

## **Protokol**

### **Imunodifuze podle Ouchterlonyho**

**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:** 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-protilátky 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 denaturaci protilátky. Následně se přidá protilátky, která se důkladně vmíchá do gelu (kvalitativní i kvantitativní).

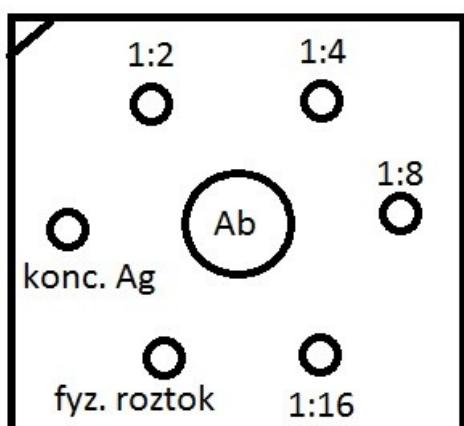
Modifikace podle **Ouchterlonyho** je založena na difuzním protisměrném pohybu molekul antigenu a protilátky. V místě setkání antigenu a protilátky vzniká v gelu precipitát, který je důkazem přítomnosti hledaného antigenu nebo protilátky (kvalitativní stanovení).

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

#### **Postup:**

1. Připravte 1,2% agarovový 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. Napijetujte  $64\mu\text{l}$  protilátky do centrální jamky a  $32\mu\text{l}$  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 ( $75\text{ml CH}_3\text{OH}$ ,  $8\text{ml CH}_3\text{COOH}$ ,  $0,08\text{g amidočerni}$ ), pak promyjte v diferenciačním roztoku ( $\text{CH}_3\text{OH} : \text{CH}_3\text{COOH} = 10:1$ )
  10. Nakonec promyjte v dest. vodě



Obr. č. 1: Ouchterlonyho destička

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