

## فهرست

۱	کار با موش آزمایشگاهی.....
۱	چند پارامتر بیولوژیک در مورد موش آزمایشگاهی.....
۱	گرفتن و مهار موش.....
۲	مهار در دستگاه restrainer.....
۲	بیهوش کردن.....
۲	انواع رایج تزریق.....
۳	حجم قابل تزریق بسته به روش.....
۴	خوراندن.....
۴	خونگیری و جداسازی اندامها.....
۵	برداشتن اندامها (طحال/گره لنفی).....
۶	تولید آنتی‌بادی (پلی‌کلونال).....
۸	جداسازی سلول‌های منونوکلتر خون و شمارش.....
۱۰	شمارش سلول.....
۱۱	رسوبگذاری در ژل (انتشار شعاعی یا RID - Radial Immunodiffusion).....
۱۵	پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری (Delayed Type Hypersensitivity - DTH).....
۱۶	تعیین تیتراژ آنتی‌بادی سرم با هم‌آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز (آنتی‌ژن).....
۱۷	جداسازی سلول‌های صفاقی و کشت ماکروفاژ.....
۱۹	تهیه سوسپانسیون سلولی از طحال و گره لنفی (موش).....
۱۹	حذف گلبول‌های قرمز از سوسپانسیون سلولی.....
۲۰	متد کشت و سنجش تکثیر.....
۲۷	الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays-ELISA).....
۲۷	الایزا غیرمستقیم (INDIRECT ELISA).....
۲۸	الایزا ساندویچ (ANTIBODY-SANDWICH ELISA).....
۲۸	الایزا مستقیم رقابتی (DIRECT COMPETITIVE ELISA).....

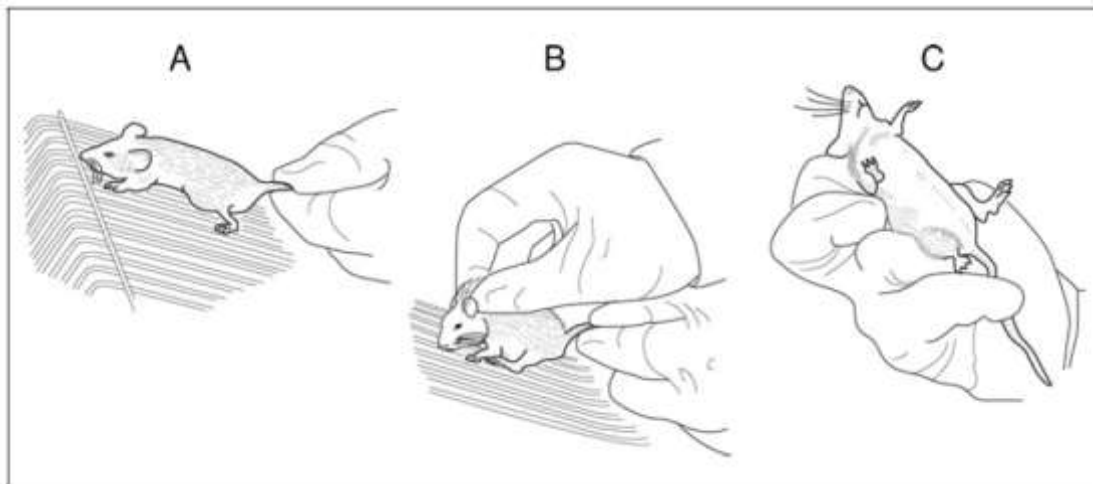
## کار با موش آزمایشگاهی

نکته: لطفا قبل از انجام این بخش از آزمایشات راهنمای اخلاقی کار با حیوان آزمایشگاهی را مطالعه و رعایت بفرمائید.

### چند پارامتر بیولوژیک در مورد موش آزمایشگاهی

Life span:	2–3 years
Adult body weight:	20–40 g
Body temperature:	36.5–38.0°C (97.5–100.4°F)
Food intake:	12–18 g/100 g body weight/day
Water intake:	15 ml/100 g body weight/day

### گرفتن و مهار موش



نکته: روش گرفتن و مهار حیوانات آزمایشگاهی مختلف، یکسان نیست

## مهار در دستگاه restrainer

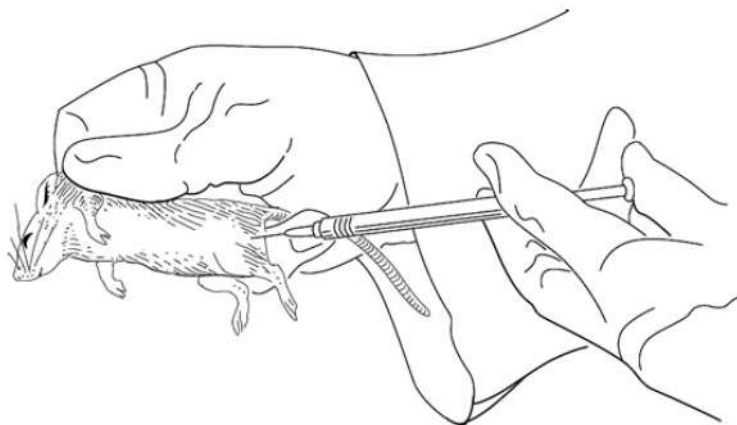


بیهوش کردن

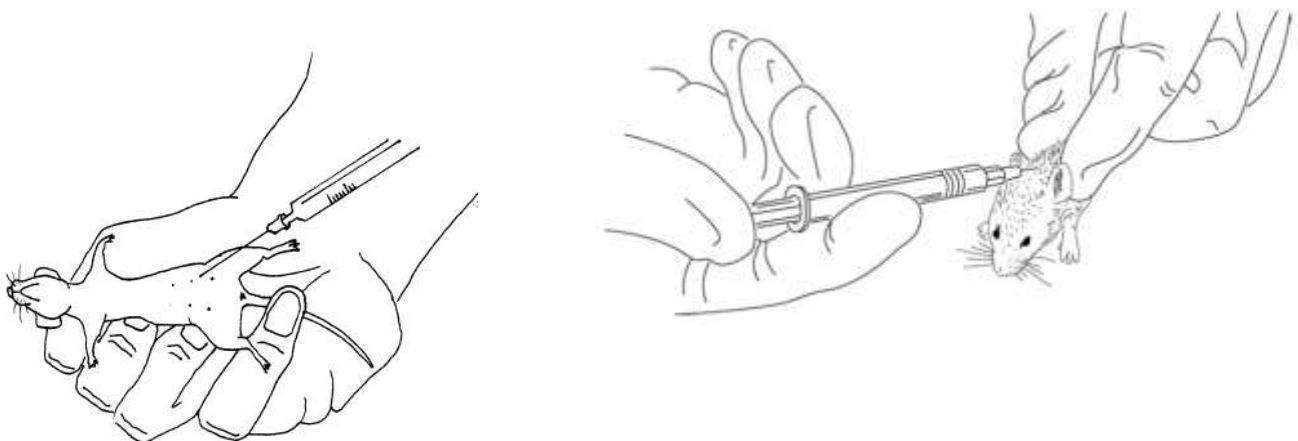


انواع رایج تزریق

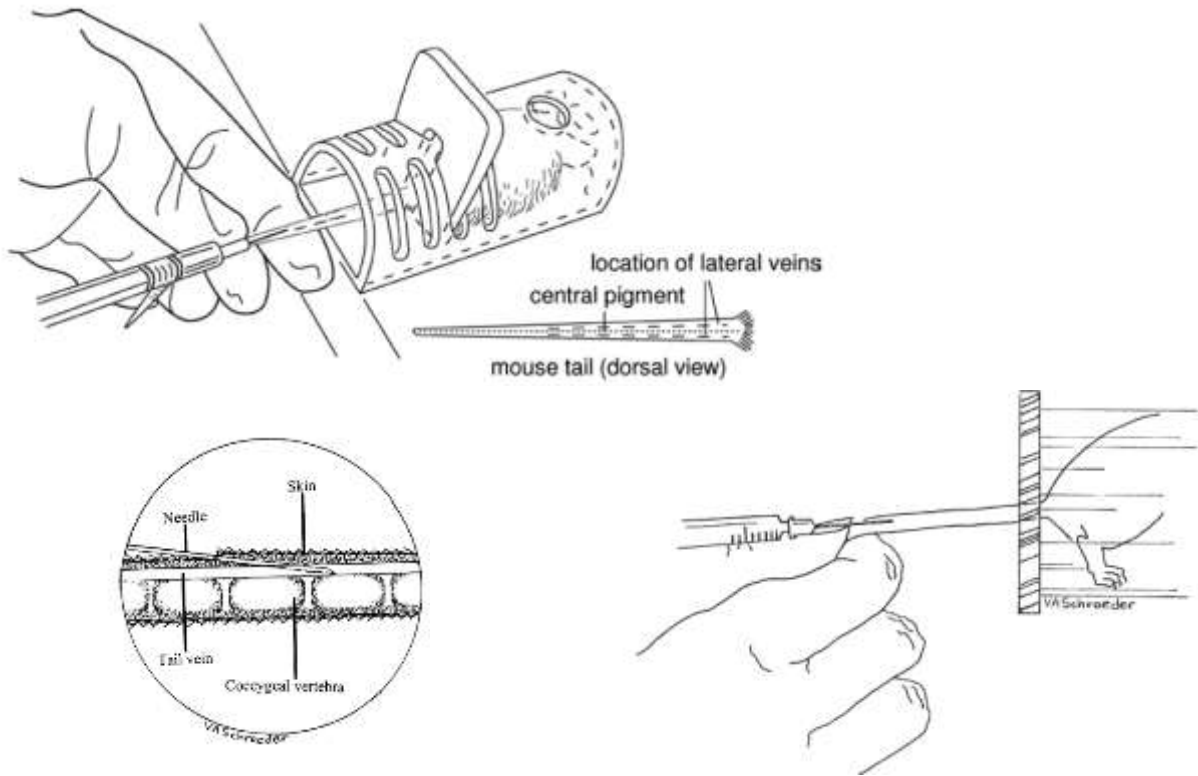
عضلانی (intramuscular/IM)



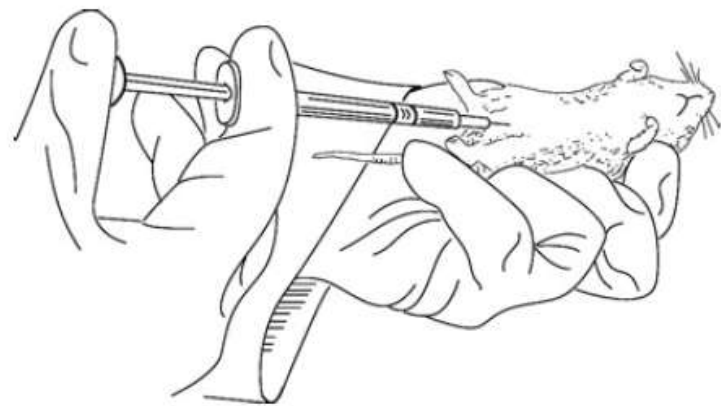
زیرپوستی (subcutaneous/SC)



داخل وریدی (intradermal/ID)



داخل صفاقی (intraperitoneal)



حجم قابل تزریق بسته به روش

**Table 1.6.1** Guidelines for Maximal Injection Volumes (in Milliliters)<sup>a</sup>

Species	Subcutaneous	Intramuscular	Intraperitoneal	Intravenous	Intradermal
Mouse	2-3	0.05	2-3	0.2	0.05
Rat	5-10	0.3	5-10	0.5	0.05
Hamster	3-4	0.1	3-4	0.3	0.05
Rabbit	30-50	0.5-1.0	50-100	1-5	0.1 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Adapted from Tuffery (1987).

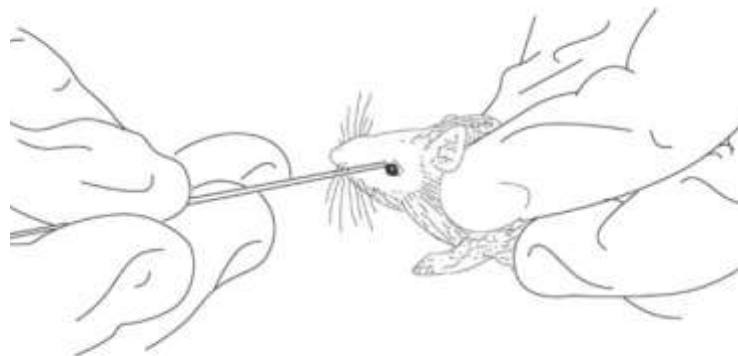
<sup>b</sup>0.05 ml, with adjuvant.

## خوراندن

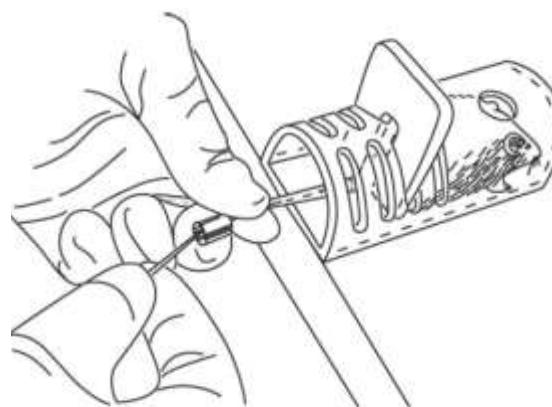


## خونگیری و جداسازی اندامها

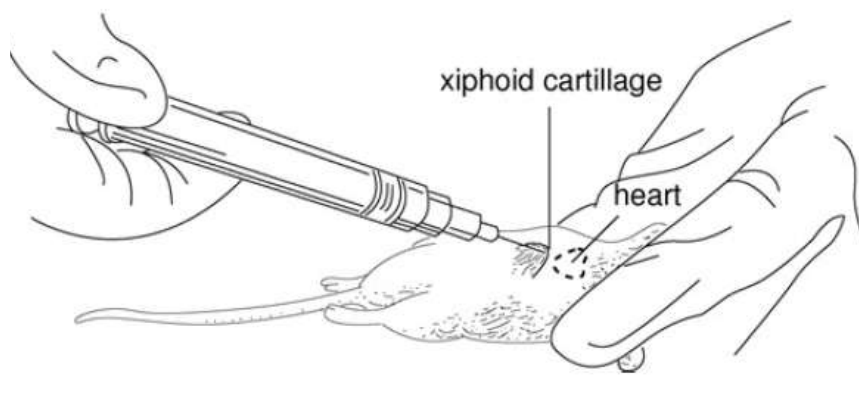
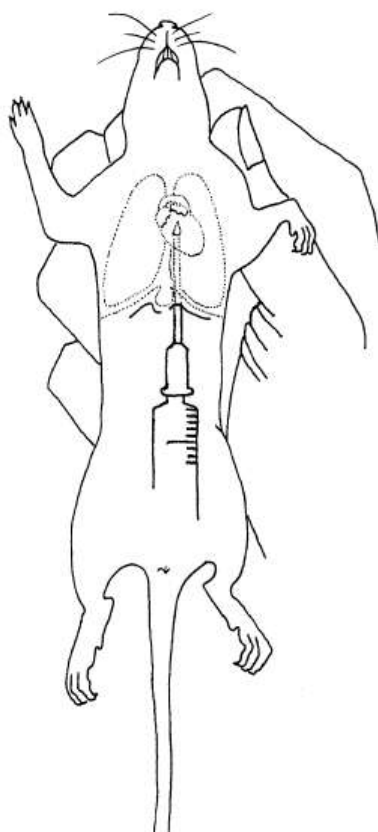
### خونگیری از چشم

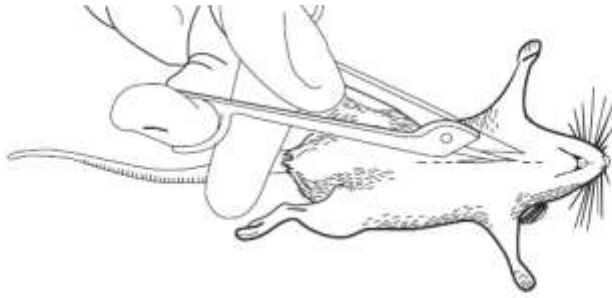


### خونگیری از ورید دمی



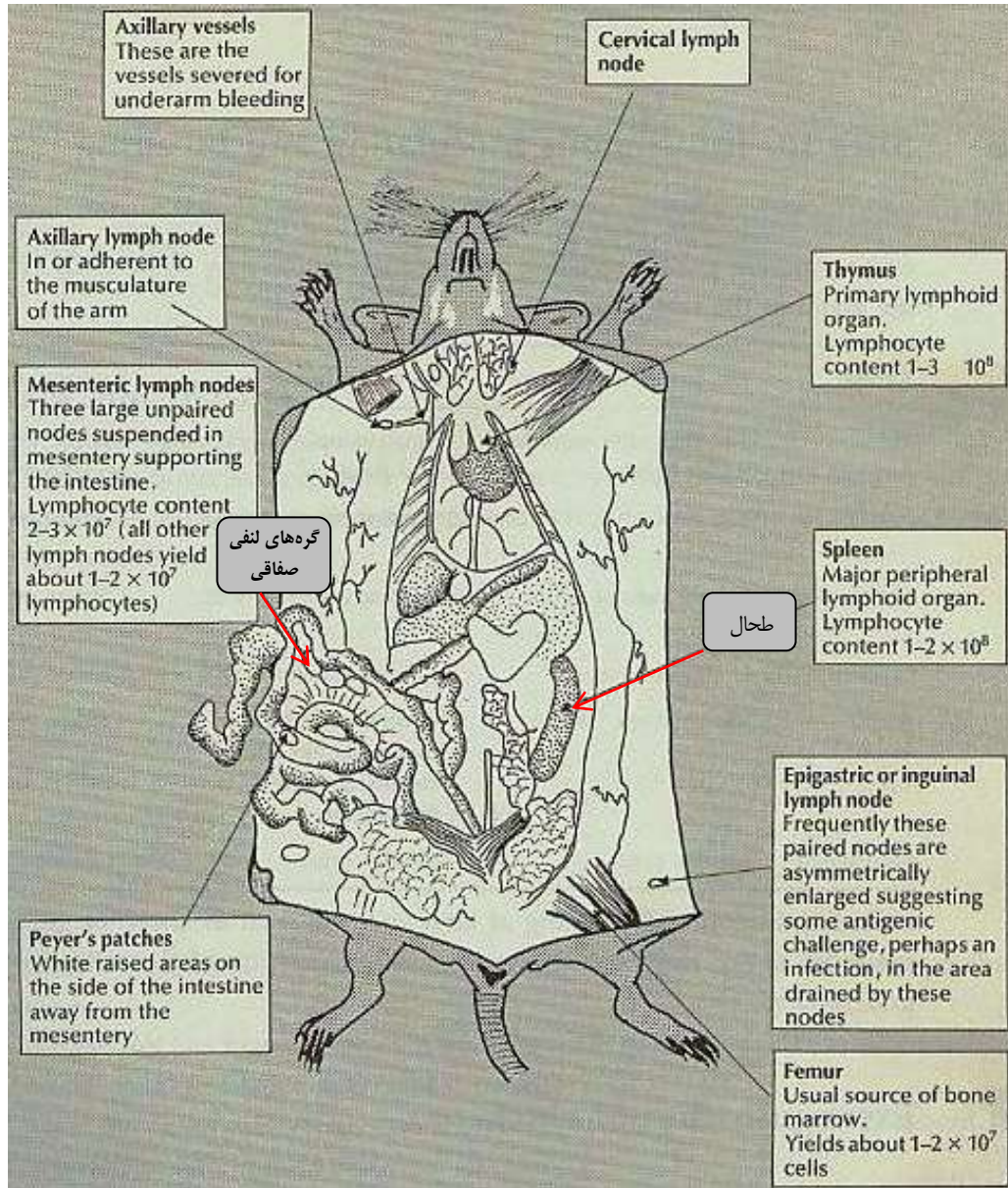
### خونگیری از قلب (بدون باز کردن)





برداشتن اندامها (طحال/گره لنفی)

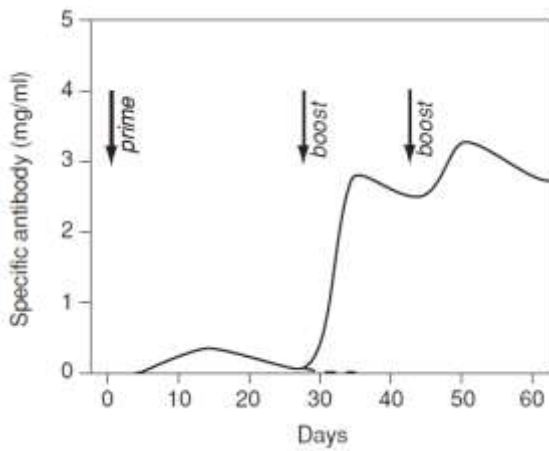
منابع:



1. Kirkwood J and Hubrecht R. The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals. 8th ed. Blackwell Publishing Ltd. 2010.
2. Suckow MA, Danneman P and Brayton C. The laboratory mouse. CRC Press LLC. 2001.
3. Coligan JE. Current Protocols in Immunology, Chapter 1. Online in Wiley Interscience ([www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)). 2010.

## تولید آنتی‌بادی (پلی‌کلونال)






- تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال ساده‌تر، ارزان‌تر و سریع‌تر است و کاربردهای متعددی دارد.



- برای تولید مقدار مناسبی از آنتی‌بادی، تزریق یادآور هم لازم است
- معمولاً افزایش تیتراژ آنتی‌بادی، الگوئی مشابه تصویر دارد
- مقدار آنتی‌ژن تزریقی بر اساس نوع آنتی‌ژن و نوع حیوان (و عوامل موثر دیگر ...) تعیین می‌شود (مقادیر تقریبی در جداول زیر).
- انتخاب حیوان به مقدار سرم مورد نیاز، تفاوت ژنتیکی (با پروتئین آنتی‌ژنی مورد نظر) و آزمایشات قبلی بستگی دارد. معمولاً برای مقادیر زیاد از خرگوش یا حیوانات بزرگتر استفاده می‌شود.
- کیفیت، خلوص و مقدار آنتی‌ژن در تولید آنتی‌سرم خوب اهمیت دارد (برخی آلودگی‌ها پاسخ ایمنی قویتری نسبت به پروتئین اصلی ایجاد می‌کنند)

- در مورد آنتی‌ژن پروتئینی که از cDNA در باکتری بیان می‌شود یا برای استفاده در ایمونوبات، فرم دناتوره و اگر در سیستم یوکاریوتی بیان شود فرم naïve مناسب است.
- برای آنتی‌ژن‌های محلول، اجوانت فروند معمولاً مناسب است (بعنوان جایگزین Titermax پیشنهاد شده است).
- رعایت نکات "اخلاق کار با حیوان آزمایشگاهی" ضروری است.

مقادیر تقریبی برای تزریق آنتی‌ژن‌های پروتئینی در حیوانات آزمایشگاهی مختلف

	Rabbit	Chicken	Mouse	Rat	Guinea Pig
					
For Immunizations (1 animal)	0.2 - 0.6 mg	0.2 - 0.6 mg	20 - 250 µg	20 - 250 µg	0.15 - 0.5 mg
For Affinity Matrix	0.5 - 2 mg	0.5 - 2 mg	0.5 - 2 mg	0.5 - 2 mg	0.5 - 2 mg
Concentration	0.3 - 2 mg/ml	0.3 - 2 mg/ml	0.3 - 2 mg/ml	0.3 - 2 mg/ml	0.3 - 2 mg/ml
Buffer	Any physiological non-toxic buffer like 1 x PBS or 0.9% NaCl. For more information: <a href="#">antigen recommendations</a>				

مقادیر تقریبی برای تزریق آنتی‌ژن‌های به فرم سلول در حیوانات آزمایشگاهی مختلف

	Rabbit	Chicken	Mouse	Rat	Guinea Pig
					
Bacterial Cells (1 animal)	$5 \times 10^6$ cfu	$5 \times 10^6$ cfu	$5 \times 10^6$ cfu	$5 \times 10^6$ cfu	$5 \times 10^6$ cfu
Virus Particles (1 animal)	$10^7$ pfu	$10^7$ pfu	$10^7$ pfu	$10^7$ pfu	$10^7$ pfu
Mammalian Cells (1 animal)	$10^7 - 10^8$ cfu	$10^7 - 10^8$ cfu	$10^7 - 10^8$ cfu	$10^7 - 10^8$ cfu	$10^7 - 10^8$ cfu

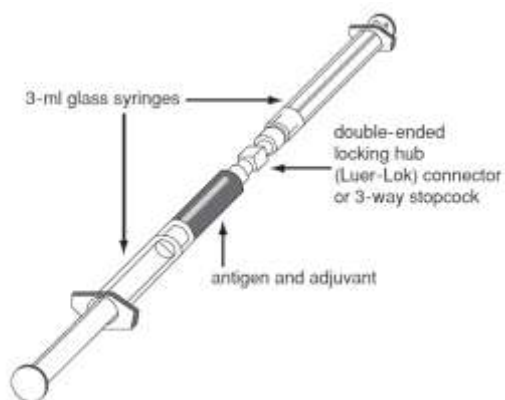
## پروتکل

جزئیات موارد زیر (و تاریخ مناسب) را بر اساس روشی که در آزمایشگاه انجام می‌دهید تکمیل کنید (دانشجویان در صورت تمایل به استفاده از آنتی‌ژن‌های میکربی می‌توانند مراجعه و هماهنگ کنند):

- تهیه گلبول قرمز ۳-۵٪ (در نرمال سالین یا PBS)
- تجویز صفاقی
- یادآور
- خونگیری
- جداسازی سرم
- تست هم‌گلوتیناسیون (تعیین تیترا)

## نکات

- گلبول قرمز گوسفند (SRBC) می‌تواند شمارش شده به تعداد تقریبی  $2 \times 10^8$  در حجم ۰,۲-۰,۵ میلی‌لیتر نرمال سالین یا PBS بصورت صفاقی تزریق شود
- برای تزریق کف پا در موش، SRBC به تعداد تقریبی  $5 \times 10^7$  در حجم ۰,۰۵ تا ۰,۱ میلی‌لیتر (۵۰-۱۰۰  $\mu$ m) نرمال سالین یا PBS کافیت.



- یادآور معمولاً ۴-۸ هفته بعد از تزریق اولیه است که می‌تواند در فاصله ۲-۳ هفته‌ای تکرار شود.
- در اینصورت به ازای هر خرگوش معمولاً از ۰,۲۵-۰,۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آنتی‌ژن پروتئینی استفاده می‌شود.
- در صورتیکه از اجوانت و آنتی‌ژن پروتئینی استفاده کنیم ، تزریق IM ، ID یا SC انجام می‌شود
- برای استفاده از اجوانت فروند نکات ویژه‌ای باید در نظر گرفته شود از جمله تهیه امولسیون مناسبی از آنتی‌ژن و اجوانت (شکل مقابل) و همچنین نکات ایمنی کار بخصوص برای اجوانت کامل فروند (CFA).

- برای توضیحات بیشتر در مورد استفاده از اجوانت فروند و یا مقدار مناسب از آنتی‌ژن‌های مختلف به منابع رجوع شود (تحقیق کلاسی - انتخاب آنتی‌ژن فرضی توسط دانشجو و مطالعه).