اصول و مبانی الایزا

دکتر زیبا مجیدی

استادیار بیوشیمی بالینی

کروه علوم آزمایشگاهی ، دانشکده پیراپزشکی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

اصول و مبانی الایزا

- ✓ معرفی تکنیک الایزا
- ✓ اجزای تست الایزا
- ✓ انواع روش های الایزا
- ✓ عیب یابی در انجام تست

2222567687

تاریخچه

مرحله ۱: آغاز مدرن تشخیص ایمونولوژیک — Immunofluorescence (1941)

در سال ۱۹۴۱، Albert H. Coons و همکارانش اولین بار از آنتی‌بادی‌های برچسب‌دار با رنگ فلوئورسنت استفاده کردند.

(Fluorescent dye-labeled antibodies)

آن‌ها این روش را برای شناسایی آنتی‌ژن‌ها در برش‌های بافتی به کار بردند.

این روش امروزه به نام Immunofluorescence شناخته می‌شود و نخستین روش تصویربرداری مبتنی بر ایمونولوژی به شمار می‌رود.

این روش نشان داد که می‌توان با استفاده از اختصاصیت آنتی‌بادی مولکول‌های هدف را در بافت یا سلول‌ها ببینیم، ولی برای اندازه‌گیری کمّی (Quantitative) مناسب نبود.

- ایمنواسی غیرنشاندار
  - ژلی غیر فعال
    - انتشار دوطرفه (تکنیک اوکترلونی)
    - انتشار یک طرفه (ایمنودیفوزیون شعاعی RID یا SRID)
  - ژلی الکتروفورزی
    - کانترایمونوالکتروفورز
    - الکتروفورز تثبیت ایمنی (IFE)
    - الکتروفورز راکتی
    - ایمنوالکتروفورز (IEP)
  - فاز محلول
    - کدورت سنجی
    - نفلومتری
  - ذره‌ای : آگلوتیناسیون
- ایمنواسی نشاندار
  - رادیو ایمنواسی (RIA)
  - آنزیم ایمونواسی (EIA)
  - فلورسنت ایمونواسی (FIA)
  - کمی لومینسنت اسی (CLA)

تاریخچه

مرحله ۲: اندازه‌گیری کمّی با مواد رادیواکتیو — Radioimmunoassay (RIA) (1960)

در سال ۱۹۶۰، Solomon Berson و Rosalyn Yalow در بیمارستان اداره بازنشستگان نیویورک،

روش RadioimmunoAssay (RIA) را معرفی کردند.

این روش برای اندازه‌گیری مقدار انسولین پلاسمای اندوژنوس طراحی شد.

RIA از آنتی‌بادی‌های برچسب‌دار با ایزوتوپ‌های رادیواکتیو استفاده می‌کرد و قادر بود غلظت‌های بسیار کم را اندازه‌گیری کند.

مشکل اصلی RIA استفاده از مواد رادیواکتیو که خطرات ایمنی، نیاز به ذخیره‌سازی ویژه، و محدودیت‌های قانونی داشت.

این مشکل، دانشمندان را به جستجوی یک جایگزین ایمن‌تر واقعی ترغیب کرد و اینجا بود که ELISA به دنیا آمد.

تاریخچه

مرحله ۳: تولد الایزا — Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (1971)

در سال ۱۹۷۱، دو گروه مستقل و همزمان، روشی را ابداع کردند که بدون نیاز به مواد رادیواکتیو، قادر به تشخیص و اندازه‌گیری کمّی پروتئین‌ها باشد:

✓ **گروه اول: Eva Engvall و Peter Perlmann در استکهلم، سوئد**

اولین مقاله علمی درباره Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) را منتشر کردند.

آن‌ها از آلکالن فسفاتاز به عنوان آنزیم گزارشگر (Reporter enzyme) استفاده کردند و موفق شدند مقدار IgG را در سرم خرگوش اندازه‌گیری کنند.

این روش بر روی سطح جامد (Solid-phase–معمولاً پلی‌استایرن) انجام می‌شد و از واکنش آنتی‌بادی–آنتی‌ژن برای تشخیص استفاده می‌کرد.

✓ **گروه دوم: Anton Schuurs و Bauke Van Weemen در هلند**

در همان سال، روشی به نام Enzyme ImmunoAssay (EIA) را معرفی کردند.

آن‌ها از horseradish peroxidase (HRP) به عنوان آنزیم گزارشگر استفاده کردند و موفق شدند hCG را در ادرار تشخیص دهند که امروزه در تست‌های بارداری استفاده می‌شود.

این دو کشف، پایه‌های الایزا را گذاشتند: استفاده از آنزیم به جای رادیواکتیو + فاز جامد برای جداسازی + واکنش اختصاصی آنتی‌بادی.

تاریخچه

مرحله ۴: توسعه فرمت‌های مختلف الایزا (۱۹۷۶–۱۹۷۸)

پس از معرفی اولیه، الایزا به سرعت به چندین فرمت مختلف توسعه یافت:

۱۹۷۶: Competitive ELISA

در این روش، یک سوبسترای کونژوگه شده با پروتئین هدف برای اتصال به آنتی‌بادی رقابت می‌کند.

برای تشخیص هورمون‌هایی مثل hCG (Human chorionic gonadotropin) استفاده شد.

۱۹۷۷: Sandwich ELISA

در این فرمت، دو آنتی‌بادی استفاده می‌شود: یکی برای تثبیت Coating antibody و دیگری برای تشخیص Detection antibody

این روش برای پروتئین‌هایی که دارای چند اپی‌توپ Multiple epitopes هستند، بسیار مناسب است.

اولین بار برای تشخیص آلبومین سرم انسانی تست شد.

۱۹۷۸: Indirect ELISA

در این روش، یک آنتی‌بادی ثانویه Secondary antibody که با آنزیم برچسب‌دار شده است، برای تشخیص آنتی‌بادی اولیه Primary antibody استفاده می‌شود.

این روش برای اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های موجود در نمونه مثل IgG, IgM بسیار مؤثر است.

این فرمت‌ها باعث شدند که الایزا انعطاف‌پذیرتر و قابل استفاده در کاربردهای گوناگون شود — از تشخیص هورمون‌ها تا تشخیص عفونت‌ها.

طراح و توسعه هنده کیت

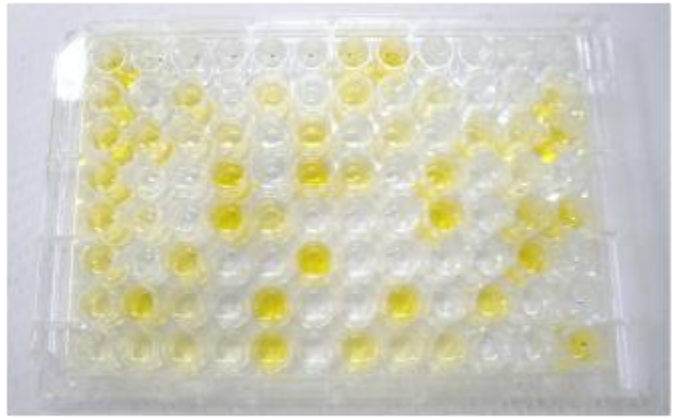
تکنسین یا مصرف کننده کیت

الایزا ELISA مخفف عبارت انگلیسی زیر است:

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

آزمون ایمونوسوربنت مرتبط با آنزیم یا الایزا (تلفظ رایج در فارسی).

ELISA: An example of an assay using a 96-well plate.



The yellow color indicates that the target protein is present. The higher degree of the color, the higher concentration of the target protein.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

«ایمونو Immuno» اشاره به سیستم ایمنی و استفاده از آنتی‌بادی‌ها یا آنتی‌ژن‌ها دارد.

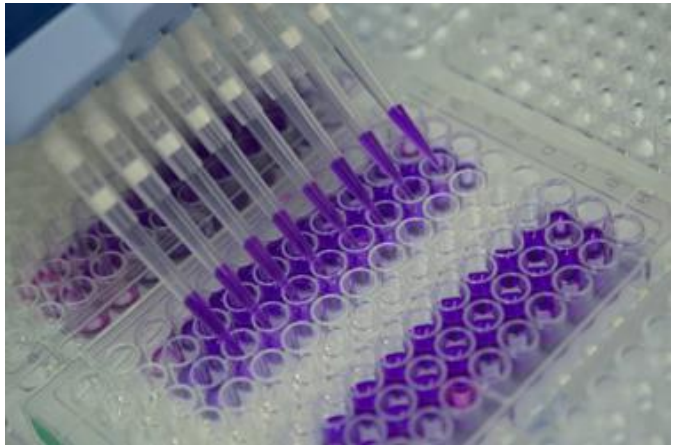
«سوربنت Sorbent» به این معنی که یکی از اجزای واکنش (معمولاً آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن) به سطح جامد (معمولاً یک پلیت میکروتیتر پلاستیکی) متصل (جذب) شده است.

«مرتبط با آنزیم Enzyme-Linked» یعنی آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن دوم به یک آنزیم (مثل HRP یا AP) متصل است که در حضور سوبسترای مناسب، سیگنال قابل اندازه‌گیری (معمولاً رنگی) تولید می‌کند.

الایزا یکی از رایج‌ترین و معتبرترین روش‌های آزمایشگاهی در زیست‌شناسی، ایمونولوژی و پزشکی بالینی است که برای تشخیص و اندازه‌گیری مولکول‌های خاصی مانند آنتی‌بادی‌ها، آنتی‌ژن‌ها، پروتئین‌ها، هورمون‌ها و سایر ترکیبات در نمونه‌های بیولوژیکی به‌کار می‌رود.

الایزا یک تکنیک ایمونواسی(Immunoassay) است.
ایمونواسی‌ها آزمایش‌هایی هستند که بر اساس تعامل اختصاصی بین **آنتی‌بادی** و **آنتی‌ژن** عمل می‌کنند، همان تعاملی که سیستم ایمنی بدن برای شناسایی و مبارزه با عوامل بیگانه (مثل ویروس‌ها یا باکتری‌ها) از آن استفاده می‌کند.

در الایزا، این واکنش در شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی و روی یک سطوح جامد (معمولاً کف چاهک‌های یک پلیت میکروتیتر پلاستیکی) انجام می‌شود.



✓تثبیت (Immobilization): یکی از اجزای واکنش (آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی) به سطح پلیت متصل می‌شود.

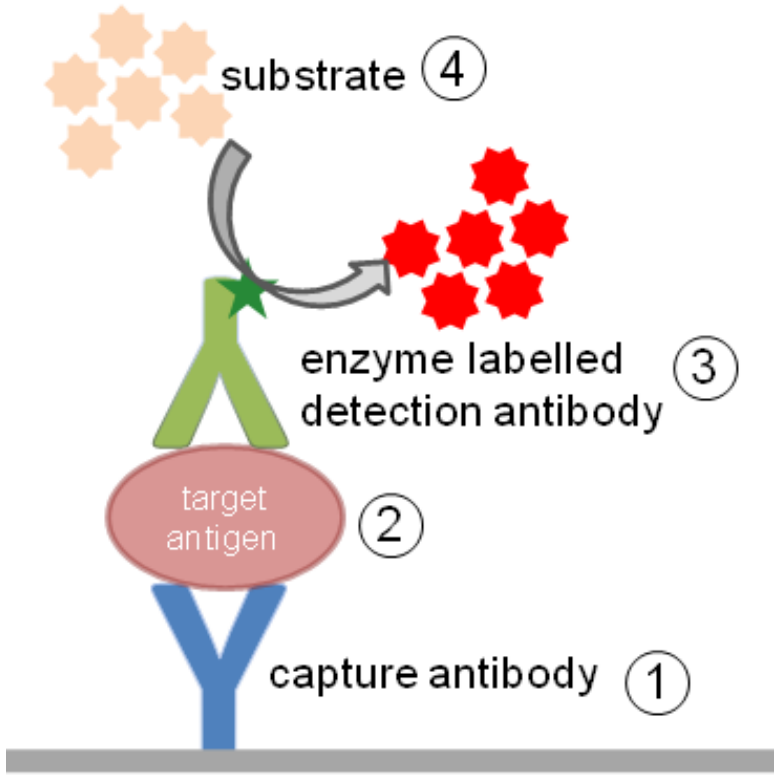
✓افزودن نمونه: نمونه بیولوژیکی (مثل خون، ادرار، بزاق یا مایع مغزی-نخاعی) به پلیت اضافه می‌شود. اگر مولکول هدف در نمونه وجود داشته باشد، به جزء تثبیت‌شده متصل می‌شود.

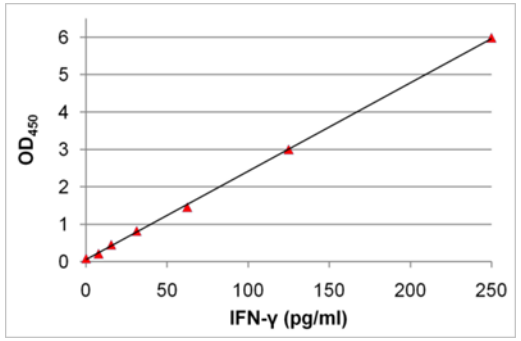
✓تشخیص (Detection): یک آنتی‌بادی دوم که به آنزیم متصل است (enzyme-linked) اضافه می‌شود و به کمپلکس تشکیل‌شده می‌چسبد.

✓تولید سیگنال: یک سوبسترای رنگ‌زا اضافه می‌شود که توسط آنزیم تبدیل به رنگ می‌شود.

وجود رنگ = نتیجه مثبت

شدت رنگ = متناسب با غلظت مولکول هدف (در تست‌های کمّی)

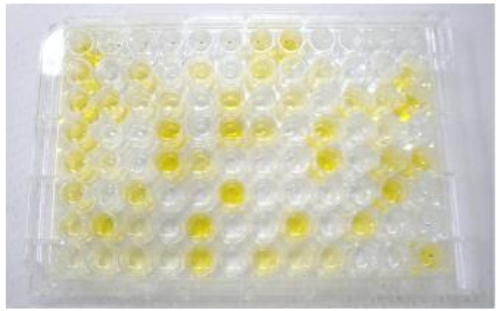




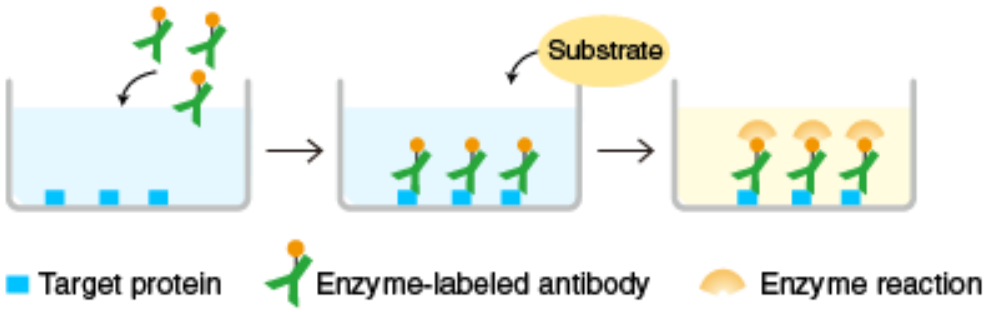
الایزا

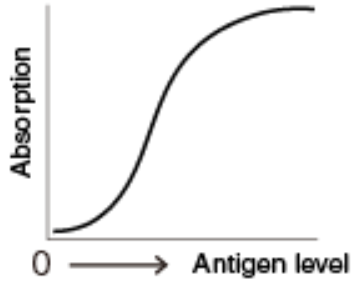
- غیر رقابتی
  - مستقیم
  - غیرمستقیم
  - ساندویچی
- رقابتی

ELISA: An example of an assay using a 96-well plate.



الایزای مستقیم Direct ELISA





آنتی‌ژن یا پروتئین هدف مستقیماً روی سطح پلیت تثبیت می‌شود.
سپس یک آنتی‌بادی اولیه کونژوگه‌شده با آنزیم اضافه می‌شود که مستقیماً به آنتی‌ژن متصل می‌شود.
پس از شستشو، سوبسترای رنگ‌زا اضافه شده و سیگنال رنگی اندازه‌گیری می‌شود.

مزایا:

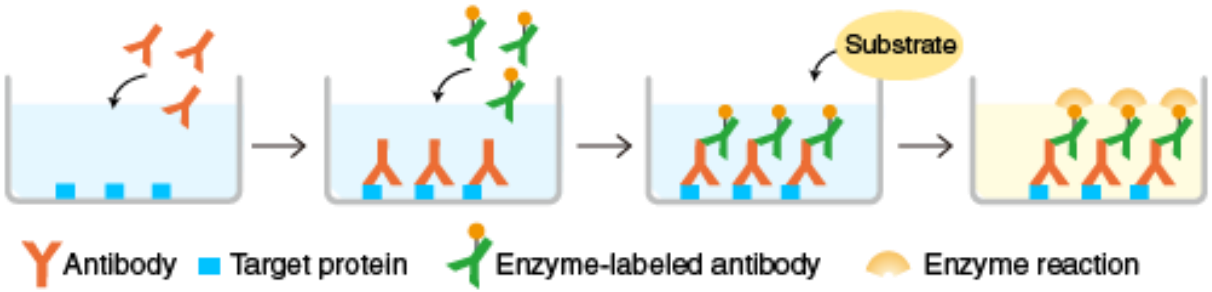
سریع (تعداد مراحل کم)
کاهش احتمال واکنش غیراختصاصی (عدم نیاز به آنتی‌بادی ثانویه)

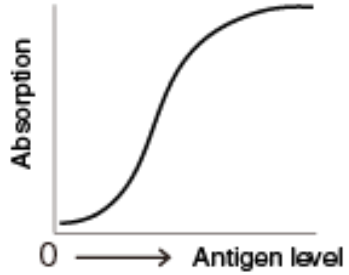
معایب:

نیاز به کونژوگه‌کردن آنتی‌بادی اولیه (گران و زمان‌بر)
حساسیت کمتر نسبت به روش‌های غیرمستقیم

تشخیص آنتی‌ژن‌های فراوان (مثل ویروس‌ها در نمونه‌های خالص)

الایزای غیرمستقیم Indirect ELIS





آنتی‌ژن روی پلیت تثبیت می‌شود.

آنتی‌بادی اولیه (غیرکونژوگه) به آنتی‌ژن متصل می‌شود.

سپس یک آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه‌شده با آنزیم که علیه ایزوتایپ آنتی‌بادی اولیه است، اضافه می‌شود.

پس از شستشو و افزودن سوبسترای، سیگنال اندازه‌گیری می‌شود.

مزایا:

تقویت سیگنال: چندین آنتی‌بادی ثانویه می‌توانند به یک آنتی‌بادی اولیه متصل شوند → حساسیت بالاتر

انعطاف‌پذیری: یک آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه می‌تواند برای انواع آنتی‌بادی‌های اولیه از یک گونه (مثلاً ضد انسانی IgG) استفاده شود.

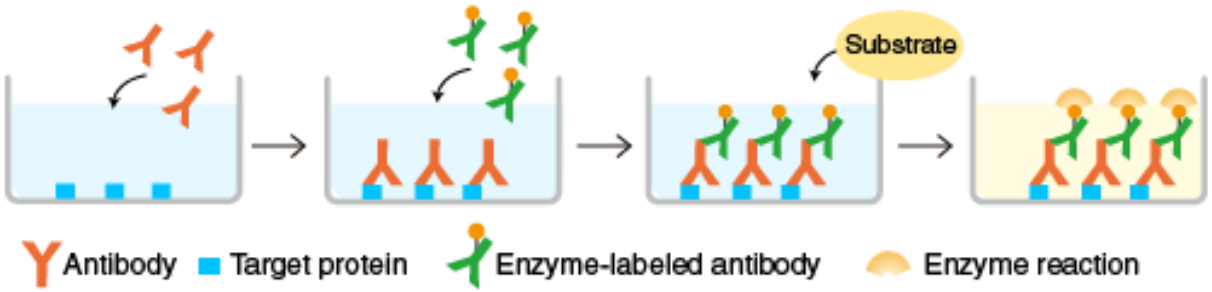
معایب:

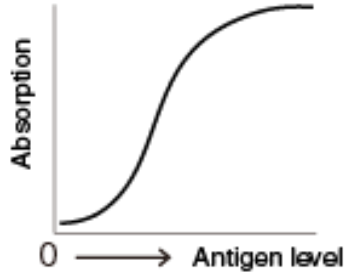
احتمال بالاتر واکنش غیراختصاصی

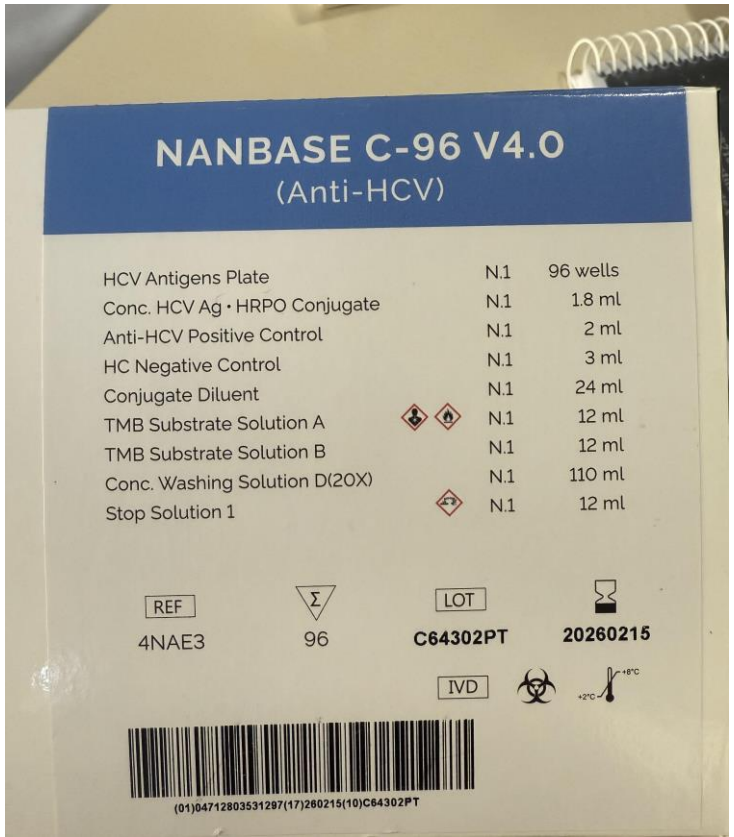
زمان بیشتر به‌دلیل یک مرحله اضافه

تشخیص آنتی‌بادی‌های سرمی (**مثل آنتی‌بادی ضد HIV در سرم بیمار**)

الایزای غیرمستقیم Indirect ELIS

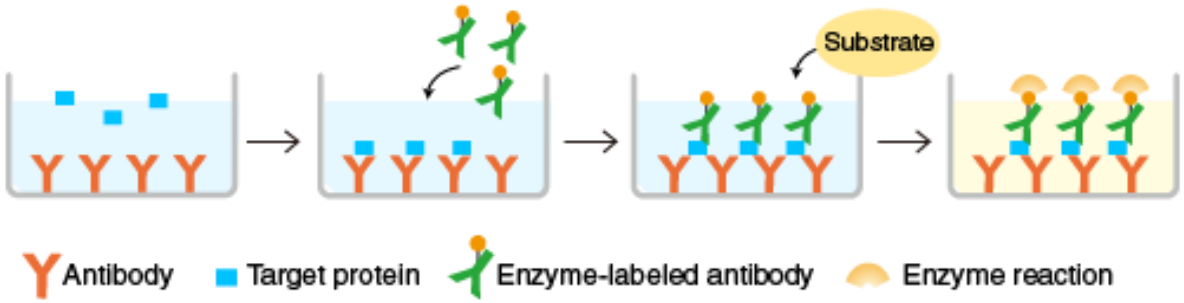


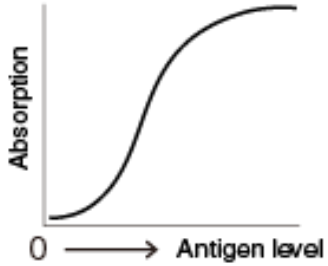




تشخیص آنتی‌بادی‌های سرمی (**مثل آنتی‌بادی ضد HIV در سرم بیمار**)

الایزای ساندویچی Sandwich ELISA





یک آنتی‌بادی کاپچر (Capture antibody) نارنجی، روی پلیت تثبیت می‌شود.

نمونه حاوی آنتی‌ژن هدف اضافه می‌شود و به آنتی‌بادی کاپچر متصل می‌شود.

سپس یک آنتی‌بادی تشخیصی (Detection antibody) سبز، که علیه اپی‌توپ دیگری از همان آنتی‌ژن است و با آنزیم کونژوگه شده، اضافه می‌شود.

نتیجه: آنتی‌ژن بین دو آنتی‌بادی "گیر" می‌افتد — مانند یک ساندویچ.

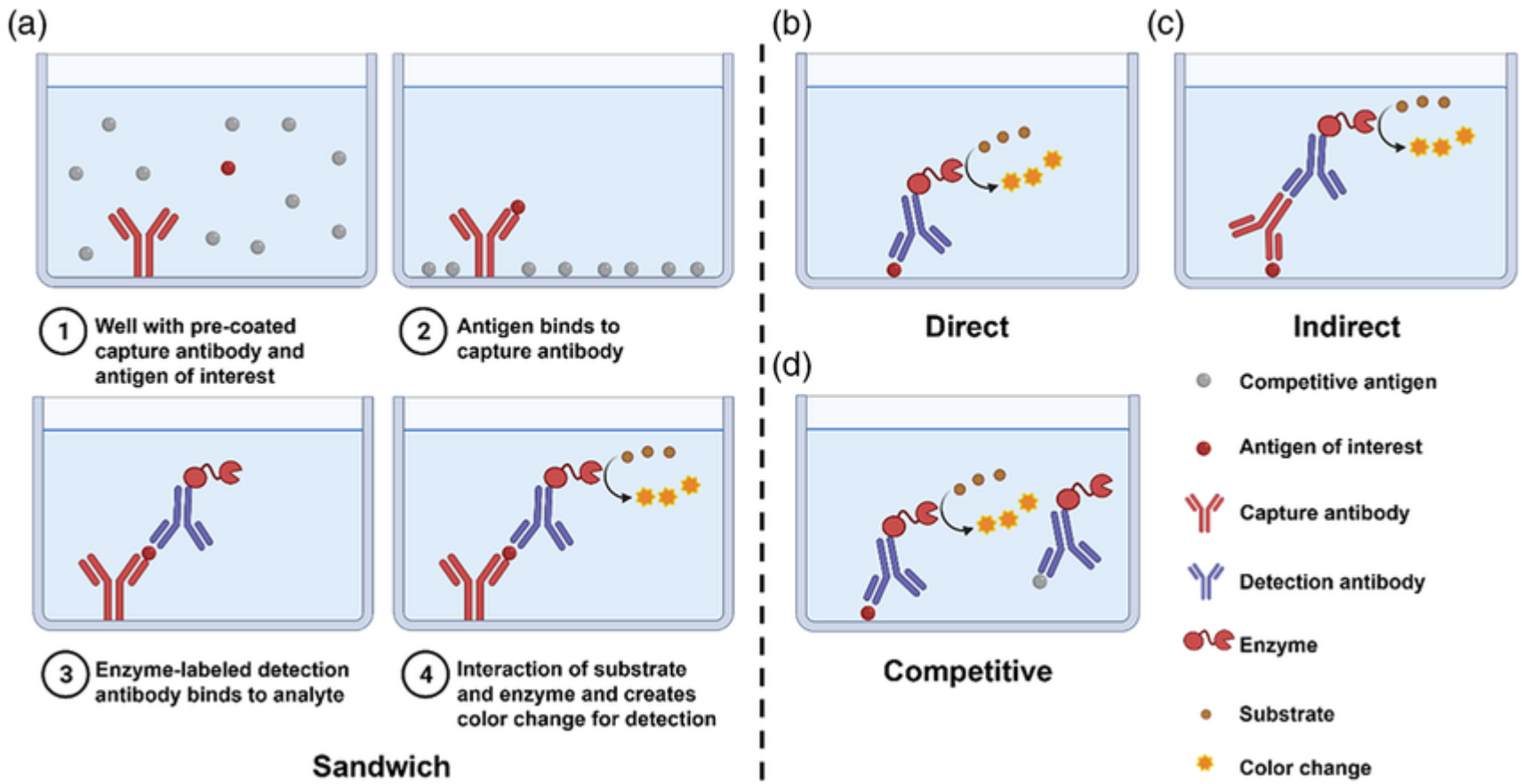
مزایا:

بالاترین اختصاصیت و حساسیت (نیاز به تشخیص دو اپی‌توپ مجزا)

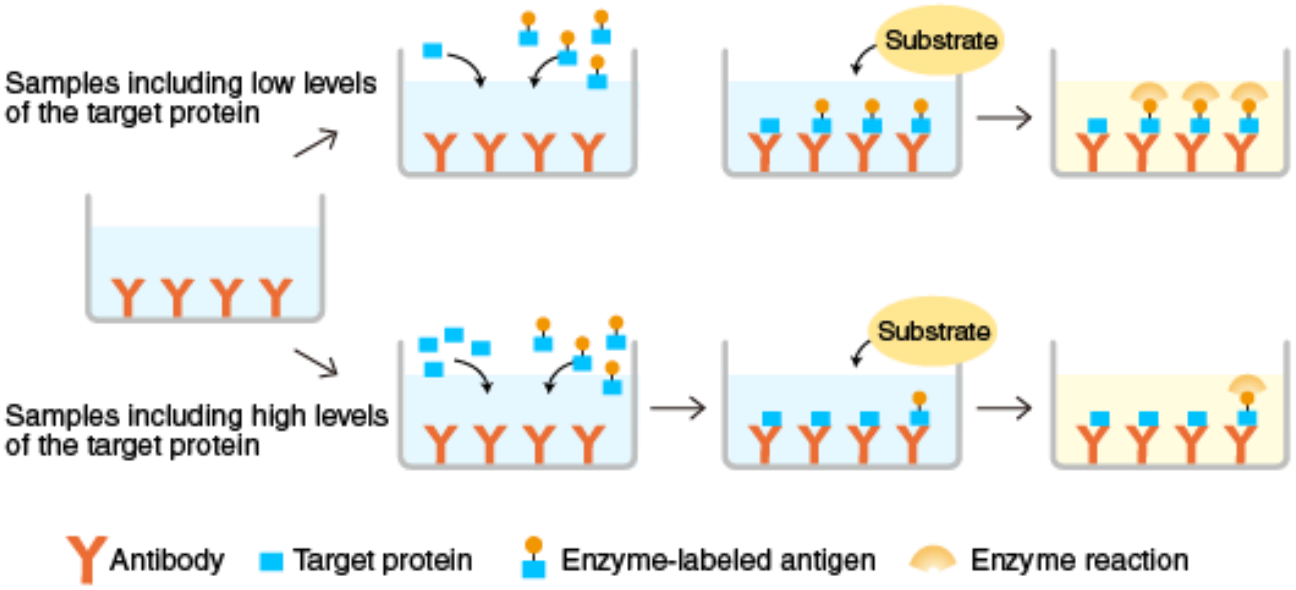
مناسب برای نمونه‌های پیچیده (مثل سرم، ادرار) بدون نیاز به خالص‌سازی آنتی‌ژن

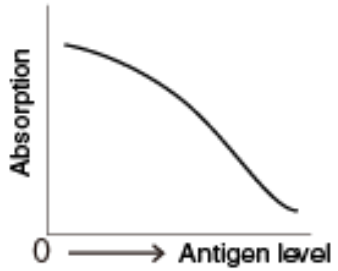
شرط ضروری: **آنتی‌ژن باید** حداقل دو اپی‌توپ اختصاصی **داشته باشد تا هر دو آنتی‌بادی بتوانند همزمان به آن متصل شوند.**

اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول (مثل سایتوکاین‌ها، هورمون‌ها، مارکرهای تومور)


(a)
1 Well with pre-coated capture antibody and antigen of interest
2 Antigen binds to capture antibody
3 Enzyme-labeled detection antibody binds to analyte
4 Interaction of substrate and enzyme and creates color change for detection
Sandwich
(b)
Direct
(c)
Indirect
(d)
Competitive
Competitive antigen
Antigen of interest
Capture antibody
Detection antibody
Enzyme
Substrate
Color change

الایزای رقابتی Competitive ELISA





یک آنتی‌بادی خاص روی پلیت تثبیت می‌شود.

نمونه حاوی آنتی‌ژن ناشناخته و یک مقدار ثابت از آنتی‌ژن کونژوگه‌شده با آنزیم با هم مخلوط شده و به پلیت اضافه می‌شوند.

آنتی‌ژن نمونه و آنتی‌ژن کونژوگه برای اتصال به آنتی‌بادی ثابت‌شده رقابت می‌کنند.

رابطه معکوس:

هرچه غلظت آنتی‌ژن در نمونه بیشتر باشد، مقدار آنتی‌ژن کونژوگه‌شده متصل‌شده کمتر است ← رنگ کمتر (ODپایین).

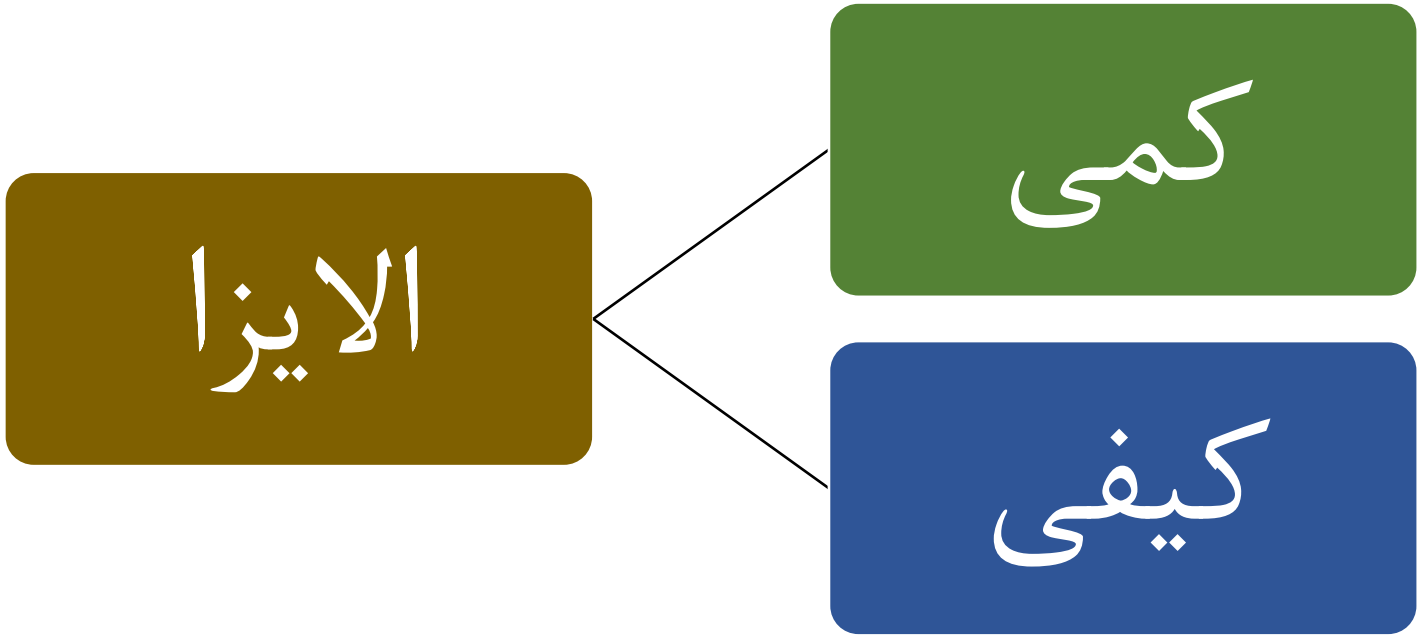
هرچه غلظت آنتی‌ژن در نمونه کمتر باشد، آنتی‌ژن کونژوگه بیشتر به آنتی‌بادی متصل می‌شود ← رنگ بیشتر (ODبالا).

مزایا:

مناسب برای مولکول‌های کوچک (مثل هورمون‌ها، داروها، سموم، هیستامین) که فقط یک اپی‌توپ دارند و در ساندویچی قابل استفاده نیستند.

تحمل بالا در برابر ناخالصی‌های نمونه

اندازه‌گیری آنتی‌ژن‌های با وزن مولکولی کم (Low molecular weight antigens)


الایزا
کمی
کیفی

وسایل و تجهیزاتی که جهت انجام آزمایشات به روش الایزا نیاز است، عبارتست از:

الف- کیت الایزا

۱- یک یا دوعدد پلیت ۹۶ خانه‌ای
۲- ویال‌های استاندارد، کنترل منفی و مثبت
۳- رقیق‌کننده نمونه **Sample Diluents**
۴- کونژوگه نشاندار شده با آنزیم
۵- محلول شستشو
۶- محلول سوبسترا- کروموژن
۷- محلول متوقف‌کننده یا بلوکر(Stopping or Blocking Solution)
۸- بروشور کیت

ب- دستگاه خوانشگرالایزا یا ELISA Reader

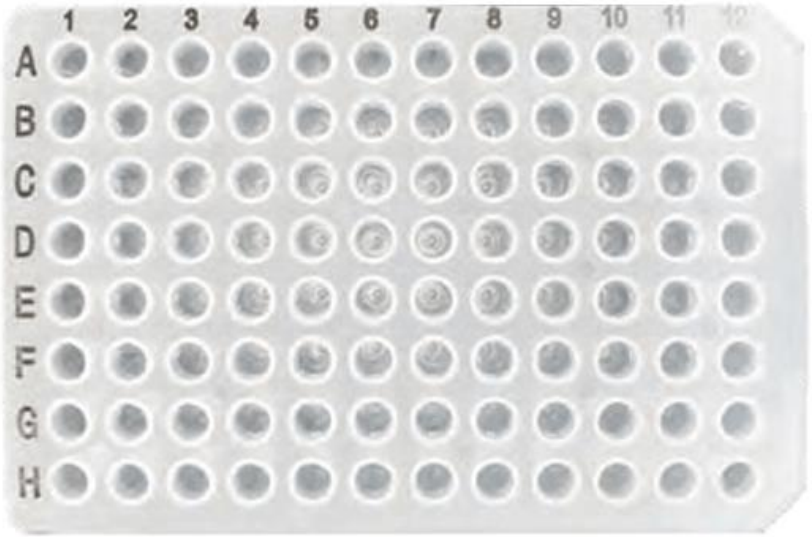
لیبل اصالت کالا
نوع استاندارد
و
کاربرد کیت
تاریخ انقضا، لات نامبر
و
مشخصه GTN
کشور سازنده
دما و نکات نگهداری
AccuBind ELISA
Determinations
E2
Cat No
4925-300A
Lot No:
49K2J1
Exp Date:
05/2024
DOM:10/2021
Monobind. Inc.Lake Forest. CA 92630\ USA
Store at 2-8°C
Do not freeze
For in vitro use only.
Use according to protocol.
Licensed By
MONOBIND Inc.

کیت الایزا

۱- یک یا دوعدد پلیت ۹۶ خانه‌ای

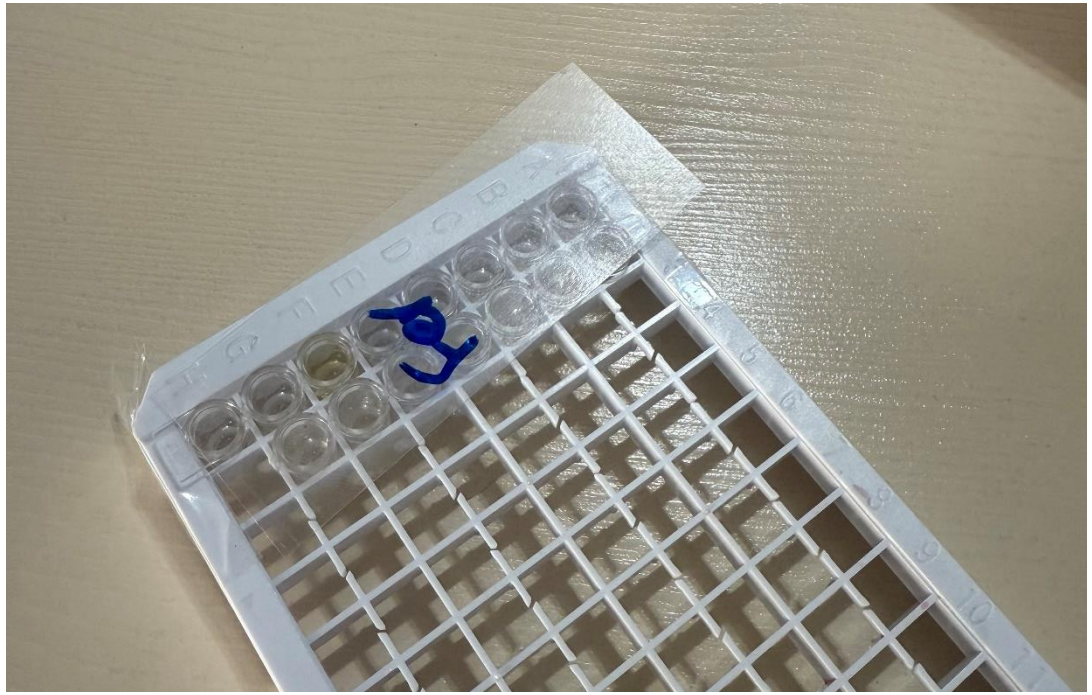
یک یا دوعدد پلیت ۹۶ خانه‌ای که در ۱۲ستون هشت خانه‌ای قرارگرفته‌اند. هر یک ازخانه‌ها را چاهک (Well) و هر ستون هشت خانه‌ای را یک استریپ (Strip) گویند.

جنس چاهک‌ها از پلی‌استیرن، پلی‌وینیل کلراید و یا پلی‌پروپیلن بوده، عمقی حدود 1 cm داشته و به اشکال ته صاف و یا ته گود می‌باشند، که بطورایده آل چاهک‌های ته صاف برای قرائت اسپکتروفتومتری در سنجش‌هایی که در آنها پیشرفت رنگ وجود دارد، پیشنهاد می‌شود. لذا چاهک‌های ته گود برای قرائت اسپکتروفتومتری مناسب نمی‌باشند.



کیت الایزا

یک یا دوعدد پلیت ۹۶ خانه‌ای



کیت الایزا

کونژوگه نشاندار شده با آنزیم

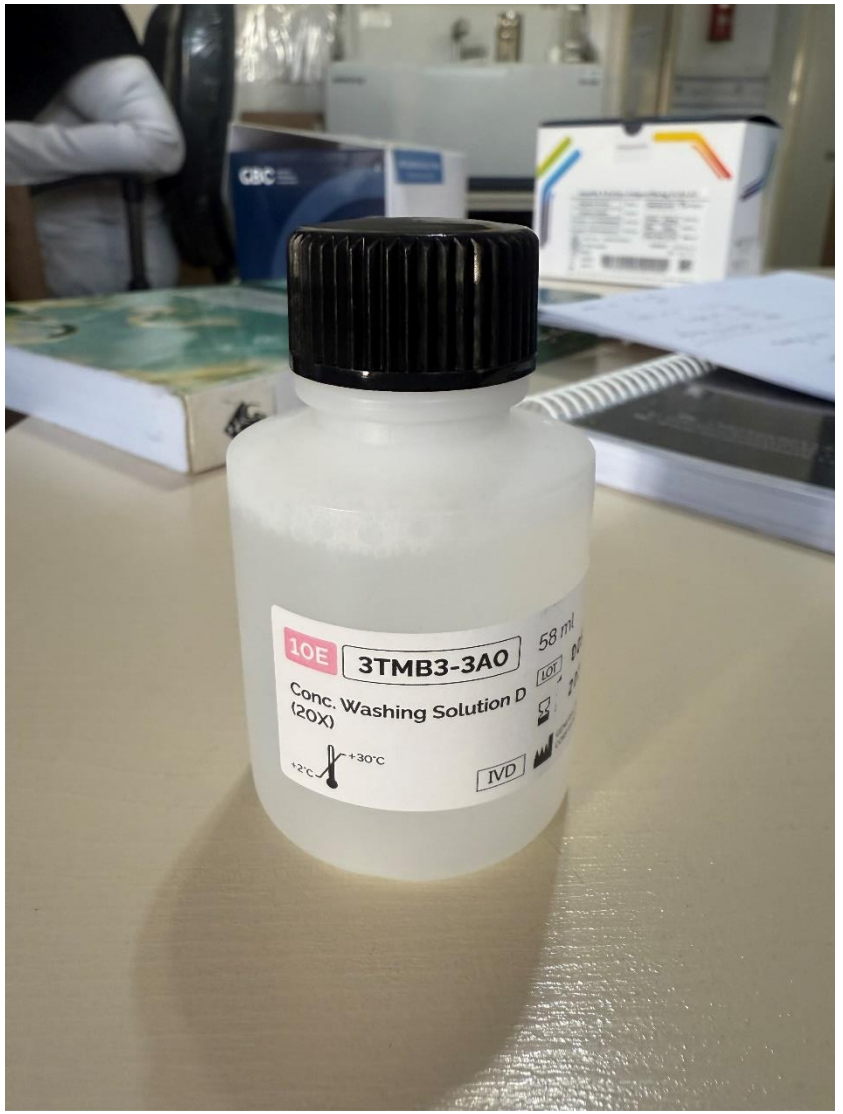
کونژوگه نشاندار شده با آنزیم که از مهم‌ترین آنزیم‌های مورد استفاده در الایزا می‌توان از پراکسیداز ترب کوهی یا HRP، آلکالن فسفاتاز و پنی سیلیناز نام برد که عمدتا" از پراکسیداز استفاده شده و از آلکالن فسفاتاز بعلت گرانی، در کارهای تحقیقاتی استفاده می‌شود. بایستی متذکر شد که آنزیم مورد استفاده برای نشاندارسازی، نقش مهمی در تعیین نوع سوبسترا و نیز نوع محلول متوقف‌کننده دارد.

آنزیم‌های رایج در ELISA

- HRP (Horseradish peroxidase) با سوبسترای تترامتیل بنزیدین (TMB) رنگ آبی تولید می‌کند.
- ALP (Alkaline phosphatase) با پارانیتروفنل (PNP) رنگ زرد می‌دهد.

کیت الایزا

رقیق‌کننده نمونه Sample Diluents



کیت الایزا

محلول شستشو

کیت الایزا

محلول سوبسترا- کروموژن که می‌تواند هم بصورت منفک از یکدیگر و یا بصورت ترکیبی باشد.

لازم بذکر است که در واکنش‌های آنزیمی، سوبسترا بر اساس حلالیت، می‌تواند محلول یا غیرمحلول باشد؛ که در سنجش الایزا بایستی سوبسترا محلول باشد، زیرا اگر غیرمحلول باشد، نمی توان محصول را با دستگاه خوانشگر الایزا یا الایزاریدر قرائت نمود و توضیح اینکه، سوبسترای غیرمحلول در روش دات الایزا و بلاتینگ کاربرد دارد.

در مورد نوع سوبسترا نیز بایستی در نظر داشت، نوع سوبسترا بستگی به کونژوگه آنزیمی داشته و لذا اگر کونژوگه آنزیمی HRP باشد، سوبسترا می‌تواند تترامتیل بنزیدین (TMB) و یا ارتوفنل دی آمین (OPD) بوده و رنگ حاصل از واکنش آنزیمی آبی خواهد شد، اما اگر کونژوگه آنزیمی ALP باشد، سوبسترا پارانیتروفنل (PNP) بوده و رنگ حاصل از واکنش نیز، زرد خواهد شد.

کیت الایزا

ویال‌های استاندارد، کنترل منفی و مثبت

وسایل و تجهیزاتی که جهت انجام آزمایشات به روش الایزا انجام می‌گیرد، عبارتست از:

الف- کیت الایزا

ب- دستگاه خوانشگرالایزا یا ELISA Reader

شستشو

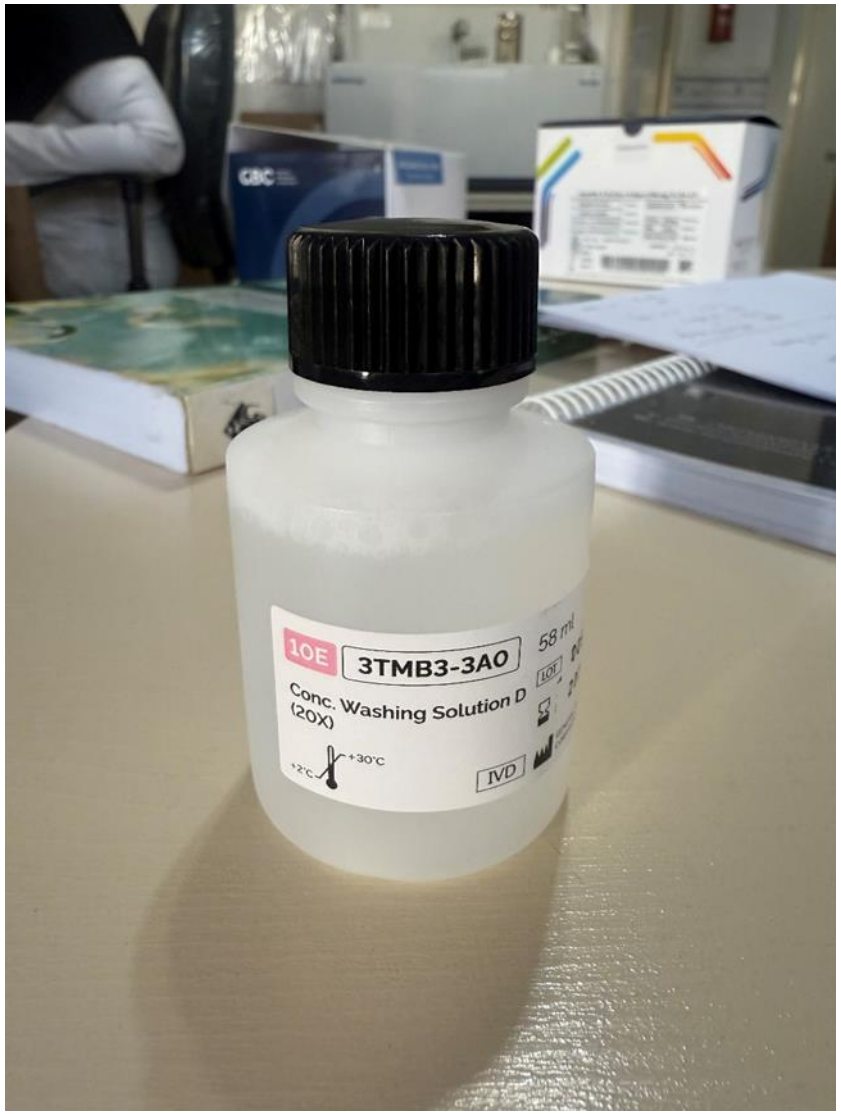
چاهک V یا U

مشاهده خطای بک گراند در همه چاهک ها

روش انجام آزمایش بصورت شماتیک

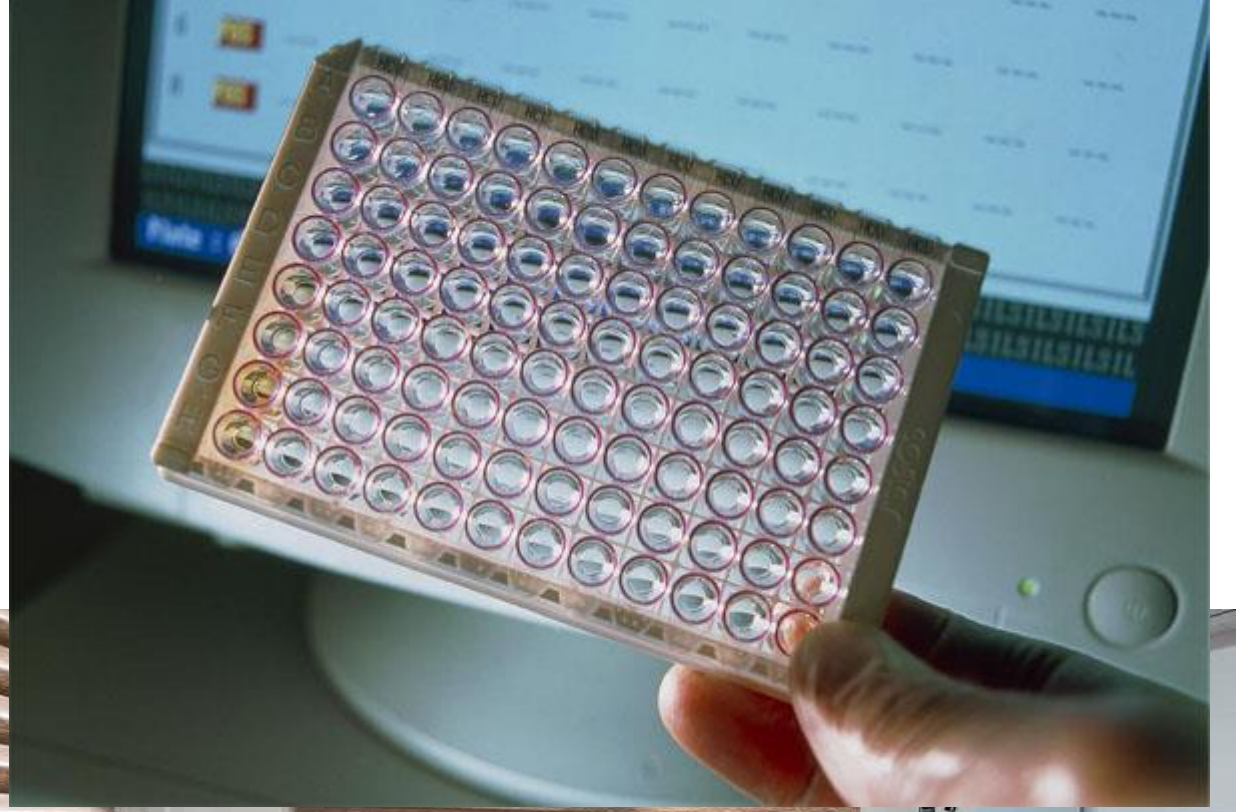
چاهکهای کوت شده با آنتی بادی علیه HBs Ag			
محلولها	بلانک	کنترل ها	نمونه
کنترل ها	-	۱۰۰ میکرولیتر	-
نمونه	-	-	۱۰۰میکرولیتر سرم یا پلاسما
کنژوگه ۱	-	۲۵ میکرولیتر	۲۵ میکرولیتر
با حرکت ملایم محتویات پلیت را به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط نمایید . دهانه چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کنید .			
کنژوگه ۲	-	۲۵ میکرولیتر	۲۵ میکرولیتر
با حرکت ملایم محتویات پلیت را به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط نمایید . دهانه چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کنید . برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید . طبق دستور شستشو ۵ بار چاهک را بشویید . **هر مرحله شستشو نیاز به soaking time ۱۵ ثانیه ای دارد .**			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید .			
محلول متوقف کننده	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را در مقابل بلانک و در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید .			

رسوب و ایجاد نمک در مخزن شستشو



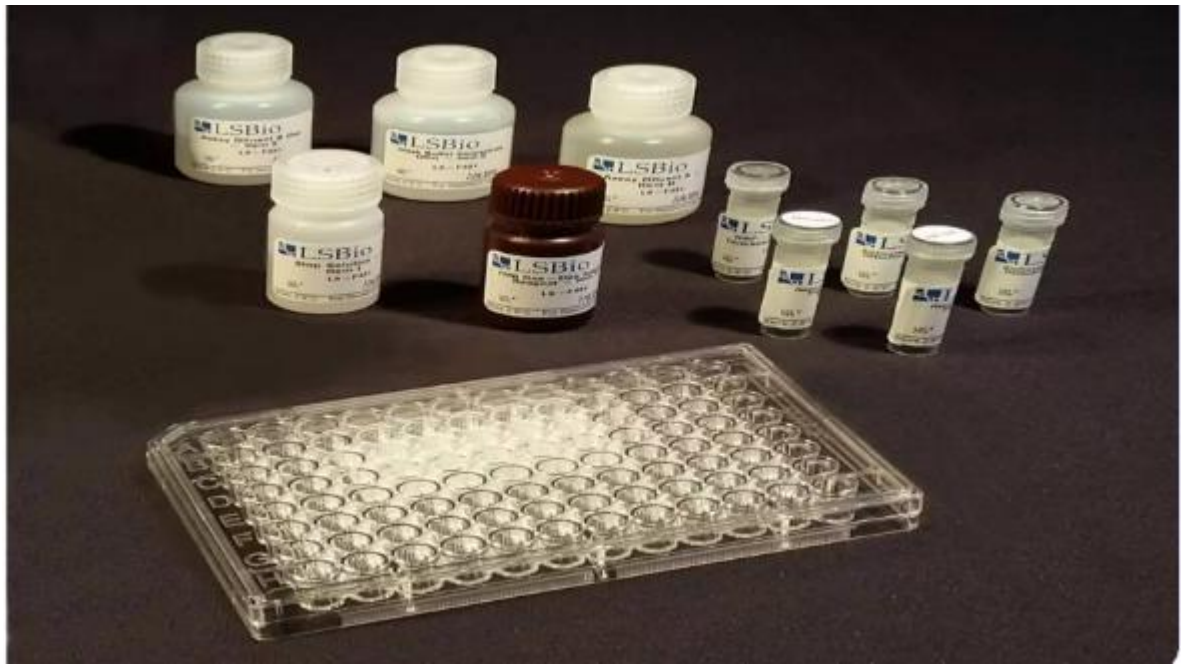
دمای اتاق

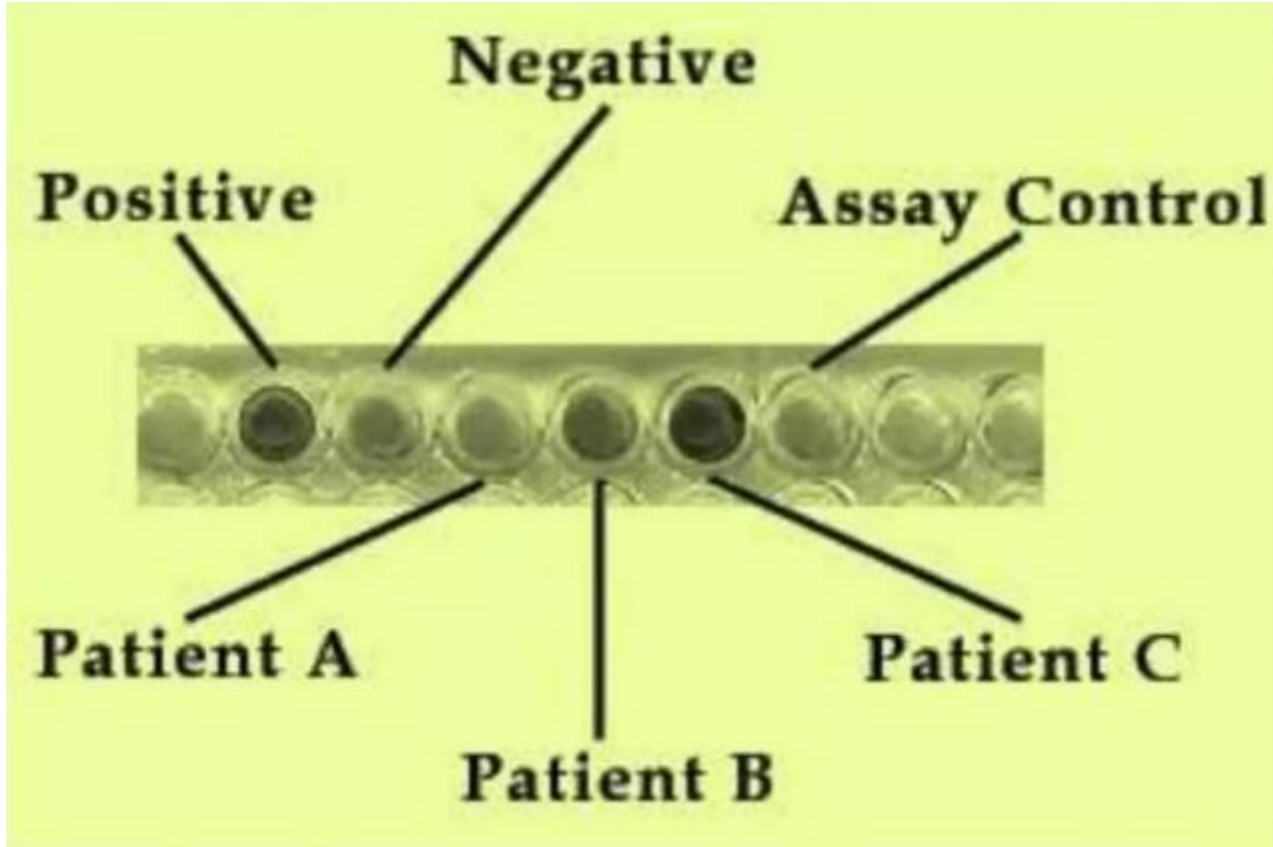
اثر لبه (Edge Effect)



عدم آلوده کردن کل محلول

چک کردن کلی کیت




Negative
Positive
Assay Control
Patient A
Patient B
Patient C