

تکنیک ایمونوهیستوشیمی

عنوان ها

[تکنیک IHC یا ایمونو هیستوشیمی چیست؟](#)

[IHC در پاتولوژی چیست؟](#)

[تاریخچه ایمونو هیستوشیمی](#)

[کاربردهای آزمایش IHC](#)

[انواع روش های ایمونو هیستوشیمی](#)

[تکنیک ایمونو هیستوشیمی به روش نوری](#)

[تکنیک ایمونو هیستوشیمی به روش فلورسنت](#)

[مراحل تکنیک ایمونو هیستوشیمی به روش دابل فلورسنت](#)

[پیش تیمار مقاطع بافتی](#)

[بازیابی آنتی ژن ها با گرما](#)

[بازیابی آنزیمی](#)

[ترکیب بازیابی گرمایی و بازیابی آنزیمی](#)

[تیمار با سدیم تترا هیدرو بورات \(Sodium borohydride\)](#)

[جمع بندی](#)

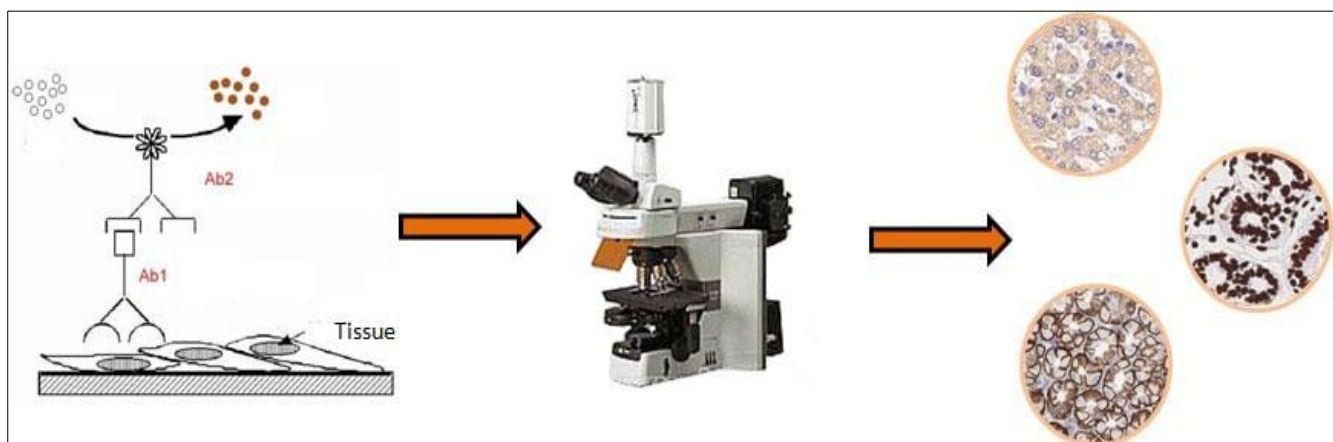
[سوالات متداول](#)

تکنیک IHC یا ایمونوهیستوشیمی چیست؟

تکنیک ایمونوهیستوشیمی (Immunohistochemistry)، یک روش در آزمایشگاهی بافت‌شناسی و ترکیبی از تکنیک‌های بیوشیمی، ایمونولوژی و آناتومی جهت تصویربرداری از اجزای مجزا در انواع بافت‌های بدن موجودات زنده و غیرزنده می‌باشد. روش ایمونوهیستوشیمی بر اساس شناسایی و مکان‌یابی انواع آنتی‌ژن‌ها یا پروتئین‌ها با استفاده از فعل و انفعالات آنتی‌ژن-آنتی‌بادی، در سلول‌ها و یا یک بخشی از بافت است. تکنیک ایمونوهیستوشیمی به عنوان ابزاری قدرتمند در آزمایشگاه‌های تشخیصی و تحقیقاتی در تشخیص و ردیابی انواع سرطان‌ها مانند Breast Cancer (سرطان پستان) در زنان، بیماری‌های نئوپلاستیک مورد استفاده قرار گرفته است. در نیم قرن گذشته، پیشرفت فوق‌العاده‌ای در تولید ابزارها و سیستم‌های ردیابی آنتی‌بادی به دست آمده است. با این حال اکثر قریب به اتفاق این تلاش‌ها، در جهت آنالیز بیشتر بیان پروتئین به عنوان نشانگر انواع سلول، بافت یا تومور خاص مورد استفاده قرار گرفته است.

IHC در پاتولوژی چیست؟

ایمونوهیستوشیمی در پاتولوژی، به عنوان یک روش رنگ آمیزی جهت سنجش کیفی و کمی پروتئین‌های بیان شده از جمله انواع آنتی‌ژن‌ها (مارکرها) در بیماری‌ها و مسیرهای سیگنالینگ می‌باشد که با استفاده از انواع مارکرها قابل رویت مانند رنگ فلئورسنت، آنزیم‌ها و المنت‌های رادیواکتیو انجام می‌شود. علاوه بر کاربردهای تحقیقاتی، آزمایش IHC برای تشخیص سرطان‌ها، آنتی‌ژن‌های اختصاصی تومورها بر پایه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و پلی‌کلونال مورد استفاده گسترده قرار گرفته است.



شکل ۱: اصول کلی تکنیک ایمونوهیستوشیمی

تاریخچه ایمنو‌هیستوشیمی

اصول ایمنو‌هیستوشیمی از دهه ۱۹۳۰ شناخته شده است اما اولین مطالعه این تکنیک در سال ۱۹۴۲ گزارش شده است بدین صورت که محقق بنام Coons و همکارانش با استفاده از آنتی بادی‌های نشاندار شده با FITC (fluorescein isothiocyanate) آنتی‌ژن‌های پنوموکوکی در بافتهای آلوده به این باکتری را شناسایی کردند. از آن زمان به بعد پیشرفت چشمگیری در روش‌های رنگ‌آمیزی ایمنی و تصویربرداری با میکروسکوپ نوری مشاهده شد. در نتیجه ایمنو‌هیستوشیمی روشی رایج و ضروری برای پاتولوژیستها تبدیل شده است. Immunohistochemistry یا به اختصار IHC، نام خود را از ریشه immuno با اشاره به آنتی‌بادی‌های مورد استفاده در این تکنیک و Histo به معنی بافت گرفته است.

کاربردهای آزمایش IHC

امروزه از تکنیک ایمنو‌هیستوشیمی در آزمایشگاه‌های تشخیصی طبی و مراکز تحقیقاتی استفاده گسترده ای دارد.

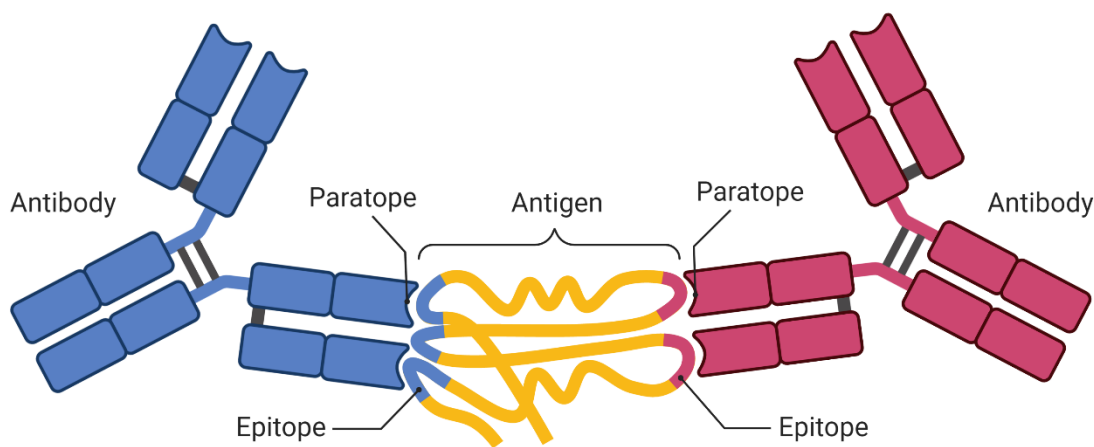
کاربردهای تکنیک IHC عبارتند از:

- تشخیص بیماری‌ها از جمله تومورها و سلولهای سرطانی
- تحقیقات بیولوژیکی، پزشکی و دامپزشکی
- توسعه و طراحی دارو جهت درمان بیماریها
- بررسی فرایند تمایز بافتی به واسطه شناسایی مارکرهای سطحی

به عنوان مثال پزشکان با استفاده از تکنیک ایمنو‌هیستوشیمی برای تشخیص خوش خیم یا بدخیم بودن تومور، تعیین مرحله و درجه پیشرفت آن، شناسایی نوع سلول و منشا متاستاز به منظور یافت یافتن محل تومور اولیه استفاده می کنند. برای مثال با استفاده از مارکرهای اختصاصی مثل مارکر Synaptophysin در تومورهای نورواندوکراین، منشا و ماهیت تومور جهت درمان صحیح تشخیص داده می شود.

در زمینه تحقیقاتی، IHC را می‌توان به تنهایی یا همراه با تکنیک‌های آزمایشگاهی دیگر برای مطالعه و بررسی رشد بافتها و اندام طبیعی، فرایندهای پاتولوژی مثل بهبود زخم، مرگ و ترمیم سلولی و بسیاری زمینه‌های دیگر مورد استفاده قرار داد. تکنیک ایمنو‌هیستوشیمی همچنین در زمینه تحقیقات دارویی و صنعت داروسازی برای آزمایش میزان اثربخشی دارو به واسطه شناسایی فعالیت و کاهش و افزایش مارکرهای بیماری در بافت‌های هدف کاربرد گسترده ای دارد.

همانطور که بیان شد، ایمونوهیستوشیمی متدی بر مبنای رنگ آمیزی ایمنی بخش‌های نازک برش زده از بافت روی لام‌های شیشه‌ای به دنبال ردیابی آنتی‌ژنها با استفاده از آنتی‌بادی‌های کنژوگه شده با مواد فلئورسنت، آنزیم‌ها و یا عناصر رادیواکتیو می‌باشد. با اتصال آنتی‌بادی اختصاصی آنتی‌ژن هدف در سطح سلول و تولید رنگ طی واکنش، با میکروسکوپ نوری می‌توان محصول رنگی را که نشان‌دهنده مکان بیان آنتی‌ژن است، تشخیص داد. آنتی‌بادی‌های اختصاصی مونوکلونال در تکنیک ایمونوهیستوشیمی از طریق تزریق آنتی‌ژن‌های مختلف به حیوانات آزمایشگاهی مانند خرگوش و تحریک سیستم ایمنی بدن حیوان و به دنبال آن تولید آنتی‌بادی طی تمایز لنفوسیت‌های B انجام می‌شود. متداول‌ترین آنتی‌بادی‌ها از گروه IgG است. با وجود اینکه آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال میل ترکیبی بیشتر دارند، اما به علت اختصاصیت کمتری نسبت به آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، کمتر استفاده می‌شوند. مزیت استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال این است که نسبت به آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، می‌توانند چند اپی‌توپ (Epitope) از آنتی‌ژن هدف را شناسایی کنند.



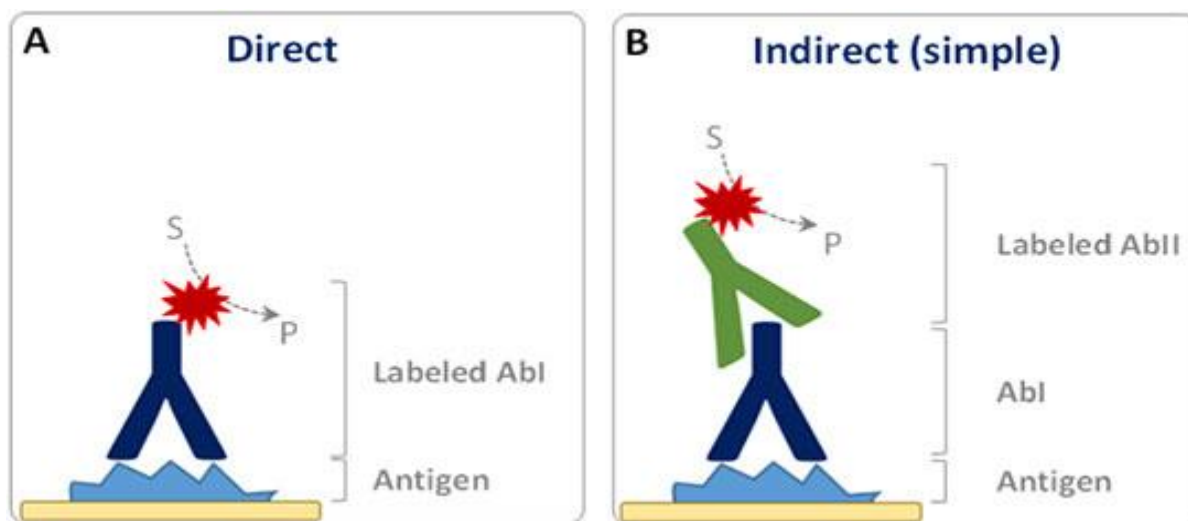
شکل ۲: شناسایی آنتی‌ژن توسط آنتی‌بادی‌ها. در تصویر اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن مشخص شده است.

جهت نشان دادن واکنش آنتی‌بادی و آنتی‌ژن از کنژوگه‌های استفاده می‌شود که به آنتی‌بادی‌ها متصل شده و در حضور سوبسترای اختصاصی و کروموزن، یک محلول رنگی تولید می‌کنند. این محلول رنگی در محل واکنش آنتی‌بادی و آنتی‌ژن رسوب کرده و زیر میکروسکوپ قابل دیدن است.

واکنش رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی تکنیک IHC با دو روش مستقیم و غیر مستقیم انجام می‌شود. این دو روش

عبارتند از:

- در روش مستقیم (Direct method) واکنش رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی یک مرحله ای است که آنتی بادی اولیه کنژوگه مستقیماً با آنتی ژن های سطح سلول ها در نمونه موردنظر واکنش می دهد. این روش اگر چه آسان، سریع و کم هزینه (به علت استفاده از یک نوع آنتی بادی) است ولی حساسیت پایین به علت سیگنال نوری کم دارد بنابراین روش مناسب جهت تشخیص ماکرها نمی باشد.
- در روش دوم یعنی غیرمستقیم (Indirect method)، واکنش رنگ آمیزی دو مرحله ای است که ابتدا آنتی بادی اولیه (نشانداز نشده) به آنتی ژن هدف متصل شده و سپس آنتی بادی ثانویه کنژوگه شده به آنتی بادی اولیه متصل می گردد. در این روش آنتی بادی ثانویه علیه IgG گونه های حیوانی است که از آن آنتی بادی اولیه تهیه شده است. همچنین آنتی بادی ثانویه با رنگ فلوئورسنت مانند FITC، رودامین، Texas red و یا با آنزیم هایی از جمله پراکسیداز، آلکالین فسفاتاز یا گلوکز اکسیداز نشاندار می شود. حساسیت این روش نسبت به روش مستقیم بیشتر است. چون آنتی بادی ثانویه سبب حفظ فعالیت و در نتیجه تقویت سیگنال می شود.



شکل ۳: تصویر شماتیک از روش مستقیم و غیرمستقیم تکنیک ایمونوهیستوشیمی. S: کروموزنیک، P: محصول نامحلول رنگی

انواع روش های ایمنو هیستوشیمی

۱. نوری
۲. فلورسنت
۳. دابل فلورسنت

تکنیک ایمنو هیستوشیمی به روش نوری

۱. استخراج و فیکس کردن بافت هدف: اولین مرحله انجام تست ایمنو هیستوشیمی آماده سازی نمونه بیولوژیکی است. آماده سازی و کیفیت نمونه در تشخیص و ردیابی صحیح آنتی ژن هدف نقش مهمی ایفا می کند. منبع نمونه بافتی متنوع است. می تواند از روش بیوپسی، جراحی، مدل حیوانی و یا اتوپسی (autopsy) تهیه شده باشد. در سه نوع اول، بافت تازه را در اختیار پاتولوژیست قرار داده ولی در روش اتوپسی حداکثر تا دو ساعت بعد از مرگ موجود هدف، بافت تهیه می شود. بنابراین می بایست فوری بافت تهیه شده به روش اتوپسی را جهت جلوگیری از تجزیه آنتی ژن، فیکس کرد. بنابراین بافت مورد مطالعه می تواند فیکس شده با پارافین جامد، محلول فرمالدئید یا فریز شده باشد. اکثر بافت های مورد استفاده در تکنیک IHC فیکس شده در پارافین هستند.

فیکس کردن بافت مورد نظر، از طریق غوطه ور کردن آن برای ۲۴ تا ۴۸ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد انجام می شود.

۲. تهیه آنتی بادی اختصاصی آنتی ژن: از آنجا که آنتی بای قیمت بالایی دارد بنابراین می بایست از کمپانی مطمئن و با کیفیت بالا خریداری کنیم. در غیر صورت عدم دقت در تهیه آنتی بادی می تواند هزینه گزافی را به محقق و آزمایشگاه تحمیل کند.

۳. مراحل پردازش بافتی (Tissue Processing) شامل مرحله آبگیری با غلظت های مختلف اتانول

۱-۳- مرحله آبگیری: به دلیل عدم حلالیت پارافین در آب، باید قبل از غوطه ور کردن بافت در پارافین مرحله آبگیری را انجام دهیم. بافت ها را در محلول اتانول با غلظت های ۷۰، ۸۰ و ۹۵ درصد هر کدام به مدت ۴۵ دقیقه قرار می دهیم سپس بافت ها را ۳ بار در اتانول ۱۰۰ درصد به صورت جداگانه هر بار ۱۰۰ دقیقه انکوبه می نماییم.

۳-۲- مرحله شست و شو و شفاف سازی: بعد از انجام مراحل آبگیری، جهت شستشوی مواد مرحله قبل از زایلین استفاده می کنیم به این صورت که بافت ها را در دو ظرف جداگانه محلول زایلین (زایلول) هر کدام را به مدت یک ساعت انکوبه می کنیم.

۳-۳- بافت ها را به ترتیب در سه ظرف جداگانه پارافین هر کدام به مدت یک ساعت غوطه ور می کنیم.

۴-۳- بافت ها را داخل بلوک های پارافینی جایگذاری می کنیم.

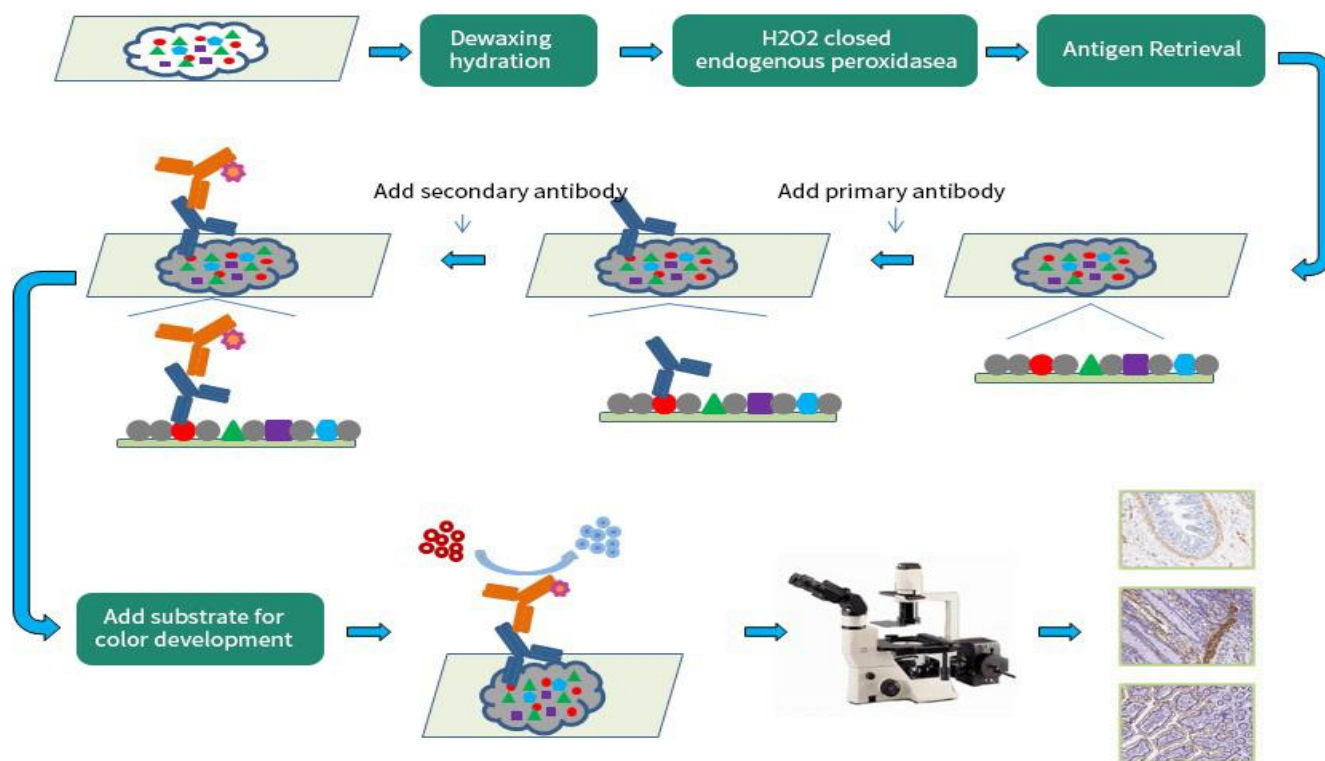
۴. برش بافت پارافینی و تهیه لام: با استفاده از دستگاه میکروتوم برش داده و قطعات برش زده را به لام انتقال می دهیم.

۵. مرحله آبدهی: پس از چسبیدن برش بافت به لام بایستی پارافین را از بافت جدا کنیم که نیاز به آبدهی بافت می باشد. مرحله آبدهی برعکس مرحله آبدگیری انجام می شود.
۶. دیپارافینه کردن بافت ها: لام ها را در دو ظرف جداگانه زایلن هر کدام را به مدت ۵ دقیقه قرار می دهیم و سپس لام ها را دو مرتبه و هربار به مدت ۳ دقیقه در اتانول ۱۰۰ درصد و سپس یک بارو به مدت ۳ دقیقه در هر یک از غلظت های ۵۰ ، ۷۰ و ۹۵ اتانول قرار می دهیم. نهایتا اجازه می دهیم بافت ها به مدت یک شب در دمای اتاق خشک شوند.
۷. بلاک کردن آنزیم پراکسیداز سلولی :به منظور بلاک کردن فعالیت پراکسیداز سلولی لام ها را در محلول متانول حاوی آب اکسیژنه ۳ درصد یا ExtrAvidin-Peroxidase برای مدت ۱۰ دقیقه انکوبه می کنیم. بعد از آن، دو بار و هر بار ۵ دقیقه بوسیله محلول بافری PBS شستشو می دهیم.
۸. در معرض قرارگیری اپی توپ های آنتی ژن: بدین منظور، لام ها را داخل یک ظرف قرار داده و روی آن بافر سیترات ریخته و ظرف را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ تا ۱۰۰ درجه سانتی گراد حرارت می دهیم. سپس ظرف را برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق می گذاریم تا سرد شود.
۹. مرحله شستشو: لام ها را دو مرتبه و هر بار برای مدت ۵ دقیقه با محلول بافری PBS شستشو می دهیم.
۱۰. مقدار مناسبی از بلاکینگ بافر (مثلا سرم 10% fetal bovine serum in PBS) روی هر لام ریخته و سپس برای مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده و سپس با PBS شستشو می دهیم.
۱۱. واکنش آنتی بادی اولیه: مقدار مناسبی از آنتی بادی اولیه رقیق شده را روی بافت ها ریخته و برای یک ساعت در دمای انکوبه کرده و سپس دو بار با محلول PBS و هر بار ۵ دقیقه شستشو می دهیم.
۱۲. واکنش آنتی بادی ثانویه: مقدار مناسبی از آنتی بادی ثانویه رقیق شده را بر روی هر لام ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار می دهیم سپس لام ها را دو بار با محلول PBS و هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو می دهیم.
۱۳. مقدار مناسبی از Sav-HRP رقیق شده را بر روی بافت ها ریخته و برای ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده سپس لام ها را دو بار با محلول PBS و هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو می دهیم.
۱۴. بر روی هر بافت مقدار مناسبی از محلول DAB ریخته و پس از ۵ دقیقه انکوبه، ۳ مرتبه با محلول PBS شستشو می دهیم.
۱۴. لام ها را برای دو دقیقه داخل هماتوکسیلین قرار داده و سپس با آب شستشو می دهیم.

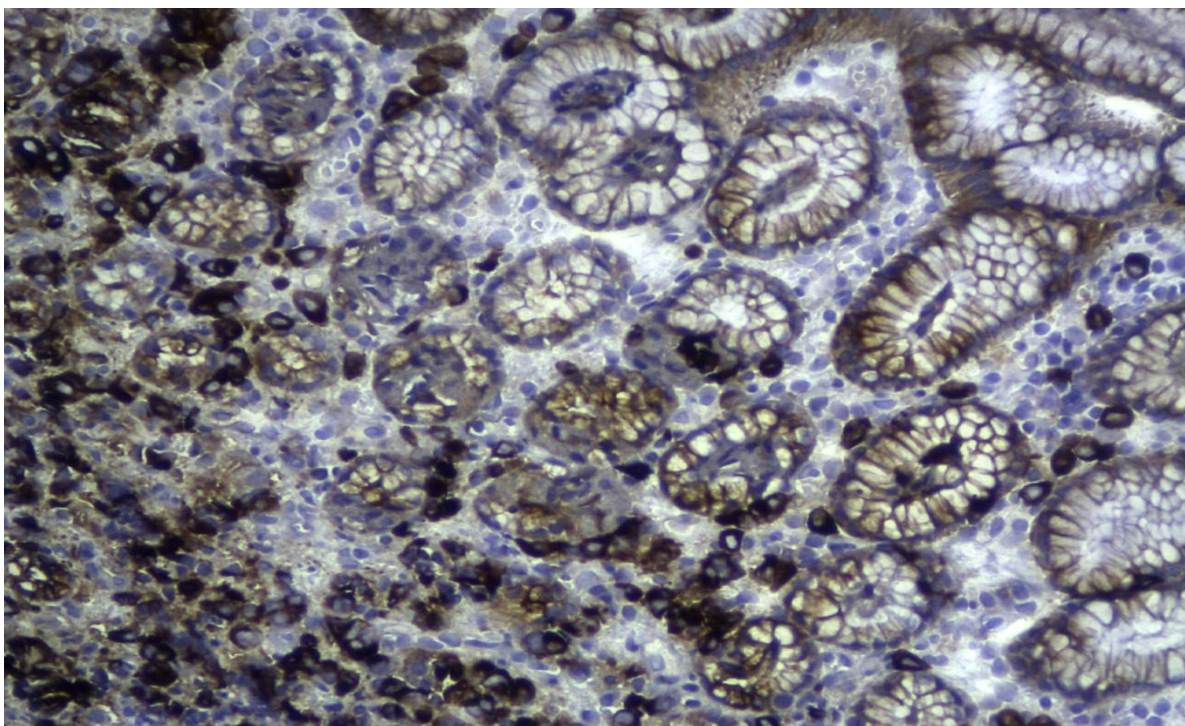
۱۵. لام ها را جهت آگیری در اتانول ۹۵ و ۱۰۰ درصد هر کدام دو بار و هر بار ۵ دقیقه قرار می دهیم.

۱۶. لام ها را جهت شفاف شدن داخل زایلن قرارداده و سپس لام ها را با چسب انتلان مونت (Mounting) می کنیم.

۱۷. مرحله آخر بررسی و تصویربرداری از نمونه ها با میکروسکوپ نوری می باشد.



شکل ۴: پروتکل کلی تکنیک ایمونوهیستوشیمی به روش نوری



شکل ۵: آنالیز ایمنو هیستوشیمی به روش نوری از بافت سرطانی معده انسان با مارکر CD3

تکنیک ایمنو هیستوشیمی به روش فلورسنت

۱. فیکس کردن بافت هدف: در روش فلورسنت، بافت ها را در محلول فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۴ تا ۸ ساعت در دمای اتاق فیکس می کنیم. معمولاً حجم فیکساتور باید ۵۰ برابر بیشتر از اندازه بافت غوطه ور باشد. از تثبیت بافت برای بیش از ۲۴ ساعت خودداری کنید زیرا آنتی ژن ها ممکن است پوشانده یا از بین بروند.
۲. مرحله آبگیری: از آنجایی که پارافین با آب غیر قابل اختلاط است، قبل از افزودن پارافین مذاب، بافت باید آبگیری شود. بافت ها را به ترتیب در اتانول های ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ هر کدام سه بار به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه می کنیم.
۳. بافت را سه بار به مدت ۲۰ دقیقه در زایلن (گزیلول) در دمای اتاق غوطه ور می کنیم.
۴. بافت ها را در قالب های پارافینی قرار داده و با پارافین مذاب در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد قالب گیری می کنیم.
۵. با استفاده از میکروتوم چرخشی، مقاطع بافتی به ضخامت ۵ تا ۱۵ میکرومتر را برش می دهیم.
۶. بافت های برش زده را در حمام آب ۵۶ درجه سانتی گراد شناور می کنیم.

۷. برشهای بافتی را روی لام های بافت شناسی قرار داده و اجازه می دهیم برشها را یک شب در دمای اتاق خشک شود. برش های بافتی در پارافین را می توان در دمای اتاق یا در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد برای چندین سال در جعبه های ذخیره سازی اسلاید نگهداری کرد.

۸. مرحله آبدهی مجدد مقاطع بافتی: در این مرحله از رقت های مختلف اتانول استفاده می کنیم.

۸-۱- بلوک های بافتی را ۲ مرتبه به مدت ۱۰ دقیقه در زایلن (گزیلول) قرار می دهیم.

۸-۲- اکنون بلوک ها را ۲ مرتبه به مدت ۱۰ دقیقه در اتانول ۱۰۰ درصد غوطه ور می کنیم.

۸-۳- نمونه های فیکس شده را به مدت ۵ دقیقه در اتانول ۹۵ درصد، سپس ۵ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و بعد از آن در اتانول ۵۰ درصد غوطه ور می کنیم.

۹. برش های بافتی را با آب دیونیزه شست و شو می دهیم.

۱۰. نهایتا برش ها را به مدت ۱۰ دقیقه در بافر PBS شست و شو غوطه ور کرده و سپس بافر اضافی را تخلیه می کنیم.

نکته: تثبیت بیش از حد ممکن است منجر به پوشانده شدن یک اپی توپ و سیگنال پس زمینه غیر اختصاصی قوی شود. در صورت لزوم، پروتکل بازیابی آنتی ژن را می توان در این زمان انجام داد.

برای جلوگیری از هدر رفت آنتی بادی، اطراف بافت را با یک مانع آبگریز (قلم داکو پن) خط می کشیم.

۱۱. با انکوبه کردن نمونه ها در بافر مسدود کننده (سرم اسب ۱٪ در PBS) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، رنگ آمیزی غیر اختصاصی بین آنتی بادی های اولیه و بافت را مسدود می کنیم.

۱۲. آنتی بادی های اولیه رقیق شده در بافر انکوباسیون را طبق دستورالعمل سازنده آنتی بادی، به لام ها اضافه می کنیم.

۱۳. برای رنگ آمیزی فلورسنت IHC توصیه می شود برش های بافتی که در طول شب در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد انکوبه شود. انکوباسیون امکان اتصال اختصاصی بهینه آنتی بادی ها به اهداف بافتی را فراهم می کند و رنگ آمیزی غیر اختصاصی پس زمینه را کاهش می دهد.

۱۴. برش های بافتی را ۳ بار به مدت ۱۵ دقیقه در بافر شست و شو شست و شو می دهیم. آنتی بادی ثانویه رقیق شده در بافر انکوباسیون را طبق دستورالعمل شرکت سازنده به بافت ها افزوده و انکوبه می کنیم.

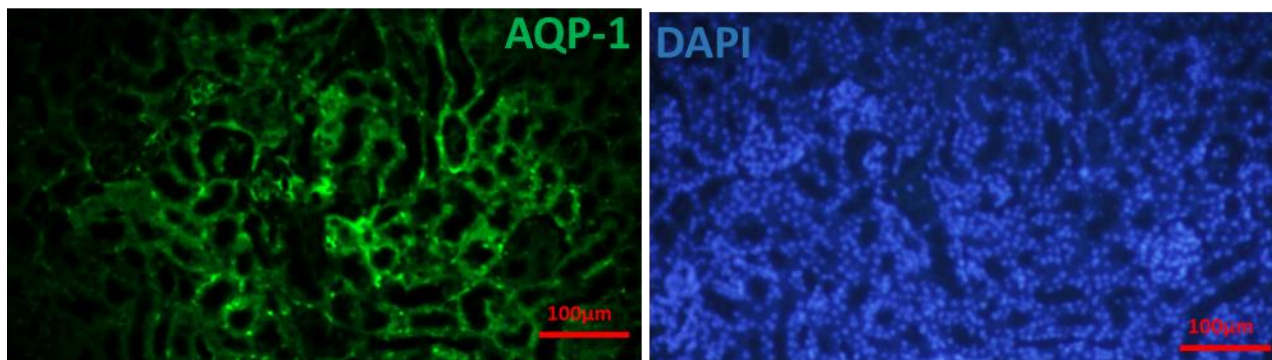
نکته: از این مرحله به بعد، نمونه ها باید از نور محافظت شوند.

۱۵. بافت ها را ۳ بار به مدت ۱۵ دقیقه در بافر شست و شو قرار می دهیم.

۱۶. ۳۰۰ میکرولیتر از محلول DAPI رقیق شده را به هر چاهک اضافه کرده و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه می کنیم. DAPI به DNA متصل می شود و هسته سلول ها را رنگ آمیزی می کند.

۱۷. لام ها را یک بار محلول PBS1X شستشو می دهیم و با استفاده از محلول گلیسرول-PBS لام ها را مونت می کنیم.

۱۸. مرحله آخر بررسی و تصویربرداری از نمونه ها با میکروسکوپ فلورسنت می باشد.



شکل ۶: آنالیز ایمنو هیستوشیمی به روش فلورسنت از بافت کلیه رت با مارکر AQP-1. در تصویر سمت راست، هسته سلولها با DAPI رنگ آمیزی شده است.

مراحل تکنیک ایمنو هیستوشیمی به روش دابل فلورسنت

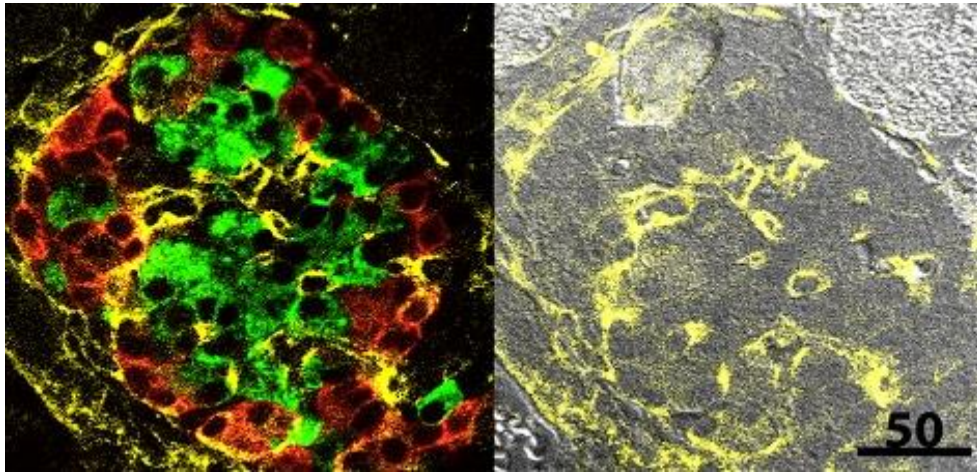
روش دابل فلورسنت برای زمانی مورد استفاده قرار می گیرد که هدف ما از تکنیک ایمنو هیستوشیمی، بررسی دو مارکر یا آنتی ژن در نمونه هدف بصورت همزمان می باشد.

در این روش، کلیه مراحل آماده سازی نمونه کاملاً مشابه ایمنو هیستوشیمی به روش فلورسنت می باشد و تنها تفاوت آن، استفاده از دو آنتی بادی اولیه و دو آنتی بادی ثانویه به طور همزمان می باشد و در نتایج نهایی مارکرها با رنگ های آبی و قرمز در تصاویر فلورسنت نمایان می شود.

نمونه های بافتی را در مخلوط دو آنتی بادی اولیه در رقت مناسب در بافر رقت آنتی بادی به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه کنید. برش های بافتی را در PBS-Tween 20 به مدت ۳ بار و هر بار ۲ دقیقه شستشو دهید. سپس با مخلوط دو آنتی بادی ثانویه کونژوگه به عنوان مثال آنتی بادی ثانویه کونژوگه با (FITC conjugated Horse Anti-Mouse) و Texas Red conjugated Goat anti-rabbit در PBS به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. نمونه ها را در PBS-Tween 20 به مدت ۳ بار و هر بار ۲ دقیقه شستشو دهید. در صورت نیاز به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق، هسته ها را با DAPI رنگ آمیزی کنید.

برش ها را در PBS-Tween 20 به مدت ۳ بار و هر بار ۲ دقیقه شستشو دهید و سپس مونت کنید.

اکنون نمونه ها برای مطالعه زیر میکروسکوپ فلورسنت آماده می باشند.



شکل ۷: تصویر IHC به روش دابل فلورسنت در بافت پانکراس موش : رنگ زرد: آنتی بادی اولیه کلاژن IV، سبز آنتی بادی اولیه انسولین، قرمز آنتی بادی اولیه گلوکاگون است. آنتی بادی های ثانویه کونژوگه با Cy2, Cy5 and Texas Red استفاده شده است.

نکته: قبل از ایمونوهیستوشیمی دابل فلورسنت، مهم است که هر آنتی بادی اولیه را به صورت جداگانه آزمایش شود و بهترین پیش تیمار را برای هر آنتی بادی انتخاب گردد. اگر دو آنتی بادی اولیه نیاز به پیش تیمار مشابه داشته باشند، ایده آل خواهند بود. در غیر این صورت، باید برای مقاطع پیش تیمار جداگانه و سپس ایمونوهیستوشیمی برای هر آنتی بادی به صورت جداگانه انجام داد. اگر هر دو آنتی بادی به پیش تیمارهای مضاعف پاسخ دادند، شرایط برای استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی دابل فلورسنت فراهم می باشد.

پیش تیمار مقاطع بافتی

اپی توپ آنتی ژن های موجود در بافت ها می توانند به صورت متقاطع به یکدیگر متصل و یا کاملاً پوشیده شوند که اتصال آنتی ژن به آنتی بادی را دشوار می کند. با پیش تیمار از طریق معرف یا روش های بازیابی آنتی ژن می توان به طور قابل توجهی اپی توپ های متقاطع را باز کرد تا آنتی بادی ها به راحتی به آنتی ژن های هدف متصل شوند. چندین روش برای بازیابی آنتی ژن ها از جمله بازیابی گرمایی و بازیابی آنزیم و غیره پیشنهاد شده است.

بازیابی آنتی ژن ها با گرما

در این روش، مقاطع را در ظرف حاوی بافر سیترات (pH 6.0) قرار داده و ظرف را در دستگاه بخار قرار می دهیم. دما را روی ۱۰۰ درجه سانتیگراد تنظیم و اجازه می دهیم تا ۲۰ دقیقه بجوشد. برای این منظور می توان از دستگاه های دیگری مانند مایکروفر نیز استفاده کرد.

بازیابی آنزیمی

پروتئیناز K، تریپسین، کیموتریپسین، پپسین و پروتئازهای مختلف دیگر را می توان برای بازیابی آنتی ژن از بافت فیکس شده با فرمالین استفاده کرد. غلظت و زمان تیمار بسته به زمان فیکساسیون و غلظت متفاوت می باشد.

ترکیب بازیابی گرمایی و بازیابی آنزیمی

این روش می تواند به عنوان انتخاب دوم زمانی که بازیابی گرمایی یا بازیابی آنزیمی به خوبی کار نمی کند استفاده شود. شرایطی مانند زمان تیمار و غلظت آنزیم باید ستاپ شود.

تیمار با سدیم تترا هیدروبورات (Sodium borohydride)

از تیمار بوروهیدرید سدیم (۱٪ در بافر فسفات) می توان برای بازیابی آنتی ژن از بافت فیکس شده در فرمالین استفاده کرد. از این روش برای بازیابی آنتی ژن ها در بافت های فیکس شده گلو تارالدئید نیز مناسب است. زمان تیمار باید قبل از انجام فرآیند ستاپ شود.

توجه: تریتون X-100 برای بازیابی آنتی ژن زمانی که آنتی ژن ها در سطح سلول های موضعی هستند مناسب نیست، زیرا تریتون X-100 ساختار غشایی را تخریب می کند.

جمع بندی

تا به امروز در تحقیقات زیست پزشکی، IHC به عنوان یک متد آزمایشگاهی به موازات تکنیک های تجربی دیگر کاربرد دارد. همانطور که در این مقاله توضیح داده شد، رعایت دستورالعمل ها و نکات مهم در پروتکل IHC برای اطمینان از داده های قابل اعتماد و قابل تکرار بسیار مهم است. در جستجو و شناسایی مولکول های زیستی که نقش مهمی در سیگنال دهی درد مانند درد دندان دارند، داده های IHC نتایج آناتومیکی و فیزیولوژیکی را ارائه کرده اند که محققان را برای حرکت به جلو و پیشرفت در این حوزه تحقیقاتی هدایت می کند. بنابراین تکنیک ایمونوهیستوشیمی یک روش مقرون بصره و با حساسیت بالا جهت تشخیص، درمان و تحقیق انواع بیماری ها در حوزه های مختلف پزشکی از جمله پاتولوژی می باشد.

سوالات متداول

۱. چه تفاوتی بین ایمونوهیستوشیمی و ایمونوسیتوشیمی است؟

ایمونوهیستوشیمی به بررسی و شناسایی آنتی ژن ها در نمونه های بافتی می پردازد اما ایمونوسیتوشیمی مطالعه و بررسی آنتی ژن ها در نمونه های سلولی است.

۲. اصل تکنیک ایمونوهیستوشیمی چیست؟

تشخیص و ردیابی آنتی ژن هدف در نمونه بافتی با استفاده از آنتی بادی ها می باشد.

۳. کاربردهای تکنیک IHC چیست؟

ارزیابی بیومارکرها در انکولوژی، تشخیص بیماری های عفونی، نقشه یابی پروتئوم انسانی

۴. ihc در پاتولوژی چیست؟

تکنیک ایمونوهیستوشیمی (Immunohistochemistry) که به اختصار IHC شناخته شده است، یک متد آزمایشگاهی بافت شناسی و ترکیبی از تکنیک های بیوشیمی، ایمونولوژی و آناتومی جهت تصویربرداری از اجزای مجزا در انواع بافت های بدن موجودات زنده و غیرزنده می باشد.