الجمهورية الجزائرية الديموقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة جيجل

جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة و الحياة
المكتبة
رقم الجرد : 412

Bc.19/04

03/3

كلية العلوم

قسم البيولوجيا

فرع: البيوكيمياء

مذكرة:

في إطار الحصول على شهادة الدراسات العليا في البيولوجيا

الموضوع:

تنقيـــة الغلوبيلينات المناعية G من مصل و بلازما الإنسان

كلية علوم الطبيعة و الحياة
المكتبة

لجنة التحكيم:

** بن قنوار لمياء ** الرئيس.
** بوحفص ليلى ** الممتحن.
** عيرش صليحة ** المؤطر.

التقديم من طرف:

** أعلامة نصيرة
** مواس عبد العزيز
** مريخي محمد

دفعة "2004"

تشكرات

في البداية نشكر المولى عز وجل الذي هدانا ووفقنا لطريق فيه خير لنا ، وأنارلنا درب العلم و أعاننا على إتمام عملنا .

كما نتقدم بخالص شكرنا للأستاذة المشرفة حيرش صليحة لدعمها لنا ، وصبرها الجميل ونصائحها القيمة التي أفادتنا وزادتنا ثقة في النفس .

نشكر مسؤول الخدمات المخبرية بمستشفى الطاهير(نبيل) ،و كما نشكرعمال مخبر معهد البيولوجيا صونيا ، مسيكة، أسيا ، واساتذتنا : لحول مصباح ، حنديس،السبتي، .....إلخ .و بالأخص نشكر الأستاذة المحترمة: بوحفص ليلى. كما لا ننسى الأشخاص الذين قدموا لنا يد العون بجامعة سطيف ، وعمال المكتبة المركزية.

نشكر جميع من ساعدنا من قريب أو من بعيد وساهم في إنجاز بحثنا هذا

أعلامة نصيرة

مواس عبد العزيز

مريخي محمد

شكرا

الفهرس

الفهرس

-المقدمــــــة.. 01

الجـزء النظـــــري :

الفصل الأول : المفهوم العام للغلوبيلينات المناعيــة

I - 1- تعريـــف.. 02

I - 2- أقسام و تحت أقسام الغلوبيلينات المناعيــــة.................................... 02

I-2-1- الغلوبيلينات المناعية من نـوع M (IgM)................................. 02

I - 2 -2- الغلوبيلينات المناعية من نـوع D (IgD)................................. 03

I -2- 3- الغلوبيلينات المناعية من نـوع G (IgG)................................. 03

I -2-4- الغلوبيلينات المناعية من نـوع A (IgA)................................. 03

I -2-5- الغلوبيلينات المناعية من نـوع (IgE)................................. 04

الفصل الثانـــي المفهوم العام للغلوبيلينات المناعية من نوع G

II-1- تعريـــف.. 06

II -2- البنية العامة للغلوبيلينات المناعية من نوع G 06

II -2-1-الجينات المشفرة للسلسلة الخفيـــــفة.. 08

II-2-2- الجينات المشفرة للسلسلة الثـــــــقيلة.. 09

II-3- الوظائف الفعالة للغلوبيلينات المناعية من نوع G 11

II-3-1- تنشيط المتممـــة.. 11

II-3-2- تنشيط البلاعم الكبيـرة.. 12

II-4- أهمية الغلــوبيليـنات المــــــناعية من نوع G...................................... 13

II-4-1- فيالتشخيـــــص... 13

II-4-2- في الصيدلـــــة.. 13

الفصل الثالث : طرق فصل الغلــوبيليـنات المــــــناعية من نوع G

III- الكروماتوغرافـــيا والغلوبيلينات المناعية

III-1 - تعريــــف.. 16

III-1-1- الكروماتوغرافـــيا الشراهـــة 16

III-1- 2- الكروماتوغرافـــيا التبادل الأيونـي.................................... 17

III-1- 3- الكروماتوغرافـــيا الطـرد الجزيئي...................................... 19

الجزء التطبيقي

I - المــواد و الطرق 21

I -1- الأدوات و المواد و الطرق المستعملة.. 21

I -1-1- الأدوات 21

I -1-2- المواد البيولوجية و المحاليل 21

I -1-3- الطرق و التقنيات .....

I -1-3-1- تقنية الترسيب..... 22

I -1-3-1-1-تحضير المحاليل و العينات..... 22

I -1-3-1-1--1- . تحضير المصل و البلازما 22

- I -1-3-1-1-2- تحضير محلول الغسل..... 22

I -1-3-1-13- تحضيرمضاد التخثر..... 22

I -1-3-1-1-4- تحضير الـ PBS 22

I -1-3-1-2- ترسيب الـ IgG..... 22

I -1-3-1-3- الميـــز..... 23

I -1-3-1-3-1- تعريـــف..... 24

I -1-3-1-3-2- المبدأ..... 24

I -1-3-1-3-3-طريقة العمل..... 24

I -1-3-2- تـ قد ير تركيزبروتينات الـ IgG المنقاة..... 24

I -1-3-3- الهجرة الكهربائية للغلوبيلينات المناعية على

أسيتات السليلوز 26

I -1-3-3-1- المبدأ و الهـدف 28

I -1-3-3-2- التقنيـــة..... 28

أ - التلويـــن..... 28

ب- إزالة التلوين..... 28

ج- نزع المـــاء..... 28

د - التشفيـــف..... 28

ه - التجفيـــف..... 29

و- القـــراءة..... 29

I -1-3-1-4- الهجرة الكهربائية على هلام الأكريلام
في وجود الـSDS- PAGE.....
I -1-3-1-5- تحديد الوزن الجزيئي 29
30
II - النتائـــــج
III-1- نتائج التقدير البروتيني بعد الترسيب 31
III-2- نتائج الهجرة الكهربائية على ورق
أسيتات السليلوز..... 32
III- المناقشـــة..... 34
- الخاتمـــــة..... 36
- المراجـــــع

قائـــمة الجداول :

الجدول 1: بعض خصائص الغلوبيلينات المناعية 05

الجدول 2: الجينات المشفرة للسلسلة الثقيلة و الخيفة 09

الجدول 3: بعض خصائص الغلوبيلينات المناعية من نوع 15

الجدول 4: فصل بروتينات المصل في عمود DEAE-CELLULOSE..... 19

الجدول 5: المقادير المأخوذة من محلول HSB والماء المقطر وكاشف MACART..... 27

الجدول 6: نتائج الميز ، تركيز و كمية الـ IgG للعينات 32

قائـــمة الأشكال :

الشكل 1: البنية العامة للغلوبيلين المناعي من نوع IgG..... 07

الشكل 2: تأثير أنزيمات القطع على الغلوبيلين المناعي IgG..... 07

الشكل 3: رسم تخطيطي لتشكل السلسلة الخفيفة 08

الشكل 4: رسم تخطيطي لتشكل السلسلة الثقيلة 10

الشكل 5: آلية تنشيط المتممة 12

الشكل 6: صورة فوتوغرافية لتجربة الميز..... 25

الشكل 7: المنحنى العياري لتقدير كمية بروتين الـ IgG (3 = n) 31

الشكل 8: نتائج الهجرة الكهربائية على أسيتات السليلوز..... 32

الشكل 9: المنحنى العياري لتركيز بروتينات المصل A..... 33

الشكل10: نتائج الهجرة الكهربائية على هلام متعدد الأكريلاميد 34
SDS - PAGE على مصل أرنب .

الشكل 11: المنحنى العياري لتحديد الوزن الجزيئي للبروتينات(n =4)..... 35

قائـــــمة المختصرات

(01) ADN : Acide désoxyribonucléique

(02)ARNm :Acide ribonucléique messager

(03)BSA : Bovin serum Albumine

(04) DEAE- cellulose : Diéthylamino-éthyl-cellulose

(05) D : Diversité

(06) ELISA :Enzym-Linked Immunoabsorbent Assay

(07) FCγ : Fragment cristallisable de la chaîne γ

(08) FC : Fragment cristallisable

(09) H : La chaîne lourde (Heavy)

(10) HSB : bovin serum human

(11) IgA : Immunoglobuline A

(12) IgD : Immunoglobuline D

(13) IgE : Immunoglobuline E

(14) IgG : Immunoglobuline G

(15) IgM : Immunoglobuline M

(16) J : Jonction

(17) KDa : killodalton

(18) L : Leader

(19) L : La chaîne léger (Light)

(20) pH_i : Point isoéléctrique

(21) PBS : phosphate buffer salin

(22)PEG : poly-éthylène glycol

(23) RFc_γ : Recepteur deFc_γ

(24) S : Svend berg

(25) V : Variable

المقدمة

المقدمـــــة :

قد يتعرض جسم الإنسان خلال فترات حياته لأمراض وإصابات مختلفة ، فالكائن الحي دائم الإتصال مع الوسط الخارجي الذي يحتوي على كائنات حية دقيقة : بكتيريا ، فيروســـات ، طفيليات ، و فطريات ...الخ ، قادرة على إصابتـــه .

فبفضل الجهاز المناعي يستطيع الجسم أن يقاوم و يحد من هذه الإصابـــات .

عند دخول الجسم الغريب يتعرض إلى مجموعة من التفاعلات تدعى المناعة غـــــير المتخصصة (فطرية) لها مفعول تخريبي للعامل الممرض نذكر على سبيل المثال : العـــطس ، الدموع ، التقيح ...الخ .

إثر إجتياز الخط الدفاعي الأول ، تنشط آليات أخرى أكثر تعقيدا و أكثر فعالـــية تتمثل في الإستجابة المناعية الخلوية و الخلطية ، هذه الأخيرة تتم بفضل غلوبيلينات مناعـــــية متشابهة جزئيا في شكلها و تختلف في وظائفها ، تنتج من طرف خلايا خاصة تدعى بالخـــلايا البائية التي تنتج و تنضج في النخاع العظمي ،وهناك أنواع مختلفة من الغلوبيلينات: IgG ،IgM ، IgD، **IgE** ، **IgA**

و لقد قمـــــنا بدراسة الغلوبيلين المناعي من نوع IgG الذي هو عبارة عـــن غليكوبروتين ذو وزن جزيئي 150 كيلودالتون ، يتكون من سلسلتين ثقيلتين (H) وسلسلتين خفيفتين (L)

يعتبر هذا الغلوبيلين لما له من أهمية في الميدان الطبي ، إضافة إلى الميدان البيولوجي من أهم الغلوبيلينات المناعية حيث يمكن إستخلاصه وفصله بعدة طرق و تقنيات من بينها : تقنية الكروماتوغرافيا بأنواعها و كذلك تقنية الترسيب بالأملاح .

و نظرا لهذه الأهمية الكبيرة التي يكتسبها الـ IgG إرتأينا من خلال هذا الموضـوع التطرق إلى إحدى تقنيات الفصل لإستخلاص هذا الغلوبيلين .

تنقسم دراستنا إلى جزئـــــين :

* الجزء الأول : هو الجزء النظري إذ نتعرض من خلاله إلى تعريف الغلوبيلينات المناعية وأنواعها ، وبعض خصائصها و التطرق إلى أهمية الـ IgG في شتى الميادين ، وطرق الفصل.

* أما الجزء الثاني : وهو الجزء المخبري أو التطبيقي ، نتناول فيه طريقة الإستخلاص إذ نقوم بمعالجة النتائج وتحليلها والخروج بخلاصة عامـــــــــة .

الجزء النظري

I- المفهوم العام للغلوبيلينات المناعية:

I-1- تعريـــف :

الغلوبيلينات المناعية هي عبارة عن غليكوبروتينات متواجدة في السوائل البيولوجية لكل الثدييات. يكون البعض من هذه الغليكوبروتينات متواجد على سطح الخلايا اللمفاوية من النوع B أين تلـــعب دور مستقبلات نوعية لمولد الضد، أما البعض الأخر فتكون سارية في الدم أو اللمـــف :

التداخل بين الخلايا اللمفاوية B و مولد الضد ضروري لتنشيطها و تمايزها إلى خلايا منتجة للأجـــسام المضادة أو ما يعرف بالبلاسموسيت (13) . إن الأجسام المضادة لها القدرة على الترصيص و الوســـم و ترسيب مولدات الضد أو تعديل البكتريا و الفيروسات و من هذه الأجسام : الـ IgG (17).

I-2- أقسام و تحت أقسام الغلوبيلينات المناعية :

يتوافق كل قسم من الغلوبيلينات المناعية بنيويا مع نوع من الأجسام المضادة، و لكن بعض الأجسام المضادة ذات النشاط المتشابه يمكن أن تنتمي إلى أقسام مختلفة من الغلوبيلينات المناعية (18) .

تتكون الغلوبيلينات المناعية من سلسلتين ثقيلتين H و سلسلتين خفيفتين L ، أين تحدد بنـــية السلاسل الثقيلة خمسة أقسام من الغلوبيلينات : IgM ، IgD ، IgG ، IgE ، IgA (5 ، 18).

I-2-1- الغلوبيلينات المناعية من نـــوع M (IgM) :

جزيئات الغلوبيلينات المناعية لهذا القسم هامة جدا لأنها أول الجزيئات التي تظهر (10) ، و تمثل نسبة 10 % من مجموع الغلوبيلينات المناعية (13) . توجد في كل جزيئة IgM خمسة مواقع ذات شراهة عالية و خمسة مواقع ذات شراهة ضعيفة (17) . لا تخترق جزيئة الـ IgM المشيمة و لكنها تثبت المتممة ، و تعتبر أهم غلوبيلين مناعي موجود على سطح الخلايا اللمفاوية B ، كما تحمل تسع أعشار الخلايا اللمفاوية B لدم الحبل السري عند الولادة جزيئة IgM غشائية أحادية (18) .

يشكل الـ IgA الغلوبيلين المناعي الأساسي للإفرازات اللعابية ، الثديية ، القصابات ، الرغـــــامي والجهاز البولي التناسلي .

يوجد الـ IgA الإفرازي الذي يمكن أن ينتمي إلى أحد تحت أقسام IgA_1 أو IgA_2 عـادة على هيئة ثنائية بمعامل ترسيب 11S و وزنه الجزئي قدره 385 كيلودالتون(13)، تكون الغلوبيلينات المناعية من نوع A غير قادرة على إختراق الحاجز المشيمي ، أو تنشيط الطريق الكلاسيكي للمتمـمة و بالمقابل فهي تستطيع تنشيطها بالطريق المتناوب (19) .

I-2-5- الغلوبيلينات المناعية من نوع E (IgE) :

تمثل الغلوبيلينات المناعية من نوع E نسبة 0.01 % من مجموع الغلوبيليـــــنات .

لا يرتبط هذا النوع من البروتينات بالمتممة ، و لا يخترق الحاجز المشيمي ، حســاس للحـــــرارة إذ يتخرب بالتسخين عند درجة 56° م لمدة 30 دقيقة (19) ، عند حقنه في جلد الإنسان يـبقى مرتبـــط بشراهة عالية بالماستوسيت (mastocyte) بواسطة القطعة Fc (12) ، كما يرتبط بالخلايا متعـددة الأنوية القاعدية (basophile) و الخلايا التي تملك مستقبلات عالية الشراهة مع IgE (18) .

يسبب الإتصال بين الجسم الغريب و الغلوبيلينات المناعية من نوع E تفريغ حبيبات الماستوسيت **(12، 18)** و بعض الخلايا الأخرى التي تفرز أمينات نشطة على الأوعية الدموية (18) .

إن الغلوبيلينات المناعية من نوع E هي أصل ظهور الحساسية المفرطة من نوع صدمة الأنفلاكسية وبعض أنواع الحساسية الممائلة (19) و يلعب أيضا دورا فيزيولوجيا هاما في حماية المخاط (12) .

الجدول 1 : بعض خصائص الغلوبيلينات المناعية (7 ، 9، 11)

الخصـــــائص	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
السلسلة الثقيلة	γ	α	μ	δ	ε
الوزن الجزيئي -KDa	165_146	160	970	184	188
الشكل المفرز	أحادي الجزيء	أحادي،ثنائي،رباعي	خماسي الجزيء	أحادي الجزيء	
تحت الأقسام	4_3_2_1	2_1	–	–	–
معامل الترسيب	7s (IgG3 :21s)	9 / 11s	19s	7s	8s
متوسط العمر- يوم -	7-21	6	10	3	2
تثبيت المتممة	+ +	-	++++	-	-
عبور الحاجز المشيمي	+	-	-	-	-
التواجد في المفرزات	+	++++	+	?	+
عدد المواقع النشطة	2	2 /+	10		2
الترسيب المخبري	++	+		-	
التعديل	++	++		-	
الإرتباط بألفة عالية مع : Mastocyte و Basophile	-	-	-	-	+++
الإنتقال عبر : Epithélium	-	+++	+/ ثنائي الجزيء	-	-
الإنتشار	+++	++ / أحادي الجزيء	-/+	-	+
الوســـــم – Opsonisation	++ ماعدا IgG2	+	-	-	-

الفصل الثاني

مفهوم العام للغلوبيولينات المناعية من نوع G

II- المفهوم العام للغلوبيلينات المناعية من نوع G :

II-1- تعريـــف :

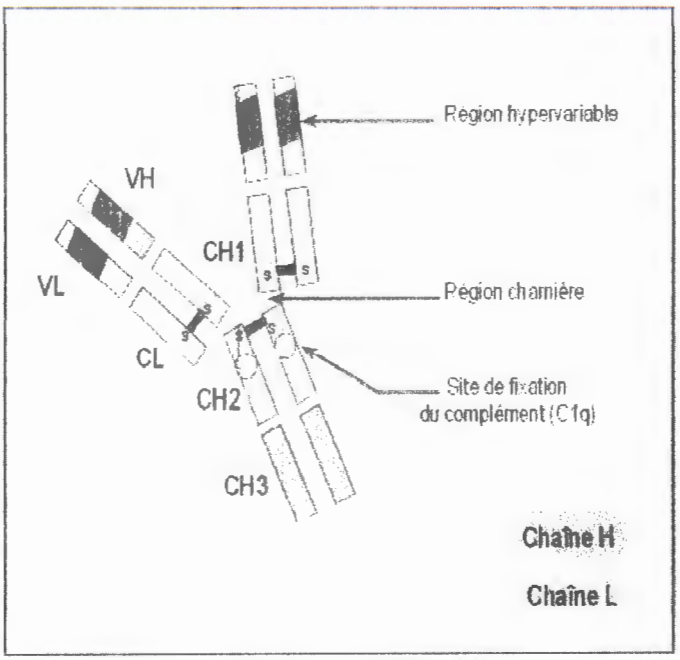
الغلوبيلينات المناعية من نوع G هي جزيئات ضخمة ذات وزن جزيئي يقارب 150 كيلودالتون(15). يتواجد هذا القسم من الغلوبيلينات بنسبة كبيرة في الجسم حيث يمثل حوالي 80 % من الأجسام المضـــادة ، و يمكن أن تنقسم في العديد من أنواع الكائنات الحية إلى تحت أقسام : (IgG_1 66% ، IgG_2 23% ، IgG_3 7% ، IgG_4 4%) التي لها خصائص فيزيوكميائية و بيولوجية مختلفة حسب جزئها Fc (17). وقد عرفت قديما تحت إسم: GAMMA-GLOBULiNE 7S بسبب حركيتها خلال الهجرة الكهربائية ومعامل ترسبها 7S (18) .

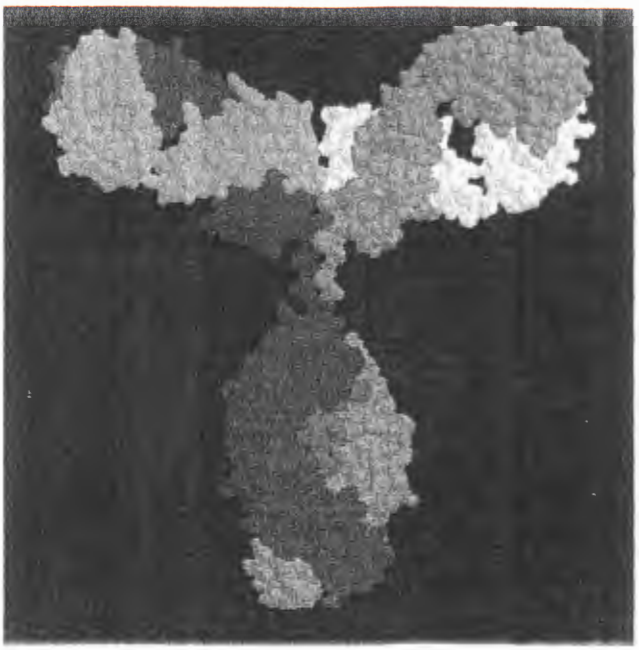
II-2- البنية العامة للغلوبيلينات المناعية من نوع G :

عند معالجة الغلوبيلينات المناعية من نوع G بواسطة المواد التي تعمل على قطع الجسور الكبريتية نتحصل على تحت وحدتين ، تحت الوحدة الأولى عبارة عن سلسلة ببيتيدية ذات وزن جزيئي 50 كيلودالتـــون تقريبا وتسمى السلسلة الثقيلة أو السلسلة H، أما الثانية فهي ذات وزن جزيئي 25 كيلودالتون وتعرف بالسلسلة الخفيفة أو السلسلة L وتتواجد كلتا السلسلتين بنسبة متساوية الجزيئات ، وتحتوي جزيئة الـIgG الـــتامة على سلسلتين ثقيلتين وسلسلتين خفيفتين : [150=(2x 25)+(2x50)] .

ترتبط السلسلتين الثقيلتين H مع بعضها البعض بواسطة جسور ثنائية الكبريت ، و ترتبط كل سلسلة ثقيلة مع سلسلة خفيفة بواسطة جسر ثنائي الكبريت (أنظر الشكل1) (15) .

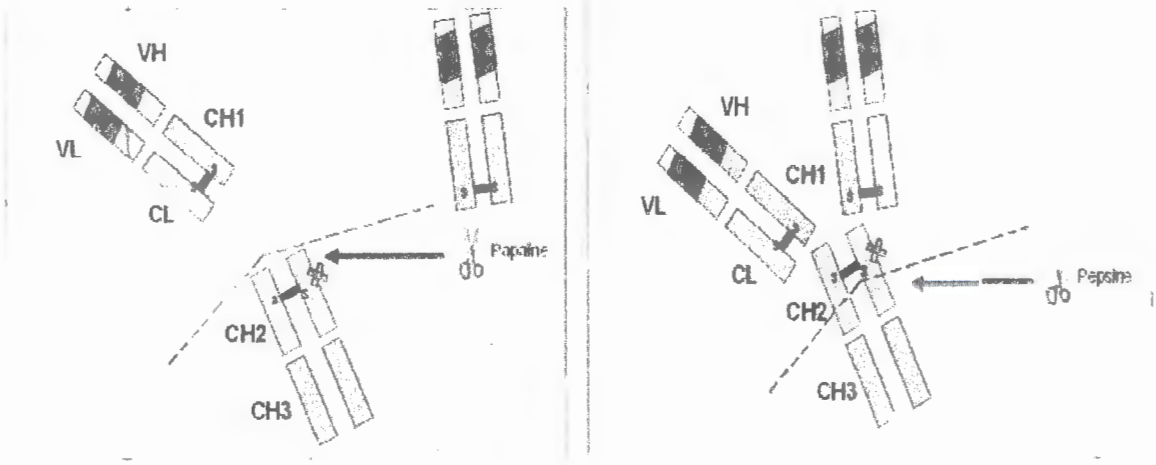
وقد أكدت تجارب الهدم أن جزيئات الـ IgG تتكون من قطعتين متلاحمتين حاملة نشاط الجسم المضاد وترتبط بقطعة ثالثة Fc بواسطة جسور ببيتيدية جد حساسة للهدم بواســطة الأنزيمـــات المـحللة للبروتيـــنات (أنظـر الشكل2) (3) .





رسم تخطيطي للـ IgG البنية ثلاثية الأبعاد للـ IgG

الشكل 1 : البنية العامة للغلوبيلين المناعي من نوع G (25 ، 28).



الشكل رقم 2 : تأثير أنزيمات القطع على الغلوبيلين المناعي G (28).

II-2-1- الجينات المشفرة للسلسلة الخفيفة :

يوجد نوعين من السلاسل الخفيفة تدعى بالسلاسل KAPPA ، و LAMBDA تتميز بإختلافات عديدة في بنيتها الأولية ، وتكون السلسلتين الخفيفتين لجزيئة واحدة من الغلوبيلينات المناعية دائما متماثلة .

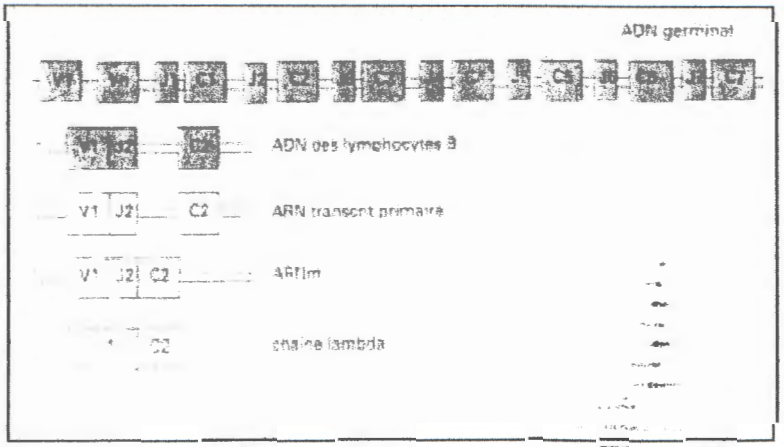
تتشكل كل سلسلة خفيفة عموما من 214 حمض أميني ، تعد إنطلاقا من النهاية الأمينية للسلسلة (NH2 terminal) (18) . وقد تمكن HILSCHMANN وCRAIG وباحثون آخرون سنة 1965 من إثبات أن كل سلسلة خفيفة تتكون من منطقتين مختلفتين .

النهاية الكاربوكسلية للسلسلة(107 حمض أميني) تكون ثابتة وتدعى بالمنطقة C_L والنهاية الأمينية التي تظهر تغير كبير في تسلسلها تدعى بالمنطقة V_L (13) .

تشفر الأحماض الأمينية من 95-101 في القطعة الأولى للسلسلة الخفيفة ؛ لأنها تمثل الجزء الكبير للمجال المتغير تدعى بالقطعة V ، ويشفر الجزء الباقي من المجال المتغير (حتى 13 حمض أميني) بقطعة أخرى تسمى القطعة الجينية الضامة أوالقطعة الجينية J .

يوجد ما يقارب 40 قطعة جينية وظيفية V_κ و5 قطع جينية J_κ بالنسبة للسلاسل الخفيفة **κ** وأما بالنسبة للسلاسل الخفيفة**λ** ، يوجد حوالي 35 قطعة جينية وظيفية V_λ و4 قطع جينية J_λ (أنظر إلى الجدول-2) (15) .

خلال مرحلة تمايز الخلايا اللمفاوية B ، يظهر أحد الجينات V_λ في الـ ADN الوراثي مرتبط مع أحد الجينات J_λ لتشكيل المركب **V-J** . يتم إستنساخ الجين المعاد ترتيبه لتشكيل مستنسخ أولي للـ ARN الذي يحتوي على مناطق غير دالة، تقطع المناطق الغير دالة فنتحصل على ARN رسول الذي يترجم إلى بروتين للسلسلة الخفيفة L (أنظر إلى الشكل- 3-) (13) .



الشكل 3 : رسم تخطيطي لتشكل السلسلة الخفيفة (13)

II-2-2- الجينات المشفرة للسلسلة الثقيلة :

تشتمل السلاسل الثقيلة على 446 حمض أميني (بالنسبة للسلسلةγ) التي تتألف من جزيئين أحدهما ثابت والأخر متغير (14) .

- الجزء المتغير V_H في النهاية الأمينية له نفس طول الجزء المتغير من السلسلة الخفيفة (115 حمض أميني) يحتوي على ثلاثة أو أربعة مناطق ذات تغير كبير (hypervariable) تقع في المناطق المشابهة لتلك الخاصة بالسلسلة الخفيفة (أنظر الشكل1) (18) ، هذا الجزء (المنطقة V) له وظيفة التعرف على الجسم الغريب (17) .

- الجزء الثابت (النهاية الكاربوكسلية) ، تحمل بنية مميزة لنوع السلسلة الثقيلة وكذلك السكريات الداخلة في بنية جزيئات الغلوبيلينات المناعية ، وتتكون في الواقع من عدة قطع مختلفة مكونة من حوالي 110 حمض أمـــيني مرتبطة بجسر ثنائي الكبريت داخل السلسلة لكل قطعة . تدعى القطع المثبتة بواسطة الجسور الكبريـــتية أيضا بالمجالات ويكون عددها ثلاثة C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} (14) .

تتمركز جينات السلاسل الثقيلة للغلوبيلينات المناعية على الكروموزوم رقم14 .

في المظهر الوراثي الموجود في الخلايا الغير ناضجة ، تنظم هذه الجينات في أربع قطع منفصلة :

تشفر الأحماض الأمينية من 1 إلى95 للمنطقة V بـ **50** جين وظيفي V ، ثم الأحماض الأمينية من 96 إلى 101 بـ **10** إلى **30** جين D وختاما الأحماض الأمينية من 102 إلى 110 بـ **6** جينات J (أنظر إلى الجدول 2) (15) .

الجدول-2: الجينات المشفرة للسلسلة الثقيلة و الخفيفة .(15) .

القطع الجينية	السلاسل الخفيفة L		السلاسل الثقيلة
	κ	λ	H
V	40	35	50
D	0	0	30
J	5	4	6

يشفر الجزء الثابت C للسلسلة الثقيلة بـ 9 جينات متكاملة: μ للـ IgM ، γ_1 للـ IgG_1 ، γ_2 للـ IgG_2 ...إلخ ، كما يلاحظ أن كل جين **V** مسبوق بتتابع L .

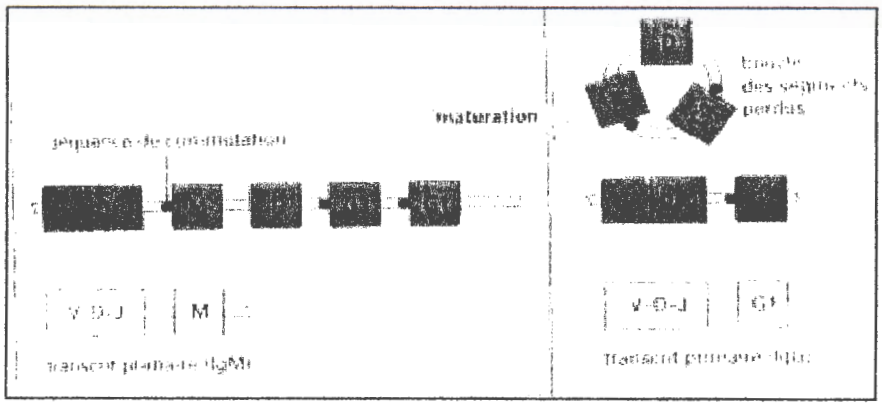
في البداية ، يتصل جين D بالقطعة J بواسطة نزع (délétion) الـ ADN الوسطي (إعادة الترتيب D-J)، ثم يشفر التتابع DJ وجين الجزء الثابت للـ **IgM** ($C\mu$) إلى ARN_m معطيا بروتين **DJ-C μ** .

بعد ذلك ، يتصل تتابع الجين V مع قطعته L بالقطعة المعادة الترتيب DJ بواسطة عملية نزع (délétion) جديدة (إعادة ترتيب **VDJ**) (9) .

إذن تستنسخ المنطقة VDJ مع القطعة الجينية M للسلسلةالثقيلة للـ IgM ، يتم بعدها إستئصال القطع الغير دالة خلال عملية القطع فينتج ARN_m الذي يشفر الشكل المفرز للـ IgM .

خلال مرحلة نضج الخلايا اللمفاويةB ينتج تنوع في الأجسام المضادة بواسطة الإرتباط بين التتابع S_μ وتتابع آخر لنوع ما يقع بعده (مثال: IgG_1) .

تشكل المنطقة الوسطية(التي تحتوي في هذه الحالة على القطع الجينية المشفرة للـ IgM،IgD وIgG_3 تبرعم الذي يستأصل ، ثم يلتحم موقعي التبادل ومنه ينتج ضياع للقطعة الوسطية ، وختاما نتحصل على بروتين السلسلة الثقيلة للـ IgG_1 (أنظر الشكل -4-) (13) .



الشكل 4 : رسم تخطيطي لتشكل السلسلة الثقيلة للـIgG (13)

II-3- الوظائف الفعالة للغلوبيلينات المناعية من نوع G:

II- 3-1- تنشيط المتـممة :

يعتبر نظام المتممة أحد الآليات الكبرى التي عن طريقها تتحول معرفة الجسم الغريب إلى دفاع فعال ضد العدوى ، وهو مهم للدفاع ضد البكتريا خارج خلوية .

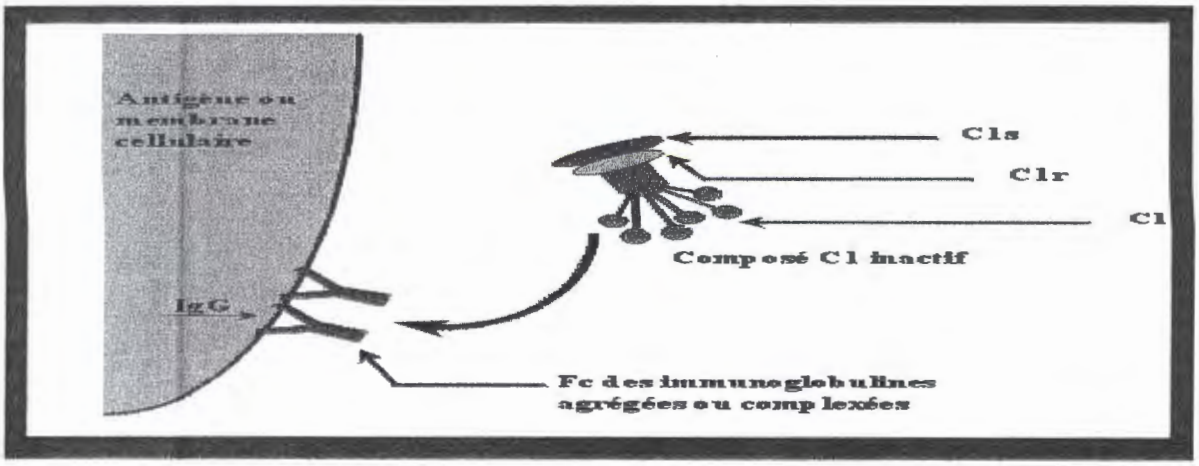
إن المتممة عبارة عن نظام بروتيني بلازمي ينشط بالجسم المضاد (مثال **IgG**) مما يؤدي إلى سلسلة من التفاعلات تحدث على سطح العامل الممرض وإنتاج مركبات فعالة .

إن أول مركب لنشاط المتممة في المسلك الكلاسيكي هو C_1 وهو عبارة عن معقد يتركب من ثلاث بروتينات تدعى C_{1q} ، C_{1r} ، C_{1s} . يبدأ نشاط المتممة عند إرتباط الأجسام المضادة المثبتة على سطـح الجسم الممرض بالبروتين C_{1q} .

بعد تنشيط الجسم المضاد المرتبط للبروتين C_{1s} ، يعمل هذا الأنزيم (C_{1s}) على المركبين التالين للمسلك الكلاسيكي فيقطع C_4 ثم C_2 لإنتاج جرينتين كبيرتين C_{4b} و C_{2b}اللتين ترتبطان لتشكيل محولـــة C_3 (C_3 convertase) للمسلك الكلاسيكي . يتمثل النشاط الأساسي لهذه الأخيرة في تقطيع كمـــــية كبيرة من جزيئات C_3 إلىC_{3b} التي تتثبت أيضا على سطح الجسم الممرض

تتمثل المرحلة الموالية لهذه السلسلة في تكوين محولة C_5 (C_5 convertase) عن طريق إرتباط C_{3b} بـ C_{4b} وC_{2b} للحصول على المركب C_{4b2b3b} .

ختاما ، يتشكل معقد المهاجمة الغشائي من إرتباط المركبات C_{5b} ، C_6 ، C_7 ، C_8 وعدد متغير من جزيئات C_9 ، فيشكل هذا المركب حلقة على الجدار إذ تخترق الغشاء الخلوي مما يسمـــح بتحليل الخلـــــــــية الهدف (15) (أنظر الشكل5) .



الشكل- 5: آليــة تنشيط المتممـــــــة (28)

II- 3-2- تنشيط البلاعم الكـبيرة :

تتمثل الوظيفة الثانية للأجسام المضادة في جعل البلاعم الكبيرة وخلايا بلعمية أخرى لها القدرة على إدخال الكائنات الدقيقة ولجسام غريبة أخرى التي لا يتم التعرف عليها مباشرة .

تحاط الأجسام الغريبة بالأجسام المضادة التي يمكنها التثبت بواسطة مستقـــبلات موجودة على سطح الخلايا البلعمية (RFc_γ) ، هذه المستقبلات تتعرف خصوصا على القطعة Fc للجسم المضاد ، وهذه البلعميات منذ تحريضها تعمل على إدخال الجسم الغريب .

تعرف إحاطة الجسم الغريب بهذه الطريقة بواسطة الأجسام المضادة بالوسم (opsonisation) ، والأجسام المضادة المحيطة هي من نوع IgG (15) .

تحرض التداخلات بين المعقدات المناعية الخاصة بالـ IgG مع مستقبلات القطعة Fc_γ ($R Fc_\gamma$) للصفائح ، يؤدي إلى تجمع هذه الأخيرة وإنتاج أمينات نشطة على مستوى الأوعية الدموية . ويبقى الـــــدور الفيزيولوجي لمستقبلات القطعة Fc للـ IgG المتواجدة في أنواع خلوية أخرى خاصة على اللمفاويات غـــير واضح .

بالرغم من أن الغلوبيلينات المناعية من نوع G غير قادرة على التثبت بشراهة قوية على خلايا الماستوسيت لجلد الإنسان ، فهي الجزيئة الوحيدة التي تتمتع بخصائص مخالفة بعض الشيء للغلوبيلينات المناعية الأخرى

II-4-أهمية الغلوبيلينات المناعية من نوع G :

II-4-1- في التشخيـــص :

تستعمل الأجسام المضادة من نوع G مخبريا في الكشف و التعرف على الأجـسام الغريبة و خصائصها :

**التعرف على البكتيريا الممرضة* *(VIBRIO cholérique، Salmonella)* و الفيروسات (مثل فيروس : *HEPATITE B*) .

* التعرف على طبيعة الزمر الدموية و محددات النسيج (HLA) قبل زرع الأعضاء.

* الكشف عن المؤشرات الورمية(Antigène carcinoembryonnaire ، α - foetoprotéine)

* التعرف و تقدير كمية البروتينات المصلية للإنسان.

* الكشف عن تلوث المواد الغذائية.

* كما تستعمل أيضا في العديد من التقنيات مثل: تقنية ELISA ، واختبار COOMBS.

تستخدم كذلك في تنقية وإستخلاص بعض الخلايا والبروتينات (10) .

II - 4-2- في العلاج :

* يعتبر فيروس ROTAVIRUS من أكثر العوامل المتسببة في إلتهاب غشائي المعدة والأمعاء للأطفال عبر العالم حيث يؤدي إلى وفاة حوالي 900000 طفل سنويا في الولايات المتحدة الأمريكية .

إن مراكز الطفولة و المستشفيات هي السبب الرئيسي للإصابة .

تـتـم الوقاية منه عن طريق علاج مناعي على شكل IgG ، وقد أعيد الأخذ بهذه الفكرة من طرف فريـــق Napolitaine حسب بروتوكول ذو بعد علاجي .

تم تقسيم 98 طفل مصاب بإسهال حاد إلى مجموعتين :

- المجموعة الأولى تلقت جرعة من الـ IgG عن طريق الفم .

- أما الثانية حاملة لبكتيريا الـ SALMONELLA تلقت نفس الجرعة من الـ IgG عن طريق الفم .

فـي المجموعة الأولى التي تلقت الـ IgG يلاحظ تناقص في مدة الإسهال ، أما الثانية لم يلاحظ أي تناقص .

بينت العديد من التجارب بأن الـ IgG له القدرة على مقاومة التثبيط المعدي و بقائها فعالة في الأملاح ونعرف أيضا دور حليب الأم في الوقاية من الإسهال الفيروسي بفضل غناه بالأجسام المضادة من نوع IgG . (26)

- تعالج أمراض الحساسية بأجسام مضادة، المسؤول عنها الـ IgE التي هي عبارة عنIgG Anti-IgE (28)
- مستحضرات الـ IgG البشرية المحضرة لحقنها داخل الأوردة و التي تم تحضيرها إنطلاقا من خليط بلازمي لـ 3 إلى 10 آلاف متبرع ، يمكن إستعمالها في بعض أمراض المناعة الذاتية (الجرعة تقدر بـ 0.4 غ / كغ / يوم لمدة 5 أيام أو مرتين 1 غ / كغ) ، و يأخذ هذا العلاج عادة مرة في الشهر بدلالة تطور الأعراض السريرية (signes cliniques) .

كما نجد أن الـ IgG (Ig IV) تستعمل بجرعات جد منخفضة من أجل علاج النقص في الأجسام المضادة من نوع IgG (27) .

الجدول 3 : بعض خصائص الغلوبيلينات المناعية من نوعG (10، 15)

الخصـــــائـص	الغلوبيلينات المناعية			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
التركيز المصلي(مغ / مل)	9	3	1	0.5
المسلك الكلاسيكي لتنشيط المتممة	+ +	+	+ + +	-
الجسور ثنائية الكبريت الداخلة في السلاسل H	2	4	15-13	2
الحساسية للسموم البلازمية للخلايا NK	+ +	-	+ +	-
الوزن الجزيئي للسلسلة الثقيلة (10^3)	54-52	54-52	60	54-52
الارتباط بالبالعات الكبيرة و بلعميات أخرى	+	-	+	-
التفاعل مع البروتين A لبكتيريا Staphylococus	+	+	-	+
التثبت على مستقبلات الـ Fc : Polynucléaires neutrophiles	+	+	+	+

الفصل الثالث

طرق فصل الغلوبيلينات المناعية من نوع G

III- الكـروماتوغرافـيا و الغلوبيلينات المناعية G :

III-1 - تعريـــف :

الكروماتوغرافيا هي طريقة فيزيائية للفصل أين تتوزع المركبات المفصولة على طورين : الأول يدعى الطور الثابت متكون من مادة صلبة أو سائلة مثبتة، والآخر يدعى الطور المتحرك يتكون من سائل أو غاز.

طبقت أول كروماتوغرافيا سنة 1905 من طرف العالم TSWETTمن أجل فصل صبغات الكلوروفيل (21) .

III -1-1- كروماتوغرافيا الشـــراهة :

كروماتوغرافيا الإدمصاص هي عبارة عن طريقة لفصل الجزيئات ، أين تفصل المادة المرغوب فيها من خليط معقد عن باقي المركبات ، لأنها ترتبط خصوصا على الدعامة التي تستعملها في العمـــلية .

يمكن إستعمال كروماتوغرافيا الشراهة أين تكون الجزيئة المراد فصلها تمتلك شراهة لمكونات المدمص التي تدعى الربيطة (LiGAND) و التي تتثبت بطريقة مستقرة .

تعتمد كروماتوغرافيا الشراهة على وجود خليط يحتوي على الجزيئات المراد فصلها و الدعامـــة التي تحتوي علىالربيطة .

إن الجزيئات التي ليست لها ألفة مع الربيطة لا تثبت بتاتا على الدعامة حيث يمكن إزالتها ، علـى عكس الجزيئات التي تمتلك ألفة تبقى مرتبطة ، و إثر خروج كل المواد الغير مرغوب فيها كليا ، يتـــم فصل الجزيئات المرتبطة بتعريض المعقد جزيئة- ربيطة إلى ظروف تعمل على فك الإتصـــــــــال .

نعمل عموما على تغيير تركيبة المحلول لإنقاص الشراهة بإضافة ربيطة منافسة (22) .

الربيطة المستعملة في الفصل الكروماتوغرافي بالشراهة للغلوبيلينات المناعية هي البروتينAالذي هو عبارة عن مركب للجدار البكتيري للـ : *staphylococus* القادر على التثبت بالمـــنطقة $C_{\gamma 2}$ و $C_{\gamma 3}$ لثلاث تحت أقسام IgG للإنسان : IgG_1 ، IgG_2 ، IgG_4 (1 ،13) .

ترتبط الأجسام الغريبة بالطور الصلب – sépharose - فتستعمل لفصل الأجسام المضادة المتواجدة في المصل الكلي (1) .

يتم الحصول على الأجسام المضادة النقية الخاصة بالجسم الغريب بفصلها من المدمص المناعي بمواد مخلبية- choatropique - مثل Thiocymate de sodium ، المحلول المنظم glycine- Hcl ، و أيضا diéthylamine (13) .

يجب توفير عدة شروط من أجل بلوغ الهدف المحدد (النقية ، دراسة الخواص) سواءا باستعمال كروماتوغرافيا الشراهة ، و هي :

- الدعامة لا يحدث عليها إمصاص
- تثبيت الربيطة بالدعامة لا يغير الشراهة مع جزيئة الهدف .
- يجب أن تكون الشراهة بين الجزيئة و الربيطة جد كافية لكي تسمح بالتثبت ، لكن لا تكون بدرجة لا يمكن تفكيكها ، و هذا من أجل فصل البروتين دون تغير طبيعته (24) .

III-1-2- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني :

و هو التحليل الكروماتوغرافي في حالة سائلة أين يكون الطور الثابت يتألف من نسيج صلب غير قابل للإنحلال في الماء ، مزود بمجموعات وظيفية غير متأينة .

لكل مجموعة القدرة على إعطاء أيون مشحون بشحنة موجبة وأيون مشحون بشحنة سالبة إذ يبقى أحدهما مرتبط على الدعامة ، والآخر يتبادل مع أيونات من نفس الشحنة الموجودة بالمحلول المراد فصله (8) .

تهدف هذه الكروماتوغرافيا إلى فصل المكونات القطبية ، وتنقسم إلى مرحلتين منفصلتين :

- تثبيت البروتين بالشحنات المثبة (الطور الثابت).
- إستخلاص البروتينات من الشحن المثبة (20) .

و يكون التوزيع بدلالة الشحنة. المبادل الأيوني عبارة عن مادة ذات ثغور والتي يثبت عليها برابطة تكافئية مجموعة كميائية قابلة للتأين .

يمكن لهذا الجزء المشحون التفاعل بقوة مع الأيونات المتواجدة في السائل المراد فصله ، وأيضا يمكن للجزيئات المشحونة أن تدمص عكسيا على المبادل الأيوني .

تنجز التجربة على ثلاث مراحل أساسية :

أ- توضع المواد على العمود المختار بدلالة شحنة الجزيئات والدعامة.

ب- إستخلاص الجزيئات ويتم عادة بالزيادة التدريجية للقوى الأيونية لمذيب الفصل.

ج- تحديد المبادلات الأيونية (بالغسل الشامل بمحلول ذو pH يجعل الشحنات في قيمتها الإبتدائية) .

إن الدعامة الدعامة المستعملة هي نفسها المستعملة في مختلف أنواع الكروماتوغرافيا (Cellulose , dextran , polyacrylamide) والتي تتثبت عليها :

إما المجاميع الحمضية القادرة على حمل الشحنة السالبة في pH المحلول المنظم الذي يغمر الدعامة والذي يكون أكبر من PK المجاميع المثبتة : يتعلق الأمر بالمبادلات الكاتيونية . إن الجزيئات المحجـــوزة هي تلك المشحونة بالموجب ، تكتسب البروتينات شحنة كلية موجبة إذا كان pH المحلول المنظم أقـــل من نقطة تعادلها الكهربائي pH_i .

- أو المجاميع القاعدية القادرة على حمل الشحنة الموجبة في pH المحلول المنظم الغامر للدعامة والـــذي يكون أقل من PK المجاميع المثبتة : يتعلق الأمر بالمبادلات الأيونية . إن الجزيئات المحجـــوزة هي تلك المشحونة بالسالب ، تكتسب البروتينات شحنة كلية سالبة إذا كان pH المحلول المـــنظم أكبر من نقطة تعادلها الكهربائي (pH_i) .

تكون أغلبية الغلوبيلينات المناعية على العموم لها نفس الكتلة الجزيئية (الـ **IgG** مايقارب KD146) ، لكنها تختلف عن بعضها البعض في شحنتها الكهربائية ، فتكون نقطة تعادلها الكهربائية متغيرة من 4,5 إلى 9,5 ، ولهذا فإن فصل الغلوبيلينات المناعية في المحلول بالإعتماد على درجة إمصاصها في الطـــور الصلب بشحنة متغيرة تكون إختيارية جدا (1) .

عند الفصل على هلام diéthylamino-éthyl-cellulose (DEAE) فإن أغلبية الـ IgG تفصل في المعول الأول للبروتينات و تكون نقـــية (أنظر إلىالجدول4) (23) .

الجدول-4 : فصل بروتينات المصل في عمود الـ DEAE-cellulose (23)

	البروتينات المفصولة	درجة النقاوة %
1	IgG	99,5
	Transferine	70
	B-globiline	20
2	IgG-IgA-IgD	آثار
	albumine	آثار
	Albumine	78
3	&-globuline	15
	IgG-IgA-IgM	آثار

III -1-3- كروماتوغرافيا الطـــرد الجزئي:

لقد عرف الفصل الكروماتوغرافي للجزيئات ذات الأحجام المختلفة ، الذي يرتكز على قدرتها على إختراق أو عدم إختراق الطور الثابت منذ زمن طويل .

الطور الثابت عبارة عن مادة حاوية على ثغور ذات أبعاد مختارة تبعا لحجم النوع المراد فصله يتكون بهذا نوع من الغربال على المستوى الجزيئي بنفاذية إختيارية (6 ، 7)

إن المواد المستعملة أساسا في هذه التقنية هي الهلمان أي وسط منظم متجانس مشـــكل من طورين :

- الطور المُبَعْثِر: وهو عبارة عن مادة صلبة تتكون من مادة الهلام
- الطور المُبَعثِر : وهو عبارة عن المذيب

وتتكون المادة الهلامية من جزيئات صغيرة جد منتظمة ناتجة عن إرتباط الجـزيئات الكـــبيرة المجتمعة مع بعضها بطريقة لتشكيل شبكة (8) .

تعرف التقنية بمصطلح الترشيح الهلامي أو النفانية الهلامية ، حسب طبيعة الطور المتحرك ، سائل أو عضوي على الترتيب .

تتعلق سرعة الهجرة في العمود لمركب ما بإنتشاره في الطور الثابت أي بطريقة غير مباشرة بكتلته الجزيئية .

ترتكز كروماتوغرافيا الطرد الجزئي على الدخول المختلف لجزيئات العينة في ثغور الطور الثابت (18 ، 20) .

يتحصل على النتائج الجيدة بواسطة هلام بحد فصل قريب من الكتلة الجزيئية للجزيئة المراد فصلها ، مثلا بالنسبة للـ : IgG يستعمل Sephadex G150 (**5000- 400000 دالتون)** (7 ، 8) .

الجزء التطبيقي

الطرق والأدوات المستعملة

I- المواد والطـــرق :

I-1 - الأدوات والمواد والطرق المستعملة :

تمت دراستنا التطبيقية على مستوى مخابر كلية العلوم بجامعة جيجل وكذلك على مستوى مخبر مستشفى بلدية الطاهيـر.

I-1-1- الأدوات :

- جهاز الطرد المركزي
- الرجاج بنوعيه(Agitateur، vortex)
- حمام مائي
- أنابيب ذات حجم 5 مل
- أنيبات –Pipettes: 2 مل
- كأس بيشر
- أنيبة دقيقة –micropipette : 100 ميكرولتر
- الميزان
- العدسات
- حامل الأنابيب
- الحوض

I-1-2- المواد البيولوجية والمحاليل :

- محلول الغسل
- محلول مضاد التختر
- محلولPBS
- المصل
- البلازما

I-1-3-طرق التقنيات :

I-1-3-1-تقنية الترسيب :

I-1-3-1-1-تحضير المحاليل و العينات :

I-1-3-1-1-1-تحضير المصل و البلازما :

قصد تحضير المصل، ننزع كمية من دم إنسان عادي و نجري عليه عملية الطرد المركزي في 3000 دورة /د، بعدها نحتفظ بالجزء الطافي الذي هو عبارة عن المصل و نتخلص من الراسب.
أما بالنسبة للبلازما، نضيف كمية من الدم إلى محلول مضاد التخثر (سيترات الصوديوم 3.2%)بما يعادل 1 حجم إلى 9 أحجام من الدم نجري عملية الطرد المركزي لمدة 15 دقيقة في 3000 دورة/د في 4 مْ ثم نحتفظ بالجزء الطافي (البلازما) و نتخلص من الراسب.

I-1-3-1-1-2-تحضير محلول الغسل:

لغرض تحضير 400 مل من محلول الغسل نقوم بإضافة 0.84% (و/ح) من $NaHco_3$ أي ما يعادل 3.36 غ إلى 18 % من Na_2So_4 (72غ) و نكمل الحجم إلى 400 مل بإضافة الماء المقطر.

I-1-3-1-1-3-تحضير مضاد التخثر:

قصد تحضير 100مل من هذا المحلول نأخذ 3.2 غ من سترات الصوديوم و نكمل الحجم إلى 100مل من الماء المقطر.

I-1-3-1-1-4-تحضير الـ PBS:

يضاف إلى 100مل من كلوريد الصوديوم (1.5 مولر) 10مل من محلول الفوسفات (1 مولر) ذو pH = 7.4 ، و إكمال الحجم إلى 1 ل بالماء المقطر.

I-1-3-1-2- ترســـــيب الـ IgG:

تعتمد دراستنا على 4 عينـــــات :

- المصل A
- المصل B
- البلازما A
- البلازما B

يتم الترسيب بإضافة 18%(و/ح) أي 1,8غ من كبريتات الصوديوم إلى 10 مل من العينة إذ تكون الإضافة ببطء لمدة نصف ساعة مع التحريك ثم يتم رج العينة لمدة ساعة ثم تترك ساعة أخرى بدون تحريك .

بعد هذا تجرى عملية الطرد المركزي بسرعة 4000 دورة/ د لمدة 20 دقيقة إذ نتخلص من الجزء الطافي ونحتفظ بالراسب .

يتم غسل الراسب بمحلول الغسل المكون من 0,84% (و/ح) من $NaHCo_3$ و18%(و/ح) من $Na_2 So_4$ بإضافة 5 مل من محلول الغسل لكل 1مل من العينة وتجرى عملية الطرد المركزي بسرعة 4000 دورة/ د لمدة 20 دقيقة , وهذا مرتين إذ نتخلص في كل مرة من الجزء الطافي ونحتفظ بالراسب .

وأخيرا يضاف حجم من محلول الـ PBS: لحجم من العينة أي 10 مل ثم الميز لـيلة كاملة ضد نفس المحلول(BENBOUBETRA – 1989) (2) .

I-1-3-1-3-الميز :

I-1-3-1-3-1-تعريف :

يعتبر الميز أحد تقنيات الفصل، و هو تقنية بسيطة تسمح بفصل المواد (أيونات، جزيئات صغيرة) لها القدرة على اختراق ثغور الغشاء الذي يسمى غشاء الميز (21).

I-1-3-1-3-2-المبدأ :

تتغير سرعة الانتشار في اتجاه معاكس للكتلة الجزيئية عند ظاهرة الأسموز، بالإضافة إلى حجم الثغور.

فإن بعض الأغشية تكون نفوذة للجزيئات الصغيرة جدا مثل الماء و غير نفوذة للجزيئات الكبيرة و هذا في حالة غشاء Pfeiffer.

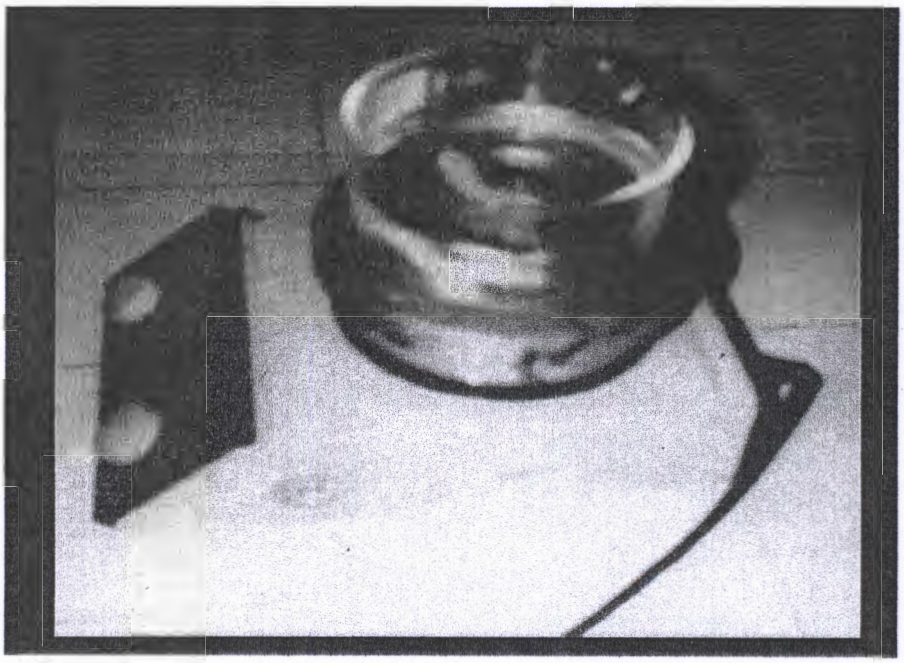
إن الأغشية الأكثر استعمالا هي التي تسمح بترشيح الجزيئات الصغيرة والمتوسطة الحجم و تمنع الجزيئات الضخمة من المرور (8).

I-1-3-1-3-3-طريقة العمل :

نقوم بتغذية غشاء الميز في حمام مائي لمدة 15 دقيقة ثم يوضع في ماء مقطر للتبريد بعدها يتم ربط الغشاء من جهة و يوضع بداخله محلول الـ (IgG + PBS) ثم يربط بإحكام من الجهة الثانية ثم يوضع في حوض يحتوي على محلول الـ PBS.

يترك العملية ليلة كاملة بالرج و في غرفة التبريد، و يتم بعدها قياس الحجم النهائي للمحلول.

ملاحظة : لا توجد حجرة التبريد لذا لا يتم الميز على أكمل وجه.



الشكل 6 : صورة فوتوغرافية لتجربة الميز

ا-1-3-2- تقديرتركيز بروتينات الـIgGالمنقاة :

قصد تقدير تركيز الـ **IgG** بالتقدير البروتيني، يتم الاعتماد على الطريقة المقترحة من طرف **BRADFORD** (1976) و المعدلة من طرف :MACART و**GERBAUT**(1982) و **MACART** و آخرون (1986)

ترتكز هذه الطريقة على تثبيت صبغة الكوماسي الزرقاء(G 250)0.004% (و/ح) المذابة بخليط متكون من 4% (ح/ح) إيثانول (96%) و 10% (ح/ح) حمض الفوسفوريك (85%)، يزود الخليط بـ 0.003% (و/ح) من**SDS** الذي يعمل على التخفيض من شدة اللون و إعطاء الطريقة نفس الحساسية باتجاه مختلف البروتيـــــنات .

ينشأ منحنى عياري باستعمال ألبومين مصل الإنسان(**HSA**)أو ألبومين مصل البقر (**BSA**) (2 مغ / مل من المحلول الفيزيولوجي) في مجال من التركيز [1.2-0.2] (مغ/مل)، و تضاف 100ميكرولترمن المحلول المعياري المختلف التركيز الى 2 مل من كاشفMACART ثم يتم الخلط برجاج : **VORTEX**

الجدول 5 : المقادير المأخوذة من محلول HSB والماء المقطر وكاشف MACART

الأنابيب	الشاهد	1	2	3	4	5	6
تركيز المحلول مغ/مل	-	0.2	0.4	0.6	0.8	1.00	1.2
الحجم المأخوذ من محلول الأم ميكرولتر	00	10	20	30	40	50	60
حجم الماء المضاف (ميكرولتر)	100	90	80	70	60	50	40
الحجم الكلي (ميكرولتر)	100	100	100	100	100	100	100
حجم كاشف MACART (مل)	2	2	2	2	2	2	2

تقاس الإمتصاصيـة عند طول موجة 595 نانومتر ضد شاهد يحتوي على 100 ميكرولتر من الماء المقطر و 2 مل من الكاشف.

تحضـــر العينات (IgG المصل ، IgG البلازما) بإضافة100 ميكرولترمنها سواء كانت مخففة أو غير مخففة إلى 2 مل من الكاشف ثم يتم الخلط بالـ :VORTEX.

وتقاس إمتصاصية كل عينة عند نفس طول الموجة بجهاز قياس الكثافة الضوئية .

I-1-3-3- الهجرة الكهربائية للغلوبيلينات المناعية على أسيتات السليلوز :

I-1-3-3-1- المبدأ و الهدف :

تعتبر الهجرة الكهربائية بإستعمال أسيتات السليلوز تقنية لفصل البروتينات المصلية ، و هي طريقة تحليلية تعتمد على هجرة مختلف الجزيئات الحاملة لشحنات تحت تأثير حقل كهربائي بسرعات مختلفة .

تعتمد سرعة الهجرة على شحنة الجزيئة و وزنها الجزيئي و تركيبتها من الأحماض الأمينية (6) .

I-1-3-3-2- التقنية :

نغمر الشريط في محلول منظم لمدة 15- 20 دقيقة ، حيث كلما كان وقت الغمر كبير كلما كانت شدة الإمتصاص جيدة وهذا ما يسمح بهجرة جيدة للعينات .

نأخذ كمية تقدر بـ: 3 ميكرولتر من كل عينة بواسطة أنيبيبات ، حيث توضع في مركز الشريط ، ثم يوضع هذا الأخيرفي أسفل الغرفة و نعمل على تغطيتها لغرض تفادي ظاهرة التبخر، إذ تكون مدة الهجرة حوالي15 دقيقة في فرق كمون يقدر بـ:180 فولط .

أ- التلويـــن :

نعمل على غمر الشريط في محلول ملون (**ROUGE PONCEAU**) لمدة 6 دقائق .

ب- إزالـــة التلوين :

لغرض إزالة التلوين يوضع الشريط في محلول مزيل للون (حمض الاسيتيك 5 %) لمدة 3 دقائق على ثلاث مراحـــل .

ج - نزع المـــاء :

نغمس الشريط في محلول الميثانول النقي لمدة دقيقتين على مرحلتين .

د - التشفيف

يتم ذالك خلال 5 إلى 10 دقائق في خليط يتكون من :

- 67 % ميثانول نقي .
- 29 % حمض الأسيتيك النقي .
- 4% محلول المنقى (CLARIFIANTE)

ه - التجفيـــف :

بعد غمس الشريط في حمام المحلول المنقى(**CLARIFIANTE**) ، يسحب و يوضع عموديا لمدة دقيقة ثم يوضع في المجففة للتقطير (أسيتات السلبلوز يكون في الجهة العلوية) لمدة 10 دقائق في درجة حرارة 50 إلى 60°م .

أخيرا ينظف الشريط بواسطة القطـــــــن .

و - القـــــــراءة :

تتم القراءة بواسطة جهاز : **DENSITOMÈTRE** عند طول موجة 525 نانومتر.

ا-1-3-4-الهجرة الكهربائية على هلام متعدد الأكريلاميد في وجود الـ SDS:

تم دراسة وتحديد الوزن الجزيئي للعينات على هلام متعدد الأكريلاميد بوجود SDS المحضر حسب طريقة LAEMMLI (1970).

يتكون هلام الفصل من 10 % أكريلاميد المكون من 9.75 % (و/ح) أكريلاميد و 0.25 % (و/ح) من N-Ń méthylène bis-acrylamide في محلول منظم Tris-Hcl(0.375 مولر)، pH =8.8

المضاف إليه 0.1 % (و/ح) من SDS، 0.024 (ح/ح) من: N,N,Ń,Ń, tetraméthylène diamine (temed) و0.033 (و/ح) من Persulfate d'ammonium .

يتكون هلام الفصل من 5 % أكريلاميد المكون من 4.876 % (و/ح) أكريلاميد و 0.124 % (و/ح) من N-Ń méthylène bis-acrylamide في محلول منظم Tris-Hcl(0.125 مولر)، pH=6.8

المضاف إليه 0.1 % (و/ح) من SDS ، 0.01 % (ح/ح) temed و 0.012 % (و/ح) من : Persulfate d'ammonium .

فككت عينات البروتينات العيارية (100 ميكروغرام) و العينات (5- 40 ميكروغرام) بالتسخين إلى 100° م لمدت 5 دقائق في محلول 30- 60 ميكرولتر من المحلول المنظم Tris-Hcl (62.5 ميلي مول) pH=6.8 الذي يحتوي على 2 % من SDS ، 20 % (ح/ح) من Glycérol و 0.005 % من Bleu de bromophénol الذي يعمل على معرفة جبهة المذيب .

من المهم أن نسجل بأن β- mercaptoéthanol يضاف مباشرة للعينات قبل تسخينها .

تتم الهجرة الكهربائية للعينات بالمحلول المنظم Tris- Hcl (25 ميلي مولر) Glycine(0.192 مولر) الذي يحتوي على 0.1 % (و/ح) من SDS تحت فرق كمون 75 فولط في 4 °م حتى دخول العينات في هلام الفصل ثم يرفع فرق الكمون إلى 250 فولط ، تثبت فيما بعد البروتينات المفصولة و تلون لمدة ساعتين بمحلول مكون من 0.1 % (و/ح) من Bleu bullant R 250 في 45 % (ح/ح) من إيثانـــــول و 10 % (ح/ح) من حمض الأسيتيك ، ثم يزال تلوين الهلام بمحلول مكون من 5 % (ح/ح) من الإيثانول و 75 % (ح/ح) من حمض الأسيتيك .

تتم إزالت التلوين (لإيضاح عينات البروتينات) تحت التحريك البطيء و تغيير المحلول في كل مرة حتى يتم إزالة التلوين الكلي للهلام (حوالي 24 ساعة) (2) .

I-1-3-5- تحديد الوزن الجزيئي :

يتم تحديد الوزن الجزيئي إنطلاقا من منحنى عياري يعبر عن الحركية النسبية بدلالة لوغاريتم الوزن الجزيئي (Log M) للبروتينات المعيارية (أنظر الشكل 11) (2) .

الحركية النسبية تحسب بالعلاقة التالية :

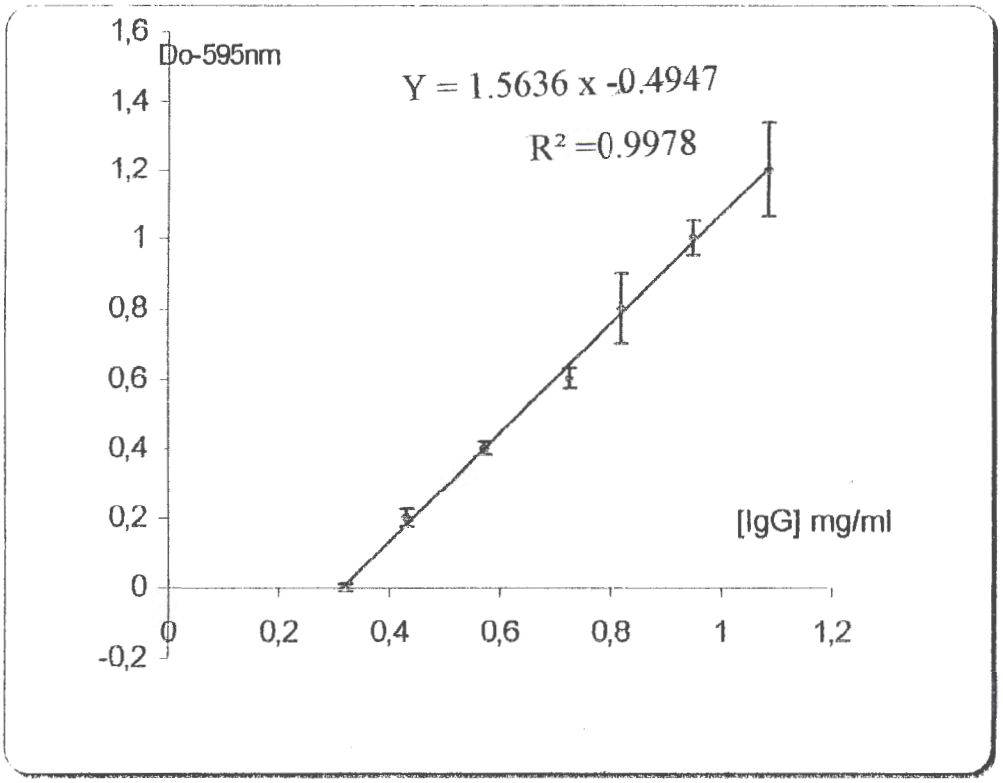
$$\text{الحركية النسبية} = \frac{\text{المسافة المقطوعة من طرف البروتين}}{\text{مسافة جبهة المذيب}}$$

النتائج و المناقشة

II- النتائـــــــج :

II-1- نتائـــــــج التقدير البروتيني بعد الترسيب:

قدرت تراكيز عينات الـ IgG حسب طريقة MACART الموضحة بالفقرة (I-1-3-2) و حسب المنحنى العياري (الشكل 7) و يعطي الجدول تركيز الـ IgG بالميلي لتر من العينة كما يعطي الحصيلة الكلية لهذا البروتين في 10 مل من العينة



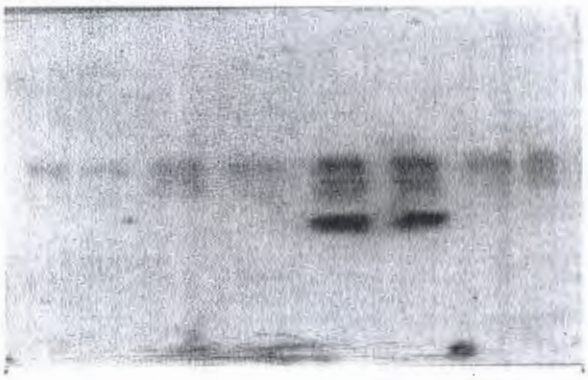
شكل 7 : المنحنى العياري لتقدير كمية البروتين (n=3)

الجدول 6 : نتائج تركيز و كمية الـ IgG للعينات

	المصل A	المصل B	البلازما A	البلازما B
قبل الميز (مل)	10.80	11.00	10.50	10.60
بعد الميز (مل)	11.20	11.40	11.50	11.00
تركيز الـ IgG من العينة (مغ / مل)	1.347	1.398	1.392	1.359
كمية بروتين الـ IgG المتحصل عليها في 10 مل	15.086	15.937	16.008	14.949

2-□- نتائج الهجرة الكهربائية على ورق أسيتات السليلوز :

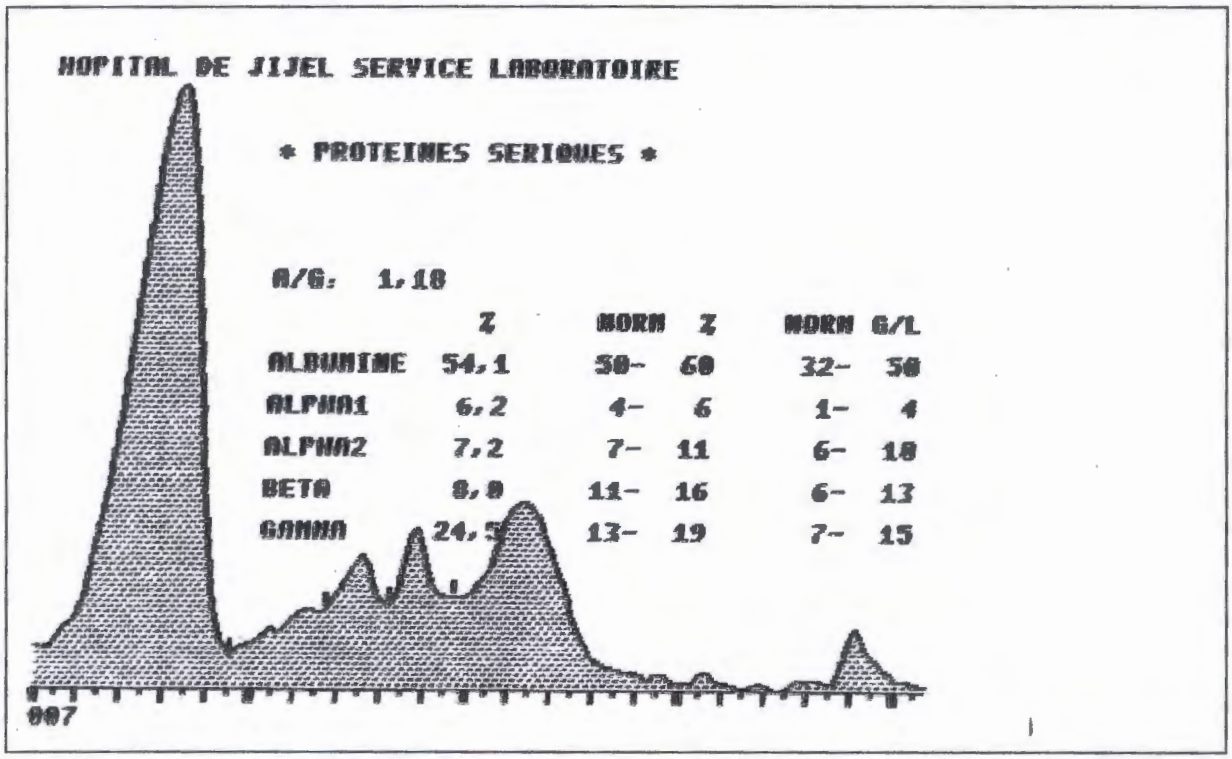
أظهرت الهجرة الكهربائية على ورق أسيتات السليلوز الموضحة بالفقرة (I-1-3-3) أشرطة مماثلة لتلك الخاصة بـ IgG المصل A و الموضحة بالشكل (8 ، 9) .



6 5 4 3 2 1

رقم 1 :البلازما B
رقم2 : المصل A
رقم3: محلول IgG للبلازما B
رقم 4 : محلول IgG للبلازما A
رقم 5 : محلولIgG للمصل A
رقم 6 : محلولIgG للمصلB

الشكل 8: نتائج الهجرة الكهربائية على ورق أسيتات السليلوز



الشكل 9 : المنحنى العياري لتركيز بروتينات المصل A

يبدو من خلال هذا الشكل أن الـ IgG هو الذي يظهر في الأخير، و عليه فهو الذي يهاجر أولا و يظهر في الصورة الموضحة بالشكل 8 على ورقة أسيتات السليلوز كشريط في الأعلى .

III- المناقشة:

من خلال العمل الذي قمنا به في دراستنا والذي يهدف إلى فصل الـ IgGعن باقي بروتينات المصل والبلازما .

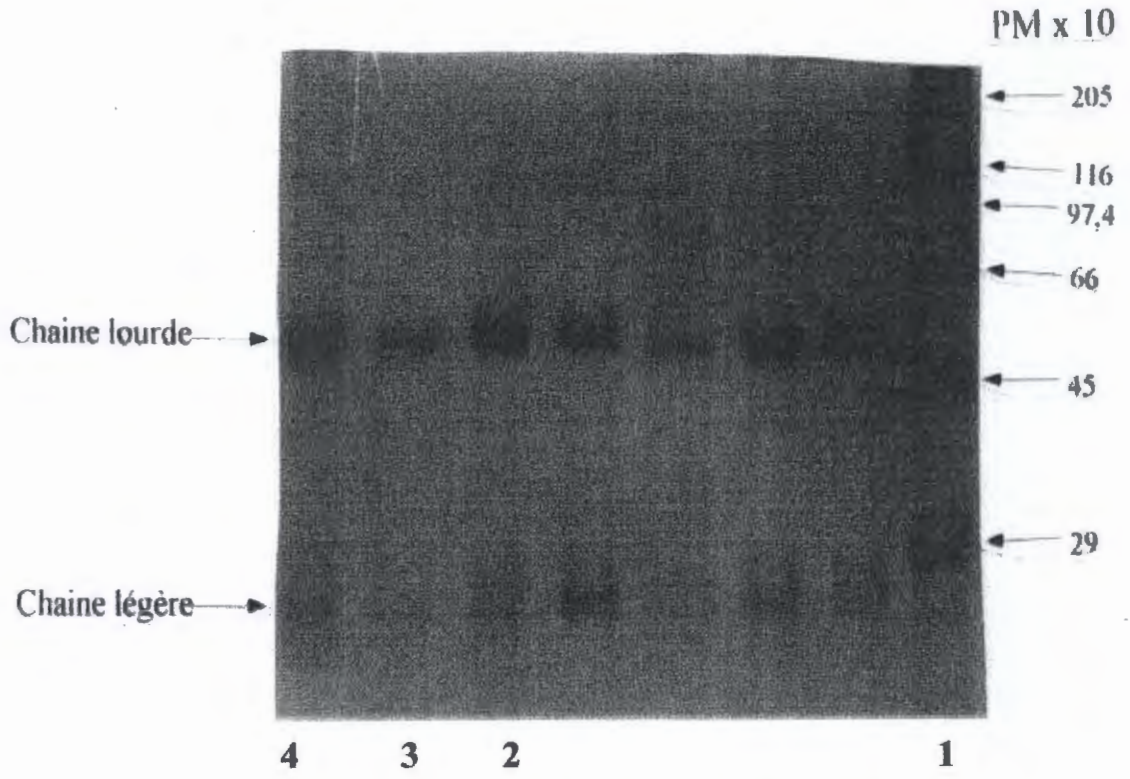
تحصلنا على نتائج وضحت الوجود الفعلي للـ IgG الذي كان بكمية قدرت بـ :

15.086 مع / 10 مل بالنسبة للمصل A ، 15.937 مع / 10 مل بالنسبة للمصل B ، 16.008 مع/10 مل بالنسبة للبلازما A ، 14.949 مع / 10 مل بالنسبة للبلازما B ، كما أوضحها التقدير البروتيني حسب طريقة MACART (1986) .

لتأكيد وجود هذا النوع من البروتينات قمنا بالفصل الكهربائي على أسيتات السليلوز والتي أعطت أشرطة للعينات المنقاة مقابلة لتلك الخاصة بـ IgG المصل ، ونظرا لغياب الـ PEG الذي يعمل على تركيز الـ IgG وكذالك لساسية الجهاز لم تتم قراءة نتائج العينات .

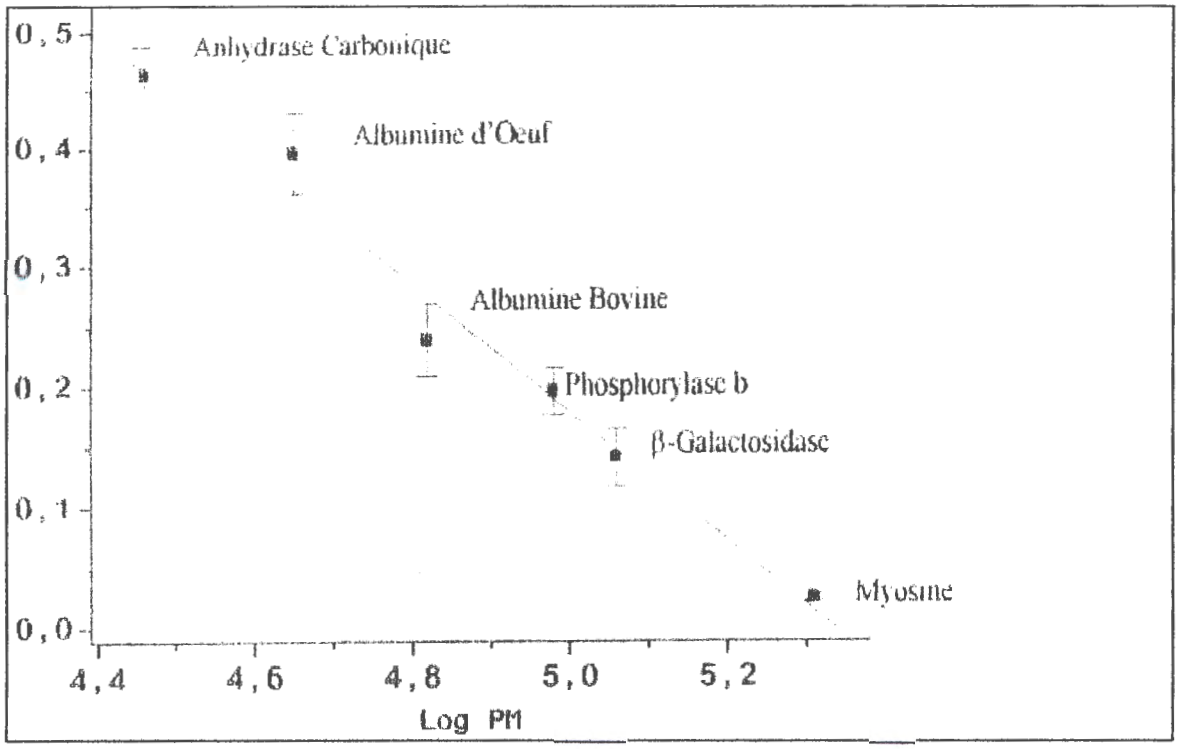
تطبق عموما طريقة الترسيب هذه على المصل ، وما أظفناه هو تطبيقها على البلازما ، مما أعطى نتائج مماثلة ، وعليه نقول أننا نستطيع إستخلاص الـ IgG أيضا إنطلاقا من البلازما .

دعمت أعمالنا بأعمال أنجزة بجامعة سطيف على مصل أرنب (جليلي ، 1998) ، التي قامت بإثبات هذا النوع من البروتينات بالهجرة الكهربائية على هلام الأكريلاميد SDS-PAG كما هو موضح بالفقرة (I-1-3-4) ، وكما يوضح ذالك في الشكل 10 .



IgG المعزولة من المصل بتقنية الترسيب : الأرقام 2-3-4 تمثل IgGالمصل .
الرقم 1 : الشاهد

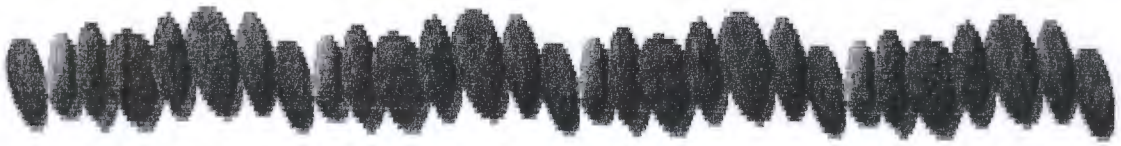
الشكل 10: نتائج الهجرة الكهربائية على هلام الأكريلاميد SDS-PAGE على مصل أرنب



الشكل 11 : المنحنى العياري لتحديد الوزن الجزيئي للبروتينات (n= 4)

يتم تحديد الوزن الجزيئي للسلاسل الثقيلة والخفيفة حسب ما هو موضح في الفقرة(I-1-3-5)

و حسب المنحنى الموضح بالشكل 11 .



الخاتمة

الخاتـــــمة :

من خلال النتائج التي تحصلنا عليها في عملنا المخبري تمكنا من تنقية الـ IgG من مصل و بلازما الإنسان والحصول على محلول الـ IgG منقى عن طريق الترسيب بالأملاح ثم عملية الميز .

و قد دعمت هذه النتائج بواسطة تقنية الهجرة الكهربائية على ورق أسيتات السليلوز حيث تحصلنا على أشرطة الـ IgG في العينات المنقاة مقابلة لتلك الخاصة بـ IgG المصل .

كما دعمت نتائجنا بتقنية الهجرة الكهربائية على هلام متعدد الأكريلاميد SDS- PAGE التي أنجزت بجامعة سطيف على مصل أرنب (جليلي ، 1998) ، التي أثبتت وجود هذا النوع من البروتينات .

و كخلاصة عامة فإن تقنية الترسيب بالأملاح هي تقنية فعالة وسهلة لتنقية هذا البروتين .

المراجع

المراجع:

(1) A .paraf – G.peltre,(1995),- immuno-analyses pour l'agriculture et l'alimentation , 2édition,masson, page : 54-57.

(2) Benboubetra. M,(1989),- characterization and significance of human antibodies to bovine milk fat globule membrane. PH. D. thesis university of batch. UK.

(3) Davies- D.R-Metzger-H,(1983),- structural basis antibody function ,edition medical international, page:84.

(4) Djelili.H,(1992),- etude de la xanthine oxydoreductase et des anticorps anti-xanthine oxydoreductase, thése de magister, université de FERHAT ABBAS.

(5) Eli. Benjamini, G.Sunshine,(1990),- immunology ; a short course, masson,page :80.

(6) Francis. Rouessac-Annick .Rouessac,(1997),- Analyse chimique –méthodes et techniques instrumentales modernes ,3 édition, masson , page :5.

(7) Francis. Rouessac-Annick .Rouessac,(2000),- Analyse chimique –méthodes et techniques instrumentales modernes,5 édition, masson, page :25-75.

(8)G.Mahuzier –M.Hamon –D.Ferrier-P.Prognon ,(1999),-chimie analytique –méthodes de séparation , 3 édition, tome 2,masson, page :211-224.

(9)Gerd.Rudiger Burmester- Antonio.Pezzutto,(2003),- atlas de poche d'immunologie , Flammrion-médecine-sciences, page :26-30.

(10) Hocine.Rabhi,(1990),-immunologie générale, office de publications universitaire, page :45-50.

(11) I.M. Roitt, (1979),- immunologie- mécanisemes essentielles,2 édition, blackwell scientific publication, page :50.

(12)Ivan.M.Roitt,(1990),- immunologie,3 édition ,édition pradel, page :40.

(13) I.Roitt-J.Brostoff-D.Male,(2002),- immunologie, 3édition , édition de Boeck université,page :65-423.

(14) Jacques.Charlemagne ,(1989),- le système immunitaire ,Hermann- éditeurs des sciences et des arts –méthodes , page :74-75.

(15)Jane.Way-Travers,(1997),- immunologie ,2édition , de Boeck université, page :113-357.

(16)N.Genetet,(1997),- immunologie ,collection biologie médicale ,3édition ,éditions médicales internationales,page :36-38.

(17)Paul.Pierre Pastort –Andre,(1990),- immunologie animal ,3édition ,Flammarion – médecine –sciences, page :86-102.

(18)P. Letonturier,(1998),- immunologie générale ,6 édition, masson, page :53-60.

(19) P. Letonturier ,(2001),- immunologie générale ,7 édition, masson , page :62-65.

(20) Seidnan-J.G and Coll,(1978),-the rearrangement and arrangement of antibody, masson, page:110-112.

(21) T.Bouchagra,(1990),- analyse instrumentale en biochimie, office des publications universitaire, page :1.

مواقع الإنترنت:

(22) www.snr.jussieu.fr/ bmedia/ lafont/ dosages/ D_3. html.
(23) www.biochimie.univ.montp2.fr / deug/chromato/krm4.htm.
(24) www.snr.jussieu.fr / bmedia/ lafont/ chromato/ A62.html.
(25) www.cea-scan / inserts/franceinst.htm.
(26) www.labo.medipole.free.fr / medip/ Ig.htm.
(27) www.membres.lycos.fr /immunologie/ phage.html.
(28) www.arp-fr.org /actualit%E9/13jARPCR.htm.

التقديم من طرف : أعلامة نصيرة- مواس عبد العزيز- مريخي محمد. تاريخ المناقشة : 2004/09/.

تنقية الغلوبيلينات المناعيةG من مصل وبلازما الإنسان

الملخص:

الغلوبيلينات المناعية G عبارة عن بروتينات سكرية يتم إنتاجها من طرف خلايا مختصة تدعى بالخلايا اللمفاوية B ، تملك هذه الغلوبيلينات عدة وظائف من بينها تنشيط المتممة والخلايا البلعمية كما أن لها عدة تطبيقات كاستعمالها في التقنية الكروماتوغرافية وفي العلاج كإعطائها بالحقن الوريدي في حالات خاصة من الأمراض، و في التحاليل البيولوجية .

يتم فصل هذا النوع من البروتينات باستعمال طرق عديدة من بينها الطرق الكروماتوغرافية ، ككروماتوغرافيا الشراهة ، التبادل الأيوني ، الطرد الجزيئي ، كما تفصل بالترسيب بالأملاح كما لاحظناه في هذه الدراسة، حيث أعطت الطريقة كمية الـ IgG قدرت بـ 15.086 ملغ / 10 مل بالنسبة للمصل A ، 15.937 ملغ / 10 مل بالنسبة للمصل B ، 16.008 ملغ / 10 مل بالنسبة للبلازما A ، 14.949 ملغ/ 10 مل بالنسبة للبلازما B .

أثبتت الهجرة الكهربائية على ورق أسيتات السليلوز الوجود الفعلي لهذا البروتين، كما دعمت الدراسة بتقنية الهجرة الكهربائية على هلام متعدد الأكريلاميد التي أنجزت بسطيف على مصل الأرانب.

تأتي هذه الدراسة في إطار تشجيع هذه الأنواع من البحوث التي تعتمد على تقنيات سهلة.

Résumer :

Immunoglobuline G est un protéine sucré, produit par des cellules spécialisés nommés cellule lymphocyte B, ces globulines possèdent beaucoup de fonction, parmi ces fonctions l'activation du complément et les cellules phagocytes, ainsi son utilisation dans la technique de chromatographie, et comme traitement par des injections de la veine dans des cas spéciale de maladie, et dans des l'analyses biologiques.

Pour la séparation de ce genre de protéine, en utilisant plusicurs méthodes, parmis celles les méthodes chromatographiques ; chromatographie d'affinité, échangeuse d'ions, chromatographie d'exclusion stérique .Elle peut être séparer par la précipitation avec les sels, comme on la remarqué dans notre étude, et où on a obtenue 15.086 mg/10ml pour sérum A, 15.937 mg/10ml pour sérum B, 16.008mg/10ml pour plasma A, 14.949mg/10ml pour plasma B.

L'électrophorèse sur l'acétate de cellulose a prouvé l'existence réelle de ce genre.

Cette étude entre dans le cadre des encouragements des recherches daus ce domaine qui se basent sur des techniques faciles.

Summary :

Immunoglobulin G is some sugary proteins, produced by the specialised cells named B lymph cells, this kind has many function, as activation of complement and phagocytes, as well as several applications as its utilisation in technic of chromatography, and as treatment while serving it as injection of the vein in the special cases of illness, and can be used in the biologic analyses.

The separation of this kind of protein involve several chromatographic methods as , chromatography of affinity, ion exchange chromatography , chromatography of exclusion, It can be separated by precipitation by salls as one there noticed in our study. This study gives a quantity of IgG reached 15.086 mg / 10 ml from A serum , 15.937 mg / 10 ml from B serum , 16.008mg / 10 ml from A plasma , 14.949 mg / 10ml from B plasma .

The electrophoresis on the acetate of cellulose has proved the real existence of this kind. This study was renforced by the technic of electrophoresis on polaccrylamide gel that has been performed in setif on serum of rabbits .

This study comes in order to encouraging the research of this kind that bases it self on easy technic .

الكلمات المفتاحية :

الغلوبيلينات المناعية G، الخلاياالمفاوية B، المتممة، الخلايا البلعمية، الكروماتوغرافيا، ورق أسيتات السليلوز، هلام متعدد الأكريلاميد .