

Prof. Dr. H. J. Langner, Berlin

Eine Apparatur für die "Micro-Slide-Immundiffusion"⁺⁾

Sonderdruck aus "Die Fleischwirtschaft", 52. Jahrgang, Januar 1972 - Heft 1 - Seite 61-64

Immunologische Analysenverfahren finden in letzter Zeit in immer stärkerem Maße Eingang auch in die Lebensmittelüberwachung. Diese Verfahren setzen voraus, daß hochwertige Antiseren zur Verfügung stehen, aber auch eine weitgehende Standardisierung aller für dieses Verfahren wichtiger Parameter. In der folgenden Arbeit wird eine Apparatur beschrieben, die es gestattet, im Mikromaßstab immunochemische Trennung durchzuführen. Für die Lebensmittelüberwachung werden damit sonst nur schwierig zu bestimmende Stoffe wie Milch-, Soja- und Hühnereiweiß, Blutplasma, Bakterientoxine, wie Staphylokokken-Enterotoxine usw., leichter und spezifischer nachweisbar. Dabei ist sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Aussage möglich. Durch Zurverfügungstellung von hoch standardisierten und streng genormten Teilen und Reagentien ist die Gewähr gegeben, Untersuchungsergebnisse in Routine und Forschung reproduzierbar zu machen. Bei optimaler Ausnutzung aller für ein immunologisches System wichtigen Parameter lassen sich 0,0005 µg Antigen und weniger eindeutig erfassen.

An apparatus for micro-slide immune diffusion

Immunological methods of analysis have recently come to be used more and more in food inspection. These methods require the availability of high value anti-sera and they also demand far-reaching standardisation of all parameters important to the method. The author describes an apparatus which makes it possible to carry out immuno-chemical separation in the micro-scale. In food inspection substances such as milk, soya and egg protein, blood plasma, bacterial toxins such as staphylococcal enterotoxins etc., which are difficult to determine, become more easily and more specifically detectable when this method is used. It is also possible to obtain qualitative as well as quantitative information. By making available highly standardized and strictly controlled parts and reagents it is possible to ensure reproducible experimental results in both research and routine work. If all the parameters of importance to an immunological system are fully utilised, 0.0005 µg antigen or less can be detected.

⁺⁾ Die vollständige Beschreibung erfolgte in der Fleischwirtschaft 52, 61-64, 1972 (mit 12 Abbildungen)

Un équipement pour la "Micro-Slide-Immunodiffusion"

Des procédés immunologiques d'analyses se pratiquent dernièrement dans une mesure de plus en plus importante pour la surveillance alimentaire. Ces procédés présupposent qu'on dispose d'antisérums de haute valeur, ainsi que d'une standardisation étendue de tous les paramètres nécessaires. Le présent travail décrit un équipement, permettant l'exécution de séparations immuno-chimiques en quantités microscopiques. Il est ainsi possible pour la surveillance alimentaire de détecter plus facilement et plus spécifiquement des matières dont la détermination n'est que difficilement possible, comme p.ex. les albumines de lait, de soja et de blanc d'œuf, le plasma sanguin, les toxines bactériennes, les entérotoxines de staphylocoques etc. Le procédé permet aussi bien une énonciation qualitative que quantitative. La mise à disposition de matière et agents sévèrement normalisés permet de reproduire les résultats des recherches dans la pratique courante et scientifique. L'utilisation optimale de tous les paramètres qui sont importants pour un système immunologique permet de dénombrier 0,0005 µg d'antigène et même moins.

Die Analytik muß sich auf immer empfindlichere Nachweismethoden einstellen. Substanzen müssen heute in so kleinen Mengen isoliert und nachgewiesen werden, wie das noch vor wenigen Jahren unvorstellbar gewesen wäre. Die verschiedensten analytischen Methoden gelangen dabei zur Anwendung. Eine schon immer sehr empfindliche Nachweismethode ist die Immundiffusion. Sie gestattet es, ohne allzu große Schwierigkeiten analytisch im Nanogrammbereich zu arbeiten. Die erste eingehendere Beschreibung dieser Methode wurde 1952 von Oudin gegeben. Abwandlungen dieser damals beschriebenen Methode wurden u.a. von Ouchterlony und Crowle empfohlen. Alle Autoren beschränkten sich aber darauf, immer nur einzelne Schritte innerhalb des Analysenganges zu verändern und den eigenen analytischen Problemen anzupassen. Dabei ist es gerade bei diesem Verfahren ungemein wichtig, bei allen Analysenschritten unter exakt definierten Bedingungen zu arbeiten. Sinn dieser Arbeit soll es sein, hier einige Parameter zu standardisieren, was im folgenden beschrieben wird.

Neuentwicklung einer standardisierten Ausrüstung

Die hier angedeuteten Analysenvoraussetzungen schafften die Grundlagen zur Entwicklung einer standardisierten Ausrüstung für die "Micro-Slide-Immundiffusion".

In der Abbildung 9 ist die vollständige Apparatur gezeigt. Sie besteht aus folgenden Einzelteilen:

1. Diffusionskammer mit Brückengliedern zur Aufnahme der Slides (Abbl. 10)

2. 100 Micro-Slides aus Kunststoff mit standardisierter Diffusionsfläche (Modell) (Abb. 11).
3. 100 Kunststoff-Templates (Modell) (Abb. 11).
4. Verkapselte Flasche mit Instant-Agar, Puffersalzen und Merthioalte, fertiggemischt, direkt zur Herstellung von 100 ml 1,2%igem gepuffertem Agar.
5. 100 Glaspipetten zur Aufgabe der Antigen- und Antikörperlösungen (Abb. 11).
6. 1 Normpipette zur Aufgabe des Diffusionsagars.
7. 50 Luftblasenentferner (Abb. 12).
8. Thiazinrot, gemischt mit Zitronensäure für 1 Liter Färbelösung (Abb. 12) (0,1%ig an Thiazinrot und 1%ig an Zitronensäure).
9. 3 Färbe- und Entfärbekammern (Abb. 12).
10. Stempel für Dokumentationszwecke (Abb. 12).

Alle Teile, insbesondere die für den Diffusionsbereich, sind streng genormt und erlauben es, unter exakt definierten Analysenbedingungen zu arbeiten.

Die Diffusionskammer wird dazu circa 1 cm hoch mit destilliertem Wasser gefüllt, um so eine wassergesättigte Atmosphäre zu schaffen.

Die Micro-Slides mit doppelter Diffusionsfläche sind aus Kunststoff, ebenso die Templates. Ein Aufbringen von Haftagar ist nicht mehr erforderlich. Lediglich die Templates sollten mit einer sehr dünnen Siliconfettschicht auf der Auflagefläche versehen werden. Dadurch lassen sie sich nach der Diffusion leichter von der Agarschicht abschieben.

Die Flaschen mit dem Instant-Agar sind hitzestabil, so daß in ihnen durch direkte Zugabe von 100 ml dest. Wasser der erforderliche (für Staphylokokkenenterotoxine und Antiseren) 1,2%ige, gepufferte und konservierte Diffusionsagar hergestellt werden kann. Nach dem Auflösen in der Wärme sollte der dann auf etwa 60°C gehaltene Agar mit einer Meßpipette auf die Diffusionsflächen der Slides aufgegeben werden (0,3-0,4 ml). Danach werden die Templates vorsichtig auf den noch flüssigen Agar aufgelegt. Die so vorbehandelten Slides (mit Agar und Templates) sind nun fertig zur Aufnahme der Antigen- und Antiserumverdünnungen. Diese Verdünnungen werden mit den beigegebenen Glaskapillaren in die jeweiligen Löcher gegeben (ca. 0,02 ml). Im allgemeinen kommt dabei die Antiserumverdünnung in das mittlere Bassin, die Antigenverdünnung in die umliegenden Bassins. Grundsätzlich muß aus jedem gefüllten Loch mit den beigegebenen Luftblasenentfernern evtl. vorhandene und eingeschlossene

ne Luft entfernt werden. Die so vorbereiteten Slides bleiben zwei bis drei Tage bei konstanter Temperatur (sehr günstig 25°C) in der feuchten Kammer. Danach werden die Templates vorsichtig von der Agardiffusionsschicht abgeschoben, und die Oberfläche des Agars vorsichtig, unter Schräghaltung der Slides mit dest. Wasser abgespült. Anschließend werden die Slides in der Färbekammer für zwei Minuten in einer 0,1%igen Thiazinrotlösung in Zitronensäure gefärbt und danach zweimal je zwei Minuten in reiner Zitronensäurelösung entfärbt. (Die Agarschicht wird dabei nicht vollständig entfärbt).

Danach können die Slides auf vorhandene oder nicht vorhandene Präzipitationslinien gegen einen dunklen Hintergrund abgelesen werden. Es ist sowohl eine qualitative wie quantitative Bestimmung möglich. Bei einer Überprüfung des Systems auf seine Empfindlichkeit konnten wir zeigen, daß bei einer Diffusion von Rind-Serum-Albumin/Anti-Rind-Albumin noch 0,0005 µg RA absolut nachgewiesen werden konnten. Durch Variation weiterer Parameter läßt sich sicherlich die Empfindlichkeit noch steigern, da es verhältnismäßig große Schwierigkeiten bereitet, alle Variablen exakt zu bestimmen.

Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, das im Agargel vorhandene Präzipitatomuster auf Papier zu übertragen. Hilfsmittel dazu ist ein Dokumentationsstempel, der dem Kit beigegeben wurde.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Apparatur beschrieben, die es gestattet, im Micromaßstab immunochemische Trennungen durchzuführen. Die für diese Arbeiten wichtigen Parameter - Diffusionsschichtdicke, Agarkonzentration, Temperatur, Feuchtigkeit usw. - lassen sich, durch die Verwendung standardisierter und streng genormter Teile, sehr gut einhalten oder einstellen. Damit ist die Gewähr gegeben, Untersuchungsergebnisse zu reproduzieren. Geeignet ist diese Apparatur z.B. für den Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen und anderen antigenwirksamen Substanzen. Bei optimaler Ausnutzung aller wichtigen Parameter lassen sich noch 0,0005 µg Eiweiß (Antigen) bequem erfassen.

Working Procedure for the Microslide Kit:

A) Contents of the Kit

=====

1. Tools

Pieces

(50)	Microslides
(100, for 4 tests ea.)	Templates
(1,000)	Micropipettes
(50)	Debubblers
(1)	Diffusion chamber
(1)	Bridge for microslides (40 tests)
(1)	Measuring pipette (1 ml)

- (3) Trays for staining and destaining
 (1) Rubber stamp for marking results

2. Chemicals

- (1 flask) 7 X Detergent concentrate
 (2 tubes) Instant Agar MD (1.5% agar, Barbitol-
 buffer pH 7.4, merthiolate)
 (2 tubes) Thiazin red concentrate for 500 ml
 staining solution
 (2 tubes) Citric acid for 500 ml destaining
 solution
 (1 tube) Silicon grease

B) Preparations

=====

Prepare a 5% solution of the detergent 7 X concentrate, and warm to 60°C. Place microslides into the detergent solution and defat for about 1 hr at this temperature. Rinse plates thoroughly with tap water, afterwards with demineralized water, and let dry.

The diffusion chamber should be placed as level as possible and where temperature changes are moderate. An incubator, adjusted to 20-25°C, is well suited. Water about 1 cm high is placed into the chamber. The bridge which accommodates the microslides is inserted.

1. Preparation of the Agar

One package of Instant Agar MD contains all the ingredients for 100 ml diffusion agar including a preservative. 100 ml demineralized water are accurately measured into an Erlenmeyer-flask. The agar is added to the water, and the mixture is heated on a steam bath until the solution is completely clear. For casting the slides, the agar should be kept as hot as possible. 0.35 ml of liquid agar is measured with the measuring pipette onto each moulded depression of the slides. The templates are lowered onto the discs of liquified agar by putting one edge in place first and then slowly bringing the other edge down. Care must be taken that the agar is not forced upwards through the small openings of the templates. Some workers recommend application of a very thin layer of silicon grease onto the bottom side of the templates. The agar solidifies very rapidly, and the tests can be started. The wells of the templates must not contain any air bubbles, otherwise, the slide cannot be used.

2. Applying the Samples

The reference antigen and the test samples are placed into the peripheral wells of the template; whereby customarily

the upper left and lower right are charged with the known standard antigen. The unknown samples are placed in the other two wells.

Concentration of the reference antigen should be 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The micropipettes included in the kit are used to fill the conical openings of the templates to the extent that a slightly convex surface is formed. This corresponds to a volume of about 0.025 ml. The central opening accommodates the antiserum. The most favorable dilution of the antiserum must be determined with each new batch. For this purpose, a dilution series using Brain Heart Infusion (0.37% B.H.I. containing merthiolate 1:10,000) as a diluent is prepared as follows: 1: 25; 1 : 50; 1 : 100; 1 : 200; 1 : 400.

All droplets in the templates should be routinely stripped of tiny little bubbles (sometimes barely visible) by immersing individual debubblers. All instruments and pipettes should be immediately placed into a large container with water containing the cationic detergent, since the test material may be quite toxic.

The microslides are placed onto the bridge of the diffusion chamber, the cover is closed tightly. It takes 2-3 days to complete the diffusion.

3. Staining of the precepitates

The staining and destaining solutions are prepared by adding the thiazin red and the citric acid to each of 500 ml of demineralized water. Staining solution is placed into one tray, two other trays are filled with destaining solution.

To remove the templates, the microslides are held horizontally, and the templates are gently slid off the agar, leaving its surface unmarred. The agar gel surface should be washed gently with water to remove any lint or residue. The slides are placed vertically into the staining trough, removed after 2-3 minutes and washed with distilled water. Excess water is allowed to drain off, and the slides are immersed into the two destaining solutions for 2-3 minutes each time. Complete destaining of the gel cannot be expected. The stained precipitin lines can clearly be recognized, especially in artificial light.

4. Documentation

The pattern of the precipitin lines seen on the slides may be sketched onto the diagrams, printed by means of the rubber stamp, for permanent records.

(476)

The microslides can be preserved in the moist state in 1% citric acid for an indefinite period of time. If the slides are to be dried, they should be held in the acid solution containing 1% glycerol to prevent cracking of the dried agar film.