

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для исследования антигенного состава биологических материалов, а также для определения чистоты, качественного и количественного состава иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) методом иммуноэлектрофореза (ИЭФ) в агаровом геле, сочетающим методы зонального электрофореза и иммунодиффузию.

В процессе иммуноэлектрофореза в гелях или на пленках из ацетата целлюлозы с помощью методов простой или двойной иммунодиффузии происходит реакция между растворимыми белками и специфическими по отношению к ним преципитирующими антителами. Количественное определение белков можно осуществлять с помощью электрофореза в среде, содержащей антитела (электроиммуноанализ, электроиммунодиффузия, ракетный иммуноэлектрофорез). Антигенную природу белковых компонентов можно исследовать путем их сравнения с известными маркерами.

Эффективность иммунохимических тестов зависит от специфичности используемых антисывороток, а также от их титра и сродства к антигенам.

Обычно иммуноэлектрофорез представляет собой сочетание электрофореза в агаровом (или агарозном) геле с последующей двойной иммунодиффузией в той же среде. При двухмерной двойной иммунодиффузии антиген и антитела, помещенные в круглые или прямоугольные углубления в геле, мигрируют навстречу друг другу, в результате чего при встрече образуются линии (дуги) преципитации. Положение полос преципитации зависит от коэффициента диффузии антигена, его концентрации относительно антител (скорость диффузии антитела можно рассматривать как постоянную). Определенное соотношение концентраций антигена и антител, которое является оптимальным для образования преципитата называется зоной эквивалентности. При этом получают четкие линии преципитации.

Концентрация (титр) антител в иммунной сыворотке также может значительно варьировать. Возможна ситуация, при которой зоны эквивалентности для разных компонентов смеси не будут перекрываться. Для подбора эквивалентного соотношения антиген-антитело иммуноэлектрофорез многокомпонентных смесей рекомендуется проводить при нескольких относительных концентрациях антиген-антитело, так как при использовании только одной такой концентрации можно не обнаружить те или иные компоненты.

Метод иммуноэлектрофореза в агаровом геле

Обработанную спиртом стеклянную пластину размером 90x120 мм помещают строго горизонтально на предметный столик. Охлажденный до температуры $(45 \pm 5)^\circ\text{C}$ агаровый гель наносят на стеклянную пластину в количестве 18,0-20,0 мл. После застывания при комнатной температуре через 20-30 мин на пластине образуется агаровый слой толщиной 2,0-2,5 мм.

После застывания геля в нем по специальному трафарету вырезают 6-7 лунок диаметром 1-2 мм. Лунки заполняют испытуемым образцом в объеме, не превышающем объем лунки (по 2 лунки на каждый испытуемый образец). При этом в верхнюю и нижнюю лунки стеклянной пластинки с гелем вносят контрольный образец - нормальную сыворотку крови человека ("Стандартный образец тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза" или иной контрольный образец в соответствии с указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации), окрашенный пиронином Б (или иным красителем, указанным в фармакопейной статье или в нормативной документации).

В мерный цилиндр вместимостью 1000 мл вносят 500 мл веронал-мединалового или боратного

буферного раствора, доводят объем раствора до метки водой очищенной и перемешивают. Полученный раствор (или иной буферный раствор указанный в фармакопейной статье или нормативной документации) наливают в электродные секции камеры прибора для электрофореза.

Пластину с подготовленным гелем помещают в прибор для электрофореза и соединяют с буферным раствором в электродных камерах прибора с помощью нескольких слоев фильтровальной бумаги. В случае конструкции прибора для электрофореза, предусматривающей соединение агара на пластине с электродным буфером с помощью агаровых столбиков, пластину устанавливают в уравновешенный прибор и заливают расплавленным агаром до его соединения с агаровыми столбиками и образования слоя геля толщиной 1-2 мм.

Прибор для электрофореза накрывают крышкой и включают источник питания (напряжение 70-200 В, сила тока 10-40 мА). Электрофорез проводят в течение 1,5-3 ч до момента, когда пятно пиронина Б, соответствующее миграции альбумина, будет находиться на расстоянии 20-25 мм от лунки.

После проведения электрофореза с помощью специального трафарета между лунками в агаровом геле вырезают продольные "канавки" (параллельные направлению миграции). В "канавки" вносят по 0,25 мл преципитирующей антисыворотки: против сывороточных белков крови человека (при проведении испытаний фракционного состава) или поливалентную сыворотку против сывороточных белков крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи (для подтверждения подлинности).

Пластину с агаровым гелем помещают во влажную камеру и выдерживают при температуре (5 ± 3)°С в течение 24-48 ч.

Для отмывания белков, не вступивших в реакцию преципитации, пластину с агаром помещают в кюветы, заливают 0,9% раствором натрия хлорида и выдерживают в течение 16-18 ч. Раствор меняют 3-4 раза. Затем пластину извлекают из 0,9% раствора натрия хлорида, накрывают фильтровальной бумагой, смоченной в 0,9% растворе натрия хлорида и высушивают на воздухе до превращения агарового геля в тонкую пленку. После этого пластину с высушенным гелем накрывают фильтровальной бумагой, смоченной в 0,9% растворе натрия хлорида, не оставляя пузырьков воздуха, и высушивают при комнатной температуре или в сушильном шкафу при температуре не выше 40°С. После высушивания пластинки фильтровальную бумагу смачивают водой и аккуратно удаляют.

Для окрашивания белков используют краситель амидочерный 10Б или другой пригодный краситель (в соответствии с указаниями в фармакопейной статье или нормативной документации), помещая пластину в кювету с красящим раствором на 30-40 мин. Затем пластину промывают в растворе для отмывки агара (2% раствор уксусной кислоты или иной раствор, в соответствии с указаниями в нормативной документации) в течение 15-40 мин до полного отсутствия окрашенного фона и снова высушивают при комнатной температуре или в сушильном шкафу при температуре не выше 40°С.

Липопротеиды окрашивают суданом черным В. Для окрашивания полностью высушенные пластины помещают на 3 ч в красящий раствор, затем обесцвечивают 50% этанолом до полного просветления фона. Липопротеиды окрашиваются в темно-синий цвет. Следует проводить окрашивание полностью высушенного препарата, так как судан черный В нерастворим в воде и окрашивает влажный гель.

Учет результатов при исследовании фракционного состава препаратов иммуноглобулинов человека проводят визуально путем сравнения электрофореграммы испытуемого образца с электрофореграммой контрольного образца - нормальной сыворотки крови человека ("Стандартный образец тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза" или иной контрольный образец в соответствии с указаниями в нормативной документации), которая должна проявлять регламентированное количество линий преципитации с сывороткой против сывороточных белков крови человека (не менее 15 линий преципитации при использовании "Стандартного образца тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза"). Основным компонентом препарата иммуноглобулинов человека должен соответствовать иммуноглобулин G (Ig G) нормальной сыворотки крови человека.

Учет результатов при проведении исследований по подтверждению подлинности препаратов

крови человека проводят визуально путем выявления линий преципитации с сывороткой против сывороточных белков крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи. Должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против сывороточных белков крови человека.

Примечания

1. Приготовление 0,05М веронал-мединалового буферного раствора ($\text{pH } 8,6 \pm 0,1$). В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 1,38 г веронала, 8,76 г мединала, добавляют воды очищенной до метки и перемешивают до полного растворения.

2. Приготовление 0,05М боратного буферного раствора ($\text{pH } 8,6 \pm 0,1$). В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 6,7 г борной кислоты, 13,4 г натрия тетраборнокислого 10-водного, добавляют воды очищенной до метки и перемешивают.

3. Приготовление 1,25% агарового геля. Приготовление агарового геля осуществляют одним из следующих способов:

а) Для приготовления 1,25% агарового геля используют 0,05М веронал-мединаловый буфер ($\text{pH } 8,6 \pm 0,1$) с удвоенной концентрацией солей (соответственно, 2,76 г веронала и 17,52 г мединала на 1000 мл воды очищенной).

б) Для приготовления 1,25% агарового геля используют боратный буферный раствор ($\text{pH } 8,6 \pm 0,1$) с удвоенной концентрацией солей (соответственно: 13,4 г борной кислоты и 26,8 г натрия тетраборнокислого 10-водного на 1000 мл воды очищенной).

В химический стакан вместимостью 1000 мл вносят 12,5 г агара, добавляют 500 мл воды очищенной и оставляют для набухания геля в течение часа при температуре $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$. Стакан с содержимым помещают в кипящую водяную баню и выдерживают до полного расплавления агара. Объем раствора геля доводят водой до 500 мл, затем добавляют равный объем веронал-мединалового или боратного буферного раствора (или иного буферного раствора, указанного в фармакопейной статье или в нормативной документации). Раствор агара фильтруют через 2-3 слоя марли, прибавляют тиомерсал до концентрации 100 мкг/мл и разливают во флаконы по 40-50 мл (количество, необходимое на две пластинки). Расплавленный агар должен быть прозрачным.

4. Приготовление красящего раствора амидочерного 10Б. Приготовление раствора красителя осуществляют одним из следующих способов:

а) В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 1,0 г амидочерного 10Б, 450 мл 0,1М раствора уксусной кислоты, 550 мл 0,1М раствора натрия ацетата и перемешивают.

б) В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 1,0 г амидочерного 10Б, 100 мл уксусной кислоты ледяной, доводят объем до метки водой очищенной и перемешивают. Через 12 ч фильтруют через бумажный фильтр.

5. Приготовление красящего раствора судан черный В. В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 1,2 г судана черного В, 20 мл 1М раствора натрия гидроксида, 380 мл воды очищенной и доводят объем раствора этанолом абсолютным до метки и перемешивают. Смесь непродолжительное время кипятят, охлаждают до комнатной температуры и после остывания краситель переливают в темную склянку с притертой пробкой. Реактив хранят при комнатной температуре в течение 3 мес.

6. Приготовление 2% раствора уксусной кислоты для отмывки агара. В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 20,0 мл уксусной кислоты ледяной, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Реактив хранят при комнатной температуре в течение 3 мес.