

УДК 597—11+597—105

**ИММУНОДИФФУЗИЯ В ИССЛЕДОВАНИЯХ  
ПО ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ РЫБ****В. С. Апекин**

Степень биологического сходства сложных желтковых препаратов, приготовленных из тканей и органов рыб, может быть установлена путем их иммунохимического исследования. На первых этапах ценную информацию можно получить с помощью метода иммунодиффузии в геле, позволяющего выявлять, сравнивать и идентифицировать отдельные белки по их антигенным свойствам. Этот метод получил широкое распространение при изучении биологии рыб как при анализе онтогенетических и циклических процессов (Ridgway, Clontz, 1962 Fine, Drilhon., 1963 Ohi, 1962 Singh, Zaale, 1972 Апекин, 1965, 1968, 1969; Апекин, Моисеева, 1973), так и при анализе систематического положения рыб (Закс и Соколова, 1961; Строганов, Иевлева, 1964; Лукьяненко, 1970; Алтухов, 1972; Харин и др., 1973 и др.). Принципы метода и техника эксперимента были кратко описаны в методических работах, опубликованных в ихтиологической литературе (Балахнин, 1962; Пучков, 1962; Алтухов, Апекин, Лиманский, 1964). Однако к настоящему времени накоплено много данных, которые заметно видоизменили первоначальные представления о возможностях иммунодиффузии. Зачительно также расширился арсенал приемов исследования. В медицине иммунохимия благодаря огромной предварительной работе выведена на уровень анализа индивидуальных систем антиген—антитело (Под ред. Зильбера, 1968). В ихтиологии, особенно на поисковых этапах исследования, чаще приходится иметь дело с многокомпонентными системами.

В предлагаемой статье мы кратко рассмотрим организацию и технику опытов иммунопреципитации, так как они подробнейшим образом изложены в прекрасной методической работе А. И. Гусева (1968), и в основном остановимся на определении антигенного состава сложных белковых препаратов и на интерпретации картин, образующихся при их сравнении.

В качестве иллюстраций использованы материалы, полученные при изучении созревания осетровых рыб и бычков.

**К ТЕХНИКЕ ЭКСПЕРИМЕНТА**

Принципиальная особенность двойной двумерной иммунодиффузии, предложенной Ухтерлони (Ouchterlony, 1949), состоит в том, что она в отличие от других вариантов иммунопреципитации в геле (Oudin, 1946; Oakley, Fulthorp, 1953), позволяет сравнивать между собой несколько преципитационных систем непосредственно в одном опыте. В простейшем случае в тонком слое геля на стекле вырезают три лунки, распо-

ложенные по треугольнику (рис. 1, а). В одну лунку вносят антисыворотку, в две другие сравниваемые препараты — антигены. Характер слияния образующихся преципитатов позволяет судить об их биохимическом сходстве.

В качестве среды для опытов широко используют 1%-ный агаровый гель на физиологическом растворе из Vacto-agar, Difco. Хорошей средой служит также 5%-ный полиакриламидный гель. Реакция в нем, однако, протекает дольше, чем в агаре.

На чистое стекло 9×6 см помещают рамку из оргстекла внутренним размером 7×5 см и, установив на горизонтальную поверхность,

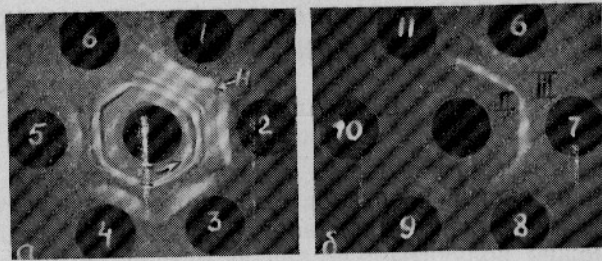


Рис. 1. Растворка вытяжки ооцитов северюги. В лунках I—II последовательные двукратные разведения вытяжки исходной концентрацией 4 мг/мл белка. В центральных лунках иммунная сыворотка к ооцитам.

наливают 5 мл горячего агара так, чтобы образовался слой толщиной около 1,4 мм. После застывания геля стекла сразу же переносят во влажную камеру.

Такую камеру легко изготовить, вмонтировав в коробку из плексигласа (25×12×10 см) стеклянные полки на расстоянии 1,5 см одна от другой. Дно камеры ограничивают бортиком высотой 1 см — образуется кювета. Переднюю откидную стенку подвешивают на лейкопластыре. В рабочем состоянии на дно камеры налита вода с антисептиком, а крышка плотно прикрыта и приклеена кусочком пластыря.

Лунки в геле пробивают специальными штампами-пробойниками (Гусев, 1968). Диаметр резцов 8 мм, расстояние между ними 8—10 мм. Края резцов должны быть острыми и хорошо пригнанными в одной плоскости. Ввинтив штамп в гнездо объектива микроскопа, пробивают слой геля и через резцы отсасывают с помощью разрезающего насоса гелевые пробки.

При постановке опыта препарат или антисыворотку вносят в лунку до того момента, когда очертание ее на белом листе бумаги, подложенном под стекло, не примет форму четкого кольца, что свидетельствует о заполнении лунки. Всю операцию необходимо выполнять быстро, чтобы не подсыхал агар. Во влажной камере реакция заканчивается при комнатной температуре на вторые-третьи сутки.

Картину преципитации фотографируют или сохраняют путем высушивания (Гусев, 1968).

Успех иммунологического исследования в значительной степени зависит от активности полученных иммунных сывороток. На основе существующих представлений об антителообразовании создан ряд принципиальных схем иммунизации животных (Cohn, 1952 Campbell et al., 1963).

Для реакции преципитации необходимы антисыворотки высокого

титра. Для их получения рекомендуют реиммунизировать животных через месяц после окончания первого цикла иммунизации (Людоговская, 1968).

При выработке кроличьих антисывороток к белкам тканей рыб (сыворотка крови, экстракты икры, гипофиза, мышц и др.) было испытано несколько схем иммунизации. Одни только внутривенные инъекции приводили к значительной вариабельности титров однозначных антисывороток (Апекин, 1964). Лучшие результаты получены при комбинированном введении антигенов — внутривенно плюс подкожно. Разовая доза по белку для внутривенных инъекций — 1—2 мг, для подкожных — 2—5 мг.

Подкожно антиген вводят в смеси 1:1 со стимулятором Фрейнда последовательно в область брюшка, шеи и лимфатических узлов передних и задних лап. Животных иммунизируют через каждые 2—3 дня в течение трех недель, в общей сложности 7—9 раз. Через 7—10 дней после последней инъекции от кроликов собирают первую порцию сыворотки крови. После месячного перерыва иммунизацию повторяют. Количество инъекций во втором туре зависит от активности антисывороток и может быть ограничено двумя-тремя. Реиммунизацию можно проводить несколько раз. От некоторых животных мы собирали антисыворотку в течение двух лет.

Для приготовления иммунных сывороток к очищенным препаратам требуется меньшее количество антигенного материала, так, к гонадотропину осетра удовлетворительные антисыворотки были получены нами на 5—7 мг белка.

#### ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИГЕННОГО СОСТАВА ПРОБЫ

При взаимодействии сложного антигенного препарата и соответствующей антисыворотки образуется спектр преципитации, представляющий собой ряд полосок, каждая из которых, в простом случае, образована одной парой антиген — антитело.

Форма полосы дает некоторое представление о размерах молекул антигена, так как кривизна ее зависит от соотношения молекулярных весов реагентов (Korngold, Leeuwen, 1957; Aladjem et al, 1959). Если антиген и антитело имеют равные диффузионные коэффициенты, преципитат формируется в виде прямой полосы.

Если диффузионный коэффициент антигена выше, чем антитела, а молекулярный вес соответственно ниже, линии изгибаются концами в сторону антитела, а выпуклостью к антигену. Противоположный эффект наблюдается, когда антиген имеет молекулярный вес больше, чем антитело.

Для того чтобы получить по возможности полное представление об отдельных компонентах сложной смеси, необходимо создать оптимальные условия для каждой реагирующей пары антиген — антитело. Это достигается путем раститровки.

Если поставить серию опытов, в которых с постоянной концентрацией антисыворотки будет реагировать ряд последовательных разведаний препарата, то удастся проследить за всей картиной взаимодействия одной пары от избытка антигена через оптимум к избытку антитела.

Опыты раститровки удобно осуществлять с помощью семилуночного шаблона с одним резервуаром в центре и с шестью, расположенными на равном расстоянии по периферии.

На рис. 1, а и б представлена раститровка вытяжки икры севрюги. В спектре этой сложной системы удается вычленить 7—9 полосок, каж-



дая из которых отчетлива лишь при определенных соотношениях концентраций. Так, преципитат *I* в самом центре фигуры находится в условиях избытка антигена. Выражен он здесь размыто и почти «уходит» в лунку с антисывороткой, а по мере разведения вытяжки отодвигается от центра и дает четкий рисунок напротив лунок 4 и 5. Следующий преципитат, образующийся на обеих пластинках в широком диапазоне концентраций, при раститровке расщепляется на два (*II* и *III* на рис. 1, б), т. е. он по своей структуре гетерогенен.

Мы рассмотрели антигены, которые в исходной пробе были в избытке и лишь при разведении попали в оптимальные условия реак-

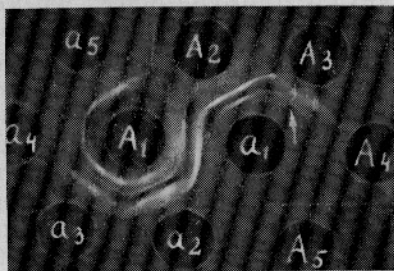


Рис. 2. Совместная раститровка антигена и антисыворотки:

$a_1$ — $a_5$  — последовательные двукратные разведения антигена (овариальная жидкость северюги);  $A_1$ — $A_5$  — подобные же разведения соответствующей антисыворотки.

ции. Однако возможен и обратный вариант, когда к началу анализа антитела находятся в избытке по отношению к антигену, в результате чего последний не обнаруживается. В этом случае необходимо или сконцентрировать препарат, или развести антисыворотку. Учитывая возможность избытка антител, рекомендуют раститровывать препарат с несколькими разведениями антисыворотки (Храмкова и Абелев, 1961). Нами для этой цели предложен вариант постановки, позволяющий объединить оба вида раститровки в одном опыте (Апекин, 1967). Как показано на рис. 2, реагенты располагают таким образом, чтобы левая часть фигуры представляла собой обычную раститровку, а правая ее часть — раститровку сыворотки с наиболее концентрированной пробой антигена. При такой аранжировке в пределах взятых разведений любой паре антиген — антитело созданы условия для взаимодействия во всех возможных соотношениях концентраций. При исследовании системы овариальная жидкость — соответствующая антисыворотка разведенной антисывороткой обнаружен дополнительный преципитат, который не проявляется цельной (показано стрелкой). В опыте легко установить его границы и положение в общем спектре.

Таким образом, как видно из приведенных примеров, раститровка позволяет полнее охарактеризовать состав спектра, оценить гомогенность преципитатов и определить пределы наиболее четкого формирования каждого из них. Однако спектр — относительная характеристика препарата. Он заметно изменяется в зависимости от концентрации антигена и антител. Разрешающие возможности иммунодиффузии в отношении количества выявляемых антигенов, хотя и могут быть несколько расширены путем раститровок, из-за малого пространства между лунками и наложения полос друг на друга ограничены примерно десятью компонентами.

Большими разрешающими возможностями отличается иммуноэлектрофорез (Грабар и Буртэн, 1963). Во-первых, в результате расхождения антигенов при электрофорезе расширяется поле анализа и упрощается идентификация отдельных элементов. Во-вторых, дуги преци-

питации располагаются в последовательности, соответствующей электрофоретической подвижности антигенов, образуя тем самым вдоль оси разделения систему, которая не зависит от концентрации реагентов. Так, методом иммунодиффузии в сыворотке крови северяги нами было дифференцировано 4—5 полос, а с помощью иммуноэлектрофореза в той же пробе и с той же антисывороткой удалось выделить уже минимум 8 дуг.

### ВОЗМОЖНЫЕ КАРТИНЫ ПРЕЦИПИТАЦИИ ПРИ СРАВНЕНИИ БЕЛКОВ

В зависимости от степени антигенного сходства, а также количественного отношения ингредиентов может наблюдаться три типа реакций: полное слияние линий (первый тип), отсутствие слияния, т. е. отсутствие влияния линий друг на друга (второй тип) и частичное слияние линий (третий тип) (Ouchterlony 1962).

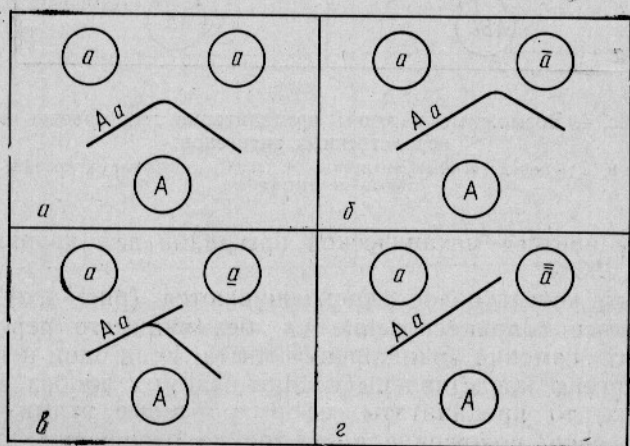


Рис. 3. Возможные картины преципитации при сравнении идентичных антигенов:

$\underline{a}$ ,  $\bar{a}$ ,  $\bar{\bar{a}}$  — уменьшающиеся концентрации антигена  $a$ ;  $A$  — анти-  
тело к антигену  $a$ .

Рассмотрим кратко возможности образования различных картин преципитации в зависимости от степени антигенного сходства сравниваемых компонентов.

**Сравниваемые белки идентичны (рис. 3).** Если концентрации сравниваемых антигенов равны, концы линий сплавляются полностью (первый тип), образуя общую дугу, левая и правая части которой симметричны друг другу и одинаково удалены от лунок (рис. 3, а). В случае неравенства концентраций симметричность фигуры нарушается и линии смещаются в сторону лунки с меньшим количеством антигена (рис. 3, б). При значительном же избытке одного из препаратов может образоваться «шпора» (рис. 3, в), т. е. частичное сплавление преципитатов (третий тип) (Ouchterlony, 1953, 1958). Такую шпору называют ложной, так как в отличие от истинной она со временем размывается. Появление ложной шпору объясняют тем, что преципитат со стороны резервуара, в котором антиген взят в большой концентрации, растворяется в избытке антигена и формируется здесь ближе к лунке с сывороткой. В связи с растворением и миграцией преципитата может возникнуть и его расщепление (Грабар и Буртэн, 1963). Наконец, в тех

случаях, когда один из сравниваемых антигенов взят в столь малом количестве, что не выявляется в опыте, хотя находится в пределах абсолютной чувствительности метода (Зильбер, Абелев, 1962), может наблюдаться второй тип реакции (рис. 3, з).

**Исследуемые вещества неродственны.** Если сравниваемые антигены чужды, то полосы, ими образуемые, формируются независимо одна от другой и дают второй тип реакции. Объясняется это тем, что преципитаты, представляющие собой дисперсную взвесь частичек, не реагируют с «чужими» антигенами и антителами и обычно не препятствуют их диффузии. Отмечено, однако, что при высокой плотности

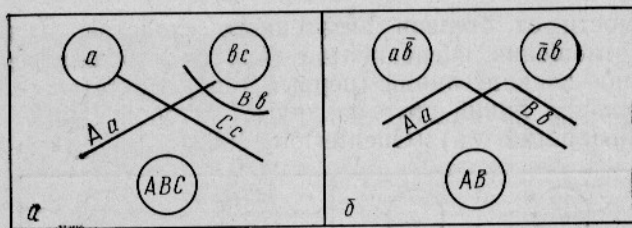


Рис. 4. Возможные картины преципитации при сравнении неродственных антигенов:

$a, b, c$  — неродственные антигены;  $A, B, C$  — антитела к соответствующим антигенам.

осадок может явиться механической преградой для крупных молекул (Ouchterlony, 1958).

Чаще всего концы полос перекрещиваются (рис. 4, а). Возможно и чисто внешнее соприкосновение их без видимого перекреста, что легко устранить изменив аранжировку опыта. Если одни и те же неродственные антигены представлены в сравниваемых пробах в различных концентрациях, то преципитаты, сформированные этими антигенами, могут сменить свое положение в спектре по отношению друг к другу (рис. 4, б).

**Сравниваемые белки имеют как общие, так и частные антигенные группы — детерминанты.** Как известно, молекулы сложных антигенных веществ могут являться проводниками сразу нескольких активных групп с различными свойствами (Kabat & Mayer, 1948). В результате иммунизации на каждую детерминанту сложного антигена продуцируется свое антитело (Бойд, 1958), и все полученные при этом антитела взаимодействуют со сложным антигеном. При сравнении двух родственных биохимических комплексов, имеющих как общие, так и частные детерминанты, возможно образование нескольких картин преципитации.

Если иммунная сыворотка содержит антитела ко всем активным группам реагирующих веществ, а каждый из сравниваемых антигенов лишь их часть, то, кроме общей дуги преципитации, образуются шпоры, т. е. имеет место частичное сплавление линий (третий тип), как это показано на рис. 5, а.

Когда в анализе используют антисыворотку к одному из препаратов, выступ появляется со стороны именно этого препарата, так как со сравниваемым реагируют лишь общие с ними антитела (Korngold, 1957).

Частично родственные компоненты могут давать картину и полного сплавления полос (первый тип) (рис. 5, б). Так, сыворотка, содержащая антитела только против общих групп или полученная к антигену, имеющему лишь часть детерминант другого, не обнаруживает различий между ними (Feinberg, 1957).



При значительной разнице молекулярных весов сравниваемых субстанций наблюдается реакция второго типа (отсутствие слияния) за счет того, что легкий антиген диффундирует скорее и дальше тяжелого. Причиной подобного же «разрыва» преципитата (рис. 5, в) может послужить и неравенство концентраций взаимодействующих антигенов.

Так, например, Ухтерлони (1953) сравнивая между собой овальбумины утки и курицы (белки эти имеют близкие диффузионные коэффициенты), получил три наиболее характерные картины. При равных концентрациях антигенов в опытах с антисывороткой к куриному белку

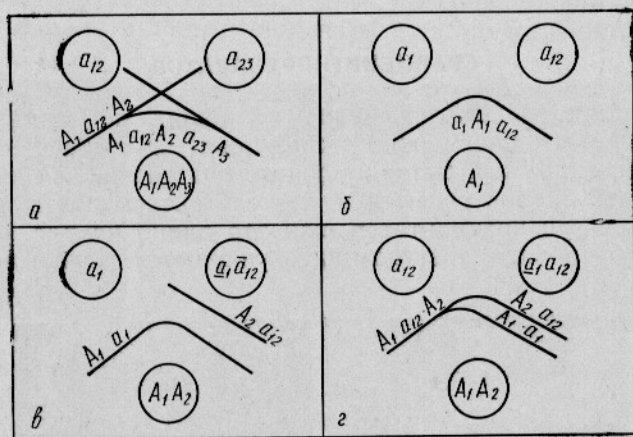


Рис. 5. Возможные картины преципитации при сравнении частично родственных антигенов (концентрации антигенов отмечены, как на рис. 3):

$a_1, a_{12}, a_{23}$  — частично родственные комплексы антигена —  $a$ ;  $A_1, A_2, A_3$  — антитела к отдельным детерминантам сложного антигена —  $a$ .

произошло частичное сплавление полос с образованием одной шпору со стороны куриного белка.

Когда в опытах с той же антисывороткой был взят утиный овальбумин в высокой концентрации и смесь его с куриным, сформировались две независимые дуги: одна общая и одна частная, подобно тому, как это показано на рис. 5, в. Белок утки, взятый в избытке, диффундируя впереди куриного белка, был связан общими антителами  $A_1$ , в результате чего образовалась дуга преципитации  $A_1, a_1$ , расположенная близко к лунке с иммунной сывороткой. Частные антитела  $A_2$ , реагирующие только с овальбумином курицы, продиффундировали дальше и, достигнув зоны критических концентраций со своим антигеном, вызвали его преципитацию на некотором расстоянии от общей полосы осадка, образовав отдельную полосу  $A_2, a_{12}$ .

Несколько изменив аранжировку опыта, тот же автор наблюдал совершенно иную картину. В данном случае сравнивались между собой куриный белок и смесь его с утиным. Наблюдалось раздвоение преципитата: овальбумин утки проявился в виде ответвления с внутренней стороны общей дуги (рис. 5, г):

Сходный рисунок «расщепления» полосы может возникнуть и по другим причинам. Если молекула сложного вещества разрушена — расщеплена энзимами в результате воздействия кислот, то антигенные «осколки», сохранившие разные детерминантные группы, присущие целому комплексу, ведут себя независимо друг от друга и могут осаж-

даться соответствующими антителами в различных позициях (Муроз, 1959).

Исследование частично родственных компонентов наиболее сложно, и рассмотренные примеры не исчерпывают конечно всех возможных вариантов.

Как было показано выше, концентрации сравниваемых веществ — одна из основных причин, определяющих рисунок преципитата. В зависимости от нее идентичные антигены могут давать несколько типов реакций. Следовательно, для установления степени сходства двух антигенных веществ сравнивать их необходимо в оптимальных концентрациях.

### СРАВНЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ

Для предварительного суждения об общих и частных антигенах двух сравниваемых проб можно воспользоваться постановкой в «семерке». Сравним, например, вытяжку ооцитов из яичника IV стадии зрелости и сыворотку крови севрюги в опыте с антисывороткой к ооцитам. В сложной фигуре преципитатов, как это видно на рис. 6, а, полосы, расположенные в виде треугольника, упираются концами в лунки с

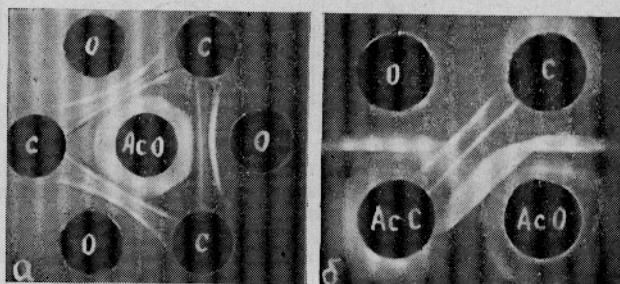


Рис. 6. Сравнение двух препаратов в семилучной фигуре (а) и по квадратной схеме (б):

O — вытяжка ооцитов севрюги, AcO — антисыворотка к ооцитам;  
C — сыворотка крови севрюги; AcC — антисыворотка к сыворотке крови.

сывороткой. На основании этого можно предположить, что они образованы антигенами, присутствующими только в вытяжке. В центре фигуры — вокруг лунки с антисывороткой — видно широкое кольцо преципитата. Вероятно, общие антигены обоих препаратов в процессе диффузии сливаются один с другим, в результате чего и образуется единая зона осадка, размытая из-за избытка антигена. Иммунная сыворотка к ооцитам отражает, естественно, состав этого препарата, в сыворотке же она открывает только те антигены, которые являются общими с ооцитарными. Для сравнения двух независимых систем антиген — антисыворотка, дающего полное представление о каждой из них, Г. И. Абелевым (1960) предложена квадратная схема опытов, которая упрощает анализ индивидуальных компонентов. При расположении препаратов и соответствующих иммуносывороток крест-накрест создаются такие условия, при которых частные структуры на всем своем протяжении отклоняются от общих, формируясь по диагоналям.

В опыте, приведенном на рис. 6, б и являющемся развитием предыдущей постановки, сравниваются две полные системы.



Две полоски, предварительно оцененные, как частные антигены ооцитов располагаются по диагонали и не испытывают влияния ни со стороны сыворотки крови, ни со стороны антисыворотки к ней, подтверждая наше первое предположение. Наиболее интенсивная и широкая полоса, расположенная на рис. 6, *a* в центре фигуры, и здесь отражает то же явление — антисыворотка к ооцитам реагирует не только со своими антигенами, но и с антигенами сыворотки.

Для анализа специфических антигенов, характерных только для одного препарата, желательно освободиться от общих реакций. Самым простым и эффективным методом получения антисывороток узкой специфичности служит их истощение. Если к иммунносыворотке против препарата *A* прибавить в достаточном количестве родственный препарат *B*,

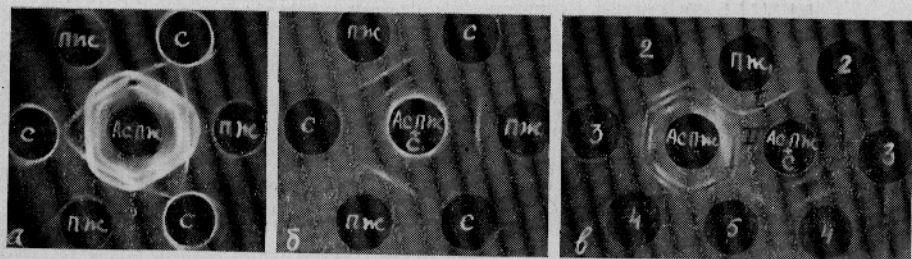


Рис. 7. Сравнение двух препаратов в опытах с цельной антисывороткой (*a*), с антисывороткой, истощенной на пластинке (*б*) и в пробирке (*в*):

*ПЖ*—*ПЖ*<sub>2</sub> — двукратные разведения полостной жидкости севриги; *АспЖ* — антисыворотка к *ПЖ*; *С* — сыворотка крови севриги.

то все общие антитела окажутся связанными и истощенная сыворотка будет реагировать только с частными антигенами *A*.

Существует несколько вариантов истощения. Широкое распространение получил вариант Бьёрклунда (Bjorklund, 1952*a, б*), который выполняется прямо на пластинках. Сводится он к тому, что один из препаратов, подлежащий исключению, заранее вносят в центральную или во все лунки. Пластинку оставляют до полного всасывания антигена в гель. После этого ставят планируемый опыт, контролируя полноту истощения. Барьер антигена, как бы фильтруя антитела, задерживает «свои» и пропускает «чужие».

На рис. 7, *a, б* приведены результаты двух опытов: первый (*a*) — обычное сравнение сыворотки крови и овариальной жидкости севриги, второй (*б*) — то же сравнение, но после предварительного внесения в центральную лунку сыворотки крови. Как видно, все общие антигены не выявляются на пластинке, а анализ частных, характерных только для полостной жидкости, значительно упростился. В полостной жидкости обнаружено два специфических антигена.

Однако метод Бьёрклунда не применим в опытах иммуноэлектрофореза и не позволяет определить положение частных антигенов в общем спектре. В этом случае истощение антисыворотки проводят в пробирке (Бойд, 1949). К антисыворотке прибавляют оптимальное количество исключаемого антигена. Смесь инкубируют 1—2 ч при комнатной температуре и помещают на ночь в холодильник. Образующийся преципитат осаждают центрифугированием, осадок отбрасывают, а очищенную антисыворотку используют в опытах. Сравнивая реакцию цельной и истощенной таким образом сыворотки в одной постановке, как это показано на рис. 7, *в*, легко определить положение специфических преципитатов овариальной жидкости в общей системе. В данном случае

один из антигенов жидкости приурочен к наружной части спектра (отмечено I), второй — выявляется только при разведении пробы в 8—16 раз (отмечено II), что еще раз подтверждает необходимость подбора оптимальных соотношений реагентов.

Предложены и другие варианты истощения антисывороток: формализированной тканью (Косяков, 1954; Косяков, Коростелева, 1959); антигенами, фиксированными на бумаге (Гостев, Шагунова, 1957; Гостев, 1959) или химически связанными с целлюлозой (Гурвич, Каппер, Незлин, 1959).

В качестве адсорбента мы использовали фиксированную 4%-ным формалином икру. После суточного промывания водопроводной водой

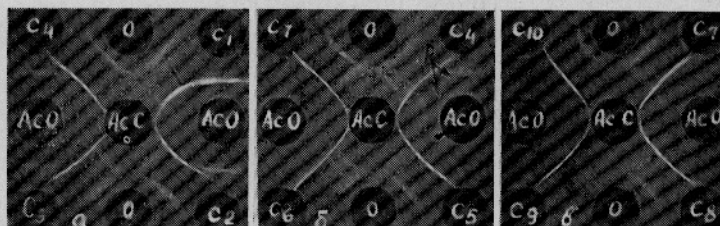


Рис. 8. Исследование частично родственных антигенов путем сравнения с тест-системой:

O—AcO — тест-система: вытяжка ооцитов севриги концентрацией  $\frac{1 \text{ мг}}{8 \text{ мл}}$  белка — соответствующая антисыворотка; C<sub>1</sub>—C<sub>10</sub> — двукратные разведения сыворотки крови севриги; AcC — антисыворотка к сыворотке крови.

икру подсушивали фильтровальной бумагой, тщательно измельчали в ступке и полученную пасту смешивали с антисывороткой. Обработанная таким образом, практически неразведенная сыворотка, утрачивала ряд антител, реакция же остальных антител не изменялась (Апекин, 1968). Вероятно, в ихтиологических исследованиях так же, как и в медицинских, универсальным адсорбентом может служить формализованная печень рыб (Косяков, 1954).

При идентификации частично родственных и общих антигенов возможности истощенных антисывороток ограничены. Здесь встают другие задачи: 1) выбор тест-системы и сопоставление с ней интересующего нас преципитата; 2) количественная оценка антигенов.

Тест-систему выбирают на основании предварительной раститровки и определения оптимальных условий выявления антигена. Дальнейшее сравнение удобно проводить по учетверенной квадратной схеме, которая, сохраняя достоинства первоначального варианта, компактна и экономична (Апекин, Фандеева, 1972). Для примера вернемся к рассмотрению ооцитарного антигена, который несет антигенные свойства белков сыворотки крови и который, как это было показано на рис. 6, б, образует широкий крылообразный преципитат. На основании предварительной раститровки (см. рис. 1, а, б) выбираем тест-систему: вытяжку ооцитов, разведенную до концентрации  $\frac{1}{8}$  мг/мл белка, и цельную антисыворотку к социтам. В этих условиях интересующий нас белок дает интенсивную и четкую полосу, прочие же реакции существенно ослаблены и не мешают анализу. Выбранную систему помещаем, как это показано на рис. 8, а, б, в, в средние лунки формы и сравниваем с ней последовательные двукратные разведения сыворотки крови севриги — в

угловых лунках. По мере разведения сыворотки крылообразный преципитат, образующий шпору, выпрямляется и формируется по диагоналям. При этом от него отщепляются две полоски (отмечено R) — два антигена в сыворотке крови, обнаруживаемые антисывороткой к ооцитам. Таким образом, можно заключить, что рассмотренные антигены ооцитов (белки желтка) содержат две детерминантные группы сывороточных белков.

В случае простых систем возможна полуколичественная оценка сравниваемых антигенов.

По способу Ховарда и Августина (Hayward, Augustin, 1957), в лунки 7- или 9-луночного штампа закапывают через одну антигены стандартной и неизвестной концентрации. Если различия достигают 25%, то многоугольник преципитации становится неравносторонним.

Файнберг (Feinberg, 1956) для количественного определения использовал 7-луночный штамп с большой лункой в центре и маленькими — по периферии. В центральную лунку вносят антисыворотку и после того, как она всосется, в маленькие луночки вносят антиген. Через 24 ч отмечаю луночку, вокруг которой преципитат сформировался полностью. Этот метод улавливает разницу в концентрации в 10%.

В подобном же варианте антисыворотку заранее смешивают с расплавленным 1%-ным агаром (Fahey, McKelvey, 1965; цит. по Гусеву, 1968). В слое агара пробивают ряд лунок и тестируют последовательные разведения известного антигена. После завершения реакции строят кривую зависимости диаметра зон преципитации вокруг лунок от концентрации антигена. Концентрацию исследуемого препарата вычисляют, сравнив величину соответствующей зоны преципитации с построенной калибровочной кривой.

Н. И. Храмовой (1968) предложен чувствительный способ обнаружения и полуколичественной оценки антигена, основанный на том, что его концентрации 0,003 мг/мл и ниже способны еще изменять форму полосы тест-системы. При сравнении сложных смесей относительную количественную оценку отдельных компонентов может дать анализ и сопоставление спектров преципитации, полученных в опытах с одной и той же антисывороткой. Так, при исследовании антигенного состава гипофиза бычка-кругляка с помощью МФ зарегистрировано достоверное количественное изменение гонадотропных факторов — антигенов на разных этапах полового цикла (Апекин, Моисеева, 1973).

Рассмотренные варианты иммунодиффузионного анализа позволяют определить антигенный состав препарата и выяснить некоторые физико-химические свойства антигенов, идентифицировать отдельные антигены в других системах и дать полуколичественную оценку их содержания. Все эти возможности могут быть использованы при решении задач физиологии и биохимии рыб.

#### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Абелев Г. И. Модификация метода преципитации в агаре для сравнения двух систем антиген — антисыворотка. — «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины», 1960, т. 49, № 3, с. 118—120.
- Алтухов Ю. П. Популяционно-генетическое исследование структуры вида у рыб. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биол. наук. М., 1972. 44 с.
- Алтухов Ю. П., Апекин В. С., Лиманский В. В. Основные принципы исследования внутри и межвидовой дифференцировки у рыб серологическими методами. — «Труды АзчерНИРО», 1964, вып. 22, с. 53—71.
- Апекин В. С. Материалы к иммунологическому анализу эмбрионального развития саргана (*Belone belone euxini* Gün.). — «Труды АзчерНИРО», 1964, вып. 22, с. 39—51.



- Апекин В. С. Исследование антигенного состава ооцитов севрюги и его изменений в процессе созревания.— ДАН СССР, 1965, т. 165, № 4, с. 966—969.
- Апекин В. С. Исследование сложной антигенной смеси по Оухтерлони методом расщепления антигена и антисыворотки в одном опыте.— «Лабораторное дело», 1967, № 1, с. 11—13.
- Апекин В. С. Антигенные различия между отдельными партиями ооцитов, полученных от разных самок севрюги и осетра.— ДАН СССР, 1968, т. 181, № 1, с. 230—233.
- Апекин В. С. Исследование методом иммунодиффузии выделений яиц осетровых.— «Журнал общей биологии», 1969, т. 30, № 2, с. 234—238.
- Апекин В. С., Фандеева В. Н. К выяснению природы полостной жидкости осетровых рыб.— «Известия АН СССР. Серия биол.», 1972, № 2, с. 262—265.
- Апекин В. С., Моисеева Е. Б. Изменение антигенного состава гипофиза бычка-кругляка *Gobius melanostomus* в связи с половым циклом.— «Журнал эволюционной биохимии и физиологии», 1973, т. 9, № 1, с. 56—64.
- Балахнин И. А. О применении реакции преципитации для выявления родственных связей рыб.— В кн.: «Рыбная промышленность», № 60, М., 1962, с. 15—23.
- Бойд В. Основы иммунологии. М., ИЛ. 1949. 646 с.
- Бойд В. Белки в реакциях иммунитета.— В кн.: Белки. Под ред. Г. Нейрата и К. Бэйли. т. III, часть I, М., ИЛ. 1958, с. 476—568.
- Гостев В. С. Химия специфического иммунитета. Изд. 2-е. М., 1959. 160 с.
- Гостев В. С. и Шагунова Н. А. Количественная реакция специфического связывания азота белковыми антигенами, сорбированными на дерматоле и бумаге.— «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины», 1957, т. 44, № 10, с. 121—125.
- Грабар П. и Буртэн Н. Иммуноэлектрофоретический анализ. М., ИЛ. 1963. 206 с.
- Гурвич А. Е., Капнер Р. Б., Незлин Р. С. Выделение чистых антител при помощи фиксированных на целлюлозе антигенов и изучение их свойств.— «Биохимия», 1959, т. 24, № 1, с. 13—21.
- Гусев А. И. Микрометод преципитации в агаре.— В сб.: «Иммунохимический анализ». Под ред. Л. А. Зильбера. М., 1968, с. 99—119.
- Закс С. Г. и Соколова М. М. Установление различий между отдельными стадиями нерки (*Oncorhynchus nerka* Wallb.) посредством реакции преципитации.— ДАН СССР, 1961, т. 139, № 6, с. 150—153.
- Зильбер Л. А., Абелев Г. И. Вирусология и иммунология рака. М., Медгиз, 1962, с. 3—392.
- Иммунологический анализ. Под ред. Л. А. Зильбера. М. «Медицина», 1969, с. 3—300.
- Косяков П. Н. Антигенные вещества организма и их значение в биологии и медицине. М. Медгиз, 1954.
- Косяков П. Н., Коростелева В. С. Метод специфической абсорбции в анализе антигенной структуры опухолевых и нормальных тканей человека.— «Труды научной конференции. Иммунологические методы исследования злокачественных новообразований». М., 1959, с. 59—70.
- Лукьяненко В. И. Иммунобиология рыб. Автореферат диссертации на соискание ученой степени д-ра биол. наук. Киев, 1970, с. 3—38.
- Людоговская Л. А. Получение и обработка иммунных сывороток.— В кн.: «Иммунохимический анализ». Под ред. Л. А. Зильбера. М., 1968, с. 5—20.
- Пучков Н. В. Иммунобиологические реакции.— В сб.: «Руководство по методике исследований физиологии рыб». М., 1962, с. 5—14.
- Строганов Н. С., Иевлева Е. С. Определение степени родства у рыб методом преципитации в агаре.— «Зоологический журнал», 1964, т. 43, № 2, с. 27—40.
- Харин Н. Н., Литвинова Н. Н., Гордеева Л. А. Изучение внутривидовой дифференциации судака при помощи реакции преципитации. Научные доклады высшей школы.— «Биологическая наука», 1973, № 3, с. 24—27.
- Храмкова Н. И. Иммунодиффузионные методы в антигенном анализе.— В кн.: «Иммунохимический анализ». Под ред. Л. А. Зильбера. М., 1968, с. 143—164.
- Храмкова Н. И., Абелев Г. И. Пределы чувствительности метода преципитации в агаре.— «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины», 1961, № 12, с. 107—111.
- Aladjem, F., Jaross R. W., Paldino R., Lackner I. The antigenantibody reaction. III. Theoretical considerations concerning the formation, location and curvature of antigenantibody precipitation zone in agar diffusion plates, and a method for determination of diffusion coefficients of antigens and antibodies. *J. Immunol.* 1959. 82, 3, p. 221—231.
- Bjorklund, B. Specific inhibition of precipitation as an aid in antigen analysis with gel diffusion method. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1952, 79, p. 319—324.

- Bjorklund, B. Serological analysis of components in homopoeitic tissue. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1952, 79, p. 324—330.
- Campbell, D. H., Garvey, J. S., Cremer, N. E., Sussdorf D. H. Methods in immunology, London, 1963, 300 p.
- Cohn, M. Production of antibodies in experimental animals. Meth. Med. Res. 1952, 5, 271—284.
- Feinberg, J. G. A new quantitative method for antigen—antibody titrations in gels. Nature (London), 1956, 177, No. 4507, p. 530—532.
- Feinberg, J. G. Identification discrimination and quantification in Ouchterlony gel plates. Int. Arch. Allergy, 1957, 11, No. 3—4, p. 129—152.
- Fine, J. M., Drilhon A., Etude immunologique des protéines du serum de Salmo salar: Etude par immunodiffusion. Compt. Rend. Soc. Biol., 1963, 157, No. 11, p. 18—22.
- Grasset, E., Pongratz E., Brechbuhler T., Analyse immunochemique des constituants des venins de serpents par la méthode de précipitation en milieu gélinifié. Ann. Inst. Pasteur. 1956, 91, No. 2, p. 162—166.
- Hayward, B. J. and Augustin R., Quantitative gel diffusion methods for assay of antigens and antibodies. Int. Arch. Allergy, 1957, 11, p. 192—205.
- Kabat, and Mayer M. M., Experimental immunochemistry. (Springfield III; Thomas Publ.), 1948, 300 p.
- Korngold, L. Immunological cross-reactions studied by the Ouchterlony gel diffusion technique. J. Immunol., 1957, 77, p. 119—122.
- Korngold, L., van Leeuwen, G. The effect of the antigens molecular weight on the curvature of the precipitin line in the Ouchterlony techniques. J. Immunol., 1957, 78, p. 172—177.
- Munoz, J. J. Some newer immunological techniques. Analyt. Chem. 1959, 31, No. 6, p. 981—985.
- Oakley, C. L., Fulthorp, R. Antigenic analysis by diffusion J. Path. Bact. 1953, 65, No. 1, p. 49—60.
- Ohi, J. Water-soluble proteins in the fish egg and their changes during early development. Embryologia, 1962, v. 7, No. 3, p. 208—222.
- Ouchterlony, O., Antigen-antibody reactions in gel. Acta Path. et Microbiol. Scand. 1949, 26, p. 507—515.
- Ouchterlony, O. Antigen-antibody reactions in gel. IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion. Acta Path. et Microbiol. Scand. 1953, 32, 231—240.
- Ouchterlony, O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Progr. in Allergy, 1958, 5, p. 1—78.
- Ouchterlony, O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. II. Progr. in Allergy, 1962, 6, p. 30—154.
- Oudin, J. Méthode d'analyse immunochemique par précipitation spécifique en milieu gélinifié. Compt. Rend. Acad. Sci. 1946, 222, p. 115—116.
- Ridgway, G. J., Clontz, G. W. Intraspecific differences in serum antigens of red salmon demonstrated by immunochemical methods. Bull. Internat. N. Pacif. Fish. Commiss, 8, 1962, 1—13 p.
- Singh, L., Laale, H. W. The antigenic pattern of the developing brain of the zebrafish (*Brachydanio rerio*). J. Exp. Zool., 1972, 182, No. 3, p. 345—356.

### Immunodiffusion in the physiological and biochemical investigations of fish

V. S. Apekin

#### SUMMARY

A possibility of application of the gel immunodiffusional method (according to Ouchterlony) to determination of the antigenic composition of compound protein preparations made of tissues of fish is discussed. Various patterns of precipitation may be obtained when identical, partly—relative and non-identical antigens are compared, which depends upon the concentration of ingredients. Detitration versions and selection of optimum concentrations needed for comparison of two preparations are considered. Antisera of narrow properties are used for revealing partial antigens.