محاضرات

علم المصول Serology

ب ٤٦٥

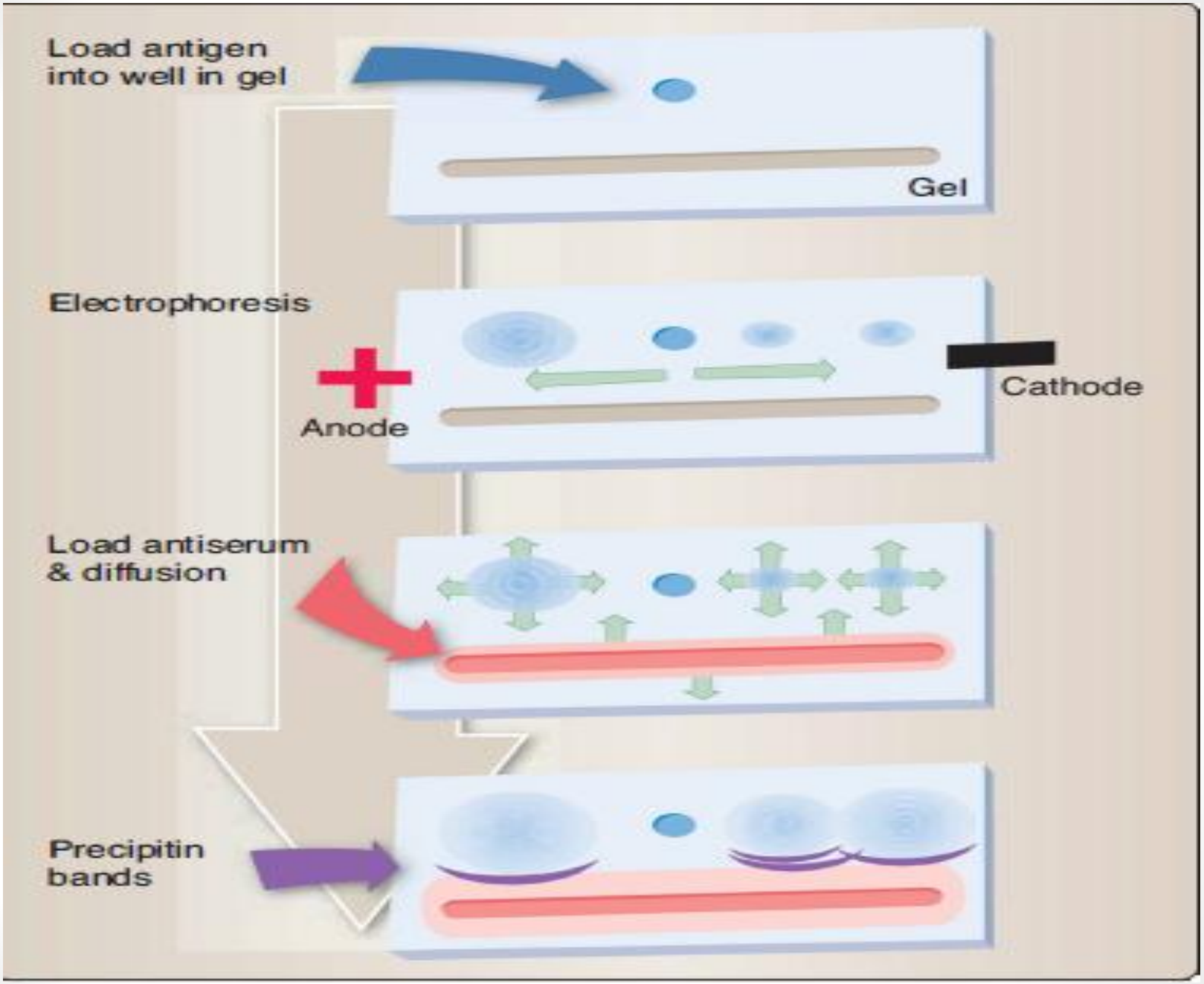
ا. د .وفاء سعدون شاني

المحاضرة الثالثة

Immunoelectrophoresis الترحيل الكهربائي المناعي

وهو فحص ترسيبي يتكون من مزج تقنيتين و هي تقنية الترحيل الكهربائي electrophoresis وتقنية الانتشار المناعي immunodiffusion ويتم في , starch , agarose , agar cellulose acetate membrane

ومبدأ التفاعل ان يتم فصل خليط من Ags بواسطة التيار الكهربائي في الـ gel ثم يترك لكي يتفاعل مع Ab في نفس الوسط وان الانتقال بواسطة electrophoresis يسهل بواسطة buffer اي محلول دارىء يمتلك PH تكون بين PH للـ Ab و PH للـ Ag حيث يتم وضع Ag في حفر وبعد ان يتحرك يوضع Ab في ثقب طويل لكي يتفاعل لذلك ممكن فصل خليط من Ags بهذه الطريقة


Load antigen into well in gel
Gel
Electrophoresis
Anode
Cathode
Load antiserum & diffusion
Precipitin bands

ومن فحوصات الترسيب هي :

فحص الترسيب الجنائي The Forensic precipitin test

ويستخدم هذا الفحص لتمييز Species specificity لصبغات الدم وان صبغة الدم في هذا الفحص يجب ان تخفف لكي تحفظ ثم بعد ذلك نستخلص الصبغة بكمية قليلة من محلول ملحي

ثم نخفف قسم منها (اي الصبغة) وقسم يبقى بدون تخفيف ويضاف للأثنين احجام او كميات متساوية من anti-human serum وذو titer عالي .

تحفظ المحاليل بدرجة حرارة الغرفة لمدة 20 دقيقة ثم يجب تحضير خمسة محاليل للسيطرة وهي

١. a. صبغة الدم المستخلصة مع normal rabbit serum
٢. Anti-human serum + saline solution. b
٣. c . مستخلص للجزء غير المصبغ من المواد المفحوصة
٤. d . عينات دم من عدة انواع من الحيوانات غير الموجودة في الفحص
٥. e .عدة عينات من دم معروف مماثل للـ anti-human serum

ويعتبر الفحص موجباً اذا كانت a و d (سالبة) و e (موجبة)

ان فحص الترسيب الجنائي يمكن ان يطبق لمعرفة او تمييز الاصل الحيواني لغيرها من الانسجة والسوائل مثل (milk , bones , semen و اللحم) باستخدام مستخلصات لتلك الانسجة و السوائل وكذلك مصول ممنعة خاصة او متخصصة .

وبصورة عامة يعد فحص الترسيب تقنية سيرولوجية حساسة حيث ان اقل من 0.1 µg من Ags محددة يمكن ان يكشف عنها .

الترحيل الكهربائي Electrophoresis

ان عزل او فصل البروتينات في حقل كهربائي قد استخدم لغرض تمييز الاستجابة المناعية وكذلك الحالات المرضية .وهناك طريقتين من الترحيل الكهربائي هما

١. Zone electrophoresis
والذي يتم فيه فصل البروتينات اعتمادا على الشحنة الكهربائية السطحية

٢. Denaturing electrophoresis
والذي تفصل فيه البروتينات اعتمادا ع الوزن الجزيئي

وفي كلتا الطريقتين فان عينات المصل توضع في وسط محدد ثم تعرض للتيار الكهربائي لكي يتم هجرة البروتينات والتي تظهر بهيئة حزم .

والاوساط الشائعة الاستخدام هي agarose gel و cellulose acetate و polyacrylamide gel

وفي الاستخدامات السريرية يشاع استخدام cellulose acetate لغرض فصل بروتينات المصل لانها

- واضحة او صافية بصريا
- وكذلك ممكن ان نستخدم كميات قليلة من البروتينات فقط
- وكذلك يمكن الكشف عنها بواسطة طرق تصبيغ كيمياوية او نسيجية كيمياوية

(SPEP) Serum protein electrophoresis

يقسم المصل الطبيعي للأنسان الى خمسة حزم

Albumin

α 1- globulin

α 2- globulin

β- globulin

γ–globulin

وتعتبر طريقة SPEP طريقة ضرورية لتشخيص مايسمى بال human paraprotein disorders مثل multiple myeloma وكذلك Waldenstorms macroglbulinemia حيث في هذه الانواع من الامراض او الاختلالات فان البروتين الذي يعمل تصاعد او نتوء عن طريق الترحيل عادة مايكون في منطقة γ او مايسمى بال spike او النتوء والذي يشير الى تجمع نوع واحد من الكلوبيولينات والذي يمتلك شحنة سطحية معروفة مقابل الاشكال العديدة من انواع الكلوبيولينات والتي تمتلك شحنات مختلفة (ولذلك تنتج مسحة في منطقة γ globulin)

وان النقص الواضح في γ globulin يمكن ان يقاس بهذه الطريقة في بعض الاحيان hypogammaglobulinemia ٠كما ان الترحيل الكهربائي لعينات الادرار او (UPEP) يحلل البروتينات المفرزة من القبل الكلية ٠

كذلك فان free Ig light chain يمكن معرفتها بسهولة في الادرار ان وجدت بكميات كبيرة كما في حالة Bense Jones proteinuria لل myeloma ٠
كما ان الترحيل الكهربائي يمكن ان يستخدم لتشخيص امراض CNS كما في حالة multiple seclerosis اي الكشف عن تغييرات بروتينات CSF

Denaturing gel electrophoresis and western blotting

وفي هذه الطريقة يتم تحطيم البروتينات بحفظها مع ionic detergent مثل sodium dodecyle sulphate (SDS) بدرجة 100م ثم يعمل لها ترحيل كهربائي بواسطة polyacrylamide gel او (SDS - PAGE) لان SDS يغطي كل البروتينات بحيث يجعل الشحنة السطحية للبروتين سالبة ٠

تهاجر البروتينات في الحقل الكهربائي اعتمادا على كمية SDS التي تربط به والتي تتأثر بحجم البروتين ٠لذلك فان هذه الطريقة تعتمد على فصل البروتين حسب الوزن الجزيئي له ٠

وان SDS – PAGE ترتبط دائما مع immunoblotting حيث ان البروتينات المعزولة بالترحيل الكهربائي تنقل الى قطعة ورق تسمى (nylon او nitrocellulose paper) حيث تلتصق بها عن طريق ارتباطات غير مستقطبة ، ثم تحضن ورقة الترشيح هذه مع مصل مضاد متخصص لتوضيح البروتينات التفاعلية وتسمى هذه العملية بال western blotting او immunoblotting

وتستخدم هذه الطريقة في المختبرات البحثية للتعرف على البروتينات المتخصصة في العينات الحياتية

اما الاستخدام السريري الواسع لل immunoblotting هو للتعرف على اشكال Ab التفاعلية للاشخاص مع ممرضات محددة مثل HIV حيث ان الفحص يستخدم بشكل واسع للبحث عن تواجد HIV ويعتبر الشخص مصابا بال HIV اذا استطاع Ab تمييز على الاقل اثنين من بروتينات فايروسية متخصصة حيث ان بروتينات الفايروس تعزل بواسطة SDS – PAGE وتنقل الى nitrocellulose paper والتي تحضن مع مصول المرضى

Complement fixation test

تستخدم فحوصات تثبيت المتمم بشكل واسع بسبب السهولة النوعية لها وقلة تكلفتها للكشف عن الاستجابات المناعية للعوامل المرضية مثل

1- Coccidiomycosis و Histoplasmosis للبحث عن antifungal Abs
2- Adenovirus و Herpes virus للكشف عن antiviral Abs
3– antimycoplasma and antirerickettsial Abs

حيث ان تكوين المعقدات المناعية في المحلول ممكن ان يكشف عنها بواسطة قابلية هذه المعقدات على تثبيت واستهلاك بروتينات المتمم ٠ ومع هذا فان العديد من فحوصات تثبيت المتمم قد استبدلت بالفحوصات المعتمدة على الانزيمات حيث انها تعتبر الان كفحوصات تأكيدية اثباتية فقط ٠

وهناك فائدتين لهذا الفحص هما :

١. ان المتمم يرتبط بكل تفاعلات الضد والمستضد سواء كانت مطلوبة او غير مطلوبة في التفاعل ٠
٢. حاجة المتمم في التفاعلات التحللية المناعية ٠

يقسم فحص تثبيت المتمم الى مرحلتين :

Test system

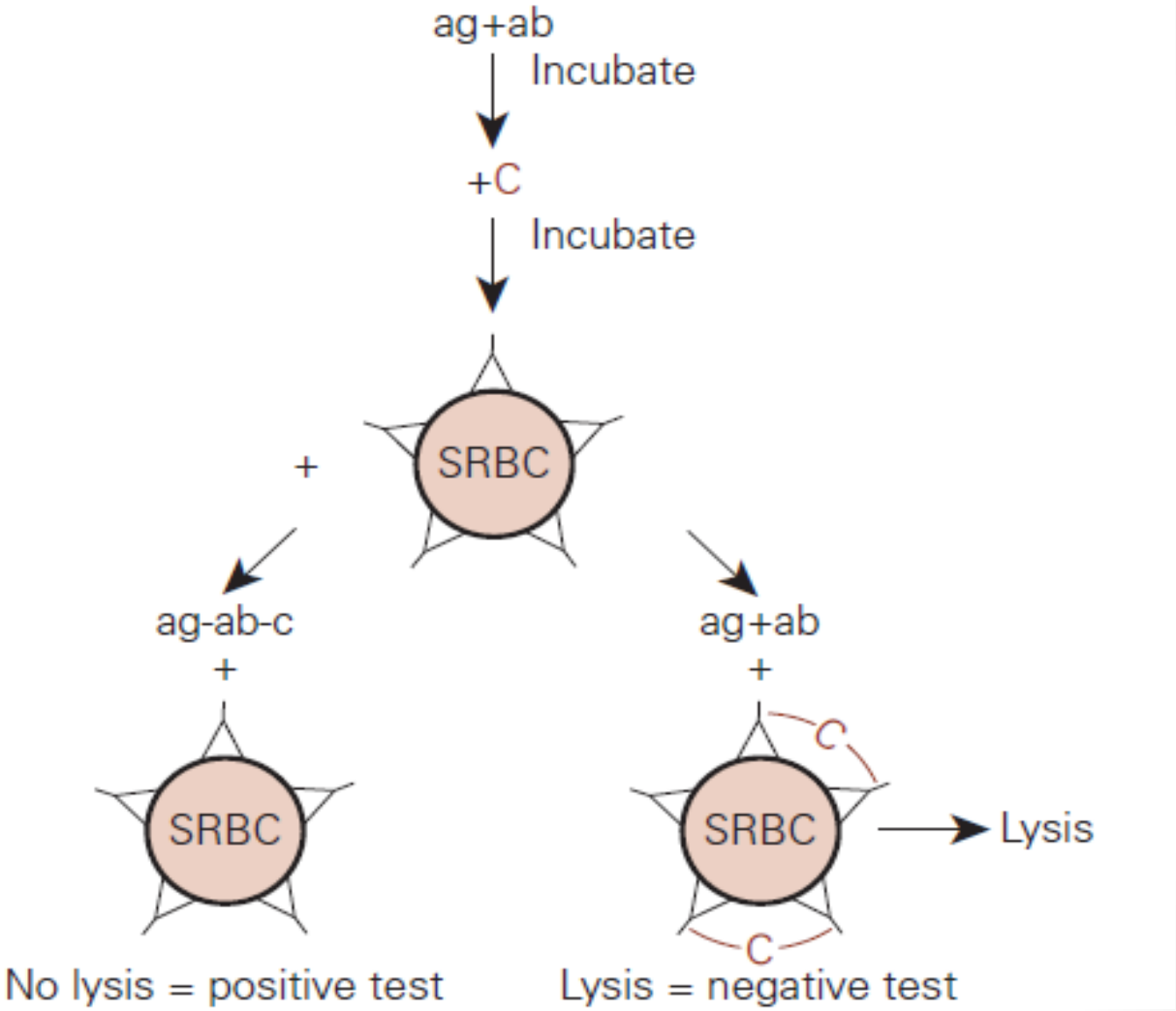
الذي يحتوي على Ag و serum الذي يعتقد بانه حاوي على Ab لهذا ال Ag ٠حيث ان المصل يجب ان يغلى لدرجة 60 م قبل الاستخدام لغرض تحطيم المتمم الموجود طبيعيا فيه ٠ثم يضاف كل من Ag وAb كمية محددة من المتمم بهيئة (normal guinea pig serum) ثم يتم حضن المحاليل السابقة وبعد الحضن يضاف النظام الثاني وهو

Indicator system

ويتكون هذا النظام من sheep RBCs وكذلك hemolysin اي (Ab المتخصص ضد sheep RBCs) والذي يضاف للمحاليل السابقة ثم يحضن ايضا

وبالنسبة لتقييم نتيجة الفحص فيعتمد على وجود او غياب التحلل الدموي او hemolysis في Indicator system اي في حالة وجود Ab في المصل المفحوص فانه يرتبط مع Agوكذلك فان المتمم المضاف سوف يرتبط مع المعقد الناتج ولايحدث هنا تحلل لل RBCsوهنا يعتبر الفحص موجبا +ve ٠

واذا لم يكن هناك Ab في المصل المفحوص فان المتمم يبقى حرا والذي يرتبط مع Indicator systemثم يحدث تحلل RBCs وهنا يعد الفحص سالبا -ve ٠


ag+ab
Incubate
+C
Incubate
+
SRBC
ag-ab-c
+
SRBC
No lysis = positive test
ag+ab
+
C
SRBC
Lysis
C
Lysis = negative test

Labeling techniques in immunoassay

Enzyme immunoassays (EIA)- 1

الامتصاصية المناعية المرتبطة بالانزيم

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

في هذا الفحص يثبت Ag او Ab على سطح اما microtiter plate او plastic beads ٠ويعتبر هذا الفحص سريعا وبسيط الاداء باستخدام جهاز محلل اوتوماتيكي ELISA reader لكنه يحتاج الى مواد عالية التنقية مثل monoclonal Ab وكذلك المستضدات المحصلة من التهجين recombinant antigens ٠

وتوجد اربعة انواع من فحوصات ELISA

Direct -1

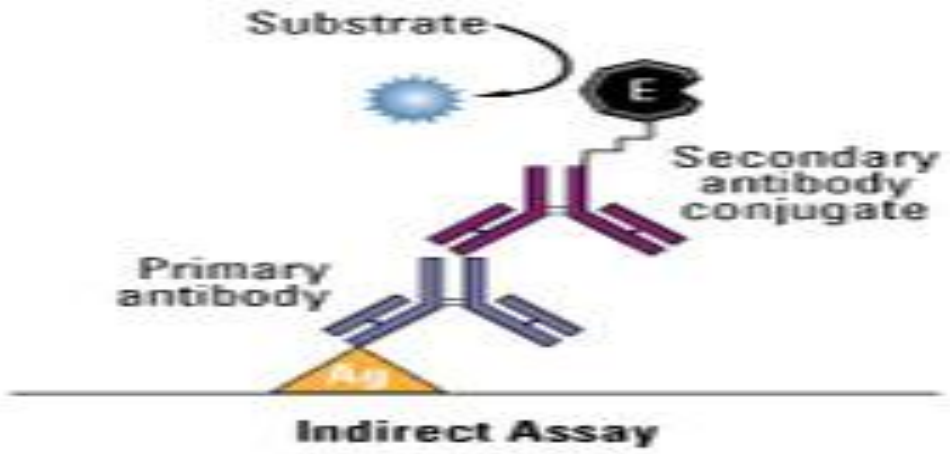
وفي هذا النوع تحاط صفيحة الاليزا بالمستضد ثم يضاف الضد المحاط بالانزيم primary antibody conjugated with an enzyme ثم تضاف المادة الاساس او substrateحيث ان كمية معقد Ag-Ab يكون متناسب مع كمية تفاعل الانزيم مع المادة الاساس والذي يعرف من تغير اللون والذي يقاس بواسطة ELISA reader وتكون النتيجة بقراءة الكثافة الضوئية optical density (OD) ثم تستخرج تراكيز المواد المفحوصة بالمقارنة محاليل قياسية

2- Indirect غير المباشر

وهنا تحاط حفرة الصفيحة بال Ag ثم يضاف مصل الشخص المتوقع احتوائه على Ab وبعدها يضاف(anti-human gamma globulin (anti – HGG (وهو Ab مصنع في حيوان اخر مخصص ضد قطعة Fc ل human Ab) والذي يرتبط به الانزيم كيمياويا ٠

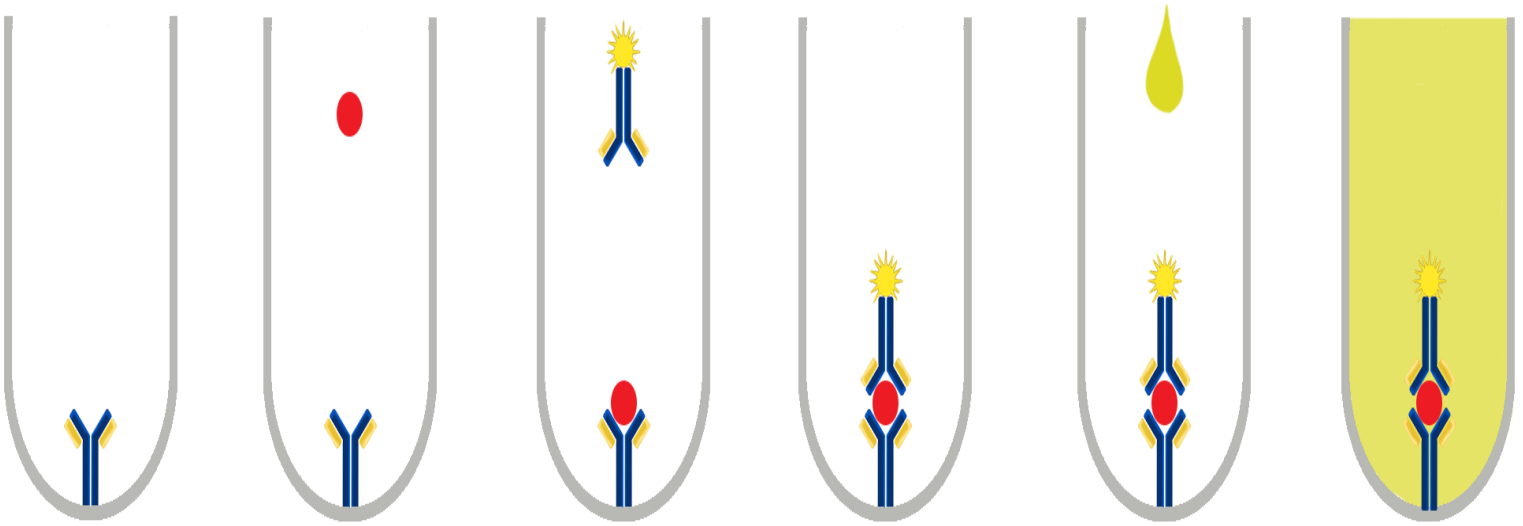
ثم تضاف substrate حيث ان كمية معقد Ag-Ab يكون متناسب مع كمية تفاعل الانزيم مع المادة الاساس والذي يعرف من تغير اللون والذي يقاس بواسطة ELISA reader وتكون النتيجة بقراءة الكثافة الضوئية optical density (OD)

ثم تستخرج تراكيز المواد المفحوصة بالمقارنة مع محاليل قياسية



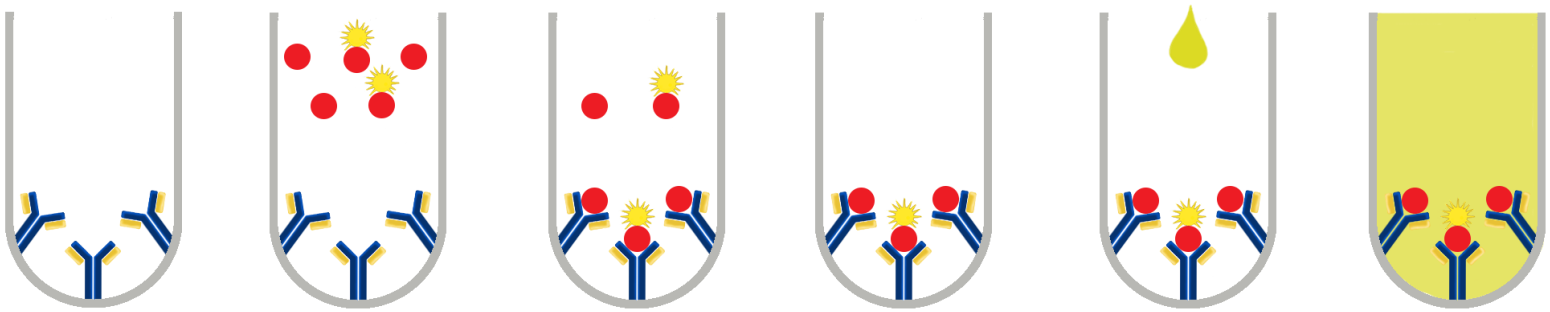
Sandwich -3

وهنا يتم احاطة الحفرة بال capture Ab ثم يضاف المستضد بعدها يضاف secondary Ab والمعلم بالانزيم ثم تضاف substrate ونفس الخطوات المذكورة اعلاه



Competitive - 4

وتسمى ايضا inhibition ELISA وفيها يتم احاطة صفيحة الاليزا بال capture Ab والمتخصص للمستضد المفحوص ، ثم يضاف ال Ag او الجزيئة المطلوب البحث عنها وكذلك الجزيئة المنافسة اي نفس المستضد محاط بالانزيم ويتنافس الاثنان للارتبط بال capture Ab ومادامت كمية الجزيئة المرتبطة بالانزيم محددة لذلك فان نسبة الجزيئة الموجودة طبيعيا في العينة هي التي تحدد نسبة ارتباط الجزيئة الطبيعية الى الجزيئة المحاطة بالانزيم ثم تضاف substrate حيث ان كمية معقد Ag-Ab يكون متناسب مع كمية تفاعل الانزيم مع المادة الاساس والذي يعرف من تغير اللون والذي يقاس بواسطة ELISA reader وتكون النتيجة بقراءة الكثافة الضوئية optical density (OD) ثم تستخرج تراكيز المواد المفحوصة بالمقارنة محاليل قياسية



ومن الانزيمات المستخدمة في فحص الاليزا هي

Horse raddish peroxidase

Alkaline phosphatase

ويجب ان تكون هذه الانزيمات ذات ثباتية عالية وخصوصية مطلقة وكذلك يجب ان لا تتغير بوجود المثبطات في نظام الفحص وان تكون غير موجودة في كل من الضد والمستضد