозы, содержащем антитела, что ускоряет преципитацию, облегчает идентификацию антигенов и позволяет производить их количественное определение);
- в) иммунодиффузия антигена в агаровом геле, содержащем антитела (или наоборот), что приводит к образованию колец преципитации, диаметр которых пропорционален концентрации антигена (антител).

Методы диффузии в геле

- 1) Качественный - используется для определения специфичности антигенов и антител;
- 2) Полуколичественный – позволяет определять как антигены, так и антитела в моноспецифических системах.

1) Двойная диффузия в геле

- **Принцип метода:**
- Растворы антигенов и антител помещают в противоположные лунки глубиной около 1,5 мм, вырезанные в горизонтально расположенном агаровом или агарозном геле.
- Расположение лунок и расстояния между ними определяют по трафарету, подложенному под стекло. Это позволяет стандартизировать эксперименты.
- Антигены и антитела диффундируют в гель, встречаются друг с другом и образуют полосы преципитации между противоположными лунками. В целом расстояние между лунками не должно превышать 6 мм. Если все лунки одинакового размера, расстояние между ними не должно превышать двух диаметров лунки.
- Инкубация в течение ночи при 4°C.
- Наилучшие результаты получают при использовании нескольких концентраций (разведений) антигенов и антител. В случае неразведенных антисывороток концентрация антигенов, как правило, должна составлять около 1 мг/мл.

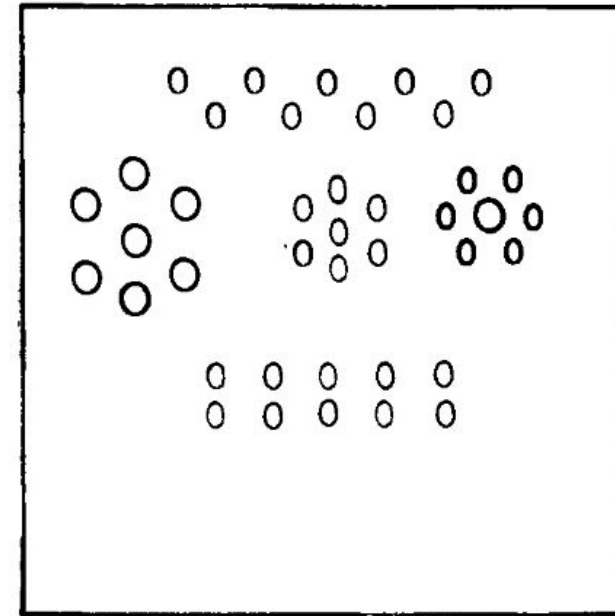


Рис. 6.2. Трафарет для реакций ДДГ. Расположение лунок можно изменять в зависимости от условий конкретного эксперимента

Применение метода

1. Важный первичный тест на преципитирующие свойства, приблизительный титр и специфичность антисывороток к растворимым антигенам.
2. Стандартный способ определения специфичности антисывороток.
3. Тест на идентичность антигенов, определение чистоты антигена и антигенных взаимосвязей между молекулами.
4. Приблизительное определение концентрации антигена.

Интерпретация результатов

- I. Важность сбалансированных эквивалентных концентраций - использование разных соотношений антиген : антитело.
- II. Множественные системы антиген: антитело и определение чистоты антигена.

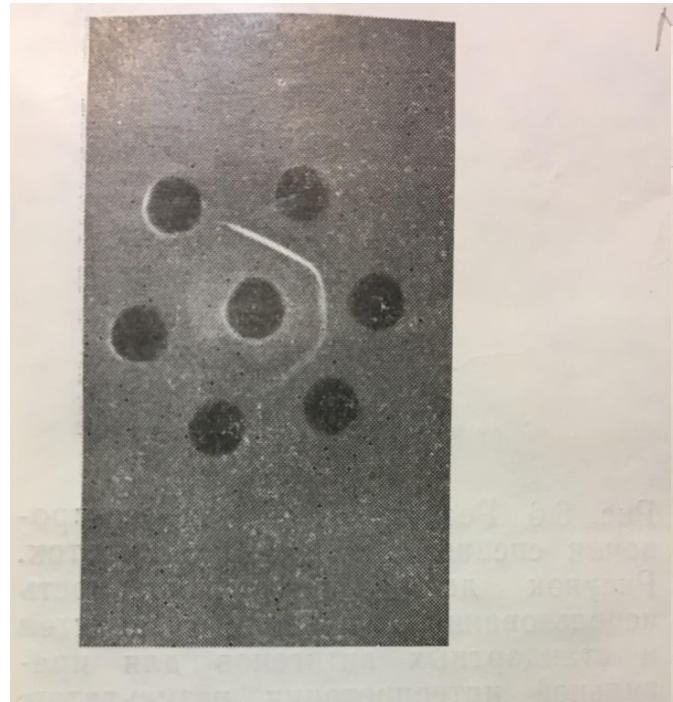


Рис. 6.3. Реакция иммунодиффузии в геле при расположении лунок в виде кольца демонстрирует, как различные соотношения антигенов и антител влияют на расположение и четкость линий преципитации. Антиген (IgG человека в концентрации 1 мг/мл) помещен в центральную лунку; антитела к IgG, исходное разведение 1:20 (верхняя правая лунка), двукратные разведения по часовой стрелке вокруг лунки антигена

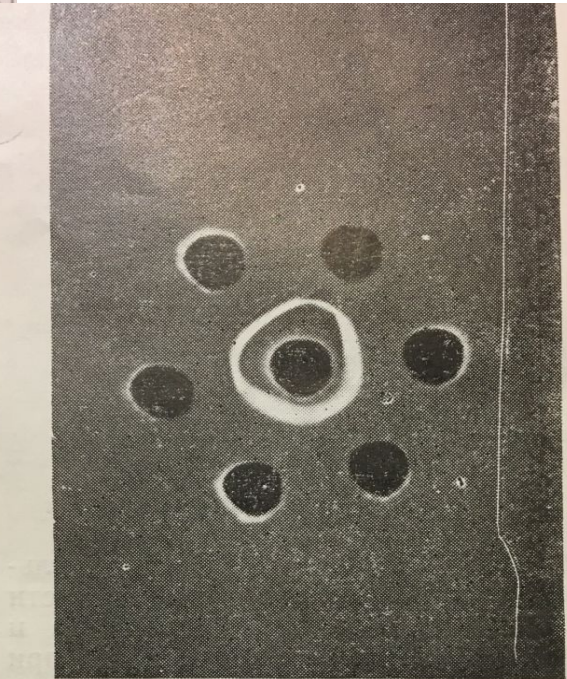


Рис. 6.4. Результат ДДГ показывает, что в одной из лунок находится чистый антиген (верхняя правая лунка), а в других он загрязнен примесями. Во всех лунках наблюдается реакция идентичности, хотя соотношение между антигеном и антителами (центральная лунка) в некоторых случаях не дает четкой линии преципитации. В центральной лунке — антисыворотка против суммарного пула сывороточных белков человека. Чистый антиген — альбумин

Интерпретация результатов

- III. Полностью, частично идентичные либо неидентичные антигены.
- IV. Специфичность антител

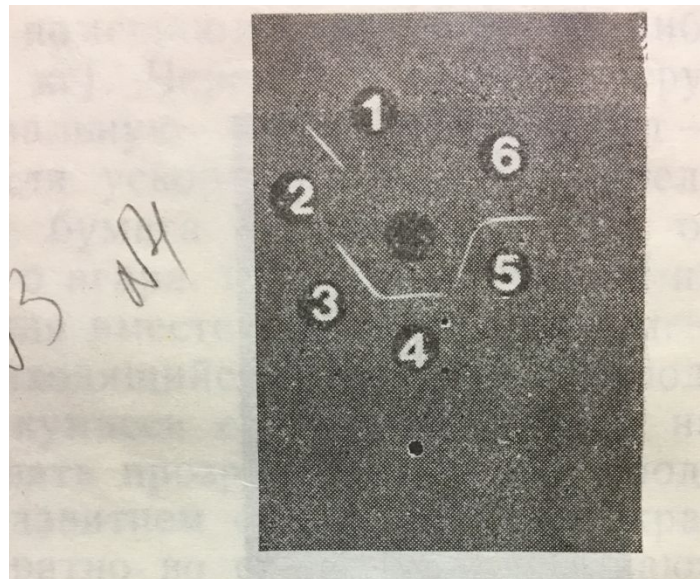


Рис. 6.6. Реакция ДДГ для тестирования специфичности антисывороток. Рисунок демонстрирует важность использования контрольных антител и стандартных антигенов для правильной интерпретации результатов.

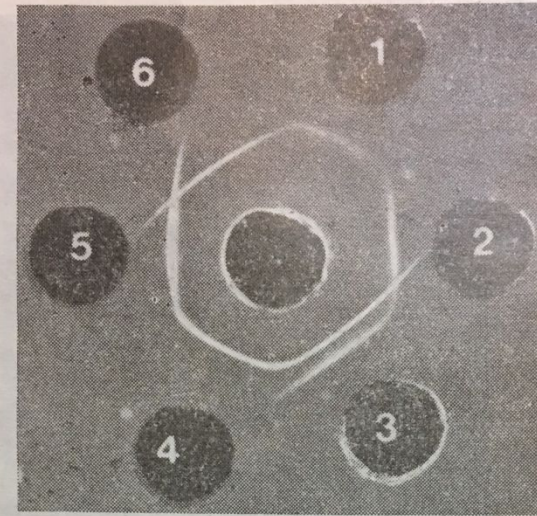
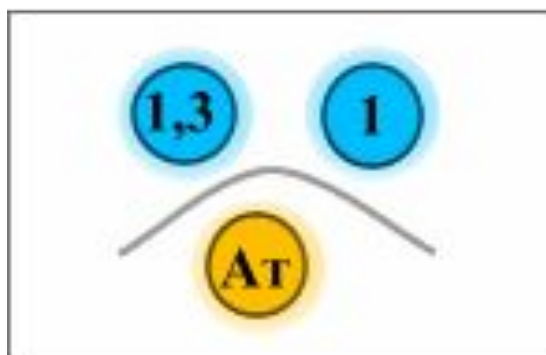


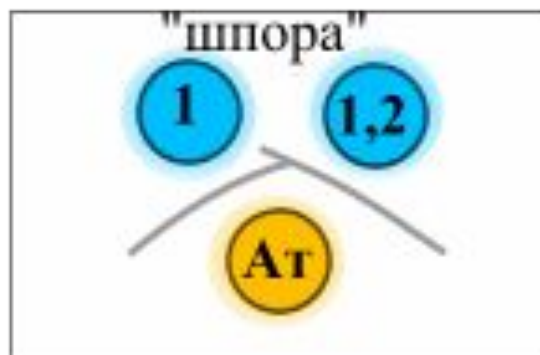
Рис. 6.5. Реакция ДДГ свидетельствует о неполной идентичности между целыми IgG (лунка 1) и $F(ab')_2$ -фрагментами (лунка 6) при взаимодействии с антителами к интактным IgG (центральная лунка). Положение шпоры указывает на то, что интактные IgG несут эпитопы, отсутствующие на $F(ab')_2$ -фрагментах. Взаимодействие антител с этими эпитопами продлевает линию преципитации. Кроме того, линии преципитации свидетельствуют о неидентичности между сывороточным альбумином человека (лунка 5) и $F(ab')_2$ -фрагментами (лунка 6), а также между альбумином, смешанным с IgG (лунка 3) и IgG (лунка 2). IgG в лунках 1, 2 и 3 и альбумин в лунках 3, 4 и 5 полностью идентичны. В центральной лунке — антитела к IgG и альбумину. Две линии преципитации напротив лунки 3 указывают на присутствие в ней обоих антигенов

1. Идентичные
эпитопы
антигенов



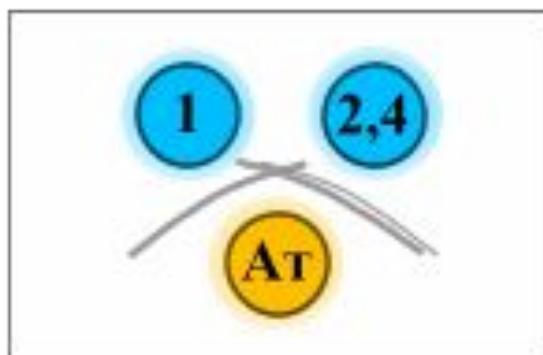
Анти-1

2. Частично
идентичные
эпитопы
антигенов



Анти-1,2

3. Неидентичные
антигены



Анти-1,2,4

Преимущества и недостатки

- **Преимущества:** единственный в своем роде, уникальный и простой метод изучения антигенных взаимосвязей между молекулами и специфичности антител.
- **Недостатки:**
 - а) относительно низкая чувствительность по сравнению с непрямými методами, например реакциями агглютинации и иммуноферментными тестами
 - б) при исследовании смесей антигенов методом ДДГ часто наблюдаются перекрывающиеся и накладывающиеся друг на друга линии преципитации.

2) Радиальная иммунодиффузия (РИД)

- **Принцип метода**

Молекулы в растворе, помещенные в лунки агарового геля, радиально диффундируют и образуют иммунные комплексы с комплементарными молекулами антител или антигенов, содержащихся в жидкой фазе агара.

- В стандартной РИД агар содержит моноспецифические антитела, а радиально диффундирующий антиген, встречаясь с ними, образует кольцо преципитации.
- Реакция протекает в течение нескольких дней, причем время проведения определяется молекулярными размерами антигена. На практике, если молекулы имеют размер IgG или менее, для построения количественной кривой с использованием стандартных разведений антигена достаточно 24-часовой инкубации при 4°C или 16-часовой при комнатной температуре.
- *Количественная* оценка основана на том, что размеры кольца преципитации прямо пропорциональны количеству антигена в лунке (при равных объемах препаратов в лунках).
- Аналогичный подход можно использовать для сравнения титра исследуемой антисыворотки с контрольной – обратная реакция радиальной иммунодиффузии (ОРИД), когда антисыворотка из лунок диффундирует в агар, содержащий антиген.

Применение

- ***I. Определение индивидуальных антигенов в растворе (РИД).***
- Обычно используют для определения сывороточных белков, в частности иммуноглобулинов при подозрении на множественную миелому или в случае недостаточности иммуноглобулинов. Можно определять и компоненты комплемента.
- ***II. Титрование антисывороток с использованием контрольных реагентов (ОРИД).***
- Наиболее удобен для количественного определения IgG, полученного путем хронической иммунизации лабораторных животных. Такие антитела должны образовывать с антигеном одно кольцо преципитации. Кроме того, метод можно использовать и для повседневного тестирования сывороток пациентов с целью выявления антител к инфекционным агентам. Правда, в ряде случаев чувствительность метода недостаточна.

Количественная оценка результатов

- ***I. Измерение колец преципитации на влажных и окрашенных пластинах.***
- Во многих случаях можно считывать результаты с еще влажных гелей. Измерение проводят с помощью окулярного микрометра, прикладываемого к обратной стороне пластины. Пластины рассматривают на темном фоне при косом освещении.
- Высушенные пластины можно измерять с помощью окулярного микрометра или специальных линеек, которые поставляются некоторыми производителями готовых пластин для РИД.

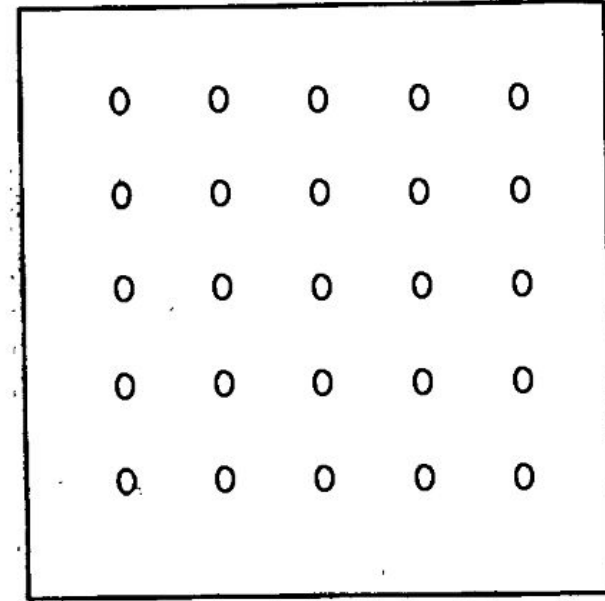
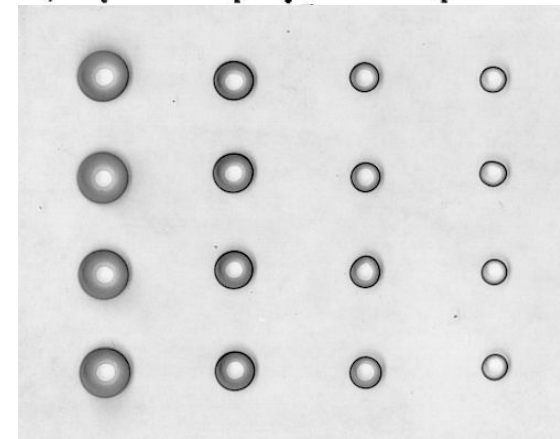
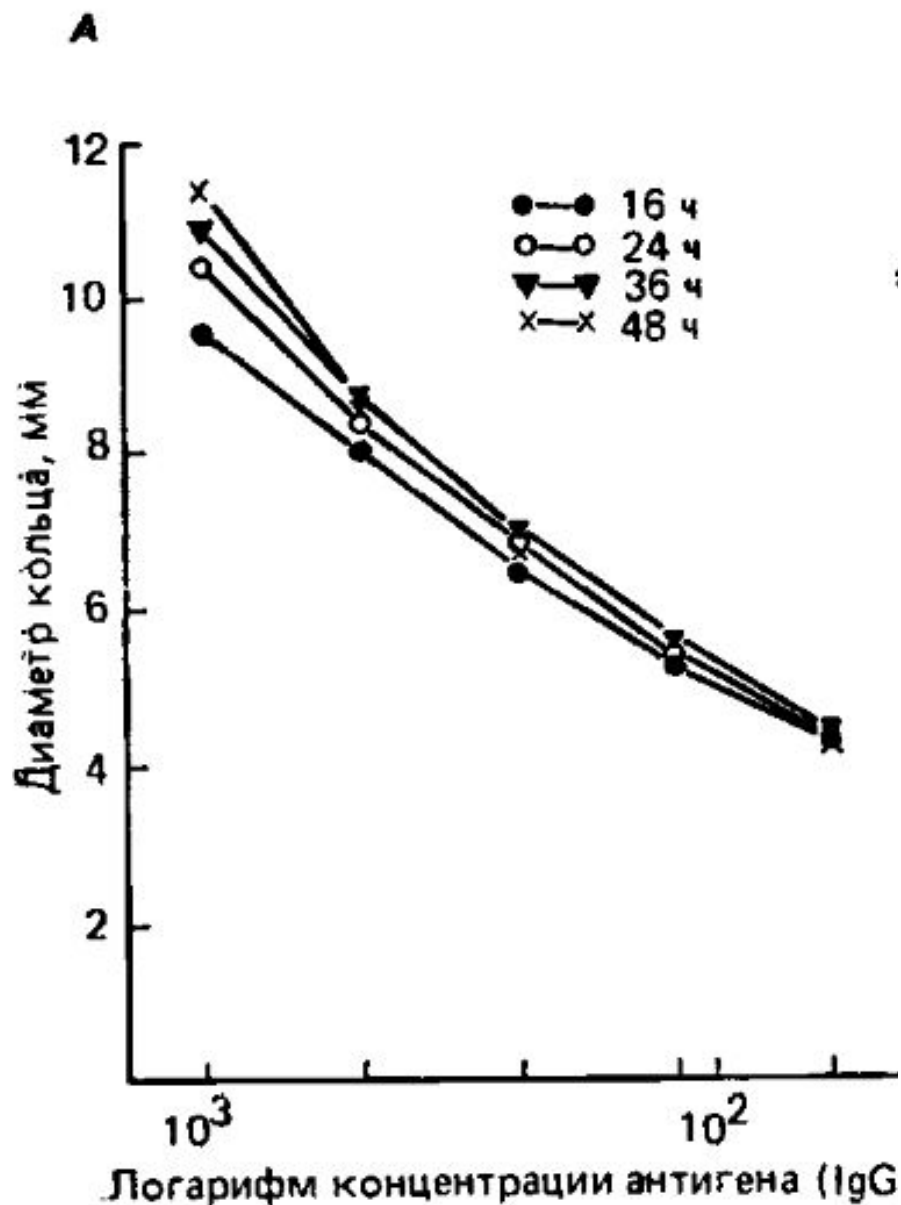


Рис. 6.7. Трафарет для реакций РИД и ОРИД. Размеры стекла 8×8 см, лунки образуют квадрат со

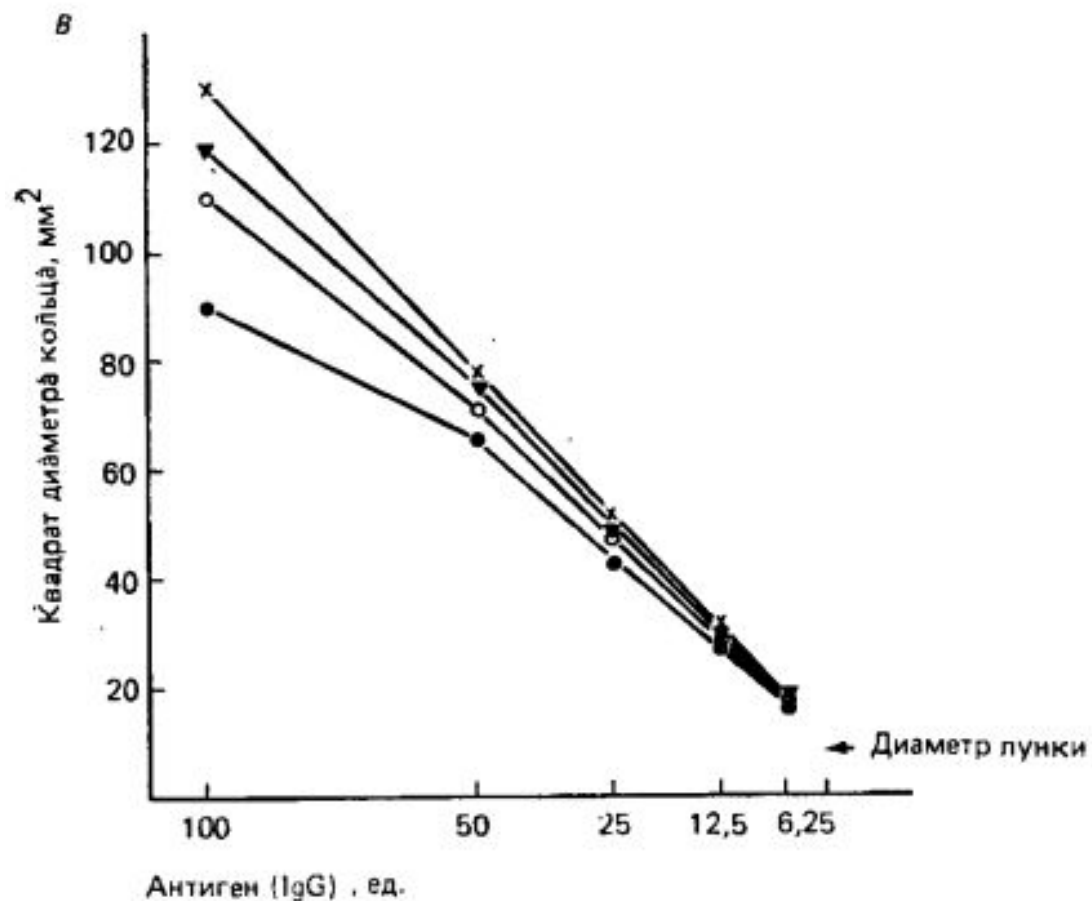
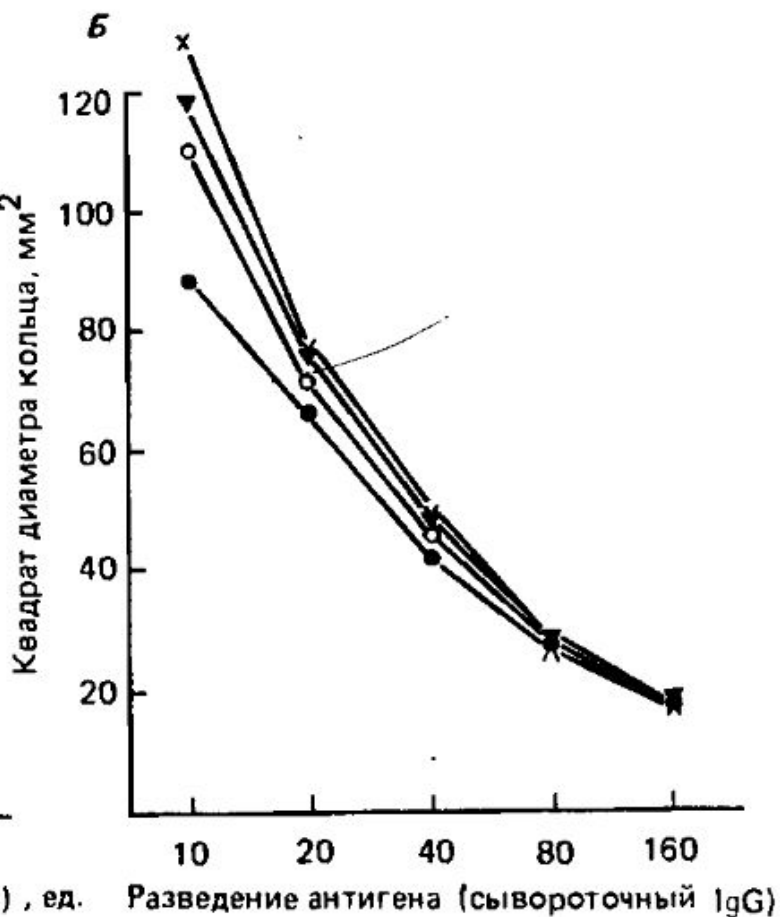


- **II. Калибровочные кривые**
- Диаметр колец находится в линейной зависимости от концентрации антигена только в том случае, если реакция продолжалась несколько дней и закончилась полностью. Если результаты учитывают через 24 ч после начала реакции, график зависимости диаметра колец от логарифма концентрации антигена. (рис.А).



• II. Калибровочные кривые

- Можно построить график зависимости квадратов диаметра колец (в линейных координатах) от двукратных разведений стандарта (рис.Б) или от убывающих концентраций антигена (рис.В). Все три метода дают одинаково точные значения для опытных образцов.



- **III. Точность, разрешающая способность и чувствительность.**

- Для уменьшения ошибки и приближения результатов к реальным значениям, желательно подбирать разведения таким образом, чтобы значения, полученные для опытных образцов, попадали на середину калибровочной кривой. Из двух разведений образца для определения его концентрации следует выбирать то, которое дало результат, лежащий ближе к центру калибровочной кривой, чем и объясняется необходимость использования двух разведений.

- Чувствительность метода поднимается двояко. Во-первых, это возможность по данной калибровочной кривой уловить различия в концентрациях образцов.

Результат зависит от того, с какой ошибкой найдены точки кривой, а также от ее наклона и линейности. Во-вторых, чувствительность определяется минимальным количеством антигена или антител, которое можно определить данным методом. В РИД этот параметр зависит от размера лунок, случайных ошибок, а также от того, насколько видимыми и четкими получились кольца преципитации при небольших концентрациях образцов.

Преимущества и недостатки

- **Преимущества:**

- Требуется минимальное оборудование и дает легко стандартизируемые результаты как для антигенов, так и для антител.
- Удобный и распространенный метод определения многих антигенов, концентрация которых удовлетворяет пределам чувствительности.
- Как для РИД, так и для ОРИД необходимо иметь моноспецифические преципитирующие антисыворотки, однако стандартные и опытные образцы антигенов не обязательно должны быть очищены.
- Методом РИД невозможно определить изменения свойств антигена (структуры, целостности эпитопов, гомогенности), но зато антигенные тесты не подвержены влиянию рI (по сравнению с ракетным и двумерным ИЭФ).
- Пластины, на которых поставлена РИД, удобны для хранения

- **Недостатки:**

- Главный недостаток РИД - это время, необходимое для получения количественных результатов.
- Чувствительность РИД невелика (около 5 мкг/мл)

Иммуноэлектрофоретические методы

- Методы, совмещающие электрофоретическую миграцию антигенов в агарозе с последующей иммунопреципитацией в геле. В результате первого процесса происходит частичное разделение смеси антигенов, поскольку скорость их миграции в геле зависит от суммарного заряда при данном рН буферного раствора. Кроме того, отрицательно заряженные молекулы быстро мигрируют в гель, содержащий антитела, что ускоряет преципитацию и сводит к минимуму латеральную диффузию.

Известны *четыре* широко распространенных модификации иммуноэлектрофореза.

Они незаменимы для качественного и (или) количественного определения антигенов (как индивидуальных, так и находящихся в смеси) и значительно облегчают определение специфичности антисывороток.

Иммуноэлектрофорез (ИЭФ)

- **Принцип метода**
- В пластине агарозного геля вырезают лунки и расположенные между ними канавки (рис. 6.10). В лунки вносят растворы антигенов и накладывают на агарозу с противоположных сторон фители, соединяющие ее с электродным буфером в двух резервуарах. После включения тока антигены начинают мигрировать из лунок вдоль геля и разделяются. По окончании электрофореза в канавки, параллельные направлению миграции антигенов, вносят антисыворотки. Антигены и антисыворотки диффундируют в геле навстречу друг другу, и в месте их взаимодействия образуются дуги преципитации (рис. 6.11). Идентичность антигенов можно определить, используя известные антигены и антитела (рис. 6.1.2,А).
- **Принцип интерпретации результатов** такой же, как и для методов диффузии в геле.

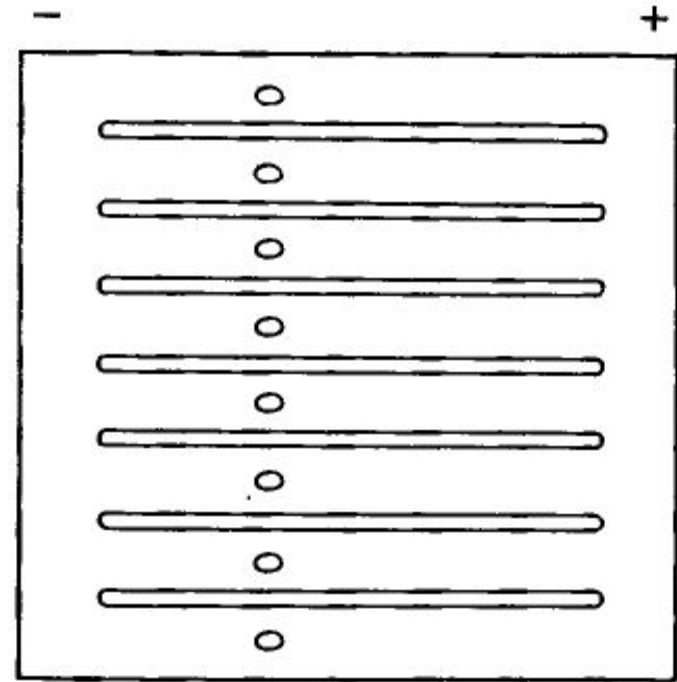


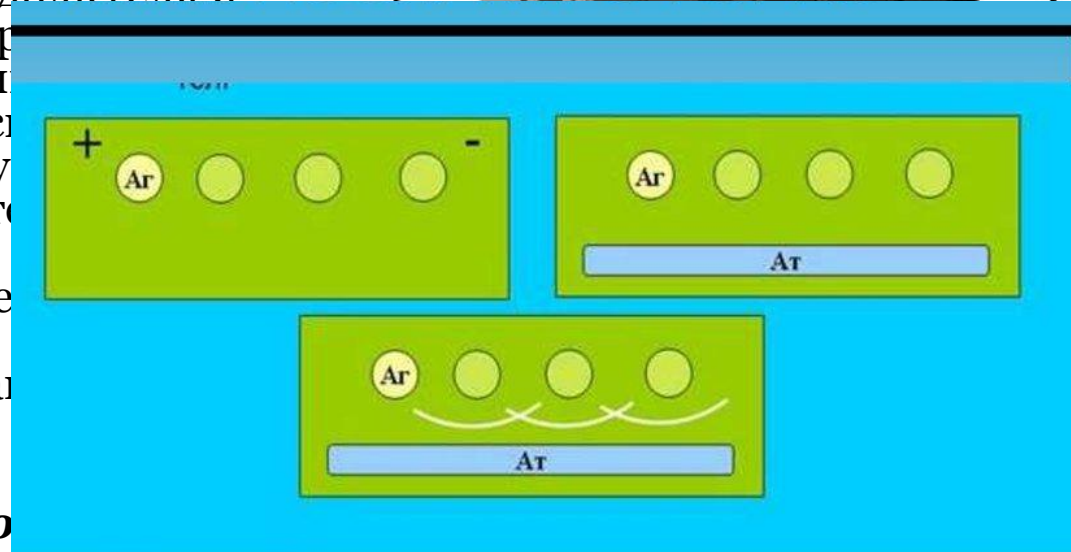
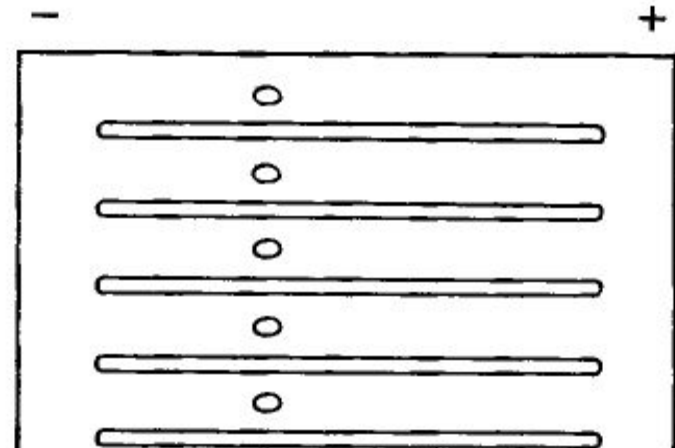
Рис. 6.10. Трафарет для лунок и канавок в случае проведения иммуноэлектрофореза на пластине 8×8 см. Показано расположение лунок для агарозы с низкой величиной электроэндоосмоса, когда большинство антигенов мигрирует к аноду (например, белки сыворотки). При использовании гелей с высокой величиной электроэндоосмоса для одновременного исследования «анодных» и «катодных» антигенов, лунки можно сместить к центру пластины

Иммуноэлектрофорез (ИЭФ)

- **Принцип метода**

- В пластине агарозного геля вырезают лунки и расположенные между ними канавки (рис. 6.10). В лунки вносят растворы антигенов и накладывают на агарозу с противоположных сторон фитили, соединяющие ее с электродным буфером в двух резервуарах. После включения тока антигены начинают мигрировать из лунок вдоль геля и разделяются. По окончании электрического тока канавки, параллельные направлению миграции антигенов, вносят антисыворотки. Антигены и антисыворотки диффундируют в геле навстречу друг другу, и в месте взаимодействия образуются дуги преципитации (рис. 6.11). Идеальное количество антигенов можно определить, используя известные антигены и антисыворотки (рис. 6.1.2, А).

- **Принцип интерпретации результатов** как и для методов диффузии в геле



дуги преципитации.

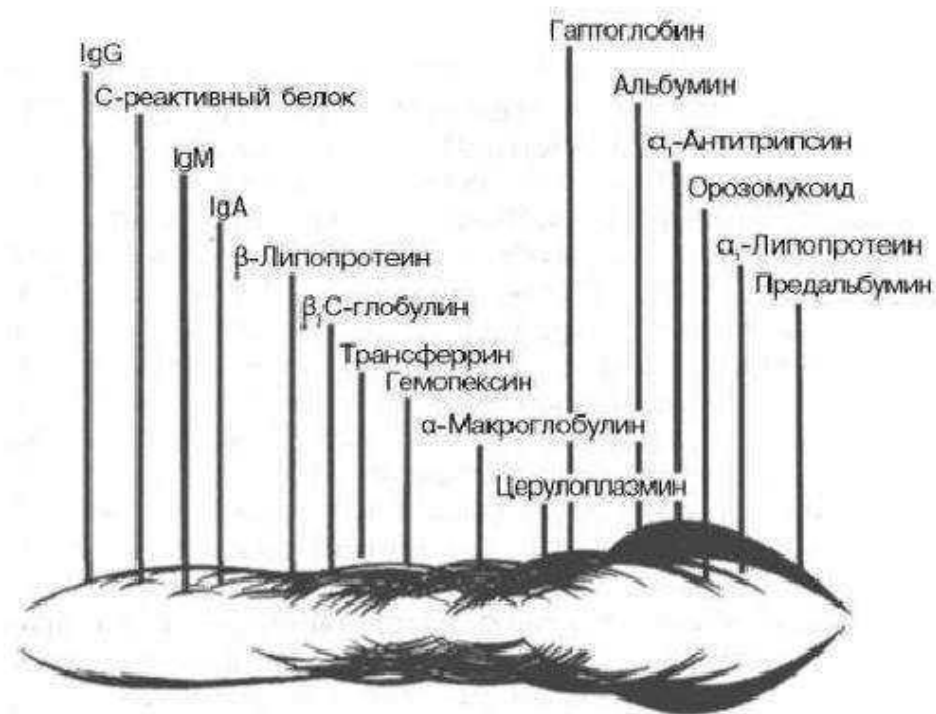


Рис. 17.1. Иммуноэлектрофореграмма белков сыворотки крови человека (по Генри).

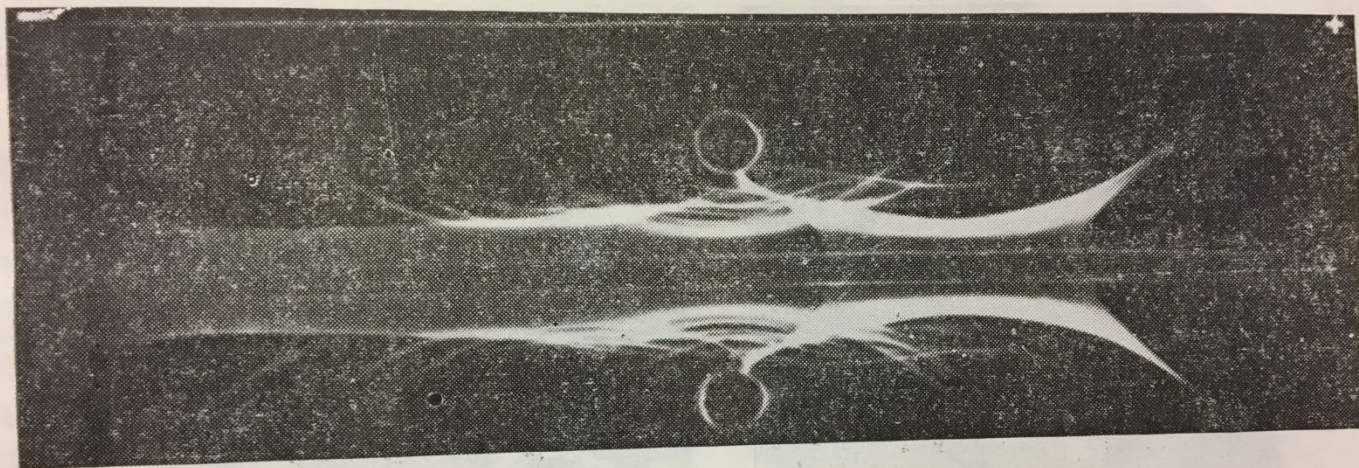


Рис. 6.11. Иммуноэлектрофореграмма сыворотки морской свинки, полученная с помощью полиспецифической кроличьей антисыворотки (агар с высокой величиной электроэндосмоса)

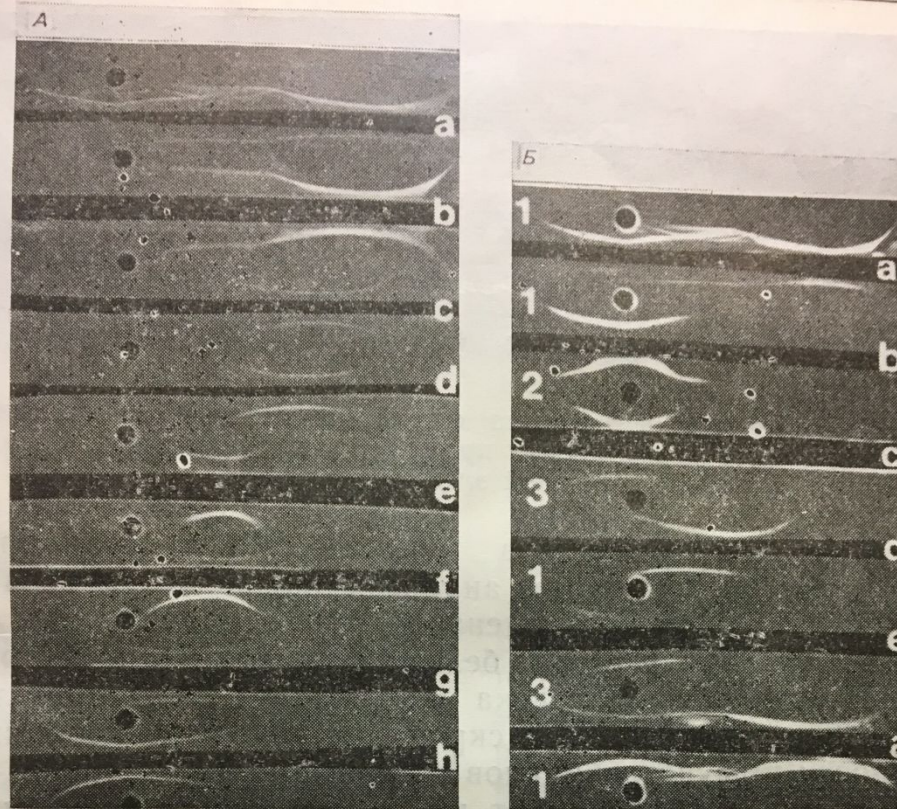


Рис. 6.12. Примеры иммуноэлектрофореза. А. Электрофореза некоторых сывороточных белков человека, полученная с помощью набора моноспецифических антисывороток. Все лунки содержат нормальную сыворотку человека. В канавках — специфические антисыворотки к (а) суммарному пулу сывороточных белков; (б) сывороточному альбумину; (в) α -1-антитрипсину; (г) орозомукоиду; (д) С3-компоненту комплемента; (е) трансферрину; (ж) IgA; (з) IgG. Б. Выявление миеломных белков IgG κ и IgA λ в сыворотках двух пациентов с помощью соответствующих антисывороток. **Лунки:** (1) нормальная сыворотка человека, (2) сыворотка больного IgG κ -миеломой; (3) сыворотка больного IgA λ -миеломой. **Канавки:** антисыворотки к (а) цельной человеческой сыворотке; (б) IgG (Fc-специфическая); (в) легким цепям κ ; (г) IgA (Fc-специфическая); (д) легким цепям λ . Миеломные белки в сыворотке можно обнаружить по характерному изгибу дуги преципитации в форме лука, которую образует патологический иммуноглобулин благодаря высокой концентрации гомогенного белка. Кроме того, в зоне преципитации миеломного белка гомогенные легкие цепи концентрируются в области изгиба и в результате линия преципитации легкой цепи выглядит укороченной

Применение

- Иммуноэлектрофорез в первую очередь представляет собой качественный метод исследования антигенов и специфичности антител.

I. Антигены.

- Метод применяется для:
 - 1) определения антигенного состава смеси - это, в частности, важно при очистке антигенов, поскольку позволяет определить природу примесей
 - 2) для анализа гетерогенности и гомогенности индивидуальных антигенов. Он является стандартным методом иммунохимического анализа широкого спектра белков. Метод широко применяется при исследовании антигенов инфекционных агентов, белков плазмы и других физиологических жидкостей человека и животных. Он эффективно используется для первичного скрининга при исследовании недостаточности иммуноглобулинов и комплемента.

II. Антитела.

- Обычный тест на определение специфичности антисывороток. В качестве контроля эффективны антисыворотки против суммарного пула сывороточных белков.

Преимущества и недостатки ИЭФ

- **Преимущества:**
- *Качественный* анализ смесей антигенов, например, сывороток. С помощью данного метода можно идентифицировать до 20 компонентов смеси.
- Удастся исследовать и аномалии индивидуальных белков, поскольку на стадии разделения обнаруживаются нарушения электрофоретической подвижности (например, гомогенность ρI миеломных белков), существенные отклонения от нормальной концентрации (определяемые по интенсивности дуг преципитации) и изменения субъединичного состава (например, искажение соотношения легких цепей каппа и лямбда у миеломных белков). Такие тонкие изменения трудно обнаружить с помощью простой диффузии в геле.
- Осторожно подбирая агарный/агарозный носитель, состав буфера и его рН, можно исследовать молекулы с самыми различными зарядами.
- **Недостатки:**
- Ограничен определением только таких молекул, концентрация которых в растворе не менее или равна 5 мкг/мл, а размеры не препятствуют образованию преципитатов.

Ракетный иммуноэлектрофорез

Позволяет быстро оценить концентрацию индивидуального антигена в реакции с моноспецифической антисывороткой.

Принцип метода

Индивидуальные антигены электрофоретически мигрируют из лунок, расположенных у основания геля, в агарозу, содержащую специфические антитела. С помощью специальных условий обеспечивается миграция антигена к аноду и неподвижность антител (IgG). По мере связывания антител мигрирующим антигеном образуются заостренные дуги преципитации (ракеты).

- Высота ракет пропорциональна концентрации антигена. Если на пластину нанесено несколько разведений стандартного антигена, то концентрации неизвестных (опытных) образцов легко определить, сравнивая их со стандартной кривой.
- ***Применение***
теста ограничено антигенами, мигрирующими при pH 8,6 к аноду, но, с другой стороны, это очень быстрый метод (1-2 ч) количественного определения таких антигенов.

• **Воспроизведение метода**

- 1. Подготавливают пластину агарозного геля, содержащего антитела, как для осуществления РИД .
- 2. Когда гель застынет (предпочтительнее оставить на ночь при 4°C, для того чтобы антитела равномерно распределились в геле), помещают пластину на трафарет (рис. 6.13) и вырезают перфоратором ряд из 11 лунок объемом 5 мкл.
- 3. Готовят несколько разведений стандартного антигена - для большей точности рекомендуется использовать серию из пяти разведений: от 1 мг/мл до 10 мкг/мл. Подготавливают три опытных образца (на одну пластину), в двух разведениях, отличающихся друг от друга в 8 раз. Выбирают случайным образом лунки для стандартных и опытных образцов и вносят в них по 5 мкл каждого образца.
- 4. Немедленно начинают электрофорез. Верхний край пластины должен быть присоединен к аноду. При напряжении 80-100 В (10-12 В/см) электрофорез должен закончиться через 1-2 ч. Время окончания определяют по ракете наибольшей концентрации стандартного антигена. Когда ее пик заострится, ток выключают.

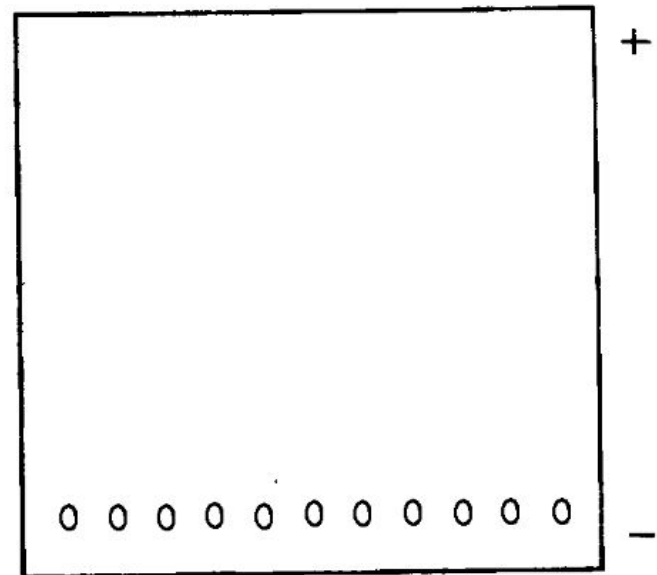


Рис. 6.13. Трафарет для проведения ракетного ИЭФ на пластине 8×8 см.

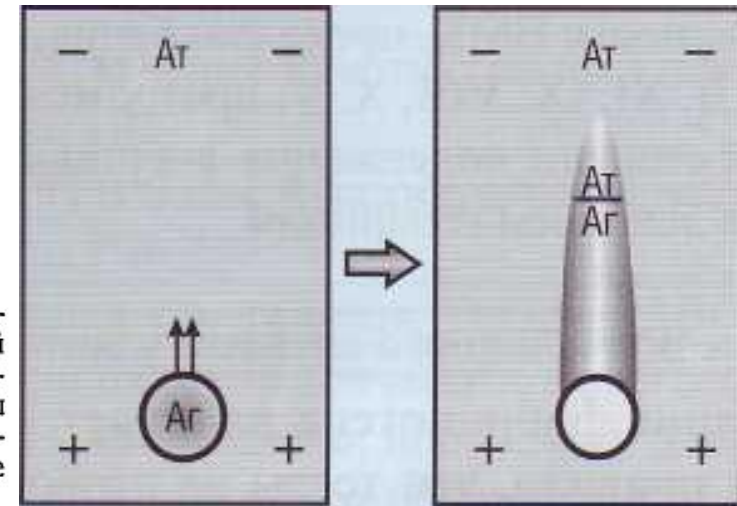
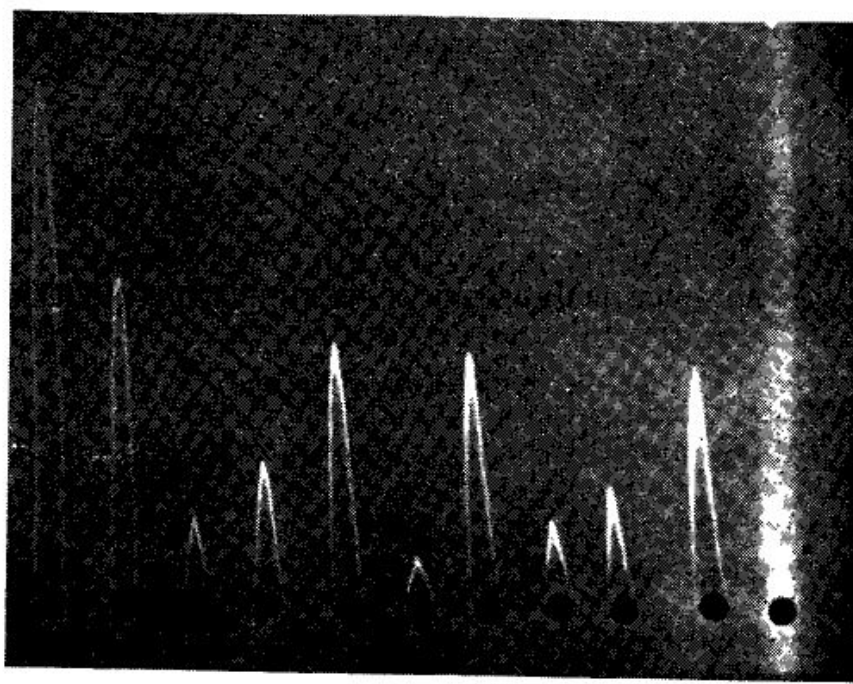
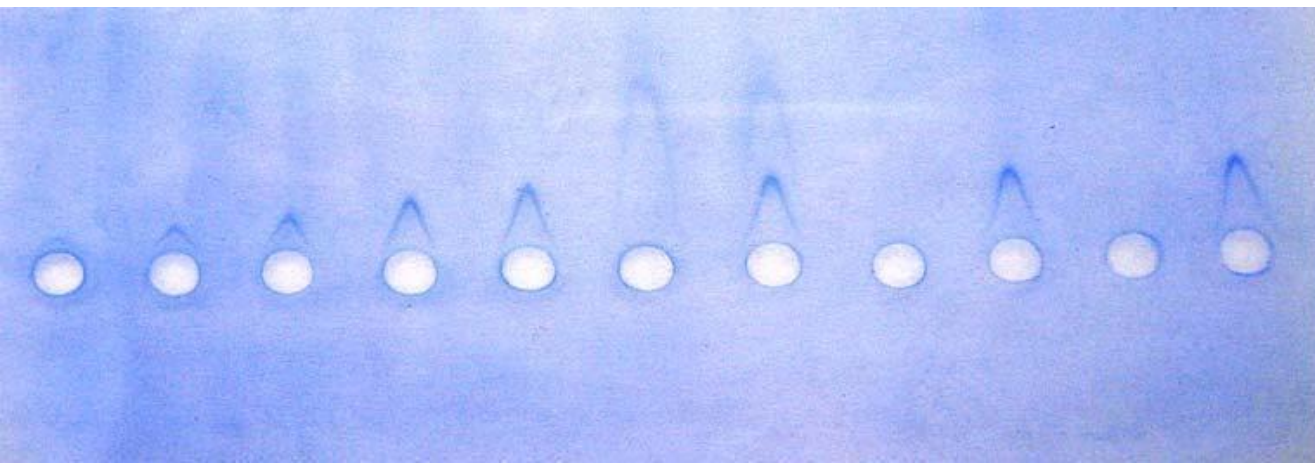


Рис. 6.14. Ракетный ИЭФ. Иммуноэлектрофореграмма, полученная при использовании пяти разведений стандартного антигена и двух разведений трех неизвестных сывороток. Цель эксперимента — определение сывороточного альбумина человека. К агарозному гелю (9,8 мл) добавили 80 мкл IgG-фракции антител овцы к альбумину. Использовали двукратные разведения стандартного антигена от 500 мкг/мл до 31,25 мкг/мл. Исследуемые сыворотки разведены в 250 и 500 раз



Интерпретация результатов

- Во избежание латеральной диффузии антигена электрофорез начинают немедленно после нанесения образцов. При большой скорости разделения ширина ракет не превышает диаметра лунок, что увеличивает точность определения. Концентрации стандартов выбирают таким образом, чтобы образовавшиеся ракеты не выходили за пределы пластины и ракета стандарта наибольшей концентрации занимала всю длину геля.
- Двойные или множественные ракеты указывают на то, что антисыворотка не моноспецифична

Количественная обработка результатов

- 1. Для быстрого получения результатов можно измерить высоту ракет, положив гель на стекло с подсветкой. Ракеты измеряют от вершины до верхнего края лунки. Если имеется достаточно времени, гель промывают 2-3 дня в 0,85%-ном растворе NaCl, затем в дистиллированной воде, высушивают и окрашивают, а затем проводят измерение.
- 2. Для определения количества антигена в неизвестных образцах строят калибровочную кривую, откладывая значения высоты пиков от концентраций стандартного антигена. Неизвестные концентрации определяют с помощью данной кривой.

Преимущества и недостатки

- **Преимущества:**

- Быстрое получение результатов.

- **Недостатки:**

- Ракетный ИЭФ применим только к тем молекулам, которые обладают средним или сильным отрицательным зарядом при рН 8,6, что исключает возможность определения иммуноглобулинов, для которых нужно подбирать специальные электролиты и агар.

Отрицательный заряд исследуемых иммуноглобулинов можно увеличить карбамилированием как опытных, так и стандартных сывороток. Это достигается следующим образом:

1. Добавляют к двум объемам 2М КСНО один объем сыворотки.
 2. Инкубируют при комнатной температуре 6-18 ч.
- На практике удобнее определять иммуноглобулины и комплемент с помощью РИД.

Перекрестный иммуноэлектрофорез

- **Принцип метода**

Данный метод совмещает в себе электрофоретическое разделение антигенов в одном направлении на первой стадии и принцип ракетного ИЭФ в другом направлении (под углом 90°) на второй стадии. Разделенные антигены мигрируют в агарозу с полиспецифическими антителами и образуют узор из ракет.

- **Области применения**

- Метод имеет большое аналитическое значение для исследования *состава* антигенов и, кроме того, обладает некоторыми чертами *количественных* подходов.
- Он очень полезен для тестирования чистоты антигенов, мигрирующих к аноду, а также специфичности антисывороток.
- Таким образом, данный метод можно использовать для очистки комплексов антиген - антитело и пики использовать для иммунизации.
- Сравнивая антигенные пики на пластинах с известными стандартами, можно производить количественную оценку смесей антигенов. Это позволяет, в частности, определить изменения состава сыворотки при заболевании.
- Метод можно использовать и для проверки специфичности антисывороток, внесенных в гель для осуществления второго этапа.

- ***Воспроизведение метода***

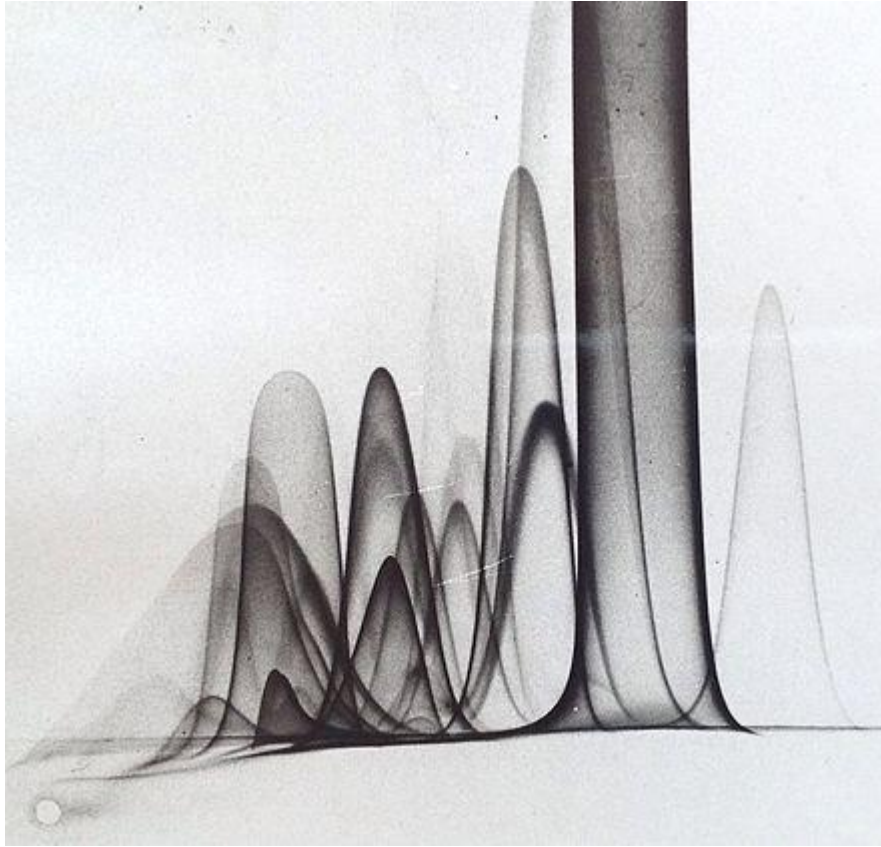
- *1. Первое направление.*

1. Приготавливают агарозный гель на барбиталовом буфере, как в случае ИЭФ и ДДГ
- 2. С помощью трафарета разрезают гель на полоски шириной 1 или 1,5 см и в указанных местах вырезают лунки.
- 3. Вносят в лунки антигены и проводят электрофорез. Когда бром-феноловый синий окажется на расстоянии 1 см от анодного края пластины, выключают ток.
- 4. Немедленно переносят полоску с разделенными антигенами на другую, стеклянную пластину. Пластина должна быть теплой. Полоску геля укладывают на край пластины, а на остальную поверхность наносят 8,5 мл заранее подготовленной смеси агарозы с антителами при 56 °С. Новый гель должен плотно соединиться с пластиной первого. Эту стадию следует выполнять как можно быстрее, чтобы свести к минимуму диффузию зон разделенных антигенов в переносимой полоске геля.

- II. Второе направление.

1. После застывания пластину геля переносят на охлаждаемую поверхность камеры для электрофореза, так чтобы пластина первого геля была соединена с катодным фитилем (т.е. второй электрофорез проводят под углом 90° к первому). Второй этап электрофореза рекомендуется проводить при напряжении 20 В (2,5 В/см) в течение ночи (16 ч). Если разделяемые антигены предполагается использовать для иммунизации, электрофорез должен продолжаться 24-48 ч.

- 2. Тщательно промывают гели в 0,85%-ном растворе NaCl и дистиллированной воде, высушивают под прессом и окрашивают. Для подготовки антигенов к иммунизации отмытый гель помещают на подсветку, вырезают нужный пик преципитации и вымачивают его в 0,85%-ном растворе NaCl - 1-2 нед.



Двумерный ИЭФ позволяет продемонстрировать свойства сбалансированной полиспецифической антисыворотки к белкам сыворотки человека

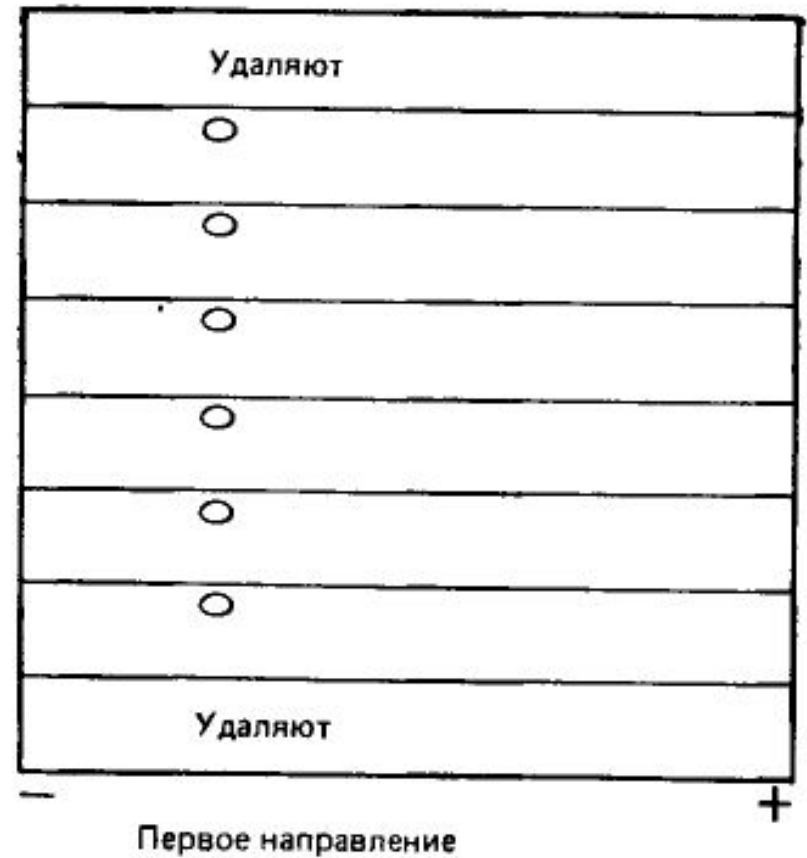


Рис. 6.15. Перекрестный иммуноэлектрофорез. Трафарет пластинны 8×8 см для электрофоретического разделения антигенов в первом направлении.

Преимущества и недостатки

- **Преимущества:**

- С помощью одних и тех же антисывороток перекрестный ИЭФ позволяет выявить большее число антигенов, чем простой ИЭФ.
- Возможность очистки антигенов.
- Наибольшая ценность перекрестного ИЭФ заключается в том, что он позволяет определять специфичность антител в неденатурирующих антигены условиях.

- **Недостатки:**

- В то же время электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии ДСН с последующим Вестерн-блоттингом и иммунохимическим окрашиванием хотя и обладает очень высокой чувствительностью, однако позволяет обнаружить только те антигенные эпитопы, которые не изменяются после денатурации.

Встречный иммуноэлектрофорез

- **Принцип метода**

Антигены, значение pI которых при pH 8,6 больше, чем у антител, находясь в геле, обладающем высокими электроэндоосмотическими свойствами, способны достаточно быстро мигрировать к аноду навстречу антителам, которые перемещаются из противоположной лунки к катоду.

- Использование этого явления позволяет быстро получить линии преципитации между лунками с антигенами и антителами при условии, что они внесены в соответствующих пропорциях.

- **Применение:**

- Встречный ИЭФ - очень чувствительный и быстрый метод определения как антигенов, так и антител.
- Он широко применяется для выявления:
 - инфекционных антигенов в физиологических жидкостях (например, антигенов вируса гепатита В)
 - изменений концентрации сывороточных белков (например, α -фетопротеина)
 - для тестирования антител к целому ряду антигенов, мигрирующих к аноду.
- Чувствительность метода достигает 400 нг/мл.

- **Воспроизведение метода**

1. Готовят обычным способом пластины геля, выбрав соответствующую марку агара.
2. Вырезают в геле лунки, используя трафарет (рис. 6.16). Обычно вырезают два ряда лунок диаметром 2 мм, находящихся на расстоянии 6 мм друг от друга. В ряд лунок, расположенных ближе к катодному краю пластины, вносят антигены (контрольные или исследуемые). В другой ряд лунок вносят по 5 мкл антител (исследуемые сыворотки или контрольные антитела).
3. Подключают ток, так чтобы антигены мигрировали к аноду. Чтобы создать оптимальные условия для преципитации хотя бы в одной паре лунок, следует использовать разные разведения антигенов и антител.
4. Проводят электрофорез при стабилизированном токе, равном 1,5 мА/см. Результаты должны быть видны через 30 мин.
5. Чтобы повысить чувствительность определения, можно отмыть, высушить и окрасить

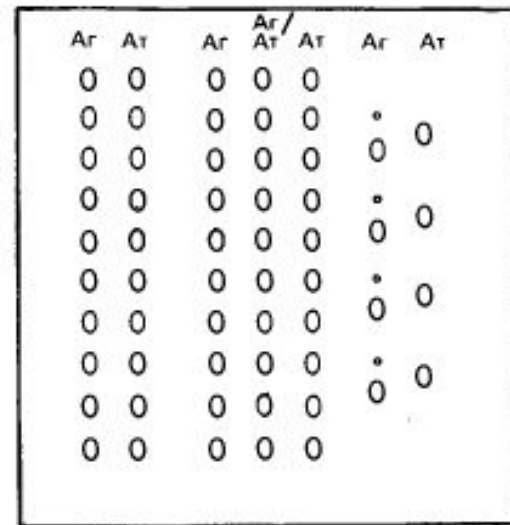
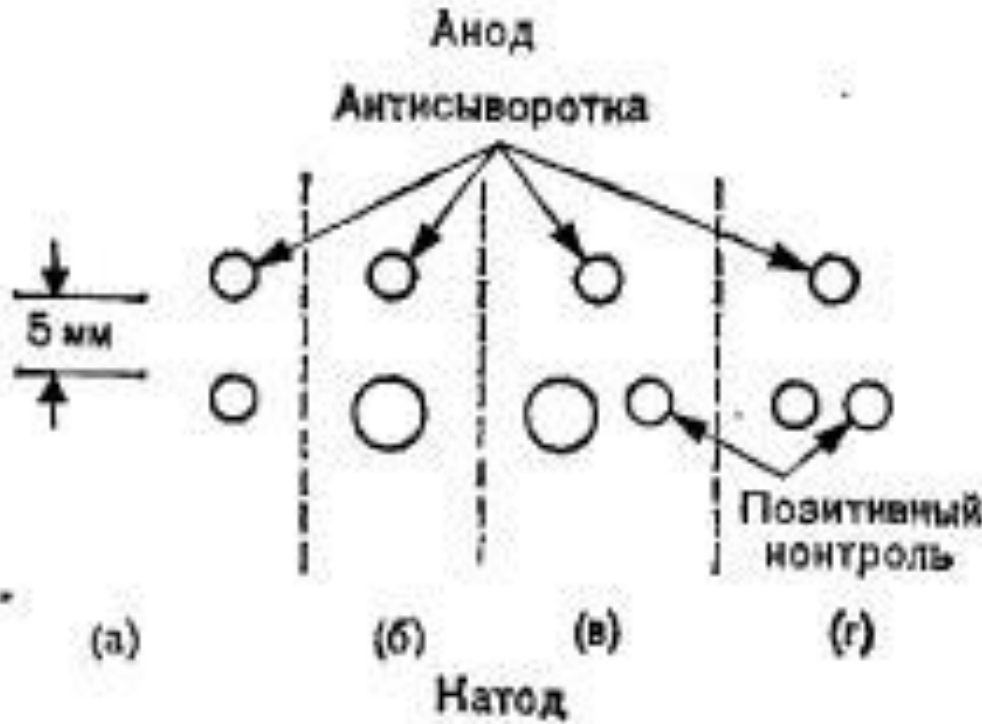


Рис. 6.16. Трафарет пластины 8×8 см для встречного иммуноэлектрофореза в агаре с использованием буферной системы, в которой антитела мигрируют к катоду, а антигены — к аноду. Два вертикальных ряда лунок слева предназначены для тестирования антигенов или антител в зависимости от того, имеются ли в наличии стандартный антиген (тест на антитела) или контрольные антитела (тест на антигены). Три вертикальных ряда в центре используются для одновременного определения антигенов и антител в опытных образцах сыворотки. В левый вертикальный ряд вносят стандартный антиген, в правый — контрольные антитела, а в центральный — исследуемую сыворотку. Лунки, расположенные справа, предназначены для определения антигенов, которые могут содержаться в образцах в различных концентрациях. Если в маленькие лунки вносить небольшие объемы (1—2 мкл), то по соотношениям, оптимальным для преципитации, можно определить очень высокие концентрации антигенов

- В
- 1.
- 2.
- 3.
- 4.

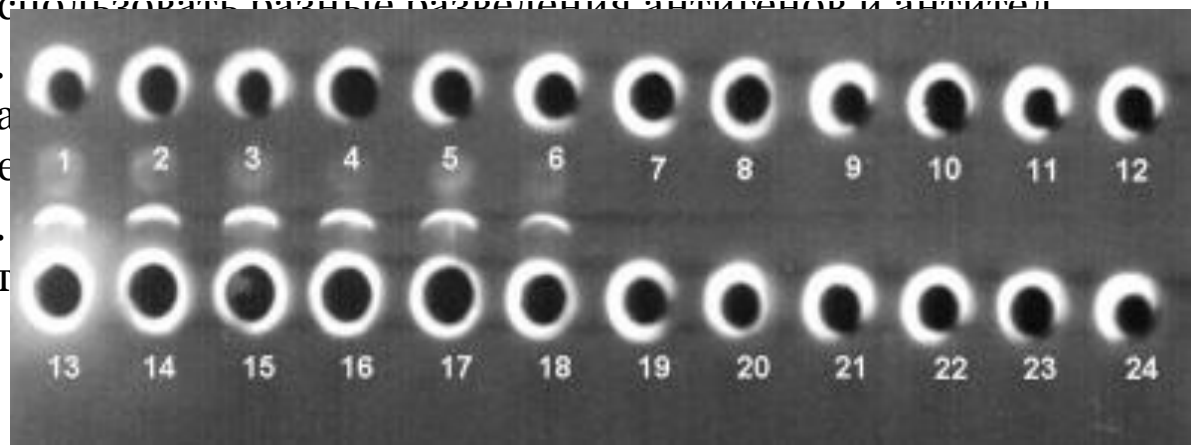


5).

ИТЕЛ

Ag	At	Ag	Ag/At	At	Ag	At
0	0	0	0	0	•	0
0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	•	0
0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	•	0
0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	•	0
0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	•	0
0	0	0	0	0	0	0

Рис. 6.16. Трафарет пластины 8×8 см для встречного иммуноэлектрофореза в агаре с использованием буферной системы, в которой антитела мигрируют к катоду, а антигены — к аноду. Два вертикальных ряда лунок слева предназначены для тестирования антигенов или антител в зависимости от того, имеются ли в наличии стандартный антиген (тест на антитела) или контрольные антитела (тест на антигены). Три вертикальных ряда в центре используются для одновременного определения антигенов и антител в опытных образцах сыворотки. В левый вертикальный ряд вносят стандартный антиген, в правый — контрольные антитела, а в центральный — исследуемую сыворотку. Лунки, расположенные справа, предназначены для определения антигенов, которые могут содержаться в образцах в различных концентрациях. Если в маленькие лунки вносить небольшие объемы (1–2 мкл), то по соотношениям, оптимальным для преципитации, можно определить очень высокие концентрации антигенов



Иммуноблоттинг

- Перенос молекул на матрицу, способную их иммобилизовать.
- В основе лежит тот же самый принцип идентификации выделенного из клеточного лизата антигена с помощью специфических антител, на котором базируется иммунопреципитация. Когда иммуноблоттинг следует за электрофорезом в полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия (ДСН-ПАГЭ), анализируемые антиген уже денатурирован ДСН, следовательно антитела могут выявить лишь его эпитопы, которые не разрушились под действием ДСН.
- **Метод позволяет:**
 - выявить те эпитопы, которые не доступны антителам на нативной молекуле антигена, но нередко экспонируются после воздействия ДСН.
 - идентифицировать антигены, строго специфически связавшие антитела, тогда как в иммунопреципитацию как правило вовлекаются посторонние молекулы, ассоциированные с антигеном, и часто бывает трудно решить, принадлежит ли данный эпитоп самому антигену или этим копреципитированным молекулам.

- ***Основной метод***

- Для идентификации антигена в иммуноблоттинге необходимо, чтобы произошла иммобилизация антигена на мембране и последующее выявление его с помощью специфических антител.
- Неочищенные препараты, например, нефракционированный клеточный лизат, можно разделить в ДСН-ПАГЭ, и затем перенести его отрицательно заряженные молекулы на нитрозоцеллюлозную мембрану с помощью электрического поля в направлении от катода к аноду.
- После переноса мембрану обрабатывают специфическими антителами, места связывания которых затем выявляют антиглобулиновыми антителами, конъюгированными с радиоактивной или ферментной меткой.

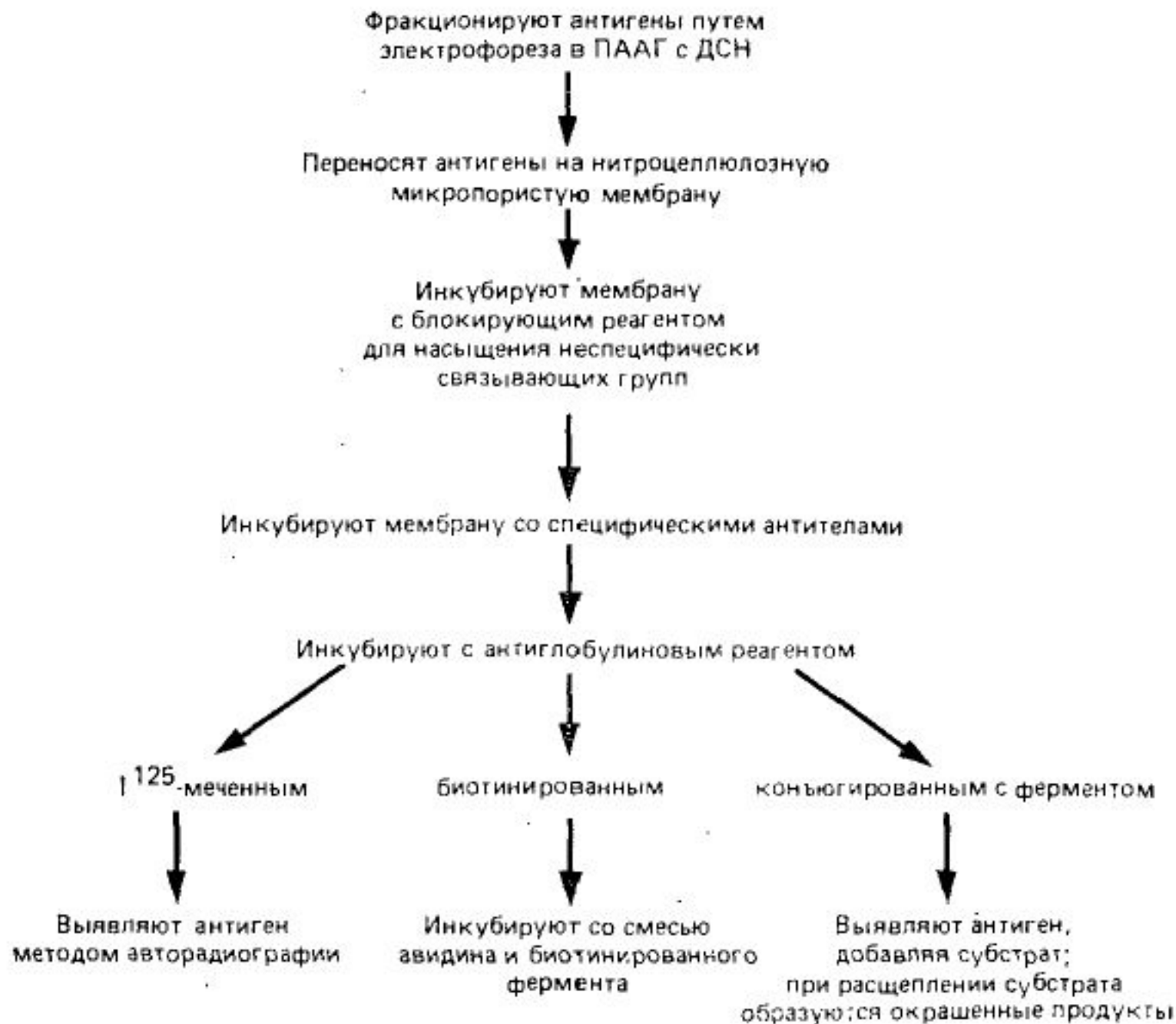


Рис. 11.8. Схема последовательных этапов иммуноблоттинга.

Электрод



Мягкая пористая прокладка



Фильтровальная бумага



Нитроцеллюлозная мембрана



Гель



↑ ↑ Белок

Фильтровальная бумага



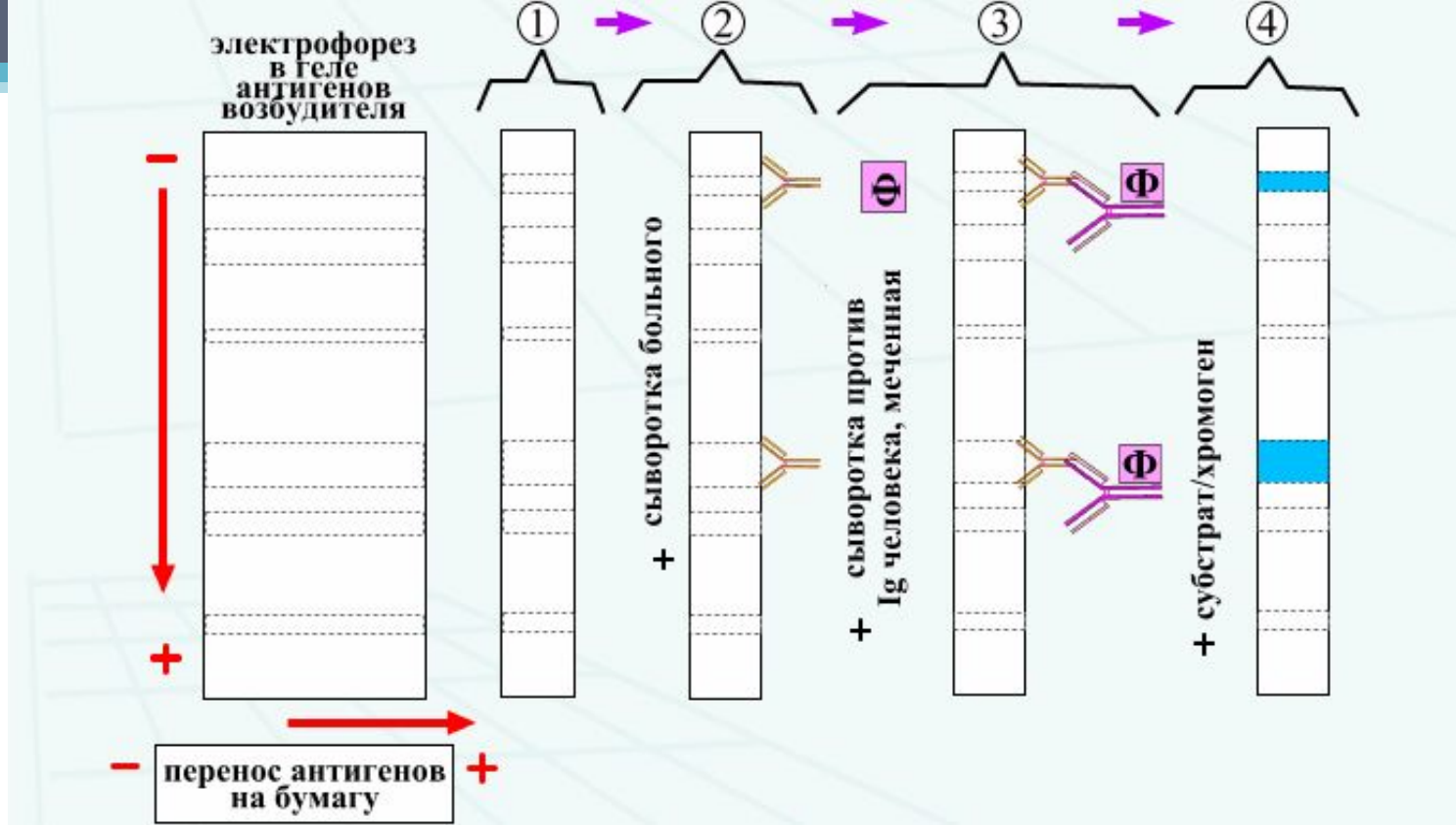
Мягкая пористая прокладка



Электрод



Рис. 11.11. Схема «сэндвича», приготовленного для блоттинга.



Антигены возбудителя разделяют с помощью **электрофореза** в полиакриламидном геле, затем переносят их (блоттинг - от англ, blot, пятно) из геля на активированную бумагу (1) или нитроцеллюлозную мембрану и проявляют с помощью **ИФА**. Фирмы выпускают такие полоски с "блотами" антигенов. На эти полоски наносят сыворотку больного (2). Затем, после инкубации, отмывают от несвязавшихся антител больного и наносят сыворотку против иммуноглобулинов человека, меченную ферментом (3). Образовавшийся на полоске комплекс [антиген + антитело больного + антитело против Ig человека] выявляют добавлением хромогенного субстрата (4), изменяющего окраску под действием фермента.

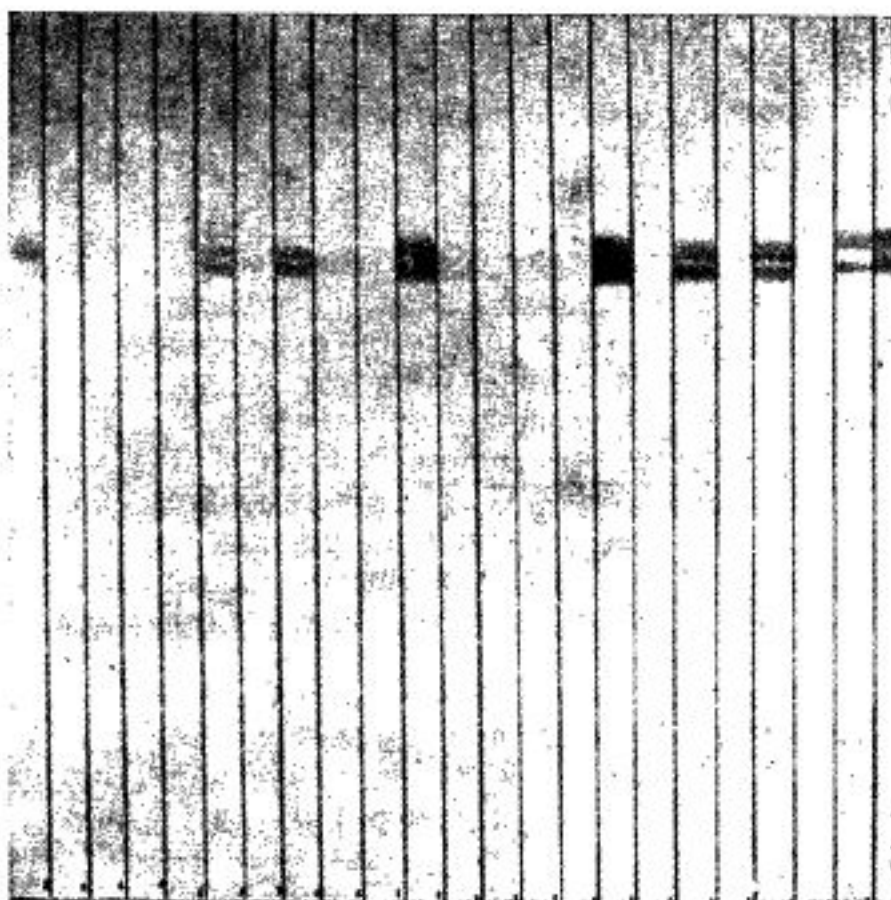
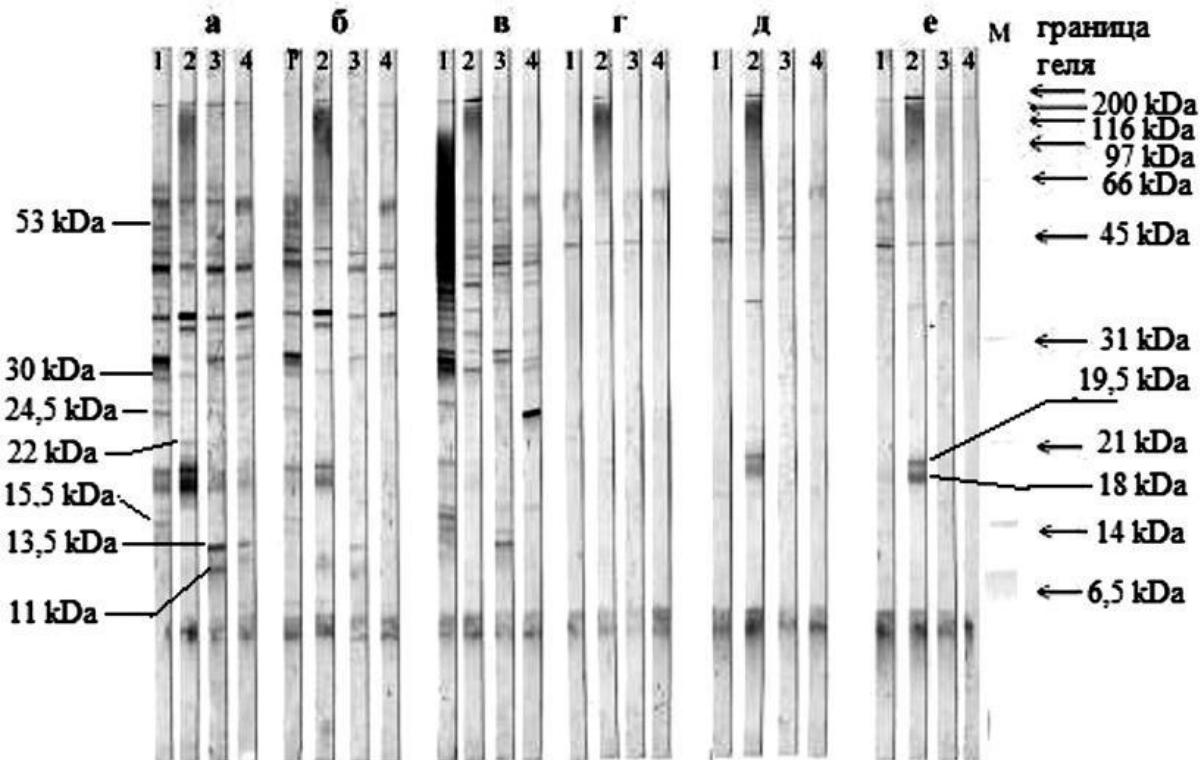


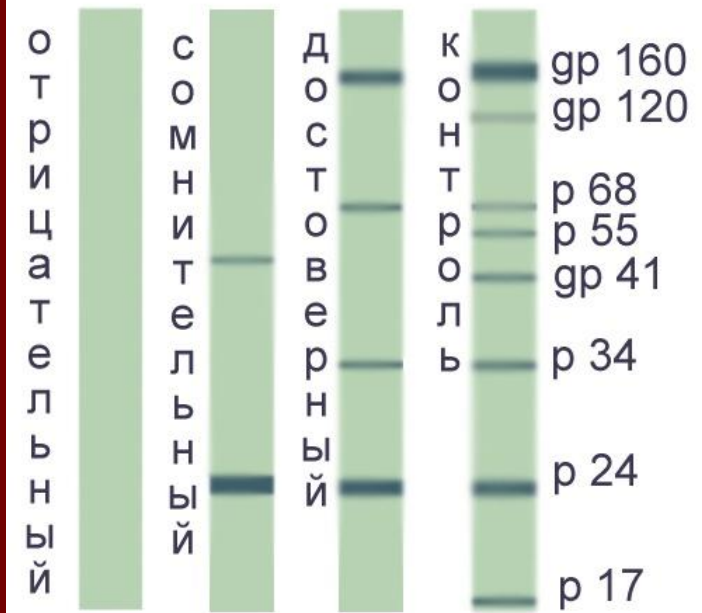
Рис. 11.10. Иммуноблоттинг антигена CD2 с использованием моноклональных антител. Микросомы человеческих лейкозных Т-клеток линии J6 солибилизовали в «литическом буфере», затем добавили равный объем буфера для образцов, содержащего 4% ДСН, и фракционировали с помощью ДСН-ПАГЭ в 12%-ном геле. Каждая полоска мембраны шириной 4 мм содержит количество антигена CD2, эквивалентное $2 \cdot 10^6$ клеток. Полоски были проявлены, как описано в разделе 3.7. Перенос белков производился в камере «Транс-блот» (Bio-Rad Laboratories Inc., США) в течение 16 ч при 4°C и напряжении примерно 50 В и силе тока около 150 мА. Полоски инкубировали в течение 16 ч при 4°C с различными образцами асцитной жидкости, содержащими разные моноклональные антитела к CD2. Первые три полоски слева инкубировали, соответственно, с очищенными антителами к CD2 (20 мкг/мл), очищенными антителами к CD3 (20 мкг/мл) и вовсе без первых антител. Несколько образцов антител весьма интенсивно реагируют с антигеном CD2 на нитроцеллюлозной мембране.



Диагностика ВИЧ-инфекции

Иммуноблот

	gr 160	Положительный результат: Наличие по крайней мере р 24 gr 41 gr 120/160
	gr 120	
	gr 65	
	gr 55 gr 51	
	gr 41	
	р 32	Отрицательный результат: отсутствие всех полос, или слабая р 18
	р 24	
	р 18	



Спасибо за внимание!