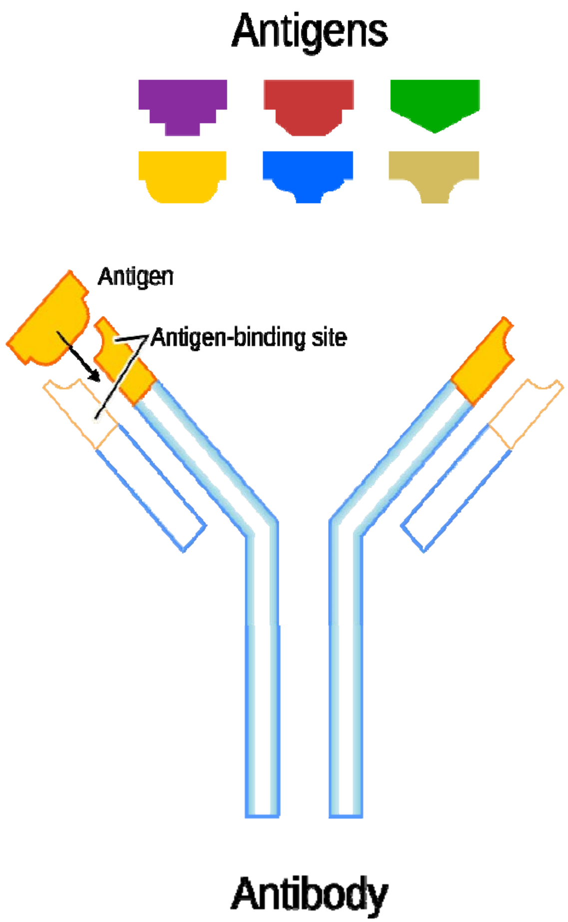
تکنیک های ایمنواسی

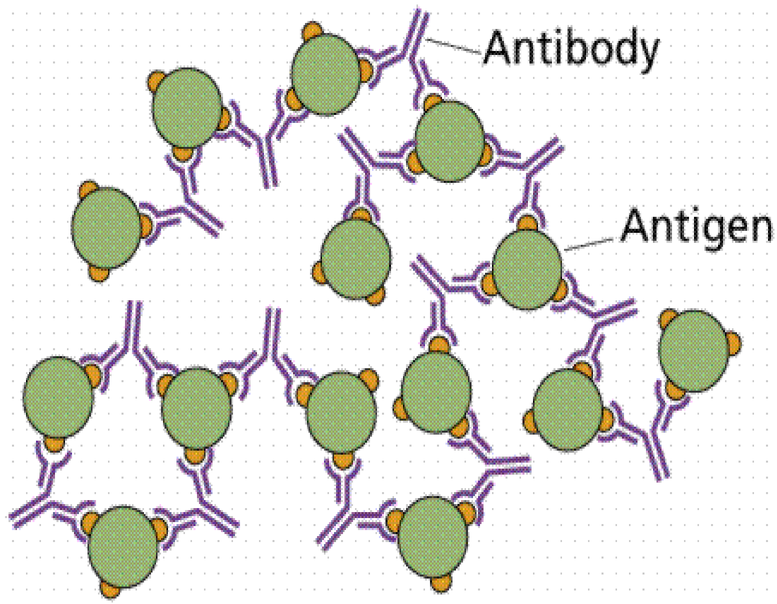
سامان تجهیز نور

ارائه دهنده:
محمد سجاد امامی آل آقا

اردیبهشت ۱۳۹۵

اساس ایمنو اسی





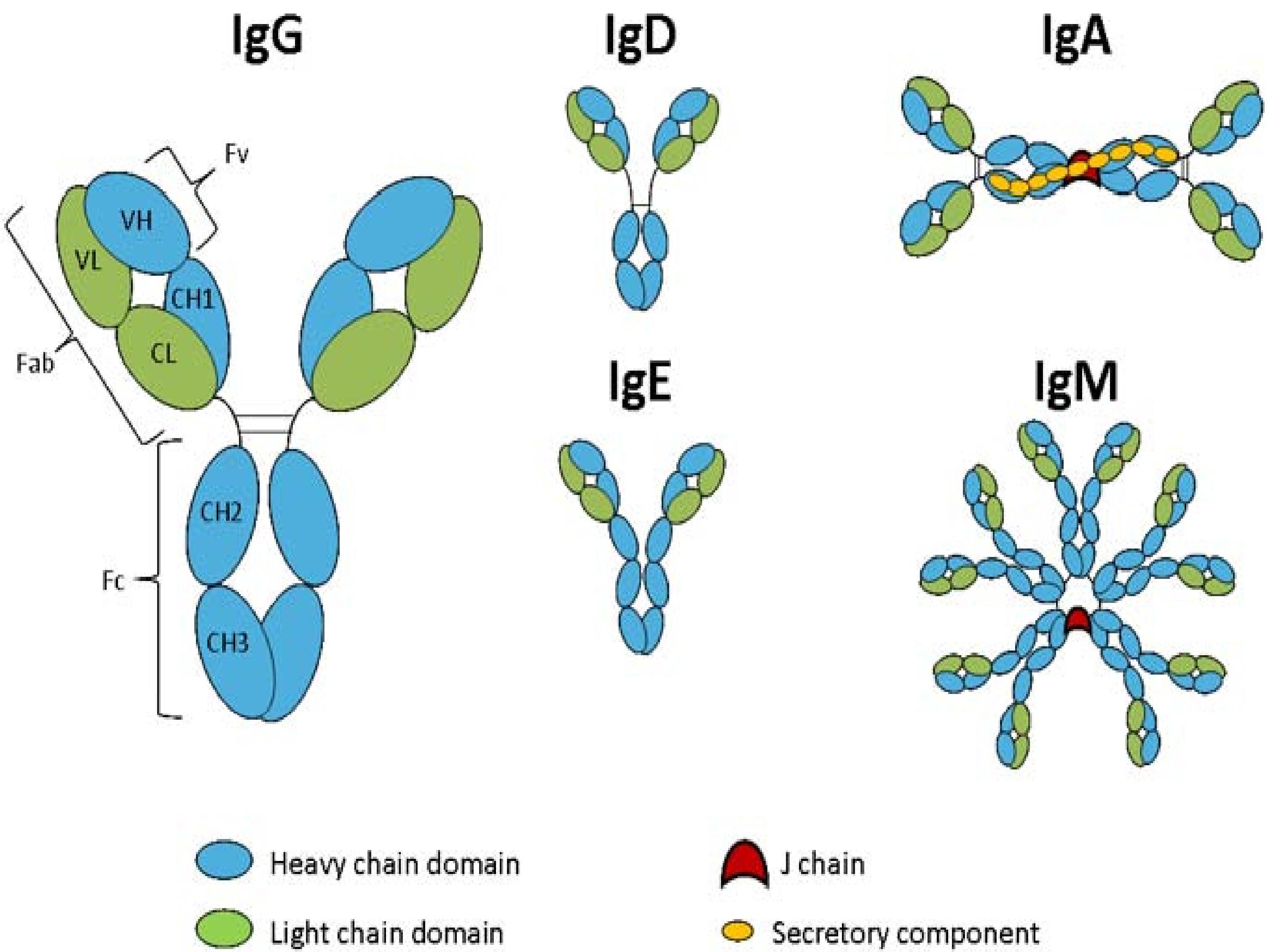
مفاهیم پایه-آنتی بادی ها

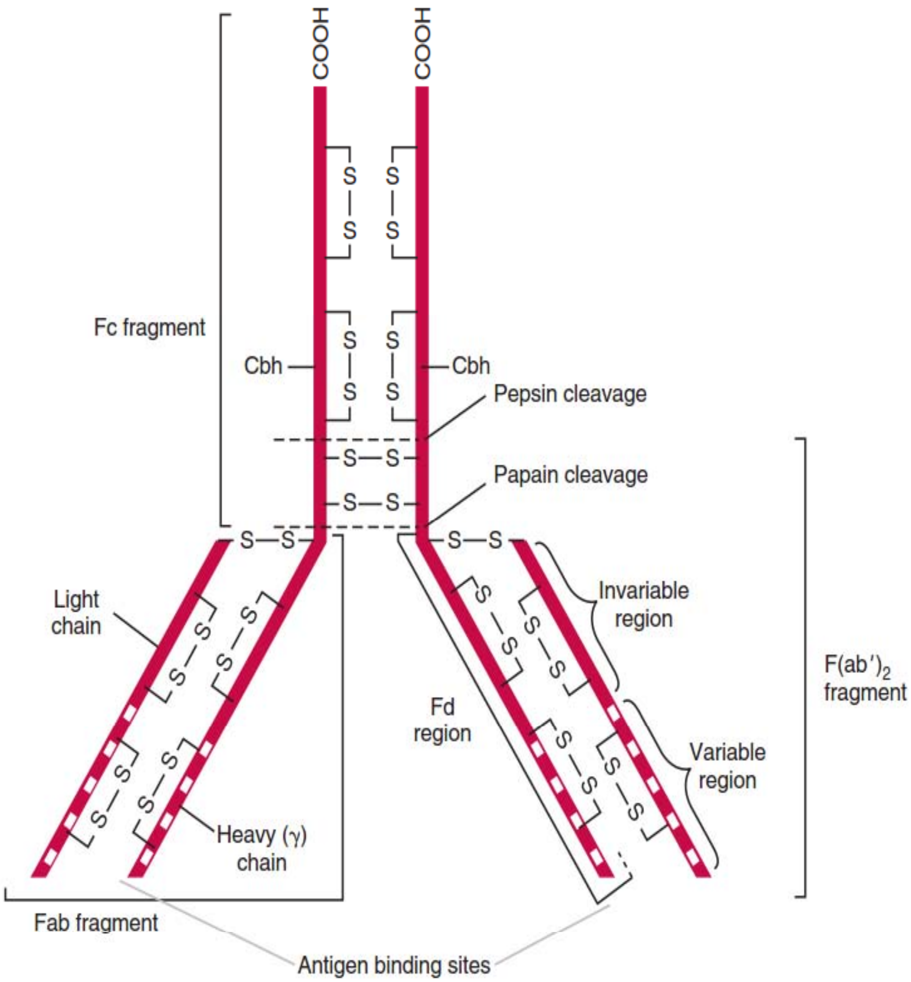
- آنتی بادی:

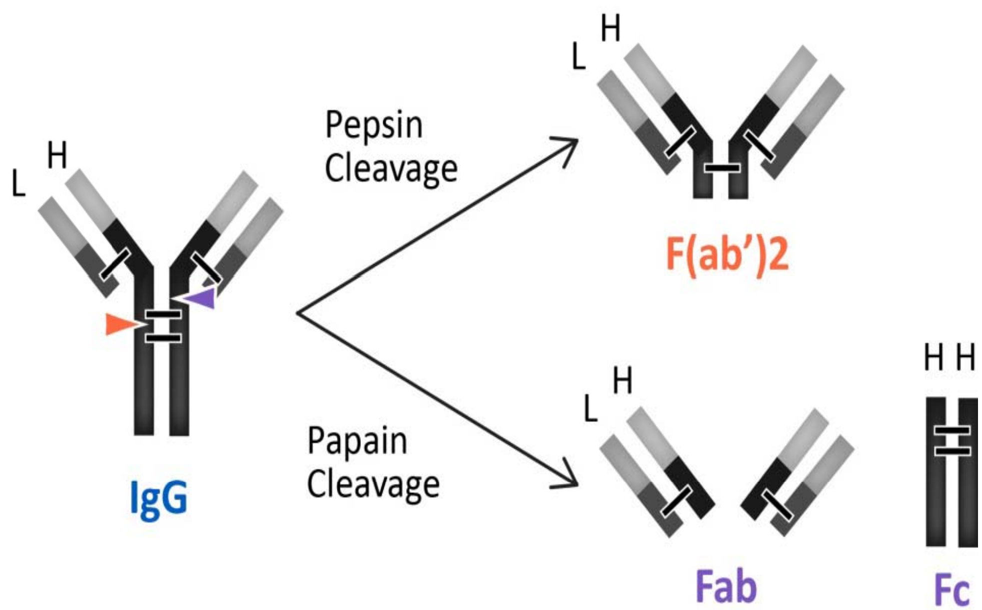
✓ ایمنوگلوبولین هایی هستند که به صورت اختصاصی به دامنه وسیعی از آنتی ژن های طبیعی و صناعی شامل پروتئین ها، کربوهیدرات ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک و سایر مولکول ها متصل می شوند.

✓ یک انسان بالغ طبیعی با وزن ۷۰ کیلوگرم، روزانه در حدود ۲ تا ۳ گرم آنتی بادی تولید می کند.

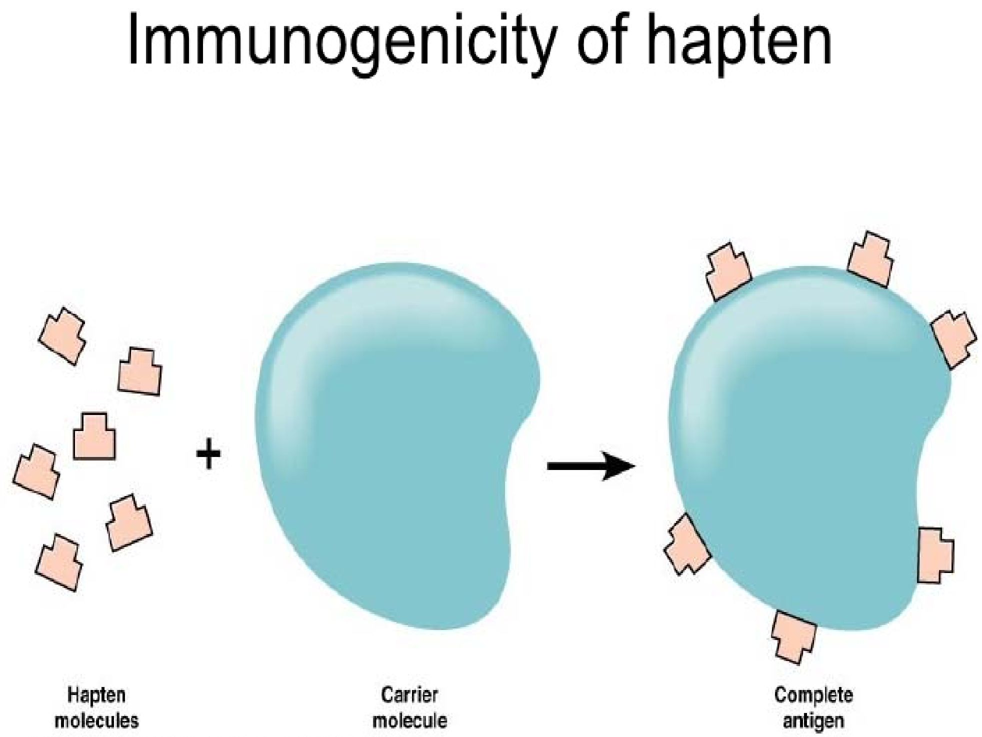
✓ شامل ۵ دسته IgA ، IgD، IgM ، IgE و IgG می باشد. نوع IgG کاربرد بیشتری در روش های مبتنی بر ایمنوشیمی دارد.


IgG
IgD
IgA
IgE
IgM
Fv
VH
VL
CH1
CL
Fab
CH2
Fc
CH3
Heavy chain domain
Light chain domain
J chain
Secretory component

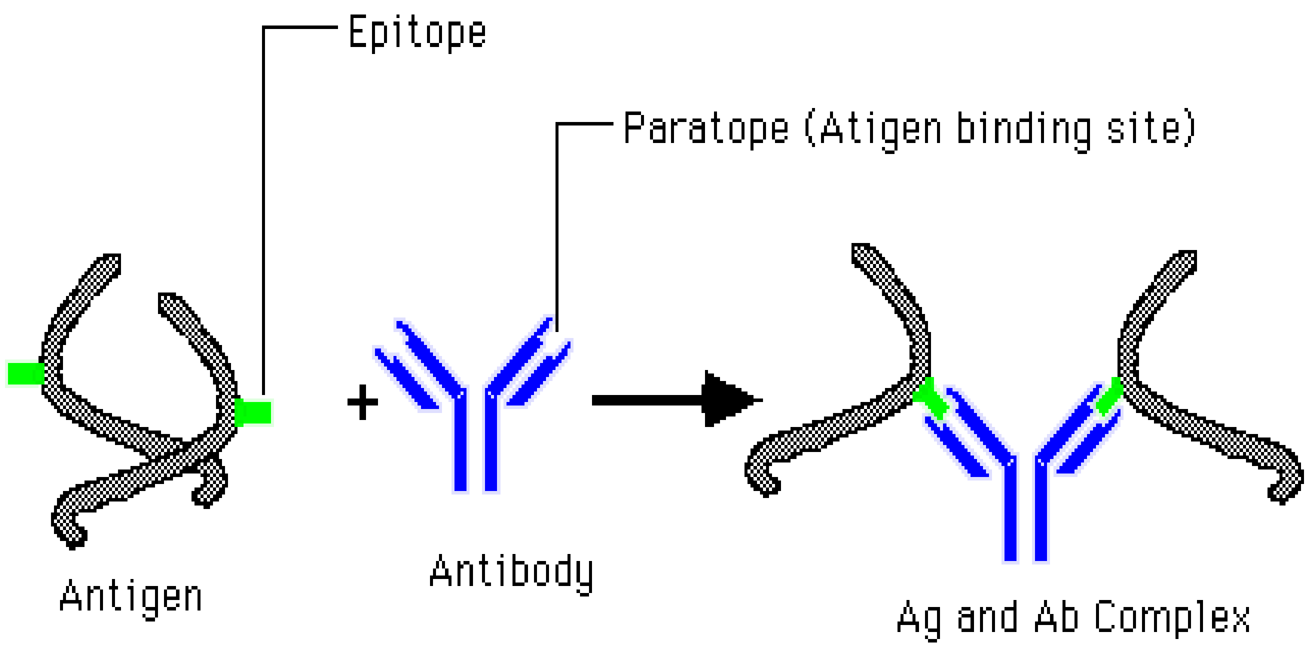

COOH
COOH
Fc fragment
Cbh
Cbh
Pepsin cleavage
Papain cleavage
Light chain
Invariable region
Fd region
F(ab')$_2$ fragment
Variable region
Heavy (γ) chain
Fab fragment
Antigen binding sites


L
H
IgG
Pepsin Cleavage
Papain Cleavage
L
H
F(ab')2
L
H
Fab
H H
Fc

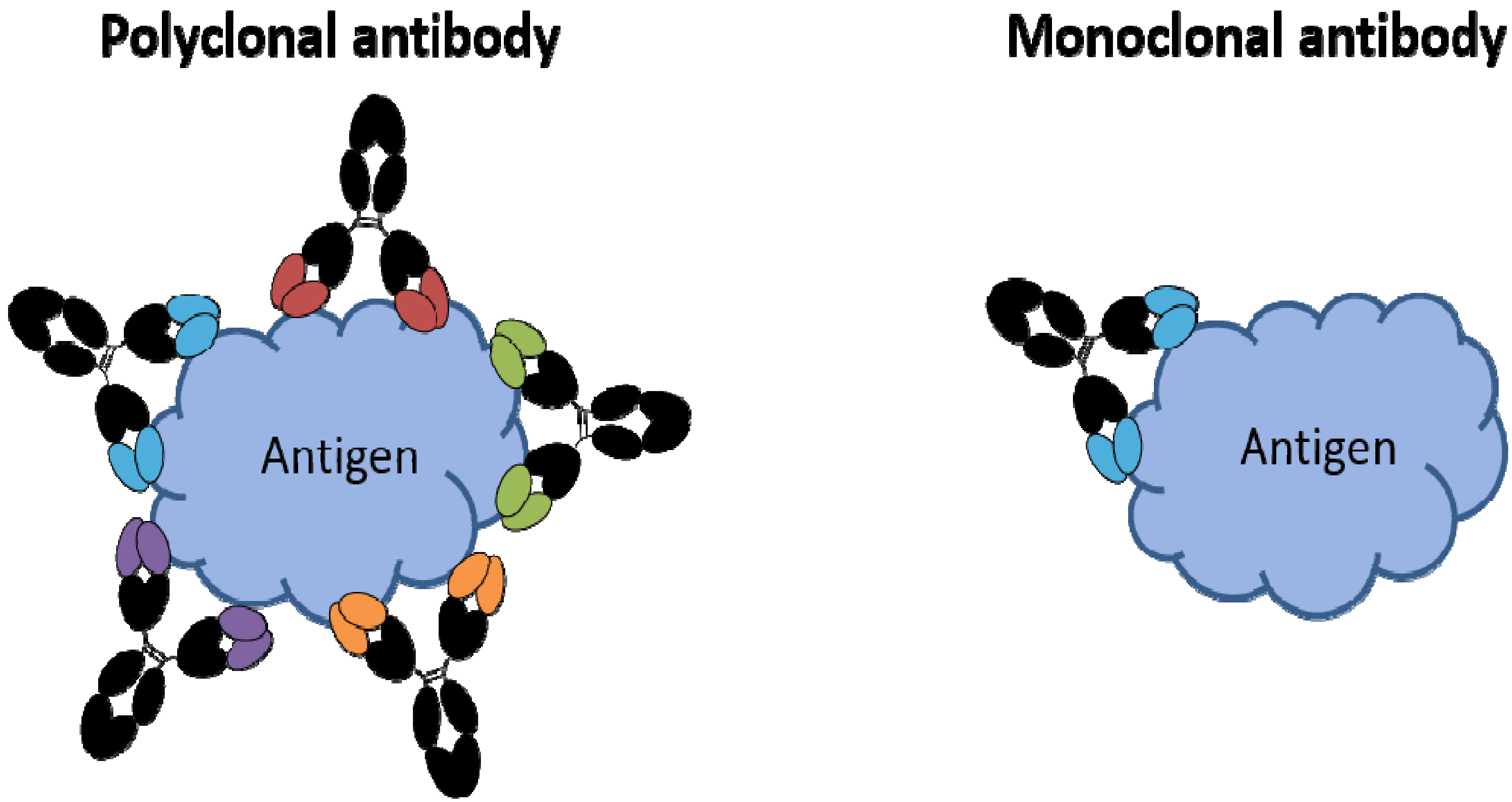
مفاهیم پایه- آنتی ژن، ایمنوژن و هاپتن



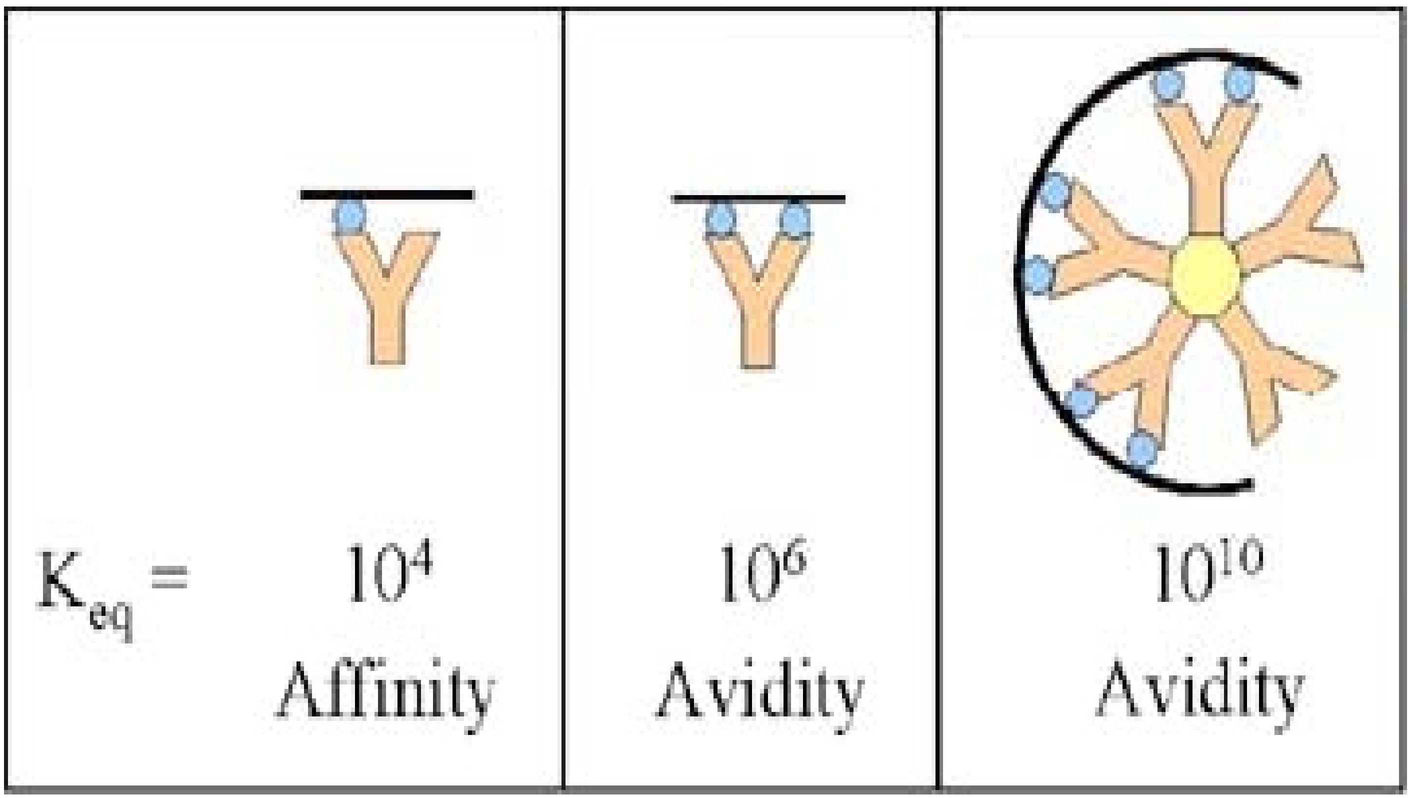
مفاهیم پایه-اپی توپ و پاراتوپ



مفاهیم پایه-آنتی بادی مونوکلونال و پلی کلونال

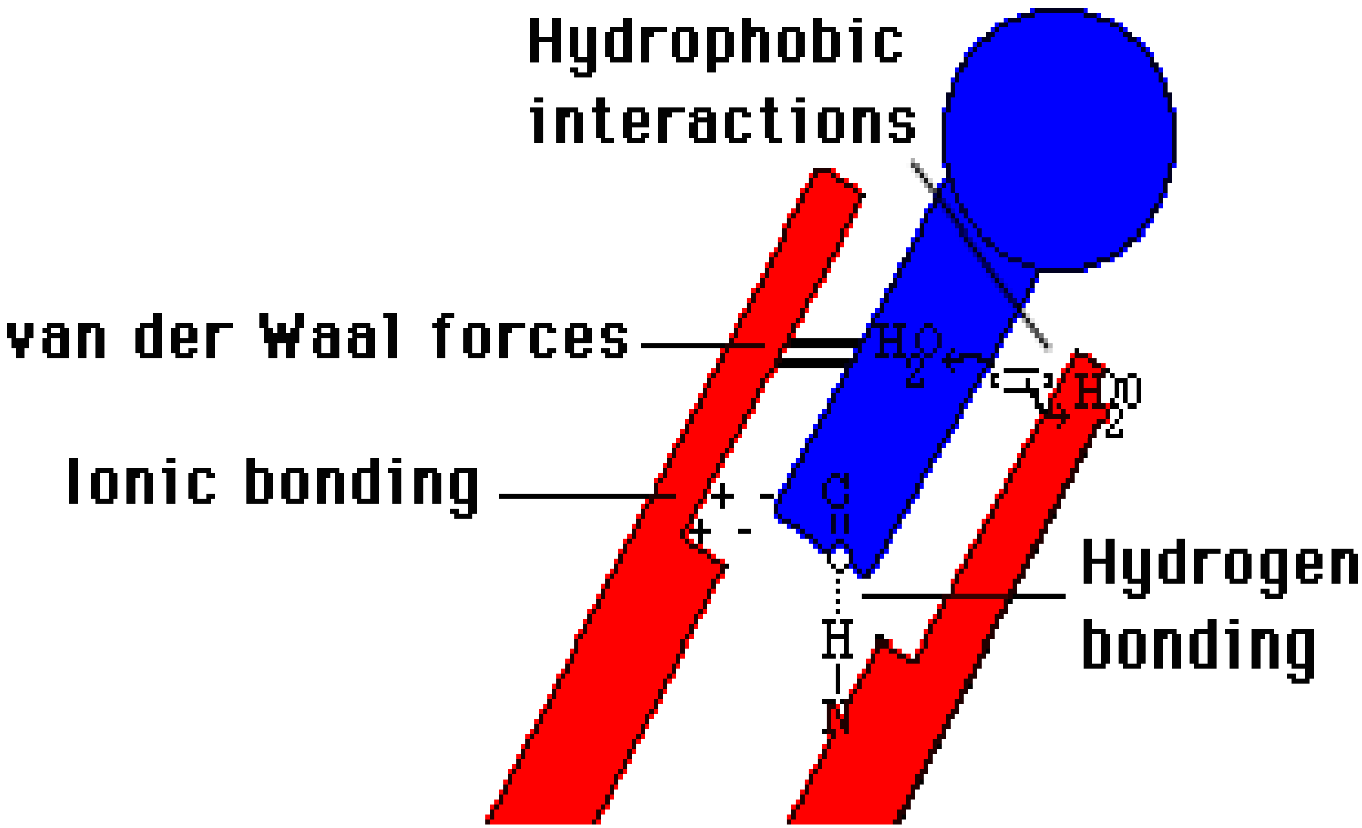


مفاهیم پایه-افینیتی و اویدیتی



اتصال آنتی بادی-آنتی ژن

- اتصال آنتی بادی با آنتی ژن تحت تاثیر نیروهای متفاوتی است که با همکاری همدیگر سبب پایداری اتصال خواهند



مکانیسم واکنش آنتی بادی با آنتی ژن

$$Ag_n + Ab \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} Ag_nAb \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} Ag_aAb_b$$

- ❑ اتصال آنتی بادی به آنتی ژن تحت تاثیر قدرت یونی، نوع یون ها و حضور پلی مرها (مثلPEG 6000) می تواند باشد.

- ❑ تغییرات دما در بازه ۲۵ تا ۳۵ درجه سانتی گراد و و تغییرات pH در بازه ۶ تا ۸ اثرات ناچیزی بر واکنش آنتی بادی با آنتی ژن دارند.

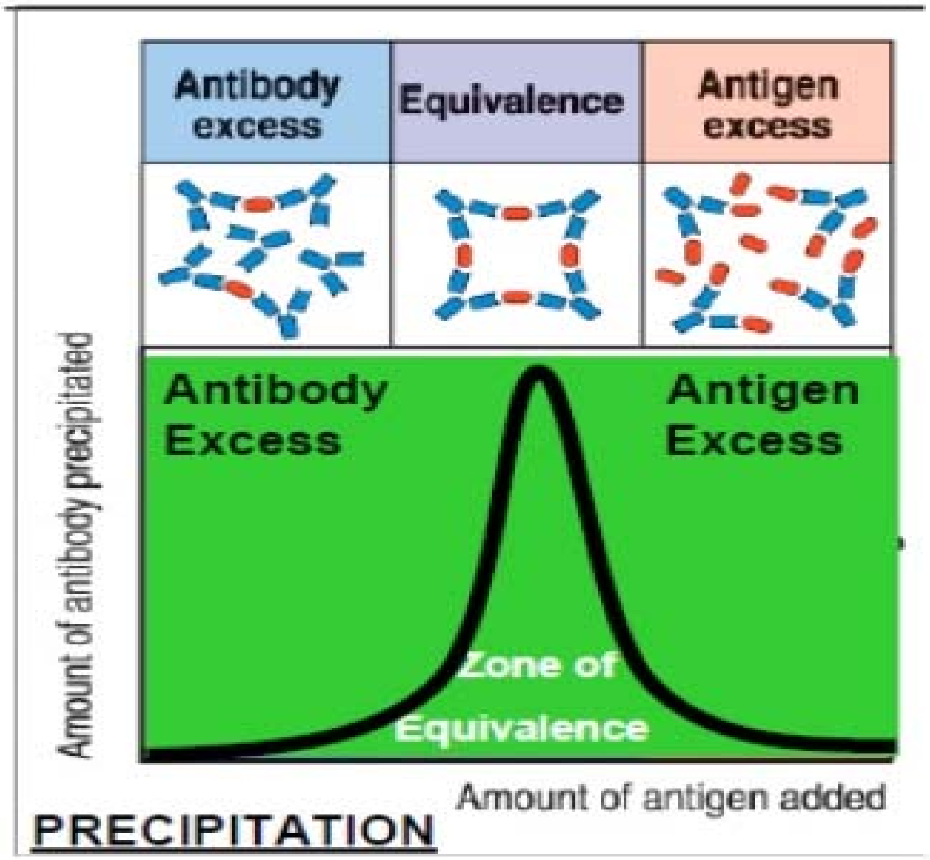
انواع واکنش های آنتی ژن-آنتی بادی

۱. واکنش های رسوبی (Precipitin reactions)

۲. واکنش های بر سطح فاز جامد (Solid phase)

واکنش های رسوبی (Precipitin Reactions)

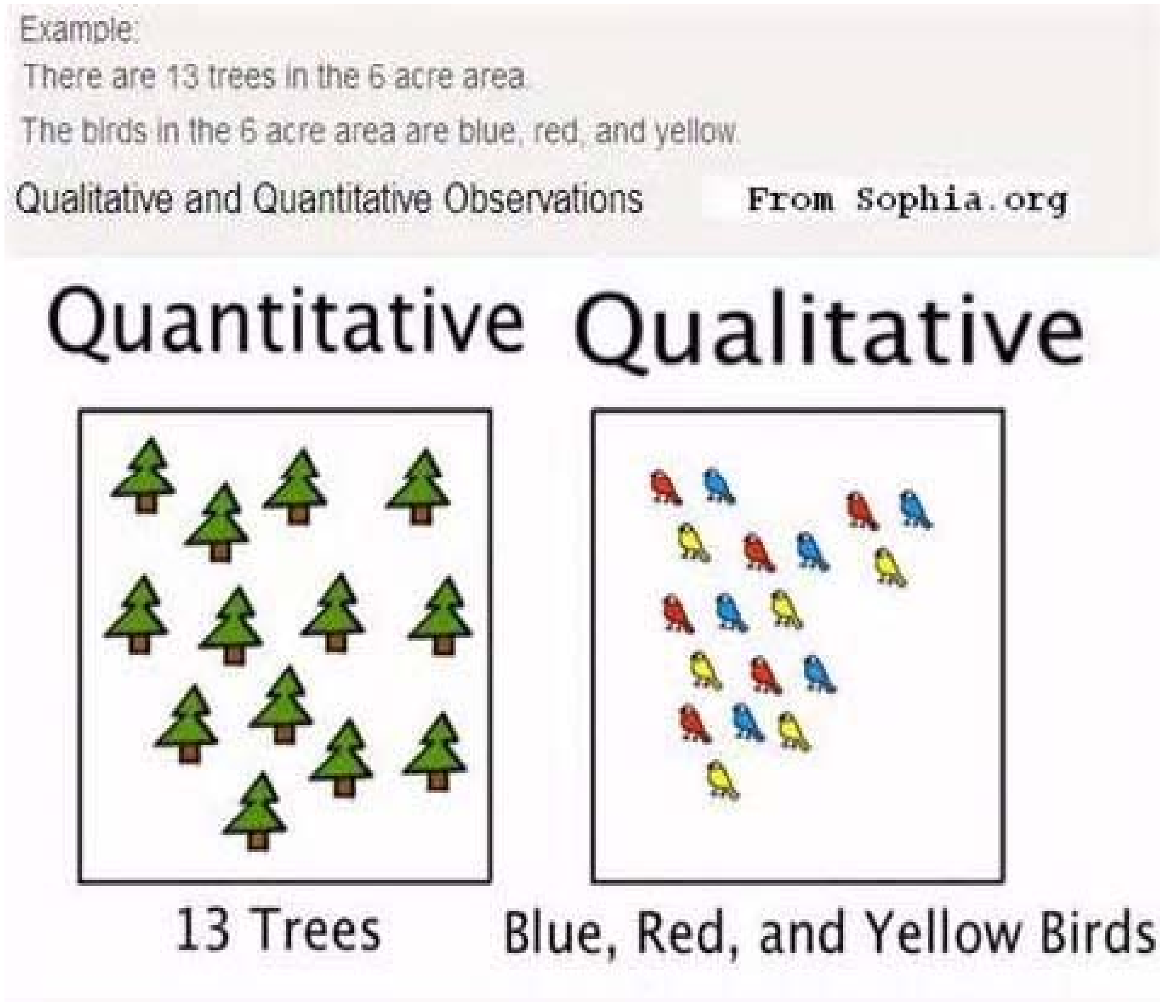
Precipitation Curve



- Zone of Equivalence
  optimum precipitation
- Prozone
  excess antibody is present
- Postzone
  excess antigen is present

Prozone and Postzone phenomena are negative reactions.

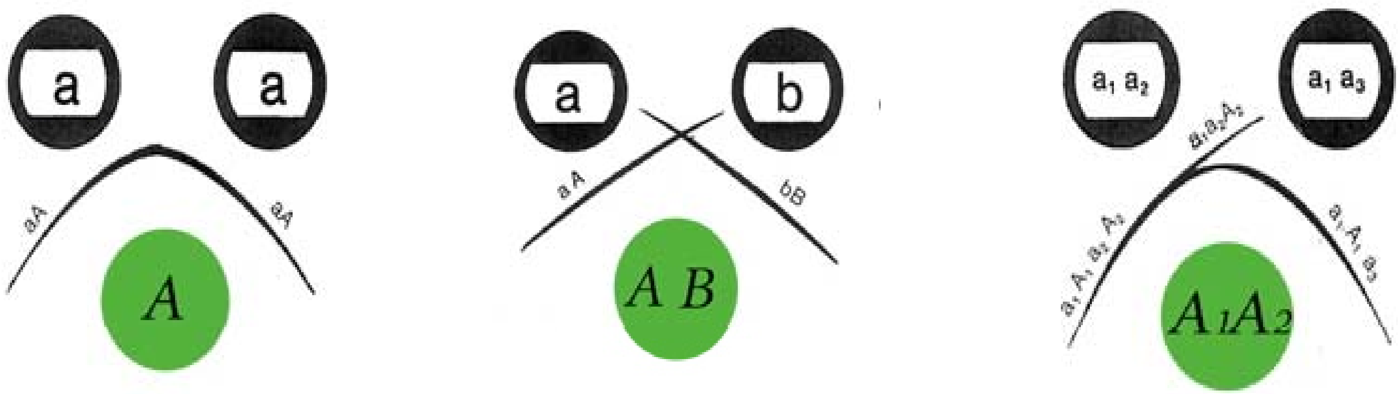
انواع روش های ایمنواسی



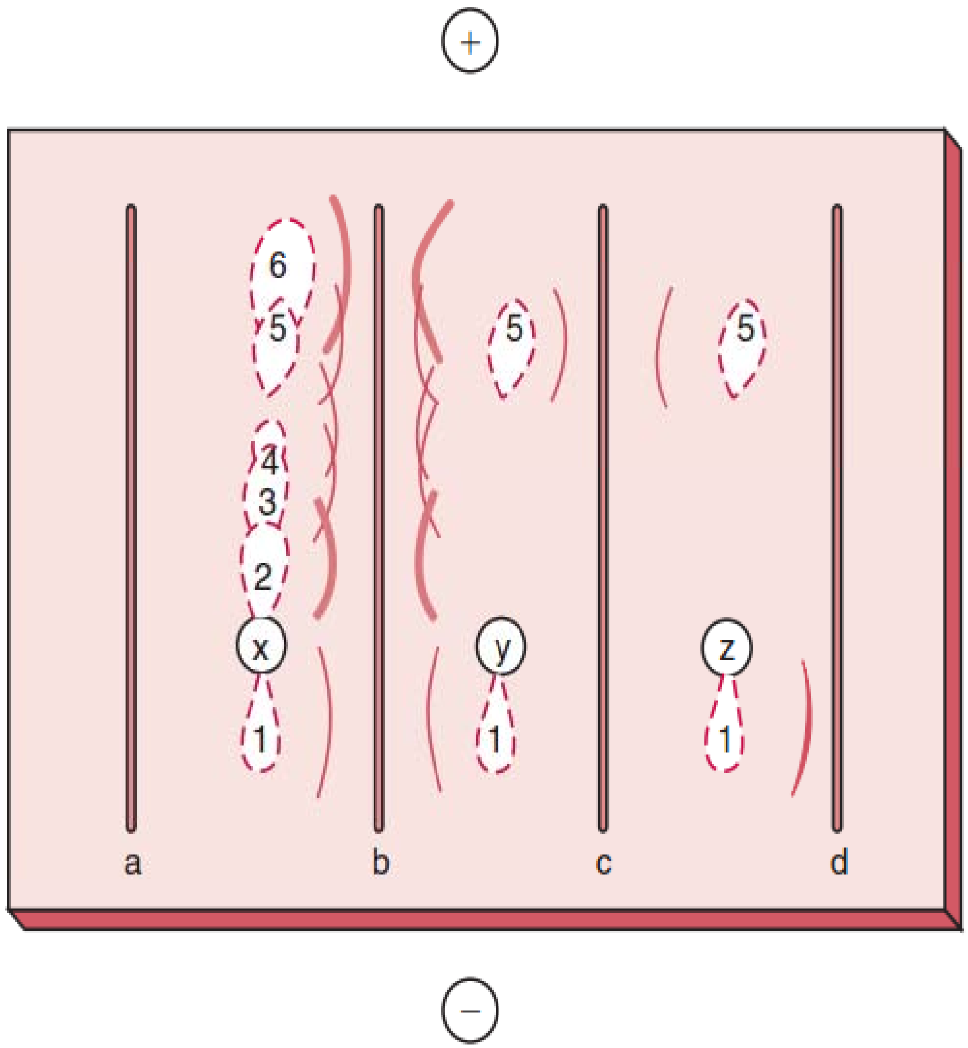

QUALITATIVE

روش های کیفی– Double Immunodiffusion

- این روش به نام روش Ouchterlony نیز شناخته می شو



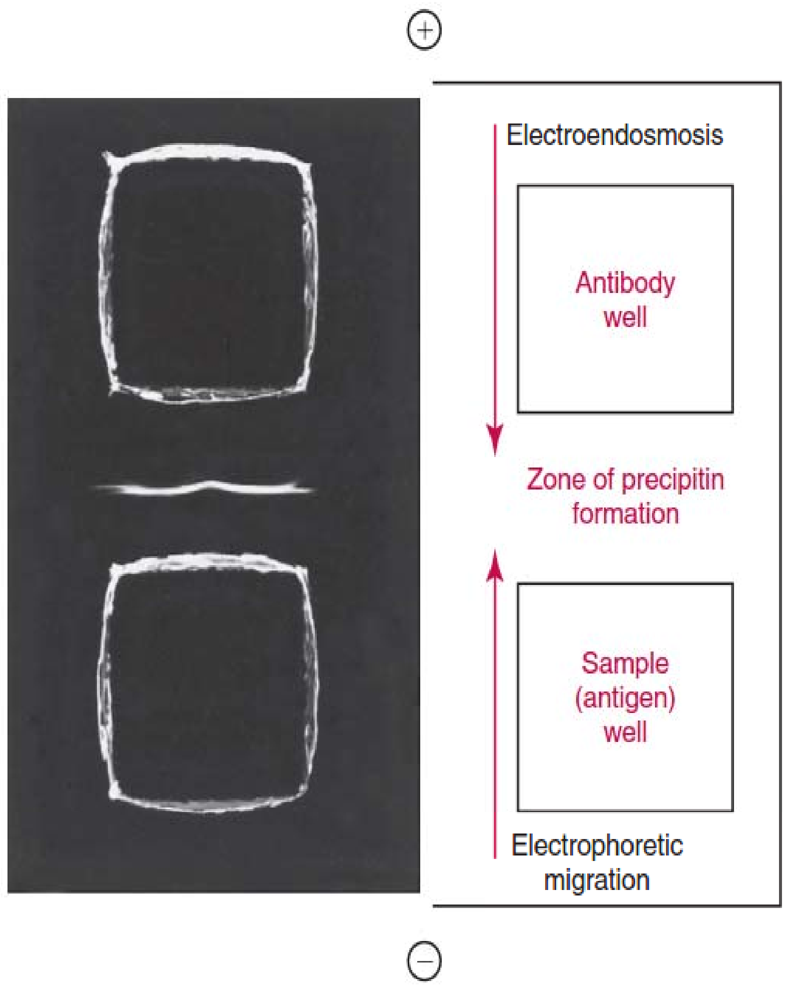
Immunoelectrophoresis (IEP)–روش های کیفی



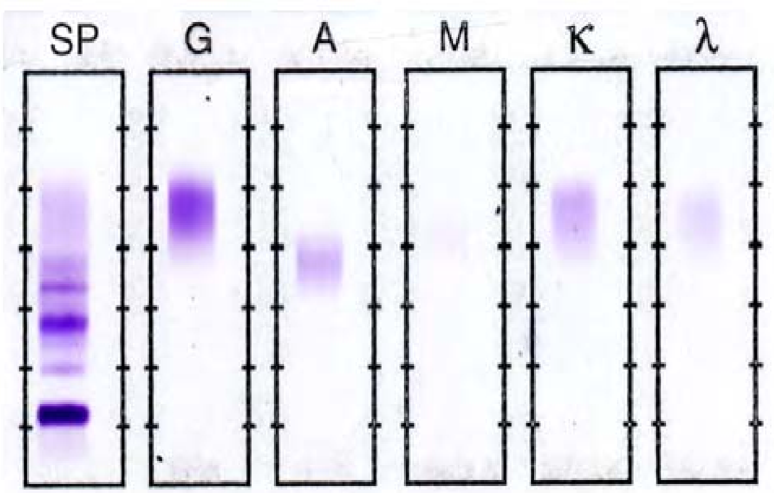
روش های کیفی- Immunoelectrophoresis (CRIE)-Crossed

- در واقع ایمنوالکتروفورز دو بعدی می باشد.
- در بعد اول مشابه روش ایمنوالکتروفورز، آنتی ژن ها در ژل آگارز قرار داده و تفکیک می شوند.
- در بعد دوم آنتی ژن های تفکیک شده در ژل حاوی آنتی بادی اختصاصی، الکتروفورز می شوند.
- این روش به مراتب از روش ایمنوالکتروفورز حساسیت بالاتری دارد.

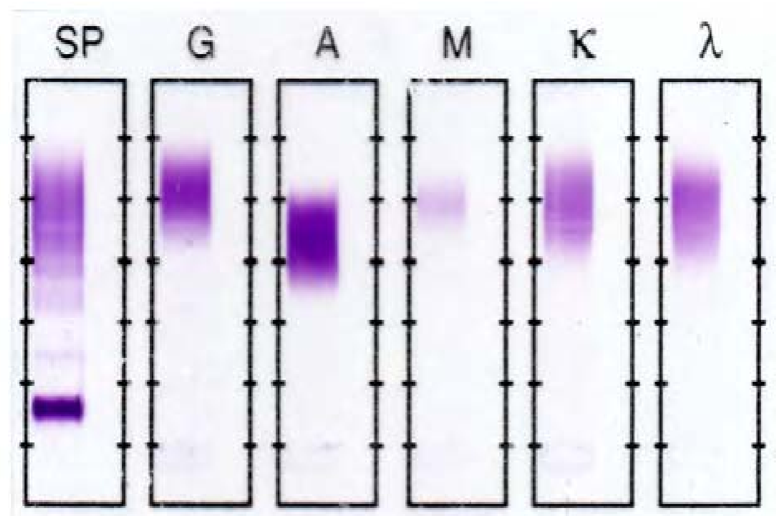
Immunoelectrophoresis (CIE)–روش های کیفی Counter



Immunofixation (IF)–روش های کیفی

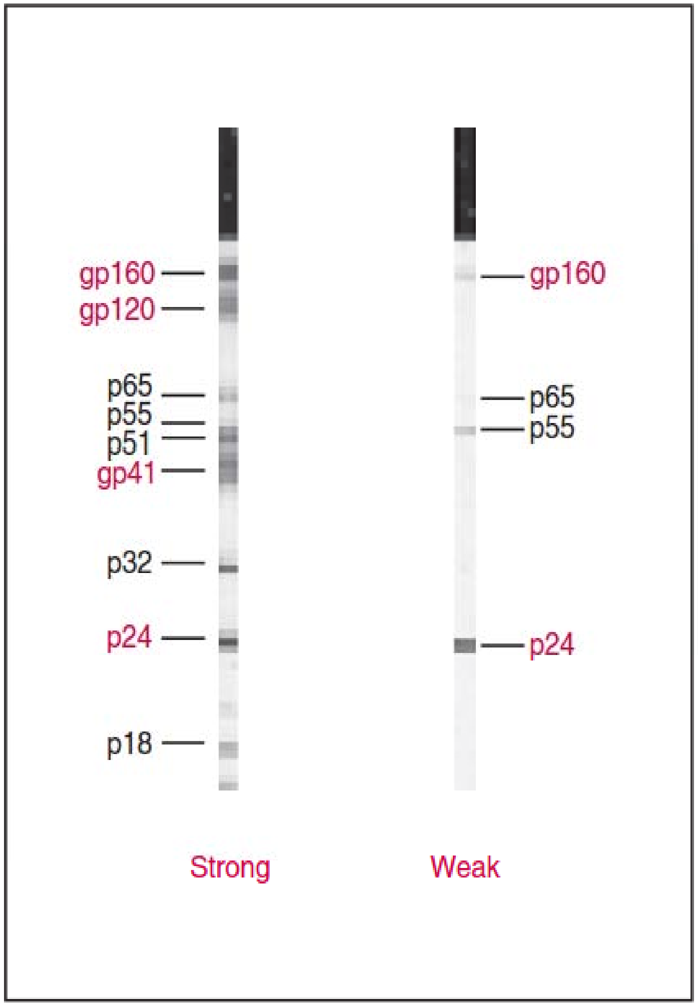


Normal Pattern

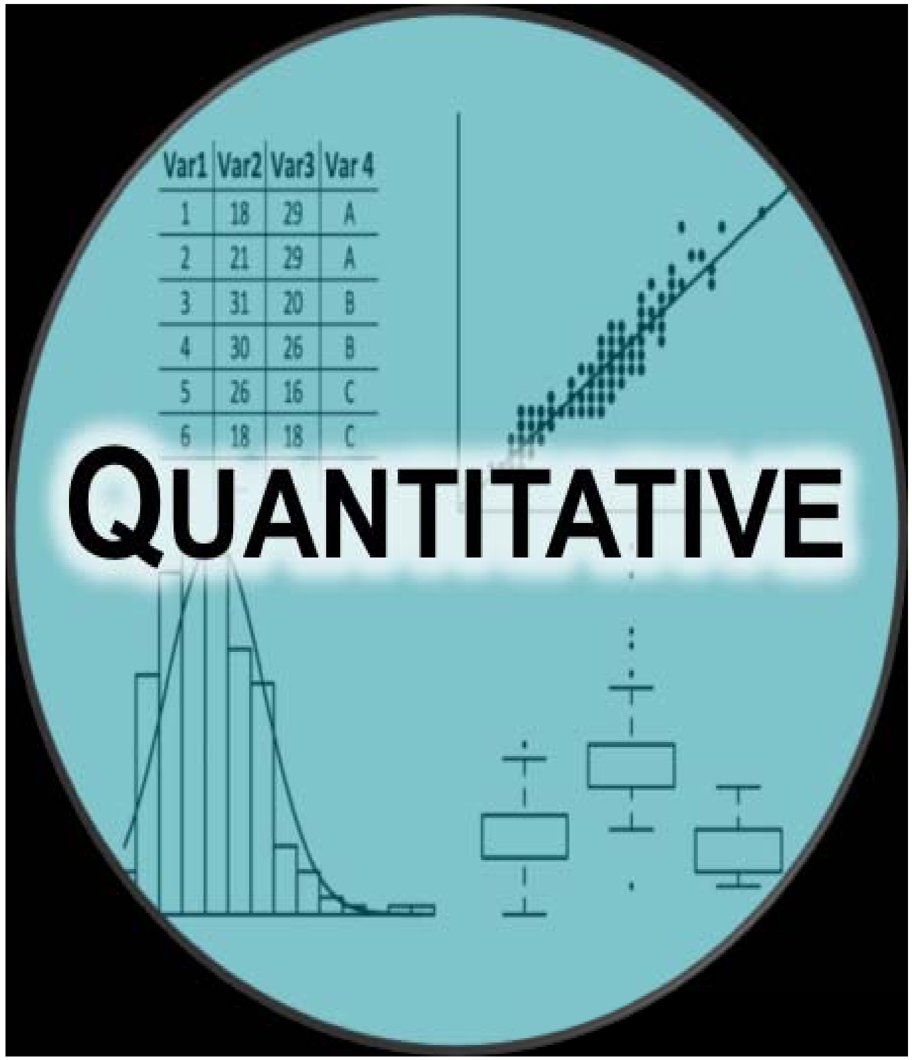


Polyclonal Increase

Western Blotting-روش های کیفی



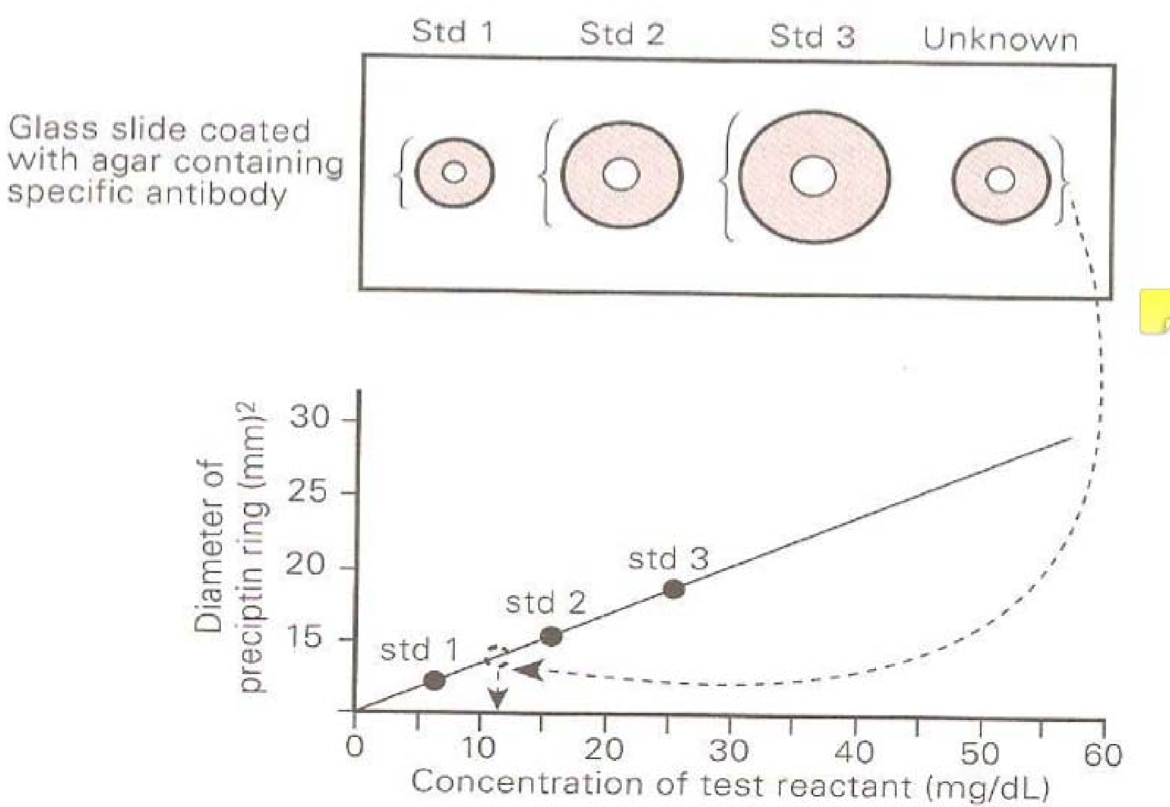
Dot Blotting-روش های کیفی



Var1
Var2
Var3
Var 4
1
18
29
A
2
21
29
A
3
31
20
B
4
30
26
B
5
26
16
C
6
18
18
C
QUANTITATIVE

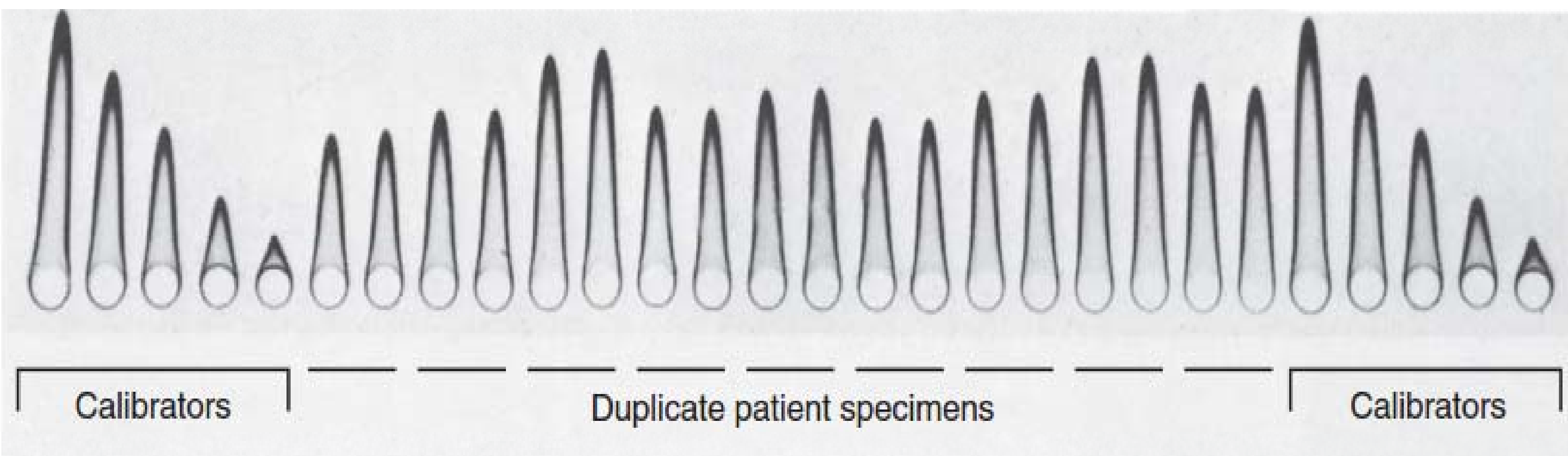
Radial Immunodifuusion (RID)-روش های کمی

- این روش را به نام روش **Mancini** نیز می شناسند.



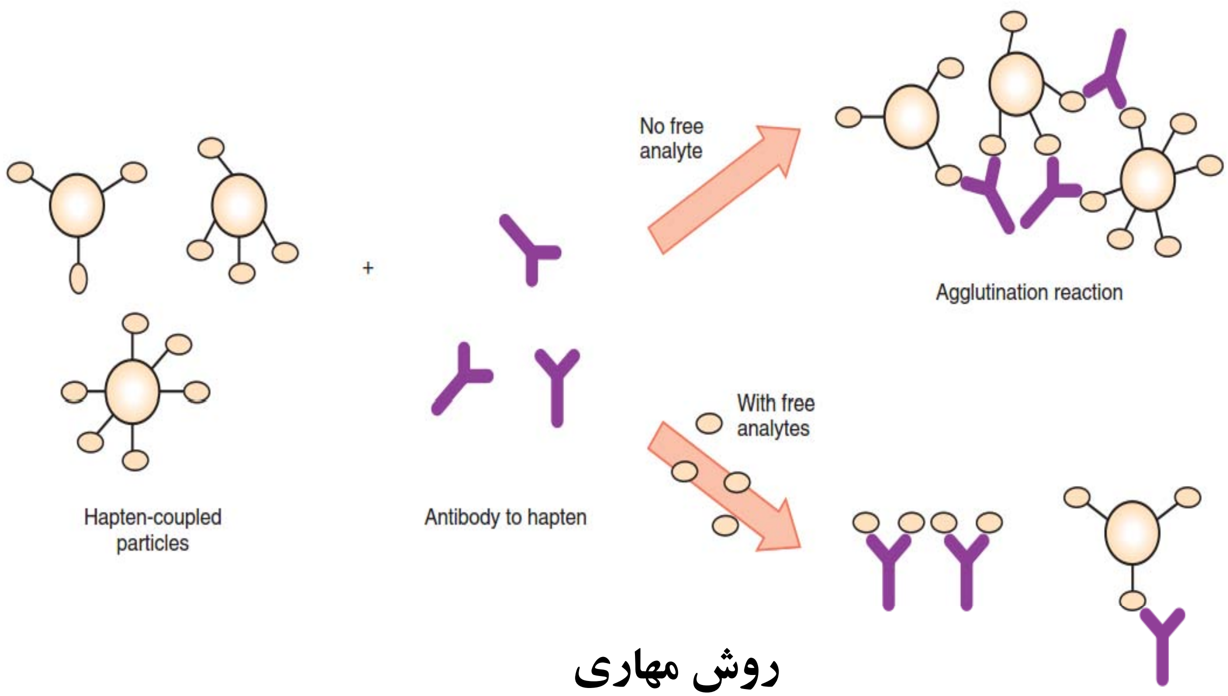
روش های کمی-Electroimmunoassay

- این روش را به نام روش Rocket نیز می شناسند و مشابه RID می باشد با این تفاوت که از ولتاژ جهت تسریع فرآیند استفاده می شود.



روش های کمی-توربیدیمتری و نفلومتری

- در شناسایی داروها از این روش ها استفاده می شود. به عنوان مثال می توان به تکنیک های مهاری (Inhibition techniques) اشاره کرد.



روش مهاری

روش های کمی-ایمنواسی نشاندار (Labeled (immunoassay

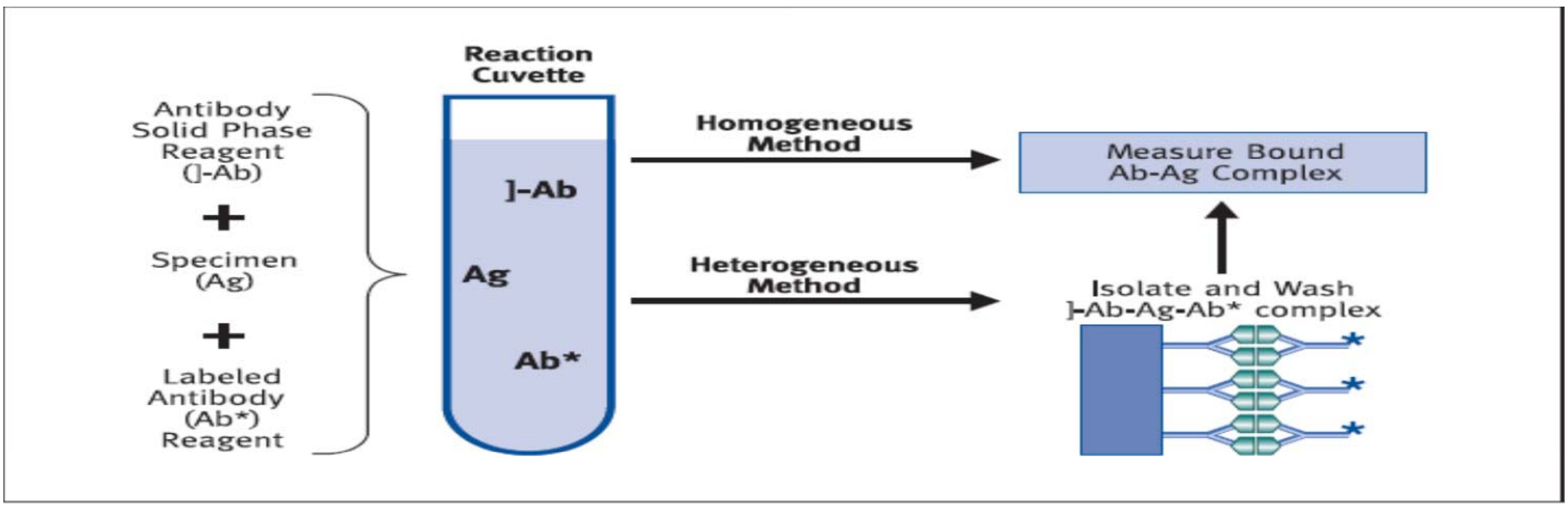
Label	Detection Limit in Zeptomoles* (10^{-21} moles)	Method
Alkaline phosphatase	50,000	Photometry
	300	Time-resolved fluorescence
	100	Fluorescence
	10	Enzyme cascade
	1	Chemiluminescence
β-D-Galactosidase	5000	Chemiluminescence
	1000	Fluorescence
Europium chelate	10,000	Time-resolved fluorescence
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	1000	Chemiluminescence
Horseradish peroxidase	2,000,000	Photometry
	1	Chemiluminescence
^{125}I	1000	Scintillation
Ruthenium (II) tris(bipyridyl)	20†	Electrochemiluminescence

*One zeptomole = 10^{-3} attomoles or 10^{-6} femtomoles.
†Personal communication.

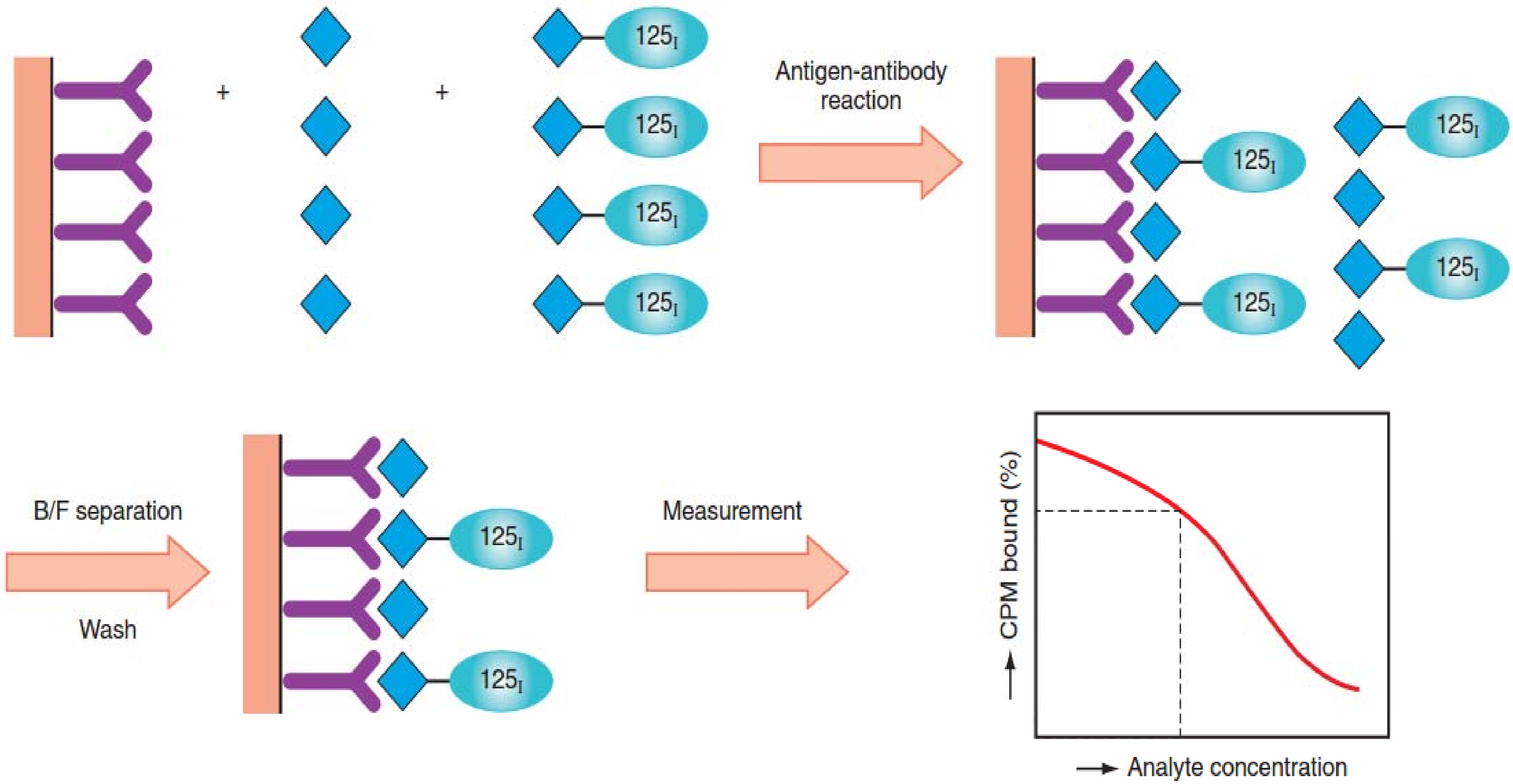
روش های کمی-انواع ایمنواسی نشاندار
(Labeled Immunoassay)

روش های کمی- ایمنواسی نشاندار
واکنش های هموژن و هتروژن

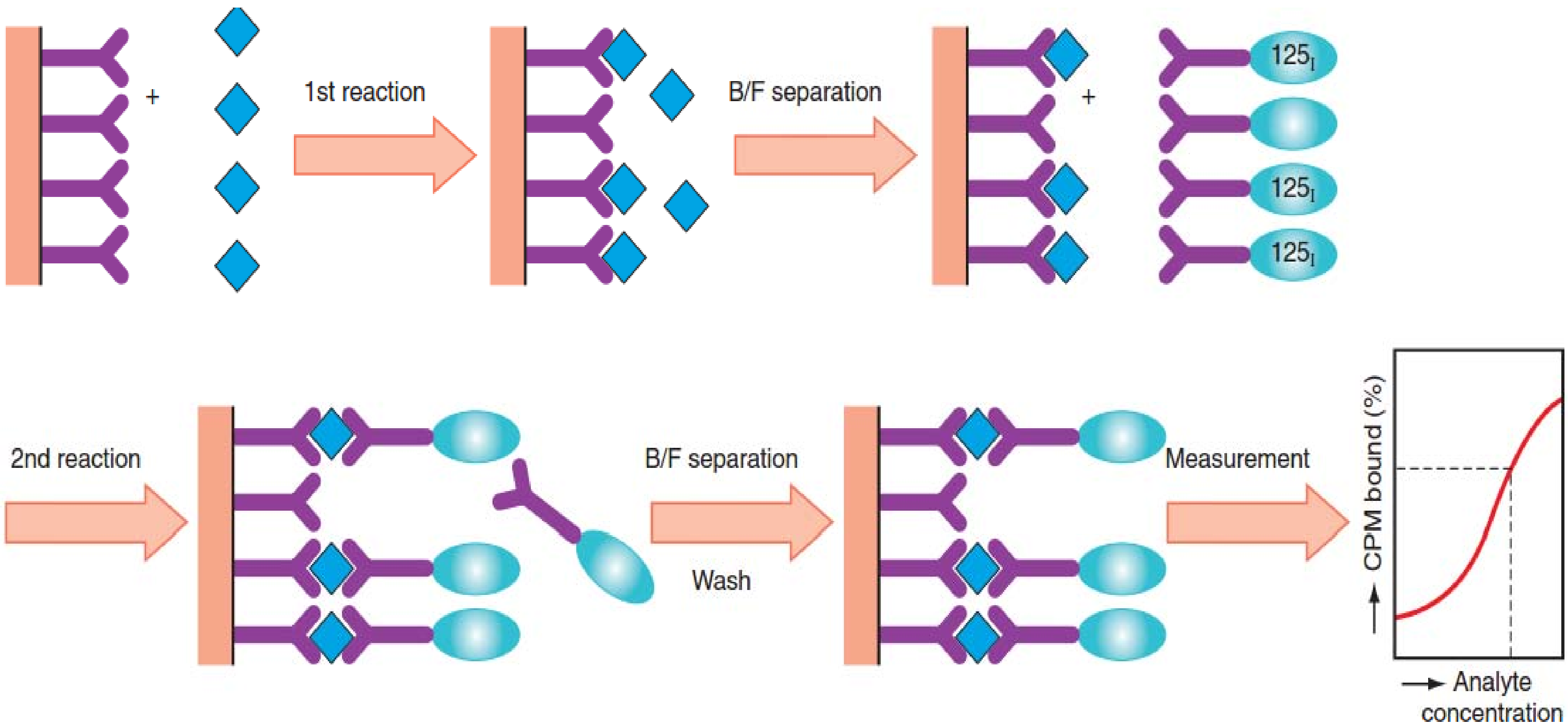
- واکنش هایی که نیاز به جدا کردن (از طریق رسوب یا جذب سطحی) ترکیب نشاندار متصل از غیر متصل را دارد هتروژن می گویند و در غیر اینصورت هموژن نامیده می شوند.



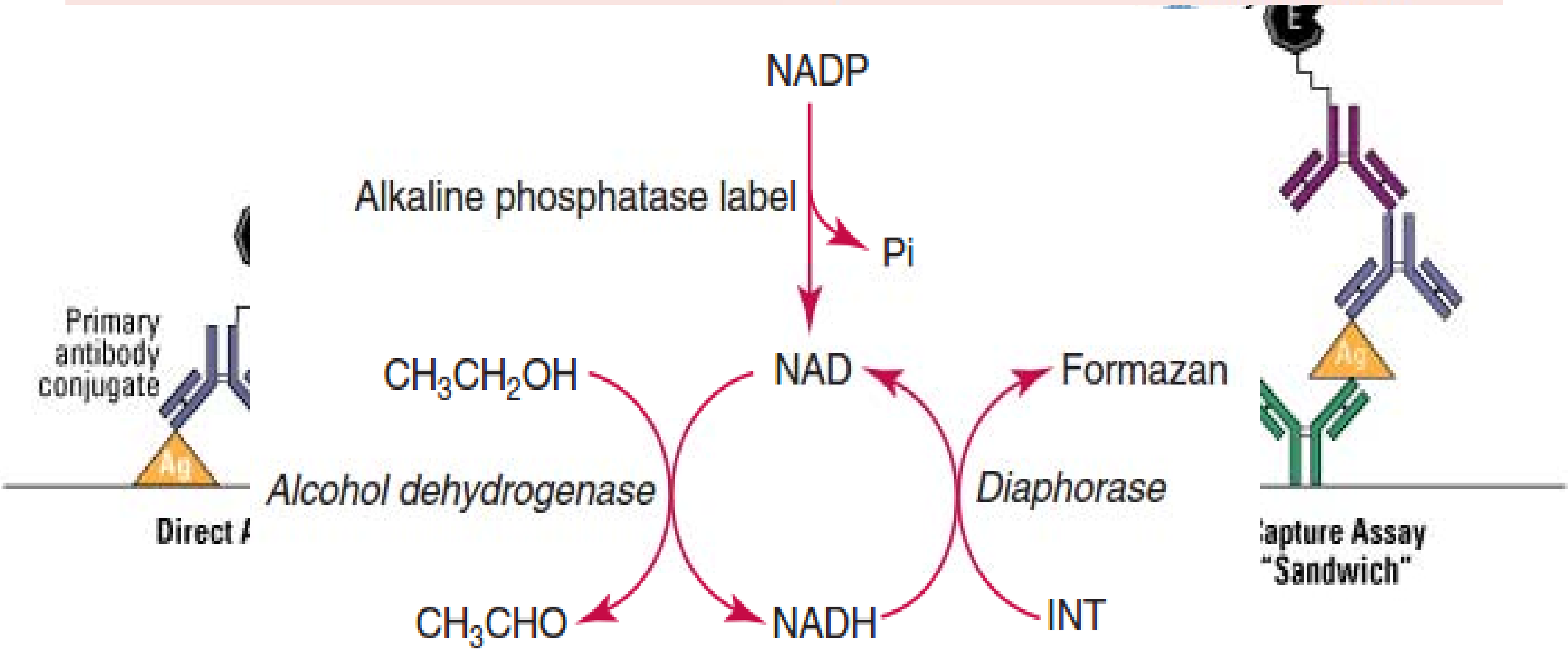
ایمنواسی نشاندار-رادیوایمنواسی (RIA)



ایمنواسی نشاندار-ایمنورادیومتریک اسی (IRMA)

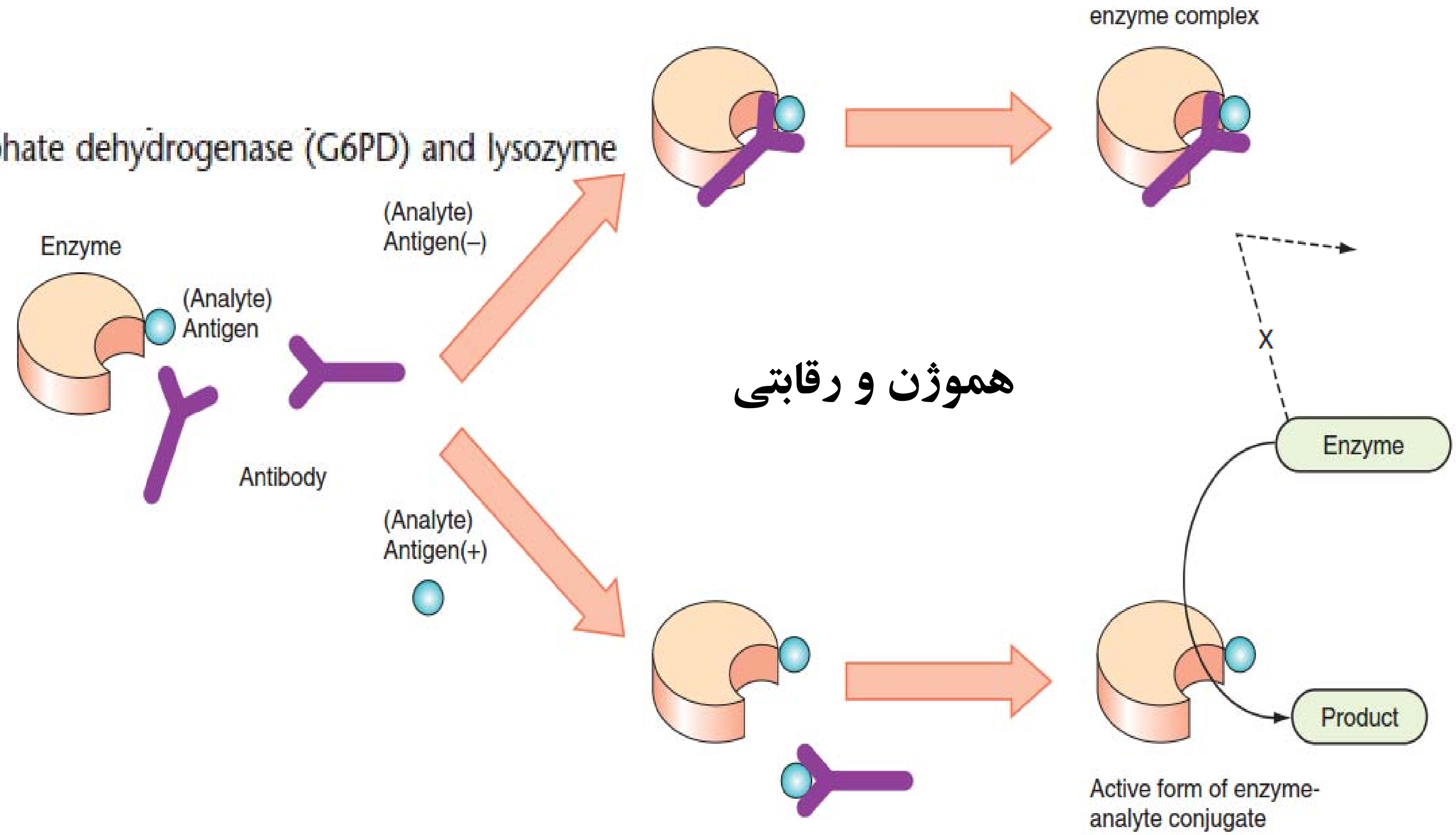


Label	Detection Limit in Zeptomoles* (10^{-21} moles)	Method
Alkaline phosphatase	50,000	Photometry
	300	Time-resolved fluorescence
	100	Fluorescence
	10	Enzyme cascade
	1	Chemiluminescence



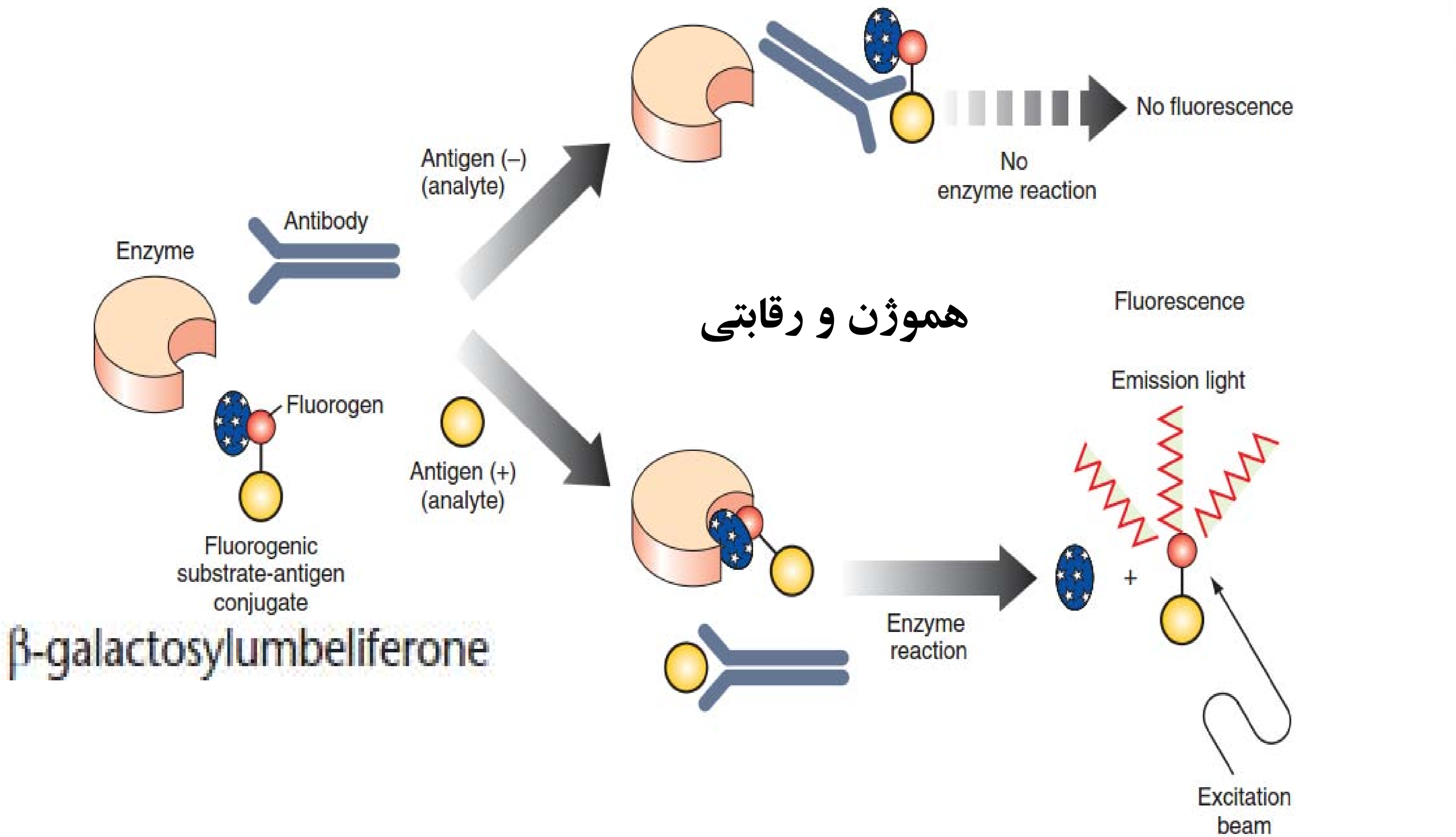
ایمنواسی نشاندار-ایمنواسی آنزیمی (EIA)-EMIT

ucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and lysozyme



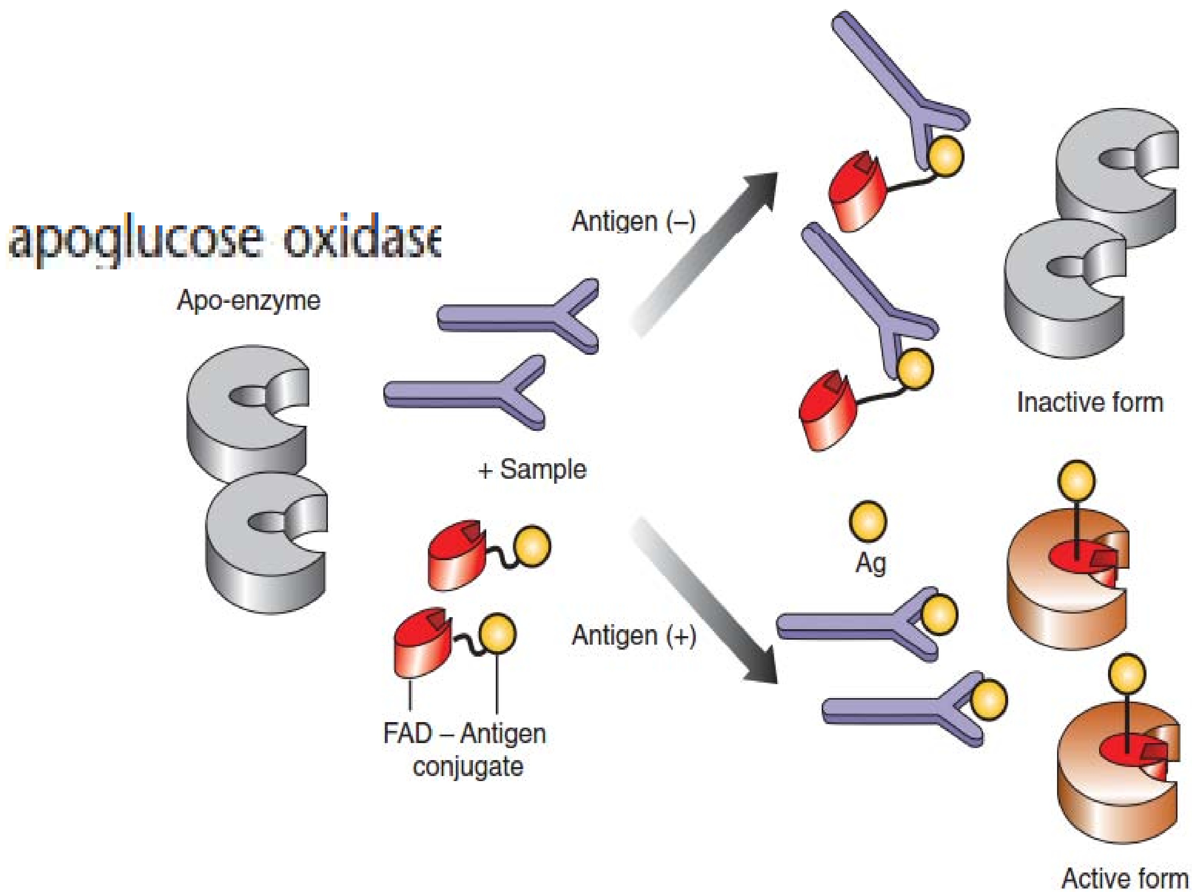
Enzyme-multiplied immunoassay technique (EMIT)

ایمنواسی نشاندار-ایمنواسی آنزیمی (EIA)–SLFIA



Substrate-labeled fluorescent immunoassay (SLFIA)

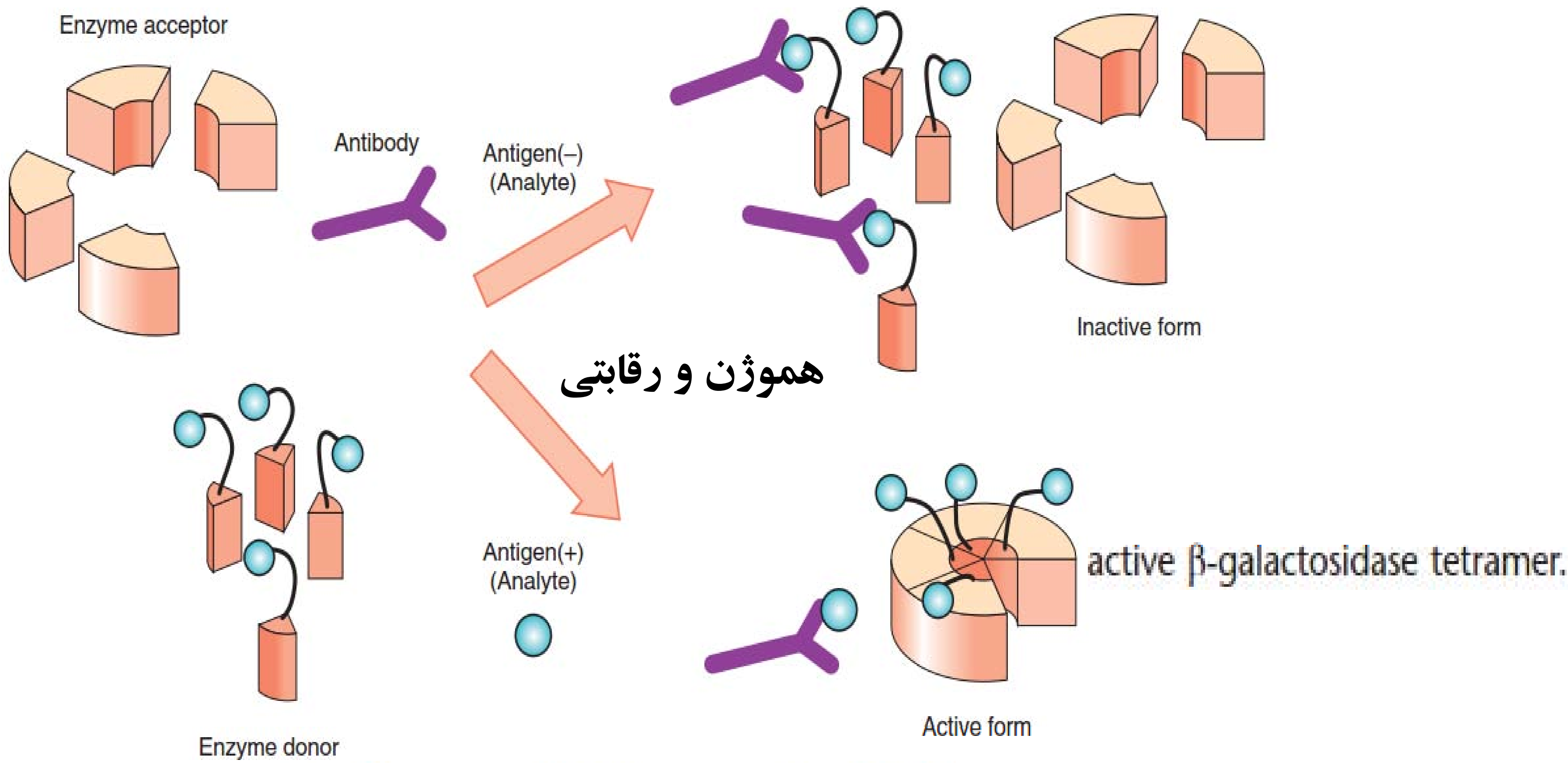
ایمنواسی نشاندار-ایمنواسی آنزیمی (EIA)-ARIS



هموژن و رقابتی

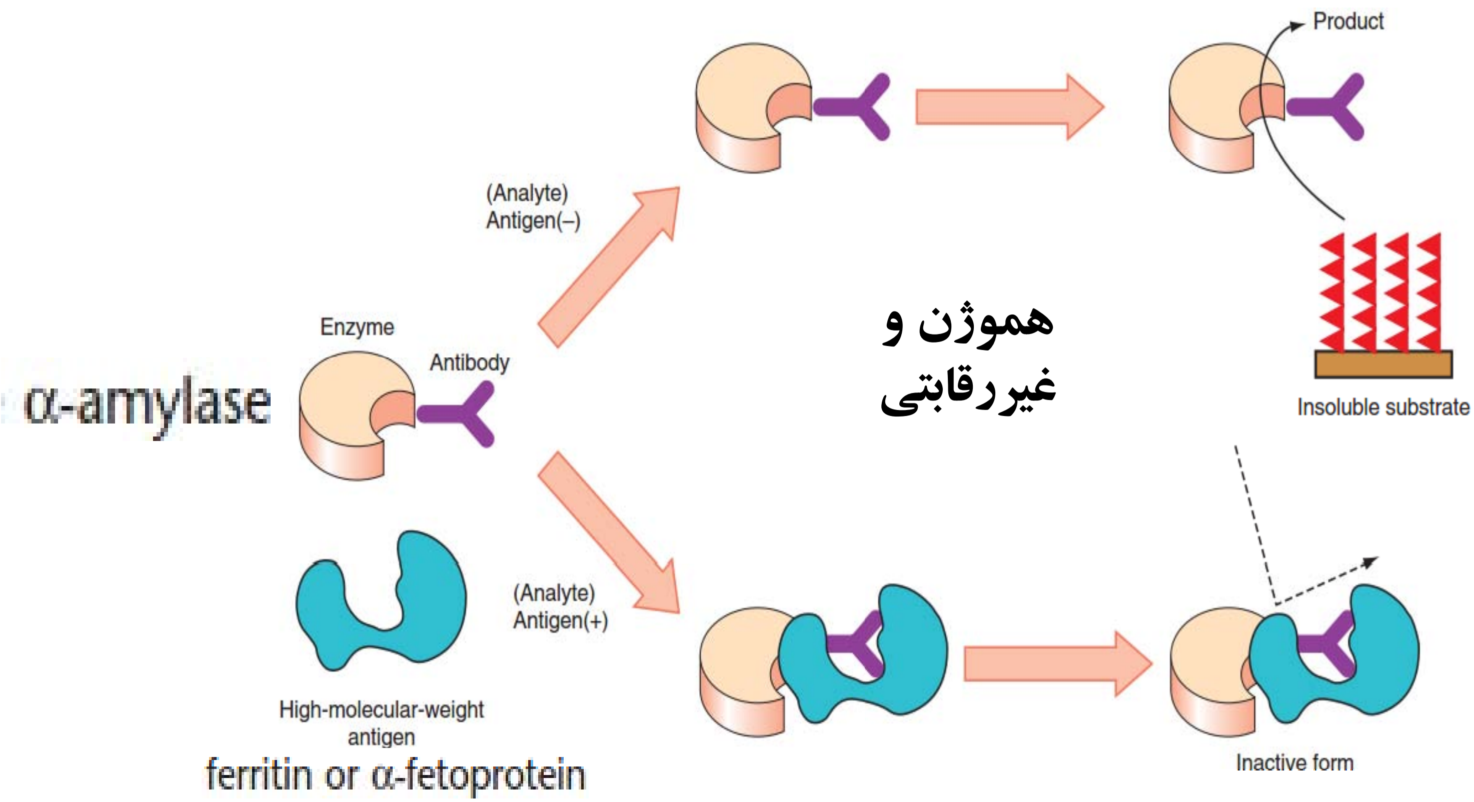
Apoenzyme reactivation immunoassay (ARIS).

ایمنواسی نشاندار-ایمنواسی آنزیمی (EIA)-CEDIA



Cloned enzyme donor immunoassay (CEDIA)

ایمنواسی نشاندار-ایمنواسی آنزیمی (EIA)–EIHIA

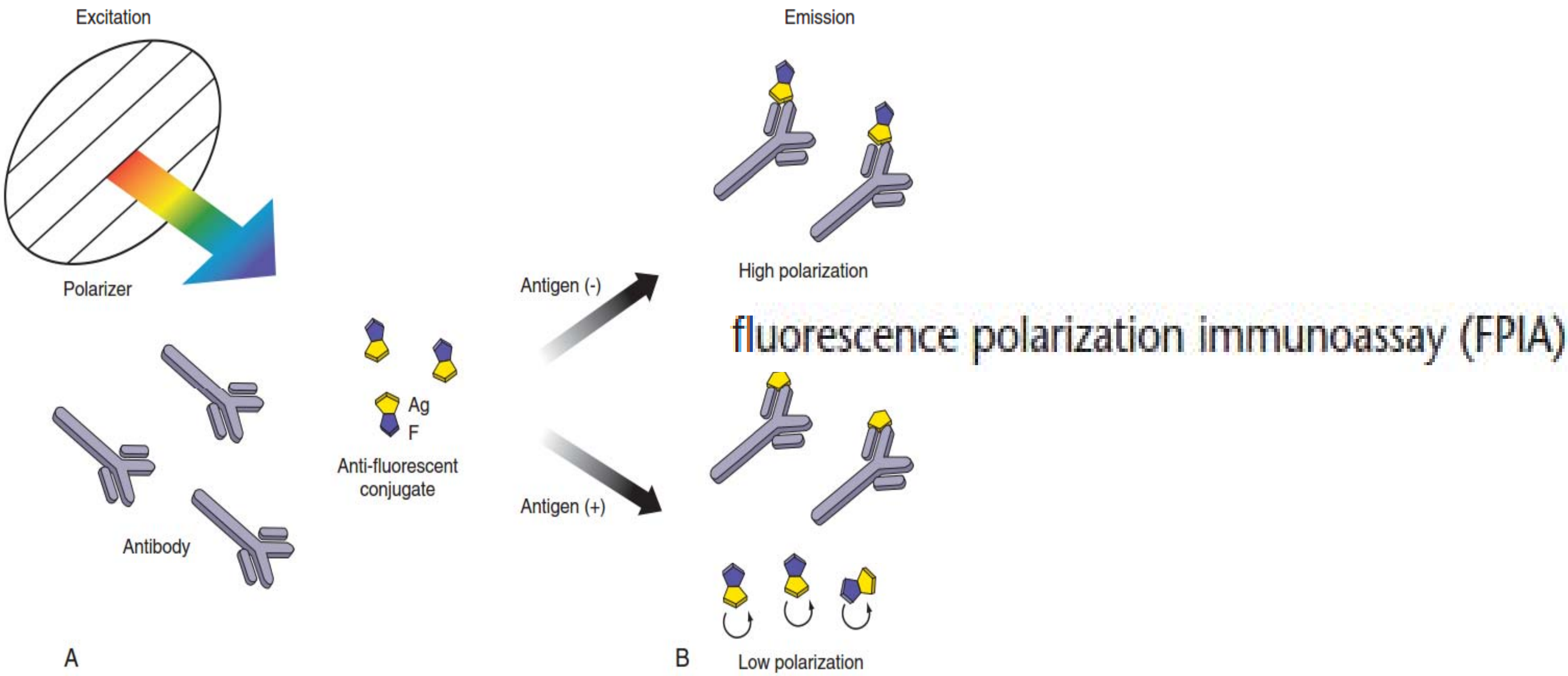


هموژن و
غیررقابتی

Enzyme inhibitory homogeneous immunoassay (EIHIA)

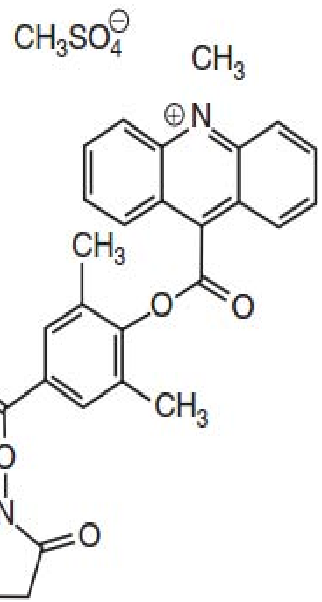
ایمنواسی نشاندار- فلئوروایمنواسی (FIA)

- همانند روش EIA به دو حالت هموژن و هتروژن می تواند انجام شود.



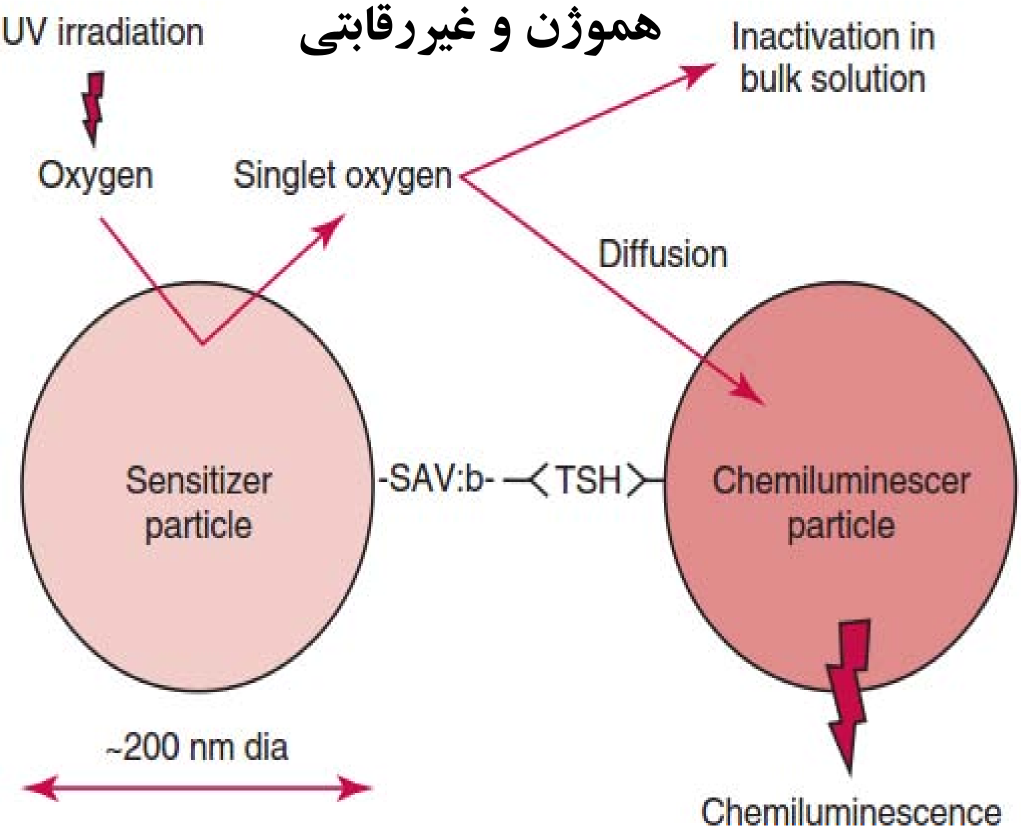
ایمنواسی نشاندار- کمی لومینسانس ایمنواسی

A

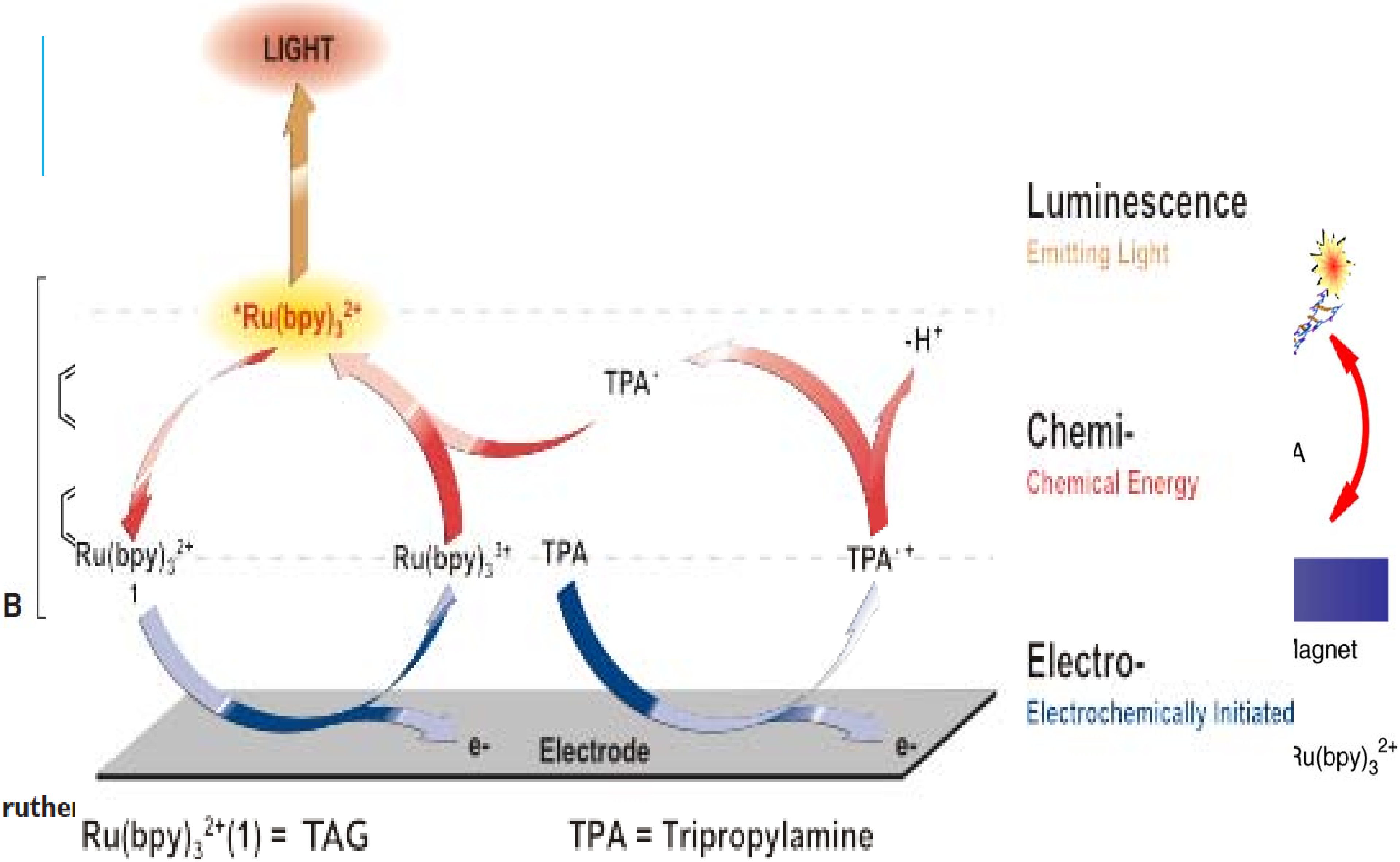


acridinium ester label.

هموژن و غیررقابتی



Luminescent oxygen channeling immunoassay (LOCI)


LIGHT
*Ru(bpy)3 2+
-H+
TPA·
Ru(bpy)3 2+
1
Ru(bpy)3 3+
TPA
TPA·+
e-
Electrode
e-
B
ruthe
Ru(bpy)3 2+(1) = TAG
TPA = Tripropylamine
Luminescence
Emitting Light
Chemi-
Chemical Energy
Electro-
Electrochemically Initiated
A
lagnet
Ru(bpy)3 2+

سایر روش های ایمنواسی موجود

- Protein Array
- Immunohistochemistry
- Agglutination assays
- Simplified Immunoassays
- Bioluminescent immunoassays
- Immuno-PCR
- Quantum Dot Immunoassays
- Surface effect Immunoassay (SPR)
- ....


با تشکر از توجه شما