

Метод иммунопреципитации в клинических исследованиях

Работу выполнили: Кужекина Ю.С., Буртасова Е.О.,
Четверухина-Малова К.С. 212-л1

Преподаватель: ассистент кафедры биохимии
Киселев В.М.

Реакция иммунопреципитации с окрашиванием преципитатов флюоресцирующими антителами

Реакция была разработана L. Foster, M. Peterson и R. Spindlove (1975). В ее основу положено иммунофлюоресцентное окрашивание вирусных агрегатов, образующихся под воздействием иммунной сыворотки, и обнаружение окрашенных агрегатов при помощи световой микроскопии. M. Peterson, R. Spindlove и R. Smart (1976) показали принципиальную возможность применения реакции для обнаружения в фекалиях ротавируса человека и ротавируса диареи телят, определили чувствительность метода и разработали его ускоренную модификацию.

Реакция преципитация в геле

Метод выявления антигенов и антител, основанный на диффузии компонентов через слой агарового геля и образования видимого преципитата на участках, где создаются их эквивалентные концентрации.

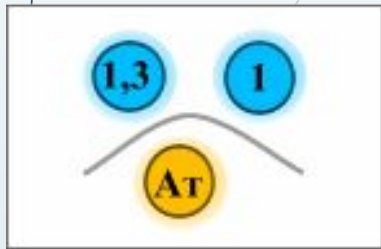
Чаще всего используется метод двойной (встречной) диффузии, предложенный О. Ухтерлони в 1948 г. Для постановки реакции растопленный агаровый гель тонким слоем выливают на стеклянную пластинку и после затвердевания в нем вырезают лунки. В лунки геля отдельно помещают антигены и иммунные сыворотки, которые диффундируют навстречу друг другу. В месте встречи в эквивалентных соотношениях они образуют преципитат в виде белой полосы.

Реакция преципитация в геле

- Кроме того, метод позволяет проводить сравнение нескольких антигенов между собой при некой стандартной сыворотке.
- В случае их идентичности образуемые ими полосы преципитации сливаются в сплошную линию и, наоборот, полосы пересекаются, если сравниваемые антигены имеют различия . РПГ широко использовалась как тест на обнаружение антигенов [вируса гепатита В](#) и антител к ним в 60 — 70-е годы, в частности, с помощью этой реакции было установлено наличие в составе вируса е-антигена или [HBeAg](#).

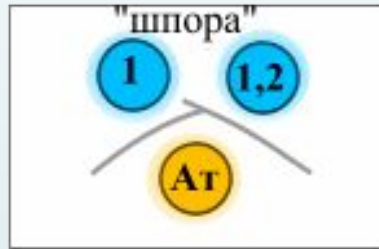
Реакция преципитация в геле

1. Идентичные
эпитопы
антигенов



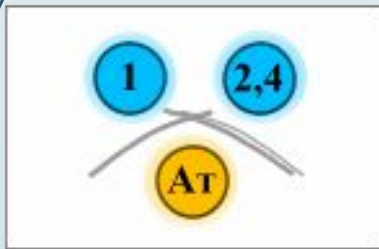
Анти-1

2. Частично
идентичные
эпитопы
антигенов



Анти-1,2

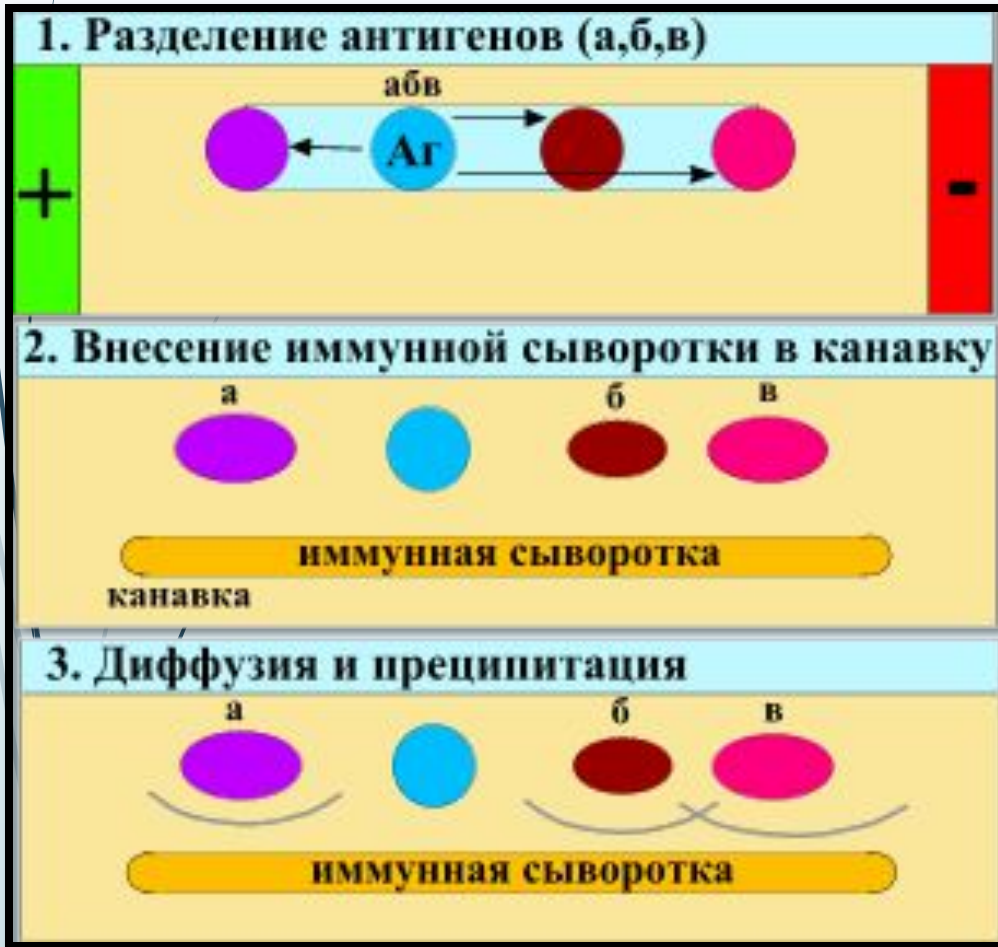
3. Неидентичные
антигены



Анти-1,2,4

Другим преимуществом реакция преципитация в геле является то, что смеси антигенов могут разделяться за счет разной скорости диффузии и выявляться индивидуально; по этой же причине могут отделяться и ингибиторы преципитации, если они содержатся в испытуемом материале. Недостатком метода считают его низкую чувствительность, иначе, разрешающую способность.

Иммуноэлектрофорез



□ Сочетание метода электрофореза и иммунопреципитации: смесь антигенов вносится в лунки геля и разделяется в геле с помощью электрофореза, затем в канавку параллельно зонам электрофореза вносят иммунную сыворотку, антитела которой диффундируют в гель и образуют в месте “встречи” с антигеном линии преципитации.

Схема опыта электрофареза

- Для опыта использовалось:
 - №1 Сыворотка трёх доноров (контроль);
 - №2 Исследуемая моча пациента Ков. (27.11.17);
 - №3 Сыворотка крови от 08.08.13;
 - №4 Сыворотка крови от 26.08.13;
 - №5 Сыворотка крови от 09.10.13;
 - №6 Сыворотка крови от 14.04.14;
 - №7 Сыворотка крови от 17.12.14;
 - №8 Сыворотка крови от 27.11.17;
 - №9 Исследуемая моча пациента Ков.

Схема опыта электрофареза

□ Условия опыта:

□ $U = 100 \text{ В};$

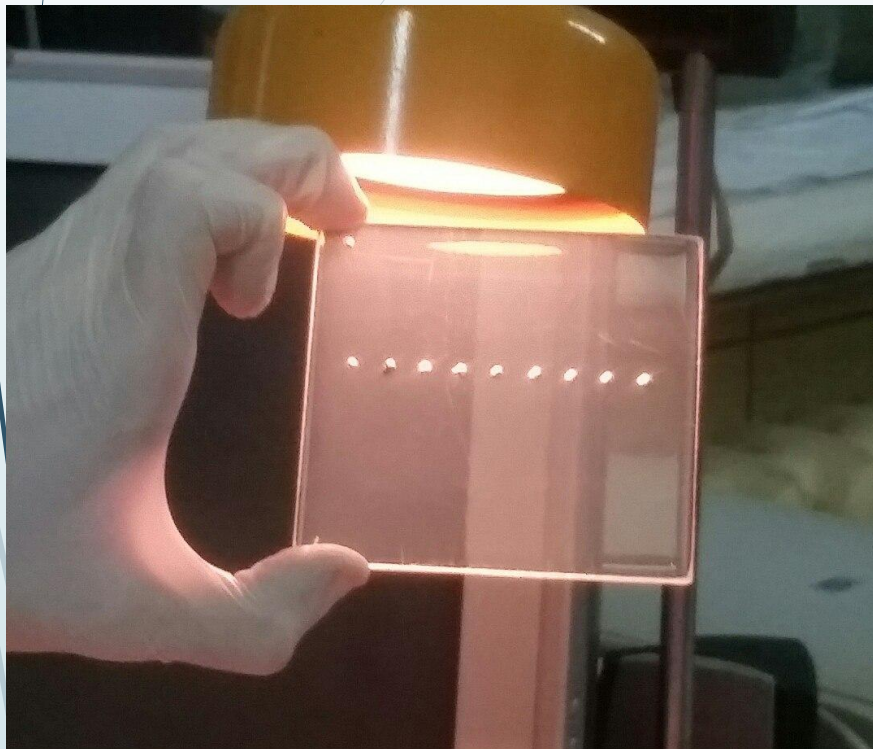
□ $I = 4-10 \text{ mA};$

□ ЛЭФ №1 и №3;

□ $\text{pH} = 9,2$

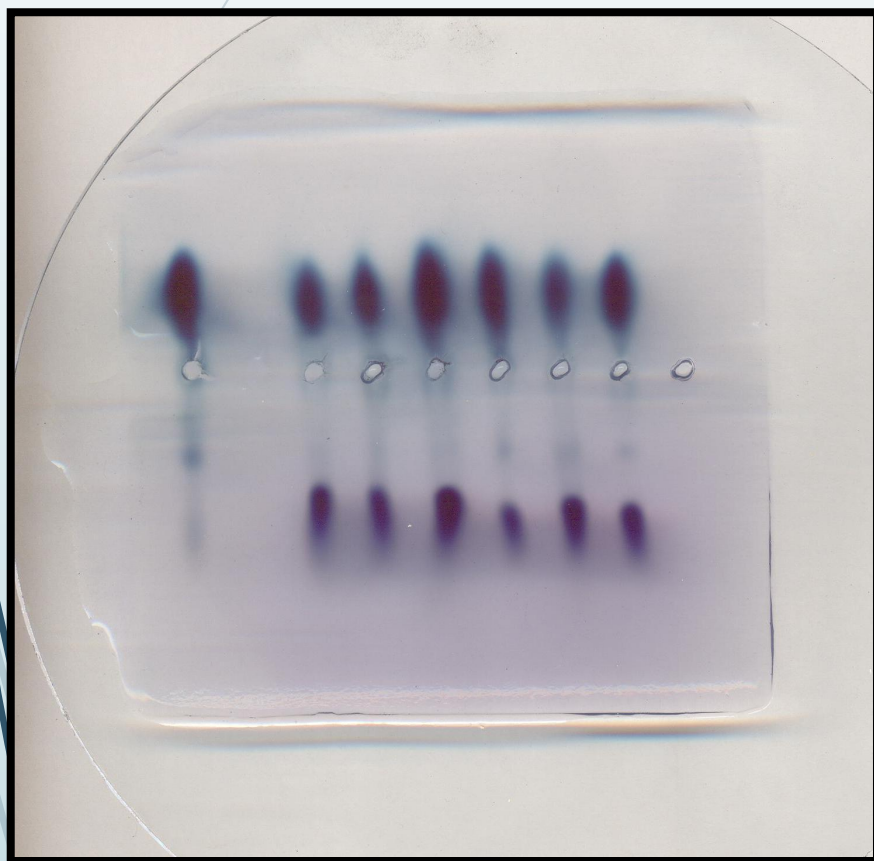
□ Красители: бромфеноловый синий и кислотный сине-чёрный.

Электрофарез



Результаты опыта

Краситель: бромфеноловый
синий



Краситель: кислотный
сине-чёрный

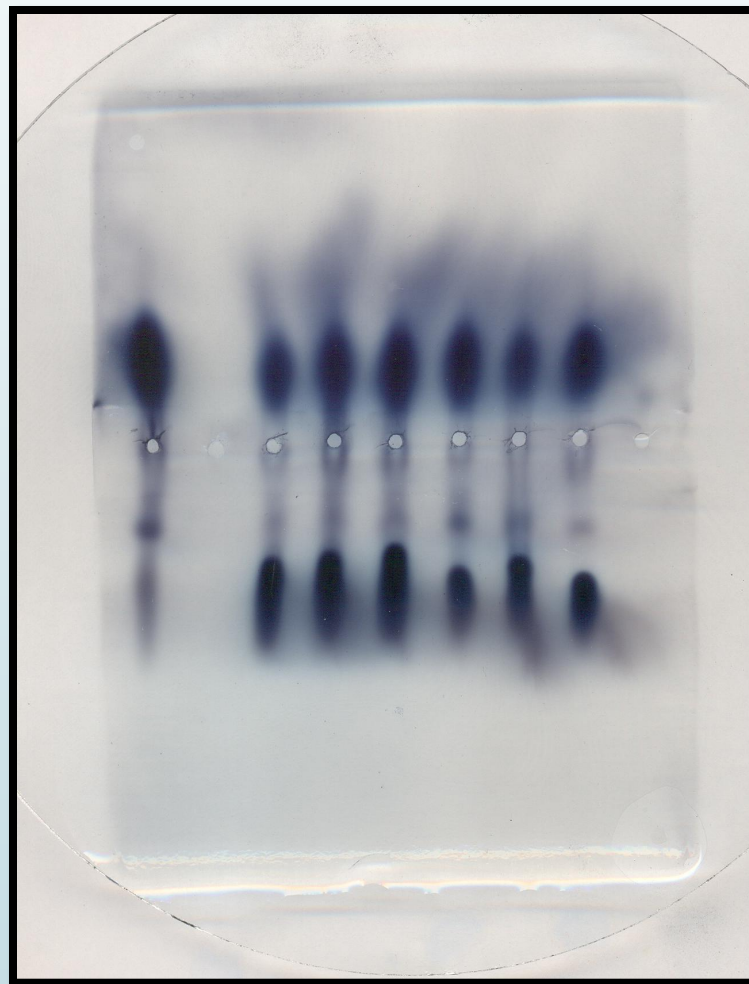
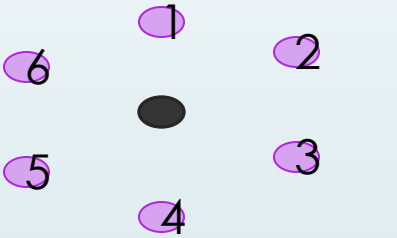
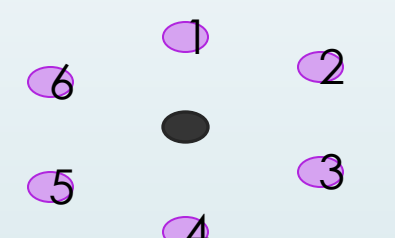
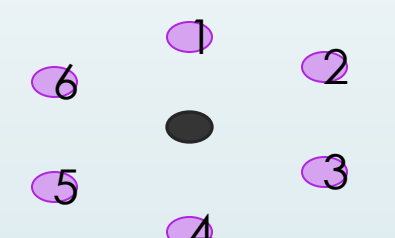
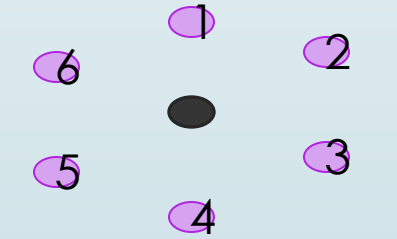
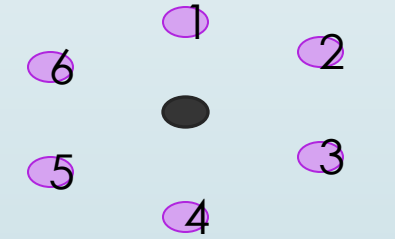
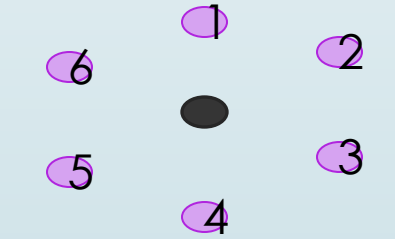
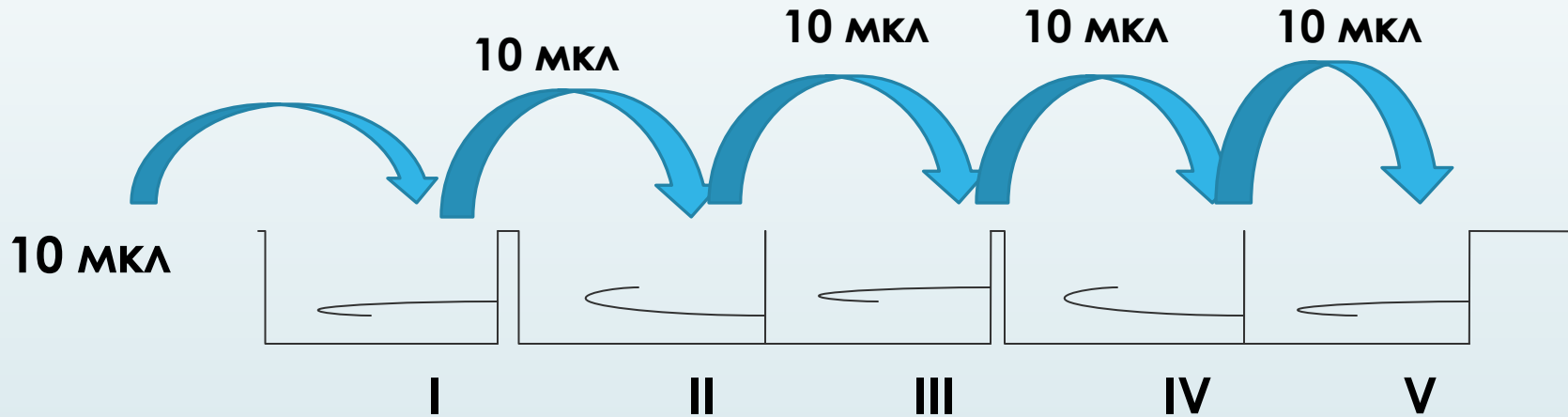


Схема опыта иммунопреципитации

	Ig A антисыворотка	Ig M антисыворотка	Ig C антисыворотка
Контроль			
Исследуемая сыворотка Ков. От 27.11.17			

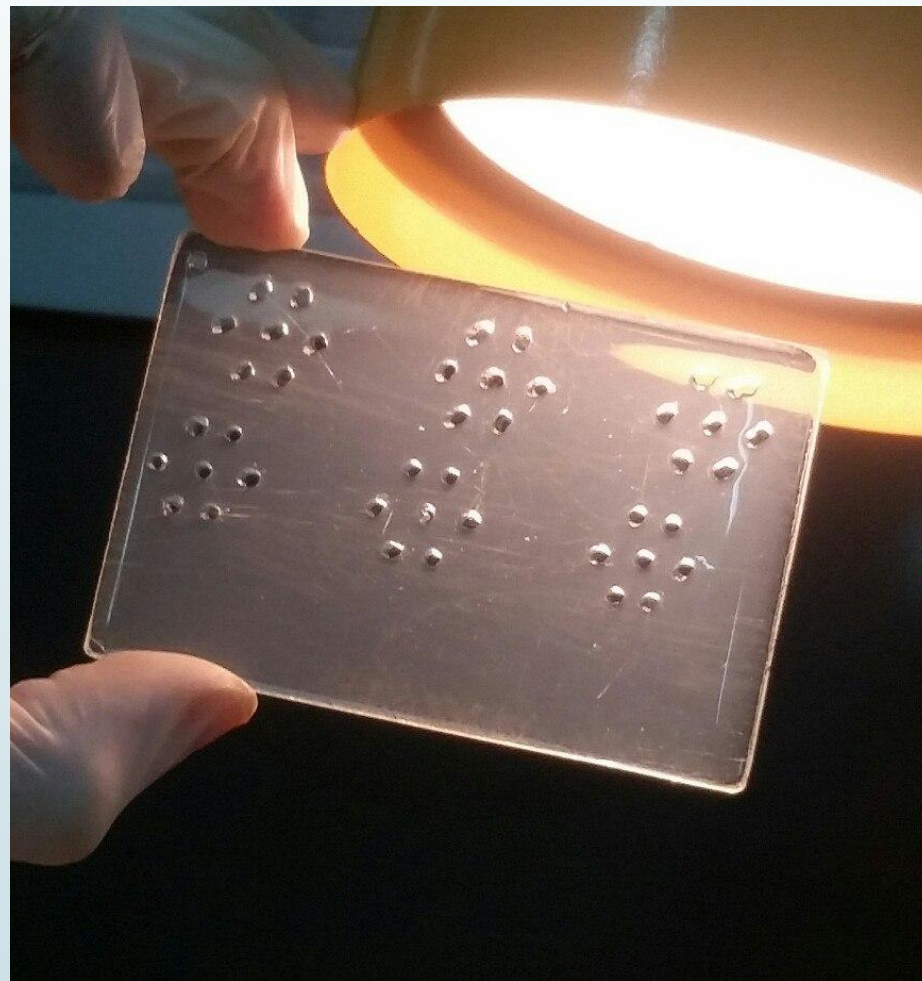
В опыте использовалось разведение 1:8

Суть разведения 1:8

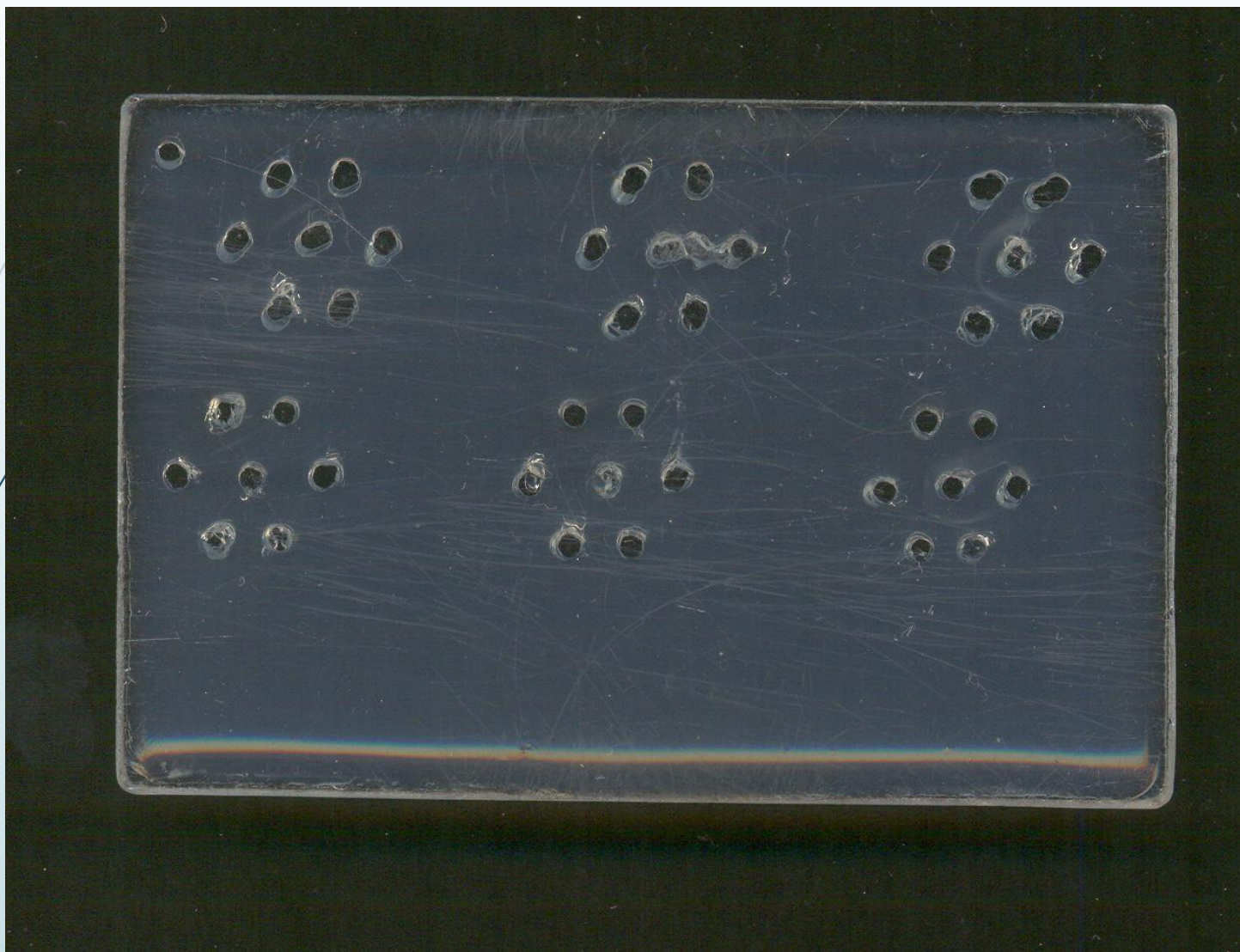


Общий объем составляет 80 мкл, который включает в себя 70 мкл ЗФР и 10 мкл сыворотки.

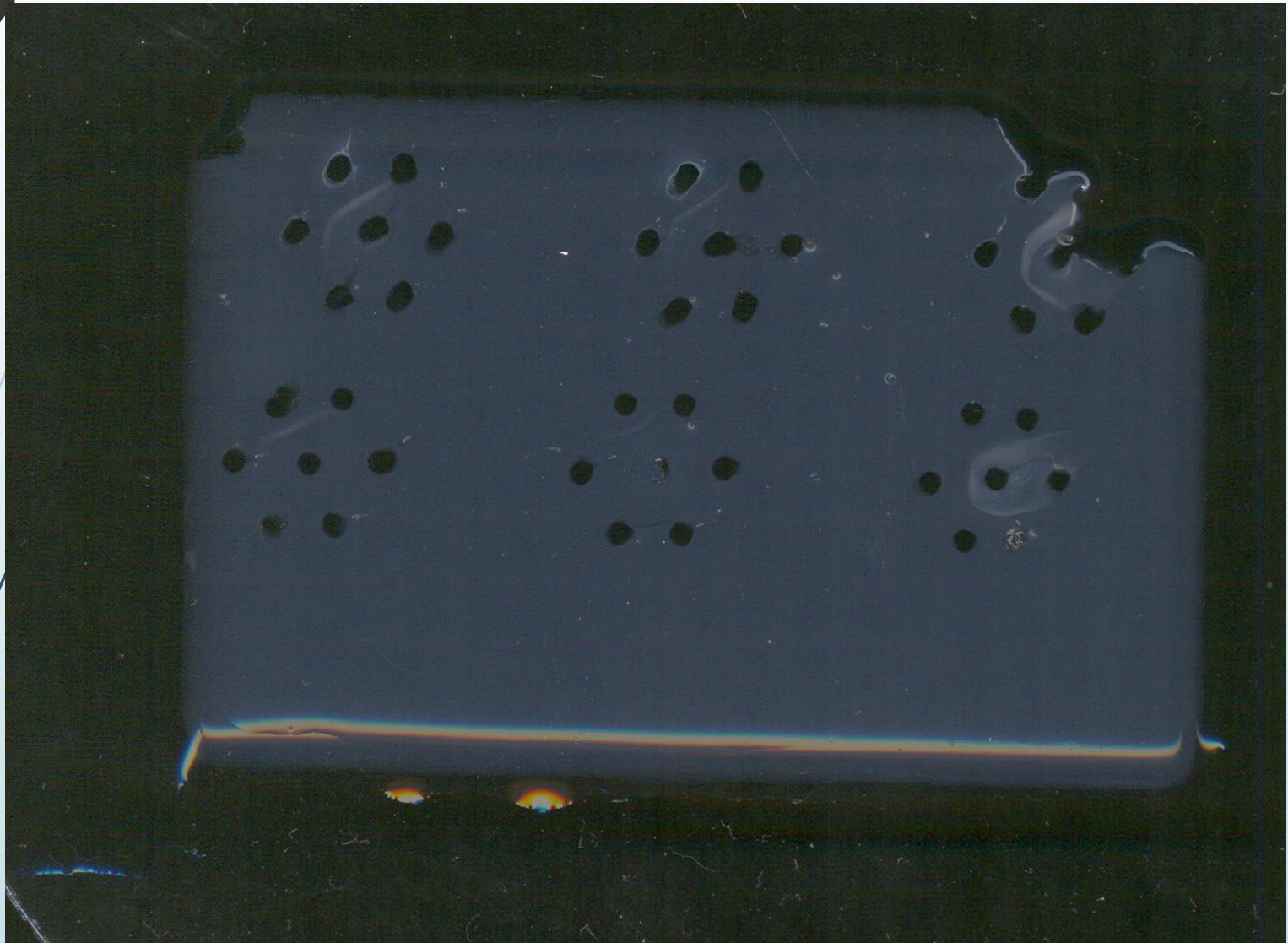
Иммунопреципитация



Результаты опыта



Результаты опыта



Выводы

- При исследовании мочи пациента Ков. методом электрофореза М-градинта не обнаружено.
- При исследовании сыворотки крови пациента Ков. Методами иммунопреципитации и электрофореза был обнаружен М-градиент класса IgG.
- Оценив динамику парапротеина в шести сыворотках крови, можно отметить, что сыворотки №1 и №2 не отличаются, в №3 наблюдается увеличение, в №4 – уменьшение, в сыворотке №5 наблюдается увеличение и в сыворотке №6 изменений не произошло.
- Проследить динамику с 17.12.2014 по 27.11.2017 трудно, так как это большой промежуток времени, однако по морфологическим показателям можно сделать вывод, что М-градиент не изменился.

**Спасибо
за
ВНИМАНИЕ**

