

استفاده‌های عملی از ایمن فلوئورسانس

* - دکتر میر دامادی

بسال ۱۹۴۲ کومبس دریافت که افزایش رنگ فلوئورسان (تابنده) مانند ایزوسیانات یا ایزوتیوسیانات فلوئورسین به سرمی که دارای پادتن (آنتی کور یا آنتی بادی) باشد بی‌آنکه خاصیت اصلی و مهم پادسرم یعنی ربایش یافتن به آنتی ژن وابسته را تغییر دهد پروتئین‌های آن از جمله گلوبولین‌ها را رنگین و تابنده میکند و آنتی ژنی که بدینسان با پادتن رنگین فلوئورسان پوشیده شده باشد باسانی بکمک میکروسکوپ با استفاده از پرتو برتر از بنفش (اولتراویوله) دیده میشود.

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

برای رنگین ساختن پروتئین‌های سرم مواد مختلفی از جمله ایزوسیانات و ایزوتیوسیانات فلوئورسین که گلوبولین رنگین شده را به رنگ زرد مایل به سبز درمیآورد و یا رودامین که آنتی-ژن را بصورت سرخ نارنجی بر میکرداند بکار میبردند و بتازگی ایزوتیوسیانات تترامتیل باموفقیت بکار برده شد.

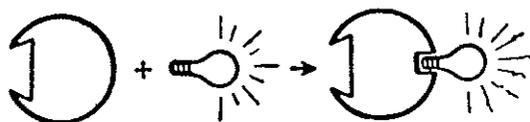
روش انجام آزمایش اینست که ماده رنگین فلوئورسان را بسرم و یا گلوبولین‌های آن می-افزایند و چنین سرم یا محلول گلوبولین دارای رنگ فلوئورسان را در مدت کافی (تقریباً ۳۰ دقیقه) در مجاورت آنتی ژن وابسته میگذارند تا بدان به پیوند - آنگاه بوسیله قرار دادن آمایش (پریارسین) در محلول که نمکی دارای pH برابر با ۷/۲ گلوبولین‌های نیبوسته به آنتی ژن را بر میکیرند سپس با میکروسکوپ که دارای دستگاہ پرتو بالای بنفش باشد آنرا می بینید و بدین ترتیب آنتی ژن (با کتری، ویروس، کویچه‌های سرخ، وسلولهای مختلف) به رنگ زرد مایل به سبز و تابنده به چشم میخورد.

* - استاد دانشکده پزشکی

روش یاد شده را مستقیم گویند زیرا بدنوسیله کلوبولین های پادتن که با ماده رنگین فلوئورسان پیوست شده است و دورا دور آنتی ژن را فرا گرفته است دیده میشود و برای جستجو و تعیین جایگاه ویروسها در کشت های بافتی مورد استفاده قرار میگیرد .

در روش های دیگری که می توان آنها را غیرمستقیم نامید بجای آنکه سرم دارای پادتن را با رنگ، فلوئورسان پیوست کنند پیشاپیش آنتی کلوبولین (برحسب نوع حیوان) مخصوص تهیه نموده و بدان ماده رنگین فلوئورسان پیوست میکنند سپس این آنتی کلوبولین پیوست شده به ماده فلوئورسان را به آنتی ژنی که قبلا در مجاورت سرم مشکوک قرار گرفته و فرضا کلوبولین های پادتن را بخود گرفته است می پیوندانند یعنی در حقیقت آنتی ژن اصلی را که بوسیله پوشیده شدن با کلوبولین های پادتن صورت آنتی ژن نوین دیگری بخود گرفته است و با کلوبولین های سرم پوشیده میجاور با آنتی کلوبولین آمیخته برنگ فلوئورسان درمی آورند که بدان به پیوند و آنرا نمایان سازد میتوان گفت که در حقیقت بدین ترتیب بطور غیرمستقیم وجود آنتی ژن اصلی مشخص میگردد .

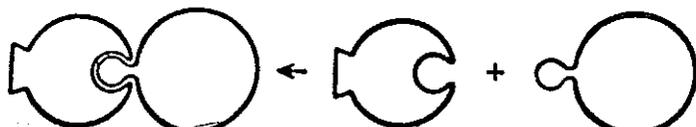
دیگراز تغییرات روش غیرمستقیم اینست که سرم مورد آزمایش را در مجاورت آنتی ژن وابسته قرار میدهند و در اینصورت سرم اگر دارای پادتن باشد گیرنده ها (رستپورها) آنتی ژن را را میپوشاند و بنا بر این اگر آنتی کلوبولین مخصوص و آمیخته با رنگ فلوئورسان بدان افزوده شد



سم آنتی کلوبولین
انسانی

ایزوتیو سیانات
فلوئورسین

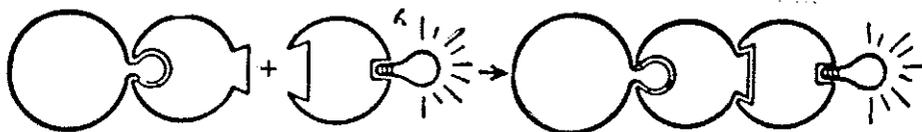
آنتی کلوبولین
فلوئورسان



آنتی ژن
تریونم سیفلیس

سرم
پادتن سیفلیس

ترکیب آنتی ژن
و پادتن



ترکیب آنتی ژن
و پادتن

سرم آنتی کلوبولین
فلوئورسان

ترکیب فلوئورسان
با پرتو بالای بنفش
و میکروسکپ دیده میشود

بر آن اثر نمی‌کند و آنتی‌ژن دیده نمی‌شود در صورتیکه برعکس اگر سرم پادتن نداشته و گیرنده - های آنتی‌ژن را فرانگرفته باشد کلوبولین‌های پادتن وابسته به آنتی‌ژن اصلی که دارای ماده رنگین فلوئورسان است به آنتی‌ژن پیوسته و آنرا نمایان می‌سازد .
روش غیرمستقیم دیگر اینست که در آن از پدیده ربایش کمپلمان استفاده میشود بدین ترتیب که نخست آنتی‌ژن مورد آزمایش را با سرم دارای پادتن وابسته مجاور می‌سازند سپس سرم خو کچه‌هندی که دارای کمپلمان باشد بدان می‌افزایند آنگاه آنتی کلوبولین ضد خو کچه هندی آمیخته به رنگ فلوئورسان را به مجموع می‌افزایند و در این صورت هر گاه چیز مورد آزمایش آنتی‌ژن مورد نظر باشد و بر اثر پادسرم وابسته حساسیت پیدا کرده باشد کمپلمان سرم خو کچه هندی بدان پیوسته و در اینصورت آنتی کلوبولین خو کچه هندی که آمیخته به ماده رنگین فلوئورسان است دورا در مجموع را گرفته و در نتیجه آنتی‌ژن نمایان میگردد .

در اینجا باید یادآوری کرد که آزمایش ایمن فلوئورسان معمولا روی تیغه‌های شیشه‌ای (لام یا اسلاید) بانجام میرسد بدین ترتیب که دو قطره از ماده آنتی‌ژنی را بشکل دو دایره کوچک در دو سمت تیغه شیشه‌ای گسترده و پس از خشک شدن آنها را بوسیله الکل یا استن پایدار می‌سازند آنگاه محلول سرم دارای پادتن را روی قطره خشک شده میریزند و همچنان می‌گذارند که در حدود نیم ساعت بماند پس آنرا بدور ریخته آزمایش را در محلول دارای PH برابر با ۷/۲ می‌گذارند . تا فزونی پروتئین های تپیوسته از میان برود آنگاه محلولی از آنتی کلوبولین پیوست شده به ماده رنگین فلوئورسان را روی لکه‌های آنتی ژنی ریخته و دوباره مدتی در حدود نیم ساعت می‌گذارند بماند پس آنرا در محلولی که دارای PH برابر با ۷/۲ باشد بمدت کافی شستشوداده با میکروسکوپ و بکمک پرتو برتر از بنفش می‌بینند .

در اینجا بی‌مناسبت نیست روش تهیه سرم آنتی کلوبولین که در حقیقت ماده عامله و معرف اصلی است یادداشت گردد:

کلوبولین‌های انسان و یا نوع معین حیوانات را به روش‌های معمولی (ترسیب بوسیله املاح خنثی و یا . . .) جدا نموده محلول پاك و بی‌آلایشی از آن آماده ساخته آنرا به خرگوش و یا بهتر از آن بزغاله چند روز در میان هر بار به میزان بیشتری سوزن می‌زنند و همینکه مقدار پادتن سرم حیوان به بالاترین اندازه رسید سرم آنرا گرفته کلوبولین‌های آنرا جدا ساخته بحالت لیوفیل و یا محلول نگاهداری میکنند و هنگام نیازمندی به هر يك سانتیمتر مکعب از محلول کلوبولین در حدود يك میلی گرم ماده رنگی فلوئورسان می‌افزایند و چند ساعتی آنرا در سردی یخچال می‌گذارند سپس فزونی رنگ را بکمک دیالیز بر میگیرند . نا گفته نماند که گاه برای آنکه در همان حال دو میکروب و یا دو آنتی‌ژن موجود در يك ماده مرضی را بررسی کنند دو رنگ فلوئورسان مثلاً یکی

ایزوتیوسیانات و دیگری رودامین به محلول آنتی کلوبولین پیوست میکنند و در این صورت با کتریها برنگ‌های مختلف زرد مایل به سبز سرخ نارنجی درمی‌آیند.

موارد استفاده از ایمن فلوئورسانس :

- ۱- تشخیص جایگاه و پرده‌ها در درون سلولها چه در کشت و پرورش و چه در بدن .
 - ۲- تشخیص جایگاه پیدایش یادتن‌ها در سلولهای لنفویلاسموسید .
 - ۳- تشخیص وجود میکروبهای مختلف مخصوصاً نیسر ها و موفیلوسها و آنتروباکتری باسه‌ها
 - ۴- تشخیص سیفیلیس بوسیله استفاده از تریونم مخصوص آن (تریونما پالیدا ویا تریونما ریتر)
- عوامل غیر اختصاصی مؤثر بر ایمن فلوئورسان .
- هر چند برخی از ذرات ممکن است بخودی خود تابندگی داشته و بصورت فلوئورسان در زیر میکروسکوپ جلوه‌گر شوند اما خوشبختانه حالت فلوئورسانس خود بخودی این ذرات چندان در کار اهمیت ندارد بلکه آنچه بیشتر اسباب زحمت است و در آزمایش تأثیر میکند ربایش غیر اختصاصی پروتئین‌هایی است که با رنگ فلوئورسان تفکیک شده اند و احیاناً بر پروتئین‌های غیر آنتی ژنی می‌چسبند اما این دشواری نیز بوسیله ربایش (آبوسوربسیون) بر کردهای اندام از میان میرود.
- برخی از کارشناسان پیشنهاد نمودند که برای جلوگیری از اینگونه بیش آمدهای غیر اختصاصی بهتر است که در آغاز آزمایش را با گلوبولهای طبیعی پیوست شده با رودامین مجاور سازند آنکاه یاد سرم اختصاصی را با رنگ فلورسان زرد مایل به سبز یعنی فلوئوسئین تابنده سازند تا بدین - ترتیب ذرات غیر اختصاصی برنگ سرخ نارنجی و آنتی ژن بصورت زرد مایل بسبز جلوه‌گر شود .

Bibliographie :

- 1 - Thivolet (J.), Gropsiron (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- Daguët (G. L.) et Pillot (J.). Ann. Just. Pasteur, 1962, 102, 364.