استفاده‌های عملی از ایمن فلوئورسانس

* ـ دکتر میر دامادی

بسال ۱۹۴۲ کومبس دریافت که افزایش یك رنگ فلوئورسان (تابنده) مانند ایزوسیانات یا ایزوتیوسیانات فلوئورسئین به سرمی که دارای پادتن (آنتی کور یا آنتی بادی) باشد بی‌آنکه خاصیت اصلی ومهم پادسرم یعنی ربایش یافتن به‌آنتی ژن وابسته را تغییردهد پروتئین‌های آن از جمله گلوبولین‌ها را رنگین و تابنده میکند و آنتی ژنی که بدینسان با پادتن رنگین فلوئورسان پوشیده شده باشد بآسانی بکمك میکروسکوپ بااستفاده از پرتو برتر از بنفش (اولتراویوله) دیده میشود .

باین ترتیب بود که نامبرده برای نخستین بار وجود پولی ساکارید های پنوموکوك را در بافتهای موشی که به انفکسیون پنوموکوك دچار شده بودآشکار ساخت .

برای رنگین ساختن پروتئین‌های سرم مواد مختلفی از جمله ایزوسیانات وایزوتیوسیانات فلوئورسئین که گلوبولین رنگین شده رابه رنگ زردمایل به سبز درمیآورد ویا رودامین که آنتی‌ژن رابصورت سرخ نارنجی برمیگرداند بکار میبردند وبتازگی ایزوتیوسیانات تترامتیل باموفقیت بکار برده شد .

روش انجام آزمایش اینست که ماده رنگین فلوئورسان را بسرم و یا گلوبولین‌های آن می‌افزایندوچنین سرم یا محلول گلوبولین دارای رنگ فلوئورسان را درمدت کافی (تقریباً ۳۰ دقیقه) در مجاورت آنتی ژن وابسته میگذارند تا بدان به پیوندد ـ آنگاه بوسیله قرار دادن آمایش (پرپاراسیون) درمحلول که نمکی دارای pH برابربا ۷/۲ گلوبولین های نپیوسته به‌آنتی‌ژن رابر میگیرندسپس با میکروسکوپ که دارای دستگاه پرتو بالای بنفش باشدآنرامی بینید وبدین‌ترتیب آنتی‌ژن (باکتری، ویروس، گویچه‌های سرخ، وسلولهای مختلف) به رنگ زرد مایل به سبزوتابنده به چشم میخورد .

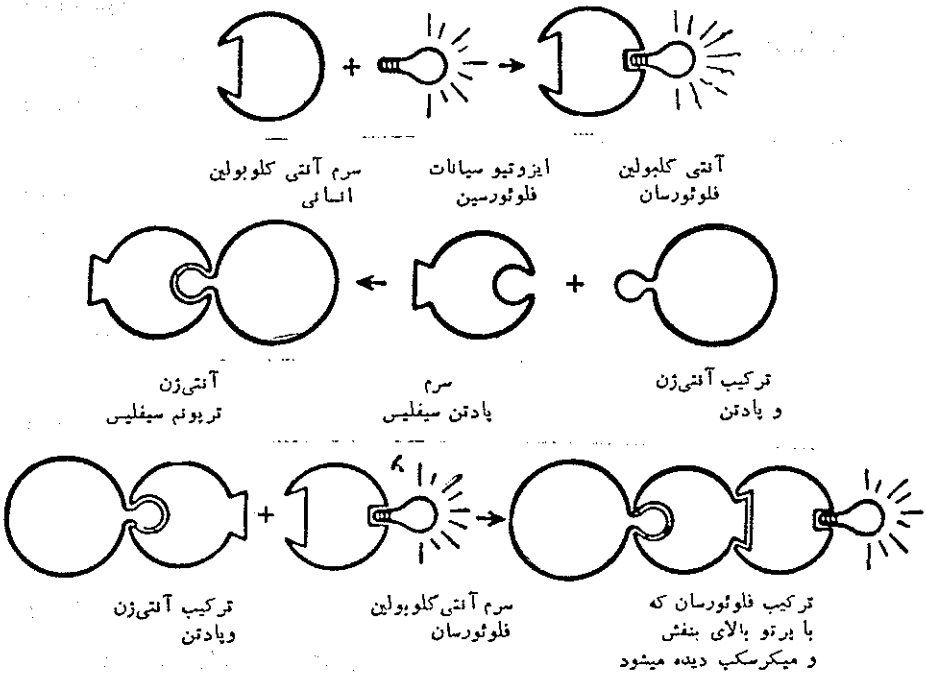
*ـ استاد دانشکده پزشکی

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 3:32 IRDT on Thursday July 18th 2019

روش یاد شده را مستقیم گویند زیرا بدینوسیله گلوبولین های پادتن کـه با ماده رنگین فلوئورسان پیوست شده است و دورا دور آنتی‌ژن را فراگرفته است‌دیده میشود و برای جستجو وتعیین‌جایگاه ویروس‌ها در کشت‌های بافتی مورد استفاده قرار میگیرد .

در روش‌های دیگری که می‌توان‌آنها را غیرمستقیم نامید بجای‌آنکه سرم دارای پادتن را با رنگ، فلوئورسان پیوست کنند پیشاپیش آنتی‌گلوبولین (برحسب نوع حیوان) مخصوص تهیه نموده وبدان ماده رنگین فلوئورسان پیوست میکنندسپس‌این آنتی‌گلوبولین پیوست شده به ماده فلوئورسان را به‌آنتی‌ژنی که قبلا درمجاورت سرم مشکوك قرارگرفته وفرضاً گلوبولین‌های پادتن رابخود گرفته است می‌پیوندانند یعنی در حقیقت آنتی ژن اصلی راکـه بوسیله پوشیده شدن باگلوبولین‌های پادتن صورت‌آنتی‌ژن نوین‌دیگری بخودگرفته‌است وباگلوبولین‌های سرم‌پوشیده مجاور باآنتی‌گلوبولین‌آمیخته برنگ‌فلوئورسان‌درمی‌آورندکه بدان به‌پیوندد وآنرا نمایان‌سازد میتوان گفت که درحقیقت بدین ترتیب بطور غیرمستقیم وجود آنتی‌ژن اصلی‌مشخص میگردد .

دیگراز تغییرات روش غیرمستقیم اینست کـه سرم مورد آزمایش را در مجاورت آنتی‌ژن وابسته قرار میدهند و در اینصورت سرم اگردارای پادتن باشدگیرنده‌ها (رسپتورها) آنتی‌ژن را را میپوشاند وبنابراین اگرآنتی‌گلوبولین مخصوص و آمیخته با رنگ‌فلوئورسان بدان‌افزوده شد



Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 3:32 IRDT on Thursday July 18th 2019

برآن اثر نمیکند وآنتی‌ژن دیده نمیشود درصورتیکه برعکس اگرسرم پادتن نداشته وگیرنده‌های آنتی‌ژن رافرانگرفته باشد گلوبولین‌های پادتن وابسته به‌آنتی‌ژن اصلی که‌دارای ماده رنگین فلوئورسان است به‌آنتی‌ژن پیوسته وآنرا نمایان میسازد .

روش غیرمستقیم دیگر اینست که درآن از پدیده ربایش کمپلمان استفاده میشود بدین ترتیب که نخست‌آنتی‌ژن موردآزمایش را با سرم دارای پادتن وابسته مجاور میسازندسپس سرم خوکچه‌هندی که دارای کمپلمان باشد بدآن میافزایند آنگاه آنتی گلوبولین ضد خوکچه هندی آمیخته به رنگ فلوئورسان را به مجموع میافزایند و در این صورت هرگاه چیزمورد آزمایش آنتی‌ژن مورد نظرباشد و براثر پادسرم وابسته حساسیت پیدا کرده باشد کمپلمان سرم خوکچه هندی بدان‌پیوسته ودراینصورت آنتی گلوبولین‌خوکچه هندی که آمیخته‌به‌ماده رنگین‌فلوئورسان است دورا دورمجموع راگرفته و درنتیجه‌آنتی‌ژن نمایان میگردد .

در اینجا باید یادآوری کرد که آزمایش ایمن فلوئورسان معمولا روی تیغه‌های شیشه‌ای (لام یا اسلاید) بانجام میرسد بدین ترتیب که دوقطره ازماده آنتی‌ژنی را بشکل دو دایره کوچك در دوسمت تیغه شیشه‌ای گسترده وپس از خشك شدن‌آنها را بوسیله الکل یا استن پایدارمیسازند آنگاه محلول‌سرم دارای پادتن را روی‌قطره خشك شده میریزند وهمچنان میگذارند که درحدود نیم‌ساعت بماند پس‌آنرا بدور ریخته‌آزمایش را درمحلول دارای pH برابربا۷/۲ میگذارند . تا فزونی پروتئین های نپیوسته از میان برود آنگاه محلولی ازآنتی گلوبولین پیوست شده به ماده رنگین فلوئورسان را روی لکه‌های آنتی ژنی ریخته و دوباره مدتی درحدود نیم ساعت میگذارند بماند پس‌آنرا در محلولی که‌دارای PH برابربا۷/۲باشد بمدت کافی شستشوداده با میکروسکوپ وبکمك پرتو برترازبنفش می‌بینند.

دراینجا بی‌مناسبت نیست روش تهیه سرم‌آنتی گلوبولین که در حقیقت ماده عامله و معرف اصلی است یادداشت گردد:

گلوبولین‌های انسان و یا نوع‌معین حیوانات‌رابه روش‌های معمولی(ترسیب بوسیله املاح خنثی ویا . . .) جدا نموده محلول پاك وبی‌آلایشی ازآن آماده‌ساخته‌آنرا به خرگوش ویابهتر ازآن بزغاله چند روز در میان هربار به میزان بیشتری سوزن میزنندوهمینکه مقدار پادتن سرم حیوان به بالاترین اندازه رسید سرم‌آنراگرفته گلوبولین‌های آنرا جدا ساخته بحالت لیوفیل و یا محلول نگاهداری‌میکنند و هنگام نیازمندی به هریك سانتیمتر مکعب از محلول گلوبولین در حدود یك میلی گرم ماده رنگی فلوئورسان میافزایند وچند ساعتی‌آنرا درسردی‌یخچال میگذارند سپس فزونی رنگ را بکمك دیالیزبرمیگیرند . ناگفته نماند که گاه برای‌آنکه درهمان حال دو میکروب ویا دوآنتی‌ژن موجود دریك ماده مرضی را بررسی کنند دو رنگ فلوئورسان مثلاً یکی

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 3:32 IRDT on Thursday July 18th 2019

ایزوتیوسیانات ودیگری رودامین به محلول آنتی گلوبولین پیوست‌میکنند ودراینصورت باکتریها برنگ‌های مختلف زرد مایل به سبزوسرخ نارنجی درمیآیند.

موارد استفاده از ایمن فلوئورسانس :

۱ـ تشخیص جایگاه ویروس‌ها در درون سلولها چه در کشت ویروس وچه‌دربدن .

۲ـ تشخیص جایگاه پیدایش پادتن‌ها درسلولهای لنفوپلاسموسید .

۳ـ تشخیص‌وجود میکروبهای‌مختلف مخصوصاًنیسرهاوهموفیلوسها وآنتروباکتری یاسه‌ها

٤ـ تشخیص‌سیفیلیس‌بوسیله استفاده ازترپونم مخصوص‌آن (ترپونماپالیدا ویا ترپونم‌رایتر)

عوامل غیراختصاصی مؤثربرایمن فلوئورسان .

هرچند برخی از ذرات ممکن است بخودی خود تابندگی داشته و بصورت فلوئورسان در زیرمیکروسکوپ جلوه گرشوند اما خوشبختانه حالت فلوئورسانس خود بخودی این ذرات چندان درکار اهمیت ندارد بلکه آنچه بیشتر اسباب زحمت است و درآزمایش تأثیر میکند ربایش غیر اختصاصی پروتئین‌هائی است که با رنگ‌فلوئورسان‌تفکیك شده‌اندواحیاناً برپروتئین‌های غیرآنتی ژنی می‌چسبند اما این دشواری نیز بوسیله ربایش (آبسوربسیون) برگردهای اندام ازمیان‌میرود.

برخی‌ازکارشناسان پیشنهاد نمودند که‌برای‌جلوگیری ازاینگونه پیش‌آمدهای‌غیراختصاصی بهتر است که درآغاز آمایش را باگلوبولهای طبیعی پیوست شده با رودامین مجاور سازند آنگاه پاد سرم اختصاصی را با رنگ فلورسان زرد مایل به سبز یعنی فلوئوسئین تابنده سازند تا بدین ـ ترتیب ذرات غیراختصاصی برنگ سرخ نارنجی و آنتی ژن بصورت زرد مایل بسبز جلوه گرشود .

Bibliographie :

1 - Thivolet (J.), Grospiron (D.) et Murat (M.) Ann. Inst. Pasteur, 1960, 99, 920-924.

2- Niel (G.) et Fribourg _ Blanc (A). Ann. Inst. Pasteur, 1962, 102, 616-628 .

3_ Serologic tests for Syphilis, 1959 Manual, Washington, D. C., United States public Health Service, Pub. 411, pp. 9-12 .

4_ Cherry, W. B. Goldman, M., Carski; T.R., and Moody, M. D.: Fluorescent antibody Techniques in the diagnosis of communicable Diseases, Washington, D. C, United States Public Health Service, Pub. 729, 1960 .

5_ Faure (M.) et Pillot (J.). Ann. Inst. Pasteur, 1961,99, 769.

6_ Pillot (J.), Duponey (P.) et Faure (M.), Ann Just Pasteur, 1960: 98, 734 .

7- Pillot (J.) et Faure (M). Ann. Inst. Pasteur, 1959. 96, 196,

8_ Daguet (G. L.) et Pillot (J.). Ann. Just. Pasteur, 1962, 102,364.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 3:32 IRDT on Thursday July 18th 2019