دانشکده پزشکی

گروه ایمونولوژی

| عنوان درس | روش‌های آزمایشگاهی ایمونولوژی و ایمونوشیمی |
|---|---|
| کد و نوع درس | کد درس:۱۰ |
| نوع و تعداد واحد | ۲ واحد نظری - ۲ واحد عملی |
| دروس پیش‌نیاز- همزمان | ندارد |
| مخاطبین | دانشجویان ارشد ایمونولوژی |
| زمان ارائه درس | |
| مکان برگزاری کلاسها: | کلاس گروه – آزمایشگاه تحقیقاتی |
| مسئول درس: | دکتر ملاحسینی |
| اطلاعات تماس مسول درس | |
| تلفن مستقیم گروه ایمونولوژی | 22439980 داخلی ۲۵۷۳ |
| تاریخ برگزاری امتحان پایان ترم: | دو هفته بعد از جلسه آخر |
| منابع درس: | |
| توضیحات: | شیوه امتحان: کوئیز- امتحان تشریحی |

## لیست سرفصل ها، برنامه تقویمی و مدرسین:

| جلسه | روز | تاریخ | ساعت | موضوع تدریس | استاد |
|---|---|---|---|---|---|
| ۱. | یکشنبه | ۰۲/۱۲/۱۳ | ۸-۱۵ | **تهیه آنتی ژن پروتئینی**<br>**نظری: روشهای مختلف تهیه پروتئین یا آنتی ژن**<br>**عملی: جداسازی IgG سرم**<br>**پروژه: نحوه تولید BSA یا یک فراورده پروتئینی مبتنی بر روش رسوبی** | **دکترشعبانی** |
| ۲. | # | ۰۲/۱۲/۲۰ | # | اندازه گیری پروتئین تام<br>نظری: روش های سنجش توتال پروتئین: حساسیت.محدودیت . تداخلات<br>عملی: برادفورد – لوری –**BCA**<br>پروژه: ساخت و کالیبراسیون کیت سنجش پروتئین | دکتر ملاحسینی |
| ۳. | # | ۰۳/۱/۱۹ | # | **الکتروفوز پروتئین و بلاتینگ**<br>نظری: اساس الکتروفورز یک بعدی و دو بعدی. نرم افزارهای مرتبط<br>عملی: **SDS-PAGE**<br>پروژه: ساخت رنگ آماده- مارکر- ژل های پری کست -تهیه سوبسترای آماده ایمونوبلاتینگ | دکتر ملاحسینی |
| ۴. | | ۰۳/۱/۲۶ | | **تغلیظ پروتئین و تعویض بافر**<br>**نظری:بافرهای ایمونوشیمی- سیستم های تغلیظ و تعویض بافر**<br>**عملی: دیالیز- اولترافیلتراسیون-کروماتوگرافی G10**<br>**پروژه: ساخت بافر پایدار- سیستم تغلیظ پروتئین** | **دکترشعبانی** |
| ۵. | | ۰۳/۲/۲ | | خالص سازی نهایی پروتئین **(polishing)** | **دکترشعبانی** |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | نظری: انواع کروماتوگرافی: تعویض یونی- افینیتی- ژا فیلتراسیون<br>عملی: کروماتوگرافی<br>پروژه: ساخت ماتریال کروماتوگرافی | |
| ۶. | | | ۰۳/۲/۹ | **تولید آنتی بادی مونوکلونال و پلی کلونال**<br>نظری: اصول تولید آنتی بادی مونوکلونال و پلی کلونال<br>عملی: ایمن سازی موش یا خرگوش با ایمونوگلوبولین خالص و نمونه گیری چشمی - پروژه: تولید AHG | دکتر مصفا |
| ۷. | | | ۰۳/۲/۱۶ | **بیوکانژوگاسیون**<br>نظری: بیوکانژوگاسیون و کاربردهای آن<br>عملی: خالص سازی AHG و کانژوگاسیون آن<br>پروژه: تهیه بیوتین فعال برای کانژوگاسیون و بررسی پایداری آن | دکترشعبانی |
| ۸. | | | ۰۳/۲/۲۳ | **روش های ایمونواسی**<br>نظری: تئوری روشهای اینواسی آنزیمی<br>عملی: الایزا با کمک آنتی بادی یا OVA تولید شده در مراحل قبل<br>پروژه: تهیه سوبسترا یا پایدار کننده کوتینگ | دکتر ملاحسینی |
| ۹. | | | ۰۳/۲/۳۰ | **ایمونوفلورسانس و ایمونوهیستوشیمی**<br>نظری: اساس و کاربرد روشهای فوق<br>عملی: انجام ایمونوفلورسانس یا ایمونوهیستوشیمی<br>پروژه: تهیه لام **ANA** – تهیه سوبسترای ایمنوهیستوشیمی | دکترشعبانی |
| ۱۰. | | | ۰۳/۳/۶ | **پایدار سازی فرآوردهای پروتئینی**<br>نظری: پایدارکننده های آنتی بادی و پروتئین برای نگهداری در یخچال<br>عملی: ارزیابی پایداری AHG به روش اکسلریت<br>پروژه : تهیه پایدارکننده آنتی بادی رقیق شده و کنترل کیفی آن | دکتر یگانه |
| ۱۱. | | | ۰۳/۰۳/۱۳ | **روش های کشت سلولی**<br>نظری:اصول کشت سلولی | دکتر هاشمی |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | **عملی: کشت و پاساژ**<br>**پروژه: تولید FBS** | |
| ۱۲ | | ۰۳/۳/۲۰ | | **<u>وش های کشت سلولی</u>**<br>**نظری:اصول کشت سلولی**<br>**عملی: کشت و پاساژ**<br>**پروژه: تولید محیط کشت** | دکتر هاشمی |
| ۱۳ | | ۰۳/۳/۲۷ | | **<u>جداسازی سلولهای طحال و غده لنفی موش آزمایشگاهی و تحریک سلولی</u>**<br>**نظری : روشهای جداسازی FACS و MACS**<br>**عملی: جداسازی –شمارش سلولی و تحریک با PHA**<br>**پروژه: تولید میتوژن** | دکتر مصفا |
| ۱۴ | | ۰۳/۴/۳ | | **<u>ایمونوفنوتایپینگ با فلوسایتومتری</u>**<br>**نظری:اساس –کاربرد و کنترل کیفی فلوسایتومتری**<br>**عملی: شمارش سلولهای +CD4 مولد IFN-γ**<br>**پروژه: بافر ها – محلولها و آنتی بادیهای فلوسایتومتری** | دکتر جلالی |
| ۱۵ | | ۰۳/۴/۱۰ | | **<u>ارزیابی مرگ سلولی</u>**<br>**نظری:روش های بررسی پدیده زودرس و دیررس آپوپتوز**<br>**عملی:آنکسین یا دیگر روشهای بررسی آپوپتوز**<br>**پروژه: ساخت کیت بررسی مرگ سلولی** | دکتر ملاحسینی |
| ۱۶ | | ۰۳/۴/۱۷ | | **<u>ارزیابی تکثیر سلولی</u>**<br>**نظری: اساس انواع روشهای تکثیر سلولی**<br>**عملی: BrdU یا روشهای معادل**<br>**پروژه:تهیه کیت تکثیر سلولی** | دکتر مصفا |
| ۱۷ | | ۰۳/۴/۲۴ | | <u>PCR</u><br>**نظری: اصول استخراج DNA و RNA**<br>**عملی: استخراج DNA انجام PCR** | دکتر امانی |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | **پروژه: کیت تشخیص موتاسیون** | | |
| ۱۸. | | ۰۳/۴/۳۱ | | Real-time PCR<br>**نظری: اصول روش** real time PCR<br>**عملی: استخراج** RNA – **سنتز** CDNA **و** Real time<br>**پروژه: ساخت کیت** Real time | دکتر یگانه |

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی

دبیرخانه شورای عالی برنامه‌ریزی علوم پزشکی

کد درس: ۱۰

**نام درس:** روش‌های آزمایشگاهی ایمونولوژی و ایمونوشیمی

**پیش‌نیاز یا همزمان:** مبانی ایمونولوژی پزشکی

**تعداد واحد:** چهار واحد(۲ واحد نظری – ۲ واحد عملی)

**نوع واحد:** نظری - عملی

**هدف کلی درس:** در پایان درس دانشجو باید با روش‌های ایمونولوژی و کاربرد آنها آشنا باشد و مهارت لازم برای انتخاب آزمایش مناسب، انجام آن و تفسیر نتایج را داشته باشد. توجه جدی به رعایت ملاحظات اخلاقی در انجام آزمایشات و کار با حیوانات، اصول به‌روشی و ایمنی فردی و زیست‌محیطی نیز مورد نظر است.

**شرح درس و رئوس مطالب:** (۳۴ ساعت نظری - ۶۸ ساعت عملی)

. هفده عنوان از مجموع عناوین زیر به شکل انتخابی تدریس شود.

اصول اولیه آزمایشگاه

درس نظری: محاسبات در بیوتکنولوژی و بیولوژی ملکولی

کار در آزمایشگاه: اصول اولیه آزمایشگاه و محلول‌سازی‌ها و محاسبات مربوطه

پروژه تولیدی مرتبط: نرم‌افزارهای آنلاین و اپلیکیشن‌های محاسبات پرکاربرد بیوتکنولوژی و بیولوژی ملکولی

تهیه پروتئین (آنتی‌ژن)

درس نظری: بررسی اساس، روش کار و کاربردهای روش‌های مختلف تهیه پروتئین یا آنتی‌ژن

کار در آزمایشگاه: ملکول IgG از سرم انسانی با یک یا چند روش رسوبی از قبیل سولفات آمونیوم، الکل و اسید کاپریلیک جدا شود

پروژه تولیدی مرتبط: بررسی نحوه تولید BSA یا یک فرآورده پروتئینی مبتنی بر روش رسوبی

اندازه‌گیری پروتئین تام

درس نظری: روش‌های اندازه‌گیری پروتئین تام، حساسیت‌ها، محدودیت‌ها و تداخل‌گرها

کار در آزمایشگاه: به روش اسپکتروفتومتری، برادفورد، لوری و یا BCA، پروتئین تام فراکشن جدا شده از سرم انسانی اندازه‌گیری شود

پروژه تولیدی مرتبط: ساخت و کالیبراسیون کیت اندازه‌گیری پروتئین تام به روش برادفورد یا سایر روش‌ها

تفکیک پروتئین‌ها از طریق الکتروفورز

درس نظری: اساس الکتروفورز یک بعدی و دو بعدی، انواع و کاربردها آشنایی با نرم‌افزارهای مرتبط

کار در آزمایشگاه: شناسایی اجزا پروتئینی فراکشن‌های جدا شده به روش SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی ژل، محاسبه وزن ملکولی و میزان خلوص فرآورده نهایی تهیه شده با هر یک از روش‌های رسوبی

پروژه تولیدی مرتبط: ساخت رنگ‌های آماده، مارکرهای از قبل رنگ شده و یا ژل‌های پری‌کست

تغلیظ پروتئین و تعویض بافر

درس نظری: انواع بافرهای مورد استفاده در ایمونوشیمی و سیستم‌های تغلیظ و تعویض بافر

کار در آزمایشگاه: تغلیظ با دیالیز در کنار گلیسرول یا با استفاده از PEG یا روش اولترافیلتراسیون روی فرکشن انتخابی انجام شود. تغییر بافر پروتئینی با کمک روش دیالیز، اولترافیلتراسیون یا ستون کروماتوگرافی G10 یا G25

پروژه تولیدی مرتبط: ساخت و پایدارسازی و کنترل کیفی بافرها و یا سیستم‌های تغلیظ پروتئین‌ها

خالص‌سازی نهایی پروتئین (Polishing)

درس نظری: کاربرد و اساس انواع روش‌های کروماتوگرافی تعویض یونی، ژل فیلتراسیون و افینتی

کار در آزمایشگاه: با یکی از روش‌های کروماتوگرافی تعویض یونی، ژل فیلتراسیون و یا افینیتی کروماتوگرافی. فراکشن دیالیز شده خالص می‌شود، پس از اندازه‌گیری مقدار کل پروتئین و SDS-PAGE، راندمان کار از ابتدا تا انتها و خلوص نهایی محاسبه می‌شود.

پروژه تولیدی مرتبط: ساخت نانوپارتیکل و یا بیدهای تعویض یونی افینیتی کروماتوگرفی پروتئین A و یا متال افینیتی.

تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال یا مونوکلونال

درس نظری: اصول تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال و مونوکلونال

کار در آزمایشگاه: آماده‌سازی فرکشن حاوی IgG از خون انسان یا حیوان، یا جداسازی از ژل اکریل‌آمید و خرد کردن و ایمن‌سازی موش یا خرگوش با ایمونوگلوبولین خالص شده، نمونه‌گیری چشمی در زمان مناسب.

پروژه تولیدی مرتبط: تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد IgG انسانی در انسان و نحوه کنترل کیفی و بررسی پایداری

ایمونوپرسیپیتاسیون (ارزیابی آنتی‌بادی تولیدی)

درس نظری: انواع ایمونوپرسیپیتاسیون، کاربردها و کنترل کیفی آن

کار در آزمایشگاه: ارزیابی آنتی‌بادی پلی‌کلونال موش یا خرگوش تزریق شده با IgG به روش دابل ایمونودیفوزیون و ایمونودیفوزیون تک قطبی شعاعی و یا کدورت‌سنجی و نفلومتری

پروژه تولیدی مرتبط: ساخت و استانداردسازی پلیت ایمونودیفوزیون تک قطبی شعاعی، نحوه کنترل کیفی و پایداری.

بیوکانژوگاسیون (نشاندار کردن آنتی‌بادی)

درس نظری: انواع بیوکانژوگاسیون و کاربردهای آنها

کار در آزمایشگاه: سرم موش یا خرگوش حاوی Anti-Human IgG بنا به امکانات با یکی از روش‌های مراحل قبل خالص‌سازی شود و با FITC یا HRP کونژوگه شود و دیالیز گردد.

پروژه تولیدی مرتبط: تهیه بیوتین فعال برای کانژوگاسیون آنتی‌بادی، نحوه کنترل کیفی و بررسی پایداری

ایمونوبلاتینگ و دات‌بلاتینگ

درس نظری: اساس روش ایمونوبلاتینگ و انواع سوبستراهای مورد استفاده در آشکارسازی

کار در آزمایشگاه: با استفاده Anti-Human IgG و IgG و OVA آماده شده، ایمونوبلاتینگ یا دات‌بلاتینگ انجام می‌شود

پروژه تولیدی مرتبط: ساخت سوبستراهای آماده ایمونوبلاتینگ یا دات‌بلاتینگ، نحوه کنترل کیفی و بررسی پایداری

ایمونواسی آنزیمی، رادیوایمونواسی و کمی‌لومینسانس

درس نظری: روش‌های ایمونواسی آنزیمی (ELISPOT-ELISA) ، رادیوایمونواسی و کمی‌لومینسانس اساس و کاربرد و کنترل کیفی آنها

کار در آزمایشگاه: با استفاده Anti-Human IgG و IgG و OVA آماده شده، روش الایزای مستقیم انجام می‌شود

پروژه تولیدی مرتبط: سوبسترا پایدار الایزا یا پایدارکننده‌های آنتی‌ژن‌های کاوت شده روی پلیت الایزا

ایمونوفلورسانس و ایمونوهیستوشیمی

درس نظری: اساس و کاربردهای ایمونوفلورسانس و ایمونوهیستوشیمی و کنترل کیفی آن

کار در آزمایشگاه: با استفاده FITC Anti-Human IgG و سرم anti-DNA بنا به امکانات ایمونوفلورسانس یا ایمونوهیستوشیمی انجام می‌شود.

پروژه تولیدی مرتبط: تهیه لام برای تست ANA، سوبسترای ایمونوهیستوشیمی، نحوه کنترل کیفی و بررسی پایداری

روش‌های نگهداری و پایدارسازی فرآورده‌های پروتئینی

درس نظری: پایدارکننده‌های آنتی‌بادی و پروتئین‌ها برای نگهداری در یخچال و فریزر

کار در آزمایشگاه: ارزیابی پایداری Anti-Human IgG به روش اکسلریت

پروژه تولیدی مرتبط: تهیه پایدارکننده‌های آنتی‌بادی رقیق شده، نحوه کنترل کیفی و بررسی پایداری.

جداسازی سلول‌ها از طحال و غدد لنفاوی موش یا خون محیطی و تحریک سلولی

درس نظری: جداسازی سلول‌ها با روش‌های مختلف از قبیل FACS و MACS

کار در آزمایشگاه: جداسازی لنفوسیت‌ها از طحال و غدد لنفاوی موش و یا خون محیطی، شمارش سلولی و رنگ‌آمیزی تریپان بلو و کشت و تحریک آن با PHA .

پروژه تولیدی مرتبط: تولید میتوژن‌های لنفوسیتی، نحوه کنترل کیفی و بررسی پایداری

ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های جدا شده با فلوسایتومتری

درس نظری: اساس و کاربرد فلوسایتومتری و کنترل کیفی آن

کار در آزمایشگاه: اندازه‌گیری تعداد سلول‌های CD3+ CD4+T. سلول‌های جدا شده در مرحله قبل یا اندازه‌گیری تعداد سلول‌های تولید کننده اینترفرون گاما یا هر سایتوکاین دیگری

پروژه تولیدی مرتبط: تهیه بافرها و محلول‌ها و آنتی‌بادی‌های مورد استفاده در فلوسایتومتری، نحوه کنترل کیفی و بررسی پایداری

ارزیابی مرگ آپوپتوتیک و نکروتیک سلولی

درس نظری: روش‌های بررسی پدیده زودرس و دیررس آپوپتوز

کار در آزمایشگاه: سلول‌های لنفوسیتی به روش فایکول از خون محیطی جدا شده و تحت تأثیر محرک آپوپتوتیک قرار گرفته و با PI- Annexin v و فلوسایتومتری ارزیابی شوند یا بررسی قطعه قطعه شدن DNA روی آگارز به روش DMSO-SDS-TE انجام گیرد.

پروژه تولیدی مرتبط: ساخت کیت‌های بررسی مرگ سلولی DNA Ladder یا سایر موارد، نحوه کنترل کیفی

ارزیابی تکثیر سلولی

درس نظری: اساس و کاربرد انواع روش‌های تکثیر سلولی

کار در آزمایشگاه: ارزیابی تکثیر لنفوسیت‌های تحریک شده با PHA با روش MTT یا Resazurin یا BrdU یا روش‌های معادل

پروژه تولیدی مرتبط: تهیه کیت‌های تکثیر سلولی، نحوه کنترل کیفی و بررسی پایداری

تکثیر و نگهداری سلول‌های یوکاریوتی

درس نظری: اصول روش‌های کشت سلولی

کار در آزمایشگاه: رترایو کردن سلول یوکاریوت، کشت و پاساژ سلول یوکاریوت

پروژه تولیدی مرتبط: تولید FBS یا محرک سلولی یا محیط کشت همراه با کنترل کیفی و ارزیابی پایداری

شناسایی ملکولی بر پایه PCR

درس نظری: اصول روش‌های استخراج DNA و PCR و کنترل کیفی

کار در آزمایشگاه: استخراج DNA و بررسی کیفیت آن، متعاقباً انجام PCR

پروژه تولیدی مرتبط: تولید کیت‌های ملکولی شناسایی موتاسیون و بررسی کنترل کیفی و پایداری آن

ارزیابی بیان ژن به روش RT-PCR کمی و نیمه کمی

درس نظری: اصول روش Real-time RT-PCR و کنترل کیفی

کار در آزمایشگاه: استخراج RNA و بررسی کیفیت آن، سنتز cDNA و انجام Real-time RT-PCR یا RT-PCR بنا به امکانات

پروژه تولیدی مرتبط: ساخت کیت Real-time RT-PCR، بررسی کنترل کیفی و پایداری آن

**منابع درس:**

1) Current protocols in immunology, Latest Edition.
2) Hay FC, Westwood OMR. Practical immunology. Latest Edition.
3) John M. Walker, The Protein Protocols Handbook, Latest Edition.

**شیوه ارزشیابی فراگیران:**

کوییز، گزارش کار، امتحان تشریحی، پروژه تحقیقی