به نام خدا

جلسه دوشنبه 23 خرداد ایمونو شیمی

جلسه هفتم ایمونو شیمی از این سری جلساتی که من در خدمت شما هستم و جلسه آخر خواهد بود. البته جلسه قبل و این جلسه قسمت تئوری کلاس عملی که قرار است برایتان برگزار کنم در مورد ایمونو استینینگ را هم شامل می­شود. حالا آن­جا دو مرتبه من یک توضیحات مختصری از کلاس عملی برایتان خواهم گفت. صحبت کردیم در مورد این­که وقتی از ایمونو استینینگ صحبت می­کنیم حالا من این­جا نوشتم ایمنو هیستو کمیستری و ایمونو فلورسنت، فلورسنس استینینگ عملاً از ایمونو اسی داریم صحبت می­کنیم که روی یک سطح در حال انجام هست برخلاف ایمونو اسی­های قبلی که در جلسات از آن­ها صحبت کردیم و معمولاً روی آنالیت­هایی انجام می­شد که حالت محلول داشتند. در ایمونو استینینگ­ها ما همان­طور که از اسم برمی­آید داریم از آنتی بادی­های واکنش آنتی ژن، آنتی بادی استفاده می­کنیم که یک آنالیتی را که روی یک سطحی قرار گرفته بیاییم و دیتکت کنیم. گاهی وقت­ها هم البته در پروسه این چیزی که آنالیت ما هست آن مولکول یا آن چیز روی آن سطح نیست. آن چیز روی سطح می­تواند ری­ایجنت ما باشد. ما در پروسه ایمونو استینینگ می­خواهیم آنتی بادی را دیتکت کنیم. حالا شاید شما استدلال کنید بگویید در الایزا هم خیلی از موارد ما وقتی که داریم الایزا را انجام می­دهیم مثلاً در الایزای دایرکت من یک میکس آنتی ژن دارم که آمدم روی سطح فیکسش کردم. یا در الایزای ایندایرکت ری­ایجنت من چیزی است که روی سطح قرار گرفته است و من یک آنتی بادی را که حالت مثلاً محلول دارد می­سنجم و از این جهت افتراق یا تفاوت قائل شدن بین ایمونو استینینگ­ها و سایر ایمونو اسی­ها خیلی درست نیست. می­شود این استدلال­ هم کرد. در حالت کلی اما ایمونو استینینگ چیزی است که روی سلول­ها حداقل یا بافتی که روی سطح داریم انجام می­شود. گفتیم نوع سیگنال­هایش معمولاً یا رنگ است یا فلورسنس. سه تا المنت وجود دارد، المنت آن در حقیقت چیزی که روی سطح قرار دارد که معمولاً سلول است یا بافت. آنتی بادی یا آنتی بادی­هایی که قرار است متصل بشوند به آنتی ژن­های روی سطح و سیگنالی که قرار است برای ما تولید بشود. گفتیم که المنتی که روی سطح است می­تواند سلول باشد یا بافت باشد. آنتی بادی­هایمان معمولاً می­توانند در حقیقت یک لایه یا چند لایه باشند. اگر یک لایه باشند از دایرکت ایمونو استینیگ صحبت می­کنیم اگر چند لایه باشند از ایندایرکت و سیگنالی که ایجاد می­شود می­تواند رنگ باشد یا فلورسنس. نامگذاری­هایی را هم از آن صحبت کردیم در مورد دایرکت و این­دایرکت، اسپسیفیتی و سنسیتیویتی هم مطالبی را گفتیم. چه فرقی دارند این دو تا از نظر سنسیتیویتی و اسپسیویتی؟

دانشجو: دایرکت سنسیتیوتر باشد.

استاد: دایرکت چی بود؟

دانشجو: در واقع مستقیم از آنتی بادی می­آمد به آنتی ژن وصل می­شد.

استاد: همیشه آنتی بادی به آنتی ژن وصل می­شود.

دانشجو: دو نوع کلاً داریم. هر چیزی یک آنتی بادی آمده به آن اضافه شده در دایرکت. ایندایرکت باید یک آنتی بادی دیگر یعنی لیبل مستقیم به همین آنتی بادی لایه اول وصل است.

استاد: آهان این­طوری باید بگویی.

دانشجو: آن یکی لیبل آنتی بادی لایه دوم است که

استاد: پس دایرکت یعنی همان آنتی بادی که به آنتی ژن وصل می­شود لیبل شده است، این­دایرکت یعنی این­که آن آنتی بادی مستقیماً لیبل نشده است یک آنتی بادی است. از نظر سنستیویتی کدامشان بهتر است؟

دانشجو: ایندایرکت بهتر است.

استاد: ایندایرکت سنسیتیوتر است. چرا ایندایرکت سنسیتیو تر است؟ به خاطر این­که برخلاف این شکلی که من این­جا کشیدم چه ایرادی دارد؟ ایرادهایی که دارد این­جا من باید این انتهای آن را می­کشیدم حالا این شماتیک است ولی از نظر اتصال آنتی بادی چه ایرادی دارد؟ سنسیتیوتر است به خاطر این­که یک آنتی بادی اولیه که این­جا اسم این دو تا می­شود پرایمری آنتی بادی و سکندری آنتی بادی یا آنتی بادی اول و آنتی بادی دوم می­تواند تارگت آنتی بادی­های ثانویه متعددی قرار بگیرد و به همین خاطر سیگنال قوی­تری برایمان ایجاد کند. پس سنسیتیویتی دیزاین­های این­دایرکت بیشتر است اما اسپسیفیتی چی؟

دانشجو: در دایرکت بیشتر است به خاطر این­که آنتی بادی دوم خودش می­تواند به جاهای مختلف متصل بشود باید در واقع داریم حذفش می­کنیم.

استاد: به خاطر این­که کاهش اسپسیفیتی ناشی از خطای اتصال آنتی بادی­ها است وقتی من دو لایه آنتی بادی داشته باشم، شانس خطای در حقیقت بیشتری خواهم داشت و گفتیم که رولافتام یا قاعده بند انگشتی در مورد طراحی­های ایمونو استینینگ این است که معمولاً ما دیزاین­هایمان اگر هدف دیتکت کردن یک آنتی ژن سطح باشد دیزاین­های ایندایرکت. حالا من به شما خواهم گفت دیزاین ایندایرکت همیشه هم آنالیتش روی سطح نیست. دقیقاً مثل الایزای ایندایرکت گاهی وقت­ها آنالیت این آنتی بادی است. به صورت معمول وقتی ایمونو استینیگ انجام می­دهیم داریم یک چیزی را که روی سطح است دنبالش می­گردیم ولی گاهی وقت­ها هم می­دانیم روی سطح چی قرار گرفته است می­خواهیم ببینیم در محلول­مان آنتی بادی داریم یا خیر. در آن حالت طبیعتاً دیزاین­مان ایندایرکت خواهد بود اما اگر دنبال مثلث­ها دارم می­گردم آنالیتم این است می­توانم دیزاین دایرکت داشته باشم، می­توانم دیزاین ایندایرکت داشته باشم ترجیحم با دیزاین ایندایرکت هست به خاطر این­که سنسیتیویتی بالاتری دارد. ما هم معمولاً نمی­دانیم مقدار آنالیتمان چقدر است می­رویم سراغ دیزاین­های ایندایرکت. از دایرکت و ایندایرکت پس صحبت کردیم و همین­طور در مورد رنگ و فلورسنس که در حقیقت رنگ­هایمان معمولاً این طور هست که یک آنزیمی است که روی سوبسترایی اثر می­گذارد و آن سوبسترا خودش رنگی می­شود یا یک چیزی تولید می­کند که روی یک کروموژنی اثر می­گذارد حالا مثال کلاسیکش این است که اچ آر پی اگر باشد سوبسترای آن هاش هاش دو او دو است. آیا هاش دو او دو وقتی تجزیه بشود خودش رنگی می­شود؟ آن اکسیژن روی کروموژن دیگری که چی هست اثر می­گذارد؟ صحبت نکردیم از نمک­های بنزیدین. از یک چیزی داریم به اسم تی ام بی که رنگش آبی می­شود؟ تترا متیل بنزیدین. هدفمان حفظ کردن اسامی چیز نیست ولی بعضی از این­ها را باید بدانیم. مثلاً تی ام بی در الایزا یک کروموژنی است که خودش سوبسترای آنزیم نیست یعنی آنزیم اچ آر پی روی تی ام بی هیچ اثری نمی­گذارد. به همین خاطر وقتی می­خواهید الایزا انجام بدهید معمولاً مرحله آخرش می­گوید دو تا ویال داریم این دو تا را با هم قاطی کنید بعد اضافه کنید به پلیت. آن دو تا که می­خواهیم قاطی کنیم یکی توی آن تی ام بی دارد توی آن سوبسترا که هاچ دو او دو هست دارد. این دو تا را قاطی می­کنیم با همدیگر آنزیم روی هاش دو او اثر می­گذارد و تی ام بی تغییر رنگ پیدا می­کند. اما اگر آنزیم­مان را آلکال اند فسفاتاز باشد آن سوبسترایی دارد که خودش رنگین می­شود پس هر دو دیزاین را می­توانیم داشته باشیم و حالت دیگر این است که ماده فلورسنت داریم که فلوروکروم ما هست که خب طبیعتاً این معمولاً آماده فلورسنس است. البته دیزاین­ها همیشه متغیر هستند و هر شاید سال و یا هر مثلاً چند ماه ممکن است دیزاین­های جدیدی اضافه بشود. مثلاً ما یک دیزاین دیگری داریم که در ایمونو استینینگ­ها خیلی به کار نمی­رود. بیشتر تو ایمونو اسی­ها است ولی ممکن است بعداً در ایمونو اسی­ها تو ایمونو استینینگ­ها هم اضافه بشود و آن هم این است که یک آنزیمی داریم، یک سوبسترای فلوروژنیک داریم، فلوروژنیک یعنی خودش فلورسنس ندارد باید یک کاتی بکنیم یک تغییری در آن بدهیم که فلورسنس آن ایجاد بشود. شبیه همانی که در ایمونو اسی­هایی مثل وایداس داشتیم. ممکن است کسی بیاید همین را هم اضافه کند. پس دیزاین­ها همیشه این­هایی که من می­گویم چیزهای شناخته­ شده­تر است ولی قطعاً لیست کامل نیست. اسم­های مختلف می­توانیم برای آن بگذاریم اگر سلول بشود می­شود سایتو، اگر بافت باشد می­شود هیستو، اگر آنزیم باشد معمولاً کلمه کمیستری را استفاده می­کنیم وگرنه فلورسنس را هیچ کس معمولاً نمی­گوید ایمونو هیستو فلورسنس بعضی وقت­ها من در مقالات دیدم که این دقت را به خرج می­دهند ایمونو سایتو فلورسنس. همه می­گویند ایمونو استینینگ یا می­گویند آی سی سی، آی اچ سی این دو تا خلاصه رایج­تر است. بعد می­گوید آی سی سی آنتی بادی ثانویه هم آنتی بادی اولیه هم به یک فلوروفور متصل است شما متوجه می­شوید که فلورسنس است یا در مورد آی اچ سی. گفتیم مراحل مختلفمان سمپل پریشن هست، سمپل پریشن چطوری می­تواند باشد یا سلولی است یا بافت است. اگر سلول باشد سلول­ها باید روی سطح قرار بگیرند این سطح معمولاً یک سطحی است که چون مایع است کشت باید حضور داشته باشد یک ارتفاعی دارد این ارتفاع باعث می­شود که این پلیت را زیر میکروسکوپ آپ رایت نتوانیم ببینیم. چون میکروسکوپ آپ رایت مثل آدم خیلی نزدیک­بین چشمش باید خیلی به سمپل نزدیک باشد ولی زیر میکروسکوپ اینورت می­شود دید. اگر بخواهیم زیر میکروسکوپ آپ رایت ببینیم یا باید ته این یک چیز شیشه­ای بگذاریم که سلول­ها به آن بچسبند این تصویر هم داشتیم یا هم که باید اصطلاحاً چینبر اسلایدها این­ها را بیاییم و در حقیقت قرارشان بدهیم در مورد میکروسکوپ­ها هم یک صحبتی کردیم. مسیر نوری این دو تا را می­توانیم با هم مقایسه کنید؟ آپ رایت را اول بگویید. آپ رایت به چه میکروسکوپی گفته می­شود؟ در آپ رایت پس من معمولاً منبع نورم این­جا است بعد این­جا سمپل دارم، بعد آبجکتیو میکروسکوپ است و این آبجکتیو چون روی سمپل است معمولاً به استثنای درشت­نمایی­های کم و مثلاً 5 ایکس داشته باشم یا 10 ایکس آن زیر فاصله دارد. مثل آدمی است که خیلی نزدیک­بین نیست یک خورده فاصله دارد ولی اگر بخواهم سلول را ببینم معمولاً با 5 و 10 خوب دیده نمی­شود. باید مثلاً 40 استفاده کنم. گاهی وقت­ها هست 60 یا 100 استفاده می­کنم. آن دیگر فاصله­ای نیست که من بخواهم پلیت زیر آن بگذارم. اما در اینورت چه فرقی می­کند؟ چرا زحمت کشیدند این را درست کردند؟

دانشجو: بتوانیم آن ارتفاع را بتوانیم ببینیم.

استاد: به خاطر این­که اینورت چشم این آدم است یا به اصطلاح آبجکتیو می­آید زیر نمونه قرار می­گیرد و من این­جا فضایی می­توانم داشته باشم. البته دیزاین­های میکروسکوپ دیگر هم داریم مثلاً فرض کنید میکروسکوپی که برای جراحی از آن استفاده می­شود فرض کنید به آن می­گویند میکروسکوپ لوپ اگر با همین نام یا سرجری مایکروسکوپ. این را یک جوری طراحی کردند که به اصطلاح یک فاصله­ای وجود داشته باشد این را نگاه کنید. این از بالا دارد نگاه می­کند لنز هم این­جا است. بیمار این پایین قرار گرفته است و در ضمن یک مطلب دیگر بگویم این دو تا میکروسکوپی که داریم می­گوییم به آن­ها می­گویند ترنسمیشن میکروسکوپی. چرا می­گویند ترنسمیشن؟ چون نور از آن عبور می­کند ولی خیلی وقت­ها ممکن است که نمونه­مان چیزی نباشد که بشود ازش نور عبور داد. کله مریض که نمی­شود نور عبور داد این می­شود رفلکشن مایکروسکوپیک و بعد این جوری طراحی کردند که این فاصله داشته باشد دست جراح بتواند زیر این کار را انجام بدهد و یا حتی فرض کنید سرجری مایکروسکوپ که برای حیوانات استفاده می­شود فرض کنید مثلاً همچین چیزی آن چیزی که توی ذهن من بود اینجوری نیست ولی آن فاصله دارد از حیوان و نور هم می­تابد می­آید. منتهی در میکروسکوپ­های معمولی که ما داریم یک همچین روندی را داریم. پس در این­جا که ترنسمیشن هست ما این دو تا دیزاین را داریم. همین دو تا می­توانند فلورسنت هم باشند اگر منبع نورشان یک منبع نور فلورسنت باشد مثل لامپ جیوه می­توانند آن کار را هم انجام بدهند با لحاظ کردن این مطلب که دو مرتبه اگر فلورسنت باشد ترنزمیشن نخواهد بود، رفلکشن خواهد بود. یعنی اگر من یک میکروسکوپ آپ رایت فلورسنت داشته باشم یک منبع نور فلورسنت دارد مثلاً فرض کنید همین در نظر بگیریم این منبع نور فلورسنت می­آید از این­جا از عدسی آبجکتیو شما سمپل می­تابد و ریفلکت می­شود و همین­طور در اینورت یعنی این­ها دو تا چیز است. آپ رایت یا اینورت است، ترنسمیشن یا رفلکشن است روی دیزاین میکروسکوپ­ها تأثیر می­گذارد. خب اگر بخواهم با میکروسکوپ آپ رایت سمپلی را مشاهده کنم طبیعتاً باید نازک باشد و روی چینبر اسلاید کشت داده شده باشد یا این­که در نمونه­هایی که کف آن کاور استیپ گذاشتیم. بسیار خب پس فیکسیشن صحبت کردیم. گفتیم فیکسیشن مهم است برای این که واکنش­های بیولوژی متوقف بشوند. متودهای مختلف فیکسیشن چی است؟ چطور می­شود فیکس کرد یک سمپل بیولوژیک را؟ پس یک متدلوژی دی هاید ریشن است که مثال قدیمی آن همین خشکبار درست کردن است. قدیم که الکل نداشتند خشکبار درست کردن و نمک سود کردن این­ها است که دی هاید ریشن اتفاق می­افتد. دیگر چی هست؟ کراس لینکینگ. حالا سرما را هم به یک طریقی شاید بتوانیم بگوییم که من بیایم مولکول­ها را به هم متصل­شان کنم که از جمله پروتئین­هایی که آنزیم هستند و اثرات تخریبی دارند آن­ها کراس لینک بشوند و نداشته باشند که معمولاً من از فرمالدهید، پارافرمالدهید و گلوتاردهید و امثال آن استفاده می­شود. مراحل انجام کار فکر کنم تا این­جا رسیدیم. مراحل انجام کار باز دو مرتبه دیزاین­های مختلفی برای این پروسه وجود دارد که من 3 تا حالت مهم را نوشتم. یک حالت در مورد سلول­ها است خب این نسبتاً ساده است وقتی من سلولی را آمدم کشت دادم بعد از این­که کشتم تمام شد می­آیم معمولاً از فیکساتیوهای کراس لینکر استفاده می­کنم این­ها را فیکس می­کنم. معمولاً یک درصد کمی از فرمالین را استفاده می­کنند که این سلول­ها فیکس بشوند. این فیکس کردن این­جا گاهی وقت­ها از نظر افراد مختلف دو تا مفهوم دارد. مثلاً باکتریو لوژیست­ها وقتی می­گویند باکتری­ها را فیکس کنیم منظور فیکس مکانیکی روی سطح است. ما وقتی می­گوییم فیکس کنیم منظور فیکس به این معنا است که پایدارش کنیم که تخریب نشود. دِگرید نشود. هر دو معنا در مورد فیکسیشن صحیح است منتهی من الان به معنای دوم دارم از آن استفاده می­کنم. سلول­های کشت داده شده را فرمالین به آن اضافه می­کنید و این آماده است که شما بیایید آنتی بادی­هایتان را اضافه کنید. اما در مورد بافت­ها خب داستان فرق می­کند. بافت را باید در بیاورید و این بافت باید معمولاً برش داده بشود. برای میکروسکوپ­هایی که ترنسمیشن است. اگر رفلکشن باشد داستانش متفاوت است که ما فعلاً از آن صحبت نمی­کنیم. توی این حالتی که بافت است یا اول فیکس می­کنید بعد می­برید یا اول می­برید بعد فیکس می­کنید. هر دو تا حالتش امکان­پذیر است. در دیزاینی که به آن می­گوییم اف اف پی ای یا فرمالین فیکس پارافین امبدد، اول فیکس می­کنیم با فرمالین بعد کات می­کنیم. منتهی برای این که کات کنیم معمولاً قالبی قرار می­دهیم مثل پارافین که آن دستگاه­هایمان بتواند این را ببرد. در دیزاین دیگری که می­گوییم کرایو سکشن اول می­بریم بعد فیکسش می­کنیم که این کرایو سکشن­ها دو مرتبه برای این­که بتوانیم باید در یک قالبی قرار بگیرد منتهی آن قالب معمولاً یک قالبی است که با یخ زدن یا با سرد کردن بدون این­که کریستال­های سوراخ کننده آب بخواهد تشکیل بشود از آن استفاده می­کنیم که می­شود این محیط می­شود او سی تی که می­شود آپتیمال کرایو سکشن همچین چیزی که یادم رفته. پس گاهی وقت­ها فیکس می­کنیم بعد می­بریم گاهی وقت­ها می­بریم بعد فیکس می­کنیم. این­ها که نیاز به برش ندارد. این دستگاهی هست که از آن استفاده می­کنیم برای کات کردن سکشن­هایی که فرمالین فیکس شدند و در پارافین قرار گرفتند. اف اف پی­ها این هم دستگاهی است که از آن استفاده می­کنیم برای بریدن سمپل­هایی که فریز شدند. برخلاف این­که در دمای اتاق کار می­کند این در آن باید سرد باشد آن نمونه­ای را که آمدیم در محیط فریز شده قرار دادیم در این قرار می­دهیم برش­ها را انجام می­دهیم و بعد فیکس می­کنیم. بعد از این­که این مرحله فیکس کردن و بریدن، بریدن و فیکس کردن نیاز به بریدن ندارد فقط فیکس کردن انجام می­دهیم حالا مراحل رنگ­آمیزی­مان آغاز می­شود. حالا می­خواهیم بیاییم این­ها را رنگ­آمیزی را انجام بدهیم. آنتی بادی­ها را اضافه می­کنیم. قبل از این­که من بیایم به این نمونه­ها آنتی بادی­ها را اضافه کنم در بعضی از موارد چیزی داریم به اسم پِرِ پراسسینگ که می­شود حد واسط بین تهیه سمپل و فیکس کردن که این پِرِ پراسسینگ­ها در مورد این یکی خیلی چیز زیادی نداریم. معمولاً فرمالین را که اضافه می­کنیم چند بار می­شوریم با پی بی اس یا بافر دیگر می­توانیم آنتی بادی­هایمان را اضافه کنیم که قبل از اضافه کردن آنتی بادی اولیه یک مرحله­ای داریم به نام بلاکینگ که خواهم گفت. در مورد این یکی دو مرتبه خیلی پِرِ پراسسینگ زیادی نداریم. تنها کاری که می­کنیم وقتی­ که از فیکساتیوهای دی هایدرید کننده استفاده می­شود معمولاً سمپل ری هایدرید می­کنیم. یعنی یک مقداری آب را به بافت سعی می­کنید برگردانید که آماده بشود برای اضافه کردن آنتی بادی­ها. کامپلکس­ترین پر پراسسینگ مال سمپل­های اف اف پی ای است. اف اف پی ای­ها دو تا عامل مزاحم در آن­ها وجود دارد. یکی پارافین یکی ازش استفاده کردیم. بافتمان آغشته است به پارافین و این پارافین مانع واکنش­های مولکولی معمولاً می­شوند. اول باید دِپارافینایزش کنیم یعنی پارافین­هایش را حذف کنیم. دوم این­که این­ها علی­رغم این­که فیکساتیوهایشان از نوع کراس لینکر است ما در مرحله پارافین امبدینگ سمپل­هایمان دی هایدریت می­شوند. تیشو پروسسینگ که انجام می­شود آب­شان را می­گیرد پس این­ها هم نیاز به این دارند که یک ری هاید ریشنی روی آن­ها صورت بگیرد. اما مهم­ترین چیز چیست؟ فیکساتیوهای کراس لینکر یک عیب دارند یک خوبی دارند. خوبی­شان این است که خیلی خوب فیکس می­کند در مقایسه با دِهایدریت کننده­ها. بدی­شان این است که چون کراس لینکینگ می­کنند اگر می­خواهید روی آن ایمونو استینینگ انجام بدهید خیلی وقت­ها من استینینگ می­خواهم انجام بدهم که ایمونو نیست. مثلاً چه استینینگی داریم؟ خیلی هم مشهور است؟ ایمونولوژیک هم نیست. هماتوکسیلین ائوزین. رنگ­آمیزی­هایی که کاری به واکنش آنتی ژن، آنتی بادی ندارند. شیمیایی هستند واکنش اسید و باز هستند. هماتوکسیلین ائوزی فرض کنید بازی است به اسید نوکلئیک وصل می­شود آن یکی اسیدی است چیزهایی که در سیتوپلاسم، اصلاً کاری به واکنش آنتی ژن، آنتی بادی ندارد. کراس لینگ هم شده باشد اتفاقی نمی­افتد. اما اگر می­خواهیم ایمونو استینینگ انجام بدهیم باید این آنتی ژنیست را یک خورده برگردانیم که به آن می­گویند آنتی ژن رتریوال پس گاهی وقت­ها هیچ پروسسینگ خاصی لازم نداریم. این­جا هم که فرمالین می­زنیم گاهی وقت­ها کراس لینک ایجاد می­شود ولی اکثراً روی سلول­ها ما آنتی ژن رتریوال انجام نمی­دهیم. در بعضی پروتکل­ها ممکن است باشد چون پروسه­های آنتی ژن رتریوال، پروسه­های هارشی هستند. معمولاً لازم است که سمپل را بجوشانیم یا یک آنزیم به آن بزنیم. معمولاً سلول­ها کنده می­شوند بخواهید از این کارها با آن­ها بکنیم ولی در بعضی از پروتکل­ها ممکن است باشد. معمولاً این­ها همین­جوری به اصطلاح یواشکی زیر سبیلی رد می­شویم می­آییم آنتی بادی­ها را اضافه می­کنیم. این­ها را فقط ری هایدریت می­کنیم. ولی این باید پارافینش را حذف کنیم. ری هایدریت کنیم آنتی ژن رتریوال را هم انجام بدهیم. ببینید چی هستند؟ دِپارافینایز کردن. دپارافینایز چطوری پارافینایز می­کنیم؟ سمپل­مان را معمولاً می­گذاریم در محلولی که محلول حلال غیر قطبی است مثل زایلن. می­گذاریم پارافین­هایش حل بشود. چطوری ری ­هایدریت می­کنیم؟ با قرار دادن در آب. منتهی معمولاً سمپل را یک دفعه نمی­اندازیم در آب. از غلظت­های افزایش یابنده آب استفاده می­کنیم. مگر آب را می­شود غلظتش را افزایش داد؟ کم باشد آب آن یا زیاد باشد. می­شود همچین کاری کرد؟ غلظت افزایش یابنده آب یعنی این­که چیزی داشته باشیم که آبش خیلی کم باشد یا نداشته باشد مثل اتانول مطلق بعد یک خورده آب داشته باشد بعد خورده آب داشته باشد و همین­طور الی آخر. از غلظت­های کاهش یابنده اتانول استفاده می­کنیم این­طوری بافتمان بهتر ری­هایدریت می­شود. این دو تا کار را که کردیم پارافین­ها را برداشتیم آب هم آمدیم به بافت برگردانیم که معمولاً 50 درصد اتانول است و معمولاً بعدش هم در آب معمولی هم این را می­گذاریم حالا آماده است که بیاییم آنتی ژن رتریوال انجام بدهیم. این آقایی که دارید این­جا می­بینید یک عکسی است که من از اینترنت گرفتم دارد آنتی ژن رتریوال انجام می­دهد. اگر نگاه کنید این­جا ماکروویو است این­جا سمپل­هایش را گذاشته یک بافری دارد روی آن می­ریزد و می­خواهد این را بگذارد در ماکروویو بگذارد بجوشد. آنتی ژن رتریوال به آن مسکینگ هم می­گویند. چطوری من رتریوال را انجام می­دهم. دو تا متد هست. ریتریوال­ها معمولاً این طوری هستند یک پروتئینی را که خیلی به خودش جمع شده در اثر کراس لینکینگ، کراس لینک­هایش را نمی­شود جدا کرد. نمی­شود با قیچی دانه دانه باز کنیم. باید دناتوره کنیم یک خورده باز بشود بعد بگذارید رناتوره بشود. علی­رغم این­که آن کراس لینک­ها باقی می­مانند اگر من دناتوره کنم بعد رناتوره کنم معمولاً شاخص­های آنتی ژنیک که به ویژه آن­هایی که اپی توپ­های خطی هستند بهتر می­شود اوضاع و احوال­شان، برمی­گردند البته صد در صد برنمی­گردند. یک راهش این است که من بیایم نمونه­ام را بجوشانم. بویلینگ انجام بدهم. وقتی بویلینگ انجام می­دهید دناتوره می­شود بعد می­گذارند به تدریج رناتوره بشود یک مقداری آنتی ژنیست را برمی­گرداند. گاهی وقت­ها هم از پروتئاز دایجسشن (28:05) استفاده می­کنیم. پروتئینی که کراس لینک کردیم یک جاهایی را می­آییم با پروتئاز کات می­کنیم دو مرتبه یک خورده بازتر می­شود و می­شود بهتر روی آن پروسه­های مربوطه را انجام داد. آنتی ژن رتریوال را معمولاً در بافرهای مختلف تست کردند یک بافری داریم به اسم بافری سیترات بهتر کار می­کند ولی با پروتکل­های متفاوت هستند. معمولاً آنتی ژن رتریوال را از بویلینگ آغاز می­کنیم اگر جواب نداد می­آییم سراغ پروتئاز دایجسشن. با غلظت خیلی کم تریپسین این کار را انجام می­دهیم. حالا که سمپل آماده کردیم و پِرِ پراسسینگ هم اضافه کردیم می­رسیم به اضافه کردن آنتی بادی­ها. هر ایمونو استینینگی که می­خواهیم انجام بدهیم قبل از این­که آنتی بادی­ها را اضافه کنیم معمولاً یک استپی دارد به اسم بلاکینگ. چه این ایمونو استینینگ، وسترن بلات باشد آن هم یک جورهایی، ایمونو استینینگ است چه الایزا باشد چه این ایمونو استینینگ روی نمونه­ها باشد.

کاهش می­دهد چون که در اکثر موارد اتصالات غیر اختصاصی افینیتی خیلی زیادی ندارد یعنی می­تواند بلاکینگ روی این امر هم مؤثر باشد ولی نه به خوبی آن حالت اولی. چطور بلاک می­کنیم؟ یا از pss استفاده می­کنیم یا از سرم استفاده می­کنیم. عملاً پروتئین اصلی سرم همان آلبومین است حالا این­جا یک نکته تکنیکالی که من خیلی نمی­خواهم وارد آن بشوم در دیزاین­های ایندایرکت بهترین چیز برای فیکس کردن سرم آن حیوانی است که آنتی بادی سکندری در آن تولید شده. آنتی بادی اولیه در موش تولید شده، آنتی بادی دوم در خرگوش تولید شده بهترین بلاکر آن سرم خرگوش است. منتهی اکثر موارد ما نداریم سرم آن حیوان دوم را معمولاً از دی اس ای استفاده می­کنیم. آنتی بادی پرایمری را اضافه می­کنیم. آن قسمتی است که من باید به شما یک مطلبی را آموزش بدهم که آنتی بادی پرایمری قرار است ضد این تارگت باشد. بعد سکندری، بعد هم سیگنال را تولید می­کنیم. سوال این است که پرایمری آنتی بادی را چطور انتخاب کنیم. الان در این قسمتی که من دارم صحبت می­کنم فرضم این است که آنالیتم یک چیزی است که در این سطح قرار گرفته است یعنی من دارم دنبال این مثلث­ها می­گردم در سطح. پس الان که می­خواهم به شما بگویم آنتی بادی را با سرچ در وب چطوری پیدا کنیم آنتی بادی من ری ایجنت است که می­خواهیم برویم پیدا کنیم ولی در بعدی­ها. می­توانید یک ایمونو استینینگ نام ببرید به آنالیتش این آنتی بادی باشد؟ می­توانید نام ببرید؟ تست فاینا. من می­خواهم ببینم آنتی نوکلئار، آنتی بادی وجود دارد یا وجود ندارد. می­آیم روی این سطح یک سری سلول را می­چسبانم. سلول­های کبدی می­دانم چیست؟ یک سلول است. حالا سرم بیمار را اضافه می­کنم آنالیتم در آن سرم بیمار می­خواهم ببینم آنتی بادی ضد هسته دارد یا ندارد و بعد اگر داشته باشد می­شود با یک آنتی بادی دوم می­توانیم این را دیتکت کنیم. ولی این را که می­خواهم این قسمت به شما بگویم فرضم این است که آنالیت این­جا است من می­خواهم آنتی بادی پرایمری برایش انتخاب کنم. یعنی آنالیتم آنتی بادی ری ایجنت برایم شناخته شده است. خب یک چیز خیلی مهم که شما هم احتمالاً در کارهایتان بعداً در دوره کارشناسی ارشد یا در دوره پی اچ دی با آن سروکار خواهید داشت این است که من یک آنتی ژنی دارم و می­خواهم برایش آنتی بادی تولید کند. قدیم­ها معمولاً در آزمایشگاه چند تا آنتی بادی در یخچالشان داشتند از آن استفاده می­کردند اما الان معمولاً ما وقتی می­خواهیم یک آنتی بادی را برای یک چیزی پیدا کنیم معمولاً می­رویم و دیگر نمی­رویم سراغ کاتالوگ شرکت­ها که به صورت کتابچه چاپ شده باشد. یا در یخچال را نگاه کنید یا از استاد بپرسید. معمولاً می­آییم سرچ می­کنیم و در این سرچ کردن با چیزهای مختلف برخورد می­کنیم. این مثالی که من می­خواهم این­جا به شما نشان بدهم این است که می­خواهیم برای یک کاسپاز 3 یک آنتی بادی پیدا کنیم. چون می­خواهیم وجود این مولکول و به صورت دقیق­تر شکل کلیو شده­اش را یعنی فرم فعالش را بیاییم در حقیقت در سلول­هایمان بسنجیم یا حالا هر چی دیگری می­توانیم در نظر بگیریم. مثلاً فرض کنید مولکول ارک را می­شناسید؟ یک آنتی بادی ضد ارک من می­خواهم پیدا کنم. آنتی ارک، آنتی بادی یا مثلاً فرض کنید یک آنتی بادی اکتین می­خواهم پیدا کنم. آنتی اکتین آنتی بادی. مثلاً من آنتی بتا اکتین آنتی بادی همین­جوری نگاه می­کنم می­بینم شرکتی است به نام سل سیگنال آنتی بادی­های ضد اکتین می­فروشد خب می­گویم بروم نگاه کنم چه هست. این هم شرکت دیگری است به نام abcam که شرکت خیلی خوشنام است در تولید آنتی بادی­ها.

سوال:

چه فیچرها یا خصوصیت­هایی را باید در نظر بگیریم وقتی می­خواهیم آنتی بادی بخریم؟ اولی آنتی ژن­مان چی است آنتی بادی باید ضد آن باشد. پس آنتی ژن ما چی هست؟ یا مثلاً من می­دانم آنتی ژن من اکتین است. حالا چکار کنم؟ 1000 تا آنتی بادی ضد اکتین وججود دارد اصلاً می­توانیم ننویسیم می­دانیم چیست؟ چه خصوصیاتی باید داشته باشد؟ آنتی بادی برای چه کاری می­خواهیم ازش استفاده کنیم. این­جا می­گوییم ایمونو استینیگ ولی خود استینینگ یکی نیستند. پس یکی از چیزهایی که توجه می­کنیم در مورد آن آنتی بادی تستد اپلیکیشن­ها است. آنتی بادی به درد چه کاری می­خورد؟ چون هر آنتی بادی به درد هر کاری نمی­خورد. یک آنتی بادی برای وسترن بلات خوب است برای ایمونو استینینگ، ایمونو هیستو کمیستری خوب نیست. برای ایمونو هیستو کمیستری خوب است. برای ایمونو استینینگ فلورسنت خوب نیست، برای فلوسایتومتری خوب است به درد وسترن بلات نمی­خورد. علل هم دارند. آدم می­گویند چرا آنتی ژن یا آنتی بادی می­خواهد وصل بشود بخاطر نوع سمپل و پری پریشن­هایی که انجام می­دهیم گاهی وقت­ها نوع برای یک چیزی خوب است برای یک چیزی خوب نیست تستد اپلیکیشن­ها. الان من این صفحه abcam را باز کردم می­توانید به من بگویید آنتی بادی که به اسم با کد 8227 دارد می­فروشد به درد چه کاری می­خورد؟ این­جا یک چیزی دارد به اسم سوتبل فور. یک چیزهایی هم این­جا نوشته شده چون به صورت کد هست اگر پایین صفحه را نگاه کنم اطلاعاتش را نوشته. وسترن بلات است. این آی اچ سی است که فرمالین فیکس پارافین امبدد است. این ایمونو سایتو کمیستری هم فلورسنت است پس برای این 3 تا چک کردند. اما از این برای فلوسایتومتری می­توانم استفاده کنم. صرف­نظر از این­که ما در فلوسایتومتری معمولاً خیلی دنبال اکتین نمی­گردیم. چیزی این­جا ننوشته. این­ها تستش نکردند می­خواهید خودتان بروید تست کنید. یکی این است. دیگر چی؟ تست اپلیکیشن­ها. خیلی مهم است. چه اهمیتی دارد که پلی کلونال باشد پی ای بی باشد یا مونو کلونال باشد. حالا شما بگویید این آنتی بادی پلی کلونال است یا مونو کلنونال؟ پلی کلونال است. چه فرقی می­کند پلی باشد یا مونو باشد؟

دانشجو: اختصاصیت

استاد: اسپسیفیتی؟ بین پلی کلونال و مونو کلونال کدامشان اسپسیفیک­تر است؟ همیشه ما به اختصاصیت نیاز داریم اتفاقاً مونو کلونال­ها الان یک جورهایی دارند ارزان­تر هم می­شوند از پلی کلونال­ها. قدیم­ها خیلی گران بودند ولی الان چون تکنولوژی­های پس من همیشه بروم مونو کلونال اوردر بدهم؟

سوال:

پلی کلونال و مونو کلونال هر کدام چه ادونتج­ها و دیس ادونتج­هایی دارند؟ معمولاً اگر یک چیزی داشته باشید که همه خوبی­ها را داشته باشد و هیچ بدی هم نداشته باشد دیگر فقط آن را تولید می­کنند. من یک پلی کلونال هنوز می­فروشد شرکتی مثل abcam که خیلی هم دید تجاری دارد می­فهمم که هنوز پلی کلونال جایگاهی دارد. یک خوبی­هایی دارد. چی است؟ دو نوع ری­ایجنت داریم در تست می­خواهیم از آن استفاده کنیم گفتیم همیشه وقتی مقایسه می­کنیم دو تا سنجه یا متریک داریم برای یک تست. چی هستند آن دو تا سنجه یا متریک؟ که می­سنجیم با آن­ها. سنسیتیویتی و اسپسیویتی.

سوال:

در یک ایمونو استینینگ که این­جوری می­خواهد انجام بشود حالا من ایندایرکت گرفتم می­تواند دایرکت باشد. آنتی بادی پلی کلونال اگر باشد از نظر آن دو سنجه چگونه خواهد بود؟ اگر مونو کلونال باشد از نظر آن دو سنجه چگونه خواهد بود. گفتند مونو کلونال­ها اسپسیفیک­تر هستند قبول دارید؟ پلی کلونال­ها سنسیتیویتی بیشتری به ما خواهند داد. چون معمولاً آنتی ژن­ها اپی­توپ­های متعدد دارند این بر ضد اپی توپ­های متعدد می­تواند متصل بشود. سیگنال قوی­تری به ما می­دهد. اما اسپسیفیتی چطوری خواهد بود؟ مونو کلونال اسپسیفیتی آن بالاتر است چرا؟ چرا پلی کلونال اسپسیفیتی آن کمتر است.

من این­جا یک آنتی ژن دارم این آنالیت من است. این هم شاخص­های آنتی ژنیک است. این بیضی­هایی که این­جا کشیده یعنی شاخص­های اپی توپ. مونو کلونال فقط یکی از این­ها را می­شناسد فقط آبی را می­شناسد. پلی کلونال چیزهای مختلف را می­شناسد. من همین­جوری اگر نگاه بکنم این پلی کلونال چون می­تواند اپی توپ­های مختلف یک آنتی ژن که آنتی ژن مدنظر من است همان اکتین فرض کن. را تشخیص بدهد برای من سنسیتیویتی بیشتری ایجاد می­کند یعنی اگر مقدار آنتی ژن کمتر باشد چون اپی توپ­های مختلف را چون می­شناسد مثلاً اگر فرض کنید پنج نوع اپی توپ مختلف هستند به این یک مولکول 5 نوع آنتی بادی می­چسبد. حالا این­جا یکی می­چسبد. پس سنسیتیویتی بیشتری ایجاد می­کند. حالا سوال این است که چرا اسپسیفیتی این از این کمتر است؟

دانشجو: فالس پازیتیو

استاد: فالس پازیتیو چرا ایجاد می­کند.

به خاطر این­که هر کدام از این آنتی بادی­ها یک ضریب خطا دارند برای خودشان. این نود درصد به این­ها وصل می­شود. یک ضریب خطایی دارد که ممکن است برود یک اپی توپ مشابهی را بشناسد یا خود این اپی توپ ممکن است یک جای دیگری هم باشد. این برای خودش یک ضریب خطایی دارد. این برای خودش یک ضریب خطا دارد. این برای خودش یک ضریب خطا دارد. من اگر یکی داشته باشم ممکن است با خطای این سروکار دارم. اگر 5 تا داشته باشم به خاطر 5 تا سروکار دارم و این خطاها هر کدام برای ما سیگنال نان اسپسیفیک ایجاد می­کنند. مثل همان آنتی بادی پرایمری سکندری است یک جورهایی. یک دانه آنتی بادی داشته باشم با خطای یک آنتی بادی سروکار دارم. دو تا که داشته باشم با خطای دو تا آنتی بادی سروکار دارم. پس مونو کلونال­ها به ما اسپسیفیتی بهتری می­دهند ولی سنسیتیویتی­شان پایین­تر است. دو مرتبه این یک قاعده کلی است یکی ممکن است بیاید بگوید من آنتی بادی مونو کلونال ضد فلان چیز رفتم گرفتم یک پلی کلونال هم گرفتم. مونو کلونال هم سنسیتیویتی بهتر است هم اسپسیفیتی بهتر است. ممکن است یک همچین چیزی باشد. ما این­جا قوانین استثنا ناپذیر نداریم. ممکن است یکی آنتی بادی مونو کلونال گرفته باشد از هر دو جهت خوب است. یکی پلی کلونال گرفته پلی کلونال هم سنسیتیویتی هم اسپسیفیک ولی در حالت کلی پلی کلونال­ها سنسیتیویتی و اسپسیفیتی­شان، سنسیتیویتی بالاتر و اسپسیفیتی پایین­تر دارند. این شد کلونالیتی پس دومین چیزی که نگاه می­کنم کلونالیتی است. به قیمت نگاه می­کنیم. آن هم مهم است فعلاً آن را در نظر نگیریم. علمی­ها را بگوییم. من می­­خواهم رنگ آمیزی را انجام بدهم ضد اکتین یا ارک یا هر چیزی. اکتین کی؟ اکتین انسان؟ اکتین موش؟ اکتین رت؟ کاسپاز انسان؟ کاسپاز موش؟ آنتی بادی که من می­خواهم اوردر بدهم با آن آنتی ژن در آن گونه مدنظر من واکنش نشان می­دهد یا نمی­دهد. حالا یک چیزهایی است مثل اکتین خیلی کانزرو هستند. معمولاً اکتین ما اکثر قسمت­هایش شبیه اکتین موش است، رت و حتی در یوکاریوتی ؟ (59:29) ممکن است اکتین آن شبیه به هم باشد. ولی خیلی از چیزها شبیه به هم نیستند. به آن می­گوییم ری­اکتیویتی. اصطلاحاً می­گوییم اسپیشیس حالا کلمه­ها را چون سایت­ها به کار می­برند من از همان کلمه­ها استفاده می­کنم. اسپیشیس ری­اکتیویتی. ضد آنتی ژن حیوانی است مثلاً اگر من سکشن انسانی را بخواهم رنگ­آمیزی کنم معمولاً می­روم نگاه می­کنم با اکتین انسان واکنش نشان می­دهد یا نمی­دهد. اگر نشان نمی­دهد نمی­روم اوردر بدهم. این­جا می­توانید به من بگویید آنتی بادی اکتین با اکتین چه موجودی واکنش نشان می­دهد؟ موش و رت و ربیت و خیلی­ها. حالا این در مورد اکتین این­جوری است چون اکتین­های این­ها شبیه همدیگر است ولی خیلی وقت­ها ممکن است یک چیز دیگر باز کنیم این­جوری نباشد. به آن می­گوییم اسپیشیس ری­اکتیویتی. دیگر چی؟ ایزوتایپ آنتی بادی. به چه دارد می­خورد ایزوتایپ آنتی بادی. اولاً ایزو تایپ آنتی بادی­ها معمولاً چی است؟ معمولاً آنتی بادی­هایی که می­فروشند آی جی جی است. ممکن است آی جی ام آی جی ای هم بفروشد ولی چرا آی جی جی می­فروشند؟ چرا آی جی ای نمی­سازند؟ چرا آی جی ام نمی­سازند؟ شما به یک حیوانی آنتی ژن تزریق کردید. آنتی بادی را از حیوانات می­­گیرند. چه مونو کلونال باشد چه پلی کلونال. بیشتر چی تولید می­کند؟ همین از حیوان آی جی ای که نمی­توانم بروم استخراج کنم. آدم بیچاره می­شود تا بخواهد برود آی جی ای را من دارم می­فروشم. آی جی دی، حتی ام. آن آنتی بادی که وقتی شما به یک حیوان حداقل پستانداران این­طوری هستند حالا بقیه حیوانات نمی­دانم. به پستانداران وقتی آنتی ژن را تجویز می­کنید آنی که تیتر بالا ازش می­توانید بگیرید آی جی جی است. تنها این هم نیست. تیتر بالا یکی از چیزهایی است که ما از آی جی ای استفاده می­کنیم یک چیز دیگر هم هست؟ آن آنتی بادی که بهترین افینیتی مچوریشن روی آن انجام می­شود چی است؟ آن هم دو مرتبه آی جی جی است. البته ام خیلی افینیتی مچوریشن ندارد. ای و ایی هم می­توانند افینیتی مچوریشن داشته باشند ولی معمولاً آی جی جی­ها از این جهت بهتر هستند. پس هم اتصالش به آنتی ژن بهتر است هم تیتر بالا می­توانم ازش بگیرم. چند صد برابر. حالا استبیلیتی مولکول هم می­تواند این­جا اهمیت داشته باشد ولی احتمالاً تو ایمونو استینینگ­ها چون فریز می­کنیم آنتی بادی را خیلی این­طور نیست که معمولاً آی جی جی خب حالا آی جی جی است من چکار دارم آی جی است. من چرا بروم نگاه کنم ببینم ایزوتایپش چی است. برای من چه اهمیتی دارد. رفته ساخته یک چیزی. به این تصویر نگاه کنید. برای من چه اهمیتی دارد ایزوتایپ این چی باشد؟ می­خواهم بروم برای سکندری آنتی بادی اوردر بدهم. سکندری آنتی بادی که اوردر می­دهم ضد چی باشد؟ اکثراً چون آی جی جی هست سکندری آنتی بادی­ها معمولاً آنتی آی جی جی هستند ولی یک وقتی ممکن است آنتی بادی پرایمری آی جی ای باشد یا خود این حالا این­جا ننوشته آی جی جی 1، 2، 3، 4 هم ممکن است مهم باشد. این یک جنبه داستان است. در فلوتو سایتومتری چرا مهم است؟ این دیزاین این­دایرکت. تو فلوسایتومتری هم ما خیلی به ایزوتایپ نگاه می­کنیم. چرا؟ چون یک چیزی داریم به اسم آیزوتایپ کنترل. آیزوتایپ کنترل یک کنترلی است که اضافه می­کنیم. ایزوتیپ باید همان آنتی بادی باشد. پس باید بدانم. آنتی بادی من چی هست؟ معمولاً آنتی بادی­ها آی جی جی هستند حالا توی این سایت بیاییم نگاه کنیم یک فیلتری یک جایی دارد مثلاً می­تواند چیزهای دیگر هم آی جی ای به شما نشان بدهد ولی باید نگاه کنید چون آنتی بادی ثانویه اوردر بدهیم. دیگر چی؟ چیزی دیگری هست مهم باشد؟ تست اپلیکیشن آن چی است؟ کلونیتی چیست؟ اسپیشیس ری­اکتیو چی هست؟ آیزوتایپ چیست؟ چیز دیگر هم هست در این­جا که شما هنوز به آن دقت نکردید. این­که در آن حیوانی که می­خواهم تولید کنم مثلاً چقدر بیگانه است با. این هم هست چون در موش خیلی آنتی بادی­های ضد آنتی ژن رت خوب نمی­شود تولید کرد یا در متن مثلاً دور باشند بهتر است. ولی مشکل من نیست. مشکل آن کسی که آنتی بادی تولید کند است. با این حال این برایم مهم است. چرا مهم است؟ آنتی بادی تو کی تولید شده؟ با این فرق می­کند. با اسپیشیزی ری­اکتیوی فرق می­کند؟ چه فرقی می­کند؟ آن­جا می­خواهیم ببینیم آنتی بادی بر ضد آنتی ژن کی یعنی چه موجودی واکنش نشان می­دهد این­جا می­خواهم بگویم که سورس آنتی بادی من چه اسپیشیزی است؟ تو هر کی تولید شده چه اهمیتی دارد برای ما؟ در موش و خرگوش یا در الاغ یا بز است. سنکدری آنتی بادی می­خواهم اوردر بدهم اگر آنتی بادی اولیه در موش تولید شده آنتی بادی ثانویه در من باید در آنتی ماوس ایمونو گلبولین باشد. اگر در خرگوش تولید شده باید آنتی ربیت ایمونو گلبولین باشد. اگر در الاغ تولید شده، اگر در گوت تولید شده باید پس سورس هم مهم است در کی تولید شده این را هم باید نگاه کنیم. خیلی وقت­ها هم ما آنتی بادی­های ثانویه را از قبل داریم در یخچال. بعد می­روم نگاه می­کنم ثانویه چی دارم پرایمری با همان مچ می­کنم. همیشه هم این­جوری نیست که اول پرایمری و اوردر بعد تازه معمولاً آنتی بادی­های ثانویه چون ارزان­تر هستند طولانی­تر می­مانند مثلا در یخچالمان آنتی بادی، آنتی ماوس اچ آر پی کونجوگیتد دارم. قاعدتاً برای این­که دو مرتبه مجبور نشوم یک آنتی بادی ثانویه دیگری اورد بدهم می­روم آنتی بادی موشی اوردر می­دهم. این­طوری هم هست. دسکریپشن، سورس را نوشته، کلونیته را نوشته. هوس اسپیشیز یا سورس اسپیشیز. اسپسیفیتی توضیح داده که بر ضد کدام قسمت اکتین تست اپلیکیشن­ها را و این­جا هم کدها را نوشته. این وسترن بلات است، این آی سی پی است. اسپشزیس ری­اکتیویتی است گفتیم. اسپشزیس ری­اکتیویتی یک چیز جالبی دارد. یک چیزهایی را تست کردند، یک چیزهایی را گفته پردیکت تو ورک ما تست نکردیم. حدس می­زنیم. چطوری حدس می­زنند که با این­ها واکنش نشان می­دهد؟ می­گوید من موش، رت و ربیت را خوک و گاو را رفتم تست کردم ولی گوسفند را تست نکردم، مرغ را تست نکردم، خوک هندی را تست نکردم ولی حدس می­زنم کار می­کند. چطوری حدس می­زند؟ بیوانفورماتیک است می­رود سکانس­های این­ها را با هم الک می­کند ببیند 90 درصد شبیه است ولی من تضمینش نمی­کنم. پردیکتد تو ورک. با چه آمدند ایمیونایز کردند؟ این اطلاعات را معمولاً می­دهد از این جهت که ما بدانیم یک پپتیت شاخص لینیر را تشخیص می­دهد یا شاخص کانفورمیشنال را. اگر با پروتئین اینتکت حیوان را ایمیونایز کرده باشند آنتی بادی­های پلی کلونال خواهیم داشت که بعضی­هایشان کانفورمیشنال را می­شناسند بعضی­هایشان لینیرها را. پپتید سنتتیک باید معمولاً لینیر است. این می­تواند دارای اهمیت باشد. معمولاً آنتی اکثر آنتی بادی­هایی که هستند بر ضد پپیتدهای سنتتیک هستند. چون هم تولیدشان راحت­تر است هم شاخص­های کانفورمیشنال بالا و پایین دارند در پروسه فیکساتیوهایی که اضافه می­کنیم خیلی شاخص­های کانفورمیشنال به هم می­خورند ولی خطی­ها معمولاً باقی می­مانند. یک ؟ (1:7:55) کنترل می­فروشد. مثلاً این سلول­ها را اگر داشته باشد همه این­ها اکتین را دارند یک سری اطلاعات دیگری. یک چیز دیگر هم هست. چرا سدیم آزاید مهم است بودن یا نبودنش؟ گاهی وقت­ها نه در این ایمونو استینیگ­ها ولی در بعضی از موارد ممکن است نخواهیم سدیم آزاید داشته باشم. اگر می­خواهید از آنتی بادی­تان برای کارهای روی سلول­های زنده می­خواهید استفاده کنید نباید در آن سدیم آزاید داشته باشد. البته این­جا که ما داریم می­گوییم سلول­های فیکس شده­اند همه مرده­اند ولی گاهی وقت­ها ممکن است آنتی بادی هم به عنوان یک نیترولایزینگ آنتی بادی بخواهیم در محیط کشت از آن استفاده کنیم. مثلاً فرض کنید سایتوکاین سلول تی ؟ (1:9:18) می­کنیم آنتی بادی ضد اینترلوکین 4 اضافه می­کنیم به سمت ؟ (1:9:20)2 نرود. من اگر آنتی آی ال فور بروم اوردر بدهم سدیم آزاید داشته باشد. چه مشکلی پیش می­آید؟ دیگر نمی­توانم به سلول­ها اضافه کنم. چون این ماده سمی است. و یک چیز خیلی مهم دیگر پیوریتی آنتی بادی است. پس اسپسیشیز ری اکتیویتی، کلونالیتی، اپلیکیشن، سورس که چه حیوانی است. آیزوتایپ، بافر و پیوریتی. این پیوریتی را هم برای شما توضیح بدهم.

پیوریتی آنتی بادی چطوری می­تواند باشد؟ آنتی بادی یا پلی کلونال است یا مونو کلونال؟ پلی کلونال­ها خودشان درجات مختلف پیوریفیکیشن دارند. خام­ترین فرم آنتی بادی، آنتی سرم است. یعنی من به حیوان آمدم آنتی ژن تزریق کردم سرم آن را گرفتم. هیچ کار دیگری هم روی آن انجام ندادم. این کرودترین فرم آنتی بادی است و ارزان­ترین فرم است. به آن می­گویند هایپر ایمیون سرم یا آنتی سرم. آیا از این­ها ما می­توانیم در ایمونو استینیگ­ها استفاده کنیم. بله ولی معمولاً نان اسپسیفیتی زیاد دارند. قدیم­ها آنتی بادی­هایی که در بازار بود همشون این­جوری بودند. چون کسی پول نداشت برود پیوریفای کند و آنتی بادی­هایی که درمان هم از آن­ها استفاده می­شد همین­ها بودند. اولین آنتی سرمی که از آن استفاده شد همانی بود که ضد توکسین دیفتری بود سرم اسب یا آقای بهرینگ می­گرفت بچه­ها می­داد دیگر نمی­توانستند پیوریفای کنند. اصلاً نمی­­دانست آنتی بادی چطوری است. راحت بود پروسه منتهی خیلی چیزها غیر اختصاصی داشت. سرم سیگنس می­داد و الی آخر. پس من ساده­ترین فرم آن این است که آنتی سرم باشد. بعضی شرکت­ها ممکن است همچین چیزی را بفروشند. ارزان هم هست. یک خورده خالص­تر شده آن چیست؟ سرم در آن آلبومین دارد، آلفا گلبولین دارد، بتا گلبولین دارد، گاماها را هم دارد. من بیایم آنتی بادی­ها را جدا کنم که معمولاً این­جا فرکشن آی جی جی را جدا می­­کنم. خب پروتئین ای استافیلوکوکی جی استرپتوکوکی و این حرف­ها. یک ستون جی دارم، یک ستون که روی آن آمدم پس من یک حالتش این است که این حیوان را ایمیونایز کردم سرمش را گرفتم. این خیلی کرود است خیلی آلبومین دارد خیلی چیزهای دیگر دارد آنتی بادی چیزهای مختلف دیگر هم دارد. حالت دوم این است که یک ستون درست می­کنم ذرات آگارز را در آن پروتئین جی دارد می­شود خرید این­ها را. آن سرم حیوان از این باال رد می­کند چیزهای غیر آنتی بادی رد می­شوند آنتی بادی­ها می­چسبند بعد این را ایلوت می­کنند با بافر ایمیدآزول یا هر چیزی. این بهتر از آن قبلی است ولی هنوز هم خیلی خالص نیست. چون همه ایمونو گلبول­های جی را دارد. اگر آی جی جی بخواهم استخراج کنم. تنها ان چیزی که مد نظر من هست نیست. لول کامل­تر چی هست؟ ایمونو یا ایمونوژن افینیتی پیوریفیکیشن این هم یک افینیتی پیوریفیکیشن است ولی این با آن فرق می­کند. این­جا من می­آیم خود آنتی ژن را به سطح متصل می­کنم حالا آنتی بادی­ها را از آن عبور می­دهم. که همه آی جی جی­ها نروند بچسبند. آن آی جی جی­هایی که ضد آن شاخص آنتی ژن مدنظر من هست بیایند متصل بشوند به آن می­گویند ایمونوژن افینیتی پیورفیکیشن. پیوریفای نگوییم چون این هم یک جور افینیتی پیوریفیکیشن است. این می­شود آنتی ژن افینیتی پیوریفیکیشن و این خالص­ترین فرم آنتی بادی پلی کلونال است. حالا خیلی وقت­ها اول می­آیند آی جی جی فرکشن را جدا می­کنند بعد می­آیند عبور می­دهند پس من سه تا فرم مختلف دارم. اگر بخواهم آنتی بادی اوردر بدهم یکی از چیزهایی که به آن دقت می­کنم میزان پیوریفیکشن است. این­ها بهتر از این­ها هستند، این­ها بهتر از این­ها هستند. حالا در این­که داشتیم نگاه می­کردیم می­توانید به من بگویید چطوری این خالص شده؟ دارد این­جا یا ندارد؟ بله دارد. پیوریتی دارد، چطوری پیوریفای کردند؟ آنتی سرم است. فرکشن آی جی جی است یا چیز دیگری است؟ ایمونو ژن افینیتی پیوریفای پس این بهترین فرم پلی کلونال آنتی بادی است. حالا ممکن است فرم­های دیگر هم باشند خوب کار کنند ولی این بهتر است پس یک چیزی هم نگاه می­کنیم این هست. مونو کلونال­ها چی؟ مونو کلونال­ها خیلی از نظر پیوریفیکیشن چیز خیلی خاصی نداریم. قدیم­ها مونو کلونال­ها معمولاً مایع آسیت یعنی آن هیبریدها را می­آمدند پریتوئن را روی آن تزریق می­کردند یک تومور می­گرفت مایه آسیتش را برمی­داشتند خب این خیلی اخلاقی نیست حیوان اذیت می­شود. الان معمولاً سوپ سلولی است. سیکل سل کالچر است که کشت دادند و این را برمی­دارند منتهی از نظر عملکردی برای ما این دو تا خیلی فرقی ندارد. اکثراً این یکی هستند. آنتی بادی ثانویه را هم به شما بگویم این شد پرایمری. آنتی بادی ثانویه را انتخاب کنیم این­جا چه چیزهایی برایمان مهم است؟ اولین چیزی که برایمان مهم است این است که آنتی بادی ثانویه باید ضد دیزاین این­دایرکت باشد. ضد آنتی بادی­های آن حیوانی باشد که آنتی بادی پرایمری در آن تولید شده است. این واضح است اگر پرایمری در موش و باید آنتی ماوس ایمونوگلبولین باشد. اگر پرایمری در آنتی رت ایمونو گلبولین باشد. مطلب دوم این است که با چی کونجوگه شده است؟ مثلاً من می­خواهم آنتی بادی ثانویه­ام به اچ آر پی وصل باشد. خب می­روم نگاه می­کنم آنتی بادی­هایی هستند ثانویه که اچ آر پی کونجوگیتد هستند یا آنتی بادی ثانویه­ای که به آلکان اند فسفاتاز وصل هستند. سومین چیز دو مرتبه پیوریتی آنتی بادی است و این پیوریتی آنتی بادی حالا این­جا یک بحثی داریم کونجوکیشن می­تواند آنزیم باشد بیوتین باشد چیزهای مختلف باشد. یک چیزی هم به اسم پیوریتی آنتی بادی یک پروسه­ای داریم به اسم پِرِ ادزورپشن که می­خواهم شما بروید مطالعه کنید بگویید پرِ ادزوپشن آنتی بادی ثانویه به چه معنا است و به چه درد می­خورد و بعد استفاده­هایی که از آن می­شود چه است؟ خب این کلیاتی شد در مورد ایمونو استینینگ. من یک سری تصویر دارم که می­خواهم به شما نشان بدهم عکس­هایش را کاربردهای ایمونو استینیگ، کاربردهایی که دارد شامل بحث­های کلینیکال هم می­­شود. خیلی وقت­ها شما دنبال یک آنتی ژن خاص می­گردید در یک نمونه. نمونه­ای که من این­جا دارم کلاسیفیکیشن­های کنسر برست را نشان داده است. زیر گروه­های مختلف دارند و بعد این زیر گروه­های مختلف براساس این­که در آن بافت ما گیرنده استروژن داریم، گیرنده پروژسترون داریم یا هرتو را داریم. زیر گروه­های مختلف کنسر برست را داریم. مثلاً اگر زیر گروهی باشد هیچ کدام نداشته باشد خیلی چیز بدی است به آن می­گویدن تریپل نگاتیو. چون معمولاً به درمان خوب جواب نمی­دهد. چرا به درمان خوب جواب نمی­دهد؟ چون برای این دارو داریم، داروهای هورمونی استفاده می­کنیم برای این هم دارو داریم. چی داریم که هرتو را تارگت قرار می­دهد؟ تراس ؟ (1:16:02) یا هرسپتین. خب من اگر یک چیزی باشد که تریپل نگاتیو باشد نه استروژن رسپتور دارند نه پروژسترون رسپتور دارد، نه هرتو پس کار درمانی خیلی زیادی روی آن نمی­توانم انجام بدهند گاهی وقت­ها این دو را ندارد این را دارد گاهی وقت­ها سه تایی را دارد و الی آخر. به همین خاطر یکی از چیزهای مهم این هست که وقتی یک سکشن کنسر برست می­رسد دست پاتولوژیست می­آید این رنگ آمیزی را انجام می­دهد با سه تا آنتی بادی. ضد استروژن رسپتور، ضد پروژسترون رسپتور، ضد هرتو. ببیند کدام­ها را دارد چون باید ساب تایپ تعیین کند و بعد گزارش بدهد به اکولوژیست بگوید ساب تایپ این است. اگر لومینال ای هست یا بی هست بهتر است اگر تریپل نگاتیو است بدتر است. هرسپتین به آن بدهم ندهم پس خیلی مهم است. این­جا در این سکشن­هایی که داریم می­بینیم هر ستون مال یک بیمار است. هر سطر یک نوع رنگ آمیزی است. چهار تا بیمار داریم چهار نوع رنگ آمیزی داریم 16 تا پنل مختلف من دارم به شما نشان می­دهم بالاییش هماتوکسیلین ائوزین است که کلی نگاه می­کند فعلاً کاری به این نداریم یعنی رنگ آمیزی استینینگ است ولی ایمونو استینیگ نیست. این و این و این ایمونو استینینگ هستند.

کیس اول را نگاه کنید ستون اول را نگاه کنید. اولاً در ایمونو استینینگ­ها حالا من سیگنال را الان برای شما نگفتم ولی معمولاً سیگنال دی ای بی هست که رسوب می­کند رنگ قهوه­ای ایجاد می­کند. دی ای بی پسر عمو یا دختر عموی تی ام بی است. تی ام بی آبی است رنگش دی ای بی قهوه­ای است رنگش. تی ام بی معمولاً در محلول منتشر می­شود رنگش دی ای بی همان نقطه­ای که تولید شده رسوب می­کند رنگش. به همین خاطر تی ام بی به درد الایزا می­خورد این به درد ایمونو استینینگ می­خورد. آن بالا که نوشته اچ اند ای آن بالا اگر نگاه کنید باید یک هماتوکیسلیدین سیتوپلاسم رنگ می­کند هماتوکسیلین هسته را رنگ می­کند رنگ بازی هسته را رنگ می­کند ائوزین هسته سیتوپلاسم را رنگ می­کند و این دانه دانه­هایی که این­جا دارید می­بینید هماتوکسیلین است که رنگ آبی ایجاد کردند. حالا من الان در این که نگاه می­کنم تو این­که این­جا است یک عالمه هسته­ها است و یک باز همبند بینابینی است این­جا می­بینیم هماتوکسیلین یک خورده پررنگ شده و یک خورده رنگ آمیزی ائوزینی بیشتر است. حالا این با یک پاتولوژیست باید بیاید تفسیر کند که این بافت همبندش مثلاً بیشتر بوده یا فرض کنید چیزهای از این قبیل من خیلی بلد نیستم. اما این را نگاه کنید استروژن رسپتور را آمده رنگ کرده. اولی، دومی، سومی و چهارمی. گیرنده استروژن یک گیرنده استروئیدی است و داخل هسته­ای هم هست معمولاً. به همین خاطر رنگ آمیزی آن خیلی وقت­ها با هسته اورلپ دارد. در این چهار تا کدامشان گیرنده استروژن دارند؟ اولی و دومی دارد سومی و چهارمی ندارند. این ته رنگی هم که این­جا وجود دارد معمولاً یک مقداری هماتوکسیلین به این استینیگ­ها هم اضافه می­کنند که هسته­ها دیده بشود. پس این یکی و این یکی استروژن رسپتور مثبت هستند. این یکی و این یکی استروژن رسپتور منفی هستند. پروژسترون رسپتور را نگاه کنید این با آنتی بادی ضد گیرنده پروژسترون رنگ شده این و این مثبت هستند. این و این منفی هستند. آخری را نگاه کنید آنتی بادی به اسم هرتو است. همان که تارگت تراستازون هم هست. این چطوری است؟ خیلی دیده نمی­شود این آبی­هایی که این­جا دیده می­شود همان آبی­هایی هموتوکسیلینی است که هسته­ها را رنگ کرده است. این و این اگر نگاه کنید می­بینیم مثبت است. حالا این­جا چیزهای مهم­تری هم هست. پترن رنگ­آمیری را نگاه کنید استروژن و پروژسترون رسپتور وقتی رنگ می­کردند هسته­ها بیشتر رنگ می­شدند. این را نگاه کنید چطوری رنگ شده است؟ سیتوپلاسم نیست. غشای سلولی است. چرا؟ چون رسپتور است. ای جی اف رسپتور است پس من معمولاً دنبال ای جی اف رسپتور در هسته معمولاً نمی­گردم. می­بینیم که اطراف رنگ شده و این هم همین­طور. اولی و آخری هرتو منفی است. این دو تا هرتو مثبت است. حالا بیاییم کلاسیفیکیشن کنیم. اولی چیست؟ ای آر مثبت، پی آر مثبت، ای آر مثبت هرتو منفی. پس این فرد درمان هرسپتین به دردش نمی­خورد. ولی درمان تاموکسیفن مثلاً ممکن است به دردش بخورد. این یکی چیست؟ تریپل پازیتیو است هر سه تا را دارد. این یکی چیست؟ استروژن پروژسترون ندارد ولی هرتو را دارد. این چیست؟ تریپل نگاتیو است. پس من با چند تا رنگ آمیزی برای چند تا آنتی ژن آمدم ساب تایپ را تشخیص دادم. خب این یکی از کاربردهای مهم ایمونو استینینگ­ها است در پاتولوژی. حالا این­جا مارکرهای مختلف دایاگنوستیک را من از یک رفرنس که رفرنس آن هم یادم رفته است آورده­ام این­جا گذاشته­ام که مثلاً شما چیزهای مختلف را می­خواهید دیتکت کنید هر کدامشان کجا دیده می­شوند؟ این یکی هم دو مرتبه استروژن رسپتور است. دیفرنشیتد یادم نیست این چی بود. دو مرتبه ­این­جا استینیگ ای آر را داریم. آبی­ها هماتوتوکسیلین است که هسته­ها را رنگ کرد. دو مرتبه این استروژن رسپتور است این هم دو مرتبه استروژن رسپتور مثبت است که کنسر آن را یادم نیست. این مال تز خودم است روی مغز بیماران ام اس دنبال یک آنتی ژنی می­گشتیم می­خواستیم ببینیم وجود دارد یا وجود ندارد یا فرقی با افراد سالم دارد یا نه. این یک سکشن بیمار ام اس است، این سکشن بیمار سالم است. یعنی فرد غیر ام اسی هست. وقتی برای آن آنتی بادی ضد آن گیرنده خاص که اسمش پار دو بود رنگ آمیزی کردیم دیدیم تو مغز افراد سالم چیز زیادی دیده نمی­شود. در ضمن آن­جا هماتوکسیلین هم نزده بودیم. این را نگاه می­کنیم یک رگ خونی است این هم کنارش یک رگ خونی است چیزی هم دیده نمی­شود. این­که کمی قهوه­ای دیده می­شود رنگ آمیزی بک گراند است. همیشه یک مقداری آلودگی وجود دارد آنتی بادی اولیه، ثانویه اشتباه می­چسبد ولی در ام اس وقتی که نگاه می­کنیم یک چیزهایی دیده می­شود که آن آنتی ژن خاص را دارد و آن چیزهایی که آنتی ژن خاص را دارند یک سری سلول­هایی هستند که اطراف یک رگ خونی قرار گرفتند که بعداً مشخص شد این­ها ماکروفاژ­های پریواسکولار هستند که در مغز ملتهب وجود دارد پس ما این­جا دو مرتبه یک آنتی ژن داشتیم، داشتیم دنبال جزئیاتش می­گشتیم. دو مرتبه این­جا یک آنتی ژن دیگری را داشتیم دنبالش می­گشتیم این هم در مغز است و از روی مورفولوژی این سلول­ها به نظر می­آید این­ها آستروسیت باشند. پس یک سوالم این است که دارم یا ندارم؟ بعد این سلولی که این­جا هست کجا قرار دارد؟ مثلاً اگر بافت نزدیک رگ­های خونی است توی پاراناشیم بافت است و ماهیت آن سلول چی است؟ یک چیزی داریم این­جا در ایمونو استینینگ­ها به اسم دابل ایمونو استینینگ یعنی همزمان شما برای دو چیز می­آیید رنگ آمیزی انجام می­دهید. یعنی دو تا آنتی ژن دارید. دو تا آنتی ژن یعنی من دو تا آنتی بادی اولیه دارم یعنی دو تا آنتی بادی ثانویه دارم ولی چطور می­توانم آن­ها را از هم افتراق بدهم. آن دو تا آنتی بادی ثانویه باید برای من دو تا رنگ مختلف ایجاد کنند مثلاً یکی رنگ قهوه­ای ایجاد کند یکیشان رنگ آبی ایجاد کند. یا اگر فلورسنت است مثلاً یکی فلورسنس قرمز داشته باشد یکی فلورسنس سبز داشته باشد. پس ما می­توانیم برای بیش از یک آنتی ژن هم رنگ آمیزی انجام بدهیم. حالا این­که این­جا هست ما دو تا آنتی ژن دنبالش می­گشتیم یکی این آنتی ژن بود که مدنظر خودمان بود. یکی هم این بود که می­خواستیم ببینیم این سلول­هایی که این را دارند آیا لکوسیت هستند یا لکوسیت نیستند؟ یعنی ماهیت آن سلول تولید کننده را هم بدانیم. آنتی بادی ضد این با یک آنتی بادی ثانویه­ای تشخیص داده می­شد که رنگ قهوه­ای ایجاد می­کرد یعنی دمش اچ آر پی داشت. آنتی بادی مربوط به این با یک آنتی بادی ثانویه­ای شناخته می­شد که رنگ آبی ایجاد می­کرد. دمش آلکال اند فسفاتاز داشت در بعضی از جاها دیدیم که بله به نظر می­آید که آن سلول­هایی که آبی شدند همان­ها هستند که قهوه­ای شدند. بعضی جاها هم به نظر می­آید که مثلاً سلول قهوه­ای شده ولی خیلی آبی نشده. خب این پس می­شود دابل استینینگ. معمولاً دابل ایمونو استینینگ­ها را اگر بخواهیم انجام بدهیم فلورسنت انجامشان می­دهیم چون تو فلورسنس راحت­تر می­شود در کانال­های مختلف رنگ­های مختلف را دید. این­جا خیلی یکی ممکن است بگوید من خیلی آبی نمی­دانم. قهوه­ایش را خیلی قهوه­ای نمی­دانم ولی این­جا می­شود دید. این دو مرتبه یک ایمونو استینینگ است روی سکشن­های نخاع موش آنتی بادی که این­جا به رنگ قرمز نشان داده شده است آنتی بادی ضد میلین است. آنتی بادی که این­جا سلول­ها را به رنگ سبز درآوردند آنتی بادی ضد یک مارکر ماکروفاژی است. به اسم آی بی ای وان و من این­جا سه تا موش دارم هر ردیف یک موش است. این موش معمولی است. وقتی نگاه می­کنیم به نخاعش رنگ آمیزی میلین تقریباً یک دست است و من سلول ؟ (1:24:32) خیلی درست و حسابی این­جا ندارم. سومی هم این دو تا روی هم انداخته. بالایی را نگاه می­کنیم مو­ش EAE این­جا آسیب میلینگ دارد. به نظر می­آیند این­جا هم از دست رفته باشد و یک عالمه سلول از جنس مونوسیت ماکروفاژ وجود دارد و بعد وقتی این دو تا را روی همدیگر می­اندازیم البته ببخشید این سومی اور لی نیست. این سی دی تری است اور لی نیست. وقتی که بعداً در تصویر بعدی این­ها روی همدیگر می­آییم قرار می­دهیم یک پترن جالب مشاهده می­کنیم می­بینیم خیلی آن جاهایی که میلینگ است این سلول­ها رفتند انگار دارند میلینگ را می­خورند فرض کنید این­جاها هم حضور دارند. این وسط یک موشی است که درمان گرفته بود. یک مقدار میلینگ بهتر است و یک مقدار این آنتی ماکروفاژها کمتر هستند. پس ما می­توانیم دابل ایمونو استینینگ هم انجام بدهیم. آخرین مطلب این است که همان­طور که گفتم به شما گاهی وقت­ها آنالیت این نیست آنالیت این است. گاهی وقت­ها آنالیت آنتی بادی است مثل این تصویر. این به چه درد می­خورد؟ تو سرم یک فردی دنبال آنتی بادی ضد مخمر می­گردد. مخمر ساکار مثل سرویس سمتی قرار می­دهد سرم بیمار اضافه کردیم آنتی بادی مخمر دارد یا ندارد. به آن می­گویند تست آسکا. به چه درد می­خورد؟ این را بروید بگردید که آنتی بادی آسکا به چه دردی می­خورد. یکی از راه­های تشخیص کرون و کولیت ؟ (1:26:37) وجود آنتی بادی ضد مخمر است. این چی؟ این هم آنالیت آنتی بادی است. منتهی آنتی بادی ضد آنکا، مخفف آنتی این­ها نوتروفیل هستند به آن می­گویند آنتی نوتروفیل سایتوپیلاسم آنتی بادی. در خیلی از بیماری­های روماتولوژی دیده می­شود. پترن­های آن هم پی آن­کا و سی آن­کا است. دو مرتبه این­جا آنالیت چی است؟ می­خواهم ببینم آنتی بادی ضد نوتروفیل دارد یا ندارد؟ مشهورترین آن این یکی روی اسلاید هم آمدم سلول­های کبدی را چسباندم. می­دانم آن­جا چی است. تو اون سلول­های دنبال چیزی نمی­گردم می­دانم آن سلول­ها هسته هم دارند. می­خواهم ببینم در سرم بیمار آنتی بادی ضد هسته وجود دارد یا وجود ندارد؟ این هم یک ایمونو استینینگ است. منتهی آنالیتم تو اسلایدم نیست. آنالیتم در مایعی است که دارم به اسلاید اضافه می­کنم و حالا بعد این­جا دیگر داستان­های خودش را دارد پترن­های مختلف دارند و امثالهم این را هم بگویید. این توکسو پلاسما است موزی شکل است. این­جا دنبال چی داریم می­گردیم؟ می­خواهیم ببینیم در سرم فرد آنتی بادی ضد توکسو وجود دارد یا وجود ندارد. توکسو پلاسماها را آمدیم روی سطح قرار دادیم سرم بیمار را اضافه کردیم البته همه این­ها رقت دارد. یک دهم دارد، یک بیستم دارد. یک چهلم دارد. آنتی بادی دومی را هم اضافه کردیم. حالا آیا من این­جا می­توانیم بفهمم این آنتی بادی که به این توکسو پلاسماها وصل شده آی جی ام است یا آی جی جی است؟ اصلاً اهمیت دارد بفهمم آی جی ام است یا آی جی جی؟ با این ایمونو استینینگ می­توانم بفهمم آی جی ام است یا آی جی جی؟ با نوع آنتی بادی ثانویه می­روم دنبال آی جی ام­ها می­گردم می­گویم آنتی بادی ثانویه من آنتی هیومن آی جی ام می­خواهم. آنی هیومن آی جی جی به درد من نمی­خورد. چون خیلی­ها گربه دارند خانه­شان ممکن است آی جی جی داشته باشند. می­خواهیم. پس آنتی بادی ثانویه نمی­شود آنتی هیومن ایمونو گلبولین. چون همه چیز نمی­شود، آنتی هیومن آی جی جی باید آنتی هیومن آی جی ام پس من با انتخاب آنتی بادی ثانویه می­توانم آن را هم تشخیص بدهم. پس ایمونو استینینگ­ها می­توانند برای تشخیص چیزی در اسلاید به کار برود، می­تواند برای تشخیص آنتی بادی به کار برود. اتفاقاً در آزمایشگاه تشخیص طبی به استثنای این نوع کار پاتولوژی که دنبال چیزی توی خود بافت می­گردند اکثر ایمونو استینینگ­هایی که انجام می­شود برای آنتی بادی دیتکشن است و آنتی بادی هم دو گروه هستند. ضد عوامل عفونی و اوتو آنتی بادی­ها. معمولاً این­ها هستند که از آن­ها استفاده می­شود.

تمرین:

چند تا آنتی ژن می­خواهم بدهم پی 53، جی اف ای پی که حالا من احتمالاً آنتی بادی آن را بگیرم برایتان کلاس خواهم گذاشت. و کلیود اکتیوید کاسپاز. اکتیویتد یعنی کات شده. برای هر کدام از این­ها فایند، فور آنتی بادی، بعد می­خواهم یک جدول بکشید و فرض کنید نمونه­های انسانی را می­خواهیم رنگ آمیزی کنیم و آن اطلاعات ازش دربیاورید. اطلاعات 1، 2، 3، 4، 5 چی هست. اسپسشیز ری­اکتیویت چی هست؟ سورسش چی هست، کلونالیتی آن چیست؟ سدیم آزاید دارد یا ندارد؟ سورس اسپیشیز آن چیست و الی آخر. برای این­ها پیدا کنید که یک تمرینی کرده باشید می­­خواهم سایت شرکت­های دیگر abcam خیلی خوب است، خیلی قشنگ می­نویسد این­ها را ولی بعضی از شرکت­ها ممکن است به این خوبی نباشد. سل سیگنال هم خوب است. این­جا چطوری پیدا کنیم یا سانتاکروز چطوری می­نویسد.