IMM/PIR/80.1

دليـــل العمـــل

لطـــرائق تحضـــير
كواشـف المناعيـات والتشـخيص المناعي

الجزء الأول : تحضير الأمصال الضـدية
والمقترنات المتألقـة التـلوين
للغلوبلينـات المناعية البشـرية أيج ج و أيج م

منظمة الصحة العالمية
المكتب الإقليمي لشرق البحر المتوسط

دليـل العمـل

لطـرائق تحضـير

كواشـف المناعيـات والتشـخيص المناعي

الجـزء الأول : تحضير الأمصال الضديـة
والمقترنات المتألقة التلوين
للغلوبلينات المناعية البشرية أيج ج و أيج م

قام بإعداده لحساب منظمة الصحة العالمية

الدكتور ا. ر. برادويل و الدكتور د. كاتي

مختبر بحوث التشخيص المناعي

(مركز منظمة الصحة العالمية المتعاون لمراقبة جودة الكواشف المناعية)

جامعة برمنغهام ، المملكة المتحدة

والدكتور ف. هوبا

وحدة المناعيات

منظمة الصحة العالمية

منظمة الصحة العالمية

١٩٩٢

يقصد من استعمال الأسماء التجارية فى دليل العمل هذا مجرد التعريف بها ، دون أن يعني ذلك تحبيذها من قبل منظمة الصحة العالمية . كما أن الكواشف والأجهزة المذكورة في هذه الوثيقة هي تلك التي يستعملها المؤلفون وقسم المناعيات بجامعة برمنغهام بالمملكة المتحدة ، ولكن يمكن الحصول على كواشف مماثلة من موردين آخرين .

تمهيـد

إن استهلاك الكواشف المناعية الشائعة في أغراض التشخيص والدراسات المتصلة بها يكون عالياً جداً وباهظ التكلفة عندما يتحتم شراء هذه الكواشف من شركات تجارية . ويمكن تحضير بعض هذه الكواشف بسهولة نسبية في مختبرات مزوَّدة بما هو أساسي من أجهزة مناعية كيميائية ، ومواد كيميائية ، ومرافق للحيوانات .

وقد صممت هذه الوثيقة لتكون مرشداً عملياً في تحضير أمصال ضدية antisera ومقترنات متألقة التلوين fluorochrome conjugates للغلوبلينات المناعية immunoglobulins البشرية ج G و م M ، يمكن استعمالها في أغراض تشخيصية مثل : تقدير الأيج ج IgG والأيج م IgM في سوائل حيوية ، والرحلان المناعي immunoelectrophoresis ، واختبارات التألق المناعي immunofluorescence المباشرة وغير المباشرة ، الخ . وقد قسمت إلى عدة فصول تغطي الطرائق المناعية الكيميائية الأساسية اللازمة لتقييم المنتجات ، والإجراءات الفعلية لتنقية المستضدات antigens وتحضير الأمصال الضدية أو المقترنات أو كليهما ، بالإضافة إلى اختبارات لمراقبة الجودة . ولتسهيل المراجعة أضيفت قائمة مفهرسة بالأجهزة والكواشف ومواد أخرى في الملحق . ويدرك المؤلفون أنه يمكن استعمال اختبارات أخرى وطرائق بديلة ، ولكن الإجراءات الموصوفة هنا تمثل طرائق بسيطة تطبَّق بنجاح في مختبراتهم الخاصة .

وهذا الدليل هو الأول من سلسلة تقوم وحدة المناعيات بمنظمة الصحة العالمية بالتخطيط لإصدارها لمساعدة المختبرات في تحضير كواشف تشخيصية بسيطة . وكما هو مذكور في النص ، يمكن أن تزوِّد وحدة المناعيات بمنظمة الصحة العالمية ، عند الطلب ، بالكواشف اللازمة لاختبارات مراقبة الجودة ، مثلاً : معايير standards لتقدير الأيج ج و الأيج م البشريين ، وأمصال ضدية ومقترنات مرجعية ، وخرزات مغلَّلة بالأيج ج و الأيج م ، الخ . بالإضافة إلى ذلك يمكن عمل ترتيبات لكي ترسل المختبرات منتجاتها إلى مراكز معيَّنة لاختبارات مراقبة الجودة .

اختصرات المستعملة

Kg	كغ	=	كيلو غرام
g	غ	=	غـرام
mg	مغ	=	ميليغرام
ug	مكغ	=	مكروغرام
cm	سم	=	سنتيمتر
mm	مم	=	ميليمتر
L	ل	=	لتـر
ml	مل	=	ميليلتر
ul	مكل	=	مكرولتر
°C	س°	=	سلزيوس (درجة مئوية)
M	مولي	=	مولي
MW	و.ج	=	وزن جزيئي
nm	نم	=	نانومتر = طول الموجة
IgA	أيج أ	=	غلوبلين مناعي أ
IgG	أيج ج	=	علوبلين مناعي ج
IgM	أيج م	=	غلوبلين مناعي م
Fc	فث	=	الجزء المتبلور من الغلوبلين المناعي Fragment c of immunoglobulin
DEAE	دياء	=	داي إيثيل أمينو إيثان Diethylaminoethane

المحتـــوى

الصفحة

الفصل الأول : الطرائق المناعية الكيميائية الأساسية ٧

١ ــ الانتشار المناعي المتشعع ٧
٢ ــ الانتشار المناعي المتشعّع العكسي ١٢
٣ ــ الرحلان المناعي ١٣
٤ ــ الانتشار المناعي ١٧
٥ ــ الرحلان المناعي الثنائي البعد ١٨

الفصل الثاني : تحضير المستضدات والأضداد ٢٣

٦ ــ الدِيال باستعمال أنابيب الفيسكينغ ٢٣
٦ ــ ١ ديال المصل لتنقية الأيج ج على عمود الدياء ٢٣
٦ ــ ٢ ديال الأيج ج للهضم بالبابائين ٢٤
٦ ــ ٣ تركيز البروتينات باستعمال أنابيب الديال ٢٥
٧ ــ الاستشراب الديائي للمصل الكامل لتحضير الأيج ج ٢٧
٨ ــ تجزيء ماكروغلوبلين المصل باستعمال السيفاكريل scphacryl الفائق النعومة ..... لتنقية الأيج م جزئياً ٢٨
٩ ــ نزع الملح من محلول بروتيني على السيفاديكس G 25 ..... ٣٠
١٠ ــ تحضير فث ــ أيج ج من الأيج ج بالهضم بالبابائين ٣٣
١٠ ــ ١ تحضير مستضد فث ــ أيج ج للتمنيع ٣٤
١١ ــ تحضير فث ــ أيج م بالهضم بالتربسين في درجة حرارة عالية ٣٤
١١ ــ ١ تحضير مستضد فث ــ أيج م للتمنيع ٣٥
١٢ ــ تمنيع وفَصْد الحيوانات ٣٧
١٢ ــ ١ اختيار الحيوانات ٣٧
١٢ ــ ٢ التمنيع ٣٧
١٢ ــ ٣ فَصْد الحيوانات ٣٨
١٣ ــ فصل واختبار وتجهيز الأمصال الضدية ٣٩
١٣ ــ ١ فصل المصل ٣٩
١٣ ــ ٢ اختبارات مراقبة الجودة ٤٠
١٣ ــ ٣ امتزاز الأضداد الملوِّثة ٤١
١٣ ــ ٤ إنتاج جزء غني بالأيج ج من المصل الضدي ٤٤
١٣ ــ ٥ التجفيد (التجفيف بالتجميد) ٤٤

١٤ ــ تحضير مصل ضدي لجميع مكونات المصل البشري الكامل ٤٧

الفصل الثالث : تحضير المقترنات المتألقة التلوين ٤٧

١٥ ــ اقتران الغلوبلينات المناعية ٤٧
١٦ ــ تجزيء المقترنات على الدياء سلُولوز DEAE ٤٩
١٧ ــ اختبارات مراقبة الجودة ٥٠
١٧ ــ ١ تعيين عيار ضدي كاف للمقترن ٥٠
١٧ ــ ٢ تعيين نسبة وسم الملون المتألق إلى البروتين للمقترن ٥١
١٧ ــ ٣ اختبار الملون للتألق الطليق في المقترنات المحفوظة ٥٢
١٧ ــ ٤ اختبار نوعية وشدة المقترنات المتألقة التلوين بنظام
المستضد المثبت (كرات الركيزة المستضدية المحددة) ٥٢

الفصل الرابع : طرائق مكمِّلة ٥٧

١٨ ــ تحضير واستعمال مازات مناعية لا ذوّابة ٥٧
١٨ ــ ١ أعمدة السيفاروز ــ المستضد ٥٧
١٨ ــ ٢ مازّات مناعية متصالبة الروابط لمستضد بروتيني ٥٧
١٩ ــ تحضير خرزات سيفاروزية مقترنة بمستضد لاختبار مقترنات الضد المتألق ٥٨
٢٠ ــ تحضير دياء السلولوز للاستشراب على العمود ٥٨

ملحــق

جدول الدائرة الفسفاتية ٦٠
قائمة مفهرسة للكواشف والأجهزة والمواد ٦١

الفصـل الأول

الطرائق المناعية الكيميائية الأساسية

توجد خمس طرائق مناعية كيميائية أساسية لتقييم المستضدات والأضداد المنتجة .

١ ــ الانتشار المناعي المتشعّع radial immunodiffusion
٢ ــ الانتشار المناعي المتشعّع العكسي
٣ ــ الرحلان المناعي immunoelectrophoresis
٤ ــ الانتشار المناعي
٥ ــ الرحلان المناعي الثنائي البُعد

١ ــ الانتشار المناعي المتشعّع (طريقة مانتشيني Mancini)

الاستعمال ــ التقدير الكمّي لبروتينات المصل

مقدمـة :

توضع المستضدات المطلوب تقديرها الكمّي في بئر مخروم في هُلامة أغاروز agarose gel . وتحتوي الهلامة على مصل ضدي أحادي النوعية monospecific (مثلا ضد ــ أيج ج أو ضد ــ أيج م) . ينتشر المستضد خلال الأغاروز وينفاعل مع المصل الضدي مكوِّناً راسباً مرئياً . ويكون حجم هذا الراسب الحلقي متناسباً مع مقدار المستضد . وباستعمال معايير مناسبة يمكن تعيين تركيز أيّ مستضد .

المـواد:

أجـهزة كبيـرة :

حمام مائي
منضدة أفقية وميزان تسوية
ميزان صفر–١٠٠ غ بحساسية ٠,٠٠١ غ
أحواض الرحلان الكهربائي
محراك stirrer مسخَّن ومَغَانط
مقياس الباهاء pH (اختياري) pH meter

أجهزة صغيرة :

صفائح زجاجية ٨ سم × ٨ سم
مخرمات الهلامة
ممصات هاملتون الصغروية ١٠ مكل، ١٠٠ مكل
ممصات فين (Finn) (مختلفة) ٥٠–٢٠٠ مكل
(مع أسَلات tips) ٢٠٠–١٠٠٠ مكل
أداة مص من الحنفية
عدسة عينية مدرَّجة
أوراق ترشيح وائمان رقم ١
مناشف ورقية
مماسك الشرائح الزجاجية
حوض لتلوين البروتينات
ورق رسم بياني

كيماويات :

أغاروز منخفض التناضح الداخلي endosmosis	١٠٠ غ
باربيتون barbitone	٢٠٠ غ
باربيتون صوديوم	٢٠٠ غ
آزيد الصوديوم	٥٠ غ
بولي‌ائيلين غليكول (و ج MW ٦٠٠٠)	١٠٠ غ
ميثانول	٢ ل
حمض الأسيتيك الجليدي	١ ل
زرقة كوماسي Coomassie اللامعة R	

كواشف مناعية (مختبر سيوارد Seward)

مصل معياري — أيج ج ، أيج أ ، أيج م معيّرة
معايير عالية — أيج ج ، أيج أ ، أيج م
أمصال ضدية للآتي : أيج ج
أيج أ
أيج م
مصل بشري كامل

أمصال اختبار

الطريقـة

الكواشف :

(ا) دارئة الباربيتون ، ٠,٠٥ مولي ، باهاء pH ٨,٦ (٥ ل)

يذاب ٩,٢١ غ باربيتون في ٣ ل ماء مقطر ، ثم يضاف ٥١,٥٤ غ من باربيتون صوديوم وتمزج حتى تذوب ، ثم يضاف ٥,٠ غ من آزيد الصوديوم ويكمل المحلول إلى ٥ لتر . تحقق من الباهاء واضبطها إذا لزم الأمر .

(ب) ملوِّنات البروتين

يحضَّر محلول التلوين بمزج ماء وحمض أسيتيك وميثانول بنسبة ٥:١:٥ ليكون حجمه ٢,٥ لتر . يضاف إلى لتر واحد ٥,٠ غ من زرقة كوماسي اللامعة R ويترك المزيج في حركة طوال الليل . وهذا هو محلول تلوين البروتين . ويكون الباقي وقدره ١,٥ ل هو محلول إزالة التلوين .

(ج) هلامة الأغاروز :

يضاف ٥,٠ غ أغاروز إلى ٥٠٠ مل من دارئة باربيتون ساخنة ، ويحرَّك جيداً حتى يتم الذوبان . يضاف ١٥,٠ غ بولي‌اثيلين غليكول ، ويُنتَظَر حتى يذوب ، ثم يقسم المزيج في أوعية بسعة ١٠٠ مل ويترك ليبرد .

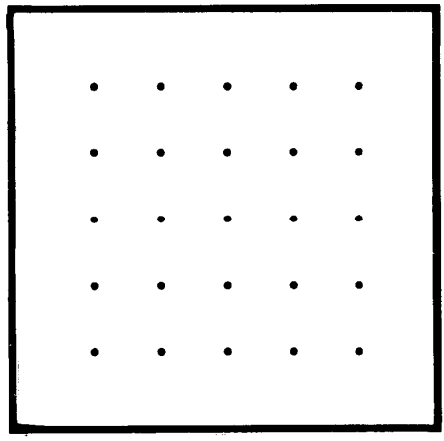
تحضير صفائح هلامة الأغاروز

يسخن مقدار ١٠٠ مل من الأغاروز المجمد في دورق حتى يذوب . وعندئذ يُبرَّد إلى درجة ٥٦°س في حمام مائي مسخَّن . يوضع مقدار ٩,٦ مل في أنبوب اختبار بمص ويضاف المصل الضدي . لتقديرات أيج ج يضاف ٥٠ مكل من ضد ج م Fc ــ أيج ج IgG ، ولتقديرات أيج م يضاف ٣٥مكل من ضد فث ــ أيج م IgM-Fc (توجد تفاصيل هذا في Immunostics Technical Products Information - Seward Laboratory) .

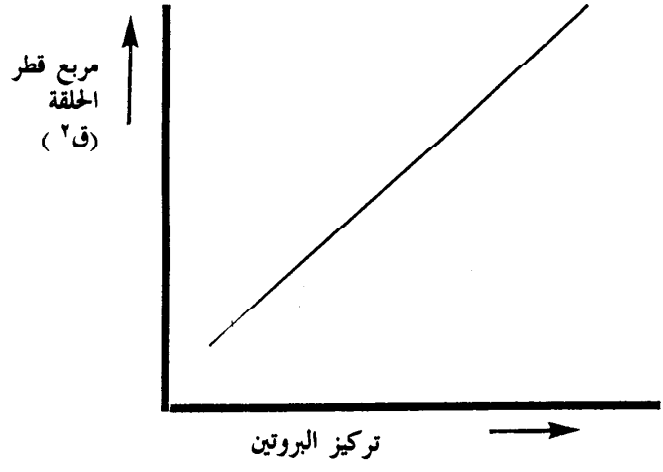
يمزج بقَلْب الأنبوب عدة مرات مع الحرص على عدم تكوين فقاعات.يُصب أغاروز المصل الضدي على شريحة زجاجية على الصفيحة المستوية أفقياً وتزال أية فقاعات بلمسها بقاع أنبوب الاختبار . ويجب أن تصبح الهلامة مستوية تماماً . فإذا لم تكن كذلك ، يعاد صب الصفيحة مرة أخرى .

آبـار المسـتضد

توضع الصفيحة الزجاجية على المرصاف template (الشكل ١) وتُنزع الهلامة بالخرمة وجهاز المص . ويجب أن تكون الآبار مستديرة تماماً وعلى أبعاد متساوية وتتبع نمطاً منتظماً ليسهل تمييزها . ويجب أن تكون المسافة بين البئر والأخرى حوالي ١,٥ سم .



الشكل ١



الشكل ٢

تطبيق العيِّنــة

في حالة الأيج ج يخفف المصل المعياري في دارئه باربيتون : ١ + ٢٠ ، ١ + ٥٠ ، ١ + ٢٠٠ ، والأمصال المفحوصة ١ + ١٠٠ . يضاف بعناية ٥ مكل من كل تخفيف في الآبار بواسطة زرّاقة هاملتون ١٠ مكل . وفي حالة الأيج م يضاف المعيار بدون تخفيف وبعد التخفيف ١ + ١ ، ١ + ٤، ١ + ٩ ، والأمصال المفحوصة مخففة ١ + ٤ .

توجد التفاصيل في المنشورة التالية : Immunostics Technical Product Information, Seward Laboratory .

الانتشـــار

يُسمح للهلامة المعبأة بالانتشار طوال الليل في أحواض الرحلان الكهربائي .

وبعد ترك الهلامات طوال الليل تكون حلقات الانتشار مرئية . ويمكن قراءتها باستعمال عدسة عينية مدرَّجة ، أو يمكن تجفيفها بالضغط وتلوينها لعمل تسجيل دائم .

ولكي يتم التجفيف بالضغط ، توضع الهلامات على سطح مستوٍ ، وتوضع فوقها بعناية أوراق ترشيح رطبة ثم عدة طبقات من مناشف ورق الترشيح الرطبة ثم ثقل بوزن ١ كغ . وتترك على هذا الوضع بضع ساعات .

يُرفع الورق بعناية وتترك الهلامة المضغوطة تجف تماماً .

التلويــن :

توضع الصفائح المجففة في ملوِّن زرقة كوماسي اللامعة R لمدة ١٠ دقائق . ثم تغسل تحت الحنفية ثم يُزال تلوينها بمحلول إزالة التلوين حتى تصير الخلفية رائقة .

التقدير الكمي لحلقات البروتين

يقاس قطر حلقـات الأمصـال المعيـارية والأمصـال المفحوصـة لأقـرب ٠,١ مم ثم تـربَّع جميـع الأقطار (ق٢) وتوضع على رسم بياني لقيم ق٢ (الإحداثي العمودي) مقابل تركيز البروتين (الشكل ٢) .

تُقرأ تركيزات أيج ج و أيج م في العينات المجهولة من الرسم البياني .

تعليقـات

أ – يجب أن يتم إعداد المنضدة الأفقية بعناية وأن تُصب الهلامة بحيث تكون منبسطة تماماً ، للحصول على نتائج دقيقة .

ب – يجب وضع مقادير العينات بدقة في آبار مستديرة تماماً لضمان الدقة البصرية .

ج – يختلف وقت الانتشار تبعاً للحجم الجزيئي للمستضد . ففي حالة بروتين مثل الأيج م تلزم مدة أسبوع قبل أن يصير الانتشار كاملاً .

د – يجب تعيين مقدار المصل الضدي المطلوب عن طريق التجربة والخطأ .

هـ – حساسية هذه الطريقة ٥ مغ / ل . ودقتها حوالي ± ٥٪ .

٢ ــ الانتشار المناعي المتشعع العكسي

الاستعمال ــ قياس عيار الأمصال الضدية .

مقدمــة :

هذه الطريقة مماثلة بدرجة كبيرة لطريقة الانتشار المناعي المتشعع ولكنها تستعمل في قياس عيارات الأمصال الضدية . يضاف مصل معياري إلى الهلامة وتوضع الأمصال الضدية موضع الاختبار في آبار مخرومة في الهلامة . تنتشر الأمصال الضدية خلال الهلامة وتتحد مع المستضد الملائم . وتتناسب العيارات مع قطر الحلقة .

المــواد

كما سبق ذكره في الانتشار المناعي المتشعع .

الطــريقة

تستعمل نفس دارئة الباربيتون ، وهلامة أغاروز ١٪ ، وملوّن للبروتين ، ومزيل للتلوين كما في طريقة الانتشار المناعي المتشعع .

تحضير الهلامــة :

يكون بنفس الطريقة المتبعة في طريقة الانتشار المناعي المتشعع ولكن يضاف مصل معياري إلى الهلامة بدلاً من المصل الضدي :

في حالة الأيج ج يضاف ٢٠ مكل من المصل لكل ٩,٦ مل من الهلامة .

وفي حالة الأيج م يضاف ٣٠٠ مكل من المصل لكل ٩,٦ مل من الهلامة .

تطبيق العينة

تخفف الأمصال الضدية للأيج ج والأيج م (سيوارد Seward) : ١ + ١ ، ١ + ٢ ، ١ + ٤ في ملحي فسفاتي مدروء . يطبق ٥ مكل من المصل الضدي غير المخفف ومن كل تخفيف في الآبار المعيارية .

يوضع في آبار الاختبار ٥ مكل من كل من خمسة أمصال ضدية مختلفة غير مخففة ومزدوجة باستخدام المرصاف template المبين في الشكل ١ .

يترك الانتشار يحدث لمدة ١٨ ساعة وتقرأ النتائج كما في طريقة الانتشار المناعي المتشعع .

تعليقات

أ – تنطبق على هذه الطريقة نفس التعليقات التي سبقت على طريقة الانتشار المناعي المشعع .

ب – تسمح هذه الطريقة بتقدير كمّي دقيق لعيارات الأمصال الضدية . وعندما يكون تركيز المستضد معلوماً ، فإنه يمكن تعيين العيار المطلق بالإضافة إلى العيار النسبي للأمصال الضدية الأخرى .

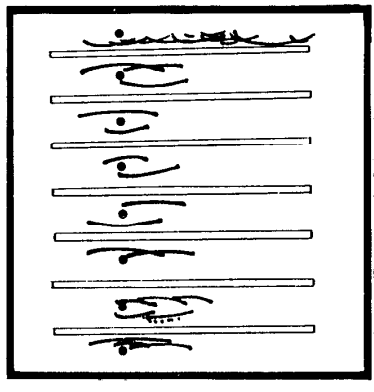
ج – يمكن أن تحدث حلقات ترسيب زائفة إذا لم يطبق المصل المعياري بطريقة جيدة .

٣ ــ الرحلان المناعي Immunoelectrophoresis

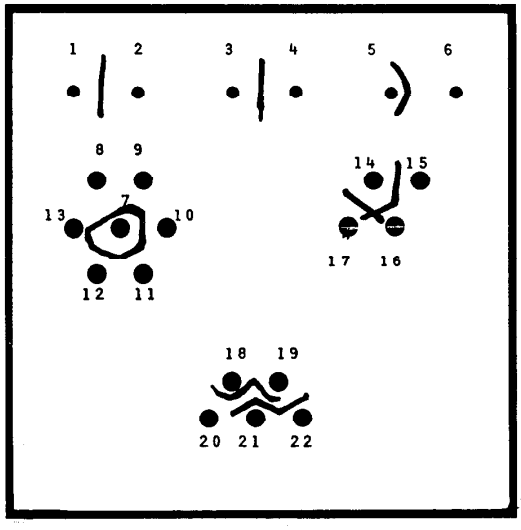
الاستعمال ــ تمييز تفاعلات المستضد مع الضد ، واختبار نقاوة المستضدات والأضداد .

مقدمـــة :

تُصب هلامة الأغاروز على شريحة زجاجية . تُحفَر فيها آبار وتُرَف troughs (الشكل ٣) . توضع المستضدات في الآبار ويسمح لها بالرحلان لفصل مكوِّناتها المختلفة تبعاً لشحناتها . يوضع المصل الضدي في التُرْفة trough المجاورة للآبار ، فيحدث انتشار المستضد والضد . وعندما يتفاعل الاثنان مع بعضهما تتكون أقواس المرسِّبات precipitin . ويمكن تحديد نوعها باستخدام مستضدات وأضداد معلومة .



الشكل ٣



الشكل ٤

المفتـاح :

(١) ٢ مكل مصل
(٢) ١٠ مكل ضد فث ــ أيج ج
(٣) ٤ مكل مصل
(٤) ١٠ مكل ضد فث ــ أيج أ
(٥) ٥ مكل مصل
(٦) ١٠ مكل ضد فث ــ أيج م
(٧) ٥ مكل ضد فث ــ أيج ج
(٨) ١٠ مكل مصل
(٩) ١٠ مكل مصل ١ + ١ دائرة
(١٠) ١٠ مكل مصل ١ + ٣ دائرة
(١١) ١٠ مكل مصل ١ + ٧ دائرة
(١٢) ١٠ مكل مصل ١ + ١٥ دائرة
(١٣) ١٠ مكل مصل ١ + ٣١ دائرة
(١٤) ٢ مكل مصل
(١٥) ١٠ مكل ضد فث ــ أيج ج
(١٦) ١٠ مكل ضد فث ــ أيج ج
(١٧) ٥ مكل ضد فث ــ أيج أ
(١٨) ٢ مكل مصل
(١٩) ٢ مكل مصل
(٢٠) ٥ مكل ضد فث ــ أيج م
(٢١) ١٠ مكل مزيج ضد أيج م وأيج ج
(٥ مكل من كل منها)
(٢٢) ٥ مكل ضد أيج ج

المـــواد

كما في طريقة الانتشار المناعي المتشعع

يضاف إلى ذلك :

حاشـدة تيار للرحلان الكهربائي
أحواض وحوامل قضبان الرحلان الكهربائي
صفيحة وخراطيم تبريد الرحلان الكهربائي

مواد صغيرة

ضمادات جراحية
ممصات زجاجية وحَلَمات مطاطية وحيدة الاستعمال
مرصاف template للرحلان المناعي
نِصَال للقطع
زرقة البروموفينول ـــ ١ غ

كيماويات مناعية

مستضدات
مستحضر أيج ج
ناتج هضم أيج ج بالبابائين
مستحضر أيج م
ناتج هضم أيج م بالتربسين
مصل بشري كامل

أمصال ضدية (مختبر سيوارد) لما يأتي :

فث ـــ أيج ج
أيج ج الجزئي الكامل
فث ـــ أيج م
أيج أ
ضد المصل الكامل
ضد قليل النوعية أيج ج ، أيج أ ، أيج م

الطـــريقة

تستعمل نفس دارئة الباربيتون ، وهلامة الأغاروز ١٪ ، وملوِّن البروتين ، ومزيل التلوين كما في طريقة الانتشار المناعي المتشعع .

تحضير الهلامة

يوضع بالممص ٩,٦ مل من الأغاروز المذاب على صفيحة زجاجية ٨ سم × ٨ سم ويترك حتى يجمد .

تُحفَر الآبار والتُرَف troughs كما هو مبين في المرصاف (الشكل ٣) . يجب أن تكون التُرَف بعرض حوالي ٢ مم .

الإعداد للرحلان الكهربائي

يُملأ كل جانب من حوض الرحلان الكهربائي بدارئة الباربيتون . تُوَصَّل صفيحة التبريد بمَدَد الماء البارد ويسمح بجريان الماء ببطء شديد . تقطع فتائل الضمادة ٢٥ سم × ٨ سم وتُغمس في الدارئة وتُعصر لإزالة المحلول الزائد .

بعد ذلك توضع صفيحة الرحلان المناعي على صفيحة التبريد ، وتوضع المستضدات في الآبار كما هو مبين في الشكل (٣) . تُوصَّل الفتائل وتُدار حاشدة التيار لتعطي حوالي ٨٠ فولط عبر الصفيحة (يتم التحقق من ذلك باستعمال مسبار كهربائي) . ثم توضع بلورة من زُرقة البروموفينول بجانب البئر الأخيرة وتلاحظ حركتها . (أ) للتحقق من أن التيار يسري في الاتجاه الصحيح ، (ب) ولإيقاف التيار عندما تكون البقعة الزرقاء قد تحركت $\frac{٣}{٤}$ المسافة تجاه نهاية التُرفة .

تُرفع الصفيحة ويوضع حوالي ١٥٠ مكل من كل مصل ضدي في إحدى التُرَف حتى تصير ممتلئة تقريباً . ثم يُعاد وضع الصفيحة على صفيحة التبريد لحوض الرحلان الكهربائي طوال الليل .

يجب أن تكون أقواس المرسبات مماثلة لما في الشكل ٣ . تُسَجّل النتائج .

توضع الصفيحة في ماء مقطر لمدة ١٦ ساعة ثم تجفف بالضغط وتلوَّن للحصول على تسجيل دائم ، كما سبق وصفه في طريقة الانتشار المناعي المتشعع .

تعليقات

أ – يتوقف نمط الخطوط على التركيزات النسبية للمستضد والضد . ويمكن مع اكتساب الخبرة تمييز ٢٠ نمطاً مستضدياً مختلفاً .

ب – تتوقف حركة البروتينات أثناء فترة عمل الرحلان الكهربائي على نوع الهلامة . فالهلامات العالية التناضح الداخلي تسبب حركة أقل للبروتين .

ج – أكثر ما تكون الاستفادة من الطريقة في اكتشاف بروتينات ملوثة زهيدة .

د – يمكن إجراء تقييم مفيد لبروتينات النقيوم myeloma بهذه الطريقة .

٤ ــ الانتشار المناعي (طريقة أوختر لوني Ouchterlony)

الاستعمال ــ وجود تفاعلات مستضدية / ضدية ، واختبار الهوية المستضدية .

مقدمـــة :

تصب هلامة الأغاروز على صفيحة زجاجية ، تُجْتَفَر آبار في الأغاروز . تنتشر المستضدات والأضداد إحداها في اتجاه الأخرى وتحدث خطوط ترسب حيثما تفاعل الاثنان .

المـــواد :

كما في طريقة الانتشار المناعي المتشعع .

الطريـقة :

تحضير الهلامة

يوضع بمص ٩,٦ مل من الأغاروز المذاب على صفيحة زجاجية ٨ سم × ٨ سم . تُحْتَفَر الآبار باستخدام الأحجام المشار إليها في المرصاف (الشكل ٤) .

تُملأ الآبار بالمستضدات والأضداد تبعاً للتفاصيل المبينة في الشكل ٤ . ثم توضع الصفيحة في غرفة رطبة لمدة ١٨ ساعة .

يبين الشكل (٤) نتائج الاختبارات . يتوقف موضع الرسابات precipitates المناعية على تركيز البروتين والحجم الجزيئي .

تسجيل النتائج : يتم ذلك بتجفيف الصفائح بالضغط وتلوينها كما في الانتشار المناعي المتشعع .

النتائج :

١ ــ التفاعلات بين الآبار ١ ، ٢ و ٣ ، ٤ و ٥ ، ٦ تبين أن تركيزات المستضد والضد تصل إلى التكافؤ وتعطي مستوى مرسبة precipitin واضحاً .

٢ ــ التفاعلات بين البئر ٧ والآبار ٨ ــ ١٣ توضح أثر المستضد الزائد والضد الزائد .

٣ ــ تفاعلات المرسبة بين البئر ١٤ والآبار ١٥ ــ ١٧ توضح تفاعلات إثبات هوية الأيج ج ونفي هوية الأيج أ .

٤ ــ توضح الآبار ١٨ ــ ٢٢ كيف يمكن تعيين نوعية مزيج من الأضداد باستخدام أمصال ضدية نوعية .

التعليقـات

أ – الطريقة حساسة جداً ولكن يجب أن تكون المستضدات والأضداد بالتركيزات الصحيحة وإلا فسوف تختفي خطوط المرسبات .

ب – الجزيئات الكبيرة مثل الأيج م تنتشر ببطء ، بحيث تكون خطوط التفاعل دائماً قريبة من البئر الأصلية .

ج – هذه هي أفضل طريقة لاختبار الهوية المستضدية ، ويجب استعمالها لاختبار جميع الأمصال الضدية الجديدة .

٥ ــ الرحلان المناعي الثنائي البعد
Two-Demensional Immunoelectrophoresis

الاستعمال – تحضير المستضدات
اختبار نقاوة المستضدات والأضداد
التقدير الكمّي للبروتينات
إظهار معقّدات هضم المستضدات

مقدمـــة :

هذه الطريقة مماثلة للرحلان المناعي . تُفصل المستضدات أولاً بالرحلان الكهربائي ، ثم توضع بجانبها هلامة تحتوي على ضد ، وتجرى عملية رحلان كهربائي للمستضدات في الضد . تحدث أقواس مرسّبات وتزال جميع البروتينات الأخرى بالرحلان الكهربائي . تحتوي أقواس المرسبات على مستضدات وأضداد نقية ويمكن استخدامها في التمنيع .

المـــواد :

كما في الانتشار المناعي والرحلان المناعي .

الطريقـــة :

تحضير الهلامة

يوضع بممص ٩,٦ مل من الأغاروز المذاب على شريحة زجاجية وتترك لتجمد .

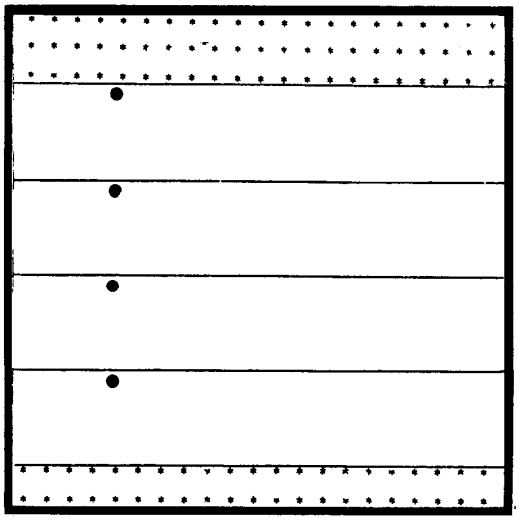
يقطع الأغاروز إلى أقسام كما هو مبين في المرصاف (الشكل ٥) وتزال الأقسام الطرفية من الأغاروز .

بعد ذلك تقطع الأقسام الباقية وتُفصل باستعمال نصل المقطاع . وتقطع آبار سعة ٢ مكل في كل شريط أغاروز قرب أحد طرفيه . يوضع ١ مكل من المصل وتُعرَّض الصفيحة للرحلان الكهربائي كما في الرحلان المناعي (انظر اعلاه) . وتستعمل زُرقة البروموفينول بمثابة راسم marker وتُرَحّل البروتينات بالرحلان الكهربائي حتى تصل البقعة الزرقاء إلى مسافة ثلثي شريط الأغاروز

وأثناء ذلك يُمزج مقدار ٧,٥ مل من الأغاروز المذاب في درجة ٥٦° س بمقدار ٥٠٠ مكل من ضد المصل الكامل أو ٢٠٠ مكل من ضد فث ــ أيج وتترك في درجة ٥٦° س . وبعد رفع شرائط الأغاروز من الصفيحة الزجاجية ، توضع كل واحدة على صفيحة زجاجية منفصلة ٨ سم × ٨ سم (الشكل ٦) .

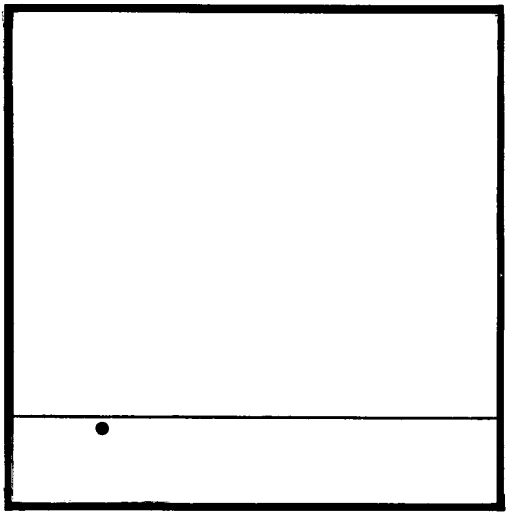
وتصب مزائج المصل الضدي / والهلامة بجانب كل شريحة هلامية مع الحرص على أن تتاخم الهلامة البعد الأول للشريط . وعندما تجمد الهلامة المضافة يعاد وضعها في حوض الرحلان الكهربائي لتحريك المستضدات مرة أخرى تجاه الآنود anode . ويخفض التيار إلى ٢٠ فولط (٢,٥ فولط لكل سم من الصفيحة) . وبعد الرحلان طوال الليل (لمدة حوالي ١٦ ساعة) ، تجفف الصفائح بالضغط وتلوَّن كما سبق وصفه .

يُزال هذا القسم



يُزال هذا القسم

الشكل ٥



الشكل ٦

التعليقـــات

أ – لا يلزم التبريد في البُعد الثاني للرحلان الكهربائي .

ب – عندما تستعمل هذه الطريقة لتحضير مستضدات ، يجب الحرص على النظافة التامة طوال الوقت . فيجب ألا تحتوي أحواض الدارئة على أية بروتينات خارجية ، ويجب ترحيل البعد الثاني لمدة ٢ ــ ٣ أيام لإزالة جميع البروتينات الملوِّثة

ج – وعند إجراء اختبار لنقاوة مستضد أو ضد ، تستعمل عشرة أمثال التركيزات العادية للمستضد والضد .

د – يلزم توافر خبرة واسعة لتقييم نقاوة البروتين والمعقّدات complexes البروتينية والأنماط الشاذة .

الفصل الثاني

تحضير المستضدات والأضـــداد

يتطرق هذا الفصل إلى تنقية الأيج ج والأيج م وطرائق تحضير أمصال ضدية مُناوعة للصنف class-specific . وتوجد عدة طرائق لمحاولة عمل ذلك ولكن الطرائق المبينة هنا بسيطة وسريعة .

يحتاج المرء لكي يقوم بتحضير أحسن أمصال ضدية ، إلى عدة ميليغرامات من الحِتّة (فث Fc) ومُناوِعة للصنف class specific مطلقة النقاوة من كل جزيء غلوبلين مناعي . ولا يمكن تحقيق هذا من الناحية العملية . ولذلك يجب البحث عن حل وسط . ويتم في هذا الكتيب عمل تنقية جزئية لكل من الأيج ج والأيج م باستخدام طريقة الاستشراب على العمود column chromatography . يحضَّر الجزء فث (Fc) بالهضم الحال للبروتين ثم ترسيب الحتّة المتبلورة (فث Fc) بمصل ضدي وحيد النوعية monospecific . وبهذه الطريقة تزال أية بروتينات ملوِّثة . وعندما تتم هذه العملية بعناية فسوف يؤدي حقن هذه المادة إلى إنتاج أمصال ضدية للغلوبلينات المناعية وحيدة النوعية ومناوعة للصنف . وتستعمل الطرائق الموصوفة في الفصل الأول لرصد التقدم في تحضيرالمصل الضدي .

٦ ــ الدِيال Dialysis باستعمال أنابيب الفيسكينغ Visking

مقدمـــة

تلزم دواريء ومحاليل ملحية مختلفة لعمليات تجزيء البروتينات المختلفة . وتستخدم أنابيب الديال في تغيير هذه الأملاح . وهذه الأنابيب تسمح بمرور الجزيئات الصغيرة (الوزن الجزيئي أقل من ١٠,٠٠٠) ولا تسمح بمرور جزيئات البروتين الكبيرة (الوزن الجزيئي ٥٠,٠٠٠ ــ ١,٠٠٠,٠٠٠)

٦ ــ ١ ديال مصل لتنقية الأيج ج على عمود الدياء DEAE

مقدمة :

يُدال المصل مقابل دارئة فسفاتية ٠,٠١ مو (مولي) ، باهاء ٧,٢ لتحضيره للاستشراب الديائي DEAE .

المـواد

دارئة فسفاتية (انظر الملحق)
أنابيب فيسكينغ
مصـل ١٠ مل

الطـريقة:

دارئة فسفاتية ، باهاء ٧,٢ ، ٠,٠١ (انظر الملحق) : يمزج ٢٨ مل من محلـول خزيـن ٠,١ مو للفسفات الوحيدة الصوديوم HaH_2PO_4 مع ٧٢ مل من محلول جزين ٠,١ مو للفسفات الثنائية الصوديوم Na_2HPO_4 ، ويخفف المزيج إلى ١ لتر بالماء المقطر . يضاف ١ غ من آزيد الصوديوم كمادة حافظة . تحقّقْ من الباهاء pH واضبطها إذا لزم الأمر .

أنابيب فيسكينغ : تؤخذ قطعة بطول ١٠ بوصات (٢٥ سم) من أنبوب فيسكينغ ٣٢/١٨ ، تُرَطَّب بالماء المقطر . يُربط أحد الطرفين ثم يوضع ١٠ مل من المصل في الأنبوب ويُربط الطرف الآخر .

الدِيَال : يوضع كيس الدِيَال في ٢٠٠ مل من الدارئة الفسفاتية المحضَّرة . وتغيَّر الدارئة ٥ مرات قبل اليوم التالي .

تعليقـات

أ ـ من المهم عمل عدة تغييرات للدارئة الفسفاتية لضمان أن التركيز المولي للمصل صحيح .

ب ـ هذه الطريقة بطيئة . وهذا يعني أن بروتينات المصل تبقى بتماس دارئة منخفضة التركيز المولي لمدة طويلة . وفي هذه الحالة قد تترسب بعض البروتينات ترسباً لا رجعة فيه . ولهذا يجب عدم استمرار عملية الدِيَال أياماً عديدة ، ويجب إذا أمكن إجراؤها في درجة حرارة ٤° س (ثلاجة أو غرفة باردة) .

٦ ـ ٢ دِيَال الأيج ج للهضم بالبابائين

مقدمـة

يُدال محلول الأيج ج مقابل دارئة فسفاتية ٠,١ مو ، باهاء ٧,٠ لتحضيره للهضم بالبابائين .

المـواد

دارئة فسفاتية (انظر الملحق)
أنابيب فيسكينغ
أيج ج ١ مل (١٠ مغ / مل)

الطـريقة

الدارئة : يحضَّر ٥٠٠ مل من دارئة فسفاتية ٠,١ مو ، باهاء ٧,٠ ، امزج ١٩٥ مل من محلول الفسفات الوحيدة الصوديوم ٠,١ مو مع ٣٠٥ مل من محلول الفسفات الثنائية الصوديوم ٠,١ مو . تحقَّق من الباهاء واضبطها إذا لزم الأمر .

أنابيب فسكينغ: تستعمل قطعة بطول ٦ بوصات وقطر ٣٢/٨ كما سبق ذكره (في ٦ ــ ١) ، ويوضع فيها ١ مل من مستحضر الأنج ج .

الديال : يجرى الديال مقابل الدارئة مع التغيير ٥ مرات .

التعليقـات

كما سبق ذكره .

٦ ــ ٣ تركيز البروتينات باستعمال أنابيب الديال

مقدمـــة

هذه طريقة بسيطة لتركيز البروتينات ، ولكنها ليست بنفس مردود أو معوَّلية طريقة الخلايا المحرَّكة stirred cells أو طريقة الليف المجوَّف **hollow fibre** .

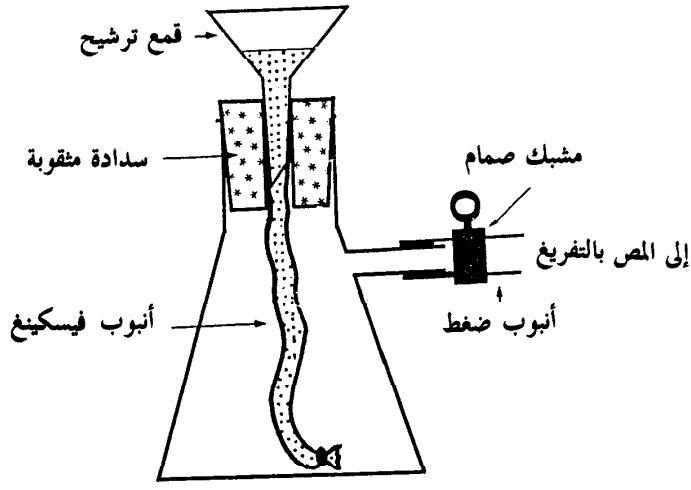
المـــواد

حوجلة بوخنز Buchner flask
أنابيب ضغط
مضخة مص
سدادة مثقوبة
قمع ترشيح
مشابك صمام
أنابيب فسكينغ ، ٣٢/٨ ، ٢ قدمان (٦٠ سم) .

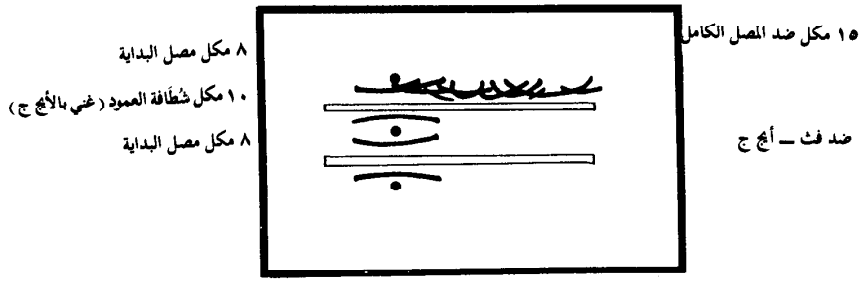
الطريقـة :

يوضع ٥٠ مل من محلول مصل مخفف في أنبوب فيسكينغ

يثبّت أنبوب فيسكينغ على قمع الترشيح باستخدام سدادة مطاطية كما هو مبين في الشكل ٧ . يطبّق المص من حنفية . يوقف المص بعد عدة دقائق بالغلق بمشبك الصمام ، ويسمح بحدوث الترشيح الفائق ultrafiltration . ويمكن إضافة أحجام أكبر من السائل عن طريق قمع الترشيح .



الشكل ٧



الشكل ٨

التعليقـات

أ – هذه الطريقة مفيدة في تركيز أحجام صغيرة من محاليل البروتين . وعندما يتعلق الأمر بأحجام أكبر من ٢٥٠ مل ، يستحسن استعمال طريقة الخلايا المحرَّكة أو الليف المجوف . ومثل هذه الأجهزة متاحة من عدة مصادر تجارية (مثلا شركة آميكون Amicon) .

ب – يجب إجراء الديال في درجة حرارة ٤° س (ثلاجة أو غرفة باردة) لو أمكن ذلك .

ج – يجب حفظ المحلول المركز بآزيد الصوديوم (١ غ / لتر) في درجة حرارة ٤° س أو بالتجميد العميق في درجة –٢٠° س

٧ – الاستشراب الديائي DEAE Chromatography للمصل الكامل لتحضير الأيج ج

مقدمـة

يوضع مصل بشري في عمود من الدياء DEAE المبادل للأنيونات في شروط تستَعْوِق بروتينات المصل على مَطرِس matrix العمود باستثناء الأيج ج الذي يَتجمع في شُطافة eluate العمود .

المـواد

دياء DEAE مبادل للأنيونات DEAE anion exchanger (ثنائيإثيل أمينوإيثان) Diethylaminoethane – واتمان DE52 (مستحضر من دياء السلولوز . توزينه equilibration وتعبئته في شكل عمود موصوفان في الطرائق المكملة ، ٢٠ ، صفحة ٥٥) .

دارئة فسفاتيّة ، ٠,٠١ مو ، باهاء ٧,٢ (انظر الملحق)

عمود استشراب ٢٠ سم × ١ سم

٥ مل مصل بشري ، تم ديالها مقابل دارئة فسفاتية ، ٠,٠١ مو ، باهاء ٧,٢ (انظر ٦ – ١)

الطريقـة

يُصب ٢٠ مل من روبة slurry الدياء في دارئه فسفاتية ، باهاء ٧,٢ ، في عمود استشراب تم وضعه عمودياً .

تترك شُطافة eluate الدارئة تجري في دورق ويُثابَر على إضافة الدارئة حتى يتوقف حدوث دكّ packing العمود ويكون ممتلئاً بالدياء إلى حوالي النصف . تُزال الدارئة الزائدة من العمود .

توضع بعناية طبقة من ٥ مل من المصل المُدال ويترك يتسرب في العمود .

توضع بعناية طبقة من دارئة فسفاتية ، ٠,٠١ مو ، باهاء ٧,٢ ويُحتفظ بالعمود ممتلئاً بهذه الدارئة .

تُرمى أول ٤ مل من العمود ، وتجمع الـ ١٢ مل التالية . يجب توزين هذا الجزء مقابل ملحي داريء فسفاتي باهاء ٧,٤ بالديال .

يُختَبَر الأيج ج المجموع بالرحلان المناعي كما هو مبين في الشكل ٨ .

تعليقـات

أ – إذا تم إجراء الاستشراب بعناية فإنه يمكن بهذه الخطوة البسيطة تحضير أيج ج نقي تقريباً .

ب – ويمكن تصعيد هذه العملية بسهولة لإنتاج مقادير كبيرة من الأيج ج النقي تقريباً .

ج – يمكن أن تُدرَج في الطريقة مرحلة تجزيء بسلفات الأمونيوم قبل الاستشراب ، ولكن هذا ليس ضرورياً .

٨ ــ تجزيء ماكروغلوبلين macroglobulin المصل باستعمال السيفاكريل sephacryl الفائق النعومة superfine لتنقية الأيج م IgM جزئياً .

مقدمـــة

ليس في الإمكان تنقية الأيج م بعملية استشرابية واحدة كما هو الحال مع الأيج ج . والسبب في ذلك هو أن تركيزه في المصل منخفض وليست له صفة مميزة فريدة تجعله مختلفاً عن سائر بروتينات المصل . ولكن يمكن باستعمال الأمصال المحتوية على الماكروغلوبُلين ، الحصول على أيج م نقي نسبياً بالترشيح من الهلامة . وعندئذ يكون هذا المستحضر بالجودة الكافية لتنقية لاحقة بطريقة الرحلان المناعي الثنائي البعد .

المـواد

عمود استشراب ٢,٥ سم × ٤٠ سم
خزان الشاطف
أنبوب تمديد
ملحي داريء فسفاتي (٠,٠١ مو من PO_4 في ملحي ٠,١ مو)
سيفاكريل س ٣٠٠ (S 300) (فائق النعومة ، شركة فارماسيا ، أوبسالا ، السويد)
١ مل مصل
ديكستران أزرق
سيتوكروم ج (C) (بدل الهيموغلوبين)
كرومات البوتاسيوم

الطريقـــة

يجب أولاً تعبئة عمود السيفاكريل بحيث يمكن حدوث الترشيح من الهلامة ثم يوضع مصل يحتوي على المواد الملوّنة الثلاث : الديكستران الأزرق، والسيتوكروم ج ، وكرومات البوتاسيوم . يكون الديكستران الأزرق في الحجم اللاغي void من العمود ويشطف مع الأيج م ، ويمكن جمعه واختباره . ويمكن ملاحظة عملية التجزيء عيانياً من الانفصال الذي يحدث بين المواد الملوّنة الثلاث .

يثبت العمود عمودياً ويملأ أنبوب المخرج والحيِّز الخامد dead space تحت حامل الطبقة بالدارئة بواسطة زرّاقة . ويسد المخرج .

إذا كان حجم معلّق الهلامة المحضَّر أكبر من الحجم الكلي للعمود ، يثبت أنبوب الامتداد على العمود ليمكن إضافة الهلامة كلها في صبَّة واحدة .

يكون السيفاكريل س ٣٠٠ جاهزاً للاستعمال عند الحصول عليه من الصانع .

تحرَّك الهلامة برفق لضمان تجانس المعلّق ، وتُصب بعناية على جدار العمود ، مع إضافة الهلامة كلها في صبَّة واحدة مع التحقق من الوضع العمودي للعمود .

يملأ خزان الشاطف بمقدار ٢٠٠ مل من الدارئة . وإذا لم يكن العمود ممتلئاً تماماً يكمل ملؤه بالدارئة ويوصل بخزّان الشاطف . يجب التأكد من أنه لا توجد جيوب هوائية في أعلى العمود بإزالة الهواء المتبقي من العمود عن طريق حلمة مخرج الهواء . يُنتَظَر حتى تدخل الهلامة كلها العمود قبل إيصال إمداد الشاطف .

يفتح مخرج العمود ويُدَكّ العمود بمعدل جريان حوالي ٤٠ مل / سم٢ / ساعة (حوالي ٢٠٠ مل / ساعة) . يلزم وجود ضغط مائي سكوني hydrostatic قدره ٢٠٠ سم من الماء على الأقل . يُترك العمود يعمل طوال الليل مع وجود عروة أمان لحمايته من الجفاف .

وعندما يتم دَكّ العمود يسد المخرج .

يثبت الصمام الثلاثي الممرات مع الزرّاقة على الحامل ، ويوصل الخزان واللؤمة adapter بالصمام .

تُنزع القطعة العليا من العمود ويُضبط مستوى السائل في العمود ليكون في حدود ١ ــ ٢ سم من القمة .

ترخى أداة تضييق اللؤمة ويُدخل المكبس بزاوية بحيث لا يُحصر أيّ هواء تحت الشبكة . يُضبط المقبض العلوي ليعطي سدادة منزلقة بين جدار العمود وحلقة البداية O-ring .

يُزلق المكبس ببطء إلى أسفل العمود لكي يحل الشاطف eluant محل الهواء الموجود في اللؤمة فوق الشبكة وفي الأنابيب الشعرية . يدار الصمام في كلا الموضعين أثناء هذه العملية لطرد الهواء .

تُثبَّت بلولب قطعة اللؤمة العليا على قطعة نهاية العمود . تضبط اللؤمة في موضعها في سطح المَسْكَبة bed ويُسَدُّ بإحكام بضبط المقبض ليعطي سدادة جيدة . تثبت اللؤمة في موضعها بلولب

مثبِّت .

يوضع ٢٥٠ ــ ٣٠٠ مل من الشاطف لملء الخزان ويترك العمود يعمل لمدة ٥ دقائق على الأقل . يُسد مخرج العمود ويعاد ضبط موضع لؤمة الجريان ضاغطاً إياها مسافة ١ ــ ٢ سم تجاه قاعدة الهلامة . يُعلَم ارتفاع المَسْكَبَة bed .

يُبدأ بالجريان مرة أخرى باستعمال ضغط أقل من المستعمل أثناء الدَكّ .

توضع العيِّنة في أسطوانة الزرّاقة ويُدار الصمام لإدخال العينة . يُبدأ بجمع الدَفيق في مخبار مدرَّج .

وبعد وضع عينة قدرها ٢ مل يدار الصمام إلى الخلف مرة أخرى . وعندما يبلغ الحجم في المخبار ٥٠ مل ، يُبدأ بجمع أجزاء بمقادير ٥ مل في أنابيب اختبار (علامة التعبير المركزي) . ويثابَر على ذلك حتى يتم شطف العينة كلها .

يُنتَبَه إلى الجزء المشطوف مع ديكستران أزرق . وهو يحتوي على ذروة الأيج م .

يقاس انطفاء extinction الأجزاء المحتوية على الديكستران الأزرق على موجة ٦٢٠ نم وانطفاء الأجزاء المحتوية على السيتوكروم ــ ث وكرومات البوتاسيوم على موجة ٤١٠ نم .

يختبر جزء الأيج م بالرحلان المناعي بحسب الشكل ٩ .

تعليقـــات

أ ــ هذه الطريقة لا تعطي مستحضراً نقياً من الأيج م .

ب ــ يجب تركيز الشُطافة المحتوية على الأيج م حتى تركيز ١ مغ / ١ مل للحفظ .

ج ــ يمكن استعمال مستحضرات الغلوبلين الحقيقي euglobulin للمصل بدلاً من الغلوبلين الكِبْرَوي macroglobulin .

٩ ــ نزع الملح من محلول بروتيني على السيفاديكس G 25

مقدمـــة

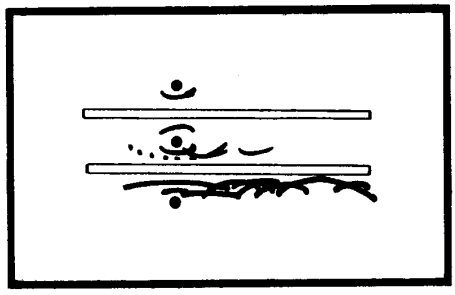
هذه التجربة مصممة لتوضيح السرعة والسهولة اللتين يمكن بهما إزالة جزيء صغير مثل ملح من الأملاح (كرومات في هذه الحالة) من بروتين أو مادة أخرى كبيرة الجزيئات (ديكستران أزرق في هذه الحالة) . وحيث أن الحجم اللاغي void يكون حوالي ٣٠٪ من الحجم الكلي للمَسْكَبَة bed ، فإنه يمكن استعمال تحميل للعيِّنة بمقدار ٢٥ ــ ٣٠٪ لعملية نزع الملح ومما يستحق الملاحظة أن عملية نزع الملح هذه قد تستغرق ٢٤ ساعة بطريقة الدِيَال dialysis وتستهلك ٥٠ ضعفاً من الدارئة على الأقل .

المـــواد

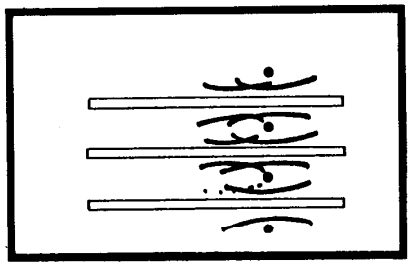
عمود استشراب ٢ سم × ٨ سم (أو PD-10 الجاهز للاستعمال من شركة فارماسيا)
محلول كلوريد الصوديوم ٠,٩٪
١ مل مصل
ديكستران أزرق
كرومات البوتاسيوم
سيفاديكس G25 (خشن)

الطـريقة

بعد غسل السيفاديكس في محلول ملحي،يُصَبّ في العمود حتى يمتلىء ثلثاه (عمود PD 10 جاهز للاستعمال)



الشكل ٩



الشكل ١٠

يوضع المصل المحتوي على مقدار صغير من الديكستران الأزرق وكرومات البوتاسيوم في العمود . سوف تنفصل المادتان الملونتان بسرعة . يوجد البروتين مع جزء الديكستران الأزرق ويمكن أخذه منفصلاً عن محلول الملح الذي يوجد مع محلول كرومات البوتاسيوم البرتقالي .

تعليقـات

أ - طريقة ممتازة لتغيير محاليل الملح قبل عملية الاستشراب الديائي DEAE .

ب - يكون محلول البروتين مخففاً إلى حدٍ ما وقد يلزم إعادة تركيزه .

ج - يمكن تكرار استعمال السيفاديكس G 25 .

١٠ ــ تحضير فث ــ أيج ج من الأيج ج بالهضم بالبابائين

مقدمـــة

تُجرى على جميعة pool أيج ج بشري (محضرة كما سبق وصفه في ٧) عملية هضم بالبابائين ، ثم رحلان كهربائي ثنائي البعد ، لتحضير مستضد فث ٢ F (الجزء المتبلور) للتمنيع .

المـــواد

معلَّق بابائين منقَّى (سيغما Sigma)
ملح الإيديتات (اثيلين داي أمين تترا أستيك) الثنائي الصوديوم
هيدروكلوريد السيستئين L-cysteine hydrochloride
جميعة أيج ج بشري ١٠ مغ / مل في دارئة فسفاتية ٠,١ مولي باهاء ٧,٠
مثبِّط بابائين من فول الصويا (سيغما)
مصل ضدي لجزيء أيج ج الكامل

الطـــريقة

يذاب ٩٠ مغ من هيدروكلوريد السيستئين L-cysteine و ٤٠ مغ من إيديتات الصوديوم Na_2 EDTA في ١٠ مل من دارئة فسفاتية ٠,١ مولي باهاء ٧,٠ . يضاف إلى ١ مل من محلول الأيج ج بتركيز ١٠ مغ / مل مقدار ٠,١ مل من محلول السيستئين / إيديتات و ٠,١ مغ بابائين (٥ مكل من معلق ٢٠ مغ / مل) . يمزج جيداً ويحضن في درجة ٣٧° س في حمام مائي ، وتؤخذ أجزاء بمقدار ٢٥ مكل على فترات كما يلي :

(أ) ١٥ دقيقة ، يضاف ٢ مكل من مثبط البابائين من فول الصويا*
(ب) ٣٠ دقيقة ، يضاف ٢ مكل من مثبط البابائين من فول الصويا
(ج) ٦٠ دقيقة ، ويضاف ٢ مكل من مثبط البابائين من فول الصويا

* **ملحوظة** : كبديل يمكن إيقاف تحلّل البروتين بالتجميد

تُختبر منتجات الهضم بالرحلان المناعي كما هو مبين في الشكل ١٠

النتـائج :

هضم جزيء الأيج ج الكامل بالبابائين سريع جداً . فبعد ١٥ دقيقة سوف يكون الجزء المصعدي anodal فث ــ أيج ج مرئياً بالرحلان المناعي . وهذا هو جزء البروتين الذي سيستعمل للتمنيع . ويؤدي الهضم المديد إلى تلف الجزء فث ــ أيج ج .

١٠ ــ ١ تحضير مستضد فث ــ أيج ج للتمنيع

يُختبر ٥ مكل من أيج ج غير مهضوم و ٥ مكل من ناتج هضم البابائين بعد ٣٠ دقيقة بطريقة الرحلان المناعي الثنائي البعد (انظر الفصل ١ ، القسم ٥) .

سوف تبين الصفائح ذروة واحدة بالنسبة إلى العينة غير المهضومة وذروتين بالنسبة إلى العينة المهضومة . ويجب أن تُزال الذروة الأسرع ــ وهي فث ــ إيج ح ــ مع الهلامة وتُغسل في ملحي داريء فسفاتي عدة أيام . وتكون عندئذ جاهزة للتمنيع بها .

تعليقـات

انظـر القســم ١١ .

١١ ــ تحضير فث ــ أيج ج بالهضم بالتربسين في درجة حرارة عالية

مقدمــة

في درجة حرارة فوق ٥٠° س تشطر التربسين جزيئات الأيج م الكاملة لتنتج فث Fc سليماً وأجزاء مخموسة pentameric وأجزاء فأب Fab (جزء ربط المستضد) . ويترسب الجزء فث بضد فث ــ أيج م في تحليل ثنائي البعد . ويُقطع الراسب ويُغسل ويستعمل للتمنيع .

المــواد

أيج م بشري منقًى ١٩ س (معامل تثفل = ١٩)
(محضَّر كما سبق وصفه في القسم ٨)
تربسين الخنزير (سيغما)
مثبط التربسين من فول الصويا (سيغما)
ملحي داريء فسفاتي ٠,١ مولي باهاء ٧,٤
أمصال ضد فث ــ أيج م (سيوارد)

الطـــريقة

يخفَّف ١ مل من الأيج م البشري (محضر كما سبق وصفه في القسم ٩) في ٥ مل من الملحي الداريء الفسفاتي ويسخَّن إلى درجة حرارة ٥٦° س .

يوضع في أنبوب ٠,٥ مل من المحلول أعلاه ويضاف $\frac{١}{٢٥}$ من وزنه تربسين (أي ٤٠ مكغ) ويمزج برفق لمدة ٣٠ دقيقة .

يبرَّد المزيج ويضاف ١٠٠ مكل من محلول بمثبط التربسيني لفول الصويا (١٠٠ مكل من محلول ١٠ مغ / مل) . يمكن أن يحفظ هذا في درجة حرارة ــ ٢٠° س .

يعرَّض ٤ مكل من المزيج لعملية رحلان مناعي كما هو مبين في الشكل ١١ .

يمكن رؤية فث ــ أيج م في الموقع المصعدي (الأنودي) .

١١ ــ ١ تحضير مستضد فث ــ أيج م للتمنيع

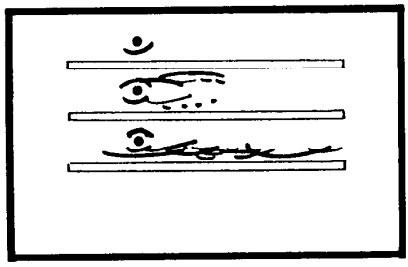
يعرَّض ١٠ مكل من المزيج لعملية رحلان كهربائي ثنائي البعد باستعمال ٥٠ مكل من مصل ضد فث ــ أيج م وحيد النوعية (انظر الفصل ١ ، القسم ٥) . يجب ترك الصفيحة تعمل لمدة ٤٨ ساعة مع تغيير الدارئة بعد فترة ٢٤ ساعة .

تُقطع الذروة المصعدية (الأنودية) التي تحوي فث ــ أيج م وتغسل في ٢٠ مل من الملحي الداريء الفسفاتي على مِحْراك stirrer لمدة ٢٤ ساعة مع تغيير الملحي الداريء الفسفاتي عدة مرات . ويمكن حفظ المستحضر في درجة حرارة ٤° س ريثما تلزم لتمنيع الحيوانات .

تعليقـات

أ ــ من الضروري عدم السماح بوصول بروتينات ملوِّثة إلى أحواض الدارئة أثناء عملية الرحلان المناعي الثنائي البعد ، وإلا فلن تكون الأمصال المحضرة نقيَّة .

ب ــ يجب مقارنة أنماط الهضم المرئية في عمليتي الرحلان المناعي والرحلان المناعي الثنائي البعد بالصفائح الملونة للأيج م غير المهضوم . وعند قطع الجزء فث من الأيج م الأسرع حركة لغرض التمنيع ، يجب العناية بأن لا تضم أيَّ جزء من هلامة البعد الأول ، أو الهلامة القريبة من بئر المصدر .



ضد فث ــ أج م
٤ مكل مستحضر أج م
ضد فث ــ أج م
٤ مكل ناتج هضم أج م
ضد مصل كامل
٤ مكل مصل

الشكل ١١

١٢ ــ تمنيع وفَصْد الحيوانات

مقدمـــة

يوجد اعتباران أساسيان يجب النظر فيهما عند تمنيع وفَصْد الحيوانات : أولاً حجم الأمصال الضدية المطلوبة ، وثانياً سهولة العمل على الحيوان . والذي يوصف هنا هو إلى حد كبير خبرتنا في التعامل مع أحجام كبيرة من المصل .

١٢ ــ ١ اختيار الحيوانات

الحيوانات الأكثر استعمالاً لإنتاج أمصال ضدية هي الأرانب ، والخراف ، والماعز ، والحمير ، والخيول . وحجم الدم الذي يمكن الحصول عليه من كل نوع من هذه الحيوانات هو : ٢٥٠ مل . للأرانب ، و ٢,٥ لتر للخراف والماعز ، و ١٠ ــ ٢٠ لتراً للحمير والخيول . وتتوقف تكلفة الاحتفاظ بالحيوانات المختلفة على المرافق المتاحة . والعمل على حيوانات الرعي الطليقة مثل الخراف أسهل من العمل على الأرانب ، لاسيما أثناء الصيف حيث يمكن تركها في الحقول ، ومن ثم فإن تكلفة الاحتفاظ على مدى عام بخراف قد لا تختلف كثيراً عن الاحتفاظ بأرانب . ومن واقع خبرتنا ينتج كل من هذه الحيوانات أمصالاً ضدية عالية الجودة ، وليس صحيحاً أن أمصال الماعز الضدية أفضل من أمصال الأرانب أو العكس . ويمثل مصل الحصان الضدي استثناءاً بسيطاً، وينزع إلى إحداث مشاكل أحياناً في اختبارات الترسيب في الهلامة بسبب المدى الضيق للترسيب .

١٢ ــ ٢ التمنيـع

من الصعب وصف عملية منتظمة لتمنيع الحيوانات ، وذلك لأنها تتوقف على ذراري الحيوانات المتاحة وظروفها ، وعلى المستضد ، وعلى عدة عوامل أخرى . ولهذا توصف هنا صورة عامة ، ويجب تكييف تفاصيل خطة التمنيع تبعاً لنتائج العينات المفحوصة .

المســـتضدات

يجب دائما مزج المستضدات التي تم تحضيرها للتمنيع بمساعد فروند freund adjuvant الكامل قبل التمنيع . وهذا عبارة عن مزيج من الزيت ومادة مستحلبة ومتفطرات mycobacteria ميتة ، وله أثر معزِّز جداً لتفاعل الحيوانات للمستضد . ويفضّل مزج حجمين من المساعد مع حجم واحد من المستضد . ويجب مزج الاثنين جيداً حتى يتكون مستحلب . ويتم إنجاز هذا عادة بوضع المزيج في زرّاقة صغيرة ثم دفعه ومصه من فوهتها بالمكبس . وعندما يتم المزج فسوف لا تنتشر قطيرة منه عند وضعها على الماء .

جرعة التمنيع

يفضل دائماً إعطاء جرعة صغيرة من المستضد . فتكفي لجرعة الشروع ١٠ ــ ١٠٠ مكغ من البروتين ، بينما يمكن مع الجرعة المعزِّزة إعطاء نفس مقدار المستضد أو أكبر منه . ويتوقف هذا على استجابات الحيوانات وتنزع جرعات المستضد الصغيرة إلى إعطاء أضداد عالية الألفة affinity وبعيارات عالية بينما تنزع الجرعات الأكبر إلى إعطاء أضداد أقل ألفةً . ويوجد ضرر آخر لجرعات المستضد الأكبر وهو أن أي مستضد ملوَّث لديه فرصة أكبر في تنبيه الحيوانات فنسج بذلك ضداً أقل نوعية .

الحجم

يحضَّر المستضد في محلول ملحي ثم يمزج بالمساعد ليكون المزيج حوالي ١ ــ ٢ مل . أما الأحجام الأكبر فإنها تسبب ألماً للحيوان ولكن يمكن بالطبع زرقها في مواقع مختلفة .

المواقـع

نحن نمنِّع بزرقات داخل العضل في كَفَل rump معظم الحيوانات . وتكون الحُقَن تحت الجلد أو داخل الجلد أيضاً مقبولة ، ولكن الحُقَن داخل الوريد تكون خطراً على الحيوان ويستبعد أن تنتج استجابة ضدية جيدة . وتختلف الآراء بشأن موقع وتوقيت الحُقَن ، ولكل باحث برنامج محدد ، ولكن تعتبر محاولة البدء بحُقَن داخل العضل قاعدة حسنة ، وإذا لم يستجب الحيوان يُحاول الحقن في موقع آخر . وإذا جابهت المرء مشاكل في إنتاج أمصال ضدية فإن الموقع يكون أقل أسباب المشاكل احتمالاً .

التوقيـت

لا يمكن إنتاج أمصال ضدية جيدة في أقل من ستة أسابيع . بعد الجرعة الأولية يمكن إعطاء جرعة معزِّزة booster بعد ثلاثة أسابيع ، ثم بعد ذلك إذا لزم الأمر . كما أن إعطاء جرعات متزايدة بالتدريج من المستضد قد تعطي استجابات أحسن أثناء برنامج تمنيع مديد . ويفضل عادة ترك فترة طويلة بين بعض الجرعات المعززة وبعض . ولكن تتباين النتائج تبايناً كبيراً باختلاف الحيوانات ، ولهذا يجب اختبار الحيوانات بانتظام لتعيين مدى التقدم .

١٢ ــ ٣ فَصْد الحيوانات Bleeding

الأرانـب

يستعمل وريد الأذن للفصْد الاختباري والفصد الغزير . ويمكن الحصول على تفاصيل دقيقة من الكتب المرجعية ولكن تجدر الإضافة بأنه يمكن الحصول على فَصْد سريع بنَزْل شريان الأذن وتثبيت الإبرة فيه .

الخراف والماعز والحمير والخيول

يتم فَصْد هذه الحيوانات من أوردة العنق التي توجد وحشيَّ الحنجرة ويمكن جسُّها بسهولة . توضع عاصبة tourniquet غير مربوطة بإحكام حول الرقبة ، ثم تغرز إبرة في الوريد المحتقن . وعندما يراد فصد غزير ، يمكن تثبيت أنبوب في الإبرة ليدع الدم يجري في وعاء . ومرة أخرى توجد معظم هذه التفاصيل في الكتب المرجعية . وليس من الحكمة بصفة عامة قتل حيوان للحصول على أحجام كبيرة من الأمصال الضدية ، لذلك يفضل إجراء الفصد على أيام متتابعة .

توقيت عمليات الفصد

يجب إجراء عمليات الفصد الاختباري بعد سبعة أيام من آخر حقنة للمستضد فإذا كان المصل الضدي ضعيف الجودة في هذه المرحلة فإنه لن يتحسن ويجب متابعة التمنيع .

وإذا كان المصل الضدي عالي الجودة في عملية الفصد الاختباري ، فإنه يجب فصد الحيوان بأكبر قدر ممكن على مدى الأيام القليلة التالية . وذلك لأن المصل الضدي يتغير من يوم ليوم . ومن الأفضل دائماً الحصول على دفعة واحدة من عملية تمنيع واحدة .

١٣ ــ فصل واختبار وتجهيز الأمصال الضدية

مقدمــة

عندما يصل المصل الضدي من حيوانات ممنَّعة إلى عيار مقبول وجودة مقبولة ، فإن من الواجب فَصْد الحيوان في أسرع وقت ممكن وبأكبر قدر ممكن . فهذا يضمن الحصول على جميعة pool كبيرة واحدة من مصل ضدي معروف الجودة . بعد ذلك يتم تجهيز المصل الضدي وتطبق لذلك ضوابط جودة صارمة . وقد يلزم امتزاز الأضداد الملوِّثة وقد يفيد تحضير جزء غني بالأيج ج .

١٣ ــ ١ فصل المصل

يمكن فصل المصل إما بالأخذ المباشر للمصل من دم متخثر أو بتحضير بلازما وتحويلها إلى مصل .

فصل المصل من دم متخثر

يسمح للدم بالتخثر في أنابيب أو حواجل في حمام مائي بدرجة حرارة ٣٧° لمدة ٣٠ ــ ٦٠ دقيقة . تُزَحْزَح الخثرة بعناية من الحافة ويسمح لها بالانكماش في فترة ٣٠ دقيقة أخرى في درجة حرارة الغرفة . يُسحب المصل وينبَّذ ثم يتابع تجهيزه بحسب المطلوب .

هذه العملية أسهل من الناحية الفنية من فصل البلازما ، ولكن كثيراً ما يحتوي المصل على هيموغلوبين فيتلون بلون أحمر بُنّي . وتكون الحصيلة أيضاً أقل مما في حالة أخذ البلازما . ولذلك تستعمل هذه الطريقة على الخصوص في عمليات الفصد الاختباري .

فصل البلازمـا

يؤخذ الدم في أنابيب أو حواجل تحتوي على مضاد التخثر (مثل الهيبارين heparin أو محلول الدكستروز ــ سترات Dextrose-citrate المستعمل في خدمات نقل الدم) ، وتفصل البلازما عن الكريات بالتنبيذ . يضاف الترومبين Thrombin أو البروتامين Protamine لمعادلة مضاد التخثر وتُزال الجلطة الناتجة بالترشيح أو التنبيذ .

تعليقـات

تتوقف ظروف الحفظ على البرنامج الزمني لمتابعة تجهيز المصل :

أ ـ يمكن حفظ الأمصال بدون مواد حافظة في درجة حرارة ٤° س لفترات قصيرة (عدة أيام) .

ب ـ يجب تجميد الأمصال وحفظها في درجة حرارة ــ ٢٠° س للفترات التي تزيد على أسبوع .

ج ـ كبديل يمكن حفظ الأمصال في درجة حرارة ٤° س بعد إضافة مواد حافظة (مثلاً ١ غ من آزيد الصوديوم / لتر) لفترات طويلة (شهور) .

د ـ للحفظ على مدى طويل يوصي بإضافة مثبّط البروتياز Protease inhibitor (حمض إبسيلون ــ أمينو كابرويك ٣ غ / لتر) إلى المصل وتخفيض الباهاء pH إلى ٦,٥ ــ ٦,٥ بدارئة أسيتات ، ويجب حفظ المصل درجة حرارة ــ ٢٠° س .

١٣ ــ ٢ اختبارات مراقبة الجودة

يجب اختبار عينات الاختبار لتعيين الفاعلية potency (العيار titre) والنوعية specificity . ويجب كذلك اختبار عينات الدم الكبيرة لتحري التلوث والألفة (إن أمكن ذلك) .

العيـار Titre :

تختبر الأمصال الضدية للأيج ج والأيج م بطريقة الانتشار المناعي المتشعع العكسي (مانتشيني Mancini) مقابل مصل ضدي مرجعي (انظر الفصل ١ ، القسم ٢) .

ويجب اختبار المصل الضدي لبروتينات ذات وزن جزيئي منخفض مثل النمط كابا kappa أو لامدا lambda من السلسلة الخفيفة Light chain (للغوبلين المناعي) باستعمال طريقة مانتشيني التقليدية **وليس** بطريقة مانتشيني العكسية . ويستعمل المصل الضدي المرجعي على صفيحة مقابل تخفيفات من المستضد ، والمصل الضدي المفحوص على صفيحة أخرى مقابل تخفيفات مماثلة من المستضد (انظر الفصل ١ ، القسم ١) .

ويمكن اختبار الأمصال الضدية لبروتينات المصل الكامل بطريقة الرحلان المناعي ومقارنتها بمصل ضدي مرجعي (الفصل ١ ، القسم ٣) .

ويعبَّر عن العيار بمقلوب آخر تخفيف للمصل يعطى تفاعلاً إيجابياً .

النوعيـــة specificity

يجب إجراء الانتشار المناعي المزدوج (أوختلوني ouchterlony) مقابل مستضد معلوم (الفصل ١ ، القسم ٤) . ويستحسن توضيح خط تعيين الهوية مقابل مصل ضدي مرجعي . ويمكن أيضاً إجراء طريقة الرحلان المناعي (انظر أدناه) .

التلـــوث

يجب إجراء طريقة الرحلان المناعي مقابل مصل بشري كامل أو أجزاء فث Fc للغلوبلينات المناعية (الفصل ١ ، القسم ٣) ، والرحلان المناعي الثنائي البعد (الفصل ١ ، القسم ٥) باستعمال كميات كبيرة من المستضد والضد . ولكي يمكن اكتشاف مقادير ضئيلة من الأضداد الملوِّثة، يمكن استعمال طرائق أخرى أكثر حساسية (مثلاً : الرحلان الكهربائي الصاروخي rocket) . وإذا كان يلزم استعمال المصل الضدي في مقايسات شديدة الحساسية (مثل المقايسة المناعية الشعاعية) ، فإنه يجب اختباره بهذا النظام .

الألفـــة Affinity

قد يُطلب أحياناً معرفة الألفة لمصل ضدي . ويمكن اختبار ذلك بطريقة قياس الكدر nephelometry أو طريقة المقايسة المناعية الشعاعية radioimmunoassay . ولكن يمكن الوصول إلى تقدير تقريبي لألفة مصل ضدي بطريقة مانتشيني الـ سية (الفصل ١ ، القسم ٢) ويدل حصول رسابة قناعية محدّدة وكثيفة في العادة على ألفة عالية للمصل الضدي . ويجب عمل مقارنة بين المصل الضدي المفحوص وبين مصل ضدي مرجعي .

١٣ ــ ٣ امتزاز Adsorption الأضداد الملوِّثة

ينتج التمنيع بغلوبلين مناعي معيَّن طيفاً واسعاً من الأضداد لمعيِّنات determinants المستضد الموجودة على جميع أقسام الجزيء . وحيث أن جميع أصناف الغلوبلينات المناعية تحتوي على نفس نمط السلاسل الخفيفة ، فيلزم إزالة الأضداد لهذه السلاسل لكي يصبح المصل الضدي نوعياً specific لصنف معيَّن من الغلوبلينات المناعية . وقد تم تصميم الإجراءات المبينة أعلاه لانتاج الجزء فث Fc من الجزيء (القسم ١٠ ، ١١) للتقليل بقدر الإمكان من هذه المشكلة . ولكن قد لا يكون امتزاز السلسلة الخفيفة بقياس ضرورياً في العادة وبالإضافة إلى ذلك فقد تحتوي بعض المستضدات (مثلاً الأيج م ــ فث) على ملوِّثات من بروتينات أخرى (مثلا الأيج أ ، الأيج ج) يُنتَج ضدها أضداد في الحيوانات الممنَّعة . ويجب إزالة هذه الأضداد . وفي ما يلي أمثلة لإجراءات امتزازها .

اختبار مصل ضدي مقابل الأيج ج للتفاعلية المتصالبة للسلسلة الخفيفة

المـــواد

مصل ضدي للأيج ج البشري الكامل
جميعة محلول سلسلة خفيفة بشرية

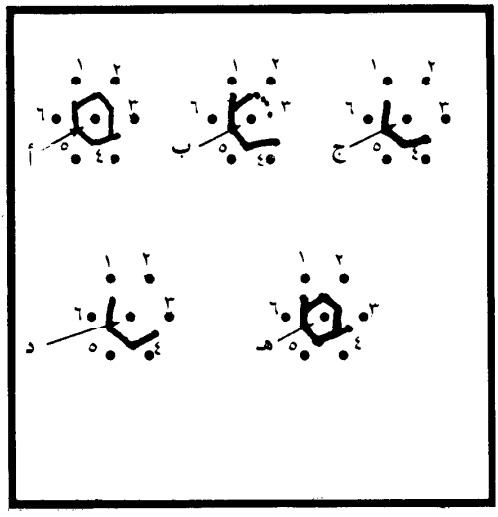
أنابيب اختبار صغيرة
أجهزة للانتشار المناعي
مصل بشري طبيعي

الطريقـــة

يوضع ٥٠ مكل من ضد الأيج ج في كل من أربعة أنابيب
يوضع في الأنبوب ١ مقدار ٢ مكل من جميعة محلول السلسلة الخفيفة (= أ)
يوضع في الأنبوب ٢ مقدار ٥ مكل من جميعة محلول السلسلة الخفيفة (= ب)
يوضع في الأنبوب ٣ مقدار ١٠ مكل من جميعة محلول السلسلة الخفيفة (= ج)
يوضع في الأنبوب ٤ مقدار ٢٠ مكل من جميعة محلول السلسلة الخفيفة (= د)

يتم التأكد من مزج المحاليل جيداً بعد إضافة محلول السلسلة الخفيفة ، ثم تترك في درجة حرارة الغرفة لمدة خمس دقائق .

يتم اختبار الامتزازات الأربعة بالإضافة إلى مصل غير ممتز بطريقة الانتشار المناعي ، كما هو مبين في الشكل ١٢ .



الشكل ١٢

المفتـــاح

البئر أ = امتزاز أ ١٠ مكل
ب = امتزاز ب ١٠ مكل
ج = امتزاز ج ١٠ مكل
د = امتزاز د ١٠ مكل
هـ = مصل ضدي غير ممتز ١٠ مكل

البئر ١ = ١ مكل من محلول السلسلة الخفيفة
٢ = ٣ مكل من محلول السلسلة الخفيفة
٣ = ٤ مكل من محلول السلسلة الخفيفة
٤ = ١ مكل من مصل بشري طبيعي
٥ = ٢ مكل من مصل بشري طبيعي
٦ = ٤ مكل من مصل بشري طبيعي

النتـائج

يمكن رؤية الإزالة المترقّبة لضد السلسلة الخفيفة من التخفيض المترفيّ لخطوط المرسّبة حول البئرين ب و ج . كما أنها تبين أيضاً كمية مستحضر السلسلة الخفيفة اللازم لامتزاز حجم كبير من المصل الضدي .

إجـراءات الامتـزاز

توصف طريقتان لهذا الغرض في الفصل ٤ : مازّات مناعية immunoadsorbents لاذوّابة محضَّرة على السيفاروز ٤ ب sepharose 4B (انظر القسم ١٨ ــ ١) ومازّات متصالبة الارتباط cross-linked محضّرة بالغلوتيرالدهيد gluteraldehyde (انظر القسم ١٨ ــ ٢) . يمكن استعمال الطريقتين بنجاح ولكن يوصي المؤلفون باستعمال طريقة الغلوتيرالديهيد . يجب رصد عمليات الامتزاز باختبارات مراقبة الجودة كما هو موصوف في القسم ١٣ حتى يكون المصل الضدي مقبولاً .

١٣ ــ ٤ إنتاج جزء غني بالأيج ج من المصل الضدي

يفضَّل تنقية المصل الضدي الحيواني لتحضير جزء غني بالأيج ج للأسباب التالية :

(١) لأنها ضرورية لعملية الاقتران بالملوّن المتألق fluorochrome .

(٢) يكون تلوّن الخلفية أقل عند استعمال المصل الضدي في اختبارات ترسيب الهلامة .

(٣) أيُّ مصل ضدي أكثر نقاوة وبه بروتين حامل أقل ، يكون أفضل لقياس الكدر والتفاعلات الأخرى للضد .

ولا تكاد المنهجية تختلف عمّا هو موصوف بالنسبة للأيج ج البشري (انظر القسم ٧) إلا بتعديلات قليلة .

فالزيادة المناسبة للأحجام الكبيرة ضرورية .

ويجب استعمال الدواريء الفسفاتية الآتية بحسب أنواع الحيوانات المستعملة للتمنيع :

الخـراف والماعز = ٠,٠٣ مول ، باهاء ٧,٢
الأرانب = ٠,٠٢ مول ، باهاء ٧,٢

ويجب إعادة اختبار جزء الأيج ج المحضَّر باختبارات مراقبة الجودة كما سبق وصفه .

١٣ ــ ٥ التجفيد (التجفيف بالتجميد) Lyophilization

يمكن تجفيد الأمصال الضدية (أو أجزاء الأيج ج) في مؤسسات لديها مرافق خاصة لهذا الغرض . ولا يُورد في هذا الدليل وصف للعمليات الفنية للتجفيد لأنها تتوقف على الأجهزة المتاحة .

الأمصال الضدية (أو أجزاء الأيج ج) شديدة الحساسية للتمسّخ denaturation . ولهذا يجب إتخاذ جميع الاحتياطات لمنع تمسّخ هذه المواد أثناء التجفيد والحفظ (درجة الحرارة ، الرطوبة المتبقية ، استخدام المثبتات ، الخ) ، ويجب إجراء اختبارات الفاعلية (العيار) على العينات المجفّدة .

١٤ ــ تحضير مصل ضدي لجميع مكونات المصل البشري الكامل

يلزم مصل ضدي للمصل البشري الكامل لاختبار نوعية المستضدات ومستحضرات المصل الضدي ولدراسة تركيزات بروتينات كثيرة ومختلفة في المصل في نفس الوقت . ولتحضير هذا المصل نبدي تُمنَّع حيوانات بمصل بشري طازج أو بلازما بشرية طازجة . ولكن في هذه الحالة يبحث المرء عن مُنتَج متوازن ، أي مصل ضدي يعطي خطوطاً بالرحلان الكهربائي ضد ١٥ أو ٢٠ من البروتينات وقد يلزم تعزيز استجابة الحيوان بأجزاء محددة من المصل بحيث يمكن الحصول على التوازن . ومن واقع خبرتنا وجد أن البروتينات الألفية ــ ١ alpha-1-proteins هي الأقل استمناعاً immunogenicity ، ولهذا فقد يلزم تعزيز استجابة الحيوانات بمثل هذا الجزء .

ويتطلب تحضير منتج جيد التوازن توافر خبير واسع التمرس وطيف واسع من الاختبارات لرصد التمنيع وإجراء اختبارات مراقبة الجودة .

ولهذه الأسباب نوصي باستعمال أمصال ضدية تجارية عالية الجودة (مثلا سيوارد Seward) لإجراء اختبارات مراقبة الجودة الموصوفة في هذا الدليل .

الفصل الثالث

تحضير المقترنات المتألقة التلوين

توصف هنا طرائق لاقتران الغلوبلينات المناعية مع الفلوروسيئين fluorescein أو ايزوثيوسيانات الرودامين rhodamine isothiocyanate ، وتنقية المقترنات واختبارها .

ويمكن استعمال مقترنات ذات جودة ملائمة في طرائق التألق المناعي المباشرة أو غير المباشرة .

١٥ ــ اقتران الغلوبلينات المناعية مع الفلورويسيئين / أو ايزوثيوسينات الرودامين

مقدمـــة

إن التركيب الكيميائي لأيزوثيوسيانات الفلورويسيئين (ف أ ث س) وايزوثيوسيانات تترامثيل رودامين (ت ر أ ث س) متماثل ويمكن اقترانهما كيميائياً مع البروتينات بواسطة المجموعات الأمينية الإبسيلونية epsilon للّيزين lysine . وأحسن ما يحدث هذا الاقتران عند باهاء pH ٩,٠ . تتصّف المواد المتألقة التلوين بأنها تستثار بالضوء فوق البنفسجي على مدى حزمة موجبة ضيقة ، فتصدر عندئذ تألقاً بلون مميز .

المـــواد

ــ أجزاء أيج ج منقّاه من مصل ضدي (مثلا ضد أيج ج بشري و ضد أيج م بشري) في دارئة ملحية فسفاتية (م د ف PBS) ، ٠,٠٥ م ، باهاء ٧,٤ .

ــ دارئة كربونات / بيكربونات ، ٠,٥ م ، باهاء ٩,٠ . يجب تحضير هذه الدارئة قبل عملية الاقتران مباشرة : ٣٧ غ بيكربونات الصوديوم $Na\ HCO_3$ + ٦ غ كربونات الصوديوم $NaCO_3$ في ١ لتر ماء مقطر في درجة حرارة صفر° س . يجب التحقق من الباهاء وضبطها إذا لزم الأمر .

ــ الزمير ــ ١ لايزوثيوسيانات الفلوريسيئين (BDH - Cat No. 44041) ، ٠,١ غ .
ايزوثيوسيانات الرودامين ب (BDH, Cat. No. 44087) ٠,١ غ
(BDH Chemical Ltd., **Poole**, Dorset BH12 4 NN, U.K.)

ثنائي ميثيل سلفوكسيد Dimethyl sulphoxide ــ $CH_3SO.CH_3$
(BDH - Cat. No. 14021) ١٠٠ مل

ــ دارئة ملحية فسفاتية ٠,٠٥ م ، باهاء ٧,٤

ــ معيار غلوبلين مناعي بشري (١ مغ / مل)

سيفاديكس ٢٥ ج (فارماسيا Pharmacia)
— جليـــــد
— دارئة فسفاتية ٠,٠١٧٥ مول ، باهاء ٦,٣ (انظر الملحق)
— كلوريد الصوديوم NaCl
— دياء سلولوز DEAE-cellulose ، سبق تضخيم حبيباته (DE-52, Whatman)
— أغار في الدارئة الملحية الفسفاتية يحتوي على ٢٪ بولي ايثلين غليكول polyethylene glycol

الأجهـــزة

ممصات باستور Pasteur
ممصات مدرجة ١,٠ ، ٥,٠ ، ١٠,٠ مل
مخابير مدرجة ١٠ مل ، ١٠٠ مل ، ١ لتر
مقياس باهاء أو أوراق باهاء ذات مجال ضيق ٦ — ٨ ، ٨ — ١٠
موازين ذات مجال مكغ / مغ
أنابيب ديال فيسكينغ Visking ضيقة
دوارق ٥٠ مل ، ١ لتر
قوارير عادية
قضبان محرِّكة صغيرة
محراك مغناطيسي
مقياس ضوئي طيفي يقرأ على موجات ٢٨٠ نم nm ، ٤٩٦ نم ، ٥٤٦ نم
أعمدة ٢ × ٥٠ سم
عمود ١ × ٢٠ سم
صفائح زجاجية مربعة بضلع ١٠ سم وعلب ، أو علب بتري Petri بلاستيك بقطر ٥ سم
أنابيب اختبار صغيرة سعة ١,٠ — ٢,٠ مل وحوامل
مَلاوِق صغيرة وكبيرة

الطريقـــة

تؤخذ محاليل من غلوبلينات مناعية ج منقّاة سبق تحضيرها ، مثلا ضد أيج ج بشري ، ضد أيج م بشري .

تقاس تركيزات البروتين بمقياس ضوئي طيفي على موجة ٢٨٠ نم

$$\text{١ غ ٪ غلوبلين مناعي} = \text{١٣,٥} \quad \frac{\text{١ سم}}{\text{٢٨٠ نم}}$$

يخفف كل مستحضر في الدارئة الملحية الفسفاتية بتركيز ٥ مغ / مل ، ويؤخذ منه مقدار ١٠ مل توضع المحاليل في أكياس الديال ، وتُدَال مقابل ١٠ أمثال حجمها من دارئة كربونات / بيكربونات في درجة حرارة صفر — ٤° س لمدة ٤ ساعات مع التحريك وتغيير الدارئة بعد ساعة وساعتين .

يوزن ٢٥ مكغ من إيزو ــ ثيوسيانات الفلوريسيئين أو إيزوثيوسيانات تترامثيل رودامين لكل مغ من البروتين المراد وسمه (أي لكل ٥٠ مغ بروتين يوزن ١,٢٥ مغ من الكاشف) .

يذاب المتألق المناعي في ١,٠ مل من ثنائي ميثيل سلفوكسيد في درجة حرارة ٤° س ويحبس هذا المحلول في كيس الديال . يوضع كيس الديال مع قضيب تحريك صغير في قارورة عادية سعة ٢٠ مل ، ثم يصب محلول الغلوبلين المناعي المدال وتغطى القارورة . توضع القارورة في دورق سعة ٥٠ مل مملوء بالثلج ، ثم يوضع المحراك المغناطيسي ويُجرى الديال مع تحريك هادىء لمدة ٢ ــ ٤ ساعات في درجة حرارة صفر° س . يجب التحقق من أن الباهاء تبقى ٩,٠ يضاف مزيد من الدارئة إذا لزم الأمر . وأثناء حدوث هذه العملية ، يعبأ العمودان ٢ سم × ٥٠ سم بالسيفاديكس ج ٢٥ في دارئة ملحية فسفاتية (سبق تحضيرها) .

توضع بواسطة ممص باستور المادة المقترنة على عمودَيْ السيفاديكس ج ٢٥ . وعندما تتسرب هذه المادة تماماً إلى طبقة الهلامة ، توضع مكانها دارئة ملحية فسفاتية . وعندما يتسرب البروتين خلال الأعمدة فسوف ينفصل شريط متقدم من الكاشف المقترن الملون عن البروتينات غير المقترنة وعن الملوِّن المتألق . يجمع الشريط المتقدم في عينات بحجم ٢ مل أثناء شطفها من العمود .

تحفظ المحتويات في درجة حرارة ٤° س لإجراء عملية التجزيء التي يجب القيام بها خلال يوم إلى يومين .

١٦ ــ تجزيء المقترنات على الدياء سلولوز DEAE

مقدمــة

إن المستحضرات المقترنة بأضداد عالية النقاوة ــ حتى مع العناية الفائقة في تحضيرها ــ تميل إلى إعطاء مستويات لا يمكن قبولها من التلوين غير النوعي للنسج والخلايا . والسبب في ذلك أن بعض جزيئات البروتين تتكدس ، وبعضها الآخر يحمل الملون المتألق أكثر مما ينبغي . ويمكن إزالة الوسم اللانوعي ــ إلى حد كبير ــ بفصل الجزيئات المقترنة تبعاً لشحنتها على دياء السلولوز DEAE باستخدام ثلاثة تركيزات ملحية .

المــواد

كما في القسم ١٥ .

الطريقــة

تُوَازَن البروتينات المقترنة بالديال مقابل ١٠٠ ضعف حجمها من دارئة فسفاتية ٠,٠١٧٥ مول PO_4 بباهاء ٦,٣ طوال الليل في درجة حرارة ٤° س .

يوازن دياء السلولوز مقابل نفس دارئة البداية (١ غ دياء سلولوز لكل ٢٠ مغ من البروتين) . يعبّأ عمودا ١ سم × ٢٠ مم بالدياء سلولوز المتوازن (انظر القسم ٧ ، ٢٠) .

يؤخذ ٢,٠ مل من الغلوبلين المناعي المقترن الذي سبقت موازنته بدارئة البداية وتمرر خلال العمود باستخدام دارئة البداية . يُجمع الجزء الملون المشطوف (غير المرتبط) (ج ١) ويغسل العمود بدارئة البداية . ثم تجمع شطافة الجزء الثاني (ج ٢) باستعمال الدارئة الفسفاتية ٠,٠١٧٥ مول PO_4 المحتوية على ٠,١٢٥ مول من كلوريد الصوديوم NaCl ، ويُغسل العمود بهذه الدارئة . واخيراً تُجمع شطافة الجزء الثالث (ج ٣) في الدارئة الفسفاتية ٠,٠١٧٥ مول المحتوية على ٠,٢٥ م من كلوريد الصوديوم .

يُدال dialyse كلّ من الأجزاء المشطوفة (ج ١ – ج ٣) مقابل ١٠٠ ضعف حجمها من الدارئة الملحية الفسفاتية في درجة حرارة ٤° س ، باستعمال الديال مع التخلية vacuum dialysis لتركيز كل جزء مشطوف إلى حجم حوالي ١,٠ مل . تحفظ هذه الأجزاء في أوعية مغطاة في درجة حرارة ٤° س . يمكن إضافة آزيد الصوديوم (١ مغ / مل) لحفظها لفترات أطول . ينبغي عدم تجميد الأجزاء ثم تسييحها . وأفضل وسيلة للاحتفاظ بمقترنات نشيطة لفترات طويلة هي تجفيدها freeze-drying وحفظها في أوعية مغطاة بإحكام في درجة حرارة ــ ٢٠° س . يجب عدم تجميد المقترنات المُسْتَنْشَأة reconstituted وإنما يجب حفظها في درجة حرارة ٤° س .

١٧ ــ اختبارات مراقبة الجودة

١٧ ــ ١ تعيين عيار ضدي كافٍ للمقترنات

مقدمـــة

تكفي معايرة بسيطة بالانتشار في الهلامة لاختبار أن الأجزاء المشطوفة من المقترنات بها ضد طليق يكفي للعمل جيداً في اختبارات التألق . وهذا الاختبار مفيد أيضاً في مقارنة عيار الضد لمقترنات حديثة التحضير ومقترن معياري موجود مسبقاً .

الطريقـــة

تحضَّر صفائح الانتشار في الهلامة في أغار مذاب في دارئة ملحية فسفاتية ويحتوي على ٢٪ بولي ايثيلين غليكول ، وتُحفر آبار بأنماط معيارية .

يوضع في كل بئر مركزية محلول المستضد (مثلا أيج ج بشري منقًى أو مصل بشري كامل) بتخفيف حوالي ١ مغ / مل (مصل كامل بتخفيف ١ : ١٠ في دارئة ملحية فسفاتية) ويوضع المقترن في الآبار الخارجية صِرفاً neat (بدون تخفيف) ومخففاً بالمضاعفة حتى $\frac{١}{٣٢}$ في الدارئة . وتستعمل حلقة كاملة من الآبار لكل مستحضر . تترك الصفائح طوال الليل في وعاء رطب ثم تفحص التفاعلات .

تعليقـــات

على سبيل الاستئناس يجب أن تعطي المقترنات ذات العيار الكافي من الضد ومن التألق خطوط ترسيب واضحة بين بئر المستضد وآبار الضد في تخفيف لا يقل عن عيار ١٦:١ ، كما يجب أن يكون هذا التخفيف بلون جيد .

١٧ ــ ٢ تعيين نسبة وسم الملوِّن المتألق إلى البروتين في المقترن

مقدمــة

تعتمد خصائص الوسم الجيدة للمقترنات على تحقيق درجة ملائمة من الاقتران بين جزيئات الملوِّن المتألق وجزيئات البروتين . وحيث أن عدد جزيئات الملون المتألق التي ترتبط ببروتين ما تغيِّر الشحنة الكلية للجزيء ، فسوف يؤدي شطف المقترن من دياء السلولوز على مراحل بملح متزايد ، إلى فصل الجزيئات إلى أجزاء تتزايد فيها النسب المولية molar للملوِّن المتألق والبروتين .

وتكون نسب الكثافة الضوئية للمقترنات المقبولة عادة حوالي ١:١ عندما تقاس الكثافة الضوئية للمقترنات عند ذروة طول موجة الامتصاص للملوِّن المتألق وللغلوبلين المناعي . ويكون التخفيف الملائم للمقترن الصِّرف (بدون تخفيف) لهذا الغرض حوالي ١:٤٠ في الدارئة الملحية الفسفاتية .

ذروة طول موجة الامتصاص للملون المتألق الفلوريسئيني المقترن مع بروتين = ٤٩٥ نم
ذروة طول موجة الامتصاص للملون المتألق الروداميني المقترن مع بروتين = ٥٤٦ نم
ذروة الامتصاص للبروتين (ذروة الامتصاص للتيروزين) = ٢٨٠ نم

الطريقــة

يُحضر ٢ مل من تخفيف ١:٤٠ من كل جزء مشطوف من المقترنات وتقاس الكثافة الضوئية بطول موجة ٢٨٠ نم وذروة طول موجة الامتصاص للملوِّن المتألق . ثم تحسب نسبة الامتصاص تبعاً للمعادلة الآتية :

الفلوريسئين : بروتين = $$\frac{\text{٢,٨٧} \times \text{ط ٤٩٥}}{\text{ط ٢٨٠} - (\text{٠,٣٥ ط ٤٩٥})}$$ [ط = انطفاء Extinction أي كثافة ضوئية]

الرودايـــن : بروتين = $$\frac{\text{٦,٠٦} \times \text{ط ٥٤٦}}{\text{ط ٢٨٠} / \text{١,٤}}$$

تعليقـات

تشير القيم التي هي أقل من ٠,٥ (ملون متألق / بروتين = مم/ب) إلى نسب اقتران منخفضة ، وهذه تعطي تلويناً ضعيفاً حتى لو كان عيار الضد مقبولاً . ويُتوقع عادة أن تعطي القيم التي هي أعلى من ١,٥ (مم/ب) مشاكل التلوين اللانوعي لأن العدد الكبير من جزيئات الملوِّن المتألق على الضد يعطيه خصائص عالية الشحنة . ولهذا يُوصَى باستعمال مقترنات بنسب مم : ب بين ٠,٥ و ١,٥ في اختبارات التألق المناعي المباشرة وغير المباشرة . ويمكن بصفة استثنائية استعمال مقترنات بنسب أعلى للكشف عن مستضدات سطحية على الخلايا الحية (مثلا المستقبلات receptors على اللمفاويات lymphocytes) .

١٧ ــ ٣ اختبار الملون المتألق الطليق في المقترنات المحفوظة

مقدمـــة

أثناء حفظ وخزن مقترنات الملوِّن المتألق ــ والضد كمستحضرات مجمَّدة أو مجفَّدة (Freeze-dried) ، يلاحظ أن نسبة معينة من الملون المتألق تتحرر من البروتين . وهذا يتدخل في نوعية الوسم وفي جودة الخلفية في المستحضرات الملوَّنة ولهذا يجب إزالته . وفيما يلي طريقة بسيطة يجب إجراؤها بصفة روتينية مع جميع المقترنات المُسْتَنْشَأة reconstituted .

الطريقـــة

يحضَّر عمود صغير من السيفاديكس ج ٢٥ في دارئة ملحية فسفاتية (يمكن استعمال ممص باستور لهذا الغرض) باستخدام الصوف الزجاجي في حشو طبقة السيفاديكس . تُجعل قطرة من المقترن المعاد بنيانه أو المذاب حديثاً تمر خلال العمود وتُتبع بمحلول الدارئة الملحية الفسفاتية . تلاحظ حركة الشريط الملون . يتحرك المقترن بدون ملوِّن متألق طليق إلى الأسفل بسرعة بحجم بدايته بحيث لا يترك شريطاً ملوناً في أعلى العمود بينما يبقى الملوِّن المتألق الطليق في أعلى العمود . وفي هذه الحالة الثانية يجب تنقية كمية المقترن بأكملها في عمود السيفاديكس ٢٥ ج أو إذالته مقابل دارئة ملحية فسفاتية في درجة حرارة ٤° س . ويفضل الديال في حالات عدم الرغبة في تخفيف المقترنات .

١٧ ــ ٤ اختبار نوعية وشدة المقترنات المتألقة التلوين بنظام المستضد المثبت (كرات الركيزة المستضدية المحددة DASS defined antigen substrate spheres)

مقدمـــة

ثمة أمران لهما أهمية خاصة لمراقبة جودة المقترنات الضدية المتألقة ــ وهما نوعية الكواشف وشدة التألق المعطَى عند معدلات مثلى لاقتران الضد . ومن المفيد استعمال مستضد منقًى مرتبط بحامل لا ذوّاب كبير من خَرَز السيفاروز (لا يعطي تألقاً ذاتياً للخلفية) لكي يمكن تحديد هاتين الخاصتين بدقة . ويمكن بسهولة غسل الخرزات الموسومة وتحضيرها للفحص المجهري على شرائح ، كما يمكن تقييم شدة الواسم المرتبط بعدد معياري إما بصرياً أو باستعمال مقياس ضوئي طيفي . ويمكن تعيين نوعية كواشف متألقة تختبر مقابل رعيل panel من الخرزات المختلفة المُغَلَّلة بالمستضد antigen-coated ، وذلك بمستويات حساسية أعلى من تلك التي تعتبر مقبولة عملياً في التلوين المباشر أو غير المباشر أو كليهما لنُسُج أو مستضدات جُسَيْمانية particulate .

المـــواد

خرز سيفاروز ــ أيج ج بشري
خرز سيفاروز ــ أيج م بشري

مقترن فلوريسيئيني وروداميني بضد الأيج ج البشري
مقترن فلوريسيئيني وروداييني بضد الأيج م البشري
دارئة ملحية فسفاتية
ممصات باستور
غليسرول ــ دارئة ملحية فسفاتية
شرائح مجهرية ، وسواتر ، طلاء الأظافر
أنابيب صغيرة
مجهر فوق بنفسجي مجهز بالمرشحات الملائمة لكل من المشتق الفلوريسيئيني والروداييني

الطريقـــة أ

يؤخذ حوالي ٠,٥ مل من معلق خرزات مغلَّلة بالمستضد ويوضع في أنابيب اختبار صغيرة مستديرة القاع . يُنبَّذ المعلق بسرعة منخفضة ويُطرح الطافي . يعاد تعليق محتوى الأنبوب في المدارات الملحية الفسفاتية ويعاد التنبيذ وطرح الطافي. توضع تقسيمات قدرها ٥ مكل من الخرزات المتراصة لكل مستضد في أنابيب نظيفة لعمل صف من ٦ أنابيب لكل مستحضر مستضد ــ خرزات . يوضع في الأنبوب السابع ٥ مكل من خرزات عادية مغسولة (غير مغللة بالمستضد) .

تؤخذ عينات بمقدار ٢٠ مكل من المقترن الفلوريسيئيني أو الروداميني بكل من ضد الأيج ج البشري و ضد الأيج م البشري ويوضع كل منهما في أنبوب اختبار صغير . بالإضافة إلى هذين الأنبوبين توضع ٥ أنابيب أخرى لعمل صفين من ستة أنابيب حيث يكون الأنبوب الأول من كل صف يحتوي الآن على مقترن غير مخفف . يوضع في الأنابيب ٢ ــ ٦ من كل صف ٤٠ مكل من الدارئة . ثم في كل صف يُنقل ١٠ مكل من المقترن من الأنبوب ١ إلى الأنبوب ٢ ويمزج جيداً (التخفيف = ١:٥) . يؤخذ ١٠ مكل من هذا الأنبوب (٢) وتُنقل إلى الأنبوب ٣ (التخفيف = ١:٢٥) ، وهكذا لتعمل تخفيفات ١:١٢٥ ، ١:٦٢٥ ، ١:٣١٢٥ .

يعاد عمل هذه السلسلة من التخفيفات للمقترن الثاني في الصف الثاني من أنابيب المقترن .

والآن يصبح لديك ٤ صفوف من الأنابيب :

الصف	أرقام الأنابيب						
١ـ خرزات أيج ج	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧ شاهد (بدون مستضد)
٢ـ خرزات أيج م	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧ شاهد (بدون مستضد)
٣ـ مقترن ضد ــ أيج ج							
غير مخفف	١:٥	١:٢٥	١:١٢٥	١:٦٢٥	١:٣١٢٥		
٤ـ مقترن ضد ــ أيج م							
غير مخفف	١:٥	١:٢٥	١:١٢٥	١:٦٢٥	١:٣١٢٥		

باستعمال تخفيفات ضد ــ أيج ج في الصف ٣ ، تؤخذ عينات قدرها ١٠ مكل وتنقل إلى الأنبوب الملائم من خرزات أيج ج (الصف ١) ، أي ينقل من الأنبوب (١) ضد ــ أيج ج إلى الأنبوب (١) خرزات أيج ج وهكذا . يستعمل تخفيف المقترن ١:٢٥ (الصف ٣ ، الأنبوب ٣) ويضاف إلى أنبوب شاهد بدون مستضد (الأنبوب ٧ من الصف ١) . تعاد نفس العملية مع نظام الأيج م بوضع تخفيفات الصف ٤ في الصف ٢ (خرزات أيج م) . يُحتفظ بالأجزاء التي لم تستعمل من تخفيفات المقترن فسوف تلزم للقسم ب أدناه .

تُمزج الأنابيب جيداً وتغطى بالبارافِلْم وتحضن في درجة حرارة ٣٧° س لمدة ساعة . ثم تُنبَّذ وتُغسل الخرزات الموسومة مرتين في الدارئة ، وأخيراً توضع الخرزات المغسولة الموسومة من كل أنبوب على شرائح منفصلة ، وتستر بإحكام . يمكن حفظ هذه الشرائح في الظلام في درجة حرارة ٤° س .

تُفحص شدة التلوين بمجهر فوق بنفسجي مجهز بالمرشحات الملائمة مع تسجيل تأثير تخفيف المقترن . يعيَّن آخر تخفيف للمقترن يعطي أعلى شدة في التلوين . ويمكن أن يوصف هذا بأنه **تخفيف العمل** للمقترن . ويجب أن تنخفض شدة التلوين بعد هذا التخفيف إلى القدر الموجود في الخرزات غير المغلّلة بالمستضد .

الطريقة ب : اختبار نوعية المقترنات

بعد تعيين تخفيف العمل للمقترنات لحجم معياري من الخرزات الحاملة للمستضد الصحيح ، يكون من السهل التحقق من نوعية كل مقترن بالتحقق من أنه يحدث وسم ضئيل ــ أو لا يحدث إطلاقاً ــ لخرزات تحمل المستضد الخاطىء .

يوضع ٥ مكل من خرزات الأيج ج في كل من أنبوبين

يوضع ٥ مكل من خرزات الأيج م في كل من أنبوبين

يوضع ٥٠ مكل من تخفيف العمل لمقترن ضد الأيج ج على كل من أنبوب خرزات الأيج ج وأنبوب خرزات الأيج م .

يوضع ٥٠ مكل من تخفيف العمل لمقترن ضد الأيج م على كل من أنبوب خرزات الأيج ج وأنبوب خرزات الأيج م .

تحضن جميع الأنابيب ثم تغسل وتوضع على شرائح وتفحص كما في الطريقة (أ) أعلاه .

وتسجل نتائج النوعية

تعليقـات

أ ــ اختبارات الضد المتألق طريقة عالية الحساسية للكشف عن مقادير ضئيلة من نوعيات ضدية غير مطلوبة لا يمكن ملاحظتها في نظم الترسيب في الهلامة . ولهذا فإنه من المهم جداً التأكد من أن تكون تخفيفات العمل للمقترنات نوعية بنظام كرات الركيزة المستضدية المحددة DASS أو اختبار مماثل .

ب – في القسم ١٩ « الطرق المكملة » تفاصيل طريقة تحضير خرزات سيفاروز مقترنة بمستضد لمن يرغبون في تحضير خرزات مغلّلة بمستضدات بأنفسهم . ولكن يمكن إمداد المختبرات بخرزات مغلّلة بالأيج ج البشري والأيج م البشري مجاناً عند الطلب من وحدة المناعيات ، منظمة الصحة العالمية ، ١٢١١ جنيف ٢٧ ، سويسرا .

ج – ينصح بإجراء التحقق النهائي لجودة الكواشف في مراكز متخصصة حيث يمكن عمل تقديرات كمية دقيقة ومقارنات مع كواشف مرجعية واختبارات للنوعية (تقييم الجودة الخارجي) . وقد قامت وحدة المناعيات بمنظمة الصحة العالمية بعمل ترتيبات لاختبار عينات من المنتجات التي تحضرها مختبرات مشتركة في هذا البرنامج في مراكز محددة عند طلب ذلك .

د – بالإضافة إلى اختبارات مراقبة الجودة للمقترنات الموصوفة أعلاه ، يجب ضم عدد من الاختبارات الأخرى للتطبيق الناجح لاستعمال المجهر المتألق في اختبارات مباشرة أو غير مباشرة أو كلتيهما ، وهي التالية :

شواهد controls إيجابية : أي مقاطع نسج إيجابية للاختبارات المباشرة أو أمصال إيجابية للاختبارات غير المباشرة . ويمكن استعمال عيارات أمصال إيجابية معلومة في مقارنة جودة الدفعات المختلفة من المقترنات .

شواهد سلبية : أي أمصال سلبية معروفة أو دائرة ملحية فسفاتية أو كلاهما لاختبار نوعية التفاعل .

شواهد مُحصرة blocking controls : أي إحصار الاختبار الإيجابي بضد غير مقترن (من نفس الصنف والنوعية) قبل استعمال المقترن .

الفصل الرابع

طرائق مكملة

١٨ ــ تحضير واستعمال مازات مناعية immunoadsorbents لا ذوّابة بغية امتزاز الأمصال الضدية

١٨ ــ ١ أعمدة السيفاروز ــ المستضد

يغسل السيفاروز ٤ ب Sepharose 4B (فارماسيا) في ماء . يعلق ٢٠ غ في ٥٠ مل ماء ثم يضاف ٢ غ بروميد سيانوجين (CNBr) صلب مع التحريك في خزانة بخار . تعدَّل الباهاء pH إلى ١١ بمحلول هدروكسيد الصوديوم NaOH ٢ مولي وتُستبقى كذلك . يُنهى التفاعل بعد ٨ ــ ١٠ دقائق بالترشيح والغسل في ماء بارد ثم في محلول بيكربونات الصوديوم $NaHCO_3$ ٠,١ مولي . وبدلاً من كل ذلك يمكن شراء سيفاروز منشط ببروميد سيانوجين مباشرة من شركة فارماسيا (انظر الملحق) .

يضاف السيفاروز المنشط للمستضد (حوالي ٣٠٠ مغ في ٦٠ مل من محلول بيكربونات الصوديوم ٠,١ مولي) ويحرك في درجة حرارة ٤° س لمدة ١٢ ــ ١٦ ساعة ــ ثم يغسل بغزارة بالماء مقطر ، ثم الدارئة الملحية الفسفاتية ثم حمض الأستيك ٠,٥ مولي وأخيراً الدارئة الملحية الفسفاتية مرة أخرى . يمكن عندئذ تعبئة المادة في عمود واستعمالها في إزالة أضداد غير مرغوب فيها من ١٠٠ مل من المصل الضدي في كل مرة . وبين كل حجم من المصل الضدي يمكن تصفية العمود الماز من الضد المرتبط بالغسل الغزير بدارئة غليسين حمض هدروكلوريك ٠,١ مولي أو حمض أستيك باهاء pH ٣,٢ ، ثم يغسل بغزارة بالدارئة الملحية الفسفاتية حتى ترتفع باهاء الشُطافة eluate إلى ٧,٢ ــ ٧,٤ .

١٨ ــ ٢ مازات مناعية متصالبة الروابط لمستضد بروتيني

يمكن تحضير مستضدات بروتينية لا ذوّابة بالارتباط المتصالب مع الغلوترالديهيد gluteraldehyde . والمثال على هذا هو الأيج ج البشري ، ولكن يمكن تطبيق نفس العملية بالنسبة إلى السلاسل الخفيفة والملوِّثات الأخرى .

يذاب ٢٥٠ مغ من المستضد في ٥ مل دارئة فسفاتية PO_4 ٠,١ مولي باهاء ٧,٠ . يضاف ١ مل من محلول مائي من الغلوترالديهيد ٢,٥٪ قطرةً قطرة مع التحريك . يسمح للهلامة التي تتكون بالبقاء في درجة حرارة الغرفة لمدة ٣ ساعات ، ثم تُهرس إلى جسيمات صغيرة . تغسل هذه بغزارة بالماء ثم بدارئة فسفاتية PO_4 ٠,٢ مولي باهاء ٧,٤ ، ودارئة غليسين ــ حمض

الهدروكلوريك ٠,١ مولي باهاء ٣,٢ ثم عدة مرات بالدارئة الملحية الفسفاتية باهاء ٧,٤ .

وأفضل استعمال لهذه المادة يكون على شكل معلق دقيق يضاف بحجم مساوٍ إلى المصل الضدي ويُحرَّك في درجة حرارة الغرفة العادية لمدة عدة ساعات . يمكن عندئذ فصل المصل الضدي الممتز بعد التنبيذ وإستنشاء المادة المازّة كما في ١٨ ــ ١ أعلاه .

١٩ ــ تحضير خرزات سيفاروزية مقترنة بمستضد لاختبار مقترنات الضد المتألق بنظام كرات الركيزة المستضدية المحددة DASS

يمكن تنشيط السيفاروز ٤ ب ببروميد السيانوجين كما سبق وصفه في ١٨ ــ ١ أو يمكن بدلاً من ذلك شراء سيفاروز منشط ببروميد السيانوجين مباشرة من شركة فارماسيا (انظر الملحق) .

فيما يلي الطريقة العامة لاقتران مستضدات بروتينية بالخرزات المنشّطة . وللحصول على معلومات أكثر انظر كتيب « استشراب الألفة Affinity Chromatography ــ المباديء والطرائق » الذي ترسله شركة فارماسيا ، أوبسالا ، السويد ، مجاناً عند الطلب .

يُضخَّم (١) غ من خرز الهلامة ويغسل لمدة ١٥ دقيقة على مرشح زجاجي بحوالي ٢٠٠ مل من حمض الهدروكلوريك ٠,٠٠١ مولي (٠,٠٣٦ مل / ل) . يذاب حوالي ١٠ مغ مستضد بروتيني في (أو يُدال diatysed مقابل) دارئة بيكربونات الصوديوم $NaHCO_3$ ٠,١ مولي تحوي كلوريد الصوديوم ٠,٥ مولي ــ بحيث يكون الحجم النهائي ٥,٠ مل . يُمزج هذا مع خرز الهلامة في أنبوب اختبار ويحرك لمدة ساعتين في درجة حرارة الغرفة (درجة حرارة ٤° س طوال الليل) . **لا يجوز** استعمال محراك مغناطيسي لأنه يحطّم الخرزات . تغسل المادة غير المرتبطة بالدارئة المقرنة وتُشبَّع أية مجموعات نشطة متبقية بمحلول الايثانولامين ethanolamine ١ مولي باهاء ٨,٠ لمدة ساعة إلى ساعتين . بعد ذلك تغسل المادة بغزارة بدارئة حمض الأستيك ٠,١ مولي باهاء ٤,٠ يحوي كلوريد الصوديوم ١ مولي ، ثم بدارئة بورات ٠,١ مولي باهاء ٨,٠ تحوي كلوريد الصوديوم ١ مولي .

يمكن حفظ خرزات السيفاروز المقترنة بالمستضد مجمَّدة (– ٢٠° س) أو مجفَّدة . ويمكن استنشاؤها reconstitution بدون تلف بعد فترات تتوقف على المستضد المستعمل .

٢٠ ــ تحضير دياء السلولوز DEAE للاستشراب على العمود

يمكن شراء دياء السلولوز في شكل ليفي وهذا يعطي معدلات جريان أعلى ولكن يعطي ميْزاً resolution أقل ، أو في شكل حبيبات مكرَويّة microgranulat وهذه تعطي امتزازا أكثر للبروتينات ومَيْزاً أفضل .

غسل المازّ الجديد

لإزالة الجسيمات الدقيقة يجب السماح لمعلق السلولوز في الدارئة بالرسوب بالجاذبية لمدة ملائمة من الوقت ثم يُرمى الطافي الغائم . ويجب تكرار هذه العملية عدة مرات . وبعد ذلك يجب غسل هذه المادة عدة مرات ويفضل أن يكون ذلك من خلال مرشح زجاجي ملبّد ، تحت التخلية .

مالم تكن دياء السلولوز DEAE مشتراة في شكل سبقت موازنته ، فإنه يجب معالجتها قبل استعمالها للاستشراب على العمود كما يلي :

تُنقع طوال الليل في فسفات وحيدة البوتاسيوم KH_2PO_4 ٠,٣ مولي (٥٠٠ مل / لكل ٥٠ مغ) من الدياء الجافة .

تُغسل في نفس الدارئة ثم خمس مرات بغزارة بالماء المقطر .

تُنقل إلى دورق وتُغسل في هدروكسيد الصوديوم NaOH ٠,٥ مولي (٥٠٠ مل لكل ٥٠ مغ) تترك ١ ــ ٤ ساعات . ثم تغسل مرة أخرى (باستعمال القمع) بمحلول هدروكسيد الصوديوم ٠,٥ مولي ثم تترك في الدورق مرة أخرى ثم تعلّق في ٥٠٠ مل من الإيثانول لكل ٥٠ مغ مدة ساعة إلى ساعتين .

تُغسل بالإيثانول ثم بمقدار ٨٠٠ مل من هدروكسيد الصوديوم ٠,٠٥ مولي ، ثم ٥ ــ ١٠ مرات بمقدار ٨٠٠ مل من الماء المقطر .

تضبط إلى الباهاء pH الملائمة بالمعايرة الدقيقة بدارئة ثم تغسل بدارئة الموازنة النهائية مرتين أو ثلاث مرات . تحفظ في الدارئة لحين الحاجة اليها .

حشــو الأعمـدة

يغلق بملزمة clamp الأنبوب المطاطي في قاعدة العمود ثم يملأ بالدارئة الأولية (الموازنة) . يضاف مقدار كافٍ من نفس الدارئة إلى دياء السلولوز DEAE لعمل معلق خفيف ثم يوضع هذا في العمود . بينما يُسمح للدارئة بالتسرب من خلال الملزمة . تُتابع هذه العملية حتى يمتلىء العمود ويستقر إلى سنتميترات قليلة من أعلى العمود . يعبأ العمود في درجة حرارة الغرفة لتفادي ظهور فقاقيع . يغسل العمود مراراً ببضع مئات من الميللترات من الدارئة . يجب أن يكون باهاء شُطافة العمود نفس باهاء دارئة الغسيل .

ملحـــق

جدول الدارئـــة الفسفاتية

باهاء pH	حجـم أ	حجـم ب
٥,٤	٩٦,٩	٣,١
٥,٦	٩٥,٠	٥,٠
٥,٨	٩٢,٠	٨,٠
٦,٠	٨٩,	١١,٠
٦,٢	٨١,٥	١٨,٥
٦,٤	٧٣,٨	٢٦,٢
٦,٦	٦٤,٠	٣٦,٠
٦,٨	٥٠,	٥٠,٠
٧,٠	٣٩,	٦١,٠
٧,٢	٢٨,	٧٢,٠
٧,٤	١٩,٢	٨٠,٨
٧,٦	١٣,٠	٨٧,٠
٧,٨	٨,٥	٩١,٥
٨,٠	٥,٥	٩٤,٥

أ = فسفات الصوديوم ثنائية الهدرجين $NaH_2PO_4.2H_20$

١ لتر من (أ) بتركيز ٠,١ مولي = ١٥,٦ غ

ب = فسفات ثنائية الصوديوم Na_2HPO_4

١ لتر من (ب) بتركيز ٠,١ مولي = ١٤,٢ غ

تستعمل محاليل متساوية المولية (٠,١ مولي من كل)

قائمة مفهرسة للكواشف والأجهزة والمواد
(الموردون في المملكة المتحدة)

١ –

Amicon Ltd
Amicon House
2 Kingsway
Woking
Surrey GU21 1UR
United Kingdom

Ultrafiltration	نظم ترشيح فائق
	خلايا محرّكة
	مرشحات مجوفة

٢ –

Beckman-Riic Ltd.
Turnpike Road
Cressex Industrial Estate
High Wycombe
Bucks HP12 3NR
United Kingdom

مقياس طيفي ضوئي فوق بنفسجي (Cat. No. 133103, Model 25)

٣ –

BDH Chemicals Ltd.
Poole
Dorset B1L 124 NN
United Kingdom

37055 2L	أيسر ــ سستئين هيدروكلوريد
330064 D	أغاروز
31036 2 A Nr	ورق مشعر (باهاء ٦ ــ ٨)
31037 sC Nr	(باهاء ٨ ــ ١٠)
31033 2R FR	(باهاء ١ ــ ١٤)
44041	إيزوثيوسيانات الفلورئيسين الزمير ــ ١
44027	إيزوثيوسياثات الرودامين ٤٤٠٨٧
29577 4B	بولي ايثلين غليكول (و.ج ٦٠٠٠)
14021	ثنائي ميثيل سلفوكسيد

Chem. Lab. Instruments Ltd.
Horminster House
129 Upminster Road
Hornchurch
Essex RM11 SXJ
United Kingdom

أحواض رحلان كهربائي + صفائح تبريد
محراكات مسخنة — 553H

ه —

Fisons Scientific Apparatus Ltd.
Bishop Meadow Road
Loughborough
Leicestershire LE11 ORG
United Kingdom

مَلاوق spatulas	١٠	سم	M6/4
	١٥	سم	MCH
علب بتري	١٠٠	مم٢	103
توابع مغناطيسية	١٢	مم	MS/F0
	٢٥	مم	MS/F1
	٣٥	مم	MS/F1.5
	٥٠	مم	MS/F3
حواجل مخروطية	٢٠٠٠	مل	1130/30
قوارير زجاجية	٢٠٠	مل	BMF/4
دوارق	٥٠	مل	1000/02
	١٠٠٠	مل	1000/22
دوارق — فولاذ صامد	٧٠٠	مل	BS5/204
أقلام رصاص			P/BLA
أسطوانات قياس	١٠	مل	G175
	١٠٠	مل	G156
	١	مل	G152
زرّاقة هاملتون بطرف كليل	١٠	مكل	701N
مقصات			2017/6
مقاييس حرارة صفر — ١٢٠° س			+1357
أحواض تلوين			GT/30
حوامل تلوين			E.102
ممصات باستور			D/RTM810

ممصات مدرجة	١	مل	G 500
	٢	مل	G 502
	٥	مل	G 504
	١٠	مل	G 505
مرشح بمضخة ــ بولي بروبيلين			B 159400
ألماسة للكتابة على الزجاج			SD/2000
أنبوب مطاطي قوي الجدار			PRM/65
حواجل الترشيح			1170/06
مقياس باهاء موديل ٧			(Carning-EEL)
مشابك هوفمان			171/7
أوراق ترشيح رقم ١ ٥٨٠ × ٦٨٠ م			
صوديوم باريبتون			B/0100
باريبتون (حمض ثنائي ايثيل باريبتون)			B/0050
آزيد الصوديوم			5/2363
هيدروكلوريد الصوديوم			5/4880
حمض ديامينو ايثان تتراستيك ثنائي صوديوم			D/0650
كلوريد الصوديوم			5/3120
فسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين			5/3720
فسفات ثنائية الصوديوم			5/4440
زرقة البروموفينول (صلبة)			B/4630
حمض أسيتيك جليدي			A/0360
مينانول			
ثنائي كرومات البوتاسيوم			SLR P/4680
كربونات الصوديوم			SLR S/2800
بيكربونات الصوديوم			SLR S/4200
حمام مائي TWB-2 Teche Temperor			

٦ ــ

Gallenkamp A. & Co.
Frederick Street
Birmingham B1 3HT
United Kingdom

موازين بحساسية	٠,٠١	مغ	BFE-270-BH51 AR
أو	٠,١	مغ	BEF 300D H72
ميزان ميتلر			Mettler P1210 BCW-520D

٧ –

Hoechst Pharmaceutical Division
Hoechst House
Salisbury Road
Hounslow TW4 6JH
United Kingdom

5 EWA 03	م	٢,٠	قواطع الآبار
5 EWB 03	م	٢,٥	
5 EWC 03	م	٣,٠	
5 EWC 03	م	٤,٠	

٨ –

Medical International Ltd.
239 Liverpool Street
London N1 1LX
United Kingdom

أنابيب فيسكينغ	٨ /٣٢
أنابيب فيسكينغ	٣٢/١٦

٩ –

Pharmacia (G.B.) Ltd.
Paramount House
75 Uxbridge Road
London W5 5S5
United Kingdom

17-0360-01	زرقة الديكستران	١٠ غ
	سيفاديكس	٢٥ ج
		٢٠٠ ج
	سيفاروز	4B
	سيفاكريل	S300
	أعمدة (انظر قائمة الشركة)	

١٠ –

Richardsons of Leicester Ltd.
Evington Valley Road
Leicester LE5 5LJ
United Kingdom

قوارير شفط بولي ايثلين ١٠ لتر
حوامل أنابيب رقم ٢ ٣٦ أنبوب اختبار $\frac{٣}{٤}$ بوصة (٣ × ١٢)
رقم ٦ ١٢ قناني عادية (٢ × ٦)
رقم ٣٦ ٣٦ × أنبوب $\frac{١}{٢}$ بوصة (٤ × ٩)
شفرات المبضع رقم ١١
مقبض رقم ٣

١١ -

Seward Laboratory
UAC House
Blackfriars Road
London SE1 9UG
united Kingdon

أنابيب بلاستيك ٢ مل + أغطية	GW3, GC3
قوارير عادية + أغطية	1302/R
أنابيب اختبار ٩ مل	1302/R
أسَلات نبوذة ١ مل	FT 61201
أسَلات نبوذة $\frac{١}{٢}$ مل	
كواشف مناعية (ترسل القائمة عند الطلب)	

١٢ -

Sigma Chemical Co. Ltd.
Fancy Road
Poole
Dorset BH17 7NH
United Kingdom

زرقة لامعة R (كوماسي)	C.1 No. 42660
تربسين	TO134
مثبط التربسين	T9003

١٣ -

Wright Scientific Supplies Ltd.
Upper Mill
Stonehouse
Gloucester
United Kingdom

أعمدة استشراب	٢٤	مل GF10 x 30 Vol.
	٩٠	مل GF16 x 45 Vol.

طباعة تكنوتكس فن الجرافيك