دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی
سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه ایمونولوژی

جلسه یازدهم:
تست SRID
(پرسیپیتاسیون)

تهیه کننده : سهیلا عباسی

واکنش پرسیپیتاسیون یا رسوبی

- اگر در واکنشهای سرولوژی Ag ذره ای محلول باشد(مانند هورمونها،پروتئینها و...) واکنش رسوبی یا پرسیپیتاسیون نامیده می شود. این واکنش در محیط نیمه جامد مانند ژل صورت می پذیرد

تهیه کننده : سهیلا عباسی

انتشار مولکول های آنتی ژن و آنتی بادی در ژل

تکنیک‌های انتشار مولکول‌های آنتی‌بادی و آنتی‌ژن در ژل یا اصطلاحاً تکنیک‌های ایمونودیفیوژن[۲] تکنیک‌هایی هستند که برای تعیین، تشخیص و اندازه‌گیری مولکول‌های آنتی‌بادی و آنتی‌ژن استفاده می‌شوند. اساس این روش‌ها به این صورت است که در بستر ژل، اکثر مولکول‌های پروتئینی آنتی‌بادی و آنتی‌ژن منتشرشده و پس از برخورد با یکدیگر و تشکیل شبکه‌ای درهم‌تنیده از کمپلکس‌های آنتی‌بادی-آنتی‌ژن، خط رسوبی و یا باند رسوبی شیری‌رنگی را به‌وجود می‌آورند.

تکنیک‌های ایمونودیفیوژن به دو روش انجام می‌شوند: ۱) ایمونودیفیوژن دوطرفه (DID[۳]) ۲) ایمونودیفیوژن یک‌طرفه دایره‌ای (SRID[۴])

تهیه کننده : سهیلا عباسی

تکنیک های رسوب کمپلکس های ایمنی در آگار

یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های آنتی‌بادی‌ها، توانایی آن‌ها در رسوب دادن مولکول‌های آنتی‌ژن از محیط محلول می‌باشد. علت این امر واکنش آنتی‌بادی‌های اختصاصی و مولکول‌های آنتی‌ژن و تشکیل شبکه‌ای[1] از کمپلکس‌های درهم‌تنیده آنتی‌بادی–آنتی‌ژن می‌باشد که به علت درشتی بیش‌ازاندازه نمی‌تواند در محلول باقی بماند و درنتیجه رسوب می‌نماید.

البته لازم به ذکر است همیشه رسوب کمپلکس‌های ایمنی پس از برخورد مولکول‌های آنتی‌بادی و آنتی‌ژن اتفاق نمی‌افتد. همان‌طور که در فصل اول کتاب اشاره شد، غلظت نسبی مولکول‌های آنتی‌بادی و آنتی‌ژن، در تشکیل کمپلکس‌های ایمنی بزرگ و درهم‌تنیده در محیط محلول، مؤثر است به‌طوری‌که در موارد افزایش نسبی غلظت هرکدام از مولکول‌های آنتی‌بادی (منطقه پروزون) و آنتی‌ژن (منطقه پستزون) نسبت به یکدیگر، تنها کمپلکس‌های ایمنی بسیار کوچک و سبک شکل‌گرفته و رسوب ایمنی[2] اتفاق نمی‌افتد بلکه تنها در منطقه تعادل[3] هست که رسوب ایمنی اتفاق می‌افتد.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

آگار و آگارز

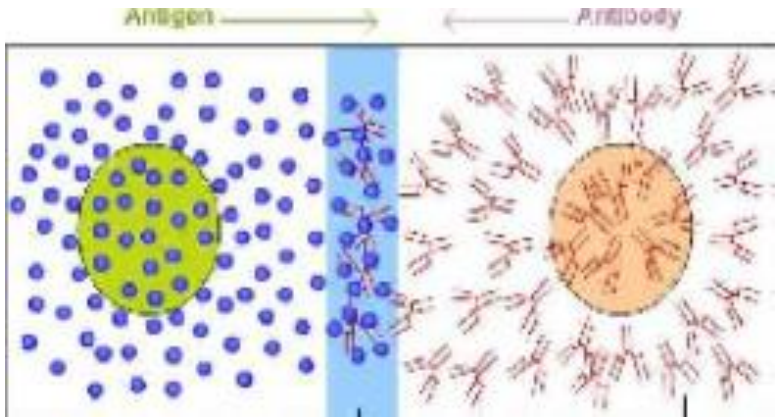
آگار یک پلی ساکارید پیچیده با وزن مولکولی بالا می‌باشد که از جلبک‌های دریایی به دست می‌آید. آگار در دماهای بالا (حدود ۹۰ درجه سانتی‌گراد) در محلول‌های آبی، حل و هنگام سرد شدن در دمای حدود ۳۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد تبدیل به ژل[1] می‌شود. آگاروز شکل خالص یافته تر آگار می‌باشد.

معمولاً تکنیک‌های رسوب ایمنی، در بستر ژلی که از حل کردن ۱ تا ۲ گرم آگار یا آگاروز در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین (PBS) حاصل می‌شود، انجام می‌گردد. این بستر ژل، به‌اندازه کافی مقاوم بوده و دارای منافذ با قطر مناسب جهت حرکت مولکول‌های پروتئینی می‌باشد.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

واکنش های رسوبی یا پرسیپتاسیون

هرگاه یک آنتی ژن محلول را در حضور آنتی بادی اختصاصی آن در محیط مایع یا نیمه جامد مانند آگار قرار دهیم مولکولهای این دو پس ازرسیدن به هم و تشکیل کمپلکس، واکنش رسوبی ایمنی یا ایمونو پرسیپتاسیون Immunoprecipitation ایجاد می کنند.
براساس اینکه در ژل فقط یکی از مولکولها (آنتی ژن یا آنتی بادی) یا هردو مولکول به طرف یکدیگر انتشار پیدا کنند دو روش وجود دارد



انتشار دو طرفه DID(Double Immuno Diffusion) یا روش (Ouchterlony)

یک تست کیفی است که بر اساس نفوذ هر دو مولکول آنتی ژن و آنتی بادی در آگار استوار است. هنگامی که این دو مولکول را جداگانه در دو حفره مقابل هم در آگار بریزیم دو مولکول با انشار شعاعی در همه جهات در آگار نفوذ می کنند و سه حالت ایجاد می کنند.

دو آنتی ژن مشابه هستند :Identity

دو آنتی ژن دارای یک یا چند اپی توپ مشترک هستند :Partial Identity

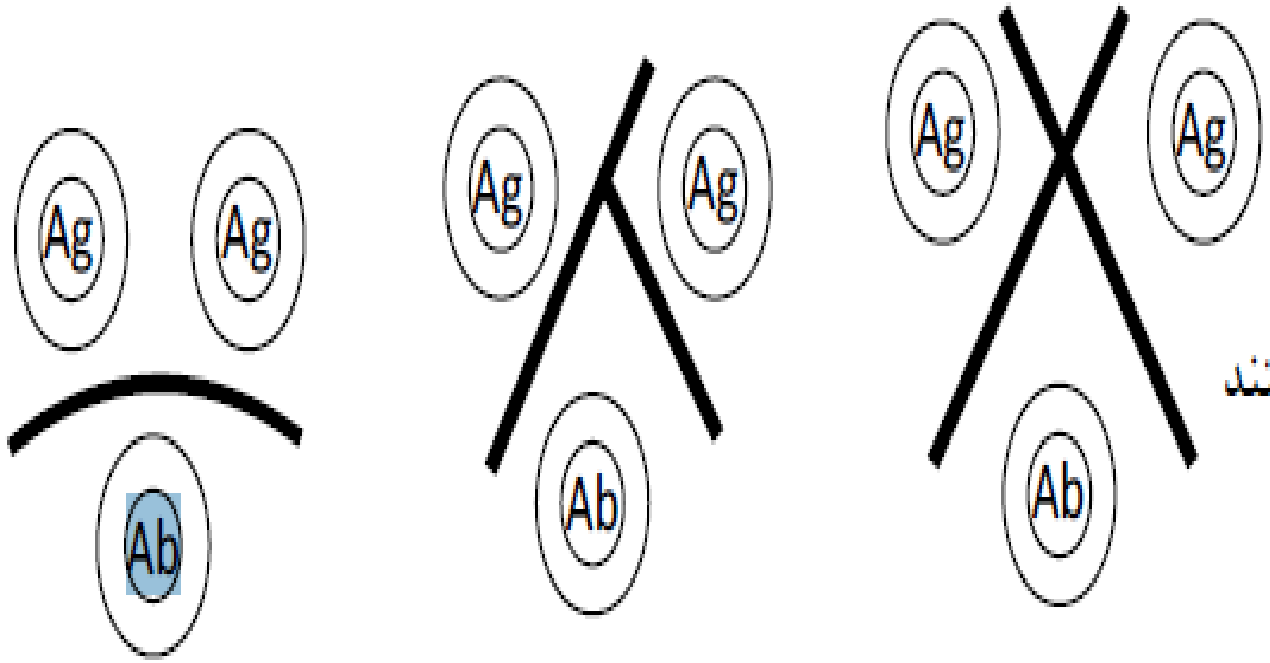
دو آنتی ژن متفاوت هستند :Non-Identity

تهیه کننده : سهیلا عباسی

Identity: دو آنتی ژن مشابه هستند

Partial Identity:دو آنتی ژن دارای یک یا چند اپی توپ مشترک هستند

Non-Identity:دو آنتی ژن متفاوت هستند



تهیه کننده : سهیلا عباسی

روش انجام تکنیک DID

مواد و وسایل لازم

پودر آگار یا آگاروز، لام هماتولوژی یا پلیت‌های باکتری‌شناسی تمیز، بافر PBS، آلبومین انسانی (۱ mg/ml)، آنتی‌بادی ضد آلبومین انسانی، شعله گاز

روش کار

۱. ۱ گرم آگار یا آگاروز را در ۱۰۰ میلی‌لیتر PBS و بر روی شعله گاز، داخل یک ظرف شیشه‌ای آزمایشگاهی به‌طور کامل حل کنید.
۲. سپس اجازه دهید تا محلول آگار در محیط آزمایشگاه تا دمای حدود ۴۵ درجه سانتی‌گراد، سرد شود.
۳. با استفاده از پیپت ۱۰ میلی‌لیتری، مقدار مناسب از محلول آگار را روی هر اسلاید یا داخل پلیت باکتری‌شناسی بریزید و اجازه دهید تا کاملاً سرد شده و ببندد.

۴. با استفاده از الگوی شکل ۱۳-۲، تعدادی چاهک در ژل حفر نمایید. برای حفر چاهک در صورت نداشتن ژل پانچر می‌توانید از پیپت پاستور شیشه‌ای و مکش دهانی استفاده کنید. البته احتیاط کنید در زمان مکش، ژل از پیپت وارد دهان نشود.

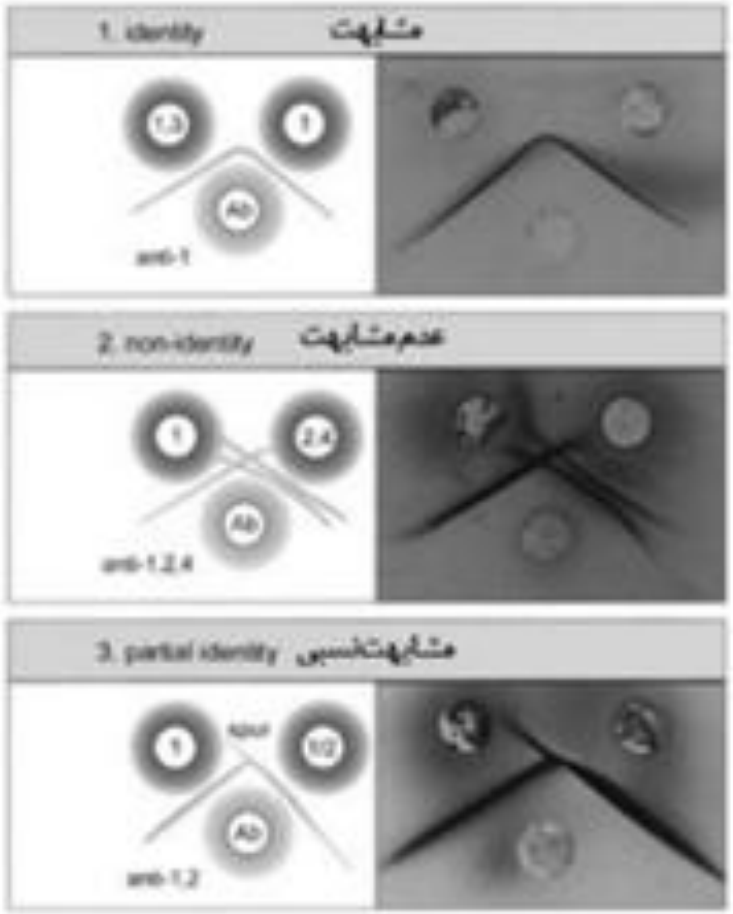
۵. رقت‌های ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶ و ۱/۳۲ از آلبومین در PBS تهیه کنید.

۶. ۲۰ میکرولیتر از آلبومین رقیق‌شده را در چاهک‌های اطراف، و ۲۰ میکرولیتر از آنتی‌آلبومین را در چاهک مرکزی بریزید.

۷. اسلایدها را به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق و در یک محیط مرطوب انکوبه کنید (برای ایجاد محیط مرطوب می‌توانید مقداری پنبه خیس را در مجاور اسلایدها و در داخل یک ظرف دربسته قرار دهید).

۸. پس از مدت‌زمان مذکور، اسلایدها را ازنظر تشکیل خطوط رسوبی بررسی نمایید (شکل ۱۳-۳).

شکل ۱۳-۲: تکنیک DID به باندهای رسوبی شیری‌رنگ بین چاهک مرکزی (حاوی آنتی‌سرم) و دو چاهک ۱ و ۳ (حاوی آنتی‌ژن) دقت نمایید.



شکل ۱۳-۱: ایمونودیفیوژن دوطرفه (DID) به منظور مقایسه مشابهت‌های اپی‌توپی آنتی‌ژن‌ها.

شماره ۱ مشابهت، شماره ۲ عدم مشابهت و شماره ۳ تشابه نسبی آنتی‌ژن‌ها را نشان می‌دهد.

انتشار یک طرفه شعاعی

یک آزمایش کمی است که در آن یکی از دو مولکول آنتی ژن یا آنتی بادی را در آگار مخلوط کرده و ثابت می گیرند و مولکول دیکر را در حفره ای که در آگار مزبور ایجاد کرده اند می ریزند.

مولکول داخل حفره با انتشار و نفوذ شعاعی در آگار به ناحیه تعادل رسیده و با مولکول دیگر واکنش می کند. در این روش خط Diffusion در آگار نفوذ Radialبه طور شعاعی Single پرسی پیتاسیون نشان می دهد.

بنابراین فقط یکی از مولکولها رسوبی به صورت حلقه ای در اطراف حفره ایجاد می شود. قطر حلقه یا هاله مزبور با غلظت ماده مجهول(آنتی ژن یا آنتی بادی) متناسب است که جهت اندازه گیری ایمونوگلوبولینهای SRID با اندازه گیری آن و مقایسه با منحنی استاندارد می توان غلظت ماده مجهول را تعیین نمود. غالبا از سرم و اجزا کمپلمان استفاده می کنند.

ایمونودیفیوژن یک طرفه دایره ای

ایمونودیفیوژن یک‌طرفه دایره‌ای یا SRID که به آن تکنیک مانسینی[1] (مبدع این روش) نیز گفته می‌شود، یک تکنیک ایمونولوژیکی برای تعیین کمی آنتی‌بادی‌ها و آنتی‌ژن‌ها می‌باشد. در این تکنیک برخلاف DID، فقط به یکی از دو طرف واکنش (معمولاً آنتی‌ژن)، در بستر ژل اجازه انتشار داده می‌شود و طرف دیگر که معمولاً آنتی‌بادی می‌باشد، با غلظت مناسب در ژل ثابت بوده و اجازه انتشار پیدا نمی‌کند.

در SRID آنتی‌ژن را در داخل چاهک‌هایی که درون ژل حفرشده و حاوی آنتی‌بادی اختصاصی می‌باشد می‌ریزند. سپس به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوبه می‌کنند. در طی این مدت، آنتی‌ژن به‌صورت دایره‌ای در ژل انتشار می‌یابد و پس از برخورد با آنتی‌بادی و تشکیل شبکه درهم‌تنیده از کمپلکس‌های آنتی‌بادی-آنتی‌ژن به‌صورت

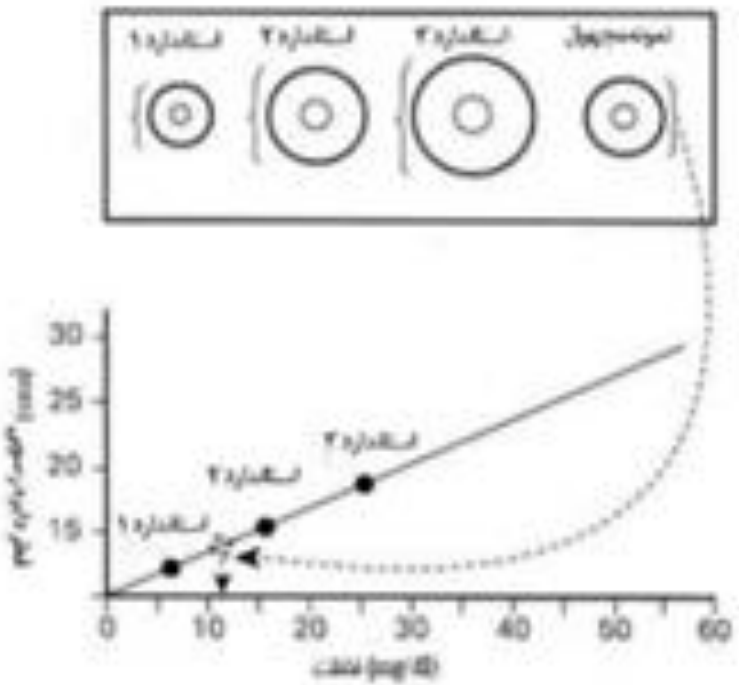
تهیه کننده : سهیلا عباسی

شکل ۱۳-۴: تکنیک SRID. قطر دایره‌های رسوبی، ارتباط مستقیمی با غلظت آنتی‌ژن دارد.

رسم منحنی استاندارد: SRID روش کار آزمایش

مقدار ۵ میکرولیتر از استاندارد های ۱ و ۲ و ۳به حفره شماره ۱ و ۲ و ۳ بریزید.مقدار ۵ میکرولیتر از سرم مجهول به حفره شماره ۴ و ۵ بریزید. بعد از ریختن نمونه ها درب پلیت را بسته و چند دقیقه صبر نمایید تا نمونه ها جذب ژل شوند. سپس پلیت را بصورت وارونه برروی یک سطح صاف دردمای اطاق به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت قرار دهید .پس از گذشت این زمان قطر حلقه های رسوبی را اندازه گیری کرده و با توجه به منحنی استاندارد را مجذور قطر در نظر گیرید. ۷را مجذور قطر در نظر گرفته و محور X غلظت را نشان می دهد.

تهیه کننده : سهیلا عباسی



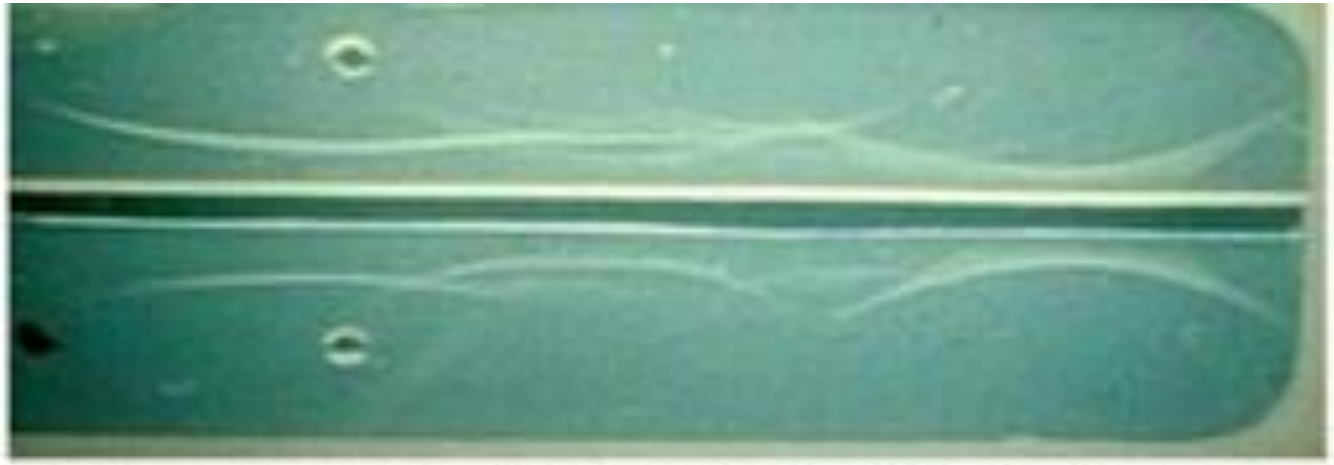
شکل ۱۳-۵: نمودار استاندارد در تکنیک SRID. با رسم نمودار بر اساس غلظت‌های استاندارد، می‌توان غلظت آنتی‌ژن مجهول را محاسبه کرد

روش ایمونو نفلومتری

یکی از روش های ایمونولوژیک سنجش آنتی ژن می باشد که تشکیل کمپلکس بین آنتی ژن و آنتی بادی در محیط مایع بررسی می شود. اغلب پروتئین ها را با این روش می توان اندازه گیری نمود. هرگاه مقداری از یک آنتی ژن محلول را در مجاورت مقدار متناسبی از آنتی بادی اختصاصی خود در محیط مایع قرار دهیم.

کمپلکس آنتی ژن-آنتی بادی در لوله آزمایش تشکیل شده و باعث کدورت می گردد. این لوله داخل دستگاه نفلومتر قرار می گیرد. در این دستگاه نور به لوله آزمایش تابیده می شود. نور پس از برخورد با کمپلکس های آنتی ژن- آنتی بادی موجود در لوله متفرق می شود. آشکار ساز دستگاه میزان نور تفرق یافته را اندازه گیری می نماید.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

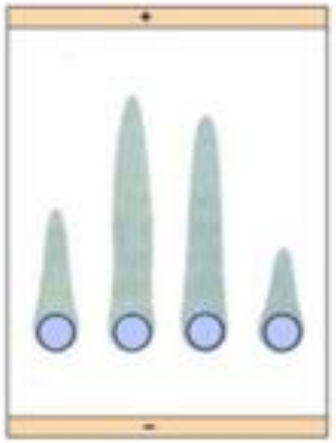


شکل ۱۳-۳: ایمونوالکتروفورز. دایره‌های بالا و پایین (قطب کاتد)، محل ریختن نمونه حاوی پروتئین (به‌عنوان‌مثال سرم انسان) می‌باشند. پس از الکتروفورز و تفکیک پروتئین‌ها از یکدیگر، در شیار وسط، آنتی‌سرم ریخته می‌شود. پس از انکوباسیون، کمان‌ها و یا قوس‌های رسوبی تشکیل می‌شوند.

۱۳-۷ ایمونوالکتروفورز راکتی

تکنیک ایمونوالکتروفورز راکتی[1] روش توسعه‌یافته SRID می‌باشد. در این تکنیک، ابتدا آنتی‌ژن‌ها را در داخل چاهک‌های حفرشده در ژل حاوی آنتی‌بادی، ریخته و سپس با استفاده از نیروی الکتریکی، آن‌ها را در ژل به حرکت درمی‌آورند (الکتروفورز). خطوط رسوبی تشکیل شده در این روش، راکتی‌شکل می‌باشند. در این روش، مساحت زیر هر راکت، ارتباط مستقیمی با غلظت آنتی‌ژن دارد (شکل ۱۳-۶).

تکنیک ایمونوالکتروفورز راکتی، در اندازه‌گیری آلفافتوپروتئین، تشخیص آنتی‌بادی‌ها در ادرار و مایع مغزی-نخاعی، اندازه‌گیری قطعات کمپلمان و تشخیص میلوماها کاربرد دارد.



شکل ۱۳-۶: تصویر شماتیک از تکنیک ایمونوالکتروفورز راکتی