

Electrodiffusion simple en plaques

Dans des recherches personnelles nous avons réalisé une série d'expériences ayant pour but la diminution de l'effet de diffusion circulaire des Ag/Ac¹⁻⁶ par application du courant électrique à la diffusion simple en plaque. Nous envisagions, que la migration électrophorétique de l'albumine sérique humaine (ASH) réagirait en tant que facteur concentrant dirigeant linéairement la plupart sinon la totalité des Ag et d'Ac dans une seule direction, et que pour certaines concentrations des Ag, des résultats positifs devraient se manifester même pendant l'électrophorèse⁷⁻¹⁴.

Le milieu des réactions était constitué par le gel d'agar Bacto-Difco à 1,5% dans un tampon véronal sodique à pH 8,2 force ionique 0,05. Les antigènes et les anticorps ont été mélangés à parties égales avec l'agar à 3%, pH 8,2 force ionique 0,1.

L'albumine sérique humaine (ASH) était utilisée en solutions aqueuses – allant de 20 000 µg/ml à 0,15 µg/ml.

L'immunsérum de lapins anti-sérum humain total a été préparé par nous-même, il était mélangé avec une solution physiologique, et ensuite ce mélange par l'agar de 3% à proportions finales de 1:6, 1:12, 1:24, 1:48.

En vue d'électrophorèse, on a utilisé un courant électrique de 12 V/cm, 30 mA par plaque, qui a duré 45 min à 18°C. La lecture des résultats a été faite 90 min après le début des analyses, à ces fins on s'est servi de la loupe agrandissante à fond éclairé. Ensuite les plaques ont été gardées pendant 24 h à 18°C, puis soumises au lavage à l'eau salée/changée plusieurs fois pendant 3 jours à 4°C, séchées, colorées et lues à la loupe, au densitomètre enregistreur (Figures 1 et 2).

Dans le Tableau, nous avons présenté les résultats des analyses de l'ASH soumise à l'électrodiffusion simple (EDS) en plaques, lus après coloration au Noir Amide. Les chiffres représentent en mm les distances entre le front des précipités et des points de contact Ag/Ac, par le signe +, -, 0 on marquait l'emplacement des précipités, qui se formaient au point de contact Ag/Ac mélangés avec l'agar⁶.

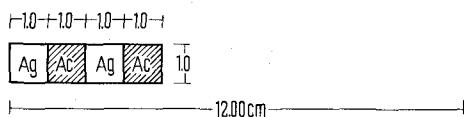


Fig. 1. Schéma de réservoirs dans l'agar qu'on remplissait par les mélanges: l'antigène (Ag)-agar et l'immunsérum (Ac)-agar.

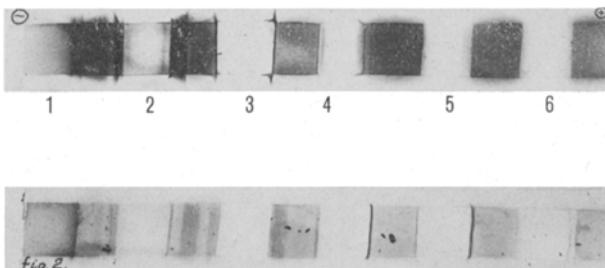


Fig. 2. Photos d'électrodiffusion simple en plaque: réservoirs 1, 2, 3, 4, 5, 6 contiennent respectivement l'ASH en solution 10000 µg - 0,01 µg/0,5 ml; d'autres réservoirs de la rangée du haut – immunsérum dilué 1:6, de la rangée du bas – immunsérum dilué 1:48.

Les chiffres présentés dans le Tableau ont été reportés sur papier milimétrique, ce qui a donné des courbes caractéristiques pour la dilution de l'immunsérum utilisé, courbes mettant en évidence la sensibilité de la méthode appliquée (Figure 3).

Les mêmes plaques que précédemment ont été soumises à la lecture au densitomètre enregistreur, qui traçait les graphiques des densités optiques montrant des pics des précipités à des hauteurs différentes en fonction des concentrations des Ag/Ac étudiés (Figure 4).

Les graphiques d'enregistrement des densités optiques montrant la hauteur des pics en mm en fonction des concentrations des Ag et Ac, plus ces concentrations sont élevées, plus les pics sont hauts; en diluant des immunséums on observe une diminution de la hauteur des pics.

Par le procédé décrit, nous avons étudié les protéines anodiques telles que l'albumine sérique, étant donné que les antigènes et les anticorps sont disposés de façon à ce qu'ils se déplacent les uns vers les autres.

Quant aux protéines cathodiques (immunoglobulines), on se heurte à une difficulté fondamentale, car les immunoglobulines-anticorps comme les immunoglobulines-anticorps dans le milieu d'agar à pH 8,2 du champ électrique migrent vers le pôle négatif.

Pour résoudre ce problème, nous avons réalisé une série d'expériences ayant pour but l'électrophorèse de l'immunoglobuline humaine-anticorps dans l'agar à différents pH et notamment: 5,5-6,3 (point isoélectrique de l'IgG)-7,2-8,2-9,5-10,5, en supposant qu'on pourrait retarder ou même arrêter la migration de l'IgG. Les

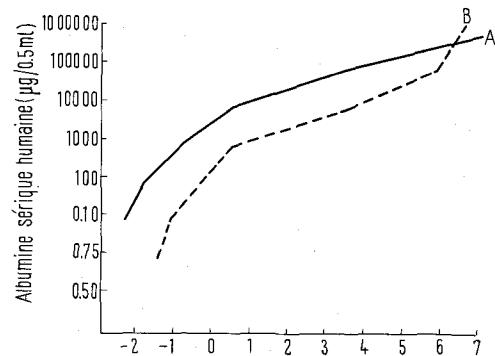


Fig. 3. Courbes tracées selon les résultats de l'EDS (voir Tableau). A) immunsérum dilué 1:6. B) immunsérum dilué 1:48.

- ¹ G. MANCINI, A. O. CARBONARA et J. F. HEREMANS, Immunochemistry 2, 235 (1965).
- ² W. BECKER, Clin. chim. Acta 23, 509 (1969).
- ³ J. L. FAHEY et E. M. MCKELVEY, J. Immun., in press.
- ⁴ V. LOPEZ et S. GOLDER, Clin. chim. Acta 21, 517 (1968).
- ⁵ J. FEINBERG, Int. Arch. Allergy 33, 120 (1968).
- ⁶ R. J. WIEME et E. M. VEYS, Clin. chim. Acta 27, 77 (1970).
- ⁷ A. BUSSARD, Biochim. biophys. Acta 34, 258 (1958).
- ⁸ E. GAJOS, Experientia 26, 1007 (1970).
- ⁹ A.-B. LAURELL, A. SJÖHOLM et U. JOHNSON, Clin. exp. Immun. 7, 423 (1970).
- ¹⁰ L. SCOLARI, J. J. PICARD et J. F. HEREMANS, Clin. chim. Acta 19, 25 (1968).
- ¹¹ C.-B. LAURELL, Analyt. Biochem. 15, 45 (1966).
- ¹² C.-B. LAURELL, Analyt. Biochem. 10, 359 (1965).
- ¹³ M. LOPEZ, T. TSU et N. E. HYSLOP, Immunochemistry 6, 513 (1969).
- ¹⁴ D. MERILL, T. F. HARTLEY, H. CLAMAN, J. Lab. clin. Med. 69, 151 (1967).

Electrodiffusion simple en plaque

Dilution de l'immunsérum	Quantités de l'ASH dans 0,5 ml de solution (μg)						
	10000	1000	100	10	1	0,1	0,75
1: 6	+7,2	+3,6	+4,2	-1,0	-1,8	-2,4	
1: 12	+6,8	+5,1	+1,0	-1,0	-1,8	-2,4	
1: 24	+6,6	+5,6	+2,5	-0,4	-0,8	-1,8	
1: 48	+6,4	+5,8	+3,5	+0,5	-0,4	-1,2	-1,5

Les chiffres représentent en mm les distances entre les fronts de précipités et les points de contact Ag/Ac.

immunoglobulines-anticorps ont été incorporés dans l'agar à pH 8,2.

Comme résultat, il a été constaté qu'au pH appliqué, la vitesse de migration d'IgG accuse de petites différences mais elles sont si peu marquées, qu'on ne peut les prendre en considération; au pH 5,5 l'IgG précipitait par dénaturation acide.

Dans une autre expérience, nous avons tenté de réaliser l'EDS en plaque d'agar à pH 8,2 en utilisant l'IgG humaine et l'immunsérum anti-protéines humaines, bien que les deux réactifs se caractérisant par la même direction de migration électrophorétique. Il a été observé que dans l'EDS en plaques des immunoglobulines (Ag), les précipités sont toujours situés dans des réservoirs contenant les mélanges l'IgG-anticorps/agar. Avec dilution de l'immunsérum utilisé, on obtient des précipités plus faibles.

Les plaques peuvent être soumises à la lecture au densitomètre enregistreur qui traçe des graphiques de pics constitués par des précipités. En fonction d'un immunsérum dilué, les pics densitométriques sont plus hauts ou plus bas.

Les investigations entreprises, ont permis de constater que l'électrodiffusion simple en plaque s'adapte bien aux analyses qualitatives et quantitatives d'albumine, qui est une protéine anodique à pH 8,2. L'application du courant électrique augmente le rendement des analyses, étant donné que sous son action les Ag et Ac se déplacent

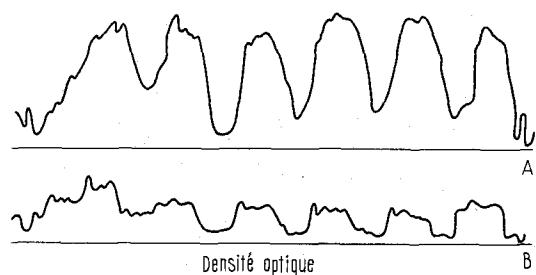


Fig. 4. Graphiques d'enregistrement de densités optiques (voir Figure 2): A) immunsérum dilué 1:6, B) immunsérum dilué 1:48.

plus énergiquement les uns vers les autres dans le gel, grâce à leur charge électrique opposée⁶⁻¹¹.

Les immunoglobulines - antigènes ou anticorps - se prêtent aussi aux analyses d'EDS donnant des résultats réguliers bien que dans ce cas la précision des réactions puisse être influencée par le fait que les immunoglobulines (anticorps) et les immunoglobulines (anticorps) se déplacent dans le champ électrique vers la cathode.

Appliquant la méthode EDS à l'étude d'un système donné Ag/Ac, on peut déterminer quantitativement les antigènes recherchés s'il y a excès d'anticorps par rapport aux anticorps ou inversement, ou s'ils se trouvent au point d'équivalence.

Summary. A simple electrodiffusion method on plates at pH 8.2 is described. Migration of proteins is accelerated by combination of diffusion and electrostatic forces. This procedure has several advantages: the results are obtained in much shorter time, antigens and antibodies are concentrated and for this reason the precipitation bands are visible at very low concentration of proteins. The results of this method can be presented graphically.

E. GAJO

Institut d'Immunologie et de Thérapie Expérimentale Service d'Immunochimie, Wroclaw (Pologne), 18 mars 1971.

A Method for Time-Lapse Cinematography of Primitive Streak Stage Rat Embryos in Culture

The study of morphogenetic movements in living mammalian embryos presents many difficulties. With membranes intact, the embryos are too opaque and three-dimensional for clear high-power photographs, but an isolated, flattened embryonic disc may not survive long at early stages and undergoes at best a stunted development. Some limited success was achieved by earlier

workers with rabbit and mouse embryos of primitive streak stages grown on plasma clots¹⁻⁴, and more recently DANIEL and OLSON⁵ were able to follow some of the cel

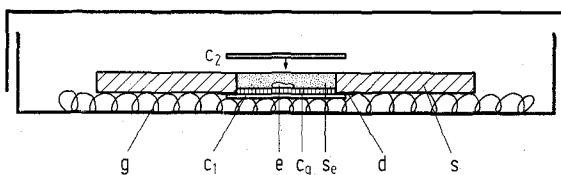


Fig. 1a. Culture slide, enclosed in Petri dish. C₁, C₂, coverslips; C_g, collagen; d, DPX seal; e, embryo; g, gauze; s, slide; Se, serum.

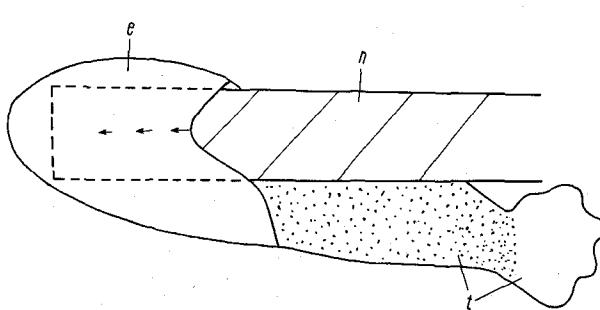


Fig. 1b. Diagram of operation. Arrows show direction of cut. e, embryonic vesicle; n, glass needle; t, trophoblast region. ---, part of needle inserted into vesicle.