

ODCZYŃ PRECYPITACJI W ŻELU Z KIEROWANYM BLOKOWANIEM NIEKTÓRYCH REAKCJI PRECYPITACYJNYCH

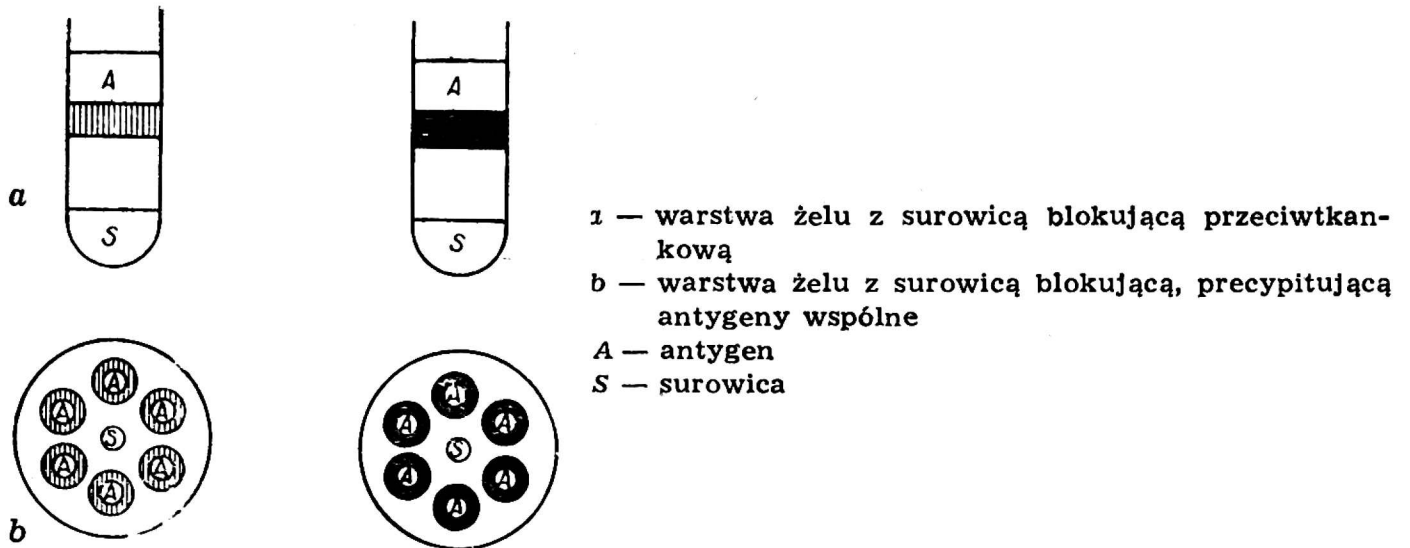
KONRAD MALICKI

Katedra Mikrobiologii Wydz. Weterynaryjnego SGGW w Warszawie
Kierownik: prof. dr J. Brill

Przedstawiony odczyń precypitacji w żelu z kierowanym blokowaniem niektórych reakcji precypitacyjnych jest modyfikacją zwykłej probówkowej (7) (5) czy płytkowej precypitacji w żelu (6). Modyfikacja ta została opracowana niezależnie od podobnych modyfikacji już wcześniej opisanych (1) (2) jako jeden ze sposobów eliminowania niewirusowych reakcji precypitacyjnych, zależnych od używania zarówno hiperimmunizacji zwierząt, jak i do późniejszych reakcji w żelu, antygeny wirusowego zawierającego zanieczyszczenia naturalne, pochodzenia tkankowego. Istotny sens wprowadzonej modyfikacji tkwi w zastosowaniu dodatkowej warstwy żelu, zawierającej specjalną surowicę odpornościową, skierowaną przeciw składnikom antygenowym do tej tkanki, na której hodowano badany wirus. Warstwa ta umieszczona jest w ten sposób przy próbie precypitacji probówkowej lub płytkowej, że antygeny wirusowe łącznie z zanieczyszczeniami pochodzenia tkankowego muszą najpierw przez nią dyfundować (następuje tutaj precypitowanie składników antygenowych tkanki, co określono jako kierowane blokowanie), natomiast antygeny wirusowe dyfundują dalej i dopiero w następnej warstwie żelu reagują ze swoistymi przeciwciałami surowicy precypitującej przeciwwirusowej. Umieszczenie warstwy żelu z surowicą blokującą w stosunku do innych składników precypitacji przedstawia schemat na rys 1a.

Analogiczna technika kierowanego blokowania może być zastosowana do badania wzajemnego pokrewieństwa antygenów wirusowych. W tym przypadku do dodatkowej warstwy żelu zamiast surowicy przeciwtkankowej można dodać surowicę precypitującą dla pokrewnego lub innego badanego szczepu wirusowego. Przy odpowiednim doborze ilościowym składników w dodatkowej warstwie żelu zachodzi precypitacja antygenów

wspólnych, podczas gdy w dalszej warstwie żelu reagują z surowicą testową tylko te komponenty antygenowe, które nie napotkały odpowiadających sobie przeciwciał w warstwie z surowicą blokującą. Układ składników precypitacji w takim przypadku jest analogiczny jako poprzednio, ilustruje to schemat na rys. 1b.



Rys. 1. Schemat miareczkowania surowicy blokującej do prób płytkowych. Usytuowanie warstwy żelu z surowicą blokującą przy próbie probówkowej i przy próbie płytkowej

Istotne dla tej modyfikacji jest:

- odpowiednie przygotowanie probówek lub płytek do precypitacji z warstwą blokującą;
- uprzednie miareczkowanie surowicy blokującej i dodanie jej w nadmiarze;
- używanie do miareczkowania i do prób probówek tylko tej samej średnicy, tak aby warstwa blokująca była we wszystkich probówkach tej samej grubości;
- dodawanie badanego antygenu możliwie wcześniej (w ciągu kilku do kilkunastu minut) po zastygnięciu warstwy blokującej;
- wykonywanie odpowiedniego oznaczenia optymalnej precypitacji.

Przygotowanie probówek z warstwą żelu do kierowanego blokowania precypitacji

W łaźni wodnej o temperaturze 54—55°C umieszcza się butelki z rozpuszczonym żelem agarowym 0,8-procentowym i 1,6-procentowym. Po wyrównaniu temperatury żelu do temperatury łaźni wstawia się do łaźni wodnej probówki 100 × 8 mm, jałowe, zamknięte korkami z waty i gazy, oznakowane odpowiednio do schematu doświadczenia. Do probówek tych rozlewa się najpierw odpowiednie surowice precypitujące lub kontrolne po 0,35 ml, a po chwili (chodzi o ogrzanie się surowicy) ogrzaną pipetą

po 0,15 ml żelu 1,6-procentowego. Przez lekki obrót probówki w pozycji pionowej można wymieszać obydwie składniki. Probówki wyjmuje się z łaźni i pozostawia w temperaturze pokojowej w pozycji pionowej do zakrzepnięcia. Po zakrzepnięciu żelu z surowicą probówki ponownie umieszcza się w łaźni wodnej i po kilku minutach dodaje ogrzaną pipetą po 1,0 ml żelu 0,8-procentowego. W celu zakrzepnięcia tej warstwy żelu probówki pozostawia się znowu w temperaturze pokojowej.

Z kolei w łaźni wodnej umieszcza się dużą jałową probówkę lub kolbkę 50—100 ml, w której należy dokładnie zmieszać odpowiednią ilość żelu 1,6-procentowego z odpowiednią ilością surowicy przeznaczonej do warstwy blokującej (w proporcji, jaka wypada z kalkulacji po miareczkowaniu tej surowicy). Naczynie takie pozostaje w łaźni wodnej; w ciągu kilku minut należy ciepłą pipetą rozlać jego zawartość po 0,25 ml do probówek umieszczonych ponownie w łaźni wodnej. Probówki wystawia się już teraz ostatecznie z łaźni wodnej i po zakrzepnięciu żelu warstwy blokującej wlewa się na powierzchnię po 0,5 ml odpowiedni antygen badany lub kontrolny. Probówki korkuje się korkami gumowymi i pozostawia w pozycji pionowej w temperaturze pokojowej. Wynik prób z warstwą blokującą odczytuje się tak samo jak zwykłą precypitację probówkową, ale po dłuższym okresie czasu, tj. po 7—10—14 dniach. Reakcje zachodzące na pograniczu warstwy blokującej i antygeny można zaobserwować już po kilku minutach. Warto podkreślić, że obecność pęcherzyków powietrza w zakrzepłym żelu może być przyczyną błędnych wyników.

Przygotowanie płytek z warstwą żelu do kierowanego blokowania precypitacji

Na płytki o średnicy 55 mm wylewa się po 10 ml żelu agarowego 1,5-procentowego. Po zastygnięciu żelu, w części obwodowej płytki wycina się duże baseny sztancą o średnicy 15 mm. Z kolei w łaźni wodnej o temperaturze 54—55°C przygotowuje się w osobnym naczyniu żel agarowy 1,6-procentowy z odpowiednim dodatkiem surowicy przeznaczonej do warstwy blokującej. Za pomocą ciepłej pipety żelem tym wypełnia się równo z brzegiem wycięte uprzednio duże baseny. Po zastygnięciu w temperaturze pokojowej wycina się ponownie w środku wypełnionych basenów nowe mniejsze baseny, o średnicy 8 mm. Ponieważ wycinany teraz żel jest znacznie rzadszy, wygodnie jest używać sztancy z rurką gumową do podessania wyciętego krawędzi żelu. Następnie wycina się basen centralny o średnicy 9 mm (basen centralny przygotowuje się bez warstwy blokującej, zob. schemat 1). Na zakończenie — do każdego wgłębienia daje się po kropli żelu 1,6-procentowego, który krzepnąc zabezpiecza badane płyny przed wydostawaniem się między żel a szkło i wkrótce po tym do basenu

centralnego daje się surowicę precypitującą, a do basenów peryferyjnych odpowiednie antygeny. Wynik na tak przygotowanych płytkach odczytuje się na 7—10—14 dzień przebywania w komorze wilgotnej, w temperaturze pokojowej. Sposób odczytywania wyniku jest taki sam jak przy metodzie rutynowej. Metoda próbówkowa, a zwłaszcza płytkowa, jest mało oszczędna i przy liczniejszych badaniach wymaga dysponowania dużą ilością surowicy blokującej.

Miareczkowanie surowicy przeznaczonej do warstwy blokującej

Miareczkowanie surowicy blokującej jest konieczne i ma na celu ustalenie dawki surowicy, jaka w danych warunkach zapewnia zatrzymanie żądanych antygenów na drodze precypitacji w warstwie blokującej. Mimo ustalenia dawki minimalnej do prób ostatecznych należy używać nadmiaru surowicy w celu uniknięcia wyników wątpliwych. Zależnie od siły surowicy blokującej nadmiar ten powinien wynosić od 0,02 do 0,05 ml surowicy na próbkę lub basen ponad zwykłą ilość. Przy miareczkowaniu wykonywanym dla poszczególnych doświadczeń jako wartości stałe należy przyjąć: grubość warstwy blokującej oraz rodzaj i ilość blokowanego antygeny. W przypadku zmiany warunków w wykonywanych później doświadczeniach, w porównaniu do warunków, w jakich wykonywano miareczkowanie, dane z miareczkowania mogą okazać się bezwartościowe. Miareczkowanie należy przeprowadzać oddzielnie dla metody próbówkowej — w próbkach, i oddzielnie dla metody płytkowej — na płytkach.

Miareczkowanie surowicy blokującej do prób próbówkowych. Przedstawiony przykład dotyczy użycia surowicy przeciwtkankowej jako surowicy blokującej. Miareczkowanie przeprowadza się w 2 szeregach, w stosunku do antygeny wirusowego, antygeny tkankowego — kontrolnego i w stosunku do surowicy przeciwtkankowej. W tym celu należy przygotować 20 próbek zasadniczych w ten sposób, aby każda z nich w dolnej warstwie żelu zawierała 0,35 ml surowicy przeciwtkankowej, oraz następną warstwę żelu 0,8-procentowego. Probówki te ustawia się w 2 rzędach i numeruje od 1 do 10. Następnie bierze się 9 dalszych pomocniczych, jałowych próbek, wstawia je w statywie do łaźni wodnej o temperaturze 54—55°C i daje się do nich składniki według tabeli 1.

Po dokładnym wymieszaniu składników w próbkach pomocniczych, ustawia się obok nich w łaźni wodnej obydwie szeregi poprzednio przygotowanych próbek i przenosi do nich po 0,25 ml płynu z próbek pomocniczych, zgodnie z numeracją, tzn. z 1 próbki pomocniczej do pierwszych próbek zasadniczych, z drugiej próbki pomocniczej do dru-

Tabela 1

Przygotowywanie serii rozcieńczeń surowicy blokującej w żelu agarowym

Numer próbówki	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Surowica S-T	0,15	0,225	0,3	0,33	0,36	0,39	0,42	0,45	—
Surowica S-K	—	—	—	—	—	—	—	—	0,45
Żel 1,6% o temp. 54°C	0,6	0,525	0,45	0,42	0,39	0,36	0,33	0,3	0,3

Legenda: S-T — surowica blokująca przeciwtkankowa
 S-K — surowica kontrolna (normalna)

gich próbek zasadniczych itd. Z kolei próbki zasadnicze wyjmują się z łaźni wodnej i po zakrzepnięciu warstwy blokującej daje się do próbek pierwszego szeregu antygen tkankowy, do drugiego szeregu antygen wirusowy. Kolejność czynności przy całym miareczkowaniu ilustruje tabela 2.

Wynik miareczkowania odczytuje się na 7—10—14 dzień przetrzymywania próbek w temperaturze pokojowej. W próbkach kontrolnych 9 i 10 uzyskuje się zwykle wynik wybitnie dodatni, zwłaszcza z antygenem tkankowym. W innych próbkach wynik zależy od zdolności precypitujących surowicy blokującej. W doświadczeniach własnych wynik w postaci precypitacji w dolnej warstwie żelu występował w 1 i 2, wyjątkowo w 3 próbce. W pozostałych próbkach ilość surowicy blokującej była dostateczna do całkowitego zatrzymania dyfundującego antygenu kontrolnego. Jako dawkę minimalną surowicy blokującej przyjmuje się taką ilość surowicy, jaka jest w tej pierwszej próbce, przy której brak precypitacji w dolnej warstwie żelu.

Miareczkowanie surowicy blokującej do prób płytkowych. W zwykły sposób przygotowuje się 4 płytki z żelem agarowym 1,5-procentowym. Na 2 z nich wycina się po 6 basenów peryferyjnych sztancą 15 mm, a basen centralny sztancą 9 mm. Na pozostałych 2 płytkach wycina się tylko 3 baseny peryferyjne sztancą 15 mm, 4 basen peryferyjny sztancą 8 mm i basen centralny sztancą 9 mm. Z kolei przygotowuje się rząd 9 dodatkowych próbek według tabeli 3 i po oznaczeniu na pierwszych dwóch płytkach basenów przyjętych za pierwszy i drugi, na pozostałych przyjętych za siódmy, wypełnia się kolejno baseny przygotowanym żelem z surowicą blokującą, przestrzegając zgodności numeracji basenów z numeracją próbek pomocniczych. Po zastygnięciu żelu z surowicą blokującą wycina się mniejsze baseny sztancą 8 mm, po czym wylewa ich dno kroplą żelu 1,5-procentowego. Do basenów centralnych wszystkich płytek daje się surowicę przeciwtkankową, natomiast do basenów peryferyjnych

Tabela 2

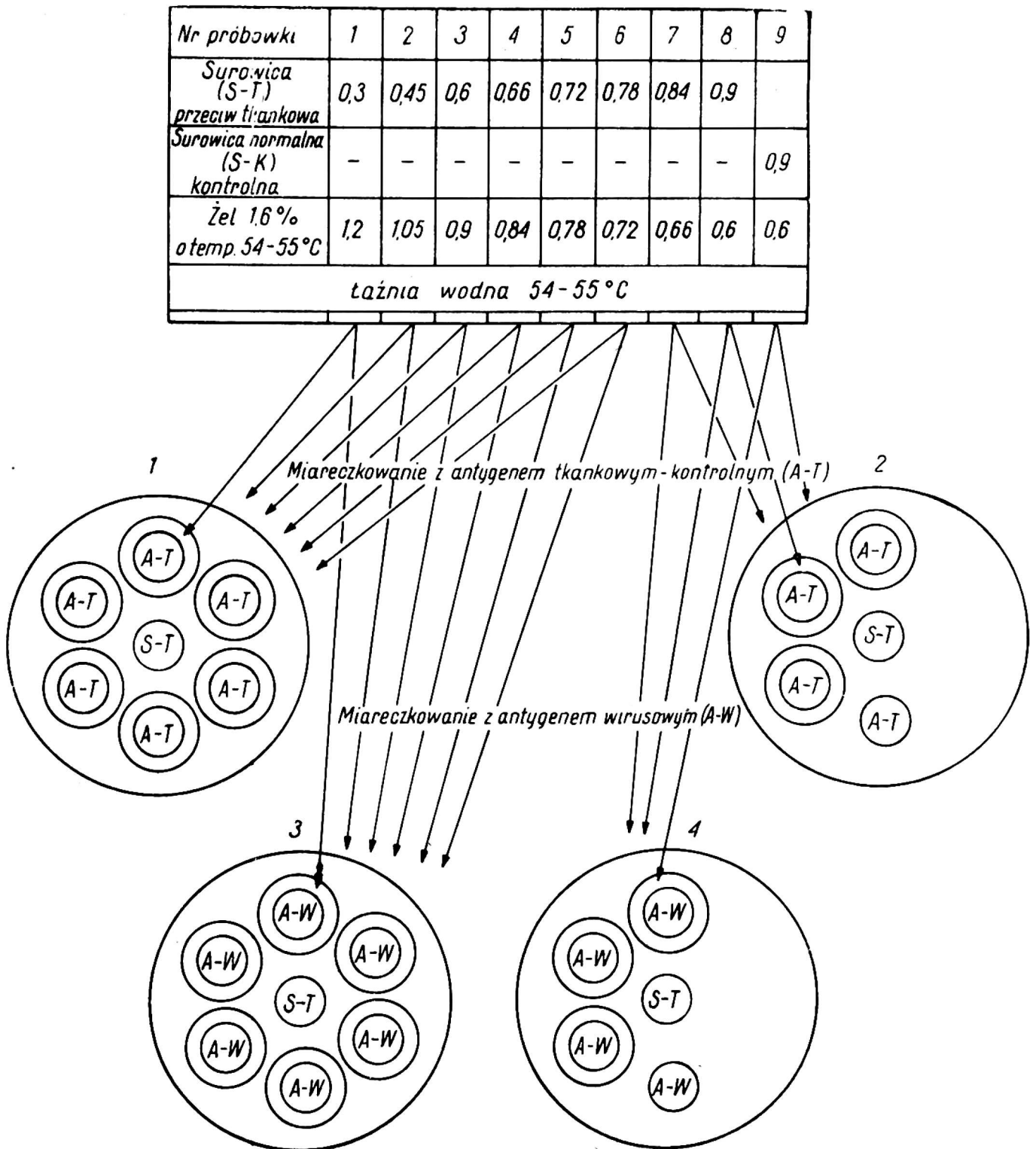
Miareczkowanie surowicy blokującej do prób probówkowych

Nr próbówki	1	2	3	4	5	6	7	8	Kontrola			
									9	10		
Łaźnia wodna 54—55°C												
Surowica S-CAM	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35		
Żel 1,6% o temp. 54°C	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15		
temperatura pokojowa (do zakrzepnięcia żelu)												
Łaźnia wodna 54—55°C												
Żel 0,8% o temp. 54°C	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0		
temperatura pokojowa (do zakrzepnięcia żelu)												
Łaźnia wodna 54—55°C												
Pierwszy szereg próbek	Roztwór żelu z surowicą blokującą	S-T	0,05	0,075	0,1	0,11	0,12	0,13	0,14	0,15	—	—
		żel 1,6%	0,2	0,175	0,15	0,14	0,13	0,12	0,11	0,10	—	—
drugi szereg próbek	Roztwór żelu z surowicą kontrolną	S-K	—	—	—	—	—	—	—	—	0,15	—
		żel 1,6%	—	—	—	—	—	—	—	—	0,1	—
Temperatura pokojowa (do zakrzepnięcia żelu)												
Antygen A-T	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
Antygen A-W	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	

Odczytanie wyniku na 7 — 10 — 14 dzień

Legenda: S-T — surowica przeciwtkankowa
 S-K — surowica kontrolna (normalna)
 A-T — antygen tkankowy (kontrolny)
 A-W — antygen wirusowy

jednego kompletu płytek — antygen tkankowy-kontrolny, a do drugiego kompletu — antygen wirusowy. Rys. 2 przedstawia obrazowo zasadę miareczkowania surowicy blokującej do prób płytkowych.



Rys. 2

Wynik miareczkowania odczytuje się jak zwykłą precipitację płytkową na 7—10—14 dzień. Zasada ustalania dawki minimalnej surowicy blokującej oraz kalkulowania proporcji surowicy blokującej do żelu jest taka sama jak przy miareczkowaniu surowicy blokującej do prób próbówkowych.

Ustalanie optymalnej proporcji

Optymalną precypitację otrzymuje się przy odpowiednim doborze ilościowym składników precypitacji. Przy ustalaniu optymalnej precypitacji bada się szereg dwukrotnie wzrastających rozcieńczeń surowicy precypi-

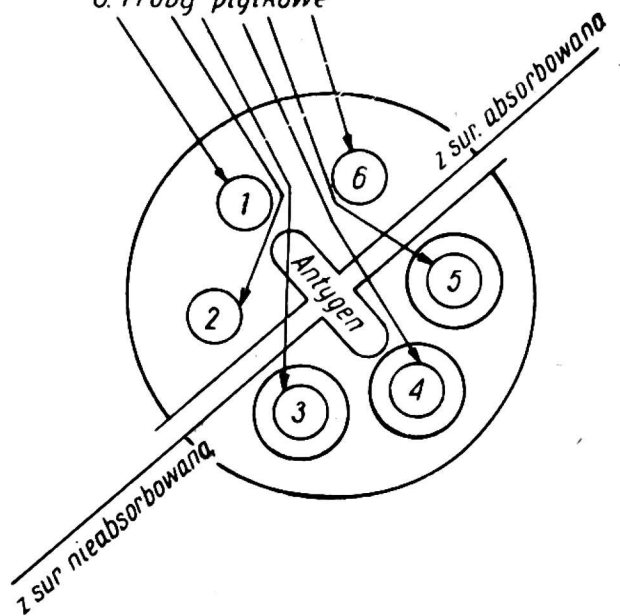
a. Rozcieńczenie wstępne surowicy precypitującej

	Rozcieńczenia					
	Nieroz.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
	1	2	3	4	5	6
Roztwór fizjologiczny	—	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Badana surowica precypitująca absorb. lub nieabsorb.	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

b. Próby próbkowe

Badana surowica precypitująca wstępne rozcieńcz.	1	2	3	4	5	6
		0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Łażnia wodna 54-55°C - 2-3 min.						
Żel 1,6% o temp. 54-55°C	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Temperatura pokojowa						
Łażnia wodna 54-55°C - 2-3 min.						
Żel 0,8% o temp. 54-55°C	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Temperatura pokojowa						
Antygen x 0	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Łażnia wodna 54-55°C - 2-3 min.						
Żel 1,6% z dodatkiem surow. blokującej	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Temperatura pokojowa						
Antygen x 0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

c. Próby płytkowe



Rys. 3

tującej w stosunku do antygeny nierozcieńczonego i do szeregu dwukrotnych rozcieńczeń antygeny. W badaniach doświadczalnych, w których zastosowano omawianą modyfikację precypitacji w żelu, przy ustalaniu

optymalnej precypitacji badano tylko szereg dwukrotnych rozcieńczeń surowicy precypitującej, w stosunku do antygeny nierozcieńczonego. Porównawczo natomiast wykonywano dość istotne dla tamtych badań ustalenie optymalnej precypitacji, w przypadku użycia surowic precypitujących nieabsorbowanych (z wykluczeniem reakcji niewirusowych drogą kierowanego blokowania) i w przypadku użycia surowic precypitujących, absorbowanych odpowiednim antygenem tkankowym. Zasady tych oznaczeń, wykonywanych metodą probówkową i płytkową, przedstawia rys. 3.

Omawianą modyfikację precypitacji w żelu zastosowano z powodzeniem do badania budowy antygenowej wirusów ospy izolowanych z ptaków domowych (Malicki — 4). W pracy tej dobór ilości składników wzorowano na pracy Gispensa (3). Te same składniki (antygeny, surowice) badano w precypitacji w żelu, stosując dwa sposoby eliminowania reakcji precypitacyjnych niewirusowych, mianowicie poprzez kierowane blokowanie lub też poprzez uprzednią absorpcję surowicy.

Porównanie uzyskanych wyników wykazało, że przy obydwóch metodach usuwania reakcji precypitacyjnych niewirusowych otrzymuje się w zasadzie wyniki zgodne, z pewną przewagą na korzyść probówkowej metody kierowanego blokowania. Metoda ta okazywała się najbardziej czuła i dawała rezultaty nawet przy badaniu antygenów o słabych zdolnościach precypitynogennych lub też zawierających małą ilość precypitynogeny.

PIŚMIENNICTWO

1. Björklund B. (1952) — Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 79, 319
2. Feinberg J. G. (1957) — Biochem. J., 65, 40
3. Gispens R. (1955) — I. Immunol. 74, 134
4. Malicki K. (1964) — Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych nr 56
5. Oakley C. L., Fulthorpe J. (1953) — J. Path. Bact., 65, 49
6. Ouchterlony Ö. (1948) — Acta path. microbiol. scand. 25, 186
7. Oudin J. (1946) — C. R. Acad. Science 222, 115.

K. Malicki (Warszawa)

ПРЕЦИПИТАЦИЯ В ЖЕЛЕ С НАПРАВЛЕННОЙ БЛОКИРОВКОЙ НЕКОТОРЫХ ПРЕЦИПИТАЦИОННЫХ РЕАКЦИЙ

Резюме

Преципитация в желе с направленной блокировкой некоторых преципитационных реакций является модификацией обыкновенной пробирочной или плитковой преципитации в желе. Модификация

состоит в применении добавочного слоя желе, содержащего соответствующую преципитационную сыворотку. Схема 1 представляет принцип размещения слоя желе с блокирующей сывороткой по отношению к другим элементам преципитации. В зависимости от преципитационной сыворотки, использованной для блокирующего слоя, модификация может иметь различные применения, например, как способ элиминации преципитационных невирусных реакций, как метод исследования взаимного родства антигенов и т. п. Модификация применялась с успехом для исследования антигеновой структуры вирусов оспы птиц (2).

В тексте изложена подробная техника работы.

K. Malicki (Warszawa)

GEL PRECIPITATION TEST WITH DIRECTED BLOCKING OF SOME PRECIPITATION REACTIONS

Summary

Gel precipitation with directed blocking of some precipitation reactions is a modification of the usual agar precipitation test in test tubes or Petri dishes. Similar idea was applied in studies by Björklund (1952). The modification consists in the additional gel layer containing a suitable precipitating serum. Scheme 1 presents the principle of localization of blocking serum containing agar layer in relation to other components. Depending on the precipitating serum used in blocking layer, the modification may be used for different purposes, i. e. as a method of elimination of non-viral precipitation, or study of antigenic interrelationship et cet. This modification was successfully applied in the studies of antigenic structure of *Pox-virus avium* strains (2).

Details of the technique are given in the text.