

واکنش های رسوبی ایمنی (immunoprecipitation reaction)

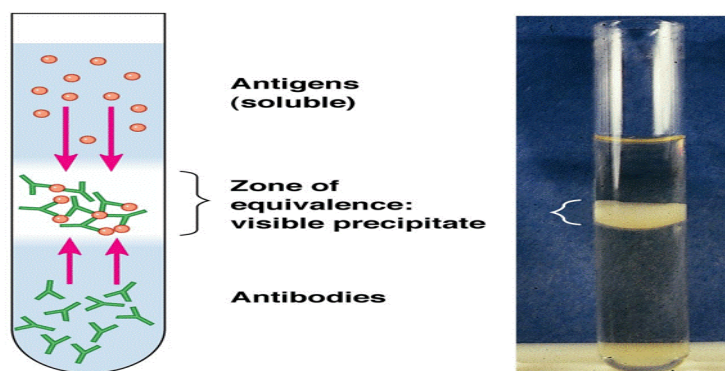
پرسیپیتاسیون از جمله واکنش هایی است که در پی واکنش آنتی بادی اختصاصی با آنتی ژن محلول به وجود می آید. به عبارت دیگر بعد از واکنش، رسوبی تشکیل می شود که با چشم قابل ردیابی است. رسوب ایجاد شده نتیجه پیوند آنتی ژن - آنتی بادی است؛ و برای تشکیل نیاز به شرایط زیر دارد:

- 1- آنتی بادی باید حداقل دو ظرفیتی باشد. (قطعات Fab یک آنتی بادی، رسوب دهنده نمی باشند).
 - 2- آنتی ژن باید حتماً چند ظرفیتی (دارای چندین اپی توپ) باشد. هاپتن ها توانایی تشکیل رسوب را ندارند.
 - 3- نوع آنتی ژن (مخصوصاً حلالیت آن) و اجزای تشکیل دهنده محیط (غلظت یونی، pH) شروع تشکیل رسوب را تحت تاثیر خود قرار می دهند. آنتی بادی های کلاس IgG که فقط 3٪ قند در ساختار خود می باشند، بهترین رسوب دهنده ها هستند، در صورتی که IgM ها با 10٪ قند و حلالیت بالاتر، رسوب دهنده های چندان خوبی نیستند.
 - 4- هر چه وزن کمپلکس های آنتی ژن - آنتی بادی تشکیل شده بیشتر باشد، بهتر رسوب می کنند.
- بر همین اساس روش هایی ابداع شده است که با کمک آنها می توان کمپلکس آنتی ژن - آنتی بادی را ردیابی و تعیین مقدار کرد. این روش ها شامل:

1. روش رینگ تست
2. روش های ایمونودیفیوژن
3. روش های ایمونوالکتروفورز
4. روش های کدورت سنجی

روش رینگ تست

این روش از جمله روش هایی است که در محیط مایع انجام می شود؛ بدین معنی که بعد از اضافه کردن آنتی ژن به آنتی بادی و تشکیل کمپلکس آنتی ژن - آنتی بادی رسوب در محیط مایع با چشم غیر مسلح قابل رویت است.



روش های ایمونودیفیوژن (رسوب ایمنی در محیط ژل)

امروزه این روش توسعه فراوانی یافته است و از آن برای سنجش پروتئین ها در محلول های بیولوژیک استفاده می شود. ژل یک محیط نیمه جامد است که ملکول ها براحتی می توانند در آن منتشر شوند و هر گاه شبکه ای از کمپلکس های آنتی ژن - آنتی بادی تشکیل شود، براحتی در ژل رسوب کرده و قابل رویت است. یکی دیگر از مزایای ژل فراهم نمودن شیبی از غلظت های آنتی ژن و آنتی بادی می باشد. تشکیل شیب غلظتی نتیجه ی انتشار آنتی ژن و آنتی بادی در ژل می باشد. هر چه این مولکول ها در ژل بیشتر انتشار یابند غلظت آن کمتر می شود؛ لذا تاثیر پدیده ی منطقه تعادل در محیط ژل کمتر از محیط مایع خواهد بود. برای انجام روش های رسوبی در ژل از ژل های متفاوتی استفاده می شود. بیشترین استفاده از ژل آگار یا آگاروز (آگار خالص شده) با غلظت 1٪ تا 2٪ می باشد.

روش تهیه ژل آگار یا آگارز:

پودر آگار یا آگارز را داخل آب مقطر ریخته و آن را تا 90 درجه سانتیگراد گرم می‌کنیم، سپس در دمای 45 درجه سانتیگراد آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی را به ژل اضافه می‌کنیم و داخل پلیت‌های مورد نظر توزیع می‌کنیم. بر اساس اینکه در ژل فقط یکی از مولکول‌های آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی و یا هر دو مولکول به طرف یکدیگر انتشار پیدا می‌کنند، روش‌های متفاوتی پایه‌ریزی شده‌اند که در زیر به شرح آنها می‌پردازیم:

انتشار ایمنی دوگانه (DID (Double immunodiffusion)

این روش برای اولین بار در سال 1949 توسط یک دانشمند ایتالیایی به نام ochterlony ابداع گردید، که بعدها این روش به نام همین دانشمند نامگذاری شد. در این روش در داخل یک لایه نازک آگارز حفراتی تعبیه می‌نماییم. سپس محلول‌های حاوی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در داخل حفرات در مقابل یکدیگر قرار داده می‌شوند. آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در ژل حرکت نموده، و در منطقه تعادل غلظت بین آنها یک کمان رسوبی تشکیل می‌شود. زمان لازم برای رسوب کمان‌های رسوبی طولانی می‌باشد (چند ساعت تا چند روز) از این روش می‌توان برای کاربردهای زیراستفاده نمود:

1. بررسی حضور آنتی‌بادی بر علیه یک آنتی‌ژن خاص در یک محلول

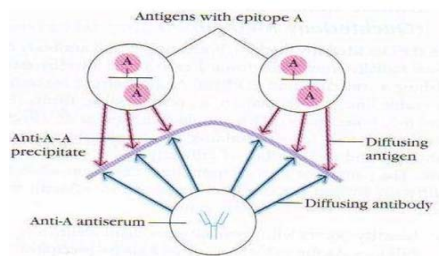
2. بررسی واکنش متقاطع بین دو آنتی‌ژن

3. بررسی شباهت ساختمانی بین دو یا چند مولکول پروتئین

با این روش می‌توان اپی‌توپ آنتی‌ژن‌های نامعلوم را با یکدیگر مقایسه کرد، بدین معنی که اگر دو آنتی‌ژن مصرفی از نظر اپی‌توپ‌ها با هم یکسان، مشابه و یا متفاوت باشند، شکل خط رسوبی تشکیل شده تفاوت دارد.

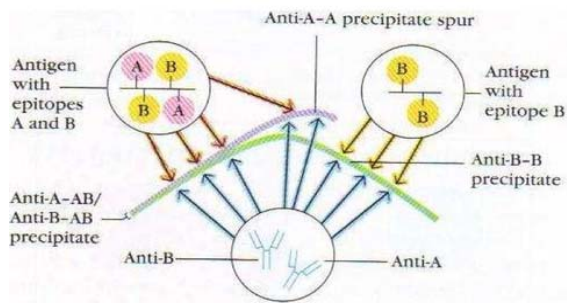
آنتی‌ژن‌های یکسان:

اگر شاخص‌های آنتی‌ژنیک دو آنتی‌ژن ریخته شده در حفره‌های 1 و 2 یکسان باشند، در فاصله‌ی بین حفره‌ی حاوی آنتی‌بادی و حفره‌های حاوی آنتی‌ژن دو خط رسوبی با انتهای به هم پیوسته شبیه کمان ظاهر می‌شود.



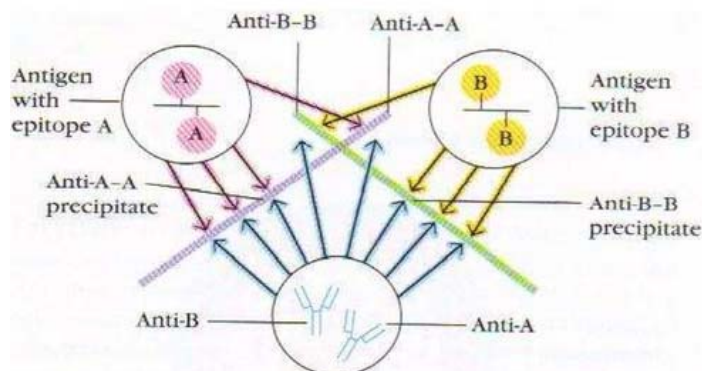
آنتی‌ژن‌های متشابه:

در این نوع واکنش برخی شاخص‌های آنتی‌ژنیک بین دو آنتی‌ژن مشترک هستند و در واقع آنتی‌ژن‌ها به هم شبیه هستند. در این حالت آنتی‌بادی‌های موجود در حفره‌ی حاوی آنتی‌بادی با هر دو آنتی‌ژن واکنش می‌دهند و در محل برخورد کمان‌های رسوبی، زائده‌ای شبیه به مهمیز را بوجود می‌آورند که در واقع نمایان گر واکنش متقاطع و وجود ارتباط سرولوژیک بین دو آنتی‌ژن مورد اشاره نسبت به آنتی‌بادی است و نه یکسان بودن آنتی‌ژن‌ها.



آنتی ژن های متفاوت:

هر گاه آنتی ژن هایی که اپی توپ مشترک ندارند با آنتی بادی های متفاوت واکنش دهند، دو خط رسوبی تشکیل شده نسبت به هم به شکل علامت ضربدر دیده می شوند، که این حالت نمایانگر مشابه نبودن دو آنتی ژن نسبت به آنتی بادی مورد آزمایش است.



از روش ایمونودیفیوژن دو طرفه برای شناسایی آنتی ژن ها استفاده می شود. به عنوان مثال بیمارانی که دچار نارسایی کلیوی هستند و پروتئین های مانند زنجیره سبک ایمونوگلوبولین ها و یا بتادو میکروگلوبولین را دفع می کنند، می توان نوع پروتئین دفع شده در ادرار را تعیین نمود.

انتشار ایمنی شعاعی منفرد (SRID: single radial immunodiffusion)



این روش توسط mancini پایه ریزی و بنام او نیز معروف می باشد. اساس این روش مبتنی بر انتشار یکی از دو عامل آنتی ژن یا آنتی بادی است. به عبارت دیگر یکی از دو ملکول آنتی ژن یا آنتی بادی را در ژل مخلوط کرده و ثابت می گیرند. سپس طرف دیگر واکنش (آنتی بادی یا آنتی ژن) را در حفراتی که در آگار ایجاد می کنیم می ریزیم. ملکول های موجود در حفره با انتشار و نفوذ شعاعی در ژل نهایتاً به ناحیه تعادل رسیده و با ملکول دیگر واکنش داده و رسوب می دهد. بنابراین فقط یکی از مولکول ها به طور شعاعی در ژل نفوذ می کند. در این روش اغلب آنتی بادی علیه آنتی ژن مورد سنجش را در زمانی که ژل هنوز به صورت مایع است (55 درجه سانتیگراد) به آن اضافه می کنیم، سپس ژل را بر روی یک صفحه صاف پخش می کنیم و بعد از اینکه ژل به صورت جامد درآمد حفراتی داخل آن تعبیه می کنیم. حجم ثابتی از آنتی ژن یا نمونه ای حاوی آنتی ژن را به داخل حفرات می ریزیم. آنتی ژن در ژل انتشار یافته و با آنتی بادی برخورد می کند و واکنش آنتی ژن - آنتی بادی شکل می گیرد که به صورت حلقه رسوبی در اطراف حفره ظاهر می گردد. قطر این حلقه به تدریج افزایش می یابد و هنگامی که تعادل بین غلظت آنتی ژن آنتی بادی برقرار شد یک حلقه رسوبی ثابت و پایدار تشکیل می شود. از این روش به طور گسترده ای برای اندازه گیری کمی بسیاری از پروتئین ها استفاده می شود.

در این روش با استفاده از محلول‌های استاندارد و رسم منحنی مربوطه می‌توان مقدار آنتی‌ژن را تعیین کرد. قطر حلقه‌های رسوبی مربوط به محلول‌های استاندارد بعد از تشکیل خط رسوبی در ناحیه‌ی تعادل غلظت آنتی‌ژن آنتی‌بادی اندازه‌گیری می‌شود. این تعادل غلظت، بسته به مشخصات مولکولی آنتی‌ژن مورد نظر، بعد از 24 تا 48 ساعت یا بیشتر حاصل می‌گردد.

در این حالت مجذور قطر حلقه‌های رسوبی با مقدار آنتی‌ژن مورد نظر نسبت مستقیم دارد. بنابراین می‌توان با قرار دادن مجذور قطر حلقه‌های رسوبی مربوط به محلول‌ها یا استاندارد، بر روی محور عمودی و غلظت آنها بر روی محور افقی منحنی استاندارد را ترسیم نمود.

حساسیت این روش در حدود 10 میلی‌گرم در دسی لیتر می‌باشد. با وجود زمان طولانی که برای واکنش مورد نیاز می‌باشد، این روش کاربرد زیادی دارد که علت اصلی آن را می‌توان به عدم نیاز به وسایل اختصاصی برای انجام واکنش دانست.

این روش بر مکانیسم ساده‌ای استوار است و با توجه به نیاز محقق می‌تواند برای جستجو و عیار سنجی آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی به کار برده شود. پیش شرط‌ها:

الف - آنتی‌ژن باید محلول باشد. (ذره‌ای {Particle} نباشد و هاپتن هم نباشد)

ب - آنتی‌بادی باید پلی‌کلونال باشد. (مونوکلونال نباشد)

1- جستجو و عیارسنجی آنتی‌بادی: خواسته محقق در این حالت بدست آوردن عیار آنتی‌بادی اختصاصی آنتی‌ژن در نمونه سرم مجهول است برای تعیین عیار از مقایسه با آنتی‌بادی دارای غلظت مشخص استفاده می‌شود و به کار بردن آنتی‌ژن معلوم برای پی بردن به حضور آنتی‌بادی اختصاصی آن، الزامی است.

آنتی‌ژن در داخل محیطی ژل مانند (نیمه جامد) از جنس آگارز با غلظت معین و به ضخامت معین، به صورت یکنواخت قبل از انجماد ژل مخلوط می‌شود پس از انجماد ژل با استفاده از پانچ، چاهکی به قطر 3 میلی‌متر و عمق 2 میلی‌متر در داخل لایه آگارز ایجاد می‌شود و نمونه سرم مجهول (حاوی آنتی‌بادی) به مقدار معین در داخل چاهک ریخته می‌شود مدت زمان معینی در محفظه‌ای که دارای رطوبت کافی است نگهداری می‌شود. در این فاصله زمانی سرم با انتشار خودبخودی به صورت شعاعی در داخل ژل نفوذ کرده و در برخورد با آنتی‌ژن، حلقه رسوبی قابل رویتی را در ناحیه مشخصی شکل می‌دهد که اگر ژل شفاف را روی صفحه سیاه رنگی قرار دهیم حلقه شیرینی رنگ به وضوح قابل تشخیص است اما برای وضوح بیشتر می‌توان رنگ آمیزی نیز انجام داد. قطر دایره رسوبی اندازه‌گیری می‌شود و مساحت دایره رسوبی مستقیماً با غلظت آنتی‌بادی در نمونه سرم ارتباط دارد.

با استفاده هم زمان از آنتی‌بادی با غلظت معلوم (به موازات تست اصلی) می‌توان غلظت نمونه مجهول را در مقایسه با نمونه‌های معلوم با دقت بالا تعیین نمود.

2- جستجو و عیارسنجی آنتی‌ژن: خواسته محقق در این حالت جستجو و تعیین مقدار آنتی‌ژن در نمونه مجهول است. برای تعیین عیار از مقایسه با آنتی‌ژن دارای غلظت مشخص استفاده می‌شود. و به کاربردن آنتی‌بادی معلوم برای پی‌بردن به حضور آنتی‌ژن الزامی است. آنتی‌بادی معلوم همان سرم حاوی آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی آنتی‌ژن است و معمولاً غلظت آن از قبل مشخص است. آنتی‌بادی معلوم در داخل ژل پخش می‌شود (قبل از انجماد ژل) و این بار آنتی‌ژن مجهول (و به طور هم زمان آنتی‌ژن‌های با غلظت معلوم) به داخل چاهک‌ها اضافه می‌شوند انتشار شعاعی آنتی‌ژن، در فاصله مشخصی از مرکز دایره، منجر به واکنش ایمنی شده و رسوب قابل رویت کمپلکس‌های ایمنی ایجاد می‌شود. مقایسه مساحت دایره رسوبی حاصل از نمونه مجهول در مقایسه با مساحت دایره رسوبی حاصل از رقت‌های مختلف آنتی‌ژن معلوم، ما را قادر می‌سازد که محتوی آنتی‌ژنی نمونه مجهول را با دقت قابل قبولی بدست آوریم.

روش انجام تست SRID

برای مشاهده پدیده پرسیپیتاسیون در محیط نیمه جامد ژل و اندازه‌گیری کمی پروتیین‌ها از این روش استفاده می‌شود.

نوع آزمایش: کمی

معمولاً در آزمایشگاه بالینی از تست SRID برای اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های سرم (IgG, IgA, IgM, C3, C4) استفاده می‌شود به همین دلیل برای هر یک پلیتی جداگانه تهیه می‌گردد. بدین معنی که مثلاً برای اندازه‌گیری IgG، در داخل ژل از پیش Anti-IgG ریخته شده و در پلیت مربوط به اندازه‌گیری C4، در داخل Anti-C4 حضور دارد.

مواد و ابزار مورد نیاز:

1. پلیت SRID (حاوی ژل + anti-IgG).
2. نمونه‌های استاندارد (کالیبراتور) شماره 1 و 2 و 3.
3. نمونه کنترل، شماره 4.
4. نمونه‌های سرمی با شماره‌های 5، 6، 7، 8.
5. خط کش ویژه و استاندارد «SRID» برای اندازه‌گیری قطر دایره‌ی رسوبی که ضمیمه می‌باشد.
6. سرنگ انسولین یا سرنگ هامیلتون یا سمپلر برای پر کردن چاهک‌ها (چاهک‌ها نباید لبریز شوند).

روش ریختن نمونه به داخل چاهک پلیت SRID

1. قبلاً بر روی یک کاغذ هر دانشجو شماره چاهک مربوط به نمونه‌ی خود را یادداشت کند. به طور معمول سه چاهک شماره 1، 2 و 3 برای کالیبراتورها و چاهک شماره برای سرم کنترل و چاهک‌های شماره 5، 6، 7 و 8 برای ریختن نمونه سرمی در نظر گرفته می‌شود. لازم به یادآوری است هر دانشجو ملزم به پر کردن یک چاهک است.
2. هر دانشجو، به کمک سرنگ انسولین به دقت حجم موردنیاز (5 μ l) از هر نمونه آماده شده را داخل چاهک از پیش تعیین شده خود بریزد (به ترتیب از چاهک شماره 1 کالیبراتور 1 و چاهک شماره 2، کالیبراتور شماره 2 و الی آخر یعنی چاهک شماره 8 نمونه سرمی با شماره 8).
3. برای گذاشتن نمونه، نوک سرنگ انسولین حاوی نمونه را تا ته چاهک برده و به آرامی شروع به تخلیه سمپلر کنید و همزمان با پر کردن چاهک، نوک سمپلر را به آرامی بالا بکشید. چاهک‌ها برای پذیرش حجم مورد نظر ایجاد شده‌اند ولی توجه بیشتر در گذاشتن نمونه و سر ریز نکردن از چاهک نتیجه دقیق‌تری را به همراه دارد، بوجود آمدن حباب هوا در کف چاهک سبب سر ریز شدن از سر چاهک است.
4. پس از گذاشتن نمونه‌ها در چاهک‌های مربوط به سرپوش پلیت SRID را گذاشته و چند دقیقه صبر کنید تا سرم‌ها و یا مایعات مورد آزمایش به درون ژل نفوذ کرده و جذب شوند.
5. قرار دادن پلیت در دمای محیط به مدت 48 ساعت برای انجام واکنش پرسی‌پیتاسیون.
6. به دلیل این که آزمایش 48 ساعت طول می‌کشد. هر دانشجو پلیت SRID های از قبل آماده شده را طبق روش ذیل بررسی می‌کند.

بررسی واکنش در پلیت SRID آماده شده (که می‌تواند یکی از انواع پلیت‌های C4, C3, IgG, IgM, IgA باشد) قطر رسوب دایره مربوط به هریک از کالیبراتورها، کنترل و نمونه بیماران را جداگانه با خط کش مخصوص SRID (که روش کار با آن ضمیمه است) اندازه گیری کنید.

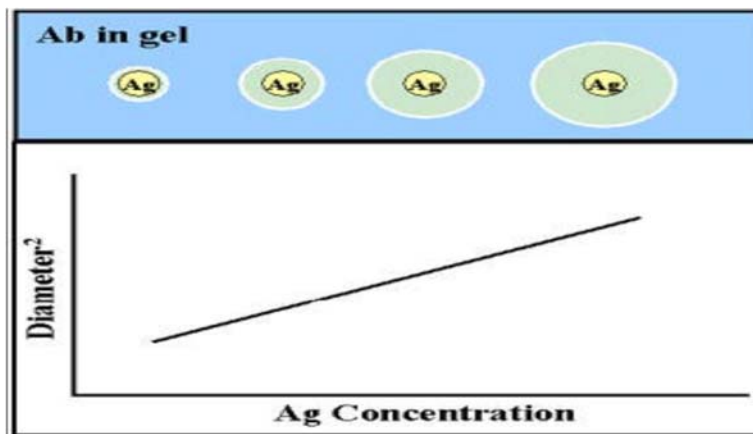
میزان هریک از ایمونوگلوبولین‌ها و یا اجزای کمپلمان در نمونه‌های مورد آزمایش براساس مقایسه قطر دایره رسوبی نمونه با کالیبراتورها، محاسبه می‌شود. رسم منحنی استاندارد این مقایسه را ممکن می‌سازد.

روش کاربرد خط کش SRID

خط کش SRID دو محور اندازه گیری دارد، یکی خط کش میلی 23 سانتی در لبه است و دیگری مثلث اندازه‌گیری قطر دایره رسوبی در داخل صفحه تا 10 mm است. در داخل صفحه خط کش SRID دو خط کج و یک خط موازی با افق در وسط به شکل میانه وجود دارد، خطوط کوتاه عمودی، با فاصله معین، دو خط کج یا ساق‌های مثلث ناقص را مدرج کرده‌اند. ارقام روی خطوط کوتاه عمودی، نمایانگر مجذور این فاصله و در واقع مجذور قطر دایره‌های رسوبی (d^2) می‌باشند. برای اندازه‌گیری قطر دایره‌های رسوبی به وسیله خط کش SRID، پلیت SRID را از پشت روی خط کش گذاشته و آنقدر آن را جابجا کرده تا محیط خارجی دایره رسوبی با دو خط کج کاملاً مماس شود و خط میانه درست از وسط چاهک بگذرد. در این حالت رقم پایین خط کوتاه عمودی که از وسط چاهک می‌گذرد، نشان دهنده قطر دایره رسوبی (d) است که می‌توان مجذور همان قطر را (d_2) در بالای خط کوتاه عمودی یافت. برای اندازه‌گیری واکنش‌های رسوبی بیضی شکل باید اندازه‌گیری را در دو جهت عمود برهم انجام داد و میانگین دو قطر کوچک و بزرگ را بر روی منحنی برد.

روش رسم منحنی و اندازه گیری غلظت

بر روی محور افقی X غلظت کالیبراتورهای به کار گرفته شده و بر روی محور عمودی Y مجذور قطر دایره‌های رسوبی هر کالیبراتور (d^2) را جداگانه علامت گذاری کنید. نقاط بدست آمده از کالیبراتورها (غلظت معین و مجذور قطر دایره های رسوبی هر کالیبراتور یعنی d^2) را علامت گذاری کنید و سپس با اتصال آن نقاط به یکدیگر، منحنی استاندارد را رسم کنید، بهترین روش رسم منحنی خطی (linear) بوده که در بهترین حالت خود از میان نقاط 1، 2 و 3 با فاصله مساوی عبور می‌کند. نقاط کالیبراتور که بیش از حد از خط مفروض دور شده را نباید در نظر گرفت. برای تعیین غلظت نمونه بیمار، از نقطه مربوط به قطر دایره رسوبی آن، خطی موازی محور X رسم کرده تا منحنی را قطع کند سپس از آنجا خطی عمود بر محور X رسم کنید، عدد مربوطه بیانگر غلظت نمونه بیمار است.



جدول 1- مقادیر کالیبراتورهای SRID

پروتئین	کالیبراتور شماره 1 (mg/dl)	کالیبراتور شماره 2 (mg/dl)	کالیبراتور شماره 3 (mg/dl)	زمان مورد نیاز برای واکنش hrs
IgG	900	1500	2050	48
IgM	65	150	240	72
IgA	160	300	540	24
C3	45	100	173	48
C4	8	25	45	48

جدول 2- مقادیر سرم کنترل SRID

Unite	C4	C3	IgA	IgM	IgG
mg/dl	8-18	50-70	205-250	50-145	650-1230

روش های ایمنوالکتروفورز

روش ایمنوالکتروفورز روش توسعه یافته DLD می باشد. که ابتدا مولکولهای پروتئینی با نیروی الکتریکی و براساس تفاوت شارژ از یکدیگر تفکیک می شوند. سپس، با اضافه کردن آنتی سرم در شیبی به موازات مسیر الکتروفورز واکنش آنتی بادی – آنتی ژن اختصاصی صورت گرفته و کمانهای (قوسهای) رسوبی تشکیل می شود.

این تکنیک در تشخیص بیماریهای نقص ایمنی و نقص اجزاء کمپلمان، تشخیص مولتیپل میلوما و ... کاربرد دارد.

روش ایمنوالکتروفورز راکتی روش توسعه یافته SRID می باشد. در این تکنیک ابتدا Agها را در داخل چاهکهای حفر شده در ژل حاوی آنتی بادی ریخته و سپس با استفاده از نیروی الکتریکی، آنها را در ژل به حرکت در می آورند یا به اصطلاح الکتروفورز می کنند. خطوط رسوبی تشکیل شده در این روش راکتی شکل بود. در این روش، مساحت زیر هر راکت رابطه مستقیم با غلظت Ag دارد. این تکنیک در اندازه گیری α فیتوپروتئین، تشخیص آنتی بادی های در ادرار و مایع مغزی نخاعی و اندازه گیری قطعات کمپلمان و تشخیص میلوماها کاربرد دارد.

روشهای کدورت سنجی

ایمونوتوربیدی متری: هر گاه مقداری از یک آنتیژن را در مجاورت مقدار متناسبی از آنتی بادی اختصاصی خود در محیط مایع قرار دهیم کمپلکس آنتیژن-آنتی بادی در محیط تشکیل شده و باعث کدورت محیط می گردد. اساس روش بر جذب نور توسط کمپلکس آنتیژن-آنتی بادی استوار می باشد. انجام روش های کدورت سنجی بسیار ساده تر از اندازه گیری پروتئین در رسوب می باشد.

ایمونونفیلومتری: این روش شبیه ایمونوتوربیدی متری است و تفاوت اساسی آن اندازه گیری میزان نور تفرق یافته می باشد که در مباحث بعد بطور مفصل توضیح داده خواهد شد.