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

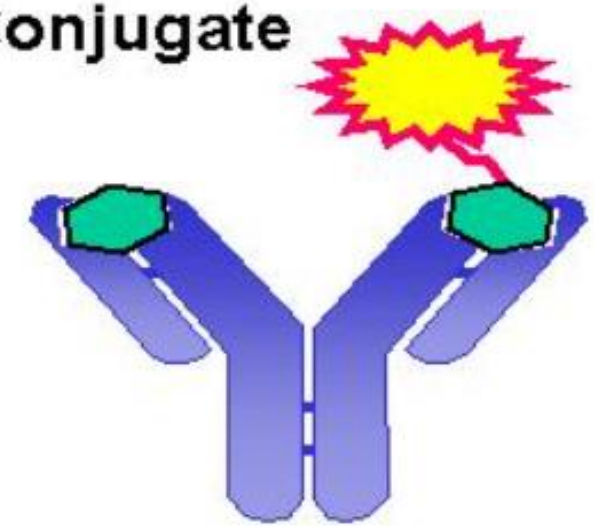
سنجش های بر پایه ایمونواسی

ایمونوفلورسانس و رادیو ایمونواسی

سهیلا عباسی

Immunoassay Conjugates - Detecting Binding

Immunoassay Conjugate



Detectable Label

- Radiolabel (RIA)
- Enzyme (EIA)
- Fluorescence (FIA)
- Luminescence
- Electrochemical
- Visual
  - Colloidal gold
  - Colored latex

ایمونوفلورسانس، تکنیک IFA

ایمونوفلورسانس روشی برای جستجوی یک آنتی ژن یا یک آنتی بادی و تعیین موقعیت آن ها در یک برش بافتی یا سلول است . این روش برای جستجوی آنتی بادی ها واتو آنتی بادی ها در برابر عوامل عفونی، آنتی ژن های سلولی و بافتی استفاده می گردد.

تشخیص هویت سلول ها با روش ایمونوفلورسانس

تکنیک ایمونوفلورسانس یکی از تکنیک هایی است که کاربرد زیادی در شناسایی مولکول های سطحی سلول ها دارد. از روش ایمونوفلورسانس برای یافتن یک آنتی ژن یا آنتی بادی و یا تعیین موقعیت آن ها در یک برش بافتی یا سلولی استفاده می شود.

در این تکنیک مولکول نشانگر مواد فلورسنت مثل فلورسئین ایزوتیوسیانات یا رودامین و... هستند که به طور شیمیایی به آنتی بادی موردنظر متصل شدند.

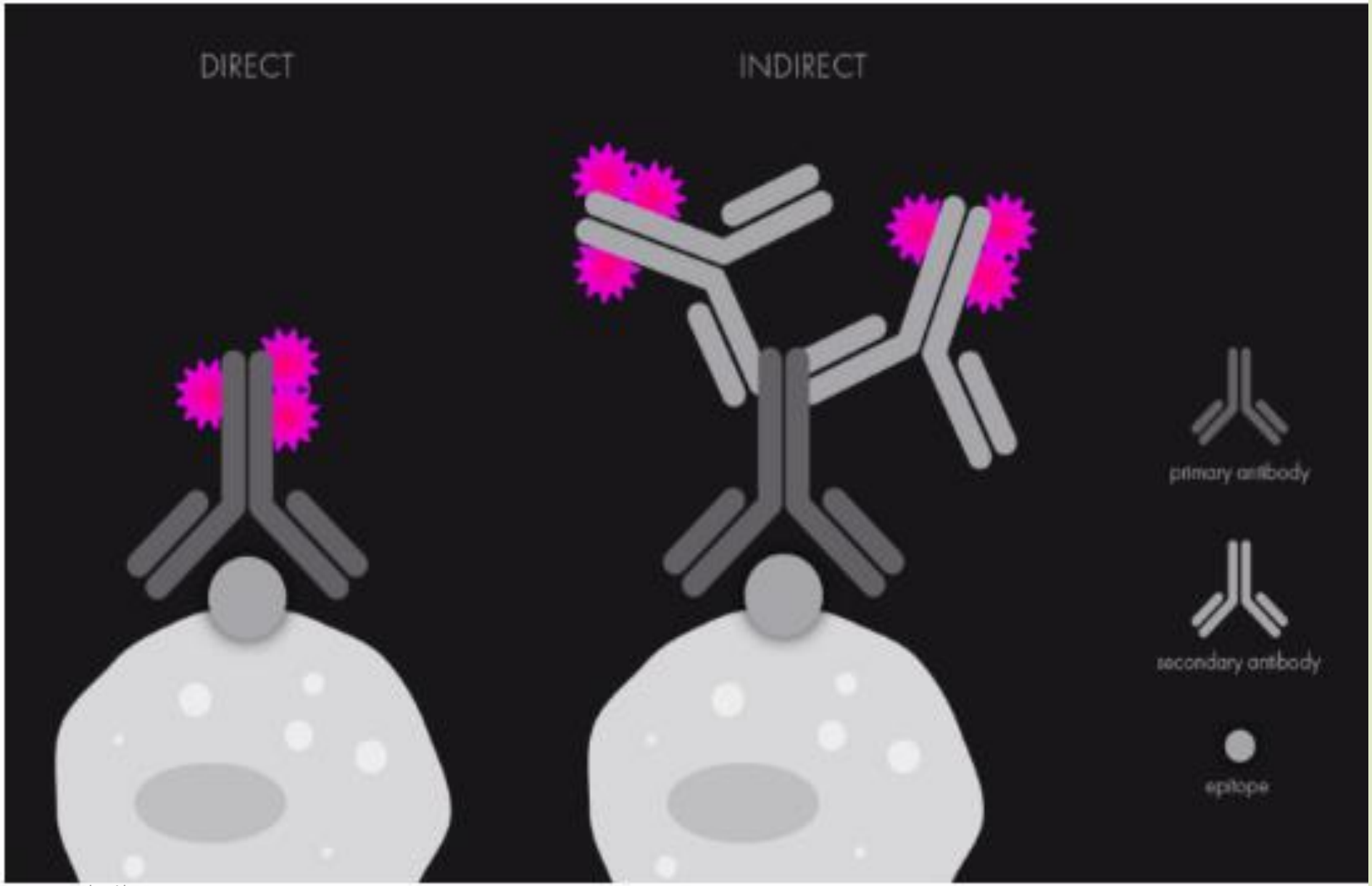
آنتی بادی های اختصاصی گران قیمت هستند برای همین در این آزمون ها برای صرفه جویی در مصرف آنتی بادی ها از لام های مخصوص که دارای حفره های کاذب کوچک هستند استفاده می شود.

در صورتی که امکان دسترسی به این لام ها وجود نداشته باشد، می توان با استفاده از ماژیک های ضد آب حفره ی کاذبی روی لام ایجاد کرد و سوسپانسیون سلولی با رقت مناسب را روی آن اضافه کرد. این سلول ها باید بطور یکنواخت روی لام پخش شوند و سلول ها روی همدیگر قرار نگیرند. لام ها بعد از خشک شدن، با متانول یا هر فیکساتور مناسب دیگری ثابت شده و آماده ی رنگ آمیزی می شوند.

روش ایمونوفلورسانس به دو روش انجام می شود:

مستقیم وغیر مستقیم.

هر دو روش مستقیم (Direct immunofluorescense) و غیر مستقیم (Indirect immunofluorescense) برپایه اتصال اختصاصی آنتی ژن - آنتی بادی استوار است. در ایمونوفلورسانس مستقیم تنها از یک آنتی بادی که به مواد فلوروسنت متصل شده است، استفاده می گردد و در روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم از دو آنتی بادی استفاده می شود که آنتی بادی ثانویه به مواد فلوروسنت اتصال یافته است.


DIRECT
INDIRECT
primary antibody
secondary antibody
epitope

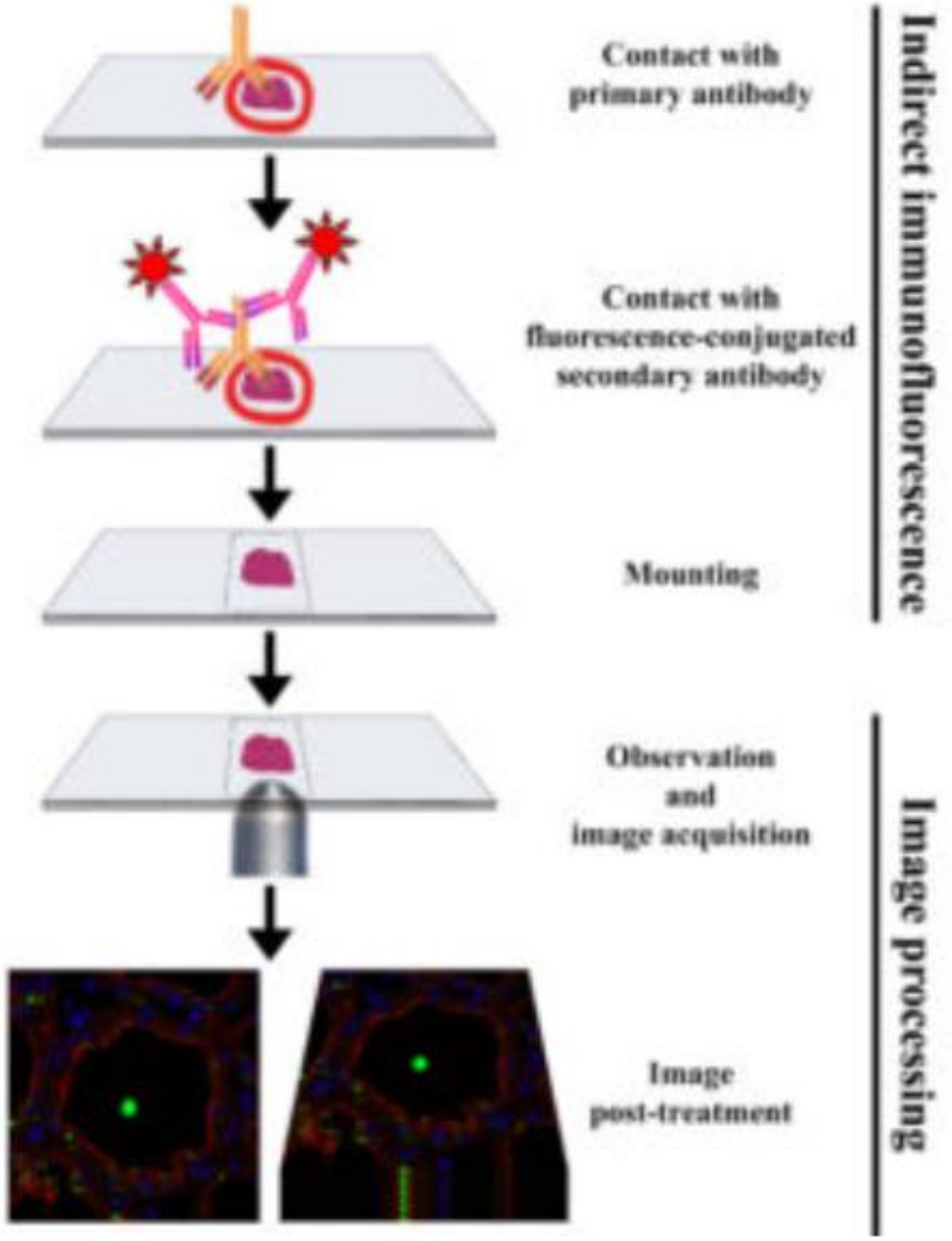
در ایمونو فلورسانس مستقیم که بر روی بافت بیوپسی شده انجام میگردد، حضور کلاس های مختلف آنتی بادی مانند IgG، IgMو IgA و نیز اجزای کمپلمان (مانند C3، C4)جستجو می گردند ولی در ایمونوفلورسانس غیرمستقیم نمونه سرم بیمار جهت بررسی حضور یا عدم حضور (و هم چنین تیتراسیون) آنتی بادی ها و اتو آنتی بادی ها استفاده می گردد.

درروش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم، سلولها یا بافت های گوناگون به عنوان آنتی ژن روی سطح اسلایدها پوشانده شده اند، سرم بیمار روی چاهک های ایجاد شده روی این اسلایدها اضافه شده و بعد از طی انکوباسیون لازم و شستشو، آنتی بادی ضد آنتی بادی انسانی نشاندار با مواد فلورسنت مانند FITC اضافه می شود.

در کنار سرم بیمار روی هر اسلاید یک کنترل منفی و یک کنترل مثبت نیز قرار داده می شود.

در صورت وجود این آنتی بادی در سرم فرد به آنتی ژن موجود در اسلاید متصل شده و سپس این کمپلکس توسط آنتی بادی ثانویه کنژوگه با ماده فلوروسنت شناسایی شده که با میکروسکوپ فلوروسنت قابل مشاهده می باشد.

با بررسی نمونه ها زیر میکروسکوپ فلورسنت و مقایسه الگوی فلورسنتی با الگوی حاصله از کنترل منفی وکنترل مثبت و الگو های موجود در منابع علمی تیتر و الگوی آنتی بادی هایی که بر علیه آنتی ژن تولید شده اند، مشخص می نمایند.


Contact with primary antibody
Contact with fluorescence-conjugated secondary antibody
Mounting
Observation and image acquisition
Image post-treatment
Indirect immunofluorescence
Image processing

دستورالعمل/ روش کار ایمونوفلورسانس
آزمون ایمونوفلورسانس به دو روش مستقیم و غیرمستقیم قابل انجام است.

ایمونوفلورسانس به روش مستقیم:

آنتی بادی های اختصاصی شاخص مورد نظر با مواد فلورسنت نشان دار شده و بعد از تهیه ی رقت لازم مستقیما روی سلول ها اضافه می شوند.
بعد از تمام شدن زمان انکوباسیون، لام ها در بافر حاوی اوانس بلو شسته شده و بعد از خشک شدن بر روی آنها محلول مانت اضافه می شود و لام ها با میکروسکوپ ایمونوفلورسنت مطالعه می شوند.

معمولا برای شستشوی لام ها از بافر فسفات با pH بین ۷.۲ تا ۷.۴ استفاده می شود. بدین ترتیب که ابتدا معرف روی لام ها با بافر مربوطه شستشو داده می شود و بعد لام ها در داخل جارهای مخصوص شستشوی لام در داخل بافر غوطه ور می شوند و چند دقیقه در داخل جار تکان داده می شوند تا مواد اضافی که بطور غیراختصاصی به لام چسبیده شسته شده و از محیط عمل خارج شوند.

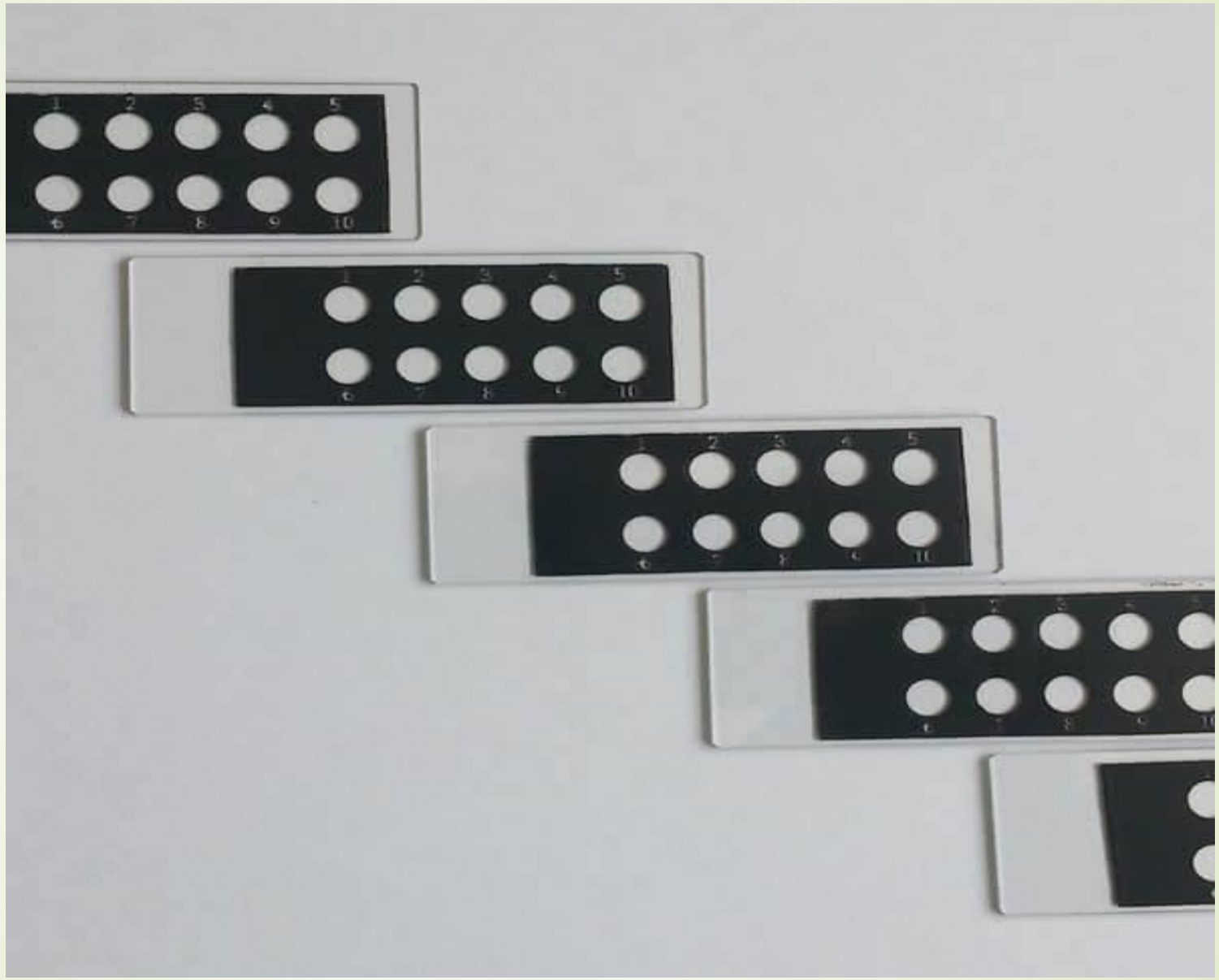
برای ایجاد کنتراست بیشتر، بهتر است چند قطره اوانس بلو هم به بافر اضافه کرد تا زمینه ی سلول ها قرمز تا ارغوانی شود و نواحی فلورسنت شده بهتر قابل تشخیص و تمایز بشوند.

ایمونوفلورسانس به روش غیر مستقیم:

ایمونوفلورسانس به روش غیر مستقیم، حساسیت بیشتری دارد. ابتدا آنتی بادی اختصاصی شاخص مورد نظر بدون کونژوگه شدن با مواد فلورسنت روی سلول ها افروده می شود و بعد از اتمام زمان انکوباسیون لام ها شسته شده و آنتی بادی دوم که در واقع علیه شاخص های آنتی ژنیک آنتی بادی اول بوده و با مواد فلورسنت کونژوگه شده اضافه می شود.
بعد از اتمام زمان انکوباسیون، مثل روش مستقیم، لام ها در بافری که حاوی رنگ اوانس بلو است شسته شده و بعد از خشک شدن روی آن ها محلول مانت اضافه شده و با میکروسکوپ ایمونوفلورسنت بررسی می شوند.

با توجه به اینکه کونژوگه کردن آنتی بادی ها باعث از دست رفتن مقداری از آنتی بادی می شود، معمولا از روش غیرمستقیم که نیاز به کونژوگه کردن کردن آنتی بادی اولیه ندارد استفاده می شود.
آنتی بادی ثانویه علیه شاخص های آنتی ژنیکی آنتی بادی اولیه بوده و بصورت تجاری وجود دارد و خیلی ارزان تر از آنتی بادی کونژوگه اختصاصی شاخص خاص است. روش غیر مستقیم با توجه به حساسیت بیشتر و مقرون به صرفه بودن رایج تر است.

سهيلا عباسي



در فلوسایتومتری نیاز به از بین رفتن کل غشای سلول نیست و می توان شاخص های موجود در سطح، سیتوپلاسم و هسته سلول را مورد بررسی قرار داد.

پروتکل روش غیرمستقیم پیچیده‌تر و زمان‌برتر از پروتکل ایمونوفلورسانس مستقیم است، اما انعطاف‌پذیری بیشتری دارد چون انواع آنتی بادی های ثانویه مختلف و تکنیک های تشخیصی را می توان برای یک آنتی بادی اولیه خاص استفاده کرد.

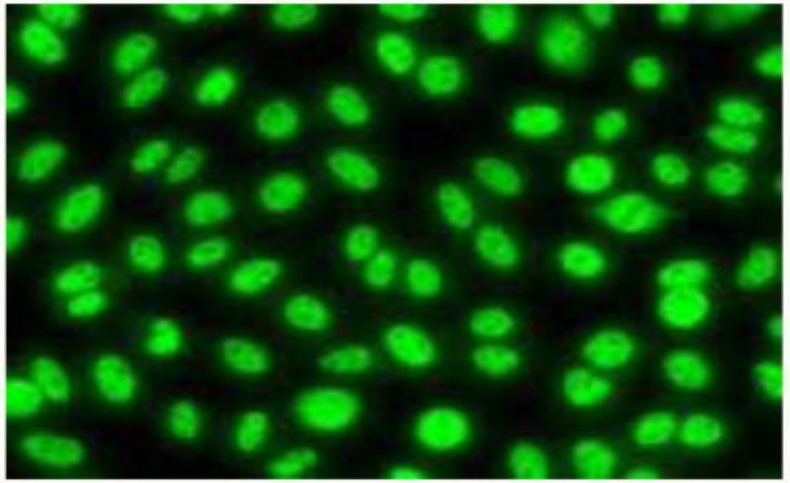
روش غیرمستقیم، یکی از تکنیک های کاربردی در تشخیص بیماری های خود ایمنی می باشد و از سرم بیمار به عنوان نمونه مورد آزمایش استفاده می شود.

ایمونوفلورسانس مستقیم اگرچه به میزان کمتری رواج دارد، مزایای قابل توجهی نسبت به روش ثانویه یا غیر مستقیم دارد.

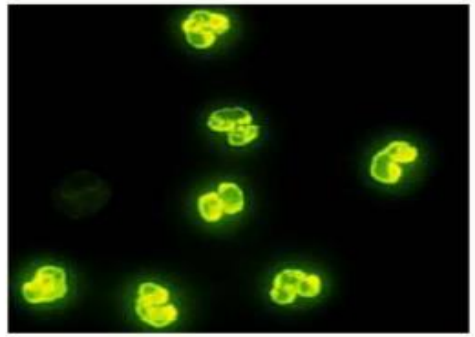
یکی از این ویژگی های مثبت این روش این است که اتصال مستقیم آنتی بادی نشان دار به آنتی ژن باعث کاهش تعداد مراحل آماده سازی نمونه می شود، در نتیجه در زمان صرفه‌جویی شده و میزان سیگنال های پس زمینه غیر اختصاصی کاهش می یابد.

از دیگر مزایای ایمونوفلورسانس مستقیم این است که امکان واکنش متقابل آنتی بادی های نشان دار با یکدیگر (cross-reactivity) و اشتباهات احتمالی را در طول فرآیند محدود می کند.

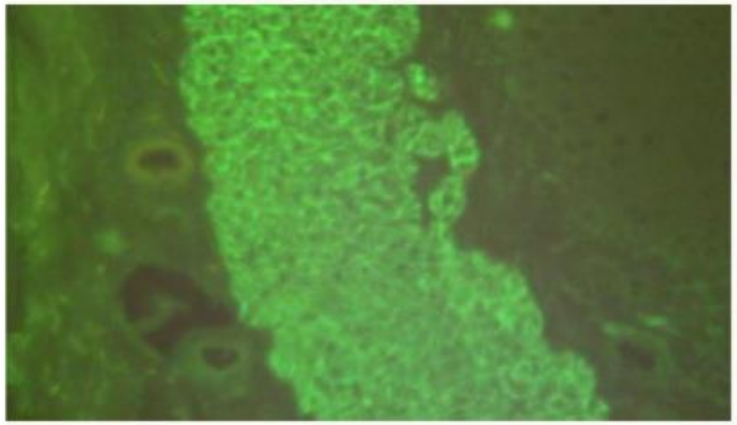
Anti Nuclear Antibody (ANA)



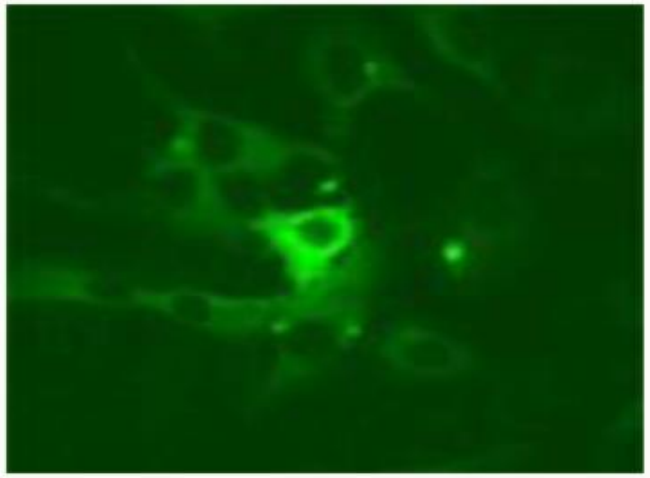
Anti-Neutrophil periplasmic Antibodies (p- ANCA)



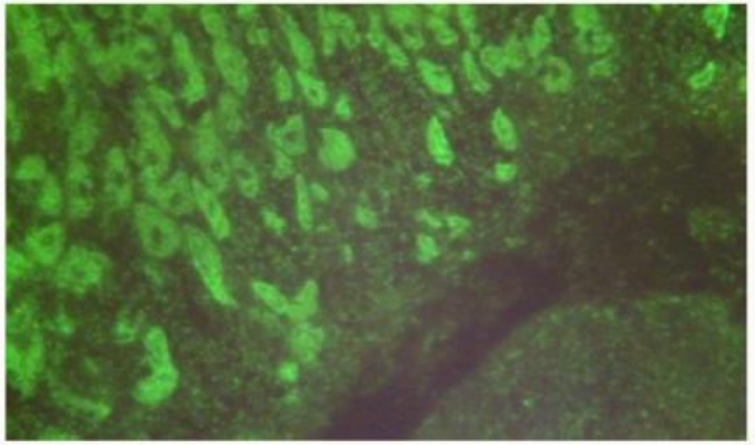
Anti EndomysialAntibody (EMA A/G)



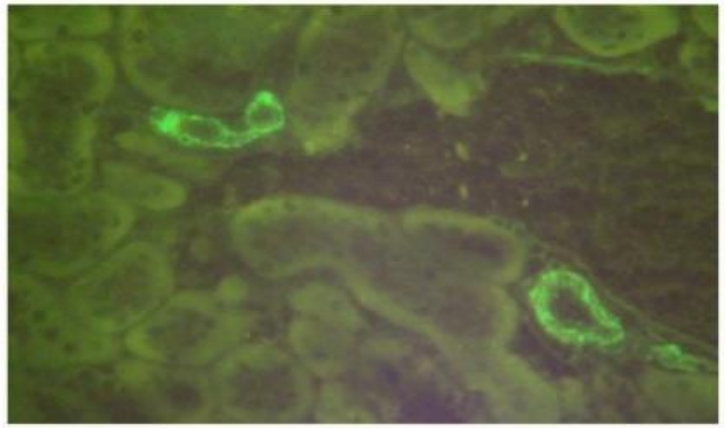
NeuromyelitisOptica (NMO)



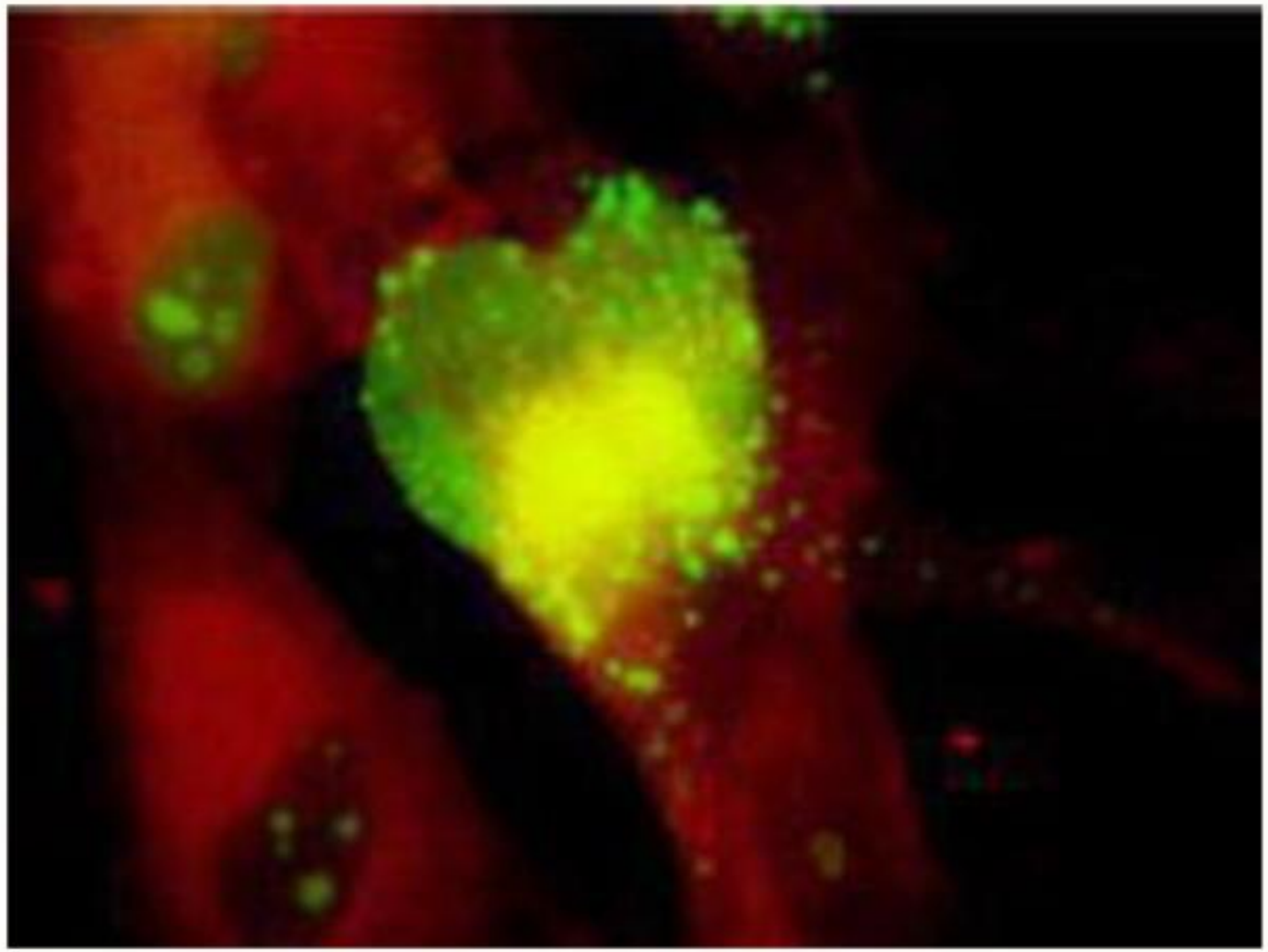
Anti-Mitochondrial Antibodies (AMA)



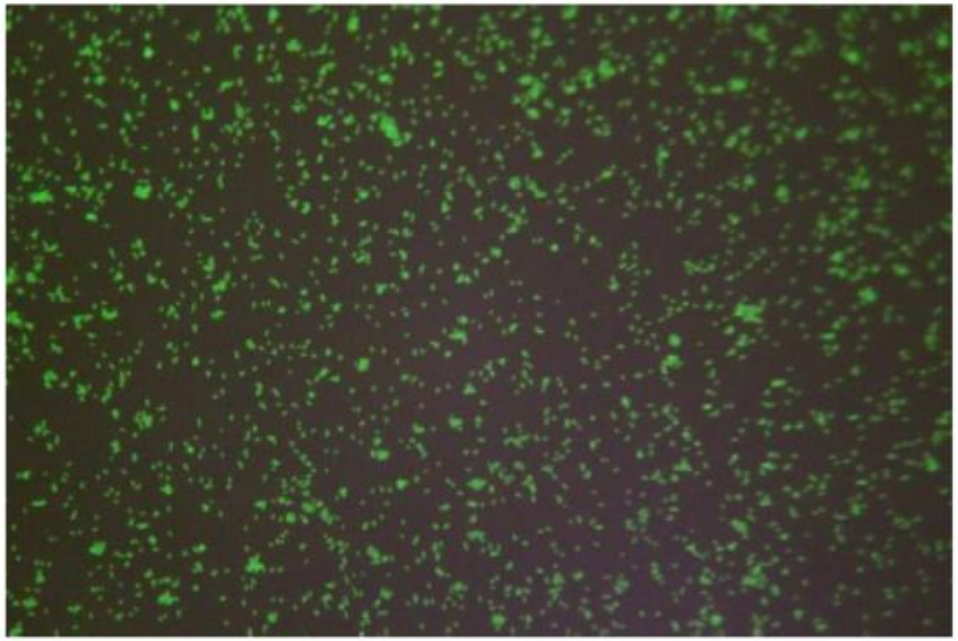
Anti-Smooth Muscle Antibody (ASMA)



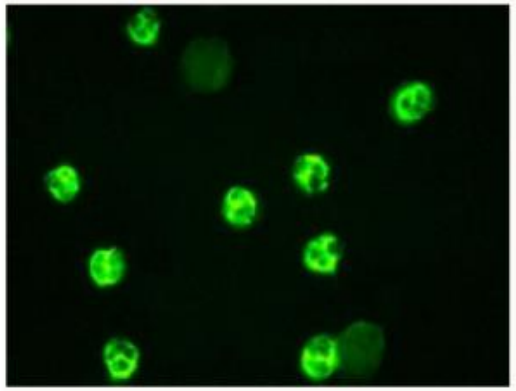
CytoMegalo Virus phospholipid 65 (CMV pp65)



Listeria monocytogenes(G & M)



AntiNeutrophil Cytoplasmic Antibodies (c-ANCA)

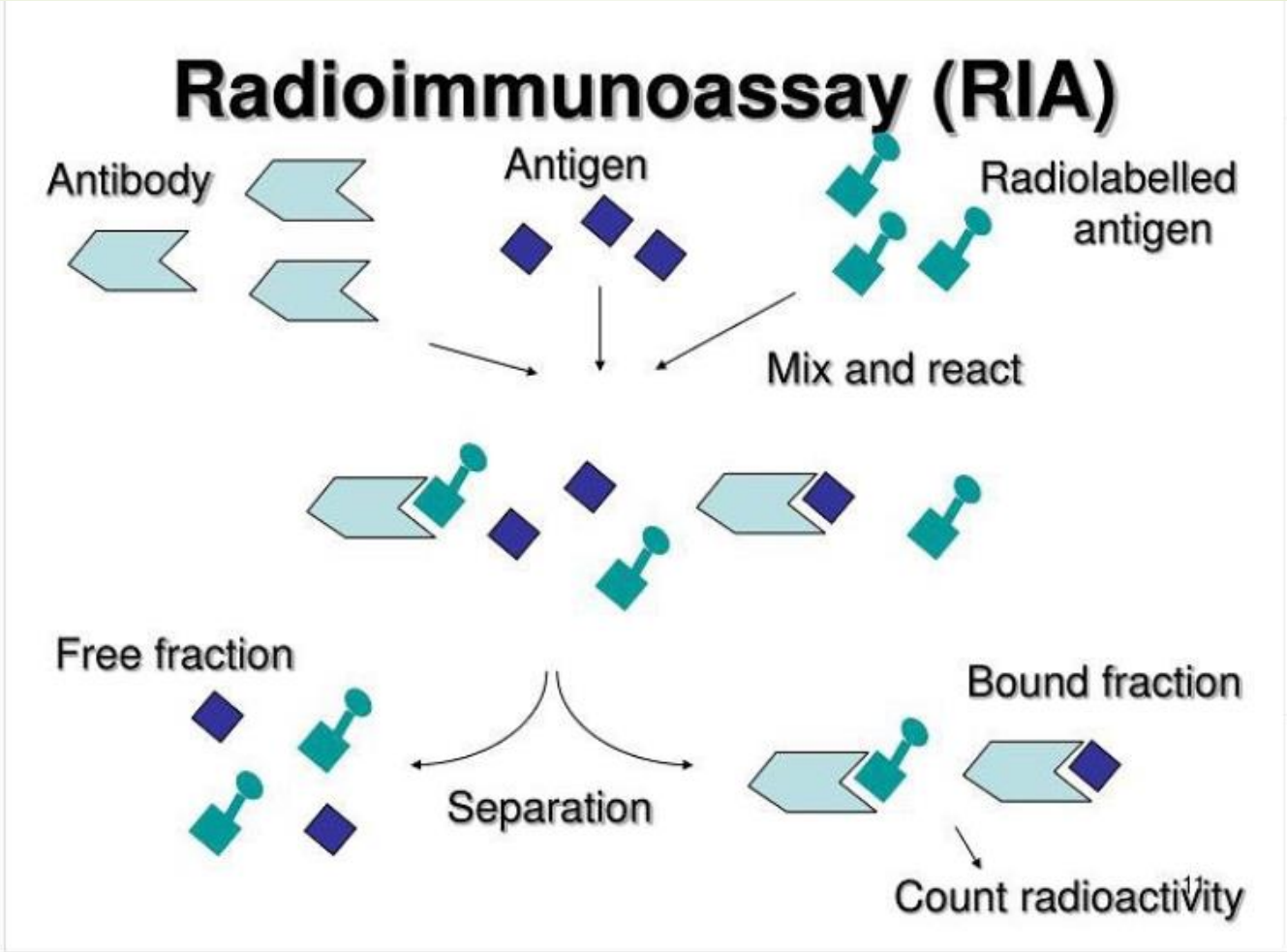


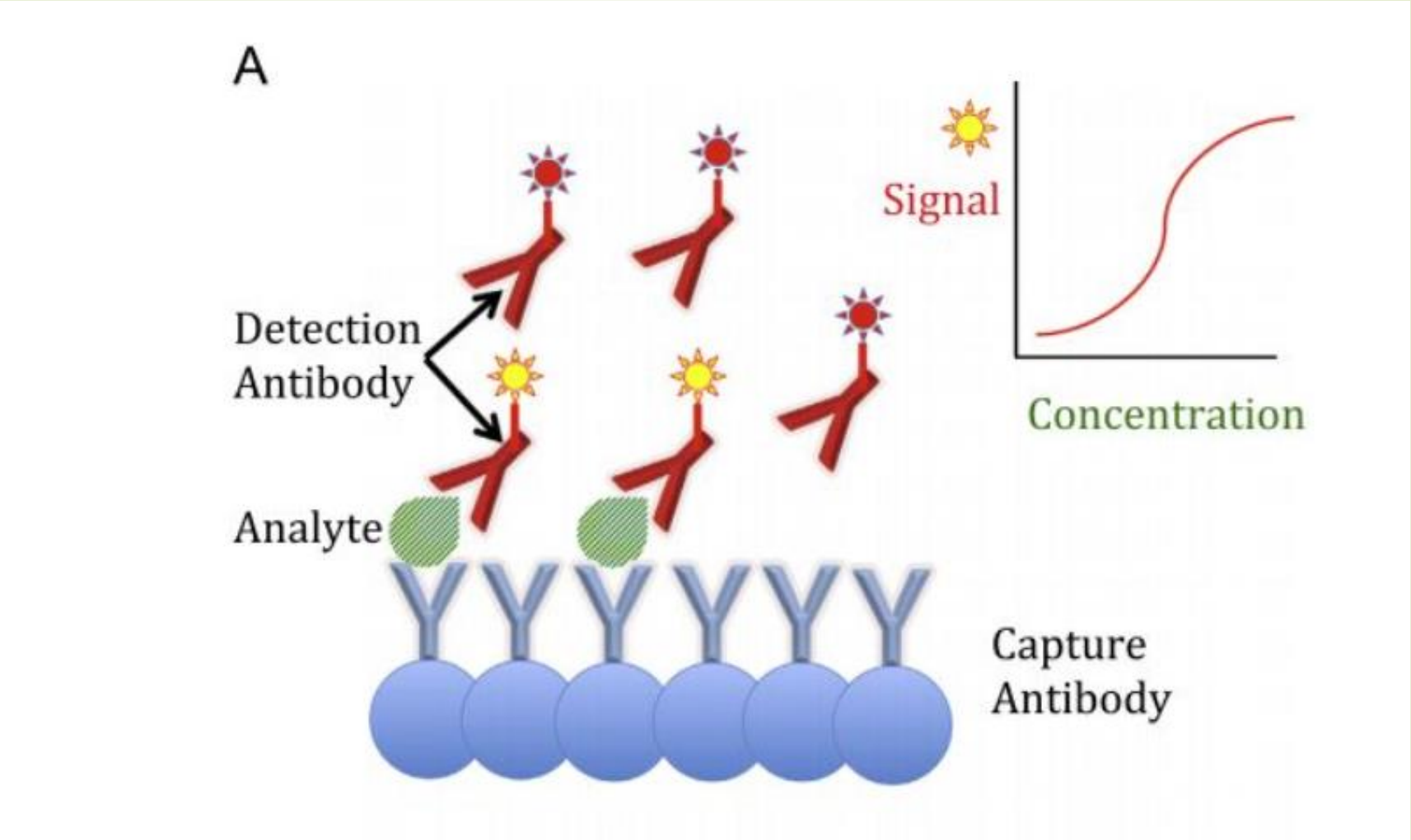
انواع بیماری های خود ایمنی که توسط تکنیک ایمونوفلورسانس غیرمستقیم تشخیص داده می شوند عبارتند از:

- Pemphigus vulgaris؛
- Pemphigus foliaceus؛
- Paraneoplastic pemphigus؛
- Immunoglobulin (Ig)A pemphigus؛
- Linear IgA bullous dermatosis and chronic bullous disease of childhood؛
- Dermatitis herpetiformis؛
- Bullous pemphigoid؛
- Pemphigoid gestationis؛
- Mucous membrane pemphigoid؛
- Epidermolysis bullosa acquisita؛
- Bullous systemic lupus erythematosus.

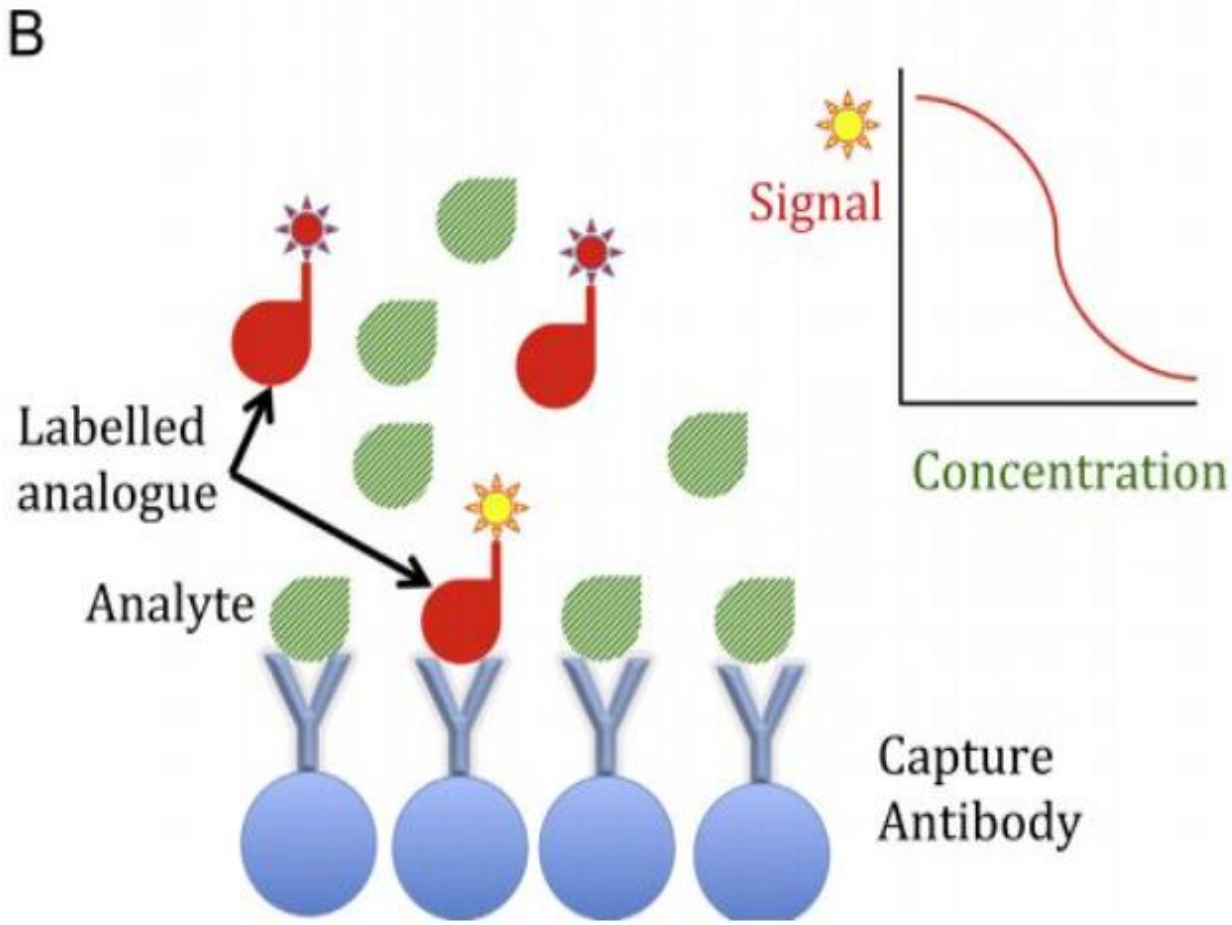
رادیوایمونواسی

رادیوایمونواسی در اواسط قرن بیستم ابداع گردید و اساس آن واکنش آنتی ژن و آنتی بادی های متصل به مواد رادیو اکتیو می باشد .


Radioimmunoassay (RIA)
Antibody
Antigen
Radiolabelled antigen
Mix and react
Free fraction
Bound fraction
Separation
Count radioactivity



در تصویر فوق نمای Aسنجش ایمونواسی را به روش ساندویچ نشان می‌دهد. در این روش مقدار آنالیت ارتباط مستقیم با سیگنال‌های ارسالی توسط آنتی‌بادی نشاندار دارد.



در نمای Bایمونواسی بر مبنای رقابتی انجام شده است. در این حالت آنالیت نشاندارشده در کیت آزمایش با آنالیت موجود در سرم برای چسبیدن به آنتی‌بادی‌های فاز جامد رقابت کرده و مقدار آنالیت نسبت عکس با سیگنال‌های ارسالی توسط آنتی‌بادی‌های نشاندار دارد.

برخی از محدودیت‌ها و معایب روش‌های سنجش ایمنی رادیواکتیو عبارتند از :

۱) خطر تشعشع رادیواکتیو
۲) نیاز به امکانات حفاظتی در برابر پرتوها،
۳) تولید زباله‌های رادیواکتیو،
۴) محدود بودن زمان انقضاء کیت‌ها به دلیل نیمه‌عمر کوتاه
۵) محدودیت اتوماسیون

در حال حاضر استفاده از این روش در اندازه گیری هورمون ها و آنتی بادی ها با توجه به موارد فوق بسیار محدود شده است

با تشکر از توجه شما

سهلا عباسی