مبحث : واکنش آنتی ژن و آنتی بادی

جلسه : ۱۱

استاد : دکتر کوروش کلانتر

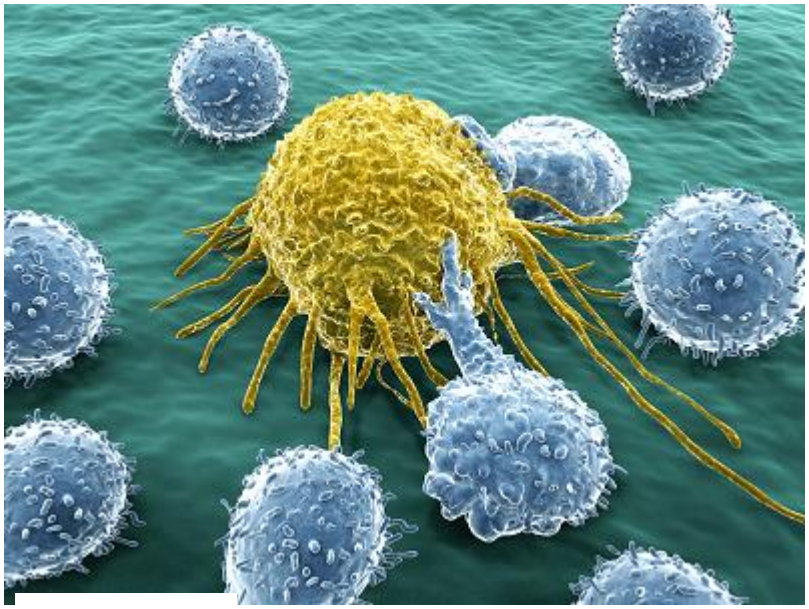
تهیه کنندگان :

۱. میلاد سعیدزاده

۲. ندا فرزانی

۳. حسن احمدیان

۴. محمد زارع

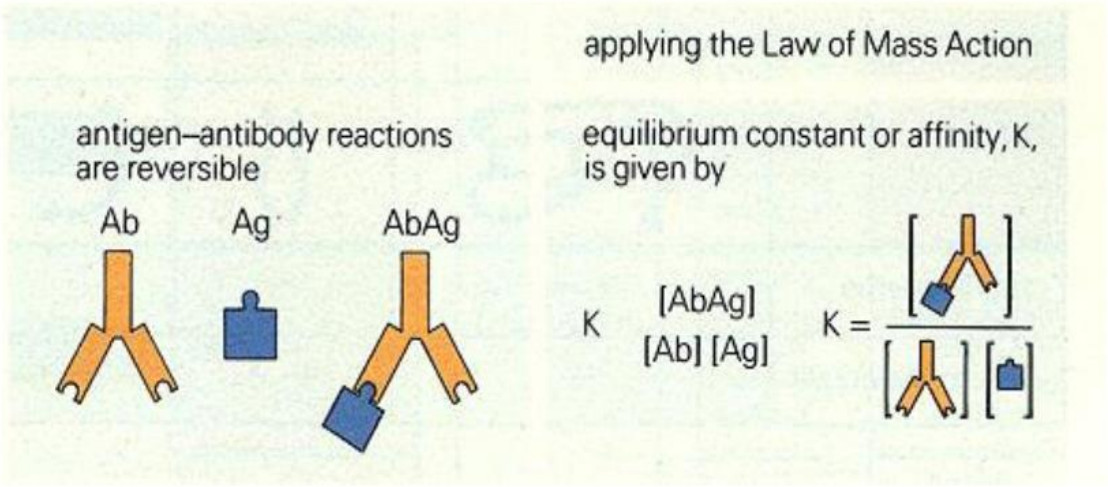


ایمنی شناسی

نواریون ۹۸ دندانپزشکی شیراز

مطالب این جلسه پیرامون یک سری واکنش های آنتی ژن-آنتی بادی ,تکنیک ها و اصول این واکنش ها ارائه خواهد شد.

The binding of Ag to Ab is mediated by non-covalent bonds, so is a reversible reaction.



در این شکل یک انتی ژن و یک آنتی بادی به اضافه واکنش بین آنها قابل مشاهده است.

در اثر واکنش بین آنتی ژن و آنتی بادی یک **complex** تشکیل میشود.این واکنش کاملا برگشت پذیر است;چون در اثر یک سری واکنش ها به یکدیگر وصل میشوند که این واکنش ها واکنش های دائمی نیستند.در واقع آنتی ژن و آنتی بادی مدام در حال اتصال و انفصال هستند.

این واکنش ها دارای << ضریب ثابت تعادل>> هستند , پس بطور کلی واکنش آنتی ژن آنتی بادی واکنشی کاملا برگشت پذیر است.

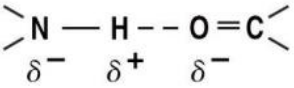
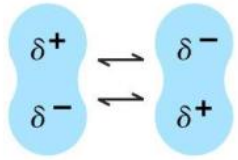
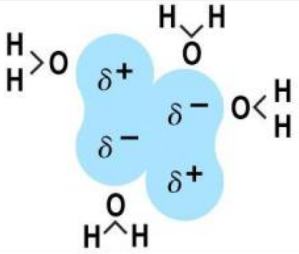
Noncovalent forces	Origin	
Electrostatic forces	Attraction between opposite charges	
Hydrogen bonds	Hydrogen shared between electronegative atoms (N,O)	
Van der Waals forces	Fluctuations in electron clouds around molecules oppositely polarize neighboring atoms	
Hydrophobic forces	Hydrophobic groups interact unfavorably with water and tend to pack together to exclude water molecules. The attraction also involves van der Waals forces	

Figure 3-9 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

برای واکنش های آنتی ژن-آنتی بادی به چند نیروی **non-covalent** احتیاج داریم که در جدول بالا بیان شده است.

به طور کلی برای آنکه واکنش آنتی ژن-آنتی بادی موثری داشته باشیم لازم است یک یا دو نوع از این نیروها را داشته باشیم تا بتوانیم اتصال قوی مشاهده کنیم.

** برای آنکه آنتی بادی خوبی داشته باشیم باید تاثیر یک سری عوامل را روی Ab درنظر بگیریم.

- Temperature : واکنش آنتی ژن-آنتی بادی در نقطه جوش ایجاد نمی شود;زیرا نیروی noncovalent ایجاد نمیشود و همچنین شاهد تجزیه پروتئین ها در این دما هستیم.از طرفی در دمای خیلی پایین مثل -20^{o} c هم نمی توانیم واکنش موثری بین آنتی ژن و آنتی بادی شاهد باشیم (اتصال نداریم).
- pH : در pHخیلی اسیدی مثل 2 یا 3 و pH خیلی قلیایی مثل 13 نمی توانیم واکنش موثری بین آنتیژن و آنتی بادی داشته باشیم (اتصال نداریم)
- Polyclonal vs. monoclonal : آنتی بادی های monoclonalاختصاصی تر هستند و واکنش ، واکنش قویتری میتواند باشد.
- Ab class : اگر آنتی بادی , IgM اختصاصی باشد (به دلیل پنتامر بودن) طبیعتا واکنش بهتری با آنتی ژن میدهد.
- Type of antigen : آنتی ژن های پروتیینی اتصال بسیار قویتری با آنتی بادی دارند .

- Ab-Ag concentrations : غلظت انتی ژن و آنتی بادی از تمامی عوامل ذکر شده مهمتر است . بطور مثال، ما نمیتوانیم یک واکنش آنتی ژن-آنتی بادی را در حالتی داشته باشیم که غلظت آنتی ژن و آنتی بادی هیچ تعادلی باهم ندارند.

**همانطور که بیان شد غلظت آنتی ژن آنتی بادی فاکتور بسیار مهمی در واکنش آنتی ژن-آنتی بادی است.بر همین اساس سه ناحیه وجود دارد :

1. Equivalent zone (ناحیه تعادلی) : میزان Ag & Ab باهم برابر است. **[Ag=Ab]**
2. Pro-zone : میزان Ab از Ag کمتر است . **[Ag>Ab]**
3. Pre-zone : میزان Ab از Ag بیشتر است . **[Ag<Ab]**

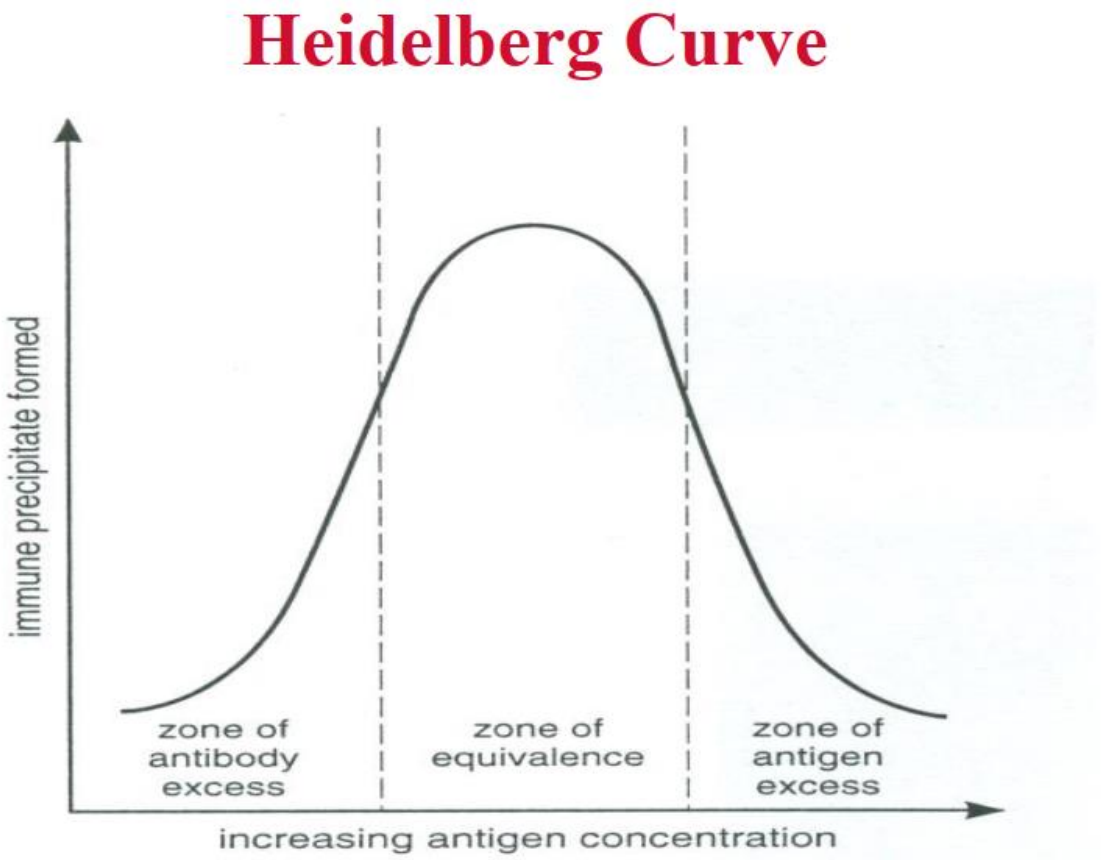
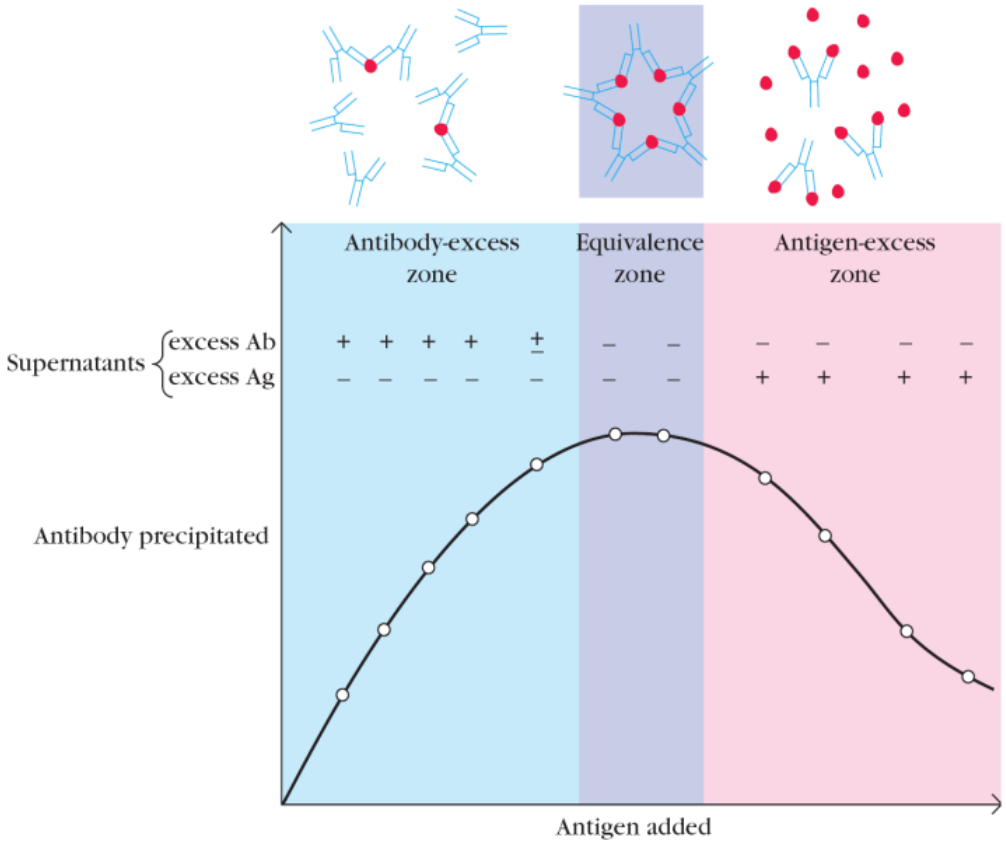


Figure 15–2. Antigen–antibody precipitin curve. Typical precipitin curve resulting from titration of increasing antigen concentration plotted against amount of immune precipitate formed. The amount of antibody is kept constant throughout.

در این curve نواحی بیان شده بخوبی قابل مشاهده است.در این تصویر، ناحیه تعادل، چون interaction آنتی ژن و آنتی بادی بیشتر است ،نسبت به ناحیه دیگر قله بالاتر است. پس چون میزان Agو Ab باهم برابر است , peak واکنش آنتی ژن-آنتی بادی در این قسمت مشاهده میشود.



در این تصویر مجددا سه ناحیه گفته شده مشاهده میشود.در ناحیه تعادل,تمام آنتی بادی ها با تمام آنتی ژن ها درگیر می باشند.

Immunoassay : واکنش حاصل از اتصال یک آنتی ژن و یک آنتی بادی

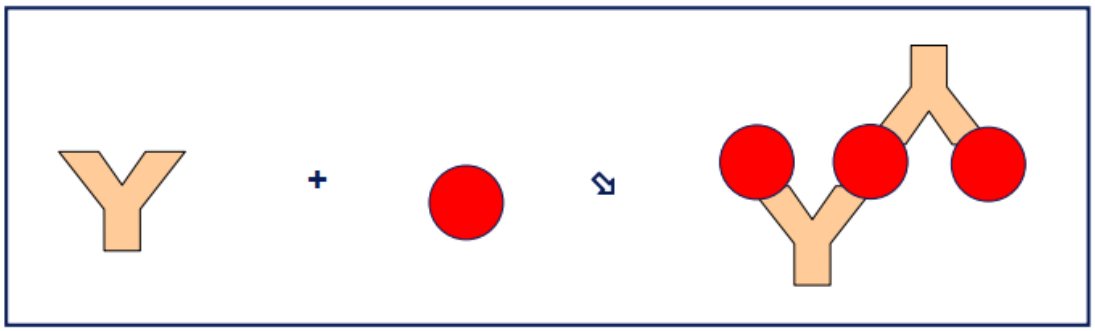
Immunoassay دو نوع دارد :

1) Macroscopic immunoassay : شامل

a. Agglutination ⟸ واکنش بین یک Abو یک Ag [ذره ای یا particular]

b. Precipitation ⟸ واکنش بین یک Abو یک Ag [محلول یا soluble]

: Agglutination



در تصویر بالا یک Ab و یک RBC و واکنش بین آنها و درنهایت رسوب و لخته ایجاد شده را مشاهده میکنیم.

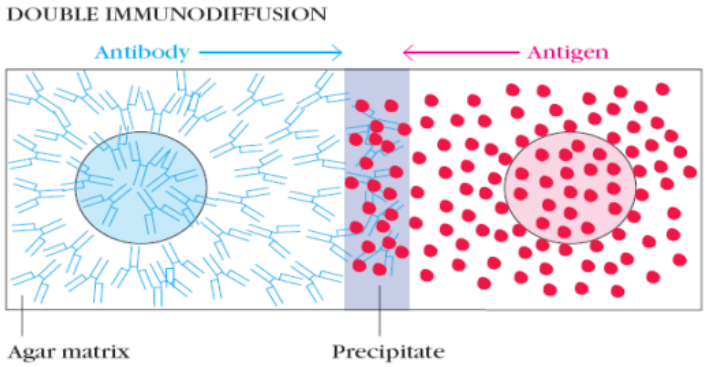
این واکنش یک واکنش Agglutination است و Ag ذره ای (particular) است.

Precipitation : انواع مختلفی دارد از جمله :

- Double immunodiffusion (ouchterlony method)
- Single radial immunodiffusion (mancini method)
- Electro immunodiffusion (countercurrent electrophoresis)

دو مورد اول توضیح داده خواهد شد و در آزمایشگاه ایمونولوژی فقط این دو مورد مشاهده میشوند.

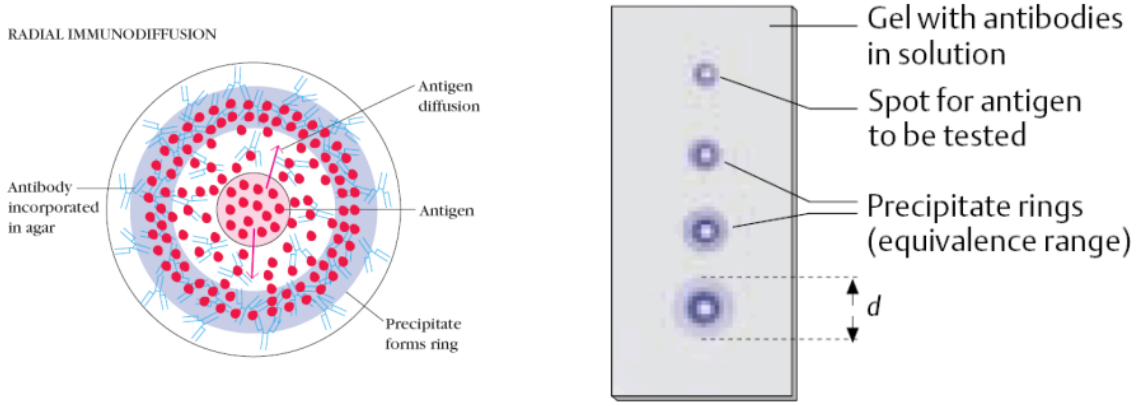
Double immunodiffusion (Ouchterlony method)



Double immunodiffusion (ouchterlony method) : این روش حالتی است که یک اسلاید شیشه ای داریم (مانند شکل بالا) . دو چاهک در دو طرف اسلاید ایجاد میکنیم. فرض کنید می خواهیم سرم یک بیمار را به چاهک راست منتقل کنیم و در سرم بیمار دنبال یک نوع آنتی ژن و یک نوع پروتئین میگردیم(مثلا C3 قطعات کمپلمان) .سپس Ab ضد C3 را به چاهک سمت چپ اضافه میکنیم. روی این اسلاید که چاهک در دو طرف ایجاد کردیم,یک نوع ژل

روی آن قرار میدهیم و ژل بسته می شود. بعد از مدتی اگر رسوب ایجاد شود , فقط میتوانیم بگوییم C3 در بدن این فرد وجود داشته یا خیر (کیفی).

Single Radial immunodiffusion (Mancini method)



: Single radial immunodiffusion (mancini method)

یک قطعه دایره ای مانند داریم که ژل را روی آن قرار داده ایم ولی از قبل در ژل Ab اضافه کرده ایم که این Ab داخل ژل، ضد C3 سیستم کمپلمان است.

ژل وقتی مایع است , Ab ضد C3 را به آن اضافه کرده و هم میزنیم و بعد روی این ظرف میریزیم تا بسته شود. در قسمت وسط آن یک چاهک ایجاد میکنیم.سرم بیمار را اضافه میکنیم سرم شروع به نفوذ میکند هرچقدر قطر هاله ایجاد شده بیشتر باشد به معنای زیاد بودن C3 در سرم بیمار است.اگر بدون در نظر گرفتن استاندارد های اندازه گیری قطر هاله را از لحاظ زیاد یا کم بودن گزارش کنیم,این نوع گزارش **کیفی** است. اگر برای هر میزان C3 و قطر هاله ای که ایجاد میکند یک استاندارد تعریف کنیم, میتوانیم با در دست داشتن قطر هاله ایجاد شده میزان C3سرم بیمار را گزارش کنیم که این نوع گزارش **کمی** است.

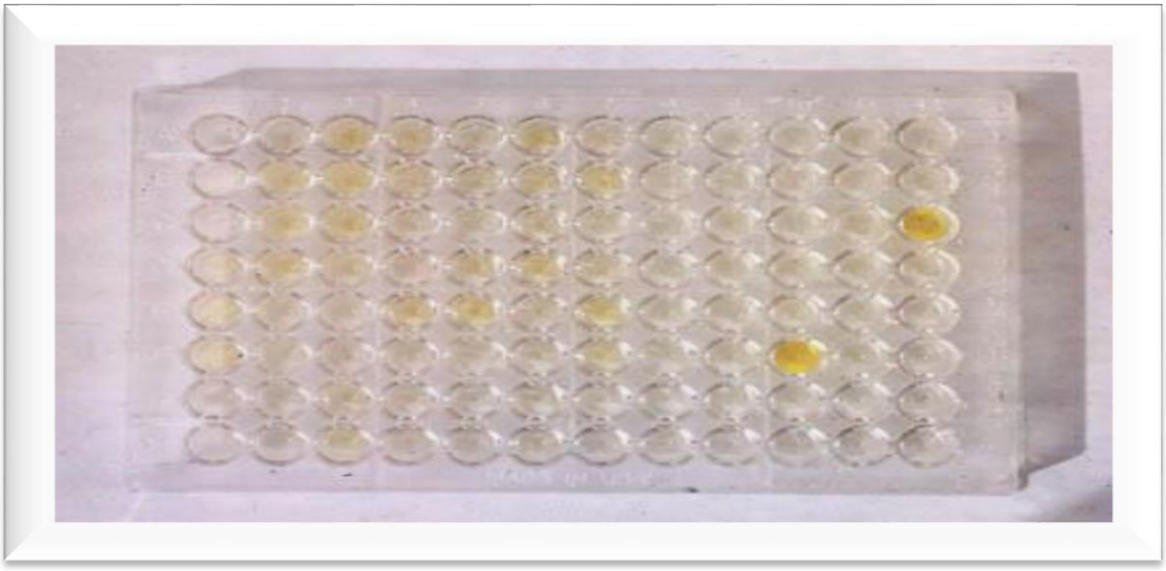
: Type of immunoassay

Microscopic immunoassay : آنتی ژن یا آنتی بادی هایی هستند که به یک آنزیم ,فلورسنت یا رادیو اکتیو کاجوگه شده اند (آنزیم, فلورسنت و رادیواکتیو نشانگر هستند)

Microscopic immunoassay به سه دسته تقسیم میشوند:

- EIA (enzyme immunoassay) : شناساگر آن آنزیم است
- FIA(fluorescence immunoassay) : شناساگر آن فلورسنت است
- RIA(radioactive immunoassay) : شناساگر آن امواج رادیواکتیو است

EIA or ELISA : نشانگر الایزا (ELISA) یک آنزیم است.الایزا واکنش بین یک آنتی ژن و آنتی بای است که در چاهک های کوچکی انجام میشوند..



** هرچیزی که در مایعات بدن انسان باشد در صورتیکه آنتی بادی ضد انرا داشته باشیم میتوانیم یک تست الایزا برای آن طراحی کنیم.

توضیحات شکل بالا: هرکدام از چاهک ها مثالی از یک فرد است که به آزمایشگاه مراجعه کرده است و میخواهد برای IgG یا IgM ضد کرونا چک شود.کاری که انجام میشود این است که پروتئین ضد کرونا ویروس را کف ظرف میچسبانند , سپس سرم آن شخص را به آن اضافه میکنند، اگر سرم آن شخص آنتی بادی ضد کرونا را داشته باشد آن آنتی بادی به پروتئین کرونا میچسبد و باعث زرد شدن محتویات چاهک ها می شود و بدین ترتیب آنرا تشخیص می دهند.

تفسیر انیمیشن فیلم جلسه 11 : به عنوان مثال ما به دنبال پروتئین x در سرم بیمار هستیم.ابتدا باید یک آنتی بادی اولیه (primer) ضد پروتئین xرا در کف پلیت بچسبانیم .

سپس سرم بیمار را به پلیت اضافه میکنیم تا پروتئین x به آنتی بادی بچسبد، سپس پلیت را شستشو میدهیم تا پروتئین های اضافی شسته شوند، سپس آنتی بادی ثانویه را که به یک آنزیم متصل است اضافه میکنیم.در مرحله بعد سوبسترا را اضافه

میکنیم (سوبسترا ماده ای است که، زمانیکه به آنزیم های داخل ظرف متصل میشود تغییر ساختار میدهد و رنگ زرد تولید میکند).

Immunohisto chemistry : همان حالت الایزا (ELISA) است.(الایزا آنتی ژن مایعات بدن مارا

اندازه گیری میکند.) درحالیکه immunohisto chemistry روی بافت ها این کار را انجام میدهد.

نحوه کار immunohisto chemistry : ما یک بافت را داریم که روی اسلاید آن را فیکس کردیم و میخواهیم ببینیم که آیا فلان مارکر آنتی ژن سرطانی را دارد یا نه. برای این کار یک آنتی بادی اولیه به اسلاید اضافه میکنیم ,اگر بافت حاوی آن مارکر سرطانی باشد آنتی بادی اولیه به آن متصل می‌شود ، سپس یک آنتی بادی ثانویه ضد آنتی بادی اولیه که به مارکر متصل شده را به اسلاید اول اضافه میکنیم(آنتی بادی ثانویه در این روش برخلاف روش الایزا به یک ماده فلئورسنت متصل شده است). این آنتی بادی ثانویه که حاوی فلوئورسنت است به آنتی بادی اولیه متصل میشود و درنتیجه ما میتوانیم با یک میکروسکوپ فلوئورسنت آن مارکر سرطانی را در بافت تشخیص دهیم.

Immunoproxide : مشابه روش قبلی (immunohistichemistry) میباشد اما در اینجا آنتی بادی ثانویه به یک آنزیم پروکسیداز متصل است، که این آنزیم پروکسیداز سوبسترایی به نامDAB (Diamono Benzidine) دارد.

اگر سوبسترای DAB به آنزیم پروکسیداز متصل شودتغییر ساختار میدهدو رنگ قهوه ای ایجاد میکند که با میکروسکوپ عادی قابل تشخیص است.

RIA : در واقع وقتی دنبال چیزی می‌گردیم که نشانگرش ماده رادیو اکتیو باشد.یه این مجموعه RIAگفته میشود.

** اگر ماده رادیو اکتیو زیاد باشد سیگنال رادیواکتیو زیاد و اگر کم باشد سیگنال رادیواکتیو کمی تولید می شود.

Flow cytometry : تست دیگری که خیلی کاربردی است و در کلینیک نیز زیاد از آن استفاده میشود.دستگاهی بنام Flow Cytometry است.این دستگاه امکان عبور یک جریان تک سلولی از یک معبر را ایجاد میکند.

دستگاه Flow Cytometry از سه قسمت اصلی تشکیل شده است :

1. منبع نوری (light source)
2. قسمتی که جریان مایع برای ما ایجاد میکند
3. Detector

مثال : فرض کنین از یه کوچه دارین رد میشین که انقدر باریکه که فقط یه نفر میتونه ازش رد بشه. این کوچه میرسه به یه جای چهار راه مانندی که سر چهار راه یه نفر وایساده و آدما رو چک میکنه و بر اساس ویژگی هایی که دارن اونا رو از هم جدا میکنه. حالا فرض کنین همین حالت واسه سلول باشه. مثلا وقتی به این دستگاه خون انسان بدیم , خون از داخل کوچه رد میشه و به سر چهار راه میرسه که یه detector اونجا حضور داره و سلولهای خونی رو از هم جدا میکنه و در آخر درصد فراوانی هر کدوم از سلولهای خونی رو میده.

** پس در Flow Cytometry جریان مایعی وجود داره که فقط یک سلول از آن عبور میکند.

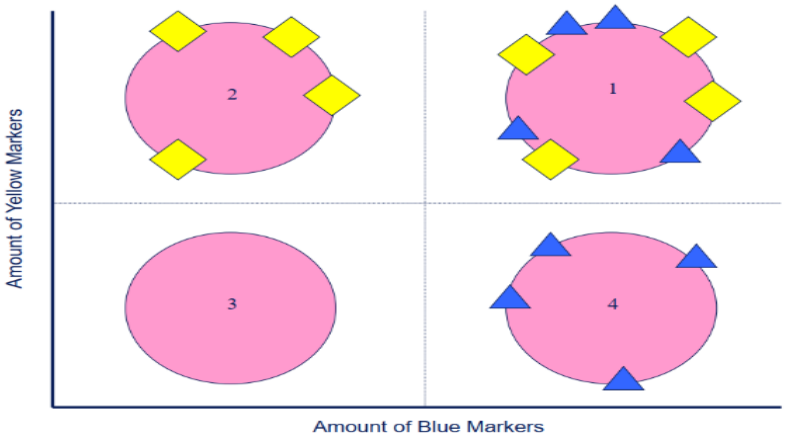
منبع نوری به detector کمک میکند تا سلول های مختلف را از یکدیگر تشخیص دهد. زیرا نور به هر سلولی که برخورد میکند , شکست نوری متفاوتی ایجاد میگردد وdetector بر اساس شکست نوری میتواند سلول ها را تا حدودی شناسایی کند.

علاوه بر این میتوانیم سلولها را با آنتی بادی که با ماده فلوئورسنت ترکیب است, کانژوگه کنیم تا وقتیکه نور با ماده فلوئورسنت برخورد کرد رنگ خاصی داشته باشیم. مثلا میگوییم نور آبی مخصوص لنفوسیت است و نور قرمز مخصوص ائوزینوفیل.

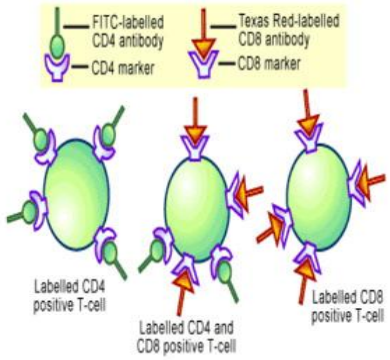
طبق مثالی که قبلا زدیم , نور در جایی که detectorحضور دارد میتابد (یعنی سر چهار راه ☺)

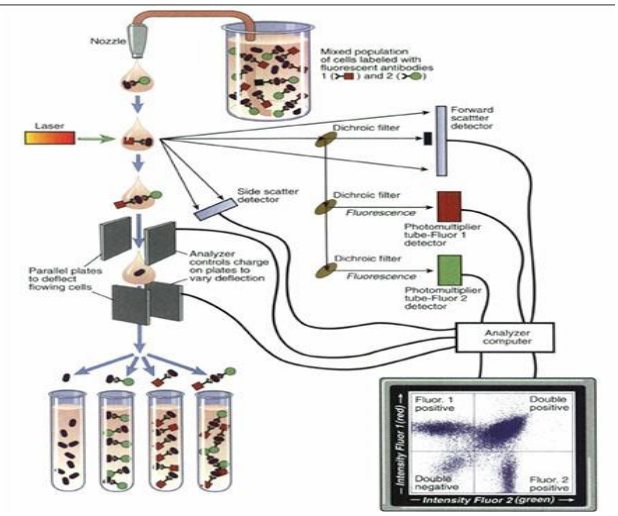
سپس شکست نوری ایجاد میشود. این میتواند تا حدودی نوع سلول را مشخص کند اما دقیق تر بخواهیم باید از آنتی بادی استفاده کنیم. مثلا آنتی بادی های CD4 و CD8 .

Remember this?

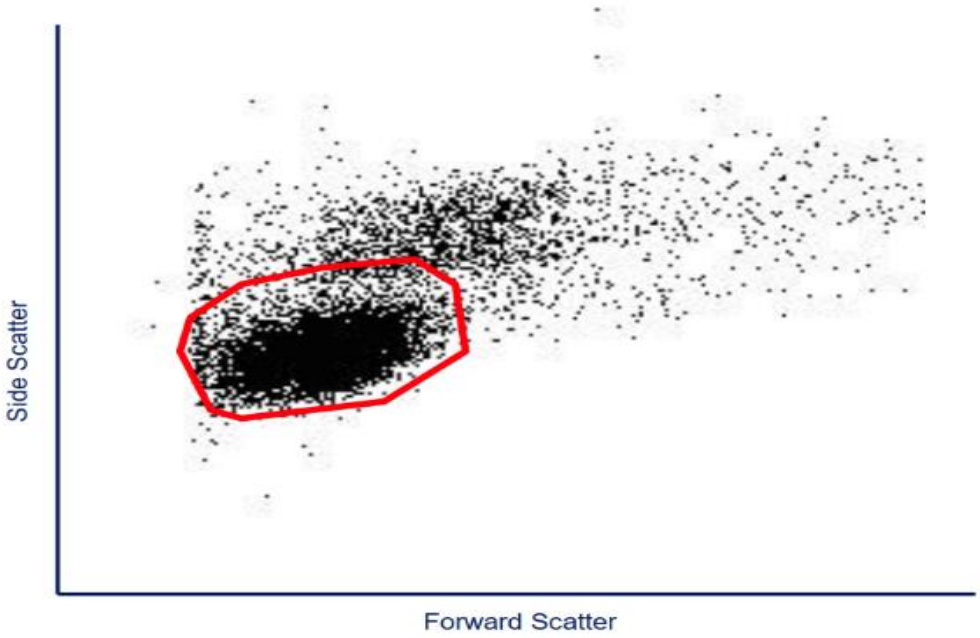


Evaluation of Cell-Surface Markers:





علاوه بر این میتوانیم سایز و گرانولوریته سلول را اندازه گیری کنیم.



در تصویر بالا(نمودار) forward scatter هرچه بیشتر باشد سایز سلول بزرگتر استو هر چه side scatter بیشتر باشد سلول گرانول تر است .(هر نقطه یک سلول است)

Nephelometry : فرض کنید یک لیوان دارید در آن سنگ میریزد و سپس با آب پر میکنید. یک لامپ پشت لیوان قرار میدهید, آیا نور رد میشود ؟ طبیعتا نور رد نمیشود و نور شکسته میشود و هرچه شکست نور بیشتر باشد یعنی تعداد سنگ ها بیشتر بوده است.

مثلا : در بیولوژی اگر بخواهیم IgA بیمار را اندازه گیری کنیم,به سرم IgA اضافه میکنیم و آن را در ظرفی کوچک به حجم 1 میلی لیتر قرار میدهیم. اگرفرد IgA داشته باشد آنتی IgA به آن متصل میشود و وقتی نور به آن برخورد میکند نور شکسته میشود و هرچه نور بیشتر شکسته شود مقدار IgA بیشتر است (کدورت بیشتر).

** اساسا Nephelometry همان کدورت سنجی است.

Complement assay :

(یاداوری : اگر یک آنتی بادی به یک آنتی ژن وصل باشد قطعات کمپلمان می ایند وسلول را لایز میکنند.)

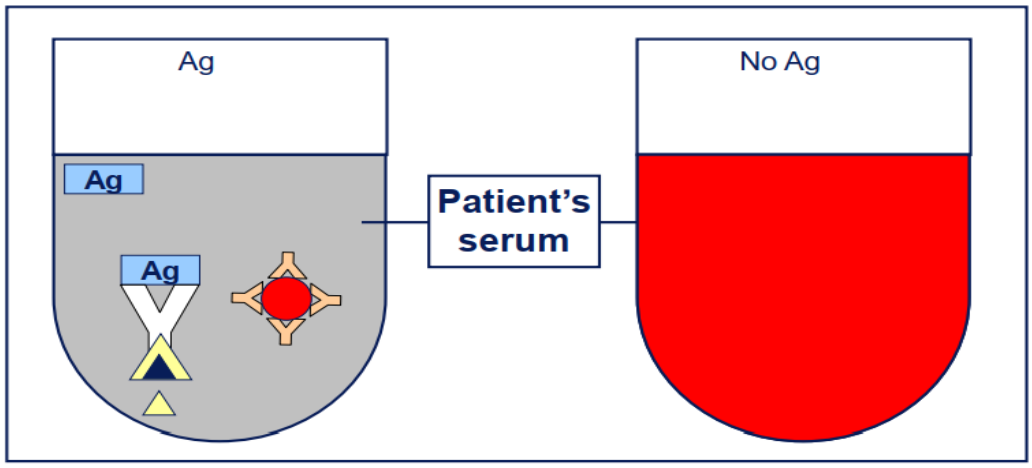
ابتدا باید RBC کوسفند را به آنتی RBC گوسفند اضافه کنیم و سپس سرم بیمار را به آنها اضافه کنیم. اگر درون سرم بیمار کمپلمان حضور داشته باشد,قطعات کمپلمان به RBC و آنتی RBC گوسفند متصل میشود و سلول را لایز میکند به غلظتی از کمپلمان که بتواند 50٪ از RBCها را لایز کند, **CH_{50}** میگویند.

بود یا نبود کمپلمان را میتوان با استفاده از ELISA و nephelometry هم اندازه گیری کنیم.(میتوانیم بفهمیم فعالیت دارد یا نه !) ولی اگر بخواهیم دقیقا بفهمیم مثلا نقص در کدام یک از قطعات است باید یا ELISA با Nephelometry این کار را انجام دهیم.

Complement Fixation

- Methodology

  – Ag mixed with test serum to be assayed for Ab
  – Standard amount of complement is added
  – Erythrocytes coated with Abs is added
  – Amount of erythrocyte lysis is determined



: Methods for studyng B & T lymohocytes

با استفاده از روش هایی که تا الان گفته شد میتوانیم سلول های B&T را مطالعه کنیم. ممثلا ; با Flow Cytometry میتوانیم مقادیر B cells & T Cells را چک کنیم. مثلا اگر بخواهیم CD4ها را اندازه گیری کنیم از آنتی بادی CD4 استفاده میکنیم یا مثلا در B cells اگر بخواهیم CD19 را اندهزه گیری کنیم از آنتی بادی CD19استفاده میکنیم. یا اگر بخواهیم بفهمیم T cell درست کار میکند و اینترفرون یا سیتوکاین تولید میکند, ابتدا T لنفوسیت را تحریک میکنیم و سپس مایع رویی را برمیداریم و چک میکنیم که در آن cytokine هست یا نه.

با تمام این روش ها میتوانیم فعالیت یا بودن با نبودن T & B Cells یا سایر سلولها را چک کنیم.

Methods for studying B & T lymphocytes:

- T cells:
- Proliferation assay by using T cell polyclonal activators such as PHA or T cell super antigens or mAb against cell surface markers.
- LTT: Lymphocyte Transformation Test.
- Cytokine production, ELISPOT.
- Cytotoxicity assay.

- B cells:
- Proliferation assay by using B cell polyclonal activators such as anti-Ig antibodies.
- Antibody assay by ELISA