इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय
विज्ञान विद्यापीठ

BZYEL-142
प्रतिरक्षा विज्ञान : प्रयोगशाला

अभ्यासों की सूची

1. स्लाइडों/चित्रों के माध्यम से थाइमस, प्लीहा और लसीका पर्व का ऊतकीय अध्ययन 7
2. विभेदित ल्यूकोसाइट गणना (**DLC**) का अध्ययन करने के लिए अभिरंजित रुधिर फिल्म की निर्मिति 16
3. ऑक्टरलोनी दोहरी प्रतिरक्षा–विसरण विधि 25
4. **ABO** रक्त समूह निर्धारण 33
5. फार्म नस्ल पशुओं/कोशिका वंशों के प्लीहाणुओं की कोशिका गणना और जीवन क्षमता का परीक्षण 38
6. एंजाइम सहलग्न प्रतिरक्षा शोषक आमापन (**ELISA**) 46
7. प्रतिरक्षी वैद्युतकण संचलन का प्रदर्शन 55
8. बिन्दु एलाइज़ा (**DOT-ELISA**) 60

कार्यक्रम अभिकल्प समिति

प्रो. एम. एस. नाथावत
पूर्व निदेशक, विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू, नई दिल्ली–110068

प्रो. प्रतिमा रे
जामिया मिलिया विश्वविद्यालय, दिल्ली–110062

प्रो. सरिता सचदेवा
मानव रचना इंटरनेशनल इंस्ट्टीटयूट ऑफ रिसर्च एन्ड स्ट्डीज,
फरीदाबाद, हरियाणा–121004

डॉ. इन्द्रकान्त के. सिंह
देशबन्धु कॉलेज, दिल्ली विश्वविद्यालय, कालका जी
नई दिल्ली–110019

प्रो. नीरा कपूर
विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू, नई दिल्ली–110068

प्रो. बानो सैदुल्लाह (सेवानिवृत्त)
विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू, नई दिल्ली–110068

डॉ. स्वाति ओमन्वार
पूर्व परामर्शदाता, विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू
नई दिल्ली–110068

खंड निर्माण दल

डॉ. शिवानी जी वरमानी
भास्कराचार्य कॉलेज, ऑफ एप्लाइड साइंसेज़, द्वारका, दिल्ली
विश्वविद्यालय (अभ्यास 1)

प्रो. सरिता सचदेवा
मानव रचना इंटरनेशनल इंस्ट्टीटयूट ऑफ रिसर्च एन्ड स्ट्डीज
फरीदाबाद, हरियाणा–121004 (अभ्यास 2 और 4)

डॉ. इन्द्रकान्त के. सिंह
देशबन्धु कॉलेज, दिल्ली विश्वविद्यालय, कालका जी
नई दिल्ली–110019 (अभ्यास 3, 5, 6, 7 और 8)

डॉ. मोजै रिन्चुई एन.
देशबन्धु कॉलेज, दिल्ली विश्वविद्यालय, कॉलका जी
नई दिल्ली–110019 (अभ्यास 3, 5, 6, 7 और 8)

हिन्दी अनुवाद, विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

प्रो. नीरा कपूर (अभ्यास 1 से 8 तक)

डॉ. निशा सोगन, परामर्शदाता (अभ्यास 1 से 8 तक)

अनुवादक : डॉ. विवेक शर्मा
प्रवक्ता, जन्तु विभाग, एम डी एस यूनिवर्सिटी, अजमेर
राजस्थान–305009

पाठ्यक्रम समन्वियका : प्रो. नीरा कपूर

पाठ्यक्रम संयोजक : प्रो. के.सी.पाण्डेय
वैज्ञानिक 'F', एन.आई.एम.आर. (आई सी एम आर), सैक्टर–7
द्वारका, नई दिल्ली–110077

सामग्री निर्माण

श्री हेमन्त कुमार
एस.ओ. (पी.), एमपीडीडी, इग्नू

आभार :

- प्रो. नीरा कपूर और श्री अजीत कुमार चित्र और आवरण पृष्ठ के लिए सुझाव।
- श्री विकास कुमार, खंड की सीआरसी बनाने के लिए।

सितम्बर, 2021

© इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय, 2021

ISBN: .....

सर्वाधिकार सुरक्षित। इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय की लिखित अनुमति के बिना इस पुस्तक के किसी भी अंश को मिमियोग्राफ अथवा किसी अन्य साधन द्वारा पुनः प्रस्तुत करने की अनुमति नहीं है।

इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय के पाठ्यक्रमों के विषय में अधिक जानकारी विश्वविद्यालय के मैदान गढ़ी, नई दिल्ली स्थित कार्यालय और इग्नू वेब साइट www.ignou.ac.in से प्राप्त की जा सकती है।

इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय की ओर से कुलसचिव सामग्री निर्माण एवं वितरण प्रभाग द्वारा मुद्रित एवं प्रकाशित।

मैसर्स :

प्रतिरक्षा विज्ञानः प्रयोगशाला

यह प्रयोगशाला पाठ्यक्रम प्रतिरक्षा विज्ञान के सैद्धांतिक पाठ्यक्रम जो 4 क्रेडित का है, पर आधारित हैं। यह कार्यक्रम 2 क्रेडिट का है।

इस पाठ्यक्रम का समग्र उद्देश्य जीव विज्ञान के छात्रों को प्रयोग के माध्यम से प्रतिरक्षा विज्ञान संबंधित प्रश्नों को हल करने का अनुभव देना है।

प्रतिरक्षा प्रयोगशाला पाठ्यक्रम छात्रों को प्रमुख विषय विशिष्ट तकनीकों जैसे ऑक्टरलोनी की दोहरी–प्रतिरक्षा विसरण विधि (Ouchterlony's Double Immune Diffusion Method) से अवगत कराएगा। सुचारू रूप से अभिकल्पित किए गए प्रयोगशालात्मक प्रयोग जो प्रयोगिक अभिकल्पना, डेटा विश्लेषण, और विज्ञान विशिष्ट संचार को विद्यार्थियों में शामिल करता है, पाठ्यक्रम साम्रगी को सुदृढ़ करता है, तथा छात्रों में वैज्ञानिक पद्धति के प्रति सराहना उत्पन्न करता है और संसूचना की योग्यता को बेहतर बनाता है।

कई निर्माताओं द्वारा किटों का उत्मादन किया जा रहा है जो विशेष रूप से शैक्षिक उपयोग के लिए बनाई जा रही है। इस प्रयोगशाला पाठ्यक्रम में किटों का उपयोग एलाइज़ा (ELISA) और वेर्स्टन ब्लॉट (Western Blot) के अभ्यासों में किया जाएगा।

वर्तमान प्रयोगशाला पाठ्यक्रम को किट के उपयोग, प्रायोगिक अनुभव, प्रमाणीकरण और स्लाइडों के अध्ययन के आधार पर 8 प्रयोगों में विभाजित किया गया है।

प्रयोग 1 में आप प्राथमिक और द्वितीयक लिम्फोइड (Lymphoid) अंग जैसे थाइमस, प्लीहा और लसीका पर्व का ऊतकीय अध्ययन करेगें।

प्रयोग 2 में आप रक्त आलेप की स्लाइड बनाएंगे और विभिन्न प्रकट की श्वेत रक्त कोशिकाओं जैसे इओसिनोफिल, बेसोफिल और न्यूट्रोफिल का अवलोकन करेंगे। जैल के आर पार प्रतिजन और प्रतिरक्षा के बीच परस्पर क्रिया द्वारा विसरण को प्रतिरक्षाविसरण कहा जाता है।

आप ऑक्टरलोनी के दोहरी विसरण विधि द्वारा विभिन्न प्रकार के प्रतिरक्षी के साथ एक प्रतिजन की प्रतिक्रिया के स्वरूप को तैयार करेंगे और उनका निरीक्षण करेंगे। जब लाल रक्त कोशिकाओं में एक या दो प्रतिजन समान प्रतिरक्षी के संम्पर्क में आते है तो वे परस्पर क्रिया कर सदृश्य समूहन बनाते है। प्रयोग 4 में आप रूधिर ABO वर्ग का निर्धारण करने के लिए स्लाइड बनाएंगे।

प्रयोगार्थी पाँचवें प्रयोग में निलंबन में मौजूद जीवनक्षम कोशिकाओं को लसीकाभ ऊतको द्वारा तैयार करेंगे। यह आपको मृत और जीवित कोशिकाओं में अंतर करने में भी सक्षम करेगा। छात्रों को प्रयोग 6 में हॉर्मोन, पेप्टाइड, प्रोटीन और प्रतिजन का पता लगाने और प्रमापीकरण करने के लिए एलाइज़ा तकनीक को प्रदर्शित किया जाएगा।

प्रयोग 7 में आप को प्रोटीन और प्रतिरक्षी के मिश्रण को पृथक करने और उनकी विशेषताओं के चित्रण को प्रतिरक्षा वैदयुत कण संचलन (Immuno Electro Phoresis) द्वारा प्रदर्शित किया जाएगा।

प्रयोग 8 में आप बिंदु (DOT) एलाइज़ा किट का उपयोग कर प्रतिदर्श में उपस्थित प्रतिजन का पता लगाएँगे।

आपको यह परामर्श दिया जाता है कि आप प्रत्येक सिद्धांत को अच्छी तरह से समझे क्योंकि इससे आपको प्रयोगशाला में काम करने में आसानी होगी, आपकी रुचि जागृत होगी और अभ्यास करने में प्रोत्साहन मिलेगा। आप प्रयोगशाला में काम करते हुए सावधान रहें, इसलिए हर अभ्यास के साथ दी हुई सावधानियाँ बरतिए।

इं.गां.रा.मु.वि. के अन्य सभी प्रयोगशाला पाठ्यक्रमों की भांति यह पाठ्यक्रम भी एक गहन आवासीय अभ्यास है जिसे पूरा करने में एक सप्ताह लगेगा। प्रति दिन चार–चार घंटे के दो प्रयोगशाला सत्र होंगे। इस प्रकार कुल 14 सत्र बनेंगे। पहला सत्र परिचयात्मक होगा तथा शेष 2 से लेकर 12 वें तक के सत्र पाठ्यक्रम में दिए गए अभ्यासों पर आधारित होंगे। प्रयोगशाला अभ्यासों की कार्य–योजना आपको सत्र में ही दे दी जाएगी। सत्र 1 से 12 शैक्षिक परामर्शदाता के निर्देशन में किए जाने वाले अभ्यास होंगे। प्रत्येक सत्र में आप तीन घंटों में अभ्यास करेंगे तथा शेष एक घंटा अपनी प्रयोगशाला नोट–बुक को पूरा करने के लिए होगा। अंतिम दो सत्र यानी 13 और 14 अनिर्देशित सत्र होंगे जिनमें सत्रांत परीक्षा होगी।

जैसा कि आपको मालूम ही होगा प्रयोगशाला निश्चित समय के लिए ही उपलब्ध होती है, अतः ज़रूरी है कि आप से कोई भी प्रयोगशाला सत्र छूट न जाए।

आपके कार्य का प्रतिदिन मूल्यांकन किया जाएगा और अंतिम दिन आपकी सत्रांत परीक्षा ली जाएगी। इस परीक्षा में आपको उत्तीर्ण होना अनिवार्य होगा।

अध्ययन निर्देशिका

1. प्रयोगशाला में अभ्यास शुरू करने के पूर्व, आप प्रतिरक्षा विज्ञान के सैद्धांतिक घटकों का BZYET-141 में अच्छी तरह से अध्ययन कर लीजिए।

2. अभ्यास आरम्भ करने से पहले आप को प्रयोगशाला पुस्तिका को अवश्य पढ़ना चाहिए और महत्त्वपूर्ण चरणों पर निशान लगा देने चाहिए।

3. प्रयोगशाला में अपने साथ अपनी प्रयोगशाला–पुस्तिका और एक रिकार्ड–बुक को ले जाना न भूले ताकि आपने जो कुछ देखा और किया उसे उसमें नोट किया जा सके।

स्लाइडों का अध्ययन

1. सूक्ष्मदर्शी के नीचे स्थायी स्लाइडों का अध्ययन करते समय पहले उसे निम्न आवर्धन ("लो–पावर") में फ़ोकस करें और जब आप किसी संरचना विशेष को जिसका आप अध्ययन करना चाहते हैं, फ़ोकस कर चुकें हो, उसके बाद ही उसे उच्च आवर्धन ("हाइ–पावर") में बदलें। शुरू में या जब भी आपको स्लाइड फ़ोकस करने में कठिनाई हो तो अपने परामर्शदाता से सहायता मांगने में संकोच न करें।

2. आरेख को स्लाइड से ही देखकर बनाइए। विस्तृत संरचना तथा नामांकन के लिए अपनी प्रयोगशाला पुस्तिका से सहायता अवश्य ले सकते हैं।

3. जब भी किसी सम्पूर्ण प्राणी का माऊण्ट दिया गया हो तो उसका वर्गीकरण अवश्य लिखें।

उद्देश्य

इस पाठ्यक्रम को पूरा करे के बाद आप इस योग्य हो जाएंगे कि :

- लसीकाभ अंगो जैसे थाइमस, प्लीहा और लसीका पर्व में विभिन्न कोशिकाओं के संगठन और औतिकी (histology) का वर्णन कर सकें;

- थाइमस, प्लीहा और लसीका पर्व में प्रतिरक्षा कोशिकाओं के कार्यात्मक अन्योन्यक्रिया की सराहना कर सकें;

- इन लसीकाभ अंगों में होने वाली प्रतिरक्षा कार्यों से संबंधित कोशिकीय प्रक्रियाओं की पहचान कर सकें;

- रुधिर आलेप तैयार कर सकें;
- विभिन्न प्रकार के WBCs अर्थात इओसिनोफिल (इओसिनरागी), बेसोफिल (क्षारकरागी), न्यूट्रोफिल (उदासीनरंजी), लिम्फोसाइट्स (लसीकाणु) और मोनोसाइट्स (एककेंद्रकाणु) की जांच कर सकें;
- विभिन्न प्रकार के WBCs की संरचना और कार्य पर चर्चा कर सकें;
- किसी प्रतिजन के साथ विभिन्न प्रतिरक्षियों की अभिक्रिया प्रतिरूप का वर्णन कर सकें;
- ऑक्टरलोनी दोहरी प्रतिरक्षा–विसरण विधि द्वारा प्रतिजन–प्रतिरक्षी अवक्षेपण का निर्धारण कर सकें।;
- रक्त वर्ग निर्धारण के लिए स्लाइड बना सकें;
- समूहन अभिक्रिया के सिद्धांत का वर्णन कर सकें;
- लसीकाभ अंगों से कोशिका निलंबन तैयार कर सकें;
- जीवित कोशिकाओं और मृत कोशिकाओं में विभेदन कर सकें;
- एलाइज़ा के सिद्धांत और प्रतिरक्षा–प्रमाणीकरण तकनीक का वर्णन कर सकें;
- पेप्टाइड, प्रोटीन, प्रतिरक्षी और हॉर्मोन का पता लगा सकें और मात्रा निर्धारित कर सकें;
- प्रोटीन/प्रतिजन के मिश्रण को अलग कर सकें और उसके अभिलक्षणन कर सकें;
- प्रतिजन–प्रतिरक्षी अन्योन्यक्रियाओं की विशिष्टता का वर्णन कर सकें;
- बिंदु एलाइज़ा किट का उपयोग कर सकें; और
- बिंदु एलाइज़ा तकनीक के सिद्धांत का विवरण दे सकें।

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

अभ्यास 1

स्लाइडों/चित्रों के माध्यम से थाइमस, प्लीहा और लसीका पर्व का ऊतकीय अध्ययन

रूपरेखा

1.1 प्रस्तावना
उद्देश्य
1.2 आवश्यक सामग्री
1.3 थाइमस
1.4 प्लीहा
1.5 लसीका पर्व
1.6 अंत में कुछ प्रश्न

1.1 प्रस्तावना

हमारा प्रतिरक्षा तंत्र कोशिकाओं, ऊतकों और अंगों का एक जटिल जाल है, जो शरीर को संक्रमण और बीमारियों से लड़ने में सहायता करता है। इन अंगों को **प्राथमिक** और **द्वितीयक** लसीकाभ अंगों में विभाजित किया जा सकता है। प्राथमिक लसीकाभ अंग, लसीकाणुओं के विकास और परिपक्वता के स्थान हैं। दो प्रमुख प्राथमिक लसीकाभ अंग, अस्थि मज्जा और थाइमस हैं। द्वितीयक लसीकाभ अंग ऐसे स्थल होते हैं जहां प्रतिजन लसीकाणुओं के लिए प्रगृहीत हो जाते हैं, ताकि इन प्रगृहीत प्रतिजनो के साथ प्रभावी ढंग से अन्योन्यक्रिया कर सकें और प्रतिरक्षा अनुक्रिया उत्पन्न कर सकें। इन अंगों में लसीका पर्व, प्लीहा, और विभिन्न **श्लेष्मीय** सम्बंधित लसीकाभ ऊतक (MALT, Mucosal associated lymphoid tissue) शामिल हैं : रक्त वाहिकाएँ और लसीका तंत्र जो इन अंगों को आपस में जोड़ते हैं जिससे यह एक पूर्ण तंत्र के रूप में कार्य कर सके।

उद्देश्य

इस अभ्यास के अंत में, आप इस योग्य हो जाएगें कि :

- लसीकाभ अंगो जैसे थाइमस, प्लीहा और लसीका पर्व में विभिन्न कोशिकाओं के संगठन और औतिकी (histology) का वर्णन कर सकें;
- थाइमस, प्लीहा और लसीका पर्व में प्रतिरक्षा कोशिकाओं के कार्यात्मक अन्योन्यक्रिया की सराहना कर सकें; और
- इन लसीकाभ अंगों में होने वाली प्रतिरक्षा कार्यों से संबंधित कोशिकीय प्रक्रियाओं की पहचान कर सकें।

1.2 आवश्यक सामग्री

- संयुक्त सूक्ष्मदर्शी।
- थाइमस, प्लीहा और लसीका पर्वों की तैयार ऊतकीय स्लाइडें/चित्र।

1.3 थाइमस

थाइमस एक चपटा, द्विपालिक अंग है, जो हृदय के ठीक ऊपर स्थित होता है। थाइमस एक सम्पुटित प्राथमिक लसीकाभ अंग है, जहां T कोशिका का विकास और परिपक्वन होता है। यह दो पालियो से बना होता है जो एक इस्थमस कि सहायता से जुड़ी रहती हैं। थाइमस ऊतकीय रूप से पालिकाओं में विभाजित होता है, जिनमें से प्रत्येक में एक केंद्रीय **मज्जा** और एक परिधीय **वल्कुट** होता है। प्रत्येक पाली को पालिकाओं में विभाजित किया जाता है, जो **सम्बन्धक** (trabeculae) नामक संयोजी ऊतक रज्जुक (strand) द्वारा विभाजित रहते हैं।

साइटोकाइन्स छोटे प्रोटीनों की व्यापक श्रेणी है जिसका महत्त्व कोशिका संकेतन में हैं। साइटोकाइन्स कोशिकाद्रव्य में प्रवेश करने के लिए कोशिका के लिपिड की दोहरी परत को पार नहीं कर सकते।

थाइमस का वल्कुट, थायमोसाइट्स (T लसीकाणुओं की पूर्वगामी कोशिकाओं) से सघन रूप से भरा होता है, जबकि मज्जा में थाइमोसाइट्स की बहुत कम सँख्या उपस्थित होती है। वल्कुट में जालीदार उपकला कोशिकाओं, वृहतभक्षकाणु और रक्त वाहिकाओं का जाल भी उपस्थित होता है। थायमोसाइट के विकास के प्रारंभिक चरण, जिसके दौरान ग्राही जीन का पुनर्विन्यास होता है। वल्कुट में उपस्थित T कोशिकाओं की सतह पर।

एक त्रि–आयामी पीठिका कोशिका जाल, जो कि उपकला कोशिकाओं, द्रूमिका कोशिकाओं और वृहतभक्षकाणुओ से मिलकर अंग संरचना बनाते हैं और थाइमोसाइट्स की वृद्धि और परिपक्वन में योगदान करते हैं, थाइमस वल्कुट और मज्जा दोनों अंतर्वलित रहते हैं। इनमें से कई पीठिका कोशिकाएं, विकासशील थायमोसाइट्स के साथ शारीरिक रूप से अन्योन्यक्रिया करती हैं (चित्र 1.1)।

TSLP साइटोकाइन्स फैमिली से संबंधित एक प्रोटीन है। यह प्रतिजन प्रसंस्करण कोशिकाओं के सक्रियण के माध्यम से T कोशिकाओं समष्टि की परिपक्वता में एक महत्त्वपूर्ण भूमिका निभातें है।

बाहरी वल्कुट में, कुछ थाइमिक उपकला कोशिकाएं, जिन्हें **धात्री कोशिकाएं** (nurse cells) कहा जाता है, और जिनमें झिल्ली के लंबे विस्तार होते हैं, और लगभग 50 थाइमोसाइट्स होते हैं, आपस में मिलकर बड़े बहुकोशिकीय सम्मिश्रों का निर्माण करते हैं। अन्य वल्कुटीय उपकला कोशिकाओं के लंबे अंतःसंबंधित कोशिकाद्रव्यी उभार होते हैं जो एक जाल रुपी संरचना बनाते हैं, और विभिन्न थाइमोसाइट्स के साथ अन्योन्यक्रियाएं करते हैं क्योंकि यह वल्कुट के साथ अन्तःर्वलित रहते हैं ।

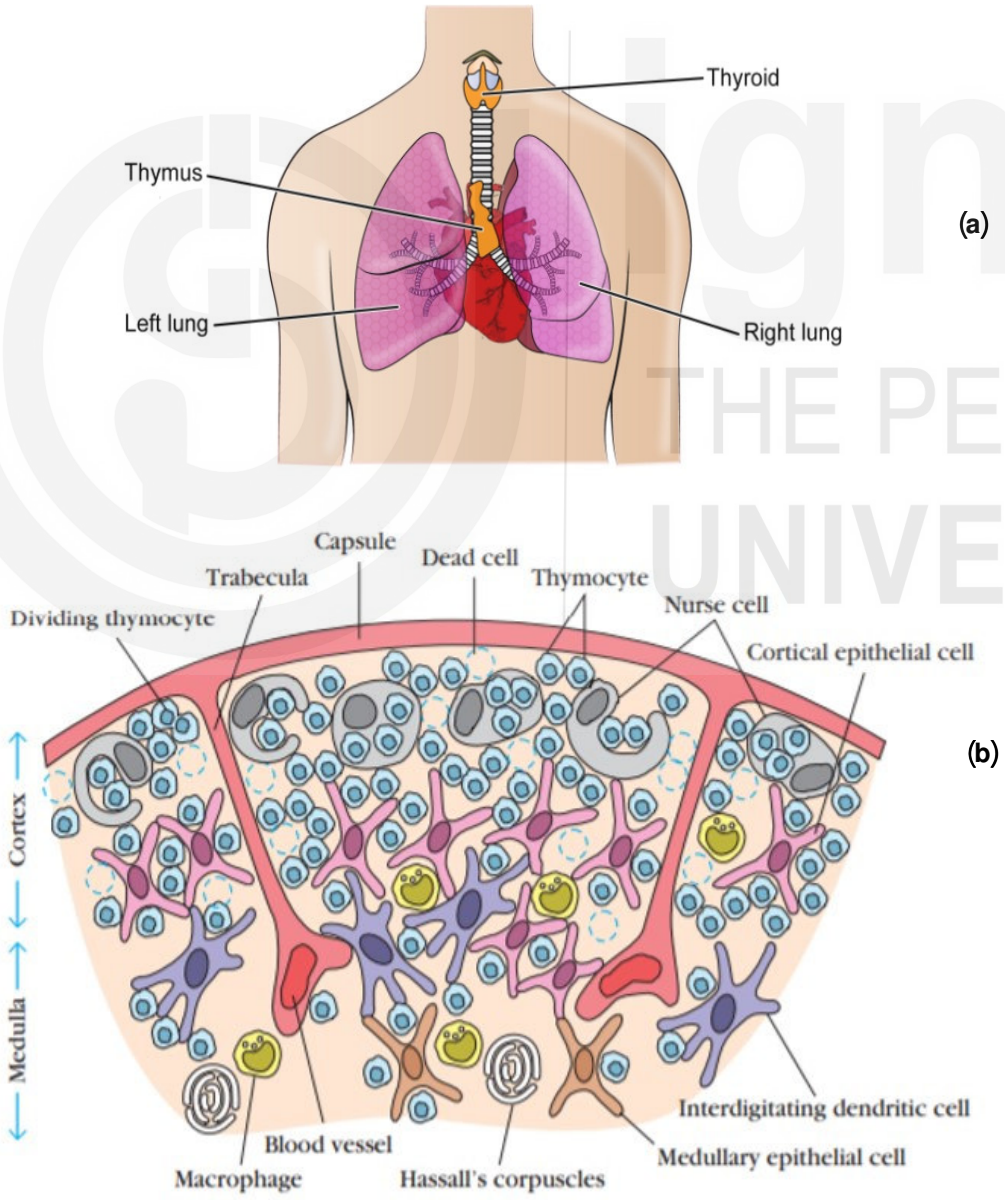
कम लसीकाणुओं और अधिक जालीदार उपकला कोशिकाओं, जैसे कि मज्जीय उपकला कोशिकाओं और अंतरागुलीयकृत द्रूमिका कोशिकाओं (inerdigitating dendritic cells) के साथ, मज्जीय क्षेत्र वल्कुटीय क्षेत्र से स्पष्ट रूप से भिन्न होता है। मज्जा में, कई संकेंद्रित पिंड मौजूद होते हैं जिन्हें हैसल कणिकाओं (Hassall's corpuscles) के नाम से जाना जाता है।

हैसल की कणिकाएं [या थाइमिक कणिकाएं (पिंड)] का नाम आर्थर हिल हैसल के नाम पर रखा गया है, जिन्होंने उन्हें 1846 में खोजा था। यह केंद्र में एक या अधिक दानेदार

कोशिकाओं से बने होते हैं, जो उपकला कोशिकाओं द्वारा घिरे होते हैं। वे आकार में भिन्न, लगभग 20 से 100 µm से अधिक व्यास के साथ भिन्न होते हैं, और आयु के बढ़ने के साथ बड़े होते जाते हैं। वे गोलाकार या अंडाकार हो सकते हैं और उनकी उपकला कोशिकाओं में किरेटोहायलीन और कोशिकाद्रव्यी रज्जुओं के बंडल होते हैं। कई अध्ययनों से संकेत मिलता है कि हैसल की कणिकाएं मज्जीय थाइमिक उपकला कोशिकाओं से विभेदित होती हैं।

हैसल की कणिकाओं का कार्य वर्तमान में स्पष्ट नहीं है। लेकिन वे साइटोकाइन TSLP (थाइमिक स्ट्रोमल लिम्फोपोइटिन) का एक प्रबल स्रोत हैं।

दूसरे वर्ष के अंत तक थाइमस आकार में तेजी से बढ़ती है, जिसके बाद इसकी वृद्धि धीमी होने लगती है, और 12–13 वर्ष की आयु में इसके आकार में कमी होने लगती है। बाद में, बुढ़ापे के दौरान, यह पूरी तरह से वसा कोशिकाओं और संयोजी ऊतक द्वारा प्रतिस्थापित कर दी जाती है।



चित्र 1.1 : a) थाइमस एक चपटा द्विपालिक अंग है जो हृदय के ठीक ऊपर स्थित है। b) थाइमस के अनुप्रस्थ काट का आरेखीय निरूपण।

थाइमस के कार्य

थाइमस की मुख्य भूमिका T कोशिकाओं के भंडार का उत्पादन और चयन करना है जो शरीर को संक्रमण से बचा सके। जैसे–जैसे थायमोसाइट्स बढ़ती है, एक यादृच्छिक प्रणाली जो प्रतिजन–MHC सम्मिश्रों को पहचानने में सक्षम ग्राही के साथ कुछ T–कोशिकाओं का उत्पादन करता है, T–कोशिका ग्राही की एक विशाल विविधता उत्पन्न करता है। इस यादृच्छिक विधि द्वारा गठित अधिकांश T–कोशिका ग्राही, हालांकि, प्रतिजन–MHC सम्मिश्रों को पहचानने में असमर्थ हैं, और एक छोटा हिस्सा स्व–प्रतिजन–MHC सम्मिश्र जटिल संयोजनों के साथ प्रतिक्रिया करता है। थाइमस उन T–कोशिकाओं की मृत्यु को प्रेरित करता है जो प्रतिजन–MHC के सम्मिश्रों को पहचानने में असमर्थ होती हैं।

यह उन T कोशिकाओं को भी मृत्यु के लिए प्रेरित करता है जो स्व–प्रतिजन–MHC पर प्रतिक्रिया करती हैं क्योंकि वे स्वप्रतिरक्षित रोग का खतरा उत्पन्न करती हैं। अतः इस प्रकार, थाइमस में सभी थाइमोसाइट्स की लगभग 95 प्रतिशत कोशिकाएं कभी भी परिपक्वता प्राप्त किए बिना, प्राकृतिक कोशिका मृत्यु द्वारा नष्ट हो जाती है। शेष लसीकाणु, विकास और परिपक्वन के पश्चात, आगे की कार्यवाही के लिए लसीका पर्व अथवा अन्य किसी लसीका ऊतकों में ले जाया जाता है। थाइमस में परिपक्व लसीकाणु को T–लसीकाणु के रूप में जाना जाता है, और यह विभिन्न विविध कोशिका–मध्यस्थ प्रतिरक्षा प्रतिक्रियाओं के लिए जिम्मेदार होती हैं। प्राथमिक लसीकाणु को T–लसीकाणु में बदलने में जालीदार उपकला कोशिकाओं से निकलने वाले थायमोसिन हॉर्मोन की भूमिका का संकेत देने वाले प्रमाण हैं।

1.4 प्लीहा

प्लीहा शरीर का सबसे बड़ा लसीकाभ अंग है। इसका आकार अंडाकार होता है, और यह ऊपरी बायीं ओर उदर गुहा में मध्यपट के नीचे और जठर के पीछे स्थित होता है (चित्र 1.2 a)। प्लीहा विशिष्ट कार्यो में योगदान देता हैं 1) रुधिर में उत्पन्न होने वाले प्रतिजनों के प्रति प्रतिरक्षा प्रतिक्रिया आयोजित करने में, 2) दोषपूर्ण लाल रुधिर कणिकाओं तथा बिम्बाणु (platelets) को परिसंचरण से बाहर करने में प्रमुख भूमिका निभाता है। यह आकार और कार्य में लसीका पर्व के समान होता है। हालांकि, लसीका पर्व के विपरीत, प्लीहा की लसीका वाहिकाओं द्वारा आपूर्ति नहीं की जाती है। इसके स्थान पर, रुधिरजनित प्रतिजनों और लिम्फोसाइटों को प्लीहा धमनी द्वारा प्लीहा में ले जाया जाता है। पेरिटोनियम के रूप में जानी जाने वाली एक सीरमी झिल्ली (serous membrane), नाभिका के क्षेत्र को छोड़कर प्लीहा को घेर लेती है। इसके नीचे संपुट उपस्थित होता है, जो कई प्रक्षेपणों (संबंधक) को आंतरिक भाग में फैलाता है। संपुट अधिकांश रूप से प्रत्यास्थ रेशो तथा कुछ चिकनी मांसपेशियों और पेशीतंतुकोराक से बना होता है।

दो प्रकार के कक्ष होते हैं, लाल मज्जा और श्वेत मज्जा, जो कि एक विस्तृत सीमांत क्षेत्र द्वारा विभाजित रहते हैं (चित्र 1.2)। प्लीहा के पीठिकीय ऊतकों में लाल मज्जा अधिकतर क्षेत्र में फैली होती हैं। यह बिलरोथ (Billroth) की छड़ो और प्लीहा कोटरक (sinusoids) से बना होता हैं, जो कि जालीदार संयोजी ऊतक द्वारा समर्थित कोशिकीय जाल होता हैं। वे धारियों के रूप में दिखाई देते हैं और वृहतभक्षकाणु, रुधिर कोशिकाओं और प्लाजमाणुओ से बने होते हैं। विभिन्न विषाक्त पदार्थों के लिए, लाल मज्जा एक

रुधिर निस्यन्दक के रूप में कार्य करता है, तथा उन्हें दैहिक परिसंचरण (Systemic criculation) में प्रवेश करने से पहले ही मार देता हैं, जो अन्यथा पूरे शरीर में फैल सकता है और अन्य अंगों को नुकसान पहुंचा सकता है। लाल मज्जा के भीतर कई वृहतभक्षकाणु में परिग्रहित लाल रुधिर कणिका अथवा हीमोग्लोबिन के नष्ट होने से बचे लौह वर्णक उपस्थित होते हैं।

प्लीहा सफेद मज्जा तीन अलग–अलग कक्षों का वहन करता हैः **पेरिआर्टेरियोलर लसीकाभ आच्छद** (PALS, periarteriolar lymphoid sheath), लसीका पुटक और सीमांत क्षेत्र। श्वेत प्लीहा मज्जा, प्लीहा धमनी की शाखाओं को घेरता है, जिससे एक पेरिआर्टेरियोलर लसीकाभ आच्छद (PALS) का निर्माण होता हैं, जो मुख्य रूप से T–लसीकाणु से भरा होता है। PALS से जुड़ी एक जननिक केंद्र युक्त प्राथमिक लसीकाभ पुटक होती हैं जो कि B–कोशिकाओं से समृद्ध होती हैं। PALS के परिधीय भाग में सीमान्त क्षेत्र होता हैं जो कि लसीकाणु और वृहदभक्षकाणु द्वारा समृद्ध होता हैं। प्लीहा धमनी के माध्यम से जो सीमांत क्षेत्र में खाली हो जाती है, रुधिर–जनित प्रतिजन और लसीकाणु प्लीहा में प्रवेश करते हैं (चित्र 1.2 b)।

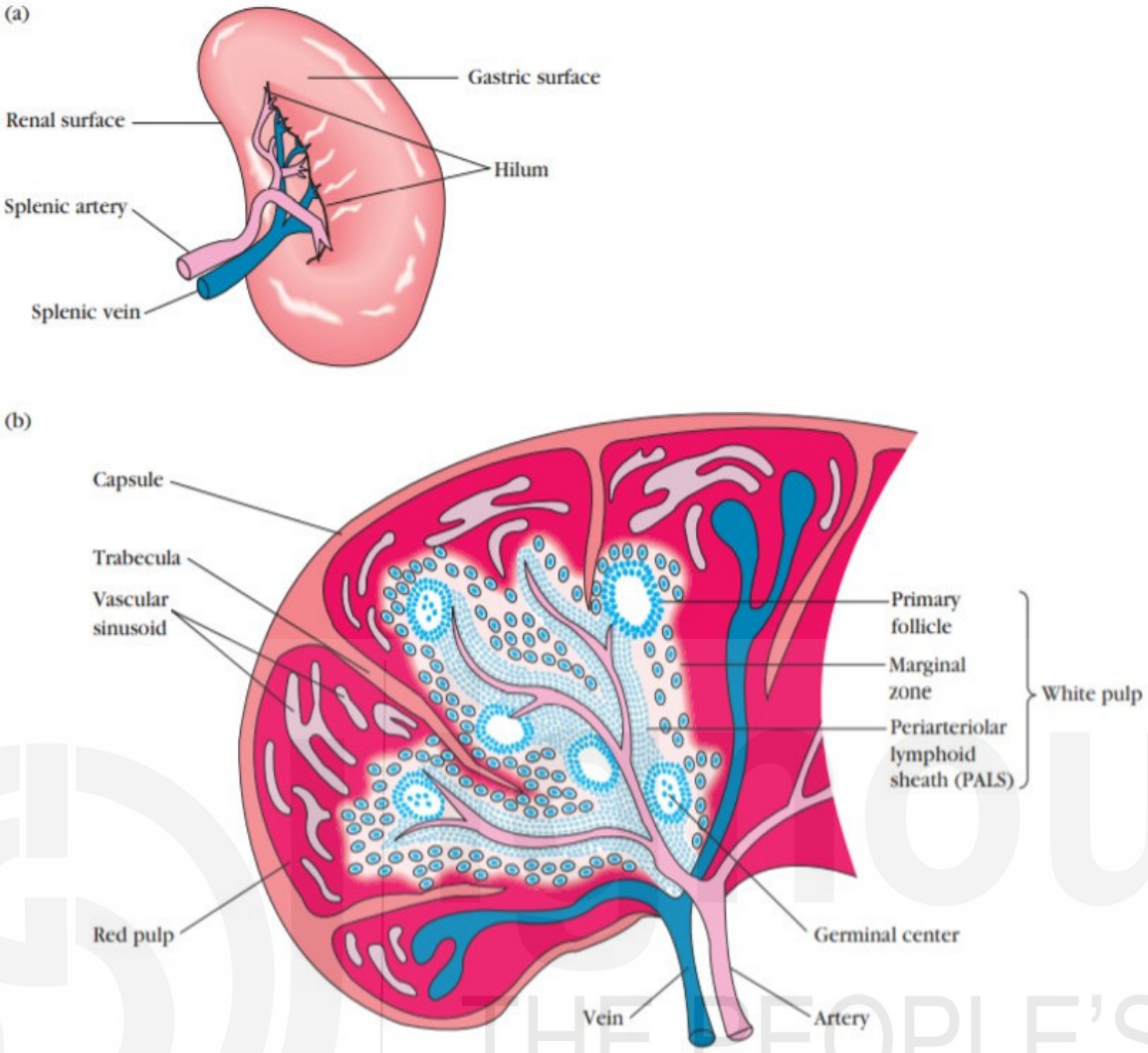
रुधिर में लसीकाणु सीमांत क्षेत्र के कोटर में प्रवेश करने के बाद, PALS में चले जाते हैं। B–कोशिकाओं की प्रारंभिक सक्रियता T–कोशिका समृद्ध PALS में होती है। सीमांत क्षेत्र में मौजूद अंतरागुलीयकृत द्रूमिका कोशिकाएं प्रतिजनो को पकड़ कर इन्हे कक्षा II MHC अणुओं के साथ T_H कोशिकाओं को उपलब्ध कराती हैं। ये T_H कोशिकाएं तब B–कोशिकाओं को सक्रिय करती हैं जो अंततः कुछ अन्य T_H कोशिकाओं के साथ सीमांत क्षेत्र में उपस्थित प्राथमिक पुटक में चली जाती हैं। प्रतिजनिक चुनौती पर, ये प्राथमिक पुटक विकसित होते हैं, और जनन केंद्रों वाले विशिष्ट द्वितीयक पुटकों में विकसित होते हैं, यह, वह स्थान है जहां लसीकाणु परिपक्व होते हैं, और प्रतिरक्षी का उत्पादन करने की क्षमता प्राप्त करते हैं।

प्लीहा के कार्य

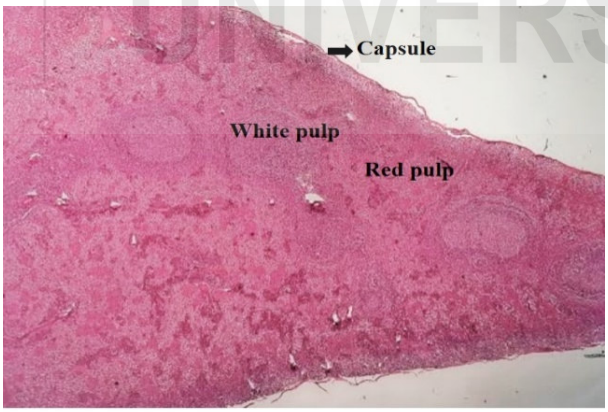
रुधिर का निस्यंदन प्लीहा के सबसे महत्वपूर्ण कार्यों में से एक है। चूंकि, यह पुरानी और कमजोर लाल रुधिर कणिकाओं को परिसंचरण से हटा देता है, इसलिए इसे **"लाल रुधिर कणिकाओं के लिए कब्रिस्तान"** के रूप में भी जाना जाता है। यह भूमिका प्रमुख रूप से लाल मज्जा जो रक्त वाहिका और वृहतभक्षकाणु में स्थित है, के विशिष्ट संघटन के कारण है। वृहतभक्षकाणु हीमोग्लोबीन की लाल रूधिर कणिकाओं का फेगोसाइटोस (Phagocytose) करते है और मारते है और फिर उनके लौह का पनुःचक्रण करते हैं। अंत में लौह (iron) अस्थि मज्जा में संसाधित होता है और पुनःप्रयोग होता है।

भ्रूण विकास के दौरान और अस्थि मज्जा के पूर्ण विकास से पहले प्लीहा रक्तोपादन का प्रमुख स्थल है। प्लीहा रक्त की एक निश्चित मात्रा को सुरक्षित रखती है जिसे रक्त वाहिकाओं में तीव्र और अत्यधिक हानि की स्थिति में निर्मुक्त किया जा सकता है।

सबसे बड़े लसीकाभ अंग के रूप में, **प्लीहा प्रतिरक्षा प्रतिक्रिया को सक्रिय करने और नियंत्रित करने के लिए प्रमुख स्थलों में से एक है।** लसीका पर्व की तुलना में, जो कि स्थानीय क्षेत्र के संक्रमण से सुरक्षा प्रदान करने में सम्मिलित होती हैं, प्लीहा दैहिक परिसंचरण संक्रमण से लड़ती है और इसकी जटिल संरचना के कारण, प्लीहा संपुटित जीवाणुओं से सुरक्षा के लिए मुख्य स्थल है।



चित्र 1.2 : a) प्लीहा सबसे बड़ा द्वितीय लसीकाभ अंग है। b) प्लीहा के अनुप्रस्थ काट का आरेखीय निरूपण।



चित्र 1.2 : c) प्लीहा का ऊतकीय काट।

1.5 लसीका पर्व

लसीका पर्व पूरे शरीर में लसीका वाहिकाओं की संधियों पर गुच्छित किए गए छोटे, अंडाकार या सेम के बीज के आकार की संरचनाएं हैं। ये अपनी संख्या और स्थिति में भिन्न होती हैं, किन्तु उनकी ऊतकीय संरचना और कार्य मौलिक रूप से समान होते हैं। एक लसीका पर्व सामान्यतः 1 से 2 सेंटीमीटर लम्बी होती हैं। प्रत्येक लसीका पर्व में

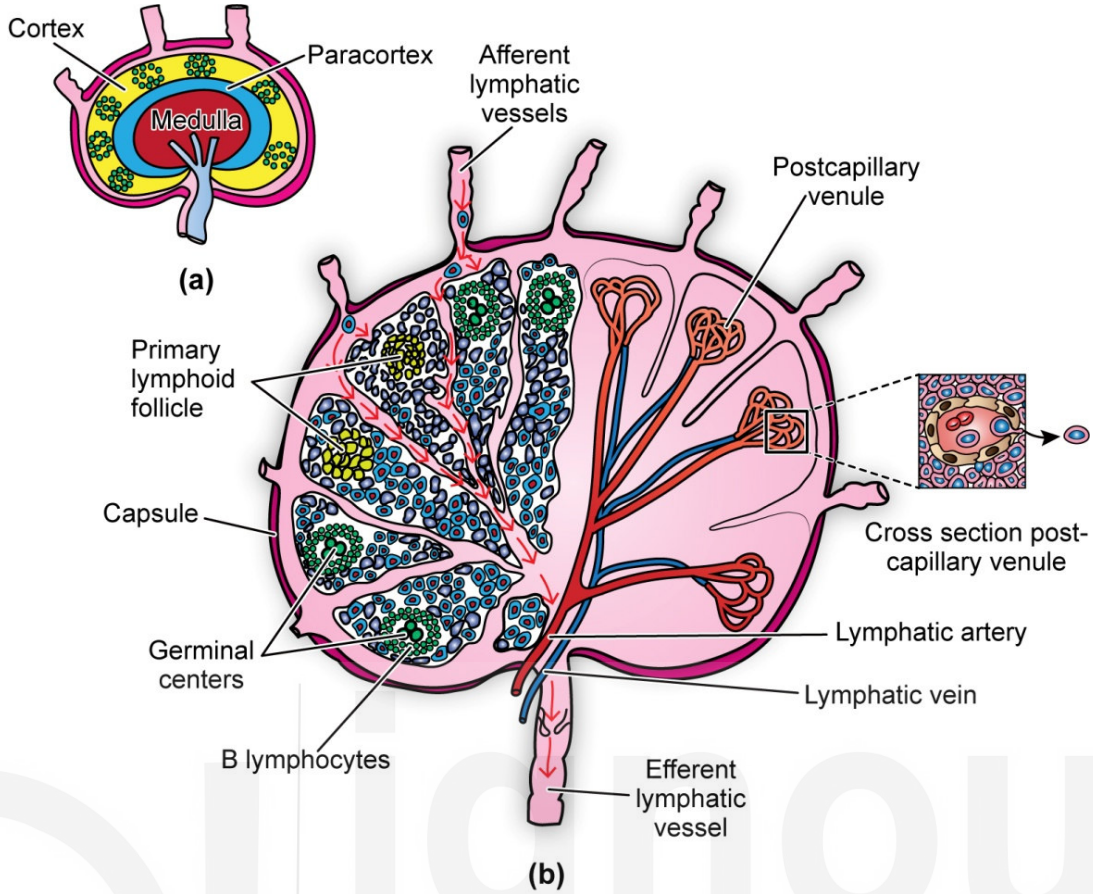
एक अभिवाही लसीका वाहिका, लसीका को पर्व में निर्देशित करती है, और एक अपवाही लसीका वाहिका, जिसे नाभिका कहा जाता है, पर्व के बाहर, पर्व के अवतल पक्ष पर लसीका का मार्गदर्शन करती है। नाभिका में लसीका पर्व की रुधिर आपूर्ति भी शामिल है (चित्र 1.3. a और b)। चूंकि लसीका एक पर्व के माध्यम से रिसता है, कोई भी कण–प्रतिजन जो लसीका में ले जाया जाता है, भक्षाणु कोशिकाओं और द्रूमिका कोशिकाओं (पुटकीय और अंतरागुलीयकृत) के कोशिकीय जाल द्वारा फंस जाता है। एक लसीका पर्व की समग्र संरचना, एक आदर्श लसीकाणु सूक्ष्मपर्यावरण को प्रभावी ढंग से सामना करने और फंसे हुए प्रतिजन पर प्रतिक्रिया करने के लिए बढ़ावा देती है।

लसीका पर्व को संरचनात्मक रूप से तीन संकेंद्रित क्षेत्रों में विभाजित किया जा सकता हैः वल्कुट, परावल्कुट, और मज्जा, प्रत्येक एक अलग सूक्ष्मपर्यावरण उपलब्ध करता हैं (चित्र 1.3 c)।

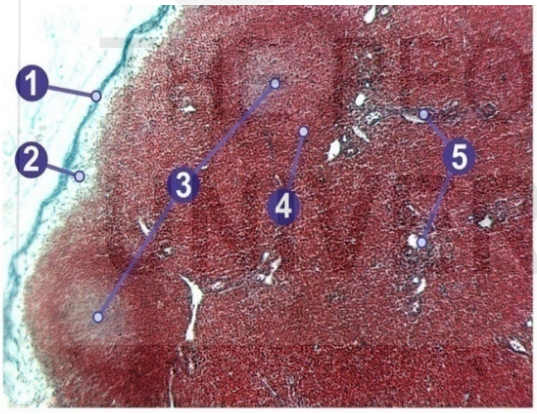
लसीकाणु (ज्यादातर B–कोशिकाएं), वृहतभक्षकाणु, पुटित द्रूमिक कोशिका, प्राथमिक पुटिका में व्यवस्थित, सबसे बाहरी स्तर, वल्कुट में उपस्थित होती हैं। एक प्रतिजनिक चुनौती के पश्चात, प्राथमिक पुटिकायें, द्वितीयक पुटिकाओं में वृद्धि कर लेते हैं, जिनमें से प्रत्येक में एक जननिक केंद्र होता है।

परावल्कुट क्षेत्र, वल्कुट के नीचे होता है, और इसमें मुख्य रूप से T–लसीकाणु और प्रवासी अंतरागुलीयकृत द्रूमिक कोशिकाओं (ऊतक से पर्व तक) की संख्या अधिक होती है। T_H कोशिकाओं में प्रतिजन प्रस्तुति के लिए आवश्यक MHC वर्ग II के अणुओं के उच्च स्तर को इन अंतरागुलीयकृत द्रूमिक कोशिकाओं द्वारा व्यक्त किया जाता है। नवजात चूहों से थाइमोसोच्छेदन (शल्य क्रिया द्वारा निकाली गयी थाइमस) द्वारा प्राप्त लसीका पर्व में परावल्कुटीय क्षेत्र में असामान्य रूप से कुछ कोशिकाएं पायी गयी, इसलिए परावल्कुटीय क्षेत्र को, वल्कुटीय क्षेत्र जो कि एक थाइमस–स्वतंत्र क्षेत्र है, के विपरीत एक थाइमस–निर्भर क्षेत्र के रूप में जाना जाता है। लसीकाभ–वंश की कोशिकाएं, लसीका पर्व, मज्जा की अंतरतम परत में कम सघनता के साथ उपस्थित होती हैं; उनमें से कई उपस्थित प्लैज़्मा कोशिकाएं हैं, जो सक्रिय रूप से प्रतिरक्षी अणुओं का स्राव करती हैं।

संक्रमण के पश्चात या शरीर में अन्य प्रतिजनों की शुरूआत के पश्चात, लसीका पर्व से अपनी एकल अपवाही लसीका वाहिका के माध्यम से वहित लसीका, मज्जा प्लैज़्मा कोशिकाओं द्वारा नए स्रावित प्रतिरक्षी से भी अधिक समृद्ध होती है, और अक्सर लसीकाणु सांद्रता, अभिवाही लसीका की तुलना में पचास गुना अधिक होती है। एक पर्व से निकलने वाले लसीका में लसीकाणु की वृद्धि, आंशिक रूप से पर्व के अंदर प्रतिजन के प्रभाव में लसीकाणुओं के प्रसार के कारण होता है। हालांकि, अधिकांश वृद्धि रुधिर–जनित लसीकाणुओं द्वारा व्यक्त की जाती है, जो विशेष अन्तःस्तर की कोशिकाओं के माध्यम से पर्व में प्रवेश करते हैं, और, जो कि पर्व की पश्चकेशिका लघुशिरा (post capillary venules) को आस्तरित करते हैं। यह अनुमान लगाया गया है कि लसीका पर्व से निकलने वाले 25 प्रतिशत लसीकाणु, रुधिर से इस अन्तःस्तर परत में चले जाते हैं, और पर्व तक पहुंच जाते हैं। जब भी पर्व के भीतर प्रतिजनिक उत्तेजना (किसी भी विदेशी कण के माध्यम से) होती है, तो हम लसीकाणुओं के प्रवासन में पर्वों में कई गुना वृद्धि देखते हैं। लसीका पर्व में प्रतिजन उत्तेजना के दौरान जारी कारकों को इस बढ़े हुए प्रवास को बढ़ावा देने के लिए उत्तरदायी माना जाता है। इस प्रक्रिया के परिणामस्वरूप लसीका पर्वों में सूजन दिखाई देती है।



चित्र 1.3 : a) b) लसीका पर्व का व्यवस्थित आरेख।



चित्र 1.3 : c) लसीका पर्व को संरचनात्मक रूप से तीन संकेंद्रित क्षेत्रों में विभाजित किया जा सकता है: वल्कुट, परावल्कुट, और मज्जा, प्रत्येक एक अलग सूक्ष्मपर्यावरण उपलब्ध करता हैं ।

लसीका पर्व के कार्य

लसीका पर्व, लसीका वाहिनियों के संधियों पर गुच्छित की गई अत्यधिक संगठित द्वितीयक संरचना हैं। ये ऊतकों और ऊतक तरल पदार्थ (लसीका) के निस्यंदक के रूप में कार्य करते हैं। इस जालीदार, आपस में जुड़े जाल में, अंतर्जात और बहिर्जात दोनों प्रकार के प्रतिजन फंस जाते हैं, और उनका वृहतभक्षकाणु द्वारा भक्षण किया जाता हैं, और साथ ही इनके द्वारा T–लसीकाणुओं को प्रस्तुत किया जाता हैं। इसके अतिरिक्त, B–लसीकाणु द्वारा स्रावित प्रतिरक्षी प्रभावी प्रतिरक्षा अनुक्रिया को स्थापित करने के लिए एक उपयुक्त प्रतिजन के साथ परस्पर क्रिया करते है।

1.6 अंत में कुछ प्रश्न

1. प्राथमिक लसीकाभ अंग क्या होते हैं?
2. हैसल की कणिकाएं क्या होती हैं?
3. प्लीहा के प्राथमिक कार्य क्या हैं?
4. लसीका क्या होता है?
5. लसीका पर्व के परावल्कुटीय क्षेत्र को थाइमस–आश्रित क्षेत्र क्यों कहा जाता है?

Acknowledgement of Figures

1. चित्र 1.1: Kuby, Immunology, Fourth Edition.
2. चित्र 1.2: (a, b) Kuby, Immunulogy, Fourth Edition.
3. चित्र 1.2 (c): Author.
4. चित्र 1.3: Kuby, Immunology, Fourth Edition.
5. चित्र 1.3 (c): https://en.wikipedia.org/wiki/Lymph_node#media /File: Lymphknoten_(Schwein).jpg.

अभ्यास 2

विभेदित ल्यूकोसाइट गणना (DLC) का अध्ययन करने के लिए अभिरंजित रुधिर फिल्म की निर्मिति

रूपरेखा

2.1 प्रस्तावना
उद्देश्य
2.2 सिद्धांत
2.3 आवश्यक सामग्री
2.4 कार्यविधि
2.5 प्रेक्षण तथा परिणाम
2.6 सावधानियाँ
2.7 अंत में कुछ प्रश्न

2.1 प्रस्तावना

श्वेत रुधिर कणिकाएं (WBCs) केन्द्रक युक्त कोशिकाएं और प्रकृति में विषमांगी होती हैं। रुधिर में श्वेत रुधिर कणिकाओं की सामान्य सांद्रता 4000 से 10,000 प्रति माइक्रो–लीटर तक भिन्नता प्रदर्शित करती हैं। वे संक्रमण के खिलाफ योद्धा हैं, और रक्षा में मदद करती हैं। ये कोशिकाएं मुख्य रूप से भक्षकाणुक्रिया और जीव की प्रतिरक्षा में सम्मिलित होती हैं। श्वेत रुधिर कणिकाओं का मूल्यांकन विभिन्न तकनीकों के माध्यम से किया जा सकता है, जो जटिलता और परिष्कार में भिन्न होते हैं। इनमें से एक है "विभेदित ल्यूकोसाइट गणना" (DLC), एक साधारण परीक्षण जो प्रत्येक प्रकार की श्वेत रुधिर कणिकाओं का सापेक्ष प्रतिशत दर्शाती है। यह परीक्षण किसी बीमारी या शोथ की स्थिति के निदान और निगरानी में महत्त्वपूर्ण भूमिका निभाता है। यह असामान्य श्वेत रुधिर कणिकाओं की समष्टि (जैसे, पूर्वगामी कोशिकाएं, अपरिपक्व कणिकाणु, और परिधीय रुधिर में लसीकार्बुद कोशिकाओं को प्रसारित करने) को निर्धारित करने में भी मदद करता है।

श्वेत रुधिर कणिकाएं पांच प्रकार की होती हैं, और प्रत्येक की अपनी विशिष्ट विशेषताएं होती हैं :

- **न्यूट्रोफिल (उदासीनरंजी) (चित्र 2.1 तथा तालिका 2.1)**

ये सबसे प्रचुर मात्रा में होती हैं, और संक्रमण के खिलाफ प्राथमिक रक्षा के रूप में कार्य करते हैं। संक्रमण या गंभीर चोट की प्रतिक्रिया में इनकी संख्या बढ़ जाती है, और रक्त

में अधिक संख्या में अपरिपक्व रूप में दिखाई देने लगती हैं। इन अपरिपक्व कोशिकाओं को STAB या BAND कहा जाता है। STAB संख्या में वृद्धि, किसी संक्रमण के प्रति WBC प्रतिक्रिया का सबसे पहला संकेत है। WBC की पूरी गणना बढ़ने से पहले ही इसे देखा जाता है।

चित्र 2.1 : न्यूट्रोफिल।

तालिका 2.1 : न्यूट्रोफिल की औसत मात्रा।

न्यूट्रोफिल (उदासीनरंजी)	संख्या घन मिमी में	%
पुरुष	3,000-7,000	50-60
महिला	1,800-7,700	50-60
गर्भावस्था	3,800-10,000	50-60

चित्र 2.2 : इओसिनोफिल।

इओसिनोफिल (इओसिनरागी) (चित्र 2.2 और तालिका 2.2)

ये कोशिकाएं प्रत्यूर्जता (allergic) विकारों से सम्बंधित होती हैं, और परजीवी संक्रमण का मुकाबला करती हैं। इनकी संख्या में वृद्धि से प्रत्यूर्जता प्रतिक्रिया, परजीवी संक्रमण, दीर्घकाली त्वचा संक्रमण और **लसीकार्बुद** तथा **ल्यूकेमिया** (अतिश्वेतकोशिका रक्तता) जैसे कुछ कैंसर का पता चलता है। हालांकि, इनकी कमी, तनाव, स्टेरॉयड उच्छादन और अन्य कुछ भी जो WBC उत्पादन को कम कर सकती हो, को दर्शाती है।

तालिका 2.2 : इओसिनोफिल की औसत मात्रा।

इओसिनोफिल (इओसिनरागी)	संख्या घन मिमी में	%
पुरुष	50-250	1-4
महिला	0-450	0-4
गर्भावस्था	0-450	0-4

लिम्फोमा (Lymphoma) लसीका तंत्र (शरीर का रोगों से लड़ने वाला जाल तंत्र) का कैंसर (cancer) है।

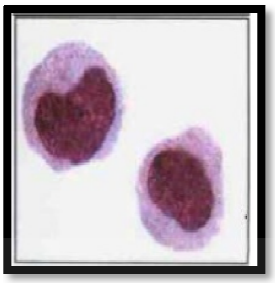
चित्र 2.3 : बेसोफिल।

बेसोफिल (क्षारकरागी) (चित्र 2.3 और तालिका 2.3)

इस प्रकार की WBC भक्षकाणु क्रिया के माध्यम से जीवाणु और अन्य बाहरी निकायों को नष्ट कर सकती है, और प्रत्यूर्जता प्रतिक्रियाओं में भाग ले सकती है। बेसोफिल गणना की अधिकता संक्रमण, विकिरण के संपर्क और कैंसर का संकेत है। इसके अतिरिक्त, बेसोफिल की कम संख्या तनाव प्रतिक्रियाओं, प्रत्यूर्जता और **अवटु अतिक्रियता** (hyperthyroidism) को दर्शाती है।

तालिका 2.3 : बेसोफिल की औसत मात्रा।

बेसोफिल (क्षारकरागी)	संख्या घन मिमी में	%
पुरुष	25-100	0.5-1.0
महिला	25-100	0.5-1.0
गर्भावस्था	25-100	0.5-1.0



चित्र 2.4 : मोनोसाइट्स।

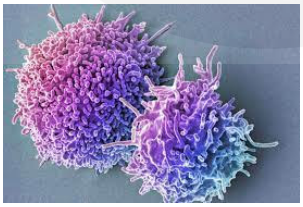
मोनोसाइट्स (एककेंद्रकाणु) (चित्र 2.4 और तालिका 2.4)

ये कोशिकाएं वे हैं जो, बाहरी निकायों को भक्षकाणु क्रिया द्वारा प्रत्यूर्जता, संक्रमण और शोथ (inflammation) पर प्रतिक्रिया करती हैं। मोनोसाइट की अधिक संख्या से विषाणु बीमारी, परजीवी संक्रमण, कोलैजन रोग और कुछ कैंसर का पता चलता है। उसी समय, मोनोसाइट का घटा हुआ स्तर रुमेटीइड संधिशोथ (Rheumatiod arthritis), HIV संक्रमण, स्टेरॉयड उदमासन और कुछ अबुर्द को दर्शाते हैं।

ग्रेव रोग एक स्वप्रतिरक्षित विकार है जिससे अवटु अतिक्रियता (Hyper thyroidism) होता है। यह 40 वर्ष से अधिक की महिलाओं में सामान्यतः देखा गया है।

तालिका 2.4 : मोनोसाइट्स की औसत मात्रा।

मोनोसाइट्स (एककेंद्रकाणु)	संख्या घन मिमी में	%
पुरुष	100-600	2-6
महिला	0-800	0-8
गर्भावस्था	0-800	0-8



चित्र 2.5 : लिम्फोसाइट्स।

लिम्फोसाइट्स (लसीकाणु) (चित्र 2.5 और तालिका 2.5)

ये कोशिकाएँ बहुत महत्त्वपूर्ण हैं, क्योंकि यह संक्रमण या शोथ के लिए तत्काल और विलंबित प्रतिक्रिया में महत्त्वपूर्ण भूमिका निभाती हैं। इनका बढ़ा हुआ स्तर विषाणु संक्रमण, जीवाणु संक्रमण, ग्रेव रोग और कुछ कैंसर को प्रदर्शित करते है। इनका कम हुआ स्तर स्टेरॉयड उदमासन, ल्यूपस, वृक्क की विफलता और प्रतिरक्षान्यूनता को दर्शाता है।

ल्यूपस (Lupus) एक स्वप्रतिरक्षित बीमारी है जिसमें शरीर का प्रतिरक्षा तंत्र अतिसक्रिय हो जाता है और शरीर के स्वस्थ ऊतकों पर हमला करता है।

तालिका 2.5 : लिम्फोसाइट्स की औसत मात्रा।

लिम्फोसाइट्स (लसीकाणु)	संख्या घन मिमी में	:
पुरुष	1,000-4,000	20-40
महिला	1,000-4,800	20-50
गर्भावस्था	1,300-5,200	20-50

उद्देश्य

इस अभ्यास के अंत में, आप इस योग्य हो जाएगें कि :

- ❖ रुधिर आलेप तैयार कर सकें;
- ❖ विभिन्न प्रकार के WBCs अर्थात इओसिनोफिल (इओसिनरागी), बेसोफिल (क्षारकरागी), न्यूट्रोफिल (उदासीनरंजी), लिम्फोसाइट्स (लसीकाणु) और मोनोसाइट्स (एककेंद्रकाणु) की जांच कर सकें; और
- ❖ विभिन्न प्रकार के WBCs की संरचना और कार्य पर चर्चा कर सकें।

2.2 आवश्यक सामग्री

एक विभेदक ल्यूकोसाइट गणना के लिए, निम्नलिखित सामग्री की आवश्यकता होती है:

- सूक्ष्मदर्शी
- तीक्ष्ण दन्त सुई (दोधारी शल्यक्रिया चाकू) निर्जर्मित सुइयों के साथ
- रुई
- संपूर्ण या थक्कारोधी युक्त रुधिर
- आसुत जल/फॉस्फेट बफर पीएच 6.5
- रोमनोफ़्स्की अभिरंजक (नीचे से कोई एक)

  लीशमैन का अभिरंजक

  राइट अभिरंजक

  जीमेसा अभिरंजक
- ग्लास स्लाइडें
- तैल निमज्जन
- नेत्रिका (100 आवर्धन क्षमता युक्त)

2.2 सिद्धांत

विभेदित ल्यूकोसाइट गणना (डीएलसी), रुधिर में उपस्थित प्रत्येक प्रकार की WBC की सापेक्ष संख्या निर्धारित करने के लिए किया जाता है। प्रत्येक प्रकार की कोशिका की निरपेक्ष संख्या उसके अनुपात से अधिक सूचनात्मक होती है। निरपेक्ष संख्या की गणना तब की जा सकती है, जब प्रति इकाई आयतन में अंतर और ल्यूकोसाइट्स की कुल संख्या ज्ञात हो। विभिन्न WBC की पहचान करने के लिए, पर्याप्त रूप से अभिरंजित हुई रुधिर आलेप स्लाइड की आवश्यकता होती है। रुधिर आलेप तैयार करने के लिए, रुधिर

की एक बूंद को कांच की स्लाइड पर फैलाया जाता है, और फिर हवा में सुखाया जाता है। इसके बाद इसे **रोमनोफ्स्की अभिरंजक** नामक एक विभेदक अभिरंजक से अभिरंजित कर दिया जाता है, जिसे सामान्यतः राइट, लीशमैन या जीमेसा अभिरंजक के नाम से भी जाना जाता है। फिर दो सौ कोशिकाओं को गिना और वर्गीकृत किया जाता है। आजकल गणना, स्वचालित अंतर गणना यंत्रो की सहायता से की जाती है, लेकिन फिर भी हस्तकृत तकनीक अधिक विश्वसनीय होती है, और इसमें आकारिकीय अपसामान्यताओं को खोजने की बेहतर क्षमता होती है।

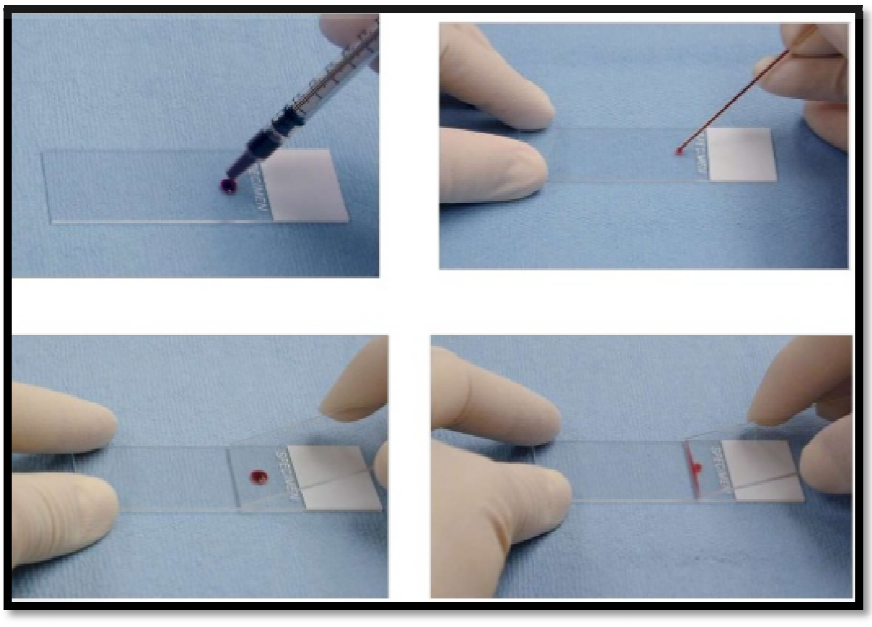
2.4 कार्यविधि

इसमें निम्नलिखित महत्त्वपूर्ण चरण शामिल हैं:

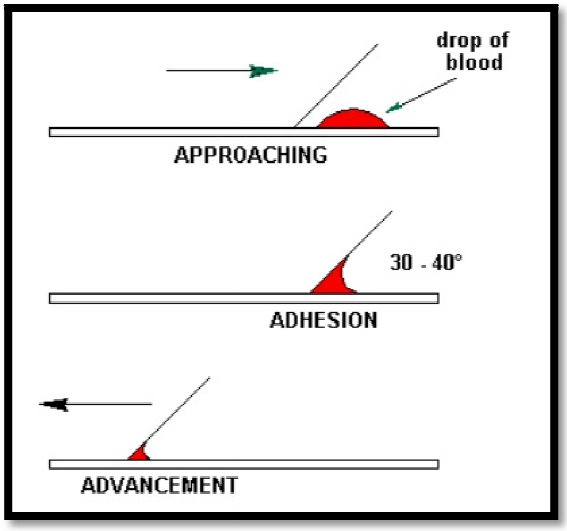
a) रुधिर आलेप की तैयारी

यह एक बहुत ही महत्त्वपूर्ण चरण है, क्योंकि समान रूप से फैली हुई रुधिर फिल्म, सटीकता के साथ WBC की विभेदक गणना में सहायता करती है। एक अच्छी रुधिर फिल्म तैयार करने के लिए निम्नलिखित चरणों का पालन करने की आवश्यकता है:

1. खरोंच और चिकनाई से मुक्त कांच की तीन साफ स्लाइड लें।
2. निर्जर्मित रुई और तीक्ष्ण दन्त सुई का उपयोग करके या तो सीधे उंगली से केशिका रुधिर प्राप्त करें अथवा EDTA (Ethylene diamine tetraacetic acid) थक्कारोधी रुधिर का उपयोग करें। रुधिर की बूंद को स्लाइड के कोने पर रखा जाना चाहिए (चित्र 2.6)।
3. विस्तारक लें, स्लाइड पर रुधिर की बूंद को स्पर्श करें और इसे पीछे की ओर धकेलें ताकि बूंद विस्तारक के किनारे तक समान रूप से फैल जाए। स्लाइड और विस्तारक के मध्य का कोण 45^0 होना चाहिए (चित्र 2.7)।

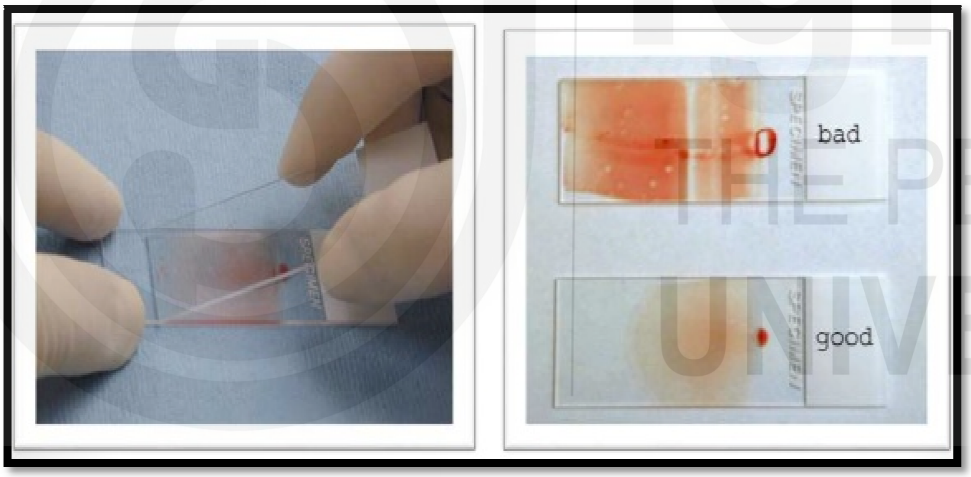


चित्र 2.6 : रुधिर की एक बूंद को स्लाइड और विस्तारक पर रखना।

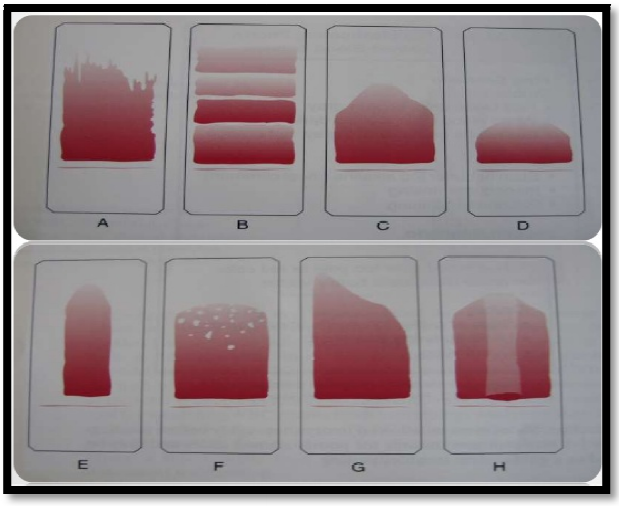


चित्र 2.7 : आलेप बनाने के लिए स्लाइड पर विस्तारक की स्थिति।

सावधानीपूर्वक और तेज गति के साथ, विस्तारक को स्लाइड के दूसरे छोर की ओर धकेलें। रुधिर फिल्म स्लाइड के किनारे से 1 सेमी और चौड़ाई 5 मिमी होनी चाहिए। आलेप को कमरे के तापमान पर सुखाएं। रुधिर फिल्म की गुणवत्ता को बनाए रखने के लिए पर्याप्त रूप से सुखना आवश्यक है। एक सीसा–पेंसिल या चिन्हक पेन का उपयोग करके स्लाइड पर पहचान संख्या अंकित की जा सकती है। तैयार सूखी रुधिर फिल्म को अभिरंजन रैक पर रखें (चित्र 2.8 और चित्र 2.9)।



चित्र 2.8 : आलेप बनना और अच्छी और बुरी फिल्म की तुलना।



चित्र 2.9 : अस्वीकार्य रुधिर फिल्में।

b) सूखी रुधिर आलेप स्लाइड का अभिरंजन

अब, पाश्चर पिपेट की सहायता से लीशमैन अभिरंजक (10–15 बूंद बिना अधिप्लावन के) द्वारा आलेप को ढक दें, और दो मिनट के लिए छोड़ दें। स्लाइड पर समान मात्रा में दोहरा आसुत जल/बफर विलयन डालें, और उन्हें मिलाने के लिए धीरे से फैलाये। आप इसके लिए एक पतली कांच की छड़ या धमन पाइप का उपयोग कर सकते हैं। इसे 10 मिनट के लिए रख दें। अब आलेप को बहते नल के पानी का उपयोग करके धो लें, इस हेतु हाथ पर पानी निर्देशित करते हुये धोये न कि सीधे आलेप पर पानी डाले। आलेप को धोने के बाद स्लाइड को सुखाने के लिए अपवाहन रैक में काउंटर पर रखें।

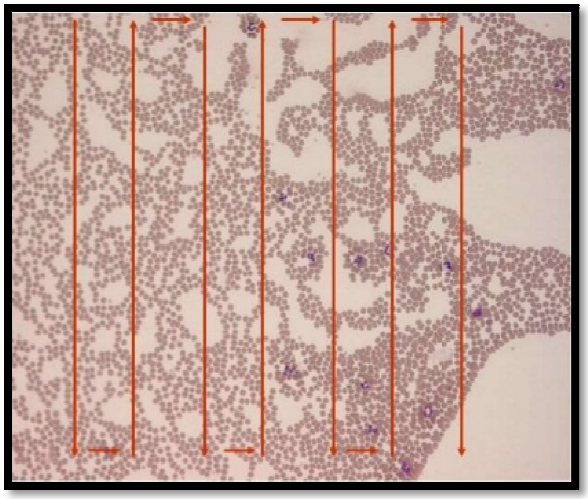
रोमनोफ़्स्की के अभिरंजक को सार्वभौमिक रूप से इस्तेमाल किया हैं, और इसमें दो आवश्यक तत्त्व हैं: मेथिलीन ब्लू और ईओसिन या अजूरे। मेथिलीन ब्लू एक क्षारीय रंजक है, और इसमें केन्द्रक जैसे अम्लीय घटक के लिए एक बंधुता है, और अजूरे/ईओसिन अम्लीय रंजक है, और इनमें कोशिका के क्षारीय घटक यानी कोशिकाद्रव्य के लिए एक बंधुता है। इन रंजको को मेथिल ऐल्कोहॉल में तैयार किया जाता है, ताकि इन्हें स्थिरीकरण और अभिरंजन में इस्तेमाल किया जा सके।

चित्र 2.10 : रुधिर फिल्म–बिना अभिरंजन और अभिरंजन युक्त।

c) अभिरंजित स्लाइड का परीक्षण

तैयार और सूखे आलेप के प्रतिच्छादन (Screening) उद्देश्य से सूक्ष्मदर्शी में कम शक्ति आवर्धन अभिदृश्यक (10X) के तहत निरीक्षण किया जाना चाहिए, और उचित भाग का चयन करना चाहिए। अब आलेप पर देवदार की लकड़ी के तेल/निमज्जन तेल की एक बूंद डालें। आयरिस डायाफ्राम को खोलकर बढ़े हुए प्रकाश में 100X आवर्धन पर एक क्षेत्र से दूसरे क्षेत्र में क्रमबद्ध रूप से आगे बढ़ते हुए निरीक्षण करें। प्रत्येक क्षेत्र में देखी गयी कोशिका के प्रकार को एक नोटबुक में क्षैतिज और ऊर्ध्वाधर अक्ष दोनों में दस खानो के साथ खींची गई तालिका में रिकॉर्ड करें या हैंड काउंटर का उपयोग करें। कम से कम 100 कोशिकाओं की गिनती होने तक अभिदृश्यक को धीरे–धीरे एक श्रृंखला के रूप में आगे बढ़ाएं।

चित्र 2.11 : हैंड काउंटर।



चित्र 2.12 : श्रृंखला विधि में आलेप की जांच।

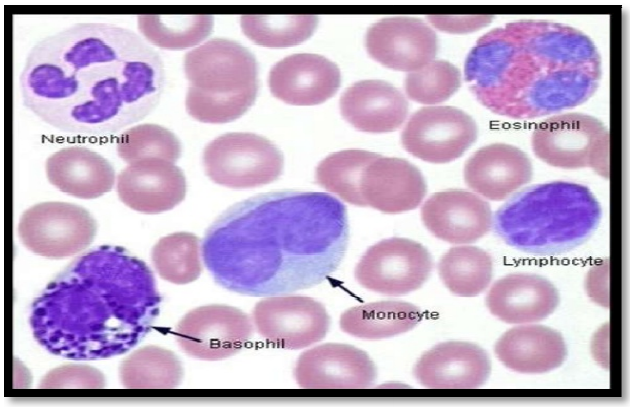
2.5 परिणाम तथा प्रेक्षण

लीशमैन अभिरंजक के साथ कोशिकाओं को अभिरंजित करने के बाद, जैसा चित्र 2.12 और तालिका 2.6 में दर्शाया गया है, वैसी संरचनाएं देखी जा सकती हैं।

रिकॉर्ड किए गए अवलोकनों की तुलना सामान्य मानक परास मान से की जा सकती है, और परिणाम प्रतिशत में व्यक्त किया जा सकता है (तालिका 2.7)।

तालिका 2.6 : श्वेत रक्त की कोशिकाओं की विभिन्न संरचनाएं।

न्यूट्रोफिल (उदासीनरंजी): गुलाबी कोशिकाद्रव्य के साथ बैंगनी रंग का केन्द्रक। बहुपालिक केन्द्रक पतले क्रोमैटिन धागों द्वारा आपस में जुड़े हुए।	**इओसिनोफिल (इओसिनरागी):** कोशिकाद्रव्य हल्का गुलाबी, केंद्रक द्विपालिक, बैंगनी रंग का और कणिका नारंगी लाल होते हैं।
बेसोफिल (क्षारकरागी): कणिका गहरे नीले बैगनी रंग में अभिरंजित, सामान्यतः केन्द्रक द्विपालिक।	**मोनोसाइट्स (एककेंद्रकाणु):** गुलाबी कोशिकाद्रव्य वृक्क के आकार के बैंगनी रंग के केन्द्रक के साथ।
लिम्फोसाइट्स (लसीकाणु): हल्के नीले कोशिकाद्रव्य के साथ बड़ा गोल गहरा नीला केन्द्रक।	**पट्टिकाणु:** बैंगनी रंग की कणिकाएँ ।
लाल रुधिर कणिका: RBCs उभयावताल होते हैं, और इस प्रकार केंद्र में सफेद और परिधि पर गुलाबी दिखाई देते हैं।	



चित्र 2.13 : ल्यूकोसाइट्स की संरचना।

तालिका 2.7 : WBCs का सामान्य मानक परास।

• श्वेत रक्त कोशिका गणना : 4.0-11.0 × 10^9/l	
• विभेदित श्वेत रक्त कोशिका गणना	
– न्यूट्रोफिल	2.0-7.0 × 10^9/l (40-80%)
– लिम्फोसाइट	1.0-3.0 × 10^9/l (20-40%)
– मोनोसाइट	0.2-1.0 × 10^9/l (2-10%)
– इयोसिनोफिल	0.02-0.5 × 10^9/l (1-6%)
– बेसोफिल	0.02-0.1 × 10^9/l (<1-2%)

2.6 सावधानियाँ

1. रुधिर निकालने के लिए निर्जर्मित रुई और तीक्ष्ण दन्त सुई का उपयोग आवश्यक है।
2. आलेप तैयार करने के लिए ली गई स्लाइडें साफ और चिकनाई मुक्त होनी चाहिए।
3. विस्तारक के स्लाइड करने के कोण का ठीक से पालन किया जाना चाहिए।
4. रुधिर फिल्म को अभिरंजित करने से पूर्व हवा में सुखाया जाना चाहिए।
5. लीशमैन अभिरंजक, जब अभिरंजन हेतु स्लाइड पर डाला जाता है, तो उसे स्लाइड से फैलना नहीं चाहिए।
6. अभिरंजक और आसुत जल/बफर को मिलाते समय बहुत सावधानी से और धीरे–धीरे फूंक मारें।
7. विभिन्न प्रकार की कोशिकाओं की पहचान और रिकॉर्डिंग सही और सावधानीपूर्वक की जानी चाहिए।

2.7 अंत में कुछ प्रश्न

1. इओसिनोफिल (इओसिनरागी), बेसोफिल (क्षारकरागी) और न्यूट्रोफिल (उदासीनरंजी) की संरचना में अंतर लिखिए।
2. रुधिर आलेप स्लाइड को अभिरंजित करने के लिए सामान्यतः किन अभिरंजको की अनुशंसा की जाती है?
3. विभिन्न प्रकार की WBCs की सही पहचान के लिए क्या सावधानी बरतनी चाहिए?

अभ्यास 3

ऑक्टरलोनी दोहरी प्रतिरक्षा–विसरण विधि

रूपरेखा

3.1 प्रस्तावना
उद्देश्य
3.2 आवश्यक सामग्री
3.3 सिद्धांत
3.4 कार्यविधि
3.5 प्रेक्षण
3.6 परिचर्चा
3.7 सावधानियाँ
3.8 अंत में कुछ प्रश्न

3.1 प्रस्तावना

ऑक्टरलोनी दोहरी प्रतिरक्षा–विसरण विधि 1948 में ओर्जन ऑक्टरलोनी द्वारा विकसित एक प्रतिरक्षा–विसरण तकनीक है। प्रतिरक्षी और प्रतिजन एक अर्धघन (semi-solid) माध्यम (जैल) में एक दूसरे की ओर अपनी इष्टतम सांद्रता के स्तर तक फैलते हैं और अवक्षेपण का एक बैन्ड बनाते हैं। जैल में प्रतिरक्षी और प्रतिजन द्वारा परस्पर क्रिया द्वारा लिए प्रसार को 'प्रतिरक्षा–विसरण (इम्यूनो–डिफ्यूजन)' कहा जाता है। अवक्षेपण एक अत्यधिक विशिष्ट सीरम सम्बन्धी अभिक्रिया है जिसमें प्रतिजन का प्रतिरक्षी के साथ आबंधन, शामिल किया जाता है, जो एक सम्मिश्र तिर्यक् बंधन "लैटिस" संरचना बनातें है। इसलिए, इस तकनीक का उपयोग किसी नमूने या तैयारी में विशिष्ट प्रतिजन की उपस्थिति के गुणात्मक परीक्षण के लिए किया जाता है।

उद्देश्य

इस अभ्यास के बाद, आप इस योग्य हो जाएँगे कि :

- किसी प्रतिजन के साथ विभिन्न प्रतिरक्षियों की अभिक्रिया प्रतिरूप का वर्णन कर सकें; और
- ऑक्टरलोनी दोहरी प्रतिरक्षा–विसरण विधि द्वारा प्रतिजन–प्रतिरक्षी अवक्षेपण का निर्धारण कर सकें।

3.2 आवश्यक सामग्री

उपकरण और कांच के बर्तन :

कांच की स्लाइड,

सूक्ष्मपिपेट,

जैल छिद्रक,

मापने वाला सिलेंडर,

बीकर,

इनक्यूबेटर (37°C),

10 मिलीलीटर डिस्पोजेबल सिरिंज

रसायन :

ऐगार,

फॉस्फेट बफर (डाई सोडियम लवण और मोनोसोडियम लवण),

NaCl,

प्रतिसीरम,

प्रतिजन,

एल्कोहॉल,

आसुत जल

3.3 सिद्धांत

जब घुलनशील प्रतिरक्षी और प्रतिजन को ऐगरोज जैल में एक–दूसरे से संलग्न रखा जाता है, तो वे पूरे जैल में अरीय (radially) रूप से फैल जाते हैं, और उनके बीच एक सांद्रण प्रवणता बनाते हैं। प्रतिजन–प्रतिरक्षी अभिक्रिया/अंतःक्रिया इष्टतम सांद्रता के क्षेत्र में होती है, प्रेसिपिटिन रेखाएँ विशिष्ट रेखाएँ होती है। जिनका जैल में बनना इस बात पर निर्भर करता है कि क्या दो प्रतिजन एक समान प्रतिजन एपिटोप (प्रतिजन निघटिक) को सांझा करतें है या आंशिक रूप से समान प्रतिजन एपिटोप को सांझा करतें हैं या समान प्रतिजन एपिटोप को सांझा नहीं करतें है। जब प्रतिजन या प्रतिरक्षी की सांद्रता अधिक होती है, तो अवक्षेपण अभिक्रिया को रोक दिया जाता है, क्योंकि प्रतिरक्षी के सभी बंध्यकारी स्थल प्रतिजन या अतिरिक्त प्रतिरक्षी से संतृप्त हो जाते हैं, या एक ही प्रतिजन से जुड़ जाते हैं, जिससे **तिर्यक बंधन** (cross linking) को रोका जा सकता है। इस घटना को "प्रोज़ोन परिघटना (Prozone Phenomenon)" कहा जाता है। इसलिए, ऐगार जैल में कूपों के करीब प्रेसिपिटिन रेखाएं बनती हैं, जहां प्रतिजन या प्रतिरक्षी की सांद्रता कम होती है।

3.4 कार्यविधि

1.5: ऐगरोज जैल का घोल तैयार करें

(pH 8.0 के फॉस्फेट बफर की 100 मिलीलीटर मात्रा में 1.5 ग्राम ऐगरोज को घोले)
इसे बीच–बीच में रुक–रूक कर घुमाते हुए उबाले

विलयन को लगभग 50-60°C तक ठंडा करें

एक साफ कांच की स्लाइड पर 4 मिली विलयन को डालें
('स्लाइड को क्षैतिज रूप से रखें)

जैल को 30 मिनट के लिए जमने दें

ऐगार विलयन के साथ सिरिंज (10 मिली) को भरें और कांच की स्लाइड पर छोड़ दें

(एक समान ऐगार परत बनाए रखने के लिए जैल को कांच की स्लाइड पर एक तरफ से बहने दें)

कांच की स्लाइड पर कूप बनाने के लिए क्षैतिज रूप से रखे गए कूपो के सांचे पर रखें

(1 केंद्रीय कूप के आसपास 3-6°C कूपों को छिद्रित करें)

जैल को 30 मिनट के लिए जमने दें

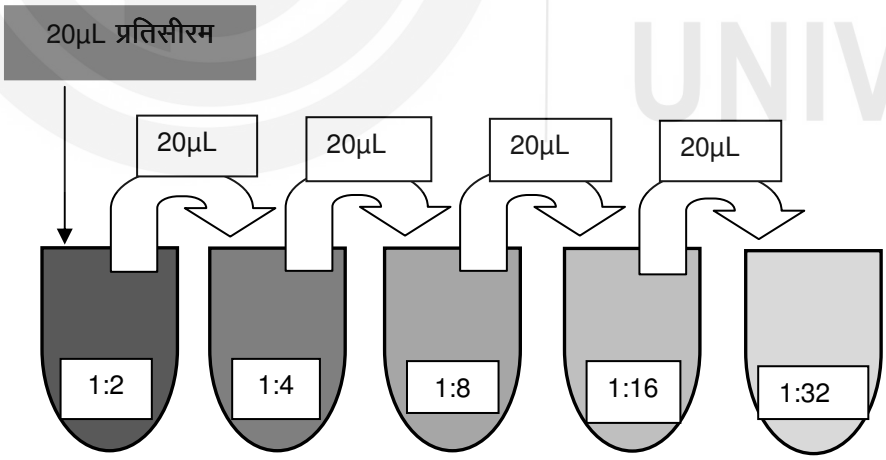
केंद्रीय कूप में प्रतिजन के 5µL के साथ कूप को भरें

परिधीय कूपो को विभिन्न तनुकरणों के संगत प्रतिसीरा से भरें

[1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 तनुकरण]

37°C पर एक नम कक्ष में कांच की स्लाइड को उष्मित करें

कूपो के बीच अपारदर्शी प्रीसिपिटिन लाइन का निरीक्षण करें



पिपेट द्वारा, दोहरे आसुत जल/फॉस्फेट बफर (PB बफर) के 20 µL युक्त एक ऐपेंडोर्फ़ कूपिक में प्रतिसीरम की 20 µL मात्रा ले।

भ्रमिल गति द्वारा ठीक से मिलाये

एक नयी, दोहरे आसुत जल/फॉस्फेट बफर (PB बफर) के 20 µL युक्त ऐपेंडोर्फ़ कूपिक में, इस नए तनुकृत विलयन के 20 µL निकाल कर मिला दे

वांछित तनुकरण प्राप्त होने तक इन चरणों को जारी रखें।

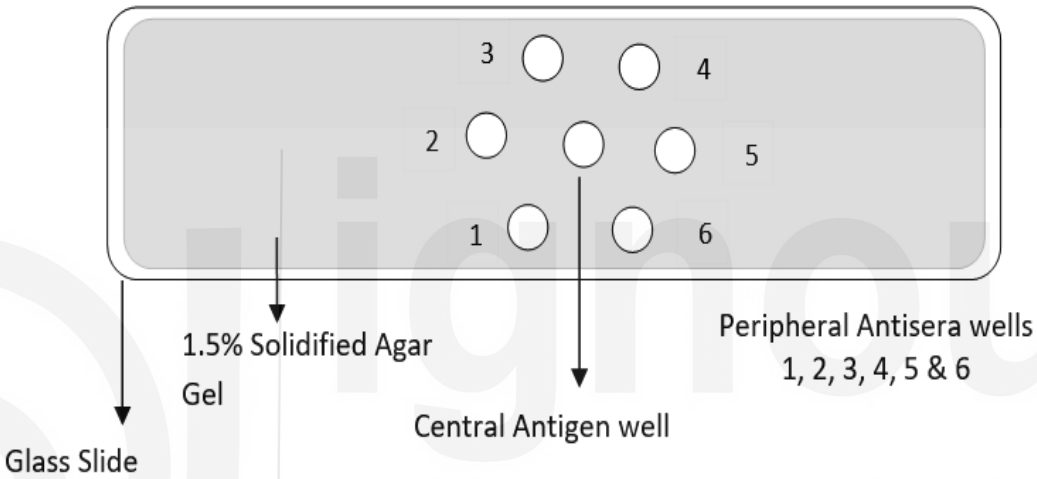
टेम्पलेट और अभिक्रिया कूपों की तैयारी (चित्र 3.1) :

एक सादा श्वेत कागज़ लें और वृत्ताकार रूप में 3–6 कूपो और 1 केंद्रीय कूप बनाएं।

एक कांच की स्लाइड के आमाप के भीतर समाहित हो सकने वाले कूपो को बनाये।

जमी हुई जैल स्लाइड को इस कागज के ऊपर रखें।

जैल पर कूपो के निशान के अनुसार कूपो का छिद्रण करें।



चित्र 3.1 : प्रतिजन और प्रतिसीरम नमूनों को कूपों में भरने के लिए ठोस ऐगरोज़ जैल (Agrose gel) पर छिद्रित कूपों को दिखाते हुए कांच की स्लाइड। (प्रतिसीरम में प्रतिरक्षी उपस्थित होते हैं)

3.5 प्रेक्षण

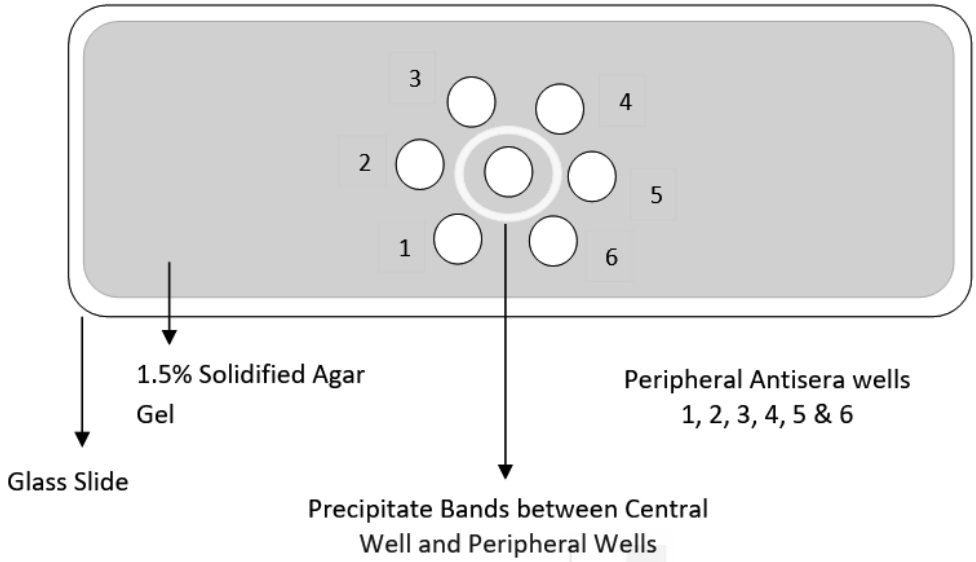
अवक्षेपण की रेखाएं और धारियां देखी जा सकती हैं। अरीय प्रतिरक्षा–विसरण में अवक्षेपण धारियों का निरीक्षण करने के लिए, विभिन्न कूपों को कांच की स्लाइड पर रखे ठोस ऐगरोज़ जैल में छिद्रित किया गया था (चित्र 3.3a)। प्रतिजन को केंद्रीय कूप मे और परिधीय कूपों में क्रमिक रूप से तनुकृत प्रतिसीरम (जैसे स्वच्छ अथवा अतनुकृत), 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) को भरा जाता है, और विसरण होने दिया जाता है। केंद्रीय कूप और परिधीय कुपों के मध्य अवक्षेपण धारियों को देखा जा सकता है (चित्र 3.3a और चित्र 3.3b)।

चित्र 3.3 में अवक्षेपण रेखाओं के विभिन्न प्रतिरूपो को निम्न प्रकार से देखा जा सकता है :

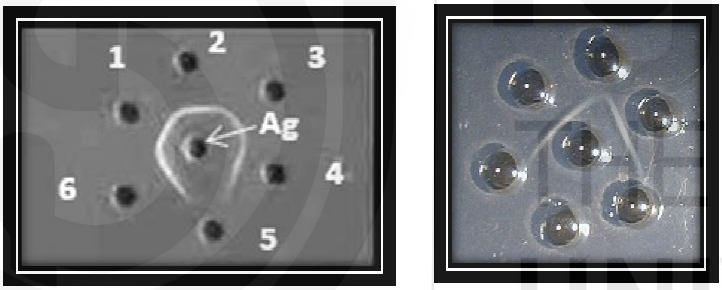
प्रतिरूप 1 में : अवक्षेपण की सीधी रेखा देखी जा सकती है, जो दर्शाती है कि परीक्षण प्रतिजन प्रतिरक्षात्मक रूप से समान हैं।

प्रतिरूप 2 में : यह "असर्वसमिका का प्रतिरूप" दिखाता है, जो दर्शाता है कि प्रतिजन एक दूसरे के साथ प्रतिरक्षात्मक रूप से असंबंधित हैं।

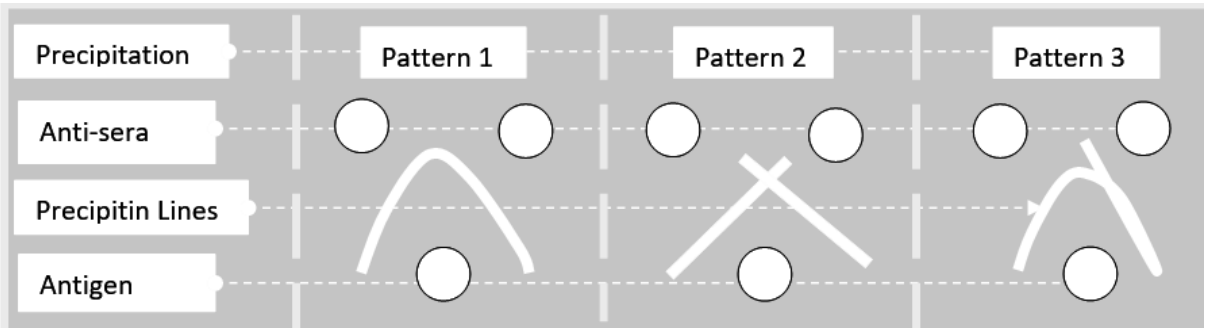
प्रतिरूप 3 में : यह "आंशिक सर्वसमिका का प्रतिरूप" दिखाता है, जो दर्शाता है कि प्रतिजन के कुछ एपीटोप (प्रतिजन का हिस्सा जो प्रतिरक्षी के साथ अन्योन्यक्रिया करते हैं) सांझा करते हैं, जो दोनों के लिए समान हैं।



चित्र 3.2 a : केंद्रीय कूप और परिधीय कूपों के मध्य अवक्षेप धारी दिखाते हुए पूर्व–लेपित कांच की स्लाइड। यह प्रतिसीरा में उपस्थित प्रतिजन और प्रतिरक्षी के मध्य अवक्षेपण के गठन को इंगित करता है।



चित्र 3.2 b : अरीय प्रतिरक्षा विसरण को दर्शाने वाला वास्तविक अवलोकन। प्रतिजन को केंद्रीय कूप में रखा जाता है और क्रमिक रूप से तनुकृत प्रति–सीरा परिधीय कूपों में रखा जाता है।



चित्र 3.3 : जब प्रतिजन प्रतिसीरा के साथ अभिक्रिया करता हैं, विभिन्न अवक्षेपण प्रतिरूप देखे गए :

प्रतिरूप 1 : दो प्रतिजन प्रतिरक्षात्मक रूप से समान हैं।

प्रतिरूप 2 : दो प्रतिजन प्रतिरक्षात्मक रूप से असमान हैं।

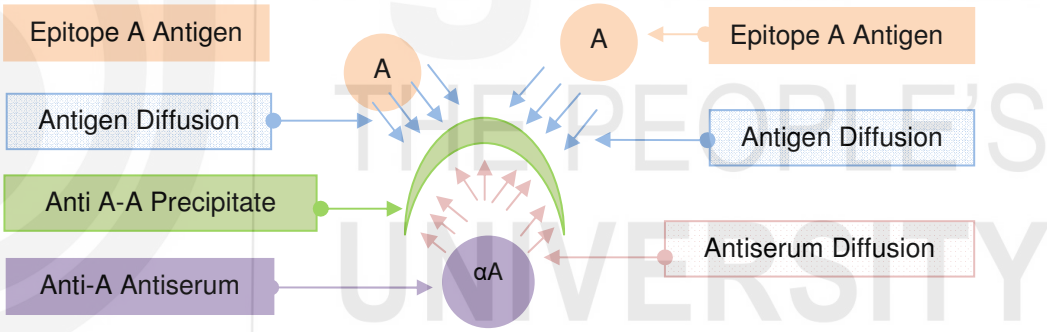
प्रतिरूप 3: दो प्रतिजन आंशिक समान हैं।

3.5 परिचर्चा

प्रतिरक्षा विज्ञान और प्रतिरक्षा का आधार पूरी तरह से प्रतिजन और प्रतिरक्षी के मध्य अन्योन्यक्रिया पर निर्भर करता है। जीवाणु और विषाणु संक्रमण तथा कुछ अन्य विषाक्त पदार्थों के विरुद्ध शरीर की प्रतिरक्षा द्वारा प्रतिरक्षियों का निर्माण किया जाता है। चूंकि एक प्रतिरक्षी में एक विशिष्ट प्रतिजन के लिए बंधुता और विशिष्टता होती है, विसरण परिघटना के कारण, प्रतिजन या प्रतिरक्षी अथवा दोनों, प्रतिजन और प्रतिरक्षी अणुओं की गति एक आधार माध्यम में होती है। अवक्षेपण की रेखाओं की संख्या, विलयन में उपस्थित विशिष्ट प्रतिजनिक पदार्थों की अधिकतम संख्या को इंगित करती है। ऐसी स्थितियों में जहां कूपों में प्रतिजन और प्रतिरक्षी, समान आकार और आमाप के होते हैं, प्रेसिपिटिन की रेखा की वक्रता प्रतिजन के सापेक्ष आणविक भार पर निर्भर करेगी। जब प्रतिजन समान आणविक भार के होते हैं, तो प्रेसिपिटिन की रेखा सीधी होती है। जबकि असमान आणविक भार के मामले में प्रेसिपिटिन की रेखा एक वक्र होती है, तो वक्रता उच्च आणविक भार के प्रतिजन की ओर झुक जाती है। गठित प्रेसिपिटिन लाइन की विशेषताएं प्रति–सीरा और अभिक्रिया के प्रतिजन की प्रकृति को दर्शाती हैं। प्रति–सीरा और प्रतिजन की प्रकृति से उत्पन्न होने वाली विभिन्न अभिक्रियाएँ हैं :

i) सर्वसमिका की अभिक्रिया

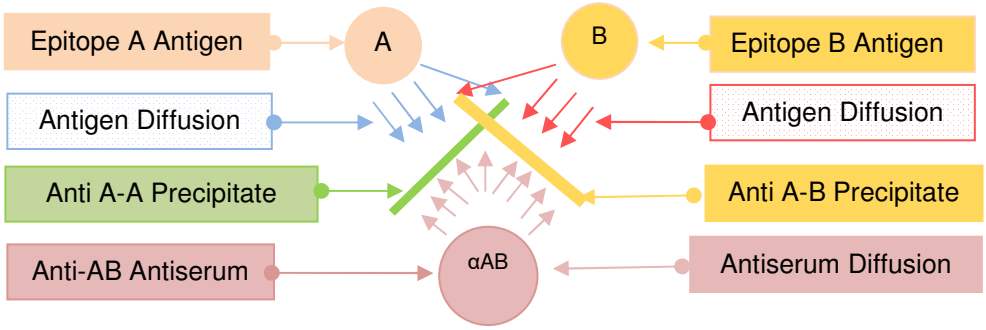
प्रति–सीरा रेखाएं एक–दूसरे की ओर बढ़ती हैं, और आपस में जुड़ जाती हैं। दो प्रतिजनों की सांद्रता समान होने के कारण, वे समान दर से विसरित होते हैं। चूंकि प्रतिरक्षी, प्रतिजन के समान एपीटोप (epitope) को अवक्षेपित कर रहे हैं, इसलिए वे एक विशिष्ट प्रतिरूप बनाते हैं – जिसे प्रेसिपिटिन कहा जाता है।



चित्र 3.4 : प्रतिजन A और प्रति–A प्रतिसीरम के साथ सर्वसमिका की अभिक्रिया को दर्शाने वाला आरेख।

ii) असर्वसमिका की अभिक्रिया

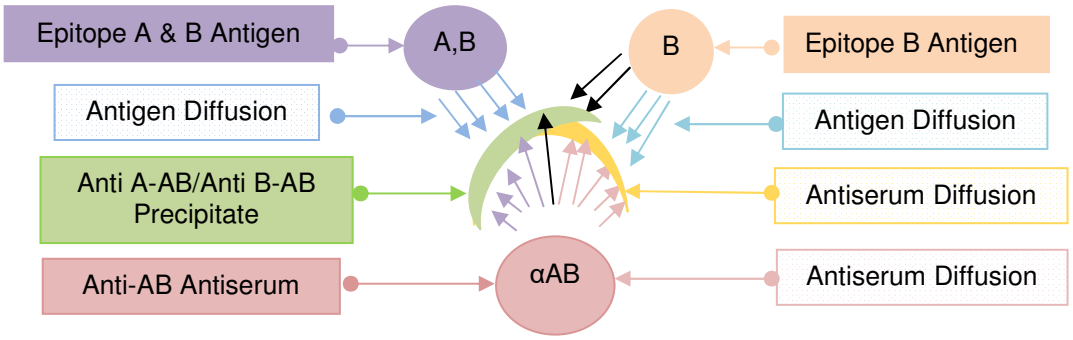
प्रति–सीरा रेखाएं अवक्षेपण की स्वतंत्र रेखाएँ (अक्सर क्रिसक्रॉस प्रतिरूप) बनाती है, क्योंकि दो प्रतिजन एक दूसरे से असंबंधित या भिन्न होते हैं। इसलिए, उन्हें असर्वसमिका कहा जाता है।



चित्र 3.5 : प्रतिजन A, B और प्रति–AB प्रतिसीरम के साथ असर्वसमिका की अभिक्रिया को दर्शाने वाला आरेख।

iii) आंषिक सर्वसमिका की अभिक्रिया

कूपों में प्रतिजन कुछ एपीटोप सांझा करते हैं, जो दोनों के लिए समान हैं, फिर भी उनके पास व्यक्तिगत–विशिष्ट एपीटोप होते हैं। इसलिए, प्रतिजन की क्रॉस–अभिक्रिया समान होती है, लेकिन समरूप नहीं होती है। ऐसे मामले में, प्रति–सीरा रेखाएं अवक्षेपण की रेखा पर एक उभार बनाती हैं।



चित्र 3.6 : प्रतिजन A, B और B; प्रति–AB प्रतिसीरम के साथ आंशिक सर्वसमिका की अभिक्रिया को दर्शाने वाला आरेख।

3.6 सावधानियाँ

1. कांच की स्लाइड पर जैल के जमने के दौरान हवा के बुलबुले नहीं आने चाहिए।
2. कांच की स्लाइड पर ऐगार का वितरण एक समान होना चाहिए।
3. कूपों के छिद्रण के समय कांच की स्लाइड का निचला भाग नहीं छूना चाहिए।
4. प्रतिजन और प्रति–सीरा की अधिक मात्रा भरने से बचना चाहिए।

3.7 अंत में कुछ प्रश्न

1. प्रतिरक्षा–विसरण को परिभाषित कीजिये।
2. ऑक्टरलोनी है :
   a) एक गुणात्मक विधि
   b) एक मात्रात्मक विधि
   c) गुणात्मक और मात्रात्मक दोनों
   d) उपरोक्त में से कोई नहीं
3. प्रतिजन या प्रतिरक्षी की अधिक सांद्रता से अवक्षेपण अभिक्रिया कैसे प्रभावित होती है?
4. ऑक्टरलोनी दोहरी प्रतिरक्षा–विसरण विधि के सिद्धांत पर चर्चा करें।

5. तुल्यता का क्षेत्र क्या होता है?

6. ऑक्टरलोनी में प्रेसिपिटिन रेखाएं क्या दर्शाती हैं?

7. एक फ़्लोचार्ट का उपयोग करते हुए प्रति–सीरा तनुकरण में शामिल चरणों का वर्णन करें।

चित्रों के लिए आभार

Illustrations are drawn/Photographs are clicked by the authors of this Exercise.

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

अभ्यास 4

ABO रक्त वर्ग निर्धारण

रूपरेखा

4.1 प्रस्तावना
उद्देश्य
4.2 आवश्यक सामग्री
4.3 सिद्धांत
4.4 कार्यविधि
4.5 प्रेक्षण और विवेचना
4.6 परिणाम
4.7 सावधानियाँ

4.1 प्रस्तावना

मनुष्यों में, रुधिर में लाल रुधिर कणिका, श्वेत रुधिर कणिका तथा बिंबाणु पायी जाती हैं, जो परिवहन, नियमन और सुरक्षा में महत्त्वपूर्ण भूमिका निभाती हैं। लाल रुधिर कणिकाओं या रक्ताणुओ पर प्रतिजनी पदार्थों की उपस्थिति या अनुपस्थिति के आधार पर, किसी व्यक्ति के रुधिर वर्ग की पहचान करना संभव है। इसे "रुधिर वर्ग निर्धारण" या "रुधिर प्ररूपण" कहा जाता है। जब चिकित्सा प्रक्रियाओं और आपात स्थितियों में रक्ताधान की बात आती है तो यह विशिष्ट महत्त्व रखता है।

यदि आप रीसस धनात्मक है (RhD), तो यह दर्शाता है कि आपके लाल रक्त कोशिकाओं की सतह पर D प्रतिजन है।

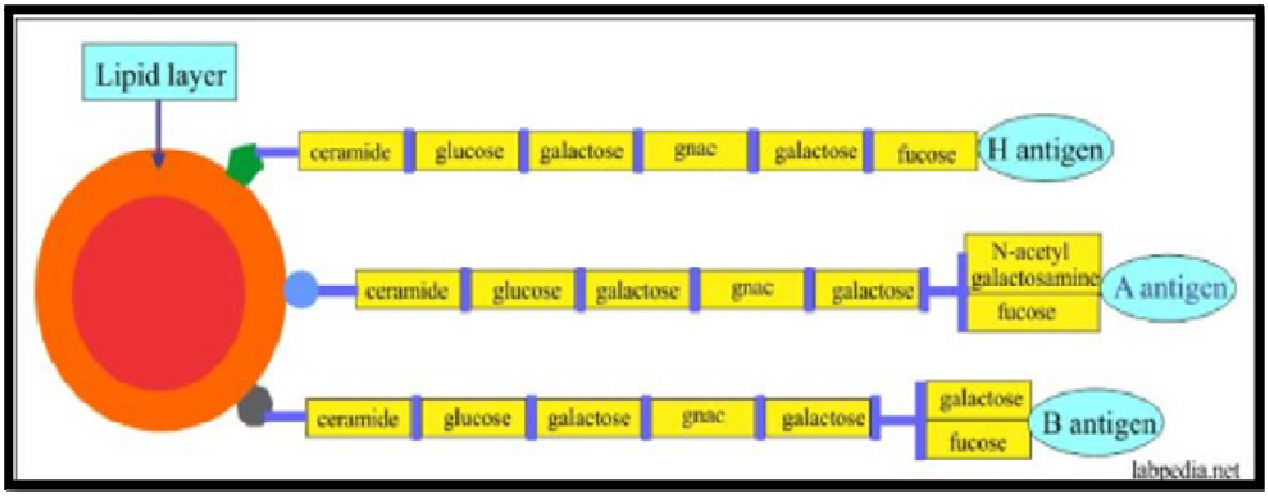
रुधिर वर्ग प्रणाली (ABO) की खोज 1900 में कार्ल लैंडस्टीनर ने की थी। रुधिर वर्ग निर्धारण की कई प्रणालियां हैं, किन्तु चार प्रमुख रुधिर वर्गों A, B, AB तथा O के साथ ABO रुधिर वर्ग तथा RhD (रीसस कारक) प्रणाली सार्वभौमिक हैं। रुधिर वर्ग O को **सार्वत्रिक दाता** कहा जाता है, क्योंकि यह अन्य सभी वर्गों को रुधिर दान कर सकता है, तथा AB रुधिर वर्ग को **सार्वत्रिक ग्राही** कहा जाता हैं, क्योंकि यह अन्य सभी वर्गों से रुधिर प्राप्त कर सकता है। ये लाल रुधिर कणिका की सतह पर दो प्रतिजनों की उपस्थिति पर निर्भर होते हैं, जैसे प्रतिजन A और प्रतिजन B। ये प्रतिजनी घटक, ग्लाइकोप्रोटीन या ग्लाइकोलिपिड होते हैं, जिनमें अंतस्थ शर्करा फ्यूकोस होती है, जिसे H प्रतिजन के रूप में जाना जाता है, जो A और B जीन के नियंत्रण में होता है तथा विशिष्ट एंजाइम के संश्लेषण के लिए उत्तरदायी होते हैं । O जीन, H पदार्थ को रूपांतरित नहीं करता है।

H प्रतिजन (H Antigen) विभिन्न प्रकार के प्रतिजन 21 जो विविध जैविक कार्य करते हैं में से एक हो सकता है। यह मानव में 19 वें गुणसूत्र पर स्थित होता है और विभिन्न प्रकार के कार्य करता है। यह प्रत्येक रक्त वर्ग के प्रतिजन के लिए पूर्वरूप भी है। इसे पदार्थ H के रूप में भी जाना जाता है।

उद्देश्य

इस अभ्यास के अंत में, आप इस योग्य हो जाएगें कि :

- रक्त वर्ग निर्धारण के लिए स्लाइड बना सकें; और
- समूहन अभिक्रिया के सिद्धांत का वर्णन कर सकें।



चित्र 4.1 : रुधिर वर्ग प्रतिजन संरचना।

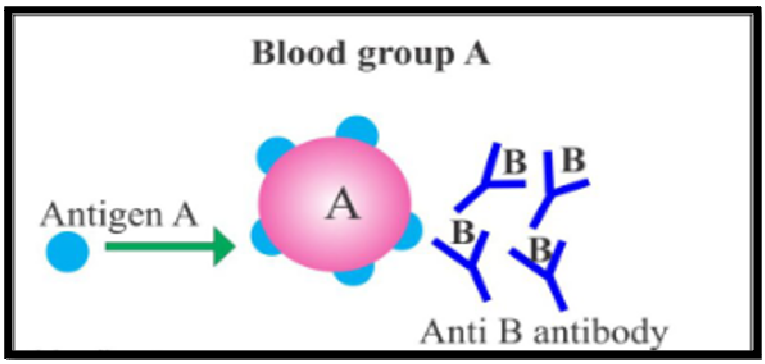
4.2 आवश्यक सामग्री

- एल्कोहॉल कूर्ची
- तीक्ष्णदन्त सुई
- स्वच्छ कांच की गर्त स्लाइड
- निर्जमित रुई का टुकड़ा
- रुधिर का नमूना
- दन्तखोदनी
- एकक्लोनी प्रतिरक्षी (प्रति–A, B, और D)
- जैविक अपशिष्ट निस्तारण पात्र

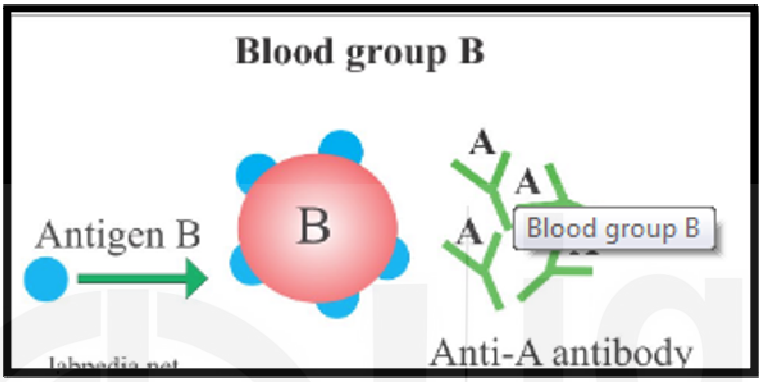
4.3 सिद्धांत

ABO और Rh रुधिर वर्ग प्रणाली, आश्लेषण अभिक्रिया पर आधारित होता है। यह देखा गया है कि जब लाल रुधिर कणिका में एक या दोनों प्रतिजन होते हैं, तथा वे समकक्ष प्रतिरक्षी के संपर्क में आते हैं तो, वे परस्पर क्रिया कर दृश्य आश्लेषण/समूहन बनाते हैं। यह प्रतिजन, O–सहलग्न ग्लाइकोल–प्रोटीन हैं, और लाल रुधिर कणिका की सतह पर उपस्थित होने वाले अन्तस्थ शर्करा अवशिष्ट यह निर्धारित करते हैं कि प्रतिजन A या B है। Rh प्रतिजन पार–झिल्ली प्रोटीन हैं, और लाल रुधिर कणिका की सतह पर उपस्थित पाश अपने अनुरूपी प्रतिरक्षी के साथ क्रिया करते हैं। सम्बंधित प्रति–A और प्रति–B प्रतिरक्षी, प्रतिरक्षित–ग्लोबुलिन के IgM वर्ग से हैं। रुधिर वर्ग A वाले व्यक्तियों में लाल रुधिर कणिका पर A–प्रतिजन और सीरम में प्रति–B प्रतिरक्षी होते हैं। इसी प्रकार, रुधिर वर्ग B के व्यक्तियों में लाल रुधिर कणिका पर B–प्रतिजन और सीरम में प्रति–A प्रतिरक्षी होते हैं। रुधिर वर्ग AB के मामले में, लाल रुधिर कणिका पर A और B दोनों प्रतिजन और सीरम में न तो प्रति–A और न ही प्रति–B प्रतिरक्षी होते हैं। अंत में O रुधिर वर्ग के व्यक्तियों में न तो A–प्रतिजन और न ही B–प्रतिजन होते हैं, लेकिन सीरम में प्रति–A और प्रति–B दोनों प्रतिरक्षी होते हैं। संबंधित प्रतिजन और प्रतिरक्षी एक ही व्यक्ति में कभी नहीं पाए जाते हैं, क्योंकि जब ये मिश्रित होते हैं, तो प्रतिजन–प्रतिरक्षी सम्मिश्र बनाते हैं, जो प्रभावी रूप से रुधिर में समूहीकरण को बढ़ाते हैं। Rh प्रतिजन वाले व्यक्तियों का रुधिर वर्ग धनात्मक होता है, जबकि जिन व्यक्तियों में इस प्रतिजन की अनुपस्थिति होती है, उनका रुधिर वर्ग ऋणात्मक होता है।

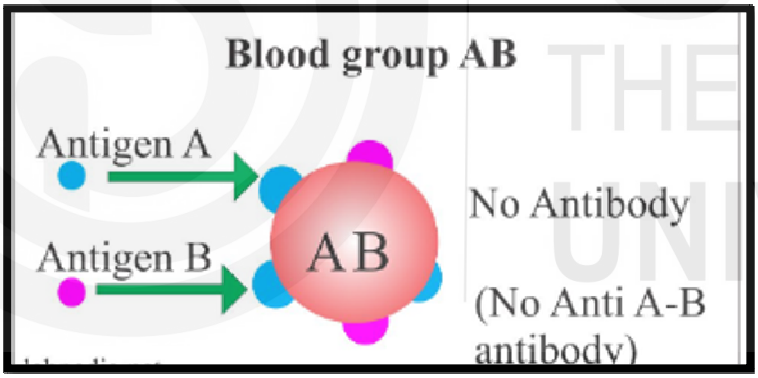
IGM मुख्य रूप से रक्त और लसीका द्रव्य में पाया जाता है, यह नया संक्रमण मिलने पर शरीर द्वारा बनाया गया पहला प्रतिरक्षी है।



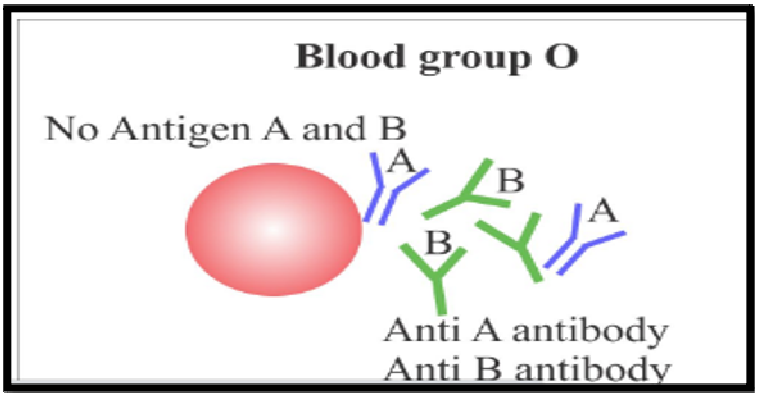
चित्र 4.2 : रुधिर वर्ग A, में A–प्रतिजन और B–प्रतिरक्षी है।



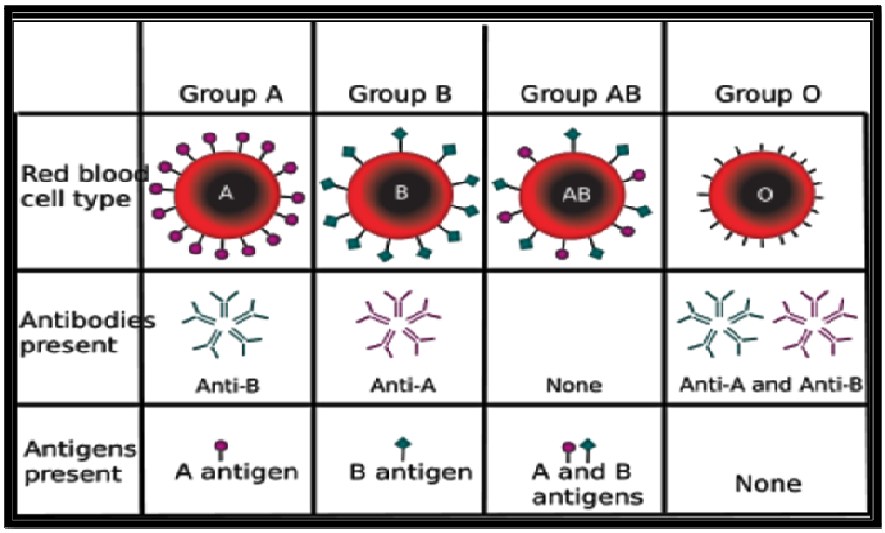
चित्र 4.3 : रुधिर वर्ग B, में B–प्रतिजन और A–प्रतिरक्षी है।



चित्र 4.4 : रुधिर वर्ग AB, में A–प्रतिजन तथा B–प्रतिजन है और कोई प्रतिरक्षी नहीं होता हैं।



चित्र 4.5 : रुधिर वर्ग O में कोई प्रतिजन नहीं होता है तथा प्रतिरक्षी –A तथा प्रतिरक्षी –B होता है।



चित्र 4.6 : प्रतिजन और अनुरूपी प्रतिरक्षी।

4.4 कार्यविधि

एकक्लोनी प्रतिरक्षी, वह प्रतिरक्षी है जो सफेद रक्त कोशिका का क्लोन (प्रतिरूप) कर के बनाई गई है। इसके पश्चात् प्राप्त सभी प्रतिरक्षी, एक विशिष्ट मातृ कोशिका का अनुरेखण करते है।

1. कांच की साफ स्लाइड लें और एक गर्त को प्रति–A, दूसरे को प्रति–B और तीसरे को प्रति–D के रूप में चिह्नित करें।
2. एकक्लोनी प्रतिरक्षी (MAB) किट को खोले और ड्रॉपर की सहायता से पहले गर्त में प्रति–A, दूसरे गर्त में प्रति–B और तीसरे गर्त में प्रति–D डाले।
3. स्लाइड को सुरक्षित रूप से एक तरफ रख दें।
4. अनामिका को धीरे से सिरे के पास रगड़ें और एल्कोहॉल कूर्ची से साफ करें।
5. अनामिका के सिरे को तीक्ष्णदन्त सुई की सहायता से साफ़ किये हुए सिरे पर छिद्रित करे और रुधिर की पहली बूंद को पोंछ लें।
6. जैसे ही रुधिर का स्राव होने लगे, इसे कांच की स्लाइड पर तीनो गर्तों पर गिरने दें।
7. दवाब लगाकर रुधिर स्राव को रोकें और जरूरत पड़ने पर रुई के टुकड़े का इस्तेमाल करें।
8. दन्तखोदनी की सहायता से रुधिर के नमूनों को धीरे से मिलाएं और एक मिनट तक प्रतीक्षा करें।
9. परिणामों का निरीक्षण करें।

चित्र 4.7 : एकक्लोनी प्रतिरक्षी (MAB) किट।

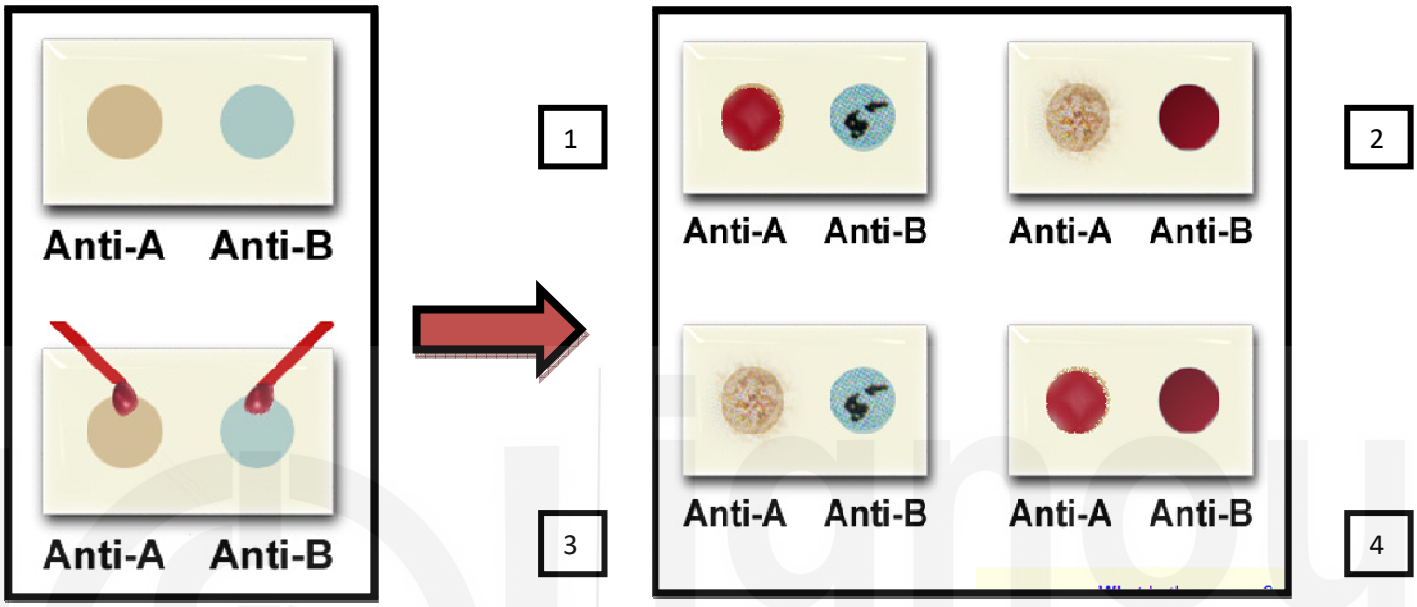
4.5 प्रेक्षण और विवेचना

स्लाइड को बारीकी से देखकर परिणाम पढ़े जा सकते हैं। विवेचना इस प्रकार की जा सकती है:

- रुधिर वर्ग A यदि प्रति–A परीक्षण सीरम के साथ समूहन हुआ हो;

- रुधिर वर्ग B यदि प्रति–B परीक्षण सीरम के साथ समूहन हुआ हो;
- रुधिर वर्ग AB यदि दोनों परीक्षण सीरम के साथ समूहन हुआ हो, और
- रुधिर वर्ग O यदि दोनों में से किसी में भी समूहन नहीं हुआ हो।

इन्हें नीचे दिए गए स्लाइड चित्रों में देखा जा सकता है (चित्र 4.8) :



चित्र 4.8 : परिणामों का अवलोकन .... 1–प्रकार B, 2–प्रकार A, 3–प्रकार AB और 4–प्रकार O।

4.6 परिणाम

एकत्रित रुधिर का नमूना, रक्त वर्ग ..... से सम्बंधित हैं।

4.7 सावधानियाँ

1. उपयोग करने से पहले उपकरण को साफ करें।
2. उंगली को एल्कोहॉल कूर्ची से अच्छी तरह साफ करें।
3. रुधिर की बूंद को प्रतिसीरम के साथ अच्छी तरह मिलाएं।
4. परिणामों को बहुत ध्यान से पढ़ें।
5. एल्कोहॉल कूर्ची, तीक्ष्णदन्त सुई, रुई तथा दन्तखोदनी को उपयोग के पश्चात् जैविक अपशिष्ट निस्तारण पात्र में निस्तारित करे।

चित्रों के लिए आभार

1. चित्र 4.5: https://www.labpedia.net/blood-banking-part-1.
2. चित्र 4.6: http://nbtc.naco.gov.in/assets/resources/training/5.pdf.

अभ्यास 5

फार्म नस्ल पशुओं/कोशिका वंशों के प्लीहाणुओं की कोशिका गणना और जीवन क्षमता का परीक्षण

रूपरेखा

5.1 प्रस्तावना
उद्देश्य
5.2 आवश्यक सामग्री
5.3 सिद्धांत
5.4 कार्यविधि
5.5 प्रेक्षण
5.6 परिचर्चा
5.7 सावधानियाँ
5.8 अंत में कुछ प्रश्न

5.1 प्रस्तावना

प्लीहाणु भिन्न प्रकार की श्वेत रक्त कोशिओं में एक हो सकती है जब तक यह प्लीहा में स्थित हो या प्लीहा ऊतकों से शोधित किया गया हो। प्लीहाणु में भिन्न प्रकार की कोशिका समष्टि होती है जैसे T और B लसीकाणु, द्रुमाकृतिक के समान कोशिकाएँ (Dendrite cells)। ये कोशिकाएं भिन्न प्रकार के प्रतिरक्षी कार्य करती है। कोशिका निलंबन या कोशिका वंश संवर्धन तंत्र में उपस्थित जीवनक्षम कोशिकाओं की संख्या निर्धारित करने के लिए ट्रिपैन ब्लू रंजक अपवर्जन परीक्षण का उपयोग किया जाता है। निलंबन में उपस्थित जीवनक्षम कोशिकाओं को गिना जाता है, और उपस्थित कुल कोशिकाओं के प्रतिशत के रूप में व्यक्त किया जाता है। जीवन क्षमता परीक्षण का एक आवर्ती आंकलन, हिमीकरण या कोशिका माध्यम तंत्र के सामान्य प्रदर्शन से पहले, कोशिकाओं की गुणवत्ता पर आधारभूत जानकारी प्रदान करता है।

उद्देश्य

इस अभ्यास को पूरा करने के बाद, आप इस योग्य हो जाएँगे कि :

- ❖ लसीकाभ अंगों से कोशिका निलंबन तैयार कर सकें; और
- ❖ जीवित कोशिकाओं और मृत कोशिकाओं में विभेदन कर सकें।

5.2 आवश्यक सामग्री

- **उपकरण**

रक्तकोशिकामापी (हीमोसाइटोमीटर) (चित्र 5.1 और 5.2),

टैली काउंटर,

सूक्ष्मपिपेट,

सूक्ष्मदर्शी,

कैंची,

चिमटी,

खरल और मूसल,

पेट्रीडिश,

विच्छेदन ट्रे,

अपकेंद्रण नलिका,

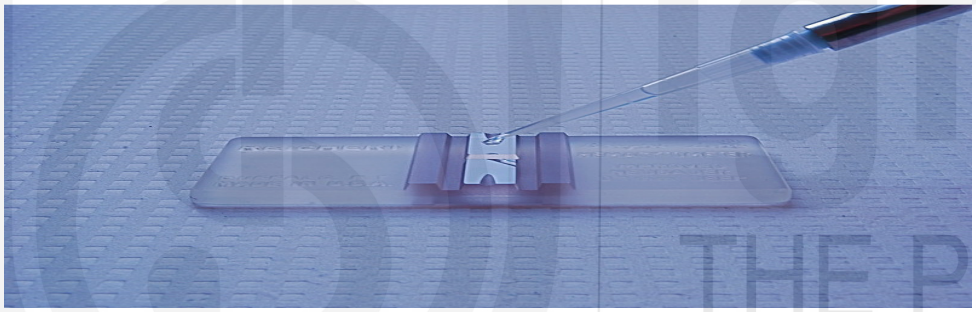
अपकेंद्रण यंत्र।

- **अभिकर्मक**

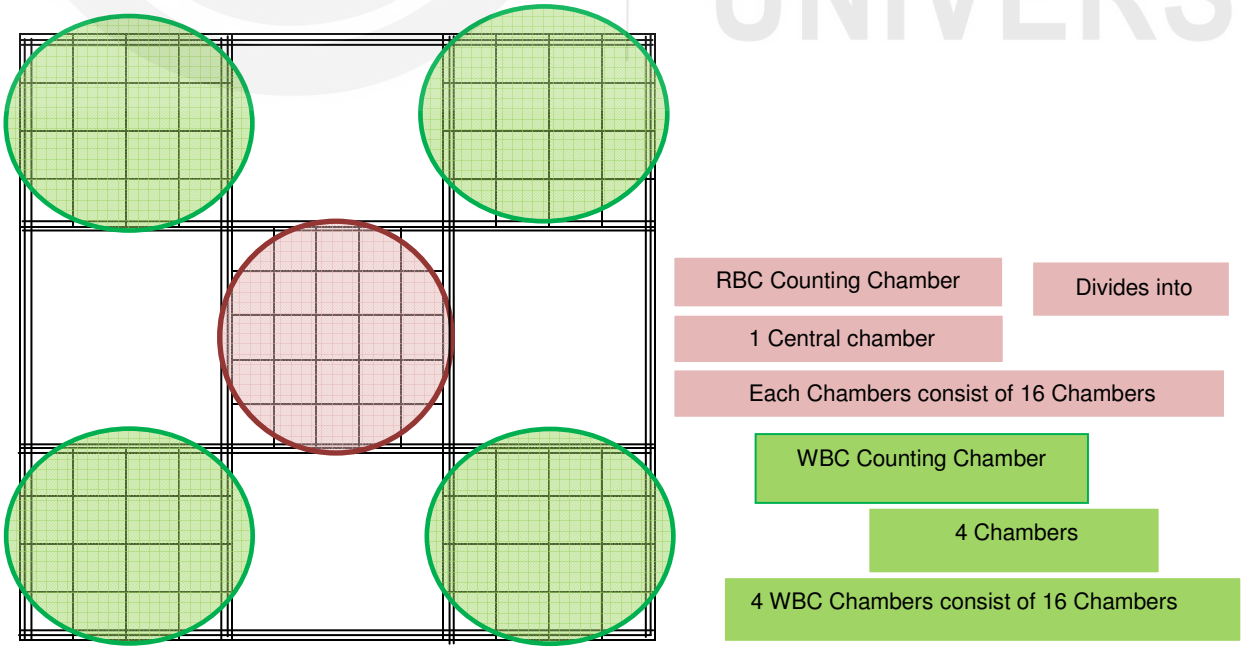
पीबीएस में 0.4 : ट्रिपैन ब्लू अभिरंजक,

पीबीएस (pH = 7.5),

फार्म नस्ल चूहे/कोशिका वंश। (*लाल रुधिर कणिका लयन बफर : 0.1% अमोनियम क्लोराइड)

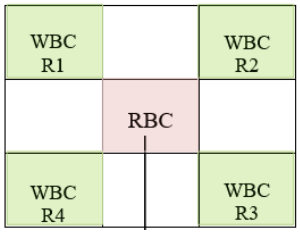


चित्र 5.1 : हीमोसाइटोमीटर (केंद्र में ग्रिड वाली एक मोटी कांच की स्लाइड जिसमें कोशिकाओं की गिनती के लिए नमूना लोड किया जाता है)



चित्र 5.2 : a) विभिन्न श्वेत रुधिर कणिका (हरा) और लाल रुधिर कणिका (लाल) गणन कोष्ठ दिखाता हुआ चित्र।

5.3 सिद्धांत



चित्र 5.2 b : श्वेत रूधिर कणिका और लाल रूधिर कणिका की हेमोसाइटोमीटर में गिनती को योजना बद्ध तरीके से दर्शाता हुआ चित्र।

ट्रिपैन ब्लू एक सामान्य जैव अभिरंजक है, जिसका उपयोग जीवित कोशिकाओं को मृत कोशिकाओं से पृथक करने के लिए किया जाता है। प्लीहाणुओं का जीवन क्षमता परीक्षण, ट्रिपैन ब्लू अभिरंजक को उपापचयन करने की जीवित कोशिकाओं की क्षमता पर आधारित है, और इस तरह यह, एक सूक्ष्मदर्शी द्वारा देखे जाने पर रंगहीन दिखाई देता है। हालांकि, अभिरंजक के संचय होने से मृत कोशिकाएं हल्के नीले रंग की दिखाई देती हैं। ट्रिपैन ब्लू अभिकर्मक में कोशिकीय प्रोटीन की तुलना में सीरम प्रोटीन के लिए उच्च बंधुता होती है। इसलिए, उच्च सीरम स्थितियों में संवर्धित कोशिकाओं और/या लसीकाभ अंगों से कोशिकाओं के निष्कर्षण को, नमूना/निलंबन से सीरम को हटाने के लिए एक उपयुक्त नमक विलयन में अपकेंद्रित और निलंबित कर दिया जाता है। यह कोशिका गणना के यथार्थ पठन के लिए एक पूर्वापेक्षा है, क्योंकि निलंबन में सीरम की उपस्थिति, सूक्ष्मदर्शी के अंतर्गत कोशिकाओं की दृश्यता से समझौता करते हुए, निलंबन में अभिरंजन के उपपादन को प्रस्तुत करेगी। ट्रिपैन ब्लू अभिरंजक में प्लीहाणुओ की जीवन क्षमता समयबद्ध है। इसलिए, कोशिका की जीवन क्षमता की गणना एक विशिष्ट समय के अंतर्गत पूर्ण होनी चाहिए।

5.4 कार्यविधि

i. चूहे को संवेदनाहीन करना (Anaesthetization)

संवेदनाहरण कक्ष के तल पर रखे टिशू पेपर या रुई में 5–10 मिली आइसोफ्लोरेन मिलाएं।

चूहे को कक्ष में रखें

सांस कम होने पर चूहे को हटा दें

↓

ii. चूहे की धीरे–धीरे मृत्यु (Euthanize)

चूहे को गर्दन के पिछले हिस्से से मजबूती से पकड़ें

अब, दूसरे हाथ से पूंछ को तब तक खींचे जब तक आपको झटका महसूस न हो

रीढ़ की हड्डी से कपाल के अलग होने का निरीक्षण करें।

↓

iii. लैपरोटोमी (उदर भित्ति का कर्तन)

70% एल्कोहॉल के साथ फर भीगने के बाद चूहों को विच्छेदन

अगले और पिछले पैरों के मध्य (उदर गुहा में बायीं ओर) त्वचा में एक छोटा चीरा लगाएं

(कैंची और चिमटी की एक जोड़ी का प्रयोग करें)

↓

चूहे की त्वचा को पूरी तरह से हटा दें, और पेरिटोनियल गुहा खोलें

चिमटी का उपयोग करके प्लीहा निकालें

प्लीहा, वृक्क की तुलना में चपटी तथा लम्बी होती है, और सेम के बीज के रंग की होती है

↓

iv. ऊतक समांगीकरण और कोशिका संग्रह

प्लीहा को काट कर निकाल ले और ठंडे PBS (pH = 7.4) में रखे

प्लीहा को भिगोये और बलपूर्वक, 90 मिमी नायलॉन जाल से गुजरने के लिए दबाएं

एक खरल और मूसल में प्लीहा को कुचले

खरल को ठंडे PBS (pH = 7.4) के साथ साफ़ करें और 15 मिलीलीटर निर्जर्मीकृत नलिका में स्थानांतरित करें

10 मिनट के लिए 1100 rpm पर निलंबन को अपकेंद्रित करे

अधिप्लवी (supernatant) को छोड दें और 1 मिलीलीटर लाल रुधिर कणिका लयन बफर (Lysis Buffer) में टिकिया को फिर से निलंबित करें

कमरे के तापमान पर 5-10 मिनट के लिए उष्मित करे

9 मिलीलीटर PBS मिलाये और 10 मिनट के लिए 1100 rpm पर अपकेंद्रित करे

अधिप्लवी को हटा दे और 1 मिलीलीटर PBS में टिकिया को फिर से निलंबित करें

0.4% ट्रिपैन ब्लू विलयन की सहायता से कोशिका निलंबन को तनुकृत करे (1:1 अनुपात में और अच्छी तरह मिलाएँ)

↓

v. कोशिका गणना

हीमोसाइटोमीटर और कवर स्लिप को 70% इथेनॉल के साथ साफ करें

हीमोसाइटोमीटर ग्रिड को सूक्ष्मदर्शी के नीचे 10X या 40X आवर्धन पर फोकस करें

पिपेट में 10 µL ट्रिपैन ब्लू – कोशिका मिश्रण लें तथा हीमोसाइटोमीटर में कवर स्लिप के किनारे पर डाले

10X पर सूक्ष्मदर्शी के तहत हीमोसाइटोमीटर को देखे और फिर 40X आवर्धन पर गणना करे

जीवनक्षम (जीवित) और मृत कोशिकाओं को या तो लाल रुधिर कणिका गणना कोष्ठ में या श्वेत रुधिर कणिका गणना कोष्ठ में गिनें

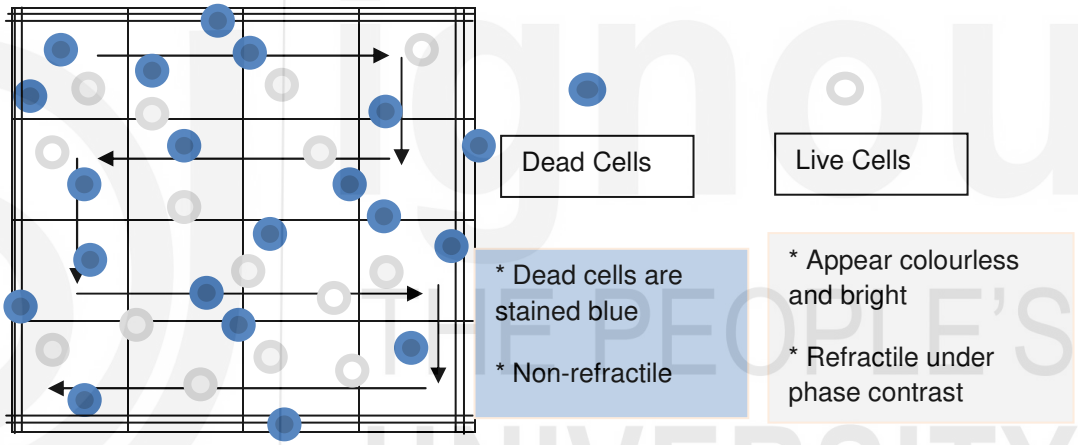
↓

कुल कोशिका गणना को रिकॉर्ड करें

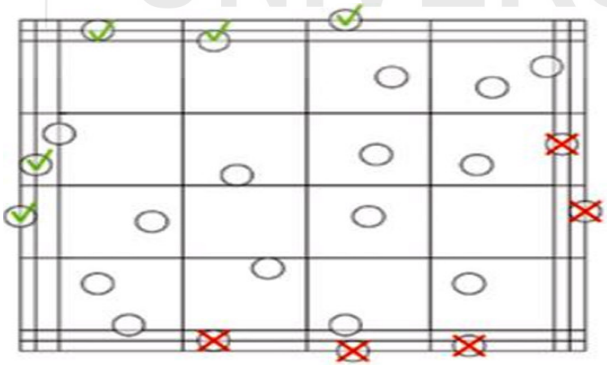
5.5 प्रेक्षण

हीमोसाइटोमीटर का उपयोग करके प्लीहाणुओं की गणना की जाती है। चित्र 5.3 a एक श्वेत रुधिर कणिका कोष्ठ को दिखाता है (बड़े बड़े वर्ग के रूप में) जिसमें में 16 छोटे वर्ग होते हैं, जहाँ हम दो प्रकार की कोशिकाओं का निरीक्षण कर सकते हैं। एक है नीली अभिरंजित कोशिका (मृत कोशिका), और दूसरी है बिना अभिरंजन वाली कोशिका (जीवित कोशिका)। चित्र 5.3b दर्शाता है कि, प्लीहाणुओं की गणना करते समय किस प्रकार की कोशिकाओं पर विचार किया जाना चाहिए। सभी प्लीहाणुओं (जीवित/मृत कोशिकाओं) को 4 श्वेत रुधिर कणिका कोष्ठो में गिना जाता है (चित्र 5.4)। प्रति मिलीलीटर कोशिकाओं की सांद्रता के आकलन के लिए, सूत्र का उपयोग किया जाता है (4 श्वेत रुधिर कणिका कोष्ठों में गणना की गई कोशिकाओं की कुल संख्या का औसत **X** तनुता गुणांक **X** 10^4।

तनुता गुणांक को **2** के रूप में लिया जाता है, क्योंकि कोशिका निलंबन, प्लीहाणुओं और ट्रिपैन ब्लू रंजक, दोनों को बराबर मात्रा में लेकर तैयार किया जाता है)। चित्र 5.5 में आप जीवनक्षम कोशिकाओं और अजीवनक्षम कोशिकाओं के वास्तविक चित्र देख सकतें है।



चित्र 5.3 : a) तीर श्वेत रुधिर कणिका कोष्ठ (16 छोटे कोष्ठो वाले) में से एक में कोशिकाओं की गणना की दिशा दिखाते हैं।



चित्र 5.3 : b) श्वेत रुधिर कणिका कोष्ठ दिखा रहा है, कि गिनती करते समय किन प्लीहाणुओं पर विचार किया जाना चाहिए। हरे रंग का निशान इंगित करता है, कि उन प्लीहाणुओ को गिनना चाहिए। जो ऊपर और बाईं ओर मध्य को छूते हैं लाल क्रॉस इंगित करता है, कि नीचे और दाईं ओर मध्य रेखा को छूने वाले प्लीहाणुओ को गणना से बाहर करें।

परिकलन

प्रति मिलीलीटर मात्रा में कोशिकाओं की सांद्रता :

एक बड़े वर्ग में कोशिकाओं की औसत संख्या = x

तनुता गुणांक = 2 (1:1)

सेमी से मिलीलीटर में रूपांतरण गुणांक = 10^4

1 वर्ग का आयतन = 1 मिमी^{2} (लंबाई x चौड़ाई) x 0.1 mm (गहराई)

= 0.1 सेमी x 0.1 सेमी x 0.01 सेमी

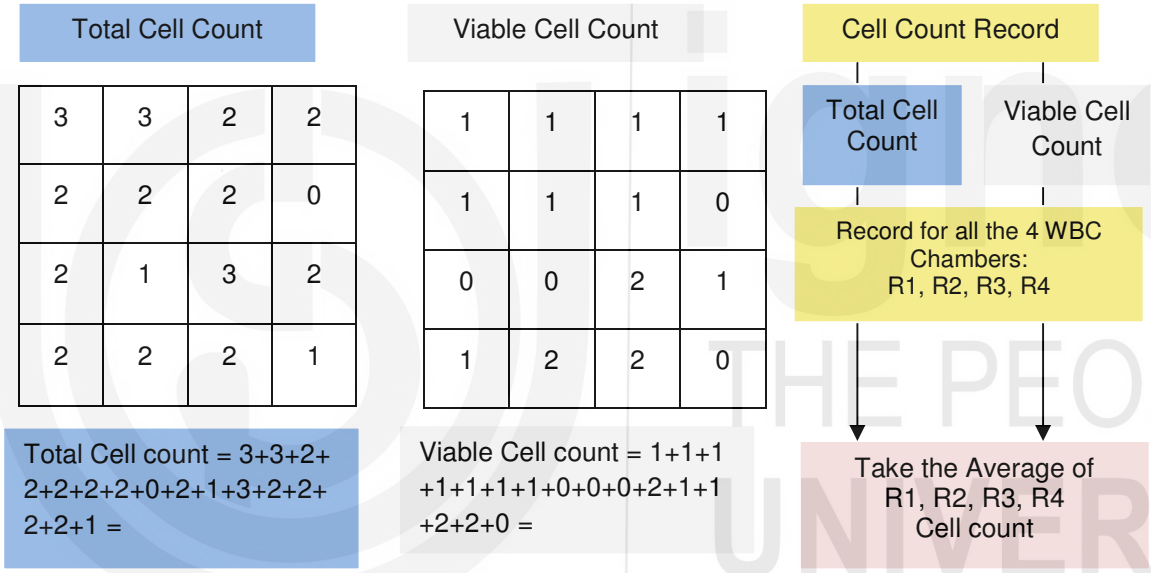
= 0.0001 सेमी^{3}

= 10^{-4} सेमी^{3}

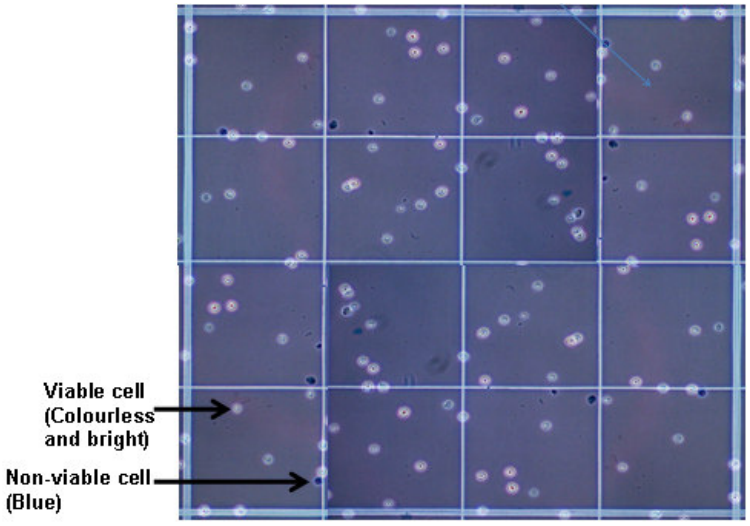
= 10^{-4} मिली

कोशिका जीवन क्षमता = $\frac{\text{जीवनक्षम कोशिकाओं की संख्या}}{\text{कुल गिनी गयी कोशिकाएं}} \times 100$

= % जीवनक्षम कोशिकाएं



चित्र 5.4 : कोशिका जीवन क्षमता की गणना के लिए कोशिका गणना की प्रक्रिया और रिकॉर्डिंग का चित्रण।



चित्र 5.5 : नमूनों से भारित एक श्वेत रुधिर कोशिका कोष्ठ में से एक वास्तविक चित्र, जहां विभिन्न जीवनक्षम और मृत कोशिकाओं को देखा जा सकता है।

5.6 परिचर्चा

कोशिका माध्यम व्यवस्थापन में इष्टतम कोशिका के अस्तित्व और वृद्धि का आकलन करने के लिए ट्रिपैन ब्लू परीक्षण एक अच्छा उपाय है। सामान्यतः 95% से अधिक या उसके बराबर जीवनक्षम गणना को अत्युत्तम माना जाता है। कभी–कभी ट्रिपैन ब्लू विसरित वस्तुओं के निर्माण को प्रेरित कर सकता है, जिसे गलती से कोशिकाओं के रूप में पहचाना जा सकता है। इस तरह के उदाहरणों से अधिआकलन हो सकता है। हालांकि गलत गणना और कोशिका की गणना के सीमित समय के मुद्दे उपस्थित हैं, 80% से कम की जीवन क्षमता को अल्प माना जा सकता है।

5.7 सावधानियाँ

1. चूहों और ट्रिपैन ब्लू अभिरंजक को कार्य में लेते समय दस्ताने जैसे व्यक्तिगत सुरक्षा उपकरणो के उपयोग की अनुशंसा की जाती है।
2. PBS विलयन को 4°C पर रखना चाहिए।
3. जब उपयोग में न हों, कोशिका निलंबन को बर्फ या 4°C में रखें।
4. प्लीहा को ध्यान से पहचानें, इसे वृक्क से न भ्रमित करें।
5. 15 मिनट के भीतर कोशिका की गणना पूर्ण करें।

5.8 अंत में कुछ प्रश्न

1. ट्रिपैन ब्लू एक सामान्य जैव अभिरंजक है, जिसका उपयोग कोशिका का ..... परीक्षण करने के लिए किया जाता है
   a) जीवन शक्ति
   b) जीवन क्षमता
   c) परिवर्तनशीलता
   d) प्रकार
2. मृत कोशिका को ट्रिपैन ब्लू द्वारा अभिरंजित कर देने से यह सूक्ष्मदर्शी के नीचे ..... रंग में दिखाई देती है।
3. हम कोशिका जीवन क्षमता परीक्षण में ट्रिपैन ब्लू अभिरंजक का उपयोग क्यों करते हैं?
4. कोशिका जीवन क्षमता का आकलन करने का उद्देश्य बताएं।
5. लाल रुधिर कणिका और श्वेत रुधिर कणिका/प्लीहाणुओ के गणना कोष्ठो के मध्य अंतर स्पष्ट करें।
6. आप जीवित कोशिकाओं से मृत कोशिकाओं की पहचान कैसे करेंगे?

7. क्या हम कोशिका जीवन क्षमता परीक्षण करने के लिए प्लीहा के अतिरिक्त अन्य अंगों का उपयोग कर सकते हैं?

8. लसीकाभ अंग से निष्कर्षित कोशिकाओं को एक उपयुक्त लवण के विलयन में क्यों निलंबित कर दिया जाता है?

9. "ट्रिपैन ब्लू अभिरंजन एक समयबद्ध अभ्यास है।" इसका औचित्य लिखिए।

चित्रों के लिए आभार

Illustration are drawn/Photographs are clicked by the authors of this Exercise.

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

अभ्यास 6

एंजाइम सहलग्न प्रतिरक्षा शोषक आमापन (ELISA)

रूपरेखा

6.1 प्रस्तावना

उद्देश्य

6.2 आवश्यक सामग्री

6.3 सिद्धांत

6.4 कार्यविधि

6.5 प्रेक्षण

6.6 सावधानियाँ

6.7 अंत में कुछ प्रश्न

6.1 प्रस्तावना

एलाइज़ा तकनीक हार्मोन, पेप्टाइड्स, प्रोटीन और प्रतिजन की पहचान और प्रमाणीकरण हेतु एक संवेदनशील प्रतिरक्षा–रसायनिक तकनीक है। यह व्यापक रूप से चिकित्सा में निदानसूचक के रूप में उपयोग की जाती है, तथा उद्योगों और अनुसंधान में गुणवत्ता नियंत्रण का एक उपाय है। आमापन को एक ठोस–आधात्री पर एंजाइमों का उपयोग करके किया जाता है, जो एक प्रतिरक्षी से सम्बद्ध होते हैं, और पहचानने हेतु एक चिन्हक के रूप में काम करता है। इसलिए, एलाइज़ा को ठोस–प्रावस्था एंजाइम प्रतिरक्षा आमापन के रूप में भी जाना जाता है।

उद्देश्य

इस अभ्यास को पूरा करने के बाद आप इस योग्य हो जाएगें कि :

- ❖ एलाइज़ा के सिद्धांत और प्रतिरक्षा–प्रमात्रीकरण तकनीक का वर्णन कर सकें; और
- ❖ पेप्टाइड, प्रोटीन, प्रतिरक्षी और हॉर्मोन का पता लगा सकें और मात्रा निर्धारित कर सकें।

6.2 आवश्यक सामग्री

- एलाइज़ा प्लेट (चित्र 6.1),
- प्रतिजन,

- मानक बहुक्लोनी प्रति–सीरम / प्रतिजन–विशिष्ट एकक्लोनी प्रतिरक्षी,
- प्रतिजन के लिए विशिष्ट निम्न और उच्च अनुमापक सीरम,
- सबस्ट्रेट विलयन,
- लेपित बफर (pH 9.6),
- वाशिंग बफर (Washing buffer) (pH 7.4),
- विराम विलयन (1M H_2SO_4),
- 1.5: मखनिया दूध–पाउडर विलयन (Skimmed milk powder solution) और / 0.5% BSA गो–सीरम एल्बूमिन।

विलयन की तैयारी

लेपित बफर (pH 9.6)

0.29 ग्राम सोडियम बाइकार्बोनेट + 0.15 ग्राम सोडियम क्लोराइड + 0.02 ग्राम सोडियम एज़ाइड, का वज़न करें और आसुत जल में घोलें, जिससे मात्रा 1 लीटर हो जाए।

सबस्ट्रेट विलयन

1.45 ग्राम डाइसोडियम हाइड्रोजन फॉस्फेट + 8.0 ग्राम सोडियम क्लोराइड + 0.20 ग्राम पोटेशियम क्लोराइड + 0.20 ग्राम पोटेशियम डाइहाइड्रोजन फॉस्फेट, वजन करें और इसे 1 लीटर आसुत जल में घोले, और इसमें 500 µL TWEEN-20 मिलाये।

फॉस्फेट बफर लवण (PBS) – pH 7.2, 0.15 M

500 मिलीलीटर आसुत जल में घोलें

8 ग्राम सोडियम क्लोराइड + 0.2 ग्राम पोटेशियम क्लोराइड + 1.15 ग्राम डाइसोडियम हाइड्रोजन फॉस्फेट + 0.2 ग्राम पोटेशियम डाइहाइड्रोजन फॉस्फेट

pH को 7.2 समायोजित करें और आसुत जल को मिला कर मात्रा को 1000 मिलीलीटर तक बनाएं।

साइट्रेट बफर – pH 5.0, 0.1 M :

0.1 M साइट्रिक एसिड का 33 मिलीलीटर + 0.1 M सोडियम साइट्रेट का 67 मिलीलीटर

ट्रिस–हाइड्रोक्लोरिक अम्ल बफर – pH 7.6, 0.01 M :

आसुत जल में घोलें, **1.21** ग्राम ट्रिस **50** मिलीलीटर में और pH को हाइड्रोक्लोरिक अम्ल के साथ **7.6** में समायोजित करें।

अंतिम मात्रा को **100** मिलीलीटर तक बनाएं। उपयोग करने से पहले **10** बार तनुकृत करें।

एलाइज़ा सबस्ट्रेट

1. **डाइअमिनोबेंज़िडाइन (DAB) :** 10 मिली 0.1M ट्रिस–हाइड्रोक्लोरिक अम्ल बफर (**pH 7.6**) में 6 मिलीग्राम **डाइ** अमाइनबेंज़िडाइन घोलें।

   हाइड्रोजन पेरॉक्साइड के 10µL मिलाये (उपयोग से ठीक पहले)।

2. **ऑर्थो–फेनिल–डाइअमाइन (OPD) :** 100 मिलीलीटर 0.1M सोडियम साइट्रेट बफर (pH 5.0), में 34 मिलीग्राम ऑर्थो–फेनिल डाइअमाइन घोलें।

हाइड्रोजन पेरॉक्साइड के 50µL मिलाये (उपयोग से ठीक पहले)।

चित्र 6.1 : एलाइज़ा प्लेट।

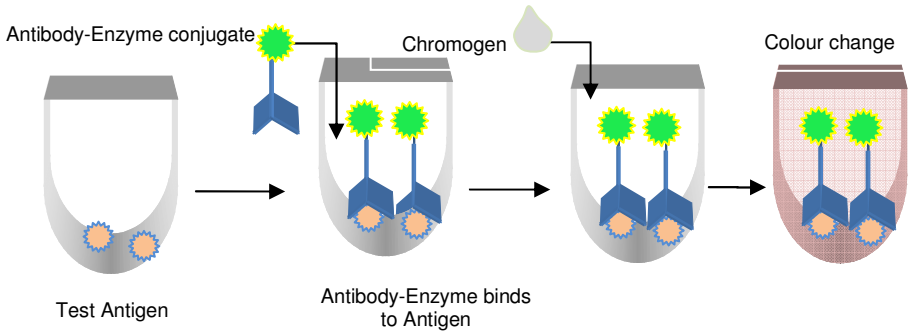
6.3 सिद्धांत

एंजाइम सहलग्न प्रतिरक्षा शोषक आमापन (एलाइज़ा), प्रतिजन के एक विशिष्ट अधिस्थानिक (एपिटोप) के लिए प्रतिरक्षी बंधन के मूल सिद्धांत का पालन करता है। आमापन में तीन प्रमुख अभिक्रियाएँ सम्मिलित हैं। सबसे पहले, विशिष्ट प्रतिरक्षा अभिक्रिया (प्रतिजन–प्रतिरक्षी अभिक्रिया), उसके बाद सबस्ट्रेट (वर्णजन) को एक अघुलनशील रंगीन उत्पाद में परिवर्तित करने की एंजाइमी रासायनिक अभिक्रिया होती है। तीसरी, रंगो के संकेतो की पहचान और रंग की तीव्रता का प्रमात्रीकरण।

एलाइज़ा के चार प्रमुख प्रकार हैं :

- **प्रत्यक्ष एलाइज़ा**

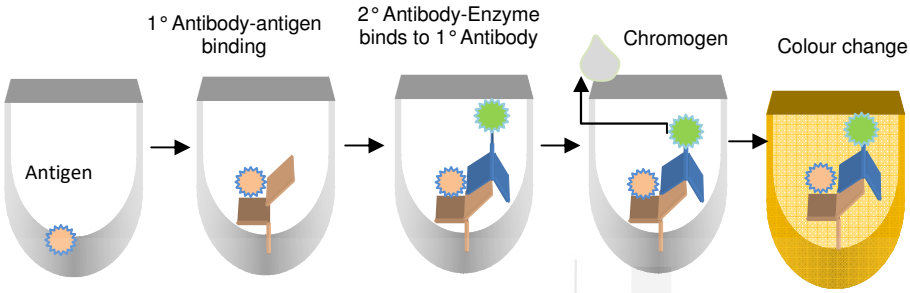
प्रत्यक्ष एलाइज़ा, एलाइज़ा का सबसे सरल रूप है। प्रत्यक्ष एलाइज़ा मे, संयुग्मित एंजाइम के साथ चिन्हित किया गया प्राथमिक प्रतिरक्षी सीधे प्रतिजन से जुड़ता है। वर्णजनिक सबस्ट्रेट के जुड़ने से एंजाइम जल–अपघटन होने पर रंग परिवर्तन होता है (चित्र 6.2)।



चित्र 6.2 : प्रत्यक्ष एलाइज़ा को दर्शाने वाला चित्र। किसी दिए गए जैविक नमूने में प्रतिजन का पता लगाने के लिए, एंजाइम (जैसे, हॉर्स रेडिश परॉक्सीडेज) संयुग्मित प्रतिरक्षी का उपयोग किया जाता है। जब प्रतिजन को पहचान लिया जाता है, तो वर्णजनिक सबस्ट्रेट, रंग उत्पन्न करता है। विशेष तरंग दैर्ध्य पर, एलाइज़ा प्लेट पठन यंत्र नामक मशीन का उपयोग करके रंग की तीव्रता को मापा जा सकता है।

- **अप्रत्यक्ष एलाइज़ा**

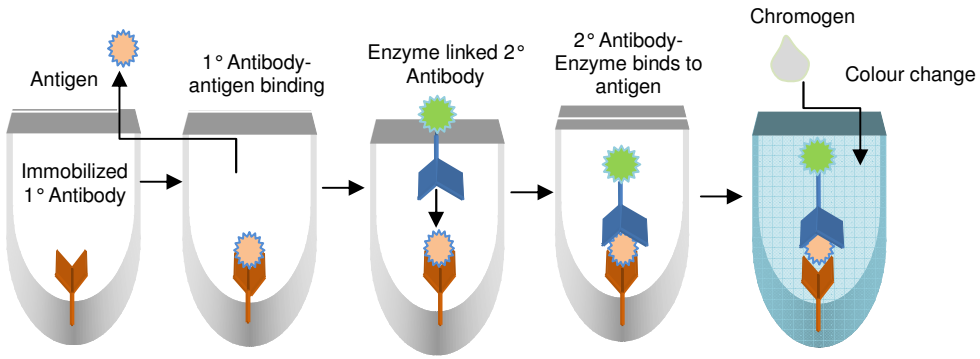
इस तकनीक में, प्रतिजन का पता लगाया जाता है, और मात्रा निर्धारित की जाती है, इसे एक विलेपित प्रतिरक्षी का उपयोग करके प्लेट पर स्थिर किया जाता है, जो विशेष रूप से ठोस प्रावस्था पर प्रतिजन को पकड़ लेता है। एक द्वितीयक प्रतिरक्षी, जिसे एक एंजाइम (प्रतिवेदक एंजाइम कहा जाता है) के साथ चिन्हित किया जाता है, फिर उसे सीधे स्थिर प्रतिजन के साथ जुड़ने दिया जाता है। परीक्षण के नमूने में प्रतिजन की उपस्थिति का पता, प्रतिजन–प्रतिरक्षी–एंजाइम सयुग्म में एक एंजाइम–सबस्ट्रेट (वर्णजन) जोड़ कर लगाया जाता है, जो कि रंग उत्पन्न करता है (चित्र 6.3)।



चित्र 6.3 : प्रतिजन का पता दो चरणों वाली प्रक्रिया द्वारा लगाया जाता है। सबसे पहले, प्रतिजन का पता लगाने के लिए विशिष्ट प्राथमिक प्रतिरक्षी को जोड़ा जाता है, और फिर एंज़ाइम के साथ संयुग्मित माध्यमिक प्रतिरक्षी को द्वितीयक प्रतिरक्षी के साथ जुड़ने की अनुमति दी जाती है। एंजाइम (उदाहरण के लिए हॉर्स रेडिश परॉक्सीडेज) इसके सबस्ट्रेट पर काम करता है, और रंग उत्पन्न करता है, जिसकी तीव्रता को (विशेष तरंग दैर्ध्य पर एलाइज़ा प्लेट पठन यंत्र का उपयोग करके), स्पेक्ट्रम भामितीयत (spectrophoto meterically) रूप से मापा जा सकता है।

- **सैंडविच एलाइज़ा**

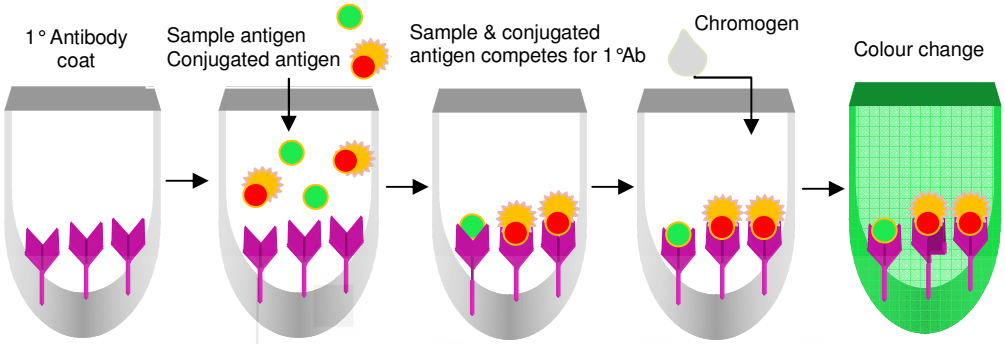
सैंडविच एलाइज़ा में, प्रतिजन को, 1 और 2 प्रतिरक्षियों के बीच सैंडविच किया जाता है। यह आमापन प्रत्यक्ष या अप्रत्यक्ष तरीके से किया जा सकता है। इच्छित प्रतिजन को अवशोषित करने के लिए प्राथमिक प्रतिरक्षी (1^0) को प्लेट पर स्थिर किया जाता है। इसके बाद संसूचन प्रतिरक्षी या द्वितीयक प्रतिरक्षी, जो एंजाइम–संयुग्मित है, को फिर 1^0 प्रतिरक्षी पर जुड़े प्रतिजन के साथ बंधने के लिए प्रस्तुत किया जाता है। वर्णजन सबस्ट्रेट को जोड़ने से एंज़ाइम जल–अपघटन होने पर रंग परिवर्तन होगा, जो 2^0 प्रतिरक्षी के साथ संयोजित है (चित्र 6.4)।



चित्र 6.4 : सैंडविच एलाइज़ा को दर्शाता चित्र मापा जाने वाला प्रतिजन, प्राथमिक और द्वितीयक प्रतिरक्षी के बीच सैंडविच किया जाता हैं, और बाकी की प्रक्रिया वही रहती है, जो पहले बताई गई थी।

स्पर्धी एलाइज़ा

स्पर्धी एलाइज़ा, इस सिद्धांत पर काम करती है, कि परीक्षण प्रतिजन और उसी प्रतिजन का एक संयुग्मित संस्करण, एलाइज़ा प्लेट पर पूर्व–लेपित विशिष्ट प्रतिरक्षी बंधन स्थलों की सीमित संख्या के लिए प्रतिस्पर्धा करेंगे। यह आमापन, लेपित प्रतिजन के लक्ष्य स्थल के लिए प्रतिस्पर्धा करने वाले प्रतिरक्षी द्वारा विपरीत रूप से भी किया जा सकता है। चिन्हित किए गए प्रतिरक्षी नमूने पहले से उपस्थित प्रतिरक्षियों के साथ प्रतिस्पर्धा करेंगे। एक स्पर्धी आमापन में, आमापन से उत्सर्जित होने वाले संकेतों की प्रबलता प्रतिजन या प्रतिरक्षी की सांद्रता के व्युत्क्रमानुपाती होती है (चित्र 6.5)।



चित्र 6.5 : स्पर्धी एलाइज़ा दिखाने वाला आरेख जो प्रतिजन का पता लगाने और मापने के लिए संवेदनशील विभिन्नताएँ प्रदान करता है।

तालिका 6.1 : चार प्रकार की एलाइज़ा विधियों की तुलना।

	प्रत्यक्ष एलाइज़ा	अप्रत्यक्ष एलाइज़ा	सैंडविच एलाइज़ा	स्पर्धी एलाइज़ा
1	यह सबसे तेज़ एलाइज़ा परीक्षण है – इसमें कम चरण, अभिकर्मक होते है और यह कम त्रुटि–प्रवण होता है	यह किफायती है क्योंकि चिन्हित प्रतिरक्षियों की कम आवश्यकता होती हैं	इसमें उच्च विशिष्टता होती है – प्रतिरक्षी का पता लगाने और पकड़ने की क्षमता होती है	नमूना प्रसंस्करण की कोई आवश्यकता नहीं
2	उच्च पृष्ठभूमि ध्वनि – प्रतिजन स्थिरीकरण विशिष्ट नहीं है। कोई पार– अभिक्रिया नहीं	द्वितीयक प्रतिरक्षी से पृष्ठभूमि ध्वनि की संभावना	पार–अभिक्रिया, पकड़े गए और पहचाने गए प्रतिरक्षियों के बीच पृष्ठभूमि ध्वनि पैदा करती है	पार–अभिक्रिया हो सकती है – इस आमापन के लिए प्रतिरक्षी का इष्टतम उपयोग कठिन है
3	कम लचीलापन – विशिष्ट प्रतिजन के लिए विशिष्ट प्रतिरक्षी	उच्च लचीलापन– 1^0 प्राथमिक प्रतिरक्षी की एक विस्तृत श्रृंखला का उपयोग एकल चिन्ह वाले 2^0–प्रतिरक्षी के लिए किया जा सकता है	उच्च लचीलापन – चूंकि प्रत्यक्ष और अप्रत्यक्ष आमापन दोनों को प्रयोग किया जा सकता है	सबसे लचीला – चूंकि प्रत्यक्ष, अप्रत्यक्ष और सैंडविच एलाइज़ा को प्रयोग किया जा सकता है

4	प्रतिजन के प्रति, प्रतिरक्षा प्रतिक्रिया का विश्लेषण करने के लिए आमापन विकल्प	प्रतिरक्षी सांद्रता के निर्धारण के लिए आमापन विकल्प	जटिल प्रतिजन नमूने के विश्लेषण के लिए पसंदीदा आमापन	प्रतिजन का पता लगाने के लिए उत्तम आमापन जो 2 अलग–अलग प्रतिरक्षियों से बंधे नहीं हैं
5	संकेत प्रवर्धन की अनुपस्थिति – कम संवेदनशील	उच्च संवेदनशीलता – संकेत प्रवर्धन	प्रत्यक्ष और अप्रत्यक्ष एलाइज़ा की तुलना में 2–5 गुना अधिक संवेदनशीलता	कम संवेदनशील लेकिन अधिक मजबूत

6.4 कार्यविधि

1. प्रतिजन से एलाइजा प्लेट का विलेपन :

पिपेट की सहायता से, एलाइजा प्लेट के प्रत्येक कूप में 50 µL तनुकृत प्रतिजन डाले

इसे रात भर 4 डिग्री सेल्सियस अथवा 37 डिग्री सेल्सियस पर प्लेट विदोलक पर 1 घंटे के लिए उष्मित करें

प्लेट को वाशिंग बफर से 3 बार धोएं

(प्लेटों को शोषी कागज़ पर पलटें और कूपों में से अवशिष्ट विलयन निकालने के लिए प्लेटों को थपथपाये)

2. प्रथम अभिक्रिया :

पिपेट की सहायता से 50 µL तनुकृत सीरा, प्रतिजन लेपित कूपों में डाले (तीन प्रतियाँ बनाए रखें)

प्लेट विदोलक पर 1 घंटे के लिए 37°C पर उष्मित करें

प्लेट को 3 बार वाशिंग बफर से धोएं और अवशिष्ट विलयन को हटा दें

3. द्वितीय अभिक्रिया :

पिपेट की सहायता से 50 µL तनुकृत एंटीमाउस (Antimouse) IgG–संयुग्म कूपों मे डाले

प्लेट विदोलक पर 30 मिनट के लिए 37°C पर उष्मित करें

प्लेट कूपों को वाशिंग बफर से धोएं और अवशिष्ट विलयन को हटा दें

4. तृतीय अभिक्रिया :

पिपेट की सहायता से प्रत्येक कूप मे 50 µL TMB (टेट्रामेथिल बेंज़िडाइन) डाले

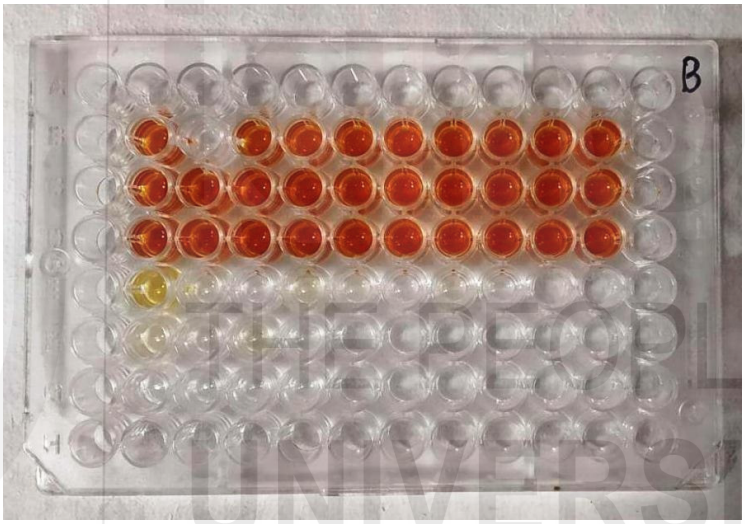
प्लेट विदोलक पर 10 मिनट के लिए 25 डिग्री सेल्सियस पर उष्मित करें

5. अभिक्रिया समापन : पिपेट की सहायता से 50 µL 1 M H_2SO_4 (सल्फ्यूरिक अम्ल) डाले

6. अवशोषणांक पठनः एलाइजा अवशोषण का अन्वेषण 450 nm पर रिकार्ड करें

6.5 प्रेक्षण

आप एलाइज़ा प्लेट पर चित्र 6.6 के अनुसार विभिन्न रंगों का अवलोकन करेंगे।



चित्र 6.6 : अभिक्रिया के पूरा होने पर रंग प्रदर्शित करती एलाइज़ा प्लेट। रंग की तीव्रता को एलाइज़ा प्लेट पठन यंत्र द्वारा मापा जा सकता है (चित्र 6.7 देखिए)। रंग की तीव्रता प्रेक्षित किए गए अवशोषणांक के समानुपातिक होती है।

चित्र 6.7 : एलाइज़ा प्लेट पठन यंत्र।

सामान्यतः एलाइज़ा के आमापन मान के परिकलन के लिए हम X–अक्ष पर सांद्रता की तुलना के सापेक्ष Y–अक्ष पर अवशोषणांक के साथ एक मानक वक्र बनाते हैं, फिर हम अवशोषणांक की सहायता से आमापन मान (अर्थात नमूने में प्रतिजन या प्रतिरक्षी की मात्रा) को आकलित/बहिर्वेशित करते हैं। इसके लिए निम्नलिखित चरणों का अनुगमन किया जाता है :

1. एलाइज़ा के नमूने द्विगुणित या त्रिगुणित प्रतियों में लेना महत्त्वपूर्ण है। यह किसी भी हस्तन त्रुटि से बचने के लिए किया जाता है, क्योंकि, एलाइज़ा कूपों में डालें जाने वाले नमूने की मात्रा बहुत कम (100ul) है, जिस कारण त्रुटि होने की संभावना होती है। एक बार अभिक्रिया पूर्ण हो जाने पर एलाइज़ा प्लेट पठन यंत्र में सभी नमूनों के लिए एक विशेष प्रकाशिक घनत्व (OD) पर अवशोषणांक ज्ञात कर लिया जाता है।

2. फिर हम प्रत्येक मानकों और नमूनों के समुच्चय के लिए अवशोषणांको के मान के औसत का परिकलन करते हैं।

3. हालांकि, नकारात्मक नमूना/रिक्त/शून्य मानक, नग्न आंखों से पारदर्शी दिखाई देता है, लेकिन इसका भी कुछ अवशोषणांक मान होता है। इसलिए, हम अन्य सभी मानकों और परीक्षण नमूनों में से शून्य मानक (OD) के औसत मान को घटाते हैं (**स्पर्धी एलाइज़ा** की प्रक्रिया में यह चरण अनावश्यक है)।

4. फिर हम एक मानक वक्र बनाते हैं, और इसके अवशोषणांक मान का उपयोग करके परीक्षण नमूने में प्रतिजन की सांद्रता को बहिर्वेशित करते हैं।

5. रिकॉर्ड किए गए अवशोषणांक मान को % अवरोध में बदल कर व्यक्त किया जा सकता है :

   - धनात्मक : जब % अवरोध का मान 50% से ज्यादा हो।
   - ऋणात्मक : जब % अवरोध का मान 50% से कम हो।

प्रतिशत अवरोध 0-100% तक हो सकता है यह सबस्ट्रेट और एंज़ाइम की सांद्रता पर निर्भर करता है। जब निरोधक जुड़ा हुआ पाया जाता है, तो सबस्ट्रेट नहीं जुड़ सकता, परन्तु जब निरोधक विलगित होता है, आश्रय जुड़ सकता है और उत्पादों में परिवर्तित हो जाता है।

6.6 सावधानियाँ

1. पूरे परीक्षण में उचित नकारात्मक नियंत्रण का उपयोग करें [सीरा (sera) के बिना/या प्रतिजन के बिना]।

2. व्यक्तिगत सुरक्षा उपकरण, विशेष रूप से दस्ताने और आंखों की सुरक्षा के यंत्रों का उपयोग करने की अनुशंसा की जाती है।

3. अभिकर्मकों के क्रॉस सम्मिश्रण से बचें।

4. कूपों के तल में अभिकर्मकों को डाले, और बुलबुलों से बचें।

6.7 अंत में कुछ प्रश्न

1. प्रयोग में एंजाइम हॉर्स रेडिश पेरोक्साइड (HRP) से जुड़े प्रतिरक्षी की क्या भूमिका है?

   (a) प्रतिजन
   (b) प्राथमिक प्रतिरक्षी
   (c) माध्यमिक प्रतिरक्षी
   (d) उपरोक्त में से कोई नहीं

2. बिंदु के रंग की तीव्रता ..... नमूने में प्रतिजन की सांद्रता

   (a) से स्वतंत्र है

   (b) के लिए समानुपातिक है

   (c) विलोमानुपातिक है

   (d) उपरोक्त में से कोई नहीं

3. प्रत्यक्ष एलाइज़ा और अप्रत्यक्ष एलाइज़ा की तुलना करें।

4. एलाइज़ा के सिद्धांत का संक्षेप में वर्णन कीजिए।

5. एलाइज़ा में, एक नमूने में प्रोटीन एक निष्क्रिय सतह पर अधिशोषित होते हैं, सामान्यतः एक 96–कूपों की पॉलीस्टाइरीन प्लेट। सतह को सस्ते गैर–विशिष्ट प्रोटीन जैसे कैसीन के घोल से क्यों धोया जाता है?

6. एक मरीज को प्रतिरक्षी दिया गया और उसके सीरम में Ag/Ab संकुल विकसित हो गया। क्या हम दिए गए प्रतिरक्षी के सीरम प्रतिरक्षी को माप सकते हैं? इसमें शामिल प्रक्रिया और इस्तेमाल होने वाली एलाइज़ा के प्रकार का वर्णन करें।

चित्रों के लिए आभार

Illustration are drawn/Photographs are clicked by the authors of this Exercise.

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

अभ्यास 7

प्रतिरक्षी वैद्युतकण संचलन का प्रदर्शन

रूपरेखा

7.1 प्रस्तावना
उद्देश्य
7.2 आवश्यक सामग्री
7.3 सिद्धांत
7.4 कार्यविधि
7.5 प्रेक्षण
7.6 सावधानियाँ
7.7 अंत में कुछ प्रश्न

7.1 प्रस्तावना

प्रतिरक्षी वैद्युतकण संचलन एक सामिमात्रात्मक विधि है, जो दो तकनीकों, वैद्युतकण संचलन तथा प्रतिरक्षा–विसरण को जोड़ती है। इसमें वैद्युतकण संचलन और प्रतिरक्षात्मक गुणों के आधार पर प्रोटीन का अभिनिर्धारण तथा अभिलक्षणन सम्मिलित है। इस पद्धति का उपयोग नैदानिक प्रयोगशालाओं में प्रमस्तिष्कमेरुद्रव, फुफ्फुस तरल पदार्थ और प्रतिरक्षाग्लोब्युलिन से सम्बंधित तरल पदार्थों, जैसे, शरीर के तरल पदार्थ में सीरम असामान्यताओं की जांच के लिए किया जाता है। अनुसंधान में, प्रतिरक्षी वैद्युतकण संचलन प्रोटोकॉल द्वारा, प्रोटीन (प्रतिजन अथवा प्रतिरक्षी) तथा सूक्ष्मजैविक निष्कर्षण के शोधन में अशुद्धता, और ऊतकों में घुलनशील प्रतिजनों की निगरानी में किया जाता हैं।

उद्देश्य

इस अभ्यास को पूरा करने के बाद, आप इस योग्य हो जाएंगे कि :

- ❖ प्रोटीन/प्रतिजन के मिश्रण को अलग कर सकें और उसके अभिलक्षणन कर सकें; और
- ❖ प्रतिजन–प्रतिरक्षी अन्योन्यक्रियाओं की विशिष्टता का वर्णन कर सकें।

7.2 आवश्यक सामग्री

- **अभिकर्मक**

ऐगरोज जैल

कांच की स्लाइड,

वैद्युतकण संचलन बफर,

प्रति सीरम नमूना,

प्रति–IgG नमूना,

आसुत जल।

- **यंत्र / उपकरण**

ऊष्मायित्र अवन,

ऊष्मा प्लेट या सूक्ष्म तरंग अवन,

विद्युत आपूर्ति के साथ वैद्युतकण संचलन इकाई,

कूप बनाने वाला,

निस्यन्दक पेपर,

सूक्ष्मपिपेट और टिप्स,

कांच के बने उपकरण (बीकर, अंकित मापक सिलिन्डर)

7.3 सिद्धांत

किसी दिए गए प्रोटीन मिश्रण में उपस्थित अलग–अलग प्रोटीन अणु, जब विद्युत क्षेत्र में रखे जाते हैं, तब वैद्युतकण संचलन के द्वारा क्षैतिज जैल में उनके आवेश तथा द्रव्यमान के अनुपात के आधार पर वे पृथक्क हो जाते हैं। अलग–अलग प्रवास करने वाले प्रोटीन, जैल पर विभिन्न बिंदुओं पर एकत्र हो जाते हैं। इसके पश्चात् पृथक्क किए गए प्रोटीन वाले जैल को विद्युत क्षेत्र से हटा दिया जाता है, तथा प्रतिरक्षी को जैल में पार्श्व गर्त के माध्यम से प्रवेश करवाया जाता है। प्रतिजन और प्रतिरक्षी को तब पूरे जैल में विसरित होने दिया जाता है, जिससे प्रेसिपिटिन रेखाएं, अपनी तुल्यता के बिंदु पर विशिष्ट प्रतिजन–प्रतिरक्षी के अनुरूप बनती हैं।

7.4 कार्यविधि

1.5% ऐगरोज जैल विलयन तैयार करने के लिए, विधुत अपघटन बफर, pH 8.5 के 100 मिलीलीटर में ऐगरोज जैल के 1.5 ग्राम को घोले।

विलयन को लगभग 50–60^{0}C तक ठंडा करे

विलयन के 8–10 मिलीलीटर को साफ स्लाइड पर डालें (फ़ैलाने से बचें)

जैल को जमने दें (लगभग 30 मिनट)

प्रतिजन नमूने के उद्भारण के लिए कैथोड की ओर एक कूप छिद्रित करें (चित्र 7.1)

कूप में 15µL प्रतिजन नमूना डालें।

उपरोक्त सेट–अप को वैद्युतकण संचलन इकाई पर रखें।

इकाई में वैद्युतकण संचलन बफर डाले।

30–40 मिनट के लिए 110 वोल्ट पर जैल चलाएँ।

(जब तक रंजक जैल की लंबाई के 3/4वें हिस्से को पार नहीं कर लेती)

प्रतिरक्षा विसरण

नमूने के दोनों ओर अच्छी तरह से 2 गर्त बनाएं
(सम्पूर्ण जैल को, जैल की मोटाई के लगभग 2/3 भाग को काट लें)

स्लाइड के दोनों ओर की गर्त से जैल निकाल दे

प्लेट सेट–अप को कमरे के तापमान पर 15 मिनट तक रहने दें

पिपेट की सहायता से 250µl परीक्षण प्रतिसीरम–A को एक पार्श्व गर्त में डालें

पिपेट की सहायता से 250µL परीक्षण प्रतिसीरम–B को दूसरी पार्श्व गर्त में डालें

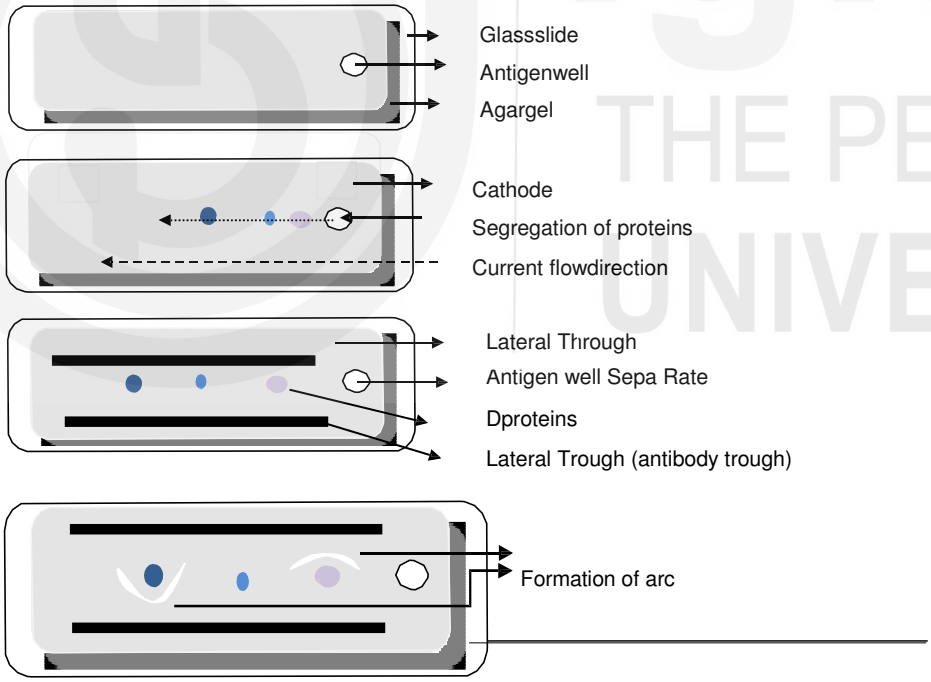
वैद्युतकण संचलन इकाई से स्लाइड निकालें

ऊष्मायन करे

नम कक्ष में रात भर के लिए कमरे के तापमान पर रखें

प्रेसिपिटिन चाप निर्माण का निरीक्षण करें

(प्रतिजन–प्रतिरक्षी सम्मिश्र)



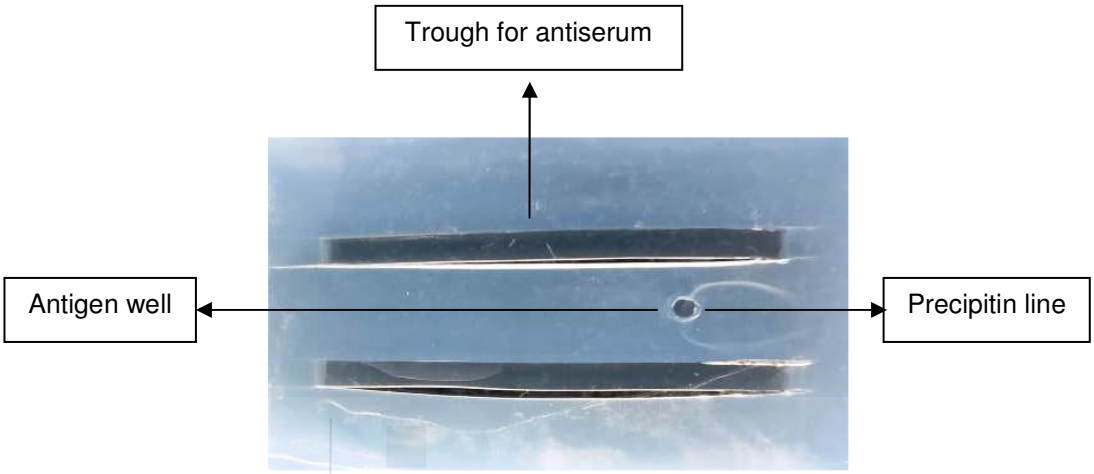
चित्र 7.1: कूप पर उदभारण किए गए प्रतिजन नमूने के पृथक्कृत हो जाने, तथा प्रतिजन और प्रतिरक्षी ऐगरोज जैल आधात्री में विसरित होकर प्रेसिपिटिन रेखा बनने को प्रदर्शित करता हुआ चित्र।

7.5 प्रेक्षण

1. प्रतिसीरम गर्त तथा प्रतिजन कूप के बीच प्रेसिपिटिन चाप/रेखाओं की उपस्थिति (चित्र 7.2)।

2. एक से अधिक प्रेसिपिटिन रेखा का होना प्रतिसीरम की प्रतिजन के लिए विषमांगता को इंगित करता है।

3. केवल एक प्रेसिपिटिन रेखा की उपस्थिति प्रतिजन तथा प्रतिसीरम के मध्य समांगता को इंगित करती है।



चित्र 7.2 : प्रतिजन कूप तथा प्रतिसीरम गर्त के बीच बनी प्रेसिपिटिन रेखा को दर्शाने वाली वास्तविक अवलोकन छवि।

7.6 सावधानियाँ

1. प्रयोग करते समय दस्ताने (नाइट्राइल) पहनें।

2. जैल की ढलाई करते समय एक समान मोटाई बनाए रखें और हवा के बुलबुलो से बचें।

3. प्रतिजन कूपों तथा गर्त को कांच की स्लाइड पर ऐगार जैल के माध्यम से नहीं कटना चाहिए।

4. प्रतिरक्षी वैद्युतकण संचलन के दौरान नमूने को जैल से दूर न जाने दें।

7.7 अंत में कुछ प्रश्न

1. प्रतिरक्षी वैद्युतकण संचलन किन दो अलग–अलग तकनीकों का एक संयोजन है?

2. प्रतिरक्षी वैद्युतकण संचलन द्वारा किसका अभिनिर्धारण तथा अभिलक्षणन हो सकता है?

   (a) RNA

   (b) प्रोटीन

   (c) DNA

   (d) DNA और प्रोटीन दोनों

3. नैदानिक प्रयोगशालाओं में प्रतिरक्षी वैद्युतकण संचलन की सार्थकता का उल्लेख कीजिए।

4. प्रतिरक्षी वैद्युतकण संचलन में विद्युत क्षेत्र की क्या भूमिका है?

5. प्रतिरक्षी वैद्युतकण संचलन तथा वैद्युतकण संचलन में अंतर लिखिए।

चित्रों के लिए आभार

Illustration are drawn/Photographs are clicked by the authors of this Exercise.

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

अभ्यास 8

बिन्दु एलाइज़ा (DOT-ELISA)

रूपरेखा

8.1 प्रस्तावना
उद्देश्य
8.2 आवश्यक सामग्री
8.3 सिद्धांत
8.4 कार्यविधि
8.5 प्रेक्षण
8.6 परिचर्चा
8.7 सावधानियाँ
8.8 अंत में कुछ प्रश्न

8.1 प्रस्तावना

बिंदु एंजाइम सहलग्न प्रतिरक्षा शोषक आमापन (एलाइज़ा) एक बहुत ही संवेदन प्रतिरक्षा रसायनिक तकनीक है, जिसका उपयोग दिए गए नमूने में एक विशिष्ट प्रोटीन की उपस्थिति का पता लगाने के लिए किया जाता है। इसकी संवेदनशीलता और दृढ़ता के कारण इसे चिकित्सा उद्देश्यों के लिए एक महत्वपूर्ण निदानसूचक माना जाता है। बिंदु एलाइज़ा में, परीक्षण नमूने में प्रतिजन सीधे दो प्रतिरक्षियों के बीच सैंडविच होता है। इसलिए, यह आमापन एक प्रकार का सैंडविच एलाइज़ा है (सैंडविच एलाइज़ा के लिए अभ्यास संख्या 6 देखें)। बिंदु–एलाइज़ा अपनी सापेक्ष गति और सरलता के कारण मानक एलाइज़ा का एक विकल्प है। बिंदु–एलाइज़ा में परिणाम को नग्न आंखों से देखा जा सकता है, क्योंकि हमें परीक्षण पट्टी पर एक बड़ा बिंदु मिलता है, जबकि मानक एलाइज़ा में हमें एलाइज़ा प्लेट पठन यंत्र की आवश्यकता होती है। बिंदु–एलाइज़ा एक गुणात्मक परीक्षण है (उपस्थिति या अनुपस्थिति का पता लगाना), लेकिन मानक एलाइज़ा द्वारा, परीक्षण प्रोटीन की मात्रा प्रमाणीकृत की जा सकती है, इसलिए यह एक मात्रात्मक परीक्षण है। बिंदु–एलाइज़ा पर वर्तमान अभ्यास में, हम मात्रात्मक रूप से नहीं बल्कि गुणात्मक रूप से नमूने का परीक्षण करना चाहते हैं।

बिंदु एलाइज़ा को बिंदु एलाइज़ा किट के माध्यम से निष्पादित किया जा सकता है, जो कि नाइट्रो–सेलुलोज पेपर और अन्य झिल्ली पर किया जाता है। परीक्षण झिल्ली किट को तीन क्षेत्रों में विभाजित किया गया है:

परीक्षण क्षेत्र : विशिष्ट प्रतिजन बंधन के लिए पूर्व–निर्धारित निश्चल प्रतिरक्षी के साथ।

धनात्मक नियंत्रण क्षेत्र : प्रतिजन से बंधे पूर्व–निर्धारित निश्चल प्रतिरक्षी के साथ।

ऋणात्मक नियंत्रण क्षेत्र : निश्चल प्रतिरक्षी उपस्थित नहीं है, इसलिए कोई प्रतिक्रिया नहीं।

उद्देश्य

इस अभ्यास के बाद आप निम्न में सक्षम होंगे :

- ❖ बिंदु एलाइज़ा किट का उपयोग कर सकें और प्रतिजन का पता लगा सकें; और
- ❖ बिंदु एलाइज़ा तकनीक के सिद्धांत का विवरण दे सकें।

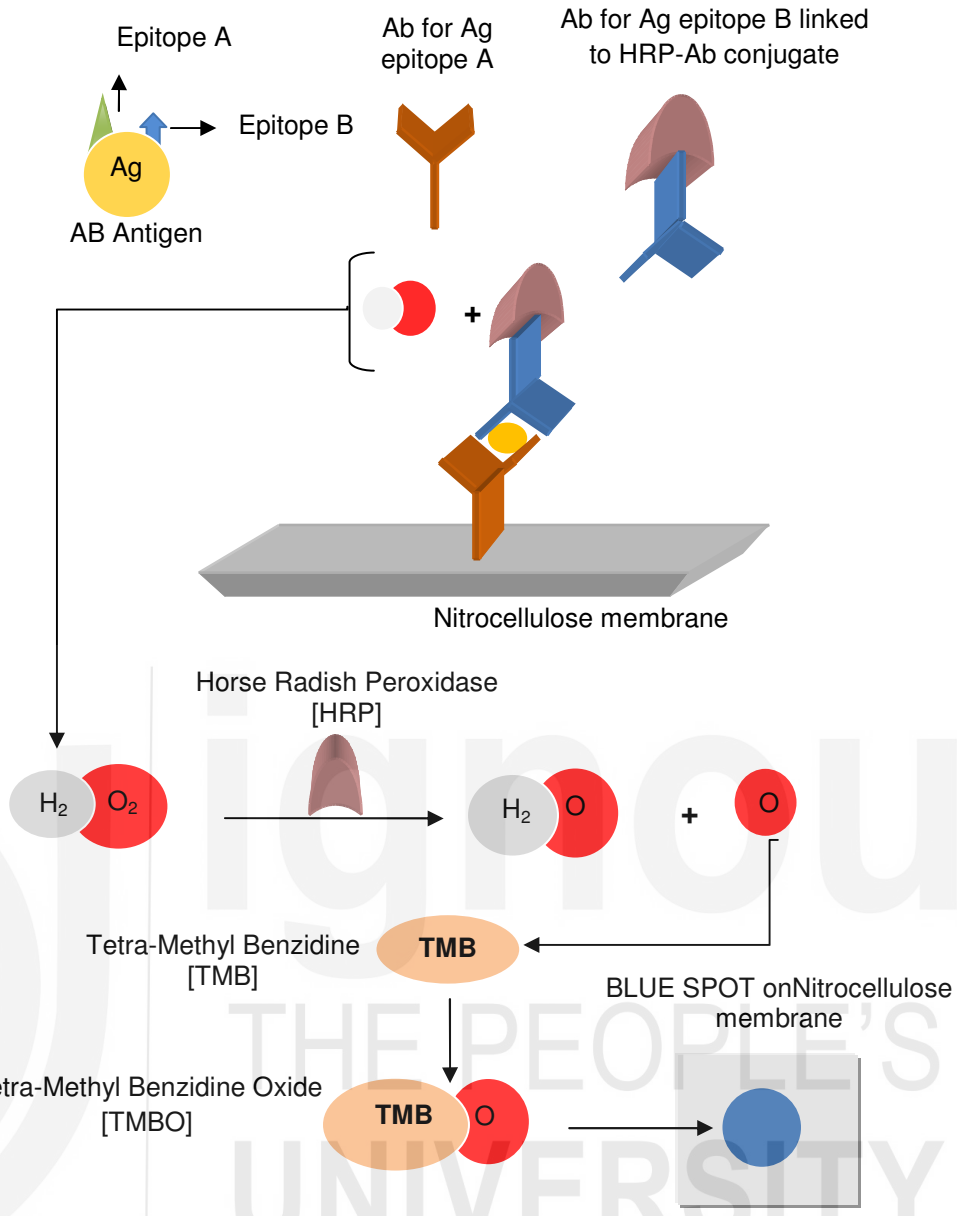
8.2 आवश्यक सामग्री

- बिंदु–एलाइज़ा किट
- 10X आमापन बफर,
- Ab-HRP संयुग्म (प्रतिरक्षी–हॉर्स रेडिश परॉक्सीडेज संयुग्म),
- तब / H_2O_2 (टेट्रामेथिल बेंज़िडाइन / हाइड्रोजन पेरोक्साइड),
- परीक्षण सीरम नमूने,
- संग्रह ट्यूब,
- बिंदु–एलाइज़ा पट्टी।

8.3 सिद्धांत

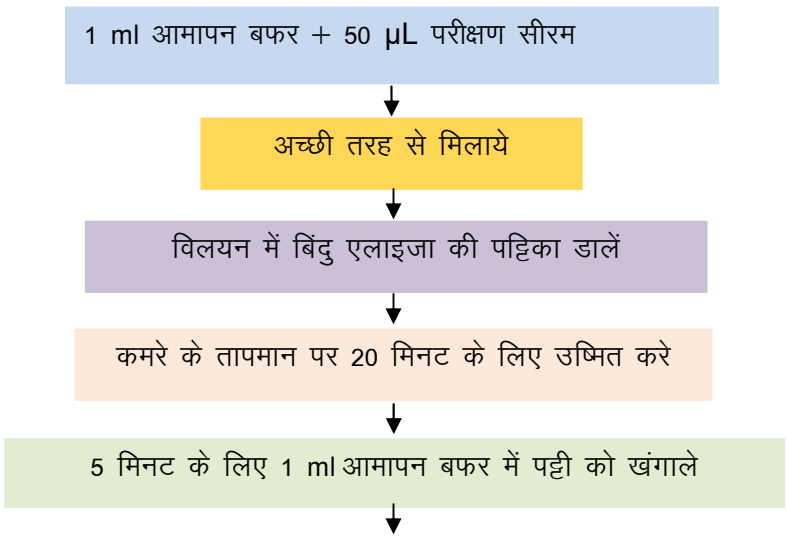
बिंदु–एलाइज़ा पट्टिका, प्रतिरक्षी से विलेपित एक नाइट्रोसेलुलोज झिल्ली होती हैं, जो एक ही प्रतिजन के दो अलग–अलग अधिस्थानिक (एपीटोप) के साथ अभिक्रिया करती है। सबसे पहले, निश्चल प्रतिरक्षी परीक्षण नमूने में मौजूद प्रतिजन के साथ अभिक्रिया करता है। इसके बाद एक एंजाइम से जुड़ा द्वितीयक प्रतिरक्षी जो विशिष्ट **वर्णजनिक सबस्ट्रेट** को एक अघुलनशील उत्पाद में एक रंगीन अवक्षेप के रूप में परिवर्तित करता है।

यहां, द्वितीयक प्रतिरक्षी एंजाइम, हॉर्स रेडिश परॉक्सीडेज (HRP) से जुड़ा हुआ है। निश्चल प्रतिरक्षी के साथ प्रतिजन (परीक्षण सीरम के नमूनों में उपस्थित) के बंधन का पता एक सबस्ट्रेट के रूप में हाइड्रोजन पेरोक्साइड और टेट्रा–मिथाइलबेन्ज़िडाइन (TMB) **वर्णजन** के रूप में एक माध्यमिक प्रतिरक्षी सयुग्मी (HRP) का उपयोग करके लगाया जाता है। एंजाइम HRP ऑक्सीजन (O_2) मुक्त करने के लिए H_2O_2 पर कार्य करता है। उत्पाद O_2 प्राप्त होता हैं जब वर्णजन TMB को एक अघुलनशील उत्पाद टेट्रा–मिथाइलबेन्ज़िडाइन ऑक्साइड (TMBO) में ऑक्सीकृत करता है। जहां एंजाइम स्थित होते हैं, उत्पाद TMBO जमा हो जाता है इस प्रकार यह नीला रंग देते हैं (चित्र 8.1)।



चित्र 8.1 : बिंदु एंजाइम सहलग्न प्रतिरक्षा शोषक आमापन (एलाइज़ा) के कार्य सिद्धांत का योजनाबद्ध प्रतिनिधित्व।

8.4 क्रियाविधि



(हर बार धोने हेतु नए आमापन बफर का प्रयोग करते हुए इसे 3 बार दोहराएं)

↓

1 ml आमापन बफर + 10 µL Ab-HRP के विलयन में पट्टी को डुबोएं

↓

(कमरे के तापमान पर 20 मिनट के लिए रखे)

↓

पट्टी को 5 मिनट के लिए आमापन बफर से खंगाले

(3 बार दोहराएं)

↓

100 µL 10x TMB/H_2O_2 + 900 µL दोहरा आसुत जल के विलयन में पट्टी को डुबोएं

↓

20 मिनट के बाद निरीक्षण करें

जब नीला बिंदु दिख जाएं

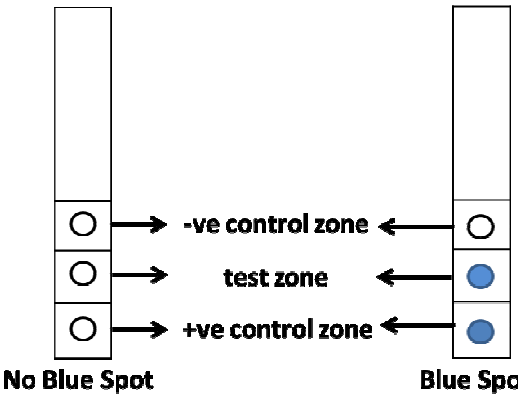
↓

अभिक्रिया को रोकने के लिए पट्टी को DDW (दोहरे आसुत जल) से धोएं

8.5 प्रेक्षण

बिंदु–एलाइज़ा पट्टी में तीन, क्षेत्र होते हैं। ऋणात्मक नियंत्रण, परीक्षण और धनात्मक नियंत्रण। धनात्मक क्षेत्र में बिंदु की उपस्थिति और ऋणात्मक नियंत्रण क्षेत्र में बिंदु की अनुपस्थिति परीक्षण के उचित प्रदर्शन का संकेत होता है।

चूंकि, ऋणात्मक नियंत्रण क्षेत्र में कोई निश्चल प्रतिरक्षी नहीं है, इसलिए, कोई बिंदु नहीं देखा जा सकता है। जबकि, निश्चल प्रतिरक्षी धनात्मक नियंत्रण क्षेत्र में होते हैं, जहां नीला बिंदु विकसित होता है। निश्चल प्रतिरक्षी (परीक्षण प्रतिजन के लिए विशिष्ट) परीक्षण क्षेत्र में उपस्थित होता है, इसलिए परीक्षण सीरम क्षेत्र से जुड़ जाता है, और HRP–संयुग्मित प्रतिरक्षी सीरम से जुड़ जाता है, और सबस्ट्रेट के साथ अभिक्रिया करने पर एक नीला बिंदु विकसित करता है।



चित्र 8.2 : बिंदु–एलाइज़ा पट्टिका धनात्मक नियंत्रण और परीक्षण क्षेत्र में नीला बिंदु दिखाती है, और ऋणात्मक नियंत्रण क्षेत्र में कोई बिंदु नहीं है।

8.6 परिचर्चा

धनात्मक नियंत्रण क्षेत्र में नीले बिंदु का दिखाई देना और ऋणात्मक नियंत्रण क्षेत्र में बिंदु की अनुपस्थिति, परीक्षण के सही प्रदर्शन का संकेत है। परीक्षण क्षेत्र में एक विशिष्ट प्रतिजन की उपस्थिति का पता परीक्षण या नमूना सीरम को निश्चल प्रतिरक्षी से आबंधित कर के लगाया जाता है, जो सयुग्मित किए गए परीक्षण सीरम में HRP संयुग्मित प्रतिरक्षी के बंधन को सुगमीकृत करता है जो तब नीला रंग देने के लिए अभिक्रिया करता है। परीक्षण नमूने में उपस्थित प्रतिजन सांद्रता का स्तर उस बिंदु की तीव्रता से निर्दिष्ट होता है, जिसे एंजाइम गतिविधि से सीधे सहसंबंधित किया जा सकता है।

8.7 सावधानियाँ

1. अभ्यास करते समय हमेशा दस्ताने पहनें।
2. उपयोग करने से पहले आसुत जल (H_2O) के साथ 10x आमापन बफर को 1x तक तनुकृत करें।
3. अभिकर्मकों के क्रॉस–संदूषण से बचने के लिए, उपयोग के बाद सूक्ष्म टिप्स को एक बार उपयोग करनें के बाद फेंक दें।
4. अभिकर्मकों को कमरे के तापमान पर न छोड़ें।

8.8 अंत में कुछ प्रश्न

1. बिंदु–एलाइज़ा (DOT-ELISA) को विस्तारित कीजिए।
2. बिंदु–एलाइज़ा ..... एलाइज़ा का एक प्रकार है।
3. एलाइज़ा दिए गए नमूने में ..... के लिए तीव्र निर्धारक तकनीक है।
   (a) DNA
   (b) RNA
   (c) लिपिड
   (d) प्रोटीन (प्रतिजन)
4. योजनाबद्ध निरूपण का उपयोग करते हुए बिंदु–एलाइज़ा के सिद्धांत पर चर्चा करें।
5. बिंदु–एलाइज़ा के अनुप्रयोग क्या हैं?

चित्रों के लिए आभार

Illustration are drawn/Photographs are clicked by the authors of this Exercise.