تکنیک الایزا

اساس روش های سنجش ایمنی

شناسایی آنالیت ، اولین مرحله در این نوع سنجش محسوب می شود . این عمل توسط آنتی بادی انجام می پذیرد . به عبارتی ، جزء لا ینفک هر سنجش ایمنی واکنش میان آنتی ژن و آنتی بادی است . در محدوده ی معینی از غلظت آنتی ژن و آنتی بادی انجام واکنش منجر به تشکیل رسوب قابل رویت (قبل یا بعد از رنگ آمیزی) می گردد . اما در اغلب موارد ، قبل و بعد از انجام واکنش آنتی ژن و آنتی بادی تغییر قابل مشاهده ای وجود ندارد ، به همین دلیل وجود سیستم نشانه گذاری ضروری به نظر می رسد . نوع طبقه بندی سنجش های ایمنی آنزیمی بر اساس نوع نشاندار سازی است .

جهت ردیابی واکنش ، آنتی ژن و یا آنتی بادی را با آنزیم نشاندار ساخت . به عمل نشاندار سازی ، کونژوگاسیون و به مولکول آنزیم دار ، کونژوگه ی آنزیمی نیز می گویند . چنانچه آنتی ژن کونژوگه گردد روش را EIA (Enzyme Immuno Assay) گویند و اگر آنتی بادی کونژوگه گردد روش را IEMA (Immuno Enzymo Meteric Assay) می نامند .

اساس روش EIA، رقابت میان آنتی ژن کونژوگه و آنتی ژن آزاد در نمونه مورد سنجش بر سر اتصال به آنتی بادی است . در اینجا میزان کمپلکس آنزیم دار با آنتی ژن آزاد رابطه معکوس دارد . لذا می توان بسته به نیاز آنتی بادی های پلی و یا مونو کلونال استفاده کرد . البته در برخی سنجش ها آنتی بادی های الیگو کلونال پاسخ بهتری ایجاد می کنند . چنانچه چند نوع آنتی بادی مونو کلونال را با هم مخلوط کنیم ، مجموعه حاصله را آنتی بادی الیگو کلونال می نامند .

مزایای IEMA نسبت به EIA :

سادگی نشان دار کردن

سرعت بیشتر واکنش

افزایش حساسیت

محدوده ی وسیع تر از غلظت آنالیت

ویژگی بالاتر

مقاومت بیشتر در برابرشرایط آزمایش

برخی از مزایای روش های سنجش ایمنی آنزیم دار نسبت به سنجش ایمنی رادیو اکتیو

عدم وجود خطر تشعشع

امکان اتوماسیون

قیمت ارزانتر دستگاه ها

سرعت خوانش بالا

معرف های ارزان

امکان افزایش حساسیت روش

نیمه عمر طولانی کیت های آنزیمی

طبقه بندی الایزا

سیستم الایزا بر اساس شیوه شناسی تشخیصی به چند گروه تقسیم می شود که عبارتند از:

الایزای مستقیم(DIRECT ELISA)

در این روش آنتی ژن یا آنتی بادی موجود در نمونه ی که باید تشخیص داده شود به طور مستقیم بر سطح فاز جامد کوت می شود و سپس آنتی بادی یا آنتی ژن مکمل آن که نشان دار شده است به سیستم اضافه میشود. در صورت وجود آنتی ژن یا آنتی بادی مورد نظر در نمونه، سیگنال مناسب ایجاد می شود. این روش مشابه

ایمونوفلورسانس مستقیم است اما کاربرد چندانی در کیت های تشخیصی ندارد و بیشتر در کارهای تحقیقاتی استفاده می شود

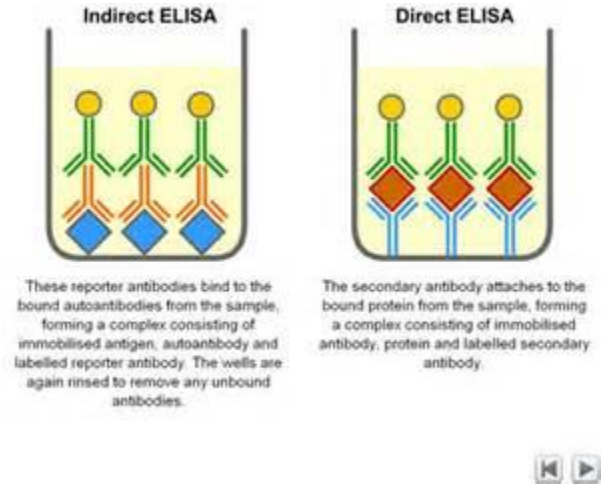
الایزای غیر مستقیم(indirect ELISA):

این روش برای تعیین آنتی بادی اختصاصی و یا تیتراسیون آنتی بادی در نمونه های سرم مورد استفاده قرار می گیرد. اساس آزمایش بدین نحو است که معمولا سرم رقیق شده به آنتی ژن های کوت شده در فاز جامد (میکرو ول یا چاهک) اضافه می شود. آنتی ژن کوت شده آنتی ژت اختصاصی مربوط به آنتی بادی است که قرار است در نمونه ردیابی شود پس از افزودن نمونه و طی زمان انکوباسیون و یک مرحله ی شستشو آنتی هیومن گلوبولین نشان دار شده با آنزیم به چاهک اضافه می شود بر حسب اینکه چه کلاسی از انتی بادی برای ردیابی اهمیت دارد نوع آنتی Ig مورد استفاده نیز متفاوت است مثلا برای ردیابی آنتی بادی کلاسIgG از انتی هیومن IgG و برای ردیابی کلاس IgA از آنتی هیومن IgA استفاده می شود.

اختصاصیت سنجش مستقیما توسط آنتی ژن ثابت شده در فاز جامد تعیین می شود که ممکن است کاملا خالص و اختصاصی باشد و یا نسبتا خام و غیر اختصاصی باشد . سرم حاوی انتی بادی اختصاصی می تواند در یک بافر برای جلوگیری از جذب غیر اختصاصی پروتئین ها و جلوگیری از اشغال نقاط اتصال آنتی ژن رقیق شود. به چنین بافری محلول رقیق کننده نمونه (sample diluent) گفته می شود. حساسیت و ویژگی چنین روشهایی می تواند با به کار گیری روش Antibody capture با کاهش تداخل اثر آنتی بادی غیر اختصاصی بهتر شود.

بهترین مثالها در مورد این روش تعیین آنتی بادی بر علیه توکسوپلاسما,روبلا ,ویروس سیتومگال و هلیکوباکتر پیلوری از کلاسهای IgMو IgGوIgA در سرم می باشد.البته امروزه برای تعیین IgM بر علیه این عوامل عموما از روش capture استفاده می شود در روش captureآنتی بادی های موجود در نمونه از کلاس IgM به روی چاهک های

ثابت شده با آنتی هیومن IgM جذب شده و سپس برای تشخیص , از آنتی ژن اختصاصی مربوطه که آنزیم نشان دار شده است و یا آنتی بادی نشان دار ضد آن به صورت مزدوج استفاده می شود.



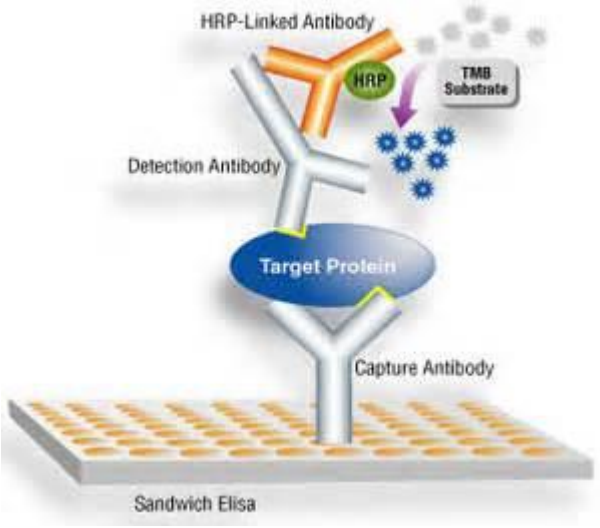
الایزای ساندویچ:

روش ساندویچ الایزا خود به ۲ دسته تقسیم می شود:

- روش Ag capture یا Ab sandwich

در این روش یک آنتی ژن در بین ۲آنتی بادی اختصاصی قرار می گیرد این روش شایع ترین روش الایزا محسوب می شود در این روش از یک آنتی بادی برای به دام انداختن آنتی ژن بر روی چاهکهای الایزا استفاده می شود و آنتی بادی دوم که با آنزیم نشان دار شده است به عنوان شناساگر عمل می کند .

قابل ذکر است که در این روش آنتی ژن باید حداقل دارای ۲ ناحیه ی آنتی ژنیک متفاوت باشد تا قادر به اتصال هر ۲ آنتی بادی باشد: مثال های بارز این روش اندازه گیری HCG, TSH, LH, FSH, PSA و... است.



روش Antibody capture:

- Ag sandwich or direct Ab capture:

این روش برای تعیین سنجش آنتی بادی مورد استفاده قرار می گیرد بدین صورت که از یک آنتی ژن کوت شده بر روی فاز جامد برای به دام انداختن آنتی بادی اختصاصی آن استفاده می شود و همان آنتی بادی از طریق بازوی دیگر خود (Fab) پذیرای همان آنتی ژن اما به صورت نشان دار می باشد در نتیجه آنتی بادی اختصاصی در بین ۲ آنتی ژن ساندویچ می گردد(شکل ۲۲-۲) در این روش آنتی بادی توتال از هر کلاس ایمونوگلوبولین میسر است و یکی از اختصاصی ترین و حساس ترین روش ها برای تشخیص آنتی بادی در نمونه است مثال بارز این روش کیت اندازه گیری آنتی بادی بر علیه پلاسمودیوم ویواکس و ترپونما پالیدوم وHBs Ab, می باشد.

:Indirect Ag Sandwich or Indirect Ab capture

در این روش پس از به دام انداختن آنتی بادی توسط آنتی هیومن گلوبولین فیکس شده در کف چاهک ها با اضافه کردن آنتی ژن اختصاصی و تشکیل کمپلکس از یک آنتی بادی اختصاصی نشان دار بر علیه آنتی ژن به عنوان سیستم شناساگر استفاده می شود.

الایزای رقابتی یا مهاری:

در روشهای رقابتی اساس سنجش بر رقابت دو آنتی ژن یا دو آنتی بادی (که یکی از آن دو نشاندار است) برای اتصال به لیگاند با مقدار محدود استوار است. اگر هر دو آنالیت نشاندار و غیر نشاندار با هم به سیستم اضافه شوند روش را رقابتی می نامند ولی چنانچه ابتدا آنالیت اضافه شده و پس از یک دوره انکوباسیون آنالیت نشاندار اضافه گردد روش را مهاری یا بالکینگ می نامند. در روش مهاری ممکن است در بین ۲ مرحله و قبل از اضافه نمودن آنالیت بعدی شستشو انجام شود یا انجام نشود مثال بارز روشهای رقابتی و مهارتی سنجش T3,T4 می باشد. انواع روشهای رقابتی عبارتند از:

- روش رقابتی یا مهاری برای انتی ژن:

اساس این روش بر رقابت بین آنتی ژن نشاندار و آنتی ژن موجود در نمونه برای اتصال به یک آنتی بادی اختصاصی کوت شده در چاهک استوار است. در این روش مقدار آنتی بادی کوت شده باید محدود باشد و ملکول سیگنال دهنده همان آنتی ژن نشاندار است, اساس RIA و EIA کلاسیک به همین روش استوار است. در این روش منحنی پاسخ دوز به صورت معکوس خواهد بود, بدین معنی که آنالیت نشاندار در حضور

مقادیر زیادی از آنالیت غیر نشاندار موجود در نمونه به مقدار کمتری به آنتی بادی متصل می شود و در نتیجه سیگنال هم بوجود آمد.

محدوده تعیین آنالیت با این روش ممکن است بوسیله استفاده از مولکول نشاندار با فعالیت اختصاصی زیاد تقویت شود اما حداقل مقدار قابل تشخیص (کمترین مقدار از آنالیت که قابل تشخیص خواهد بود) توسط تمایل آنتی بادی مورد استفاده تعیین می شود, با این وجود غلظتهای خیلی کم از هاپتن ها عموما توسط همین روش قابل تعیین اند و حساس ترین روشی است که می تواند مقدار کمتر fmol را هم تشخیص دهد.در برخی از موارد نشاندار کردن روی خصوصیات هاپتن اثر می گذارد در نتیجه در روش رقابتی برای تعیین آنتی ژن از یک آنتی بادی نشاندار استفاد می شود, در این نوع از سنجش ها ضروری است که فاز جامد توسط آنتی ژن با مقدار کم و ثابت پوشیده می شود, در این روش آنالیت موجود در نمونه با آنالیت کوت شده در چاهک برای اتصال به آنتی بادی نشاندار رقابت می کند. در اینجا هم منحنی استاندار معکوس است, از این روش بیشتر برای سنجش به روش کمی لومینسانس استفاده می شود.

-روش رقابتی برای آنتی بادی:

دراین روش بین دو آنتی بادی یکی در نمونه به صورت غیر نشاندار و یکی به صورت نشاندار شده با آنزیم برای اتصال به یک آنتی ژن فیکس شده در چاهک صورت می پذیرد, بدیهی است که هر چه مقدار آنتی بادی نمونه بیشتر باشد آنتی بادی نشاندار کمتری به چاهکها متصل شده و سیگنال نیز کمتر خواهد بود و در نتیجه منحنی استاندار نیز معکوس می باشد شاخص ترین مثال این روش اندازه گیری HBc(HBc Ab) است.

وسایل شستشو : شستشو به دو صورت دستی و اتوماتیک صورت می گیرد .

– روش دستی :

ساده ترین روش برای شستشو ریختن مایع شستشو با پی پت بر روی چاهک ها و در ادامه خالی کردن آنها بر روی سینک می باشد . ولی این روش وقتی که تعداد پلیت ها زیاد باشد بسیار طاقت فرساست . از سوی دیگر ، امروزه دستگاه های شوینده ۸ و یا ۱۲ کاناله که به پمپ اتصال می یابند وارد بازار شده اند که عموماً نیز دارای دو نیدل می باشند ؛ یکی برای ریختن و دیگری برای خالی کردن محلول شستشو.

این دستگاه ها بسیار موثر و تقریباً سریع بوده و توسط افراد مجرب مورد استفاده قرار می گیرند.

– شستشوی اتوماتیک :

دستگاه های اتوماتیک به اشکال مختلفی وجود دارند . برخی از آنها ۸ یا ۱۲ کاناله بوده و برخی دیگر کل پلیت را شستشو می دهند . بعضی از این دستگاه ها تک سوزنه و بعضی دو سوزنه هستند که در انواع تک سوزنه تمامی اقدامات توسط همان سوزن صورت می گیرد . ولی در دستگاه های دو سوزنه یک سوزن بطور دائم در حال مکش است تا چنانچه مایع شوینده بیشتری در هنگام پر کردن وارد چاهک ها شد ، آنرا خالی نماید.

الایزا ریدر یا خوانشگر الایزا (Reader ELISA) :

امروزه انواع مختلفی از خوانشگرها برای پلیت ها ی الایزا در بازار موجود می باشند اکثر این خوانشگرها یک ستونی و یا ۹۶ خانه (یک پلیتی) بوده و اکثراً اتوماتیک و تعداد اندکی نیز دستی هستند .

این دستگاه ها در قسمت سیستم نوری خود از فیبرهای نوری بهره می برند .

در بسیاری از خوانشگرها سیستم تک موج یا دو موج (Dual beam) بچشم می خورد که در سیستم اخیر تصحیح جذب نوری جهت برطرف سازی نقص سیستم نوری ، تغییرات چاهک به چاهک حجم نهایی در چاهک ها بطور اتوماتیک صورت می گیرد . این عمل توسط نوع خاصی از فیلترتحت عنوان فیلترهای افتراقی (Differential Filters) صورت می گیرد . در دستگاه های خوانشگر انتخاب طول موج توسط فیلترها و یا گریدها صورت می گیرد . گرید ها ساختارهایی هستند که با تابیده شدن نور به آنها ، تنها نور با طول موج خاصی ازآنها ساطع می شود .

منبع: کتاب الایزا:تهیه شده در واحد تحقیق و توسعه شرکت ژیشتاز طب زمان