

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

دعای مطالعه

اَللّٰهُمَّ اَخْرِجْنِيْ مِنْ ظُلُمَاتِ الْوَهْمِ وَاكْرِمْ نِيْ بِنُوْرِ الْفَهْمِ
اَللّٰهُمَّ افْتَحْ عَلَيْنَا اَبْوَابَ رَحْمَتِكَ وَاَنْشُرْ عَلَيْنَا خَزَائِنَ عُلُوْمِكَ
بِرَحْمَتِكَ يَا اَرْحَمَ الرَّاحِمِيْنَ

پروردگارا، خارج کن مرا از تاریکی های فکر و گرامی بدار به نور فهم
پروردگارا، بکشای بر مادرهای رحمت را و بکستران کنج های دانشت را به امید رحمت
تو ای مهربان ترین مهربانان

بیایید به حقوق دیگران احترام بگذاریم

دوست عزیز، این کتاب حاصل دسترنج چندین ساله‌ی مؤلف، مترجم و ناشر آن است. تکثیر و فروش آن به هر شکلی بدون اجازه از پدیدآورنده کاری غیراخلاقی، غیرقانونی، غیرشرعی و کسب درآمد از دسترنج دیگران است، نتیجه‌ی این عمل نادرست، موجب رواج بی‌اعتمادی در جامعه و بروز پی‌آمدهای ناگوار در زندگی و محیط ناسالم برای خود و فرزندانمان می‌گردد.

جنبه‌های کلیدی تکنیک ایمونوهیستوشیمی

مؤلف:

آمنه احراری

«کارشناسی ارشد زیست‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس»



استانده
IQ3

الگویتیم
میانبر

IQ3

بسم

کتاب‌خانه
دکتر خالیدی

سرشناسه	: احقراری، آمنه، ۱۳۶۸ -
عنوان و نام پدیدآور	: جنبه‌های کلیدی تکنیک ایمونوهیستوشیمی / مولف آمنه احقراری.
مشخصات نشر	: تهران: گروه تألیفی دکتر خلیلی، ۱۴۰۱.
مشخصات ظاهری	: ۷۰ ص. : مصور، جدول.
شابک	: 978-600-422-671-4
وضعیت فهرست نویسی	: فیپا
موضوع	: شیمی ایمنی بافتی
موضوع	: Immunohistochemistry
موضوع	: شیمی ایمنی بافتی -- فن
موضوع	: Immunohistochemistry -- Technique
موضوع	: شیمی ایمنی سلولی
موضوع	: Immunocytochemistry
رده‌بندی کنگره	: QR۱۸۳/۶
رده‌بندی دیویی	: ۶۱۱/۰۱۸
شماره کتابشناسی	: ۸۵۵۵۴۲۴

نام کتاب: جنبه‌های کلیدی تکنیک ایمونوهیستوشیمی

مولف: آمنه احقراری

ناشر: گروه تألیفی دکتر خلیلی

نوبت و سال چاپ: اول . ۱۴۰۱

شمارگان: ۱۰۰۰

چاپ و صحافی: شباب

مدیر تولید: اقبال شرقی

مدیر فنی و هنری: مریم آرده

تایپ و صفحه‌آرایی: بیتا اندوژفر

بهاء: ۴۹۰۰۰ تومان

آموزشگاه دکتر خلیلی: ۰۲۱۶۶۵۶۸۶۲۱

مرکز پخش: ضلع جنوب غربی میدان انقلاب . جنب سینما پارس . مجتمع تجاری پارس . طبقه اول

مرکز فروش: ۰۲۱۶۶۵۶۹۲۱۶

مدیر فروش: ۰۹۱۲۵۵۰۸۵۸۹

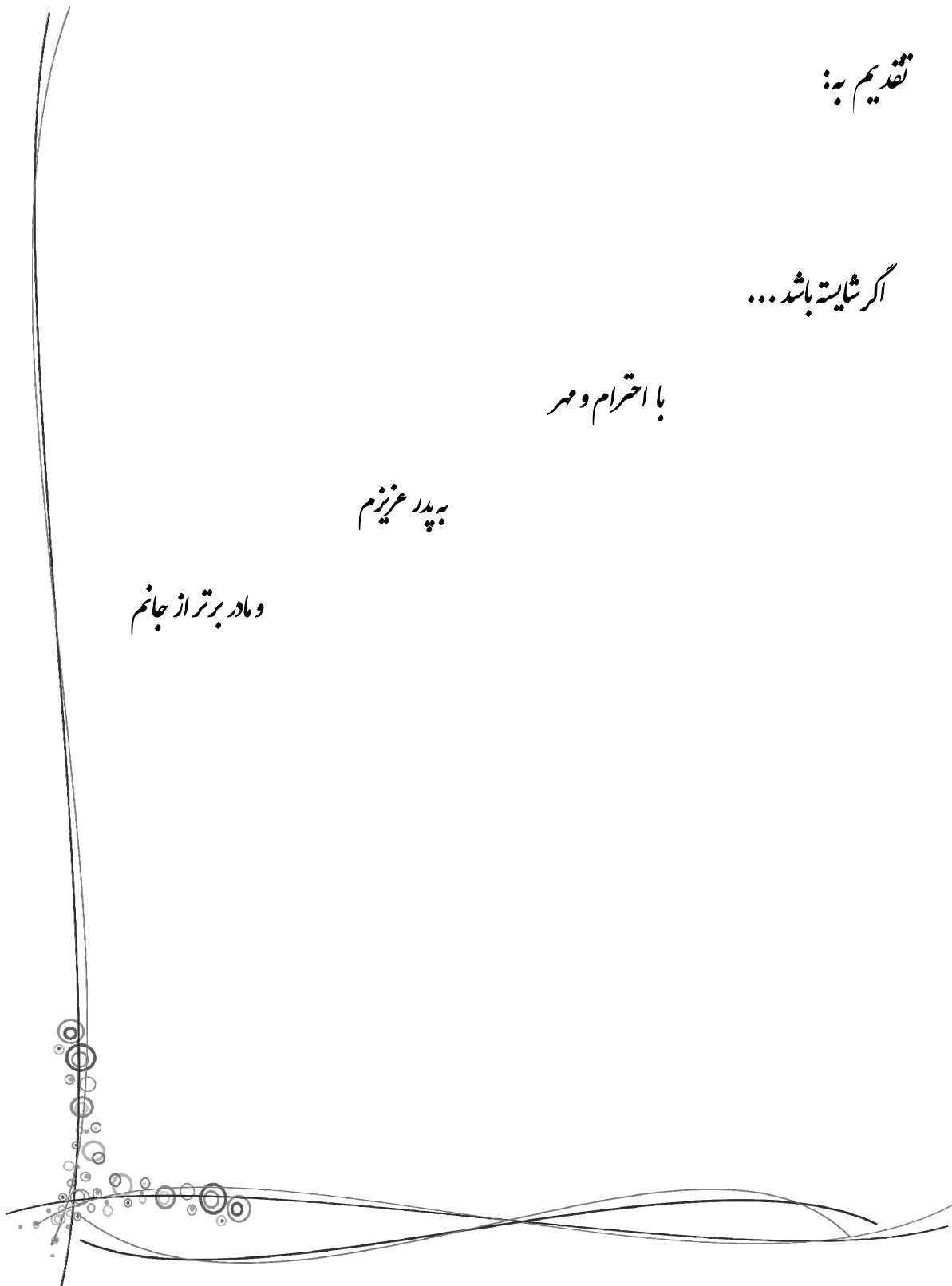
تقدیم بہ:

اگر شایستہ باشد...

با احترام و مہر

بہ پدر عزیزم

و مادر برتر از جانم



طبیعه سخن:

امروزه برای تشخیص بیماری، تحقیقات بیولوژیکی و توسعه دارو در بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیصی و تحقیقاتی از تکنیک ایمونوهیستوشیمی به‌عنوان یک ابزار تحقیقاتی مهم استفاده می‌شود. به‌عنوان مثال؛ پزشکان با استفاده از نشانگرهای تومور خاص، برای تشخیص خوش‌خیم یا بدخیم بودن تومور، تعیین مرحله و درجه آن و شناسایی نوع سلول و منشاء متاستاز از این روش کاربردی استفاده می‌کنند تا محل تومور اولیه را پیدا کنند. در انواع دیگر بیماری‌ها و شرایط غیرنئوپلاستیک نیز می‌توان از تکنیک ایمونوهیستوشیمی به‌عنوان یک روش تاییدی تشخیصی استفاده کرد. علاوه بر این موارد، ایمونوهیستوشیمی را می‌توان به تنهایی یا همراه با سایر تکنیک‌های تحلیلی برای مطالعه رشد بافت و اندام طبیعی، فرآیندهای پاتولوژیک، بهبود زخم، مرگ و ترمیم سلولی و بسیاری زمینه‌های دیگر مورد استفاده قرار داد. همچنین در تولید دارو برای آزمایش اثربخشی دارو با شناسایی فعالیت بالا یا پایین نشانگرهای بیماری در بافت‌های هدف این روش قابل استفاده است.

با تاکید بر اهمیت این روش، در این اثر نویسنده سعی داشته که برخی از جنبه‌های تشریحی، ایمونولوژیکی و بیوشیمیایی این تکنیک را مورد بحث قرار دهد. جهت تجسم و مستندسازی و همچنین مکان‌یابی اجزای سلولی خاص در بافت‌آشنایی و درک برخی مفاهیم تخصصی ضروری است. در این کتاب سعی شده است که از جمله به موارد مرتبط با آنتی‌بادی و آنتی‌ژن و بازیابی آن‌ها، انواع روش‌های ایمونویابی و تثبیت، معرف‌ها، کونژوگاسیون آنتی‌بادی، روش‌های تشخیصی، پیشینه و همچنین فن‌آوری ریزآرایه و استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال بحث و پرداخته شود.

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

۹	پیشگفتار
۱۱	مقدمه
۱۳	جنبه‌های کلیدی تکنیک ایمونوهیستوشیمی
۱۴	آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌ها
۱۴	ساختار آنتی‌بادی
۱۵	ماهیت برهمکنش‌های آنتی‌ژن - آنتی‌بادی (Ag-Ab)
۱۷	آنتی‌ژن‌ها
۱۷	انتخاب ایمونوژن‌ها
۱۸	آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و پلی‌کلونال
۱۸	آنتی‌بادی‌های مونوکلونال
۱۹	عرضه آنتی‌بادی‌های (Abs) تجاری
۲۱	ریزآرایه‌های بافتی (Tissue Microarrays)
۲۲	فرایند تثبیت (Fixation)
۲۲	فرمالدئید و فیکساتیوهای پیوند عرضی
۲۵	انواع دیگر تثبیت‌کننده‌ها
۲۶	پروسه پردازش بافت و بافرها جهت انکوباسیون (Tissue processing and incubation buffers)
۲۸	بازیابی آنتی‌ژن (Ag Retrieval)
۲۸	بازیابی آنزیمی با آنزیم‌ها
۲۹	بازیابی اپی‌توپ ناشی از گرما (Heat Induced Epitope Retrieval)
۳۰	روش‌های متفرقه بازیابی آنتی‌ژن (Miscellaneous AR methods)
۳۰	سیستم‌های تشخیص (Detection Systems)
۳۱	روش‌های غیرمستقیم (Direct methods)

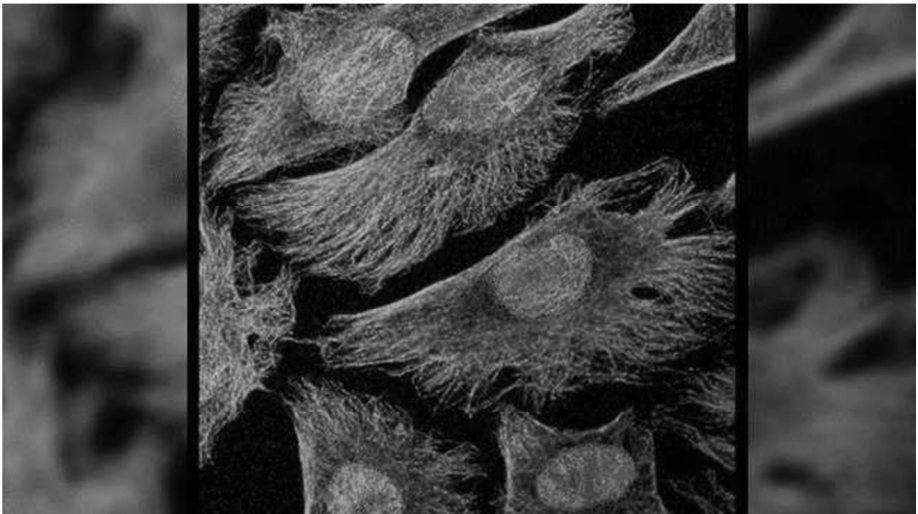
فهرست مطالب

صفحه

عنوان

۳۶.....	تقویت چرخه ایمونو رولینگ (Immuno- rolling circle amplification)
۳۸.....	سایر جنبه‌های واکنش‌های ایمونوهیستوشیمی
۳۸.....	سیستم‌های تشخیص چند ظرفیتی (Polyvalent detection systems)
۳۸.....	افزایش حساسیت تشخیص آنتی‌ژن (Increasing the sensitivity of Ag Detection)
۳۸.....	ایمونولیبلینگ چندگانه (Multiple Innunolabelling)
۴۰.....	ایمونوهیستوشیمی بر روی بافت‌های موش (IHC on Mouse Tissues)
۴۱.....	رنگ واکنش آنتی‌ژن - آنتی‌بادی (Color of the Ag- Ab Reaction)
۴۱.....	دلایل ایجاد لکه زمینه در ایمونوهیستوشیمی
۴۲.....	زمینه تولید شده توسط فعل و انفعالات هیدروفوب پروتئین‌ها
۴۳.....	زمینه تولید شده توسط فعل و انفعالات یونی و الکترواستاتیک
۴۴.....	فعالیت پراکسیداز درون‌زا
۴۴.....	آلکالین فسفاتاز درون‌زا
۴۵.....	آویدین و بیوتین به‌عنوان منابع پس زمینه
۴۷.....	آلدهیدهای آزاد
۴۷.....	گیرنده‌های FC
۴۷.....	انتشار غیراختصاصی آنتی‌ژن (Sequestration)
۴۸.....	رنگدانه‌ها
۴۹.....	میکروسکوپ فلورسانس
۴۹.....	مروری بر پروتکل‌های آزمایشگاهی جهت رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی
۵۰.....	مراحل تهیه و برش‌گیری بافت‌های تثبیت شده
۵۳.....	تعاریف
۵۷.....	منابع

پیشگفتار



Human HeLa cancer cells in culture showing the nuclei in red and the tubulin component of the cytoskeleton in green. The blue staining is a mitotic checkpoint protein that remains in the cytoplasm until pro-metaphase when it is involved in regulating cell division. HeLa cells are derived from a human cervical cancer and can be propagated indefinitely in culture. Image credit: Matthew Daniels, Wellcome Images via The Cell Image Library



سلول‌های سرطانی HeLa انسانی در محیط کشت با هسته‌های قرمز و اجزا توبولین اسکلت سلولی به رنگ سبز نشان داده شده است. رنگ‌آمیزی آبی یک پروتئین چکپوینت میتوزی است که وقتی در تنظیم تقسیم سلولی نقش داشته باشد تا زمان پرومیتافاز در سیتوپلاسم باقی می‌ماند. سلول‌های HeLa از سرطان دهانه رحم انسان گرفته شده و می‌توانند به مدت نامحدود در محیط کشت تکثیر یابند. ایمونوهیستوشیمی یک تکنیک کامل است که در بسیاری از آزمایشگاه‌های وابسته به دامپزشکی برای اهداف تشخیصی و تحقیقاتی استفاده می‌شود. در دهه گذشته، توانایی تشخیص آنتی‌ژن‌ها^۱ در بخش‌های بافتی، مخصوصاً برای مقابله با اثرات مضر فرمالدئید در بازیابی آنتی‌ژن^۲ و افزایش حساسیت سیستم‌های تشخیص، به طرز چشمگیری بهبود یافته است. در این بررسی، به این مباحث پرداخته و مروری بر جنبه‌های فنی ایمونوهیستوشیمی، از جمله موارد مرتبط با آنتی‌بادی‌ها^۳ و آنتی‌ژن‌ها، تثبیت کردن، بازیابی آنتی‌ژن، روش‌های تشخیص، پیشینه و عیب‌یابی ارائه می‌شود. همچنین فن‌آوری ریزآرایه^۴ و استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال خرگوش در ایمونوهیستوشیمی بحث شده است.

1. Ags
2. AR
3. Abs
4. Microarray

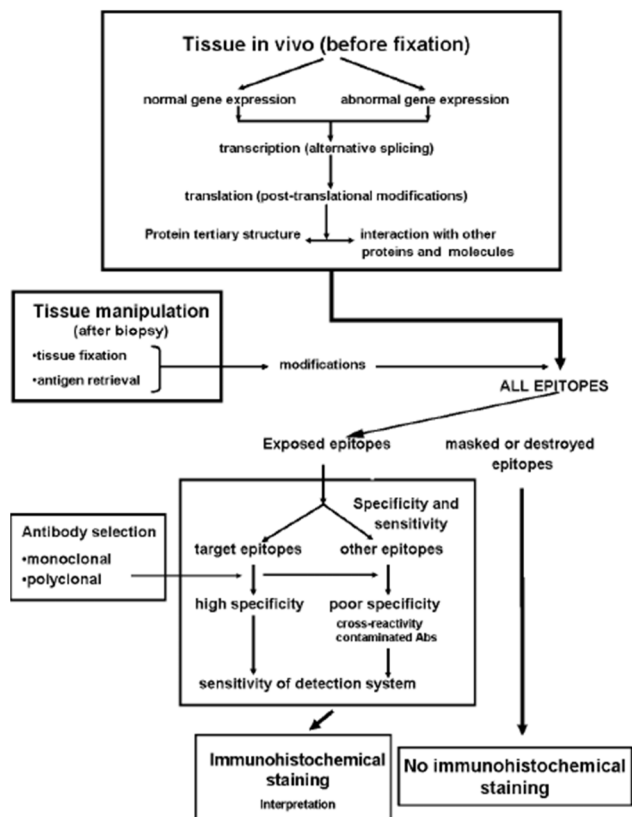
مقدمه

مقدمه

سال ۱۹۴۱ کونز و همکاران در مقاله ای (۱) به توصیف یک روش ایمونوفلورسانس برای تشخیص آنتی‌ژن‌های سلولی در بخش‌های بافتی پرداختند که این مطالعه سرآغازی بر ایمونوهیستوشیمی^۱ (IHC) بود. از آن زمان، ایمونوهیستوشیمی به ابزاری ارزشمند در تشخیص و تحقیقات بیماری‌های عفونی و نئوپلاستیک در انواع حیوانات تبدیل شده است. اساس ایمونوهیستوشیمی بسیار ساده و پل ارتباطی بین سه رشته علمی ایمونولوژی، بافت‌شناسی و شیمی است. مفهوم اساسی ایمونوهیستوشیمی نشان دادن آنتی‌ژن‌ها در بخش‌های بافتی با استفاده از آنتی‌بادی‌های خاص است. هنگامی که اتصال آنتی‌ژن-آنتی‌بادی (Ag-Ab) رخ می‌دهد، با یک واکنش هیستوشیمیایی رنگی توسط میکروسکوپ نوری یا فلوروکروم با نور ماورا بنفش نشان داده می‌شود. اگرچه از نظر مفهومی ساده است، اما با تعیین اهداف دقیق‌تر از حساسیت و ویژگی، روش ایمونوهیستوشیمی پیچیده‌تر شده است (۲) (شکل ۱). در ابتدا از روش‌های ساده (مستقیم) استفاده شد که نتایج سریعی را به همراه داشت اما فاقد حساسیت و دقت لازم بود. در حال حاضر، روش‌های بسیار حساسی برای تشخیص هم‌زمان یک یا چند آنتی‌ژن یا حتی بررسی صدها بافت در همان بخش برای وجود آنتی‌ژن خاص وجود دارد (تکنیک میکرو آرایه).

یکی دیگر از پیشرفت‌های مهم در دهه ۱۹۹۰، تکنیک‌های بازیابی آنتی‌ژن بود که با تثبیت کردن از طریق گرما تغییراتی ایجاد کرده بود و به‌طور تصاعدی تعداد آنتی‌ژن‌های قابل تشخیص در بافت‌های ثابت را افزایش می‌داد. آسیب شناسان دامپزشکی هنگام انجام ایمونوهیستوشیمی به دلیل تنوع گونه‌های مورد مطالعه و نبود تضمین برای واکنش متقابل آنتی‌بادی‌ها در بین گونه‌های مختلف با چالش‌های زیادی روبرو هستند. ایمونوهیستوشیمی به‌عنوان یک روش قابل اعتماد برای فعالیت‌های تشخیصی و تحقیقاتی در دامپزشکی پابرجا مانده است. این مطالعه جنبه‌های فنی ایمونوهیستوشیمی، از جمله موارد مربوط به آنتی‌بادی‌ها و آنتی‌ژن‌ها، تثبیت کردن، بازیابی آنتی‌ژن، روش‌های تشخیص، پیشینه و عیب‌یابی را بررسی می‌کند. یکی از اهداف این مطالعه این است که به همه محققان کمک کند جنبه‌های فنی ایمونوهیستوشیمی را درک کنند و آن‌ها را از "روش قرمز، قهوه‌ای و آبی" دورنگه دارد.

جنبه‌های کلیدی تکنیک ایمونوهیستوشیمی



شکل ۱: عوامل اصلی مؤثر بر نتیجه مطالعات ایمونوهیستوشیمی (چاپ مجدد از میگل و همکاران با اجازه از ناشران Blackwell).

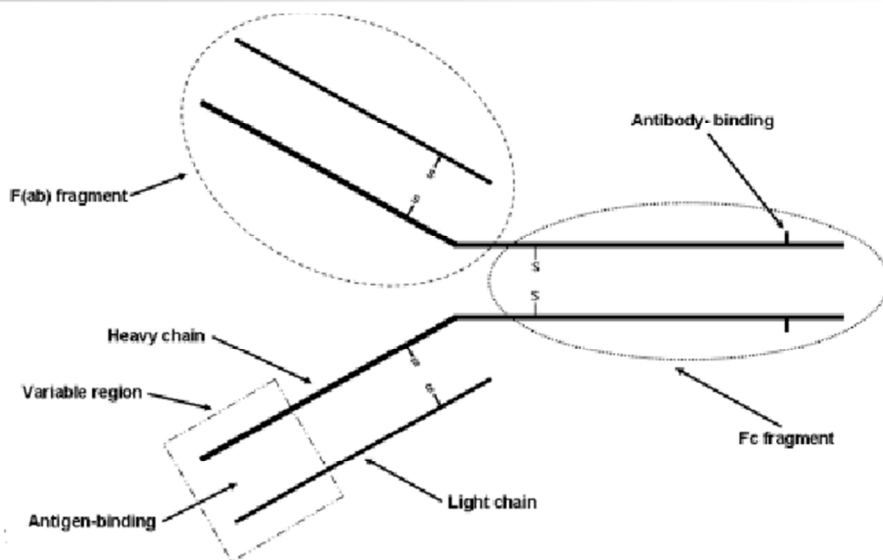
آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌ها



اساس ایمونوهیستوشیمی بر اساس اتصال آنتی‌بادی‌ها به یک آنتی‌ژن خاص در بخش‌های بافتی است. رایج‌ترین ایمونوگلوبولین مورد استفاده در ایمونوهیستوشیمی ایمونوگلوبولین G است. از ایمونوگلوبولین M کم‌تر استفاده می‌شود.

ساختار آنتی‌بادی

ایمونوگلوبین‌ها Y شکل هستند و از دوزنجیره سبک یکسان و دو زنجیره سنگین یکسان تشکیل شده‌اند (شکل ۲). زنجیره‌های سنگین نوع آنتی‌بادی را تعیین می‌کنند. دم Y شکل Fc نامیده می‌شود. زنجیره‌های سبک اکثر مهره‌داران دو شکل مشخص دارند که کپا و لامبدا نامیده می‌شوند. در هر مولکول ایمونوگلوبین، هر دو زنجیره سبک و سنگین از یک نوع هستند. زنجیره سبک از دو ناحیه مجزا تشکیل شده است: ناحیه C-ترمینال که ثابت هست و CL نامیده می‌شود (ثابت: زنجیره سبک)، درحالی‌که ناحیه N-ترمینال زنجیره دارای تنوع توالی فراوانی است و ناحیه VL نامیده می‌شود (متغیر: زنجیره سبک). ناحیه Fab قسمت اتصال آنتی‌ژن به ایمونوگلوبین است و شامل بخش‌های متغیر و ثابت زنجیره‌های سنگین و سبک می‌باشد. بخش Fc از آنتی‌بادی عملکردهای زیستی را تعیین می‌کند و اجازه می‌دهد آنتی‌بادی به سلول‌های دیگر آنتی‌بادی، سلول‌های مکمل و التهابی با گیرنده‌های Fc متصل شود. این بخش از ایمونوگلوبین برای تکنیک‌های ایمونوهیستوشیمی چندمرحله‌ای مورد نیاز است. این قسمت همچنین باعث رنگی شدن پس‌زمینه ناشی از چسبندگی غیرایمنی آنتی‌بادی‌ها به قسمت بافت است. برای جلوگیری از آن، روشی وجود دارد که فقط از بخش‌های Fab یا F(ab) از مولکول ایمونوگلوبین برای ایمونوهیستوشیمی استفاده شود. مشکل عمده این روش این است که بخش Fc از ایمونوگلوبین‌ها تمایل به اتصال آنتی‌بادی به بسترهای ثابت مانند بافت دارد. اتصال خاص آنتی‌بادی به یک آنتی‌ژن از طریق مناطق بیش‌ازحد متغیر زنجیره‌های سنگین و سبک انتهای آمینه اتفاق می‌افتد. محل اتصال آنتی‌ژن به آنتی‌بادی پاراتوپ نامیده می‌شود. اپی‌توپ‌ها نواحی از آنتی‌ژن هستند که به آنتی‌بادی‌ها متصل می‌شوند (۳). طول اپی‌توپ‌ها معمولاً ۵-۲۱ آمینواسید است (۴). یکی از مهم‌ترین معیارهای اتصال آنتی‌بادی، ساختار سوم اپی‌توپ است، یا روشی است که در آن زنجیره‌های پپتیدی پروتئین به هم پیچ می‌خورند یا با پپتیدهای مجاور واکنش می‌دهند. پاراتوپ از طریق مجموعه‌ای از فعل‌وانفعالات پیوند غیرکووالانسی با ساختار سوم اپیتوپ تعامل دارد (در زیر مشاهده می‌شود). هرچه فعل‌وانفعالات پیوند بیش‌تر باشد، میل و تمایل به آنتی‌بادی بیش‌تر است (به‌عنوان قدرت اتصال کلی بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی تعریف شده است). ایمونوگلوبین G دو ظرفیتی است (دارای دو بازوی یکسان هستند که در تشخیص آنتی‌ژن مورد استفاده قرار می‌گیرند). این یک ویژگی کلیدی است که برای انجام روش‌های ایمونوهیستوشیمی چند لایه لازم است.



شکل ۲: ساختار ایمونوگلوبین. ناحیه‌ای که با نقطه‌چین بیضی شکل مشخص شده است مربوط به قطعه F (ab) می‌باشد. منطقه‌ای که با یک مربع مشخص شده است ناحیه متغیر است. منطقه محدودشده بیضی شکل قطعه FC است.

ماهیت برهم‌کنش‌های آنتی‌ژن - آنتی‌بادی (Ag-Ab)

از نظر شیمیایی و بیوشیمیایی، فعل و انفعالات آنتی‌ژن - آنتی‌بادی تا حدودی غیرمعمول است. پیوندهای درگیر ضعیف بوده (عمدتاً آب‌گریز و الکترواستاتیک) و کووالانسی نیستند. پیوندهای آب‌گریز بین ماکرومولکول‌ها با کشش‌های سطحی کمتر از آب اتفاق می‌افتد. آن‌ها می‌توانند بین اتمی یا بین مولکولی باشند. این برهم‌کنش‌های آب‌گریز اساساً از طریق اسیدهای آمینه زنجیره جانبی فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان انجام می‌شود (۵). با میل جذب کم‌تری که به مولکول‌های آب‌دارند، این آمینواسیدها تمایل به یکدیگر رادارند. برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک باعث اتصال نیروهای جاذب بین یک یا چند طرف یون‌های آنتی‌ژن با قسمت‌های با بار مخالف در آنتی‌بادی شود. این‌ها به‌طور معمول کربوکسیل و آمینواسیدهای قطبی از گروه‌های آمینه مولکول‌های آنتی‌ژن و آنتی‌بادی هستند. نیروهای وان در والسی برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک ضعیفی بین مولکول‌های دوقطبی یا اتم‌ها هستند (۶). این نیروها در کم‌ترین فاصله بیش‌ترین کشش رادارند. بنابراین قرارگیری دقیق یون‌های دارای بار مخالف بر روی اپی‌توپ‌ها و پاراتوپ‌ها از پیوند الکترواستاتیک قوی پشتیبانی می‌کند (۶). پیوندهای هیدروژنی نتیجه برهم‌کنش‌های دوقطبی بین OH و CO، NH و CO و NH و OH هستند. انرژی اتصال از همان

مرتبه و اندر والس و فعل وانفعالات الکترواستاتیک است. اهمیت آن در برهم‌کنش‌های آنتی‌ژن-آنتی‌بادی احتمالاً زیاد نیست زیرا ضرورت وجود یک تناسب دقیق بین هر دو مولکول برای وقوع آن است. اگرچه مواردی وجود دارد که فقط یکی از این نوع برهم‌کنش‌ها در اتصال آنتی‌ژن-آنتی‌بادی قابل‌توجه است، اما برای اکثر پلی‌ساکاریدها، گلیکوپروتئین‌ها و آنتی‌ژن‌های پلی‌پپتیدی، پیوند آنتی‌ژن-آنتی‌بادی ترکیبی از نیروهای وان در والس و برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک است [1]. آنتی‌بادی‌ها به جز ایمونوگلوبولین M دو ظرفیتی هستند. اکثر آنتی‌ژن‌های پروتئینی چند ظرفیتی هستند. هر طرف ظرفیت پذیری آنتی‌ژن‌های پروتئینی به‌طور کلی یک تعیین‌کننده آنتی‌ژنتیک (اپی‌توپ) با پیکربندی کاملاً متفاوت از سایر قسمت‌های ظرفیت است (به‌عنوان مثال یک آنتی‌بادی مونوکلونال می‌تواند فقط با یک طرف ظرفیت این آنتی‌ژن واکنش دهد) (۷) (جدول ۱ شرایط مطلوب اتصال آنتی‌ژن-آنتی‌بادی را نشان می‌دهد. میل ترکیبی (Affinity) یک بیان ترمودینامیکی از انرژی اتصال آنتی‌بادی (پاراتوپ) به یک تعیین‌کننده آنتی‌ژنی (اپی‌توپ) است. میل ترکیبی را می‌توان از نظر ریاضی به‌عنوان یک ثابت میل ترکیبی (KA) تعریف کرد، که نشان‌دهنده مقدار کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی است که در تعادل تشکیل خواهد شد. (فرمول ریاضی)

$$Ab + Ag \xrightleftharpoons{K_A} Ag \sim Ab + x \text{ calories}$$

$$K_A = \frac{[Ag \sim Ab]}{[Ag] \cdot [Ab]}$$

جایی که $Ag \sim Ab$ هستند مجموعه‌های آنتی‌ژن-آنتی‌بادی ($Ag \sim Ab$) و اصطلاحات داخل براکت مربع غلظت‌های مولاری را نشان می‌دهد. دامنه ثابت‌های میل آنتی‌ژن-آنتی‌بادی گسترده است و از زیر 10^5 لیتر در مول تا 10^{12} لیتر در مول متغیر است. این اعداد به چه معناست؟ یک کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی با $KA 10^{12}$ لیتر در مول دارای میل ترکیبی 10^{10} برابر بیش‌تر از مجموعه آنتی‌ژن-آنتی‌بادی با $KA 10^9$ لیتر در مول است. میل ترکیبی واکنش آنتی‌ژن-آنتی‌بادی به دلایل عملی مهم است: (۱) آنتی‌بادی‌های با میل بالاتر در مدت‌زمان انکوباسیون کوتاه نسبت به آنتی‌بادی‌های با میل کم‌تر، بیش‌تر به آنتی‌ژن‌ها متصل می‌شوند، (۲) به‌طور کلی، هر چه میل بیش‌تر باشد، محلول آنتی‌بادی رقیق‌تر می‌شود (۸).

جدول ۱. نیروهای اصلی درگیر در اتصال آنتی‌ژن - آنتی‌بادی (۷)

نوع نیروها	اتصال مطلوب Ag-Ab با	جدایی و تفکیک مطلوب Ag-Ab با
واندروالس، الکترواستاتیک	دمای انکوباسیون بالا، pH خنثی بافر، قدرت یونی کم بافرها، دمای کم انکوباسیون	کاهش کشش سطحی بافر، pH شدید بافر، قدرت یونی بالا بافر، دمای انکوباسیون بالا

آنتی‌ژن‌ها

آنتی‌ژن‌ها می‌توانند ساختارهای مختلفی (ایزوفرم) داشته باشند. یک ژن می‌تواند چندین ایزوفرم پروتئینی از طریق دو مکانیزم اصلی ایجاد کند (۱) جایگزینی اتصال رونوشت ژن اولیه که می‌تواند چندین رونوشت ایجاد کند که هر کدام از آن‌ها یک پروتئین کمی متفاوت را کد می‌کند (۹). بسیاری از پروتئین‌ها تحت تغییرات پس از ترجمه، مانند گلیکوزیلاسیون، فسفوریلاسیون و پردازش پروتئولیتیک هستند، که پیچیدگی‌های بیش‌تری به پروتئین‌های مشتق شده از یک ژن منفرد اضافه می‌کند (۲) (شکل ۱). در نتیجه این مکانیسم‌ها، یک ژن واحد می‌تواند ایزوفرم‌های پروتئینی متعددی را تولید کند. حتی این مجموعه می‌تواند بازمان تغییر کند (به‌عنوان مثال، ایزوفرم‌های تناسکین و هموگلوبین که از رشد جنینی به بزرگسالی تغییر می‌کنند) (۲).

انتخاب ایمونوژن‌ها

منبع و آماده‌سازی ایمونوژن جهت تحریک تولید آنتی‌بادی بسیار مهم است تا بهترین کیفیت معرف را برای ایمونوهیستوشیمی به دست آوریم. دو گروه گسترده از ایمونوژن‌ها وجود دارد: پپتیدهای مصنوعی و پروتئین خالص آماده (۲). پپتیدهای مصنوعی دارای مزیت‌هایی هستند از جمله یک توالی اسیدآمین ه شناخته‌شده. این اطلاعات ممکن است در تفسیر مطالعات ایمونوهیستوشیمی ضروری باشد، هر دو با توجه به ایزوفرم‌های هدف پروتئینی که می‌تواند شناسایی شود و هر واکنش متقابلی با توالی‌های پپتیدی مشابه در پروتئین‌های دیگر پپتیدهای مصنوعی همچنین معایب بالقوه‌ای نیز دارند. توالی پپتید مصنوعی جداشده ممکن است فاقد ساختار سه‌بعدی پروتئین نیتیو یا بومی باشد. علاوه بر این، پروتئین‌های دیگر می‌توانند از نزدیک با پروتئین‌های موردعلاقه در داخل بدن از نزدیک در ارتباط باشند. هردوی این عوامل می‌توانند اپی‌توپ‌های هدف را پوشانده، مانع از تشخیص در موجود زنده^۱ توسط آنتی‌بادی‌ها منتسب به پپتیدهای مصنوعی شوند و که این می‌تواند سبب ارائه نتایج منفی کاذب شود. سومین عیب این است که تغییرات پس از ترجمه در موجود زنده می‌تواند در محصول نهایی آنتی‌ژن بسیار مهم باشد که این مسئله در مورد پپتیدهای مصنوعی وجود ندارند (۱۰، ۱۱) استفاده از پروتئین‌های خالص با استفاده از پپتیدهای مصنوعی بسیاری از بسیاری مشکلات ناشی از ایمونوژن‌ها جلوگیری می‌کند (۲). با این حال، خالص‌سازی یک پروتئین به یک حالت همگن از سلول‌ها یا بافت‌ها از نظر فنی می‌تواند دشوار باشد. همچنین، پروتئین‌های عفونی یا آلوده ممکن است نسبت به پروتئین موردعلاقه بیش‌تر آنتی‌ژنیک باشند، که سبب تولید نامتناسب و ناخواسته پاسخ ایمنی شود. مشکل دیگر هنگام استفاده پروتئین‌های خالص‌شده زمانی است که آنتی‌ژن مورد هدف شامل اپی‌توپ‌های بسیار ایمنی‌زایی است که برای آنتی‌بادی موردعلاقه اختصاصی نیستند. این یک وضعیت معمول با تغییرات بسیار مشابه پس از ترجمه در میان آنتی‌ژن‌هاست در غیراین صورت بسیار متفاوت هستند.



منبع و جزئیات خالص‌سازی آنتی‌ژن، و همچنین ایزوفرماهای پروتئین هدف شناخته‌شده توسط یک آنتی‌بادی آماده، به‌ندرت برای آنتی‌بادی‌های اولیه موجود در بازار به‌صورت تجاری گزارش می‌شوند (۲). دیگر فاکتورهای اثر گذرا بر ایمونوزایی شامل، سایز، ساختار، بار الکتریکی آنتی‌ژن، استفاده از مواد مکمل، دوز آنتی‌ژن، و مسیر توزیع است.

آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و پلی‌کلونال

آنتی‌بادی‌ها با ایمن شدن حیوانات (موش، خرگوش، بز، اسب و غیره) از طریق آنتی‌ژن‌ها ساخته می‌شوند. حیوان با تولید آنتی‌بادی‌ها که به‌طور خاص آنتی‌ژن را تشخیص داده و به آن متصل می‌شود، به آنتی‌ژن پاسخ می‌دهد. آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال در گونه‌های مختلف جانوری به‌ویژه خرگوش، اسب، بز و مرغ تولید می‌شوند. این آنتی‌بادی‌ها دارای تمایل و واکنش‌پذیری بیش‌تری هستند اما در مقایسه با آنتی‌بادی مونوکلونال از خاصیت کم‌تری برخوردار می‌باشند (۳). آنتی‌سرم‌های پلی‌کلونال دارای چندین آنتی‌بادی‌های مختلف با هدف پروتئینی هستند، اما آنتی‌بادی‌های غیرضروری با غلظت بالا (بیش‌تر از ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) در صورت خالص‌سازی نشدن می‌توانند وجود داشته باشند (۲، ۱۲). آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال از این جهت از آنتی‌بادی مونوکلونال ارجحیت دارند که توانایی شناسایی ایزوفرماهای پیچیده (اپی‌توپ) پروتئین هدف را دارند. با این حال، آماده‌سازی پلی‌کلونال به دلیل وجود آنتی‌بادی‌های اپی‌توپ‌های قوی و ضعیف ایمنی در آماده‌سازی مشابه می‌تواند بسیار ناهمگن باشد (۲). گوناگونی در کیفیت آنتی‌بادی، بسته به حیوانات ایمن‌سازی شده، باعث اختلاف در میان گروه‌های آنتی‌بادی‌های می‌شود (۱۳). انحراف ایمنی آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال (به‌عنوان مثال، امکان بیش‌تر تشخیص آنتی‌بادی از طریق تعدد تشخیص اپی‌توپ (هم‌مزیت و هم نقطه‌ضعف می‌تواند باشد) (۲). هرچه تعداد آنتی‌بادی‌های مختلف به پروتئین هدف در یک آماده‌سازی بیش‌تر باشد، شباهت واکنش متقابل با اپی‌توپ‌های مشابه در پروتئین‌های دیگر بیش‌تر است. به‌عنوان مثال، حوزه‌های ایمنی‌زایی رایج فیبرونکتین III حداقل در پروتئین‌های غیرمرتبط وجود دارد (۱۴).

آنتی‌بادی‌های مونوکلونال

آنتی‌بادی‌های مونوکلونال بیش‌تر در موش تولید می‌شود. کوهلر و میلستین (۱۵) فناوری تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال را توسعه دادند. به موش‌ها ایمونوزن خالص تزریق می‌شود (آنتی‌ژن). پس از دستیابی به پاسخ ایمنی، لنفوسیت‌های B (سلول‌های تولیدکننده آنتی‌بادی) از طحال برداشت می‌شوند. از آنجاکه طول عمر سلول‌های لنفوسیت B جداسده محدود است، با سلول‌های میلوما موش ترکیب می‌شوند. سلول ترکیبی تولیدشده (هیبریدوما) یک سلول جاودانه است که Igs مخصوص یک اپی‌توپ را تولید می‌کند (آنتی‌بادی‌های مونوکلونال). مزیت آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در مقایسه با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال خاصیت بیش‌تر آن‌ها است (جدول ۲). هیبریدوما را می‌توان در کشت سلولی (آنتی‌بادی بسیار

خالص اما در غلظت کم) یا در صفاق موش حفظ کرد. این ویژگی احتمال واکنش متقاطع با سایر آنتی‌ژن‌های را کاهش می‌دهد (اگرچه کاملاً از بین نمی‌رود). یکی از دلایل واکنش متقابل این است که آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مستقیماً علیه اپی‌توپ‌های متشکل از تعداد کمی اسید آمینه هستند که می‌تواند بخشی از چندین نوع پروتئین و پپتید باشد (۱۶). به عنوان مثال، یک آنتی‌بادی پروئینسولین ضد انسانی با سلول‌های ترشح‌کننده انسولین و گلوکاگون واکنش متقابل دارد (۱۷). از آن‌جا که این اتصال به یک اپی‌توپ یکسان است، ویژگی‌های رنگ‌آمیزی تقریباً یا کاملاً با اپی‌توپ مورد نظر آنتی‌ژن یکسان است و بنابراین تشخیص آن بسیار دشوار است (۱۸). در برخی موارد، تعیین اینکه آیا واکنش‌پذیری ناشی از اپی‌توپ مشترک (واکنش متقابل) است یا اپی‌توپ حاصل از اتصال متقابل پروتئین هنگام تثبیت با آلدئیدها، دشوار است (۳، ۱۹). رنگ‌آمیزی پس‌زمینه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به دلیل غیرخاص بودن Igs کاهش می‌یابد (مایع آسیت) یا وجود ندارد (مایع رویی کشت سلول). آنتی‌بادی‌های مونوکلونال خرگوش نیز به صورت تجاری موجود است. تولید آن‌ها توسط آنتی‌بادی‌های توسعه داده‌شده آسان شده است (۲۰، ۲۱). مزیت مونوکلونال‌های خرگوش نسبت به مونوکلونال‌های موش، میل بیش‌تر آن‌ها، سازگار بودن برای استفاده در بافت‌های موش بدون روش‌های خاص، افزایش ویژگی در برخی موارد و جلوگیری از روش‌های بازیابی آنتی‌ژن است (۲۲-۲۴).

جدول ۲. مزایای آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و پلی‌کلونال.

منبع	آنتی‌بادی پلی‌کلونال	آنتی‌بادی مونوکلونال
تمایل	متغیر (هم زیاد و هم کم)	بدون تنوع
میزان حساسیت	بالا	کم تا متوسط
اختصاصی	کم به زیاد	بالا
محتوای ایمونوگلوبین غیر مرتبط	زیاد (۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)	مایع رویی سلول: هیچ
الزامات تثبیت	گسترده	محدود
اثرات تثبیت	چندگانه	یگانه
تحمل تثبیت	بالا	پایین
همگنی	تنوع دسته‌ای	بدون تغییر دسته‌ای *
هزینه	متوسط	بالا

* برای مایع آسیت، برخی از تغییرات در دسته‌ها وجود دارد.

عرضه آنتی‌بادی‌های (Abs) تجاری

مقدار اطلاعات در کاتالوگ‌های تجاری در مورد هدف قرار دادن آنتی‌بادی مورد نظر برای همان آنتی‌ژن بسته به تولیدکننده بسیار متفاوت است. ارائه این اطلاعات بسیار رایج شده است، به‌ویژه توسط شرکت‌های متخصص در تولید آنتی‌سرم که شامل اطلاعات زیر است:



فرمت یا شکل آنتی بادی آنتی بادی (به عنوان مثال، سرم خالص، کامل، رویی، ascites، ایزوتایپ ایمونوگلوبین)، میزبانی که در آن آنتی بادی تولید شده (به عنوان مثال، موش، خرگوش)، غلظت پروتئین، ایمونوژن استفاده شده (از جمله اپی توپ و وزن مولکولی، در صورتی که شناخته شده باشد) واکنش گونه (به عنوان مثال، انسان، موش، دسته‌ای که شناخته شده نیستند)، مکان‌یابی سلولی (به عنوان مثال، سیتوپلاسمی، غشایی، هسته‌ای)، بافتی که جهت کنترل مثبت توصیه می‌شود، کاربری مورد نظر (به عنوان مثال، رسوب ایمنی، وسترن بلات، جاذب ایمنی مرتبط با سنجش آنزیم، ایمونوهیستولوژی-فرمالین/پارافین و منجمد) و دیگر جزئیات مرتبط.

بسیاری از شرکت‌ها همچنین تصاویری از واکنش ایمنی در کاتالوگ‌های خود قرار می‌دهند. توصیه می‌شود که برای اطلاعات بیش‌تر در مورد واکنش‌پذیری تحت شرایط خاص (تثبیت فرمالین) یا واکنش متقابل گونه که در کاتالوگ مشخص نشده است، با سازنده تماس بگیرید.

داده‌های دیگری که معمولاً از تولیدکنندگان آنتی‌سرم‌ها در دسترس نیستند شامل میل ثابت آنتی‌بادی‌ها و احتمال واکنش متقابل با سایر آنتی‌ژن‌ها هستند (به عنوان مثال، سروتیپ‌های (serotypes) ویروس‌ها، دیگر ویروس‌ها یا باکتری‌های مرتبط، آنتی‌ژن‌های سلولی) که ممکن است در نتیجه پروسه تثبیت یا بازیابی آنتی‌ژن باشد.

جدول ۳. پروتکل استاندارد ایمونوهیستوشیمی ABC. *

۱. اسلایدها را از حالت ضدعفونی خارج کرده و آن‌ها را به آب دیونیزه برسانید.
۲. روش بازیابی آنتی‌ژن (به عنوان مثال، آنزیم، HIER)، در صورت نیاز
۳. اسلایدها را به آب غیریونیزه برسانید.
۴. پروکسیداز درون‌زا را مسدود کنید.
۵. مقاطع را بشوید و به آن‌ها بافر اضافه کنید.
۶. مسدود کردن زمینه یا بلاکینگ.
۷. محلول مسدودکننده اضافی را بردارید (آبکشی نکنید).
۸. اسلایدها را با آنتی‌سرم اولیه انکوبه کنید (آنتی‌سرم خرگوش) †
۹. اسلایدها را با بافر بشوید.
۱۰. با معرف ثانویه (ایمونوگلوبولین‌های ضدخرگوش بز بیوتینیل) انکوباسیون کنید.
۱۱. اسلایدها را با بافر بشوید.
۱۲. اسلایدها را با مجموعه اویدین-بیوتین (ABC) انکوبه کنید.
۱۳. اسلایدها را با بافر بشوید.
۱۴. تشخیص واکنش ایمنی با معرف‌های درحال توسعه (به عنوان مثال، DAB و H ₂ O ₂ برای پراکسیداز)
۱۵. مقاطع را با آب دیونیزه بشوید.
۱۶- هماتوکسیلین Mayer ضدلکه (رنگ تمیزی متضاد) بزنید.
۱۷. آب‌گیری و پوشش‌دهی لام‌ها.