

Enzyme Linked Immunosorbent Assay

مقدمه:

تکنیک‌های سنجش‌های ایمنی (Immunoassay Techniques)

به طور کلی مبنای تمام تست‌های سنجش ایمنی نشاندار (labelled immunoassay) بر اساس شناسایی واکنش آنتی‌ژن-آنتی‌بادی استوار است. اختصاصی بودن آنتی‌بادی‌ها برای آنتی‌ژن‌های خاص، آنها را به معرف‌های با ارزش برای تعیین مقادیر بسیار کم آنتی‌ژن‌ها تبدیل کرده است.

انواع نشانگرها:

در روش‌های ایمنونواسی به کمک نشانگرهای مختلفی می‌توان واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی را ردیابی کرد، و در صورت لزوم به صورت کمی اندازه‌گیری نمود. این نشانگرها عبارتند از:

۱. نشانگرهای رادیواکتیو (radioisotopic labels): سنجش ایمنی بوسیله‌ی مواد نشاندار شده با رادیوایزوتوپ‌ها را معمولاً سنجش ایمنی بوسیله‌ی رادیوایزوتوپ (RIA: radioimmuno assay) می‌نامند.
۲. نشانگرهای آنزیمی (enzyme labels): سنجش ایمنی به وسیله‌ی مواد نشاندار شده با آنزیم را معمولاً سنجش ایمنی به وسیله‌ی آنزیم (EIA: Enzyme Immuno assay) می‌نامند.
۳. نشانگرهای فلوروسنت (fluorochrome labels): سنجش ایمنی به وسیله‌ی مواد نشاندار شده با مواد فلوروسنت را معمولاً سنجش ایمنی به وسیله‌ی فلوروسنت (IFA: Immuno Fluorescent Assay) می‌نامند.
۴. نشانگرهای کمی‌لومینسانس (Chemiluminescent Labels): سنجش ایمنی به وسیله‌ی مواد نشاندار شده با ترکیبات کمی‌لومینسانس را معمولاً سنجش ایمنی وابسته به کمی‌لومینسانس (Immuno chemileuminescent assay) می‌نامند.

تشخیص و اندازه‌گیری آنالیت بوسیله‌ی آنتی‌بادی ابتدا به وسیله‌ی تکنیک رادیوایمنونواسی (radio immuno assay) با اتصال آنتی‌بادی‌ها به مواد رادیواکتیو گسترش یافت؛ اما به دلیل خطرات بالقوه‌ی کار با مواد رادیواکتیو، این تکنیک با تکنیک سنجش ایمنی به وسیله‌ی آنزیم (ELISA) جایگزین شد. در حال حاضر سنجش ایمنی به وسیله‌ی نشانگرهای متصل به مواد کمی‌لومینسانس از بقیه‌ی تکنیک‌های نامبرده از حساسیت سنجش (Analytical sensitivity) بیشتری برخوردار است.

روش الایزا (ELISA)

الایزا (Enzyme Linked Immunosorbent Assay = ELISA) یک روش سنجش ایمنی پرکاربرد و کمی، جهت اندازه‌گیری مواد موجود در سرم، ادرار، مایع سیمن و مایع رویی کشت سلولی است که حساسیت آن از ng/mL تا pg/mL می‌باشد. این تکنیک با ایجاد انقلابی در علم ایمنولوژی بیشترین کاربرد را در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی دارد. اساس کار الایزا استفاده از آنزیم جهت شناسایی اتصال آنتی‌ژن-آنتی‌بادی می‌باشد. در این روش آنزیم نامبرده، به آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی متصل است و یکی از عوامل موجود در واکنش آنتی‌ژن-آنتی‌بادی به سطح جامد متصل شده است؛ نقش این سطح جامد، تسهیل جداسازی عوامل درگیر در واکنش آنتی‌ژن-آنتی‌بادی، از عوامل آزاد و متصل نشده می‌باشد.

به منظور تسريع در انجام آزمايشات و صرفه جويي در مواد مصرفي، ميكروپليت هاي الايزا به عوض لوله آزمايش طراحي و ساخته شده اند. اين ميكروپليت ها معمولا در ابعاد ۸/۵ در ۱۲/۵ سانتی متر ساخته شده و داراي حفره يا چاهک مي باشند. در حقيقت يك ميكروپليت حاوي تعدادي چاهک كوچك مي باشد (ميكروپليت هاي ۹۶ چاهكي، ۱۲ چاهكي و...) كه بصورت نزديك بهم و پيوسته در كنار يكدیگر قرار گرفته اند و امكان انجام آزمايش بر روي چندین نمونه را به طور همزمان فراهم مي کنند

در حال حاضر فيلترفوتومترهاي خاصي به نام خوانشگر الايزا (ELISA reader) براي سنجش رنگ در ميكروپليت هاي الايزا موجود مي باشند

آنزيم هاي مورد استفاده در الايزا:

- پراکسیداز ترب کوهی (horse radish peroxidase, HRP)
- آلکالین فسفاتاز (Alkaline phosphatase)
- بتا گالاکتوزیداز (β -galactosidase)
- اوره آز (Urease)
- Horse Raddish Peroxidase (HRP): اين آنزيم يك گليكوپروتئين آهن دار با ۷ ايزوتپ مي باشد كه در ريشه ي ترب کوهي يافت مي شود. ايزوآنزيم C آن در ۵۰٪ موارد مورد استفاده قرار مي گيرد. واكنش اين آنزيم با سوبستراي خود شامل چندین واكنش اكسيداتي و كاتاليتيك است كه موجب احياي پراكسيد و در نهايت تغيير رنگ كروموژن مي شود. پر کاربردترین كروموژن مورد استفاده براي اين آنزيم در واكنش هاي رنگزا، تترا متيل بنزيدین (Tetramethylbenzidine) يا TMB است. بررسی حضور و غلظت آنالیت با اندازه گیری جذب نوری محلول در طول موج 450 nm امکان پذیر است.
- آلکالین فسفاتاز (Alkaline phosphatase): دومین آنزیم پر کاربرد در ایمونواسی است. این آنزیم از رودی گاو یا از باکتری اشريشياکلاي بدست مي آيد. سوبستراي مورد استفاده براي اين آنزيم پارانیتر فنیل فسفات (pNPP) يا (para Nitrophenylphosphat) است. واكنش با اضافه کردن سدیم كربنات متوقف مي شود و جذب نور زرد رنگ آن، در طول موج 405nm اندازه گیری غلظت آنالیت را ممكن مي سازد.
- آنزیم گالاکتوزیداز (β -galactosidase) با سوبسترای ($ortho$ -Nitrophenyl- β -galactoside = ONPG) و آنزیم اوره آز با سوبسترای اوره برموزول نیز در موارد معدودی استفاده می شوند و رنگ ایجاد شده توسط آنها به ترتیب در طول موج 420nm و 588nm با دستگاه خوانشگر الايزا قابل بررسی می باشد.

روش بررسی نتایج

- روش چشمی: اين نوع بررسی فقط در مورد تست هاي كیفی (مثبت/منفی) کاربرد دارد و نمیتوان مقدار آنالیت را از این طریق سنجید اما در محیط های خارج از آزمایشگاه (Field) و در شرایط بحرانی و اپیدمی ها و در آزمایشگاه های صحرایی بسیار راهگشاست.
- فوتومتری: در مورد تست های کمی کاربرد دارد و غلظت دقیق آنالیت را بوسیله ی مقایسه جذب نوری آنالیت مجهول با جذب استانداردهایی با غلظت مشخص، تعیین می نماید.

وسایل مورد نیاز

- میکروپیپت تک کاناله یا چند کاناله (با حجم ثابت یا قابل تنظیم) که در ایران موسوم به سمپلر می‌باشند.
- میکروپلیت الایزا (به شکل یکپارچه یا به صورت قاب الایزا به همراه ردیف چاهک‌های بهم متصل).
- دستگاه شستشوی الایزا (ELISA WASHER) یا آب‌فشان ساده (pissete).
- خوانشگر الایزا

تذکر: در آزمایش‌های رایج و پرکاربرد، معمولاً از میکروپلیت‌های آماده الایزا (آسترکشی یا اصطلاحاً کوت شده) استفاده می‌شود ولی برای مقاصد تحقیقاتی یا ساخت پلیت الایزا در آزمایشگاه‌های ایمونوسرولوژی توسط کاربران، یک مرحله آسترکشی (یا Coating) وجود دارد زیرا به آن اشاره می‌شود که مراحل مقدماتی نیز اقلام ۱ تا ۵ در فهرست ذیل برای مهیاسازی اولیه پلیت در نظر گرفته می‌شود.

مواد مورد نیاز

۱. بافر سدیم کربنات/ بیکربنات^۱ برای تهیه ی بافر کوتینگ (Coating buffer) با غلظت ۱۰ میلی مولار و $\text{PH} = 9.6$
۲. آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی خالص با غلظت 2g/ml- 10g/ml
۳. بافر فسفات نمکی (phosphate buffered saline) با $\text{PH} = 7.4$
۴. محلول 0.5% Tween 20 حاوی شستشوی چاهک‌ها (شستشو هر چاهک باید حداقل سه بار با ۳۰۰ میکرولیتر از محلول شستشو صورت گیرد)
۵. محلول بلاک کننده^۲ حاوی آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin or BSA) ۱ تا ۵ درصد، جهت جلوگیری از اتصالات غیر اختصاصی آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی‌ها به کف پلیت. (در موارد لزوم میتوان به جای آلبومین سرم گاوی، از پروتئین شیر خشک^۳، کازئین^۴، سرم حیوانی و ... جهت پوشاندن کف پلیت استفاده کرد)
۶. نمونه‌ی حاوی آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی مجهول
۷. آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن (به روش مورد استفاده جهت سنجش بستگی دارد) متصل شده به آنزیم
۸. سوبسترا (و کروموژن)^۵ مربوط به آنزیم استفاده شده در مرحله قبل
۹. محلول متوقف کننده‌ی واکنش (Stop reagent) حاوی اسید یا باز جهت متوقف کردن واکنش آنزیم با سوبسترا. (محلول متوقف کننده‌ی آنزیم پروکسیداز، اسید سولفوریک یک مولار می‌باشد)

تقسیم بندی روش‌های الایزا

تکنیک الایزا به دو گروه بزرگ رقابتی با مقدار محدود آنالیت^۶ و غیررقابتی با مقدار اضافی آنالیت^۷ تقسیم می‌شود.

¹ Sodium carbonate/bicarbonate buffer

² Blocking reagent

³ Skimmed milk protein

⁴ Casein

⁵ Substrate/chromogen

⁶ Limited Reagent

⁷ Excess Reagent

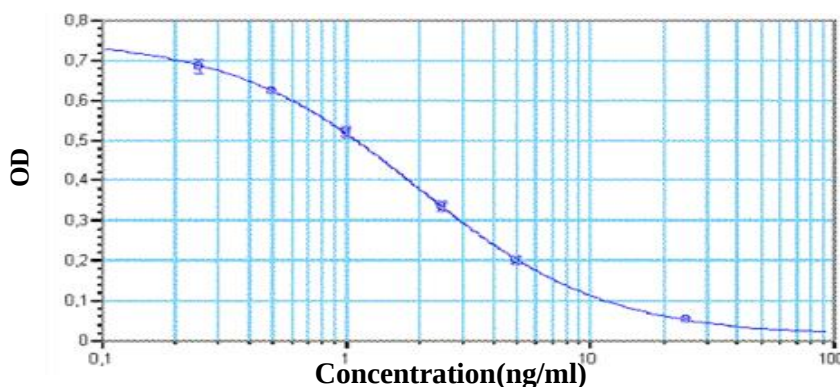
❖ روش رقابتی

• روش رقابتی (Competitive Enzyme immunoassay) جهت شناسایی آنتی ژن

۱. ابتدا کف پلیت به وسیله‌ی بافر بیکربنات حاوی آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن مورد نظر پوشانده می‌شود
۲. انکوباسیون به مدت یک شب در دمای اتاق، یا یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت می‌گیرد
۳. ۳ بار شستشو با ۳۰۰ میکرولیتر محلول حاوی Tween 20 صورت می‌گیرد تا آنتی‌بادی‌های متصل نشده به کف پلیت خارج شوند.
۴. بافر بلاک‌کننده حاوی (۱-۵٪) BSA جهت پوشاندن نواحی خالی در کف چاهک، اضافه و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه می‌شود.
۵. بعد از خارج کردن محلول بلاک‌کننده، نمونه‌ی مجهول حاوی آنتی‌ژن مورد نظر را به همراه محلولی حاوی همان آنتی‌ژن، اما متصل به آنزیم، به چاهک اضافه می‌کنیم و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه می‌کنیم.
۶. آنتی‌ژن‌های متصل نشده به کف چاهک با شستشو خارج می‌شوند.
۷. سوبسترای مناسب با آنزیم را اضافه و واکنش بعد از چند دقیقه با اضافه کردن اسید یا باز متوقف می‌شود.
۸. اکنون مقدار آنتی‌ژن مجهول با بررسی رنگ حاصله از واکنش مشخص می‌شود.

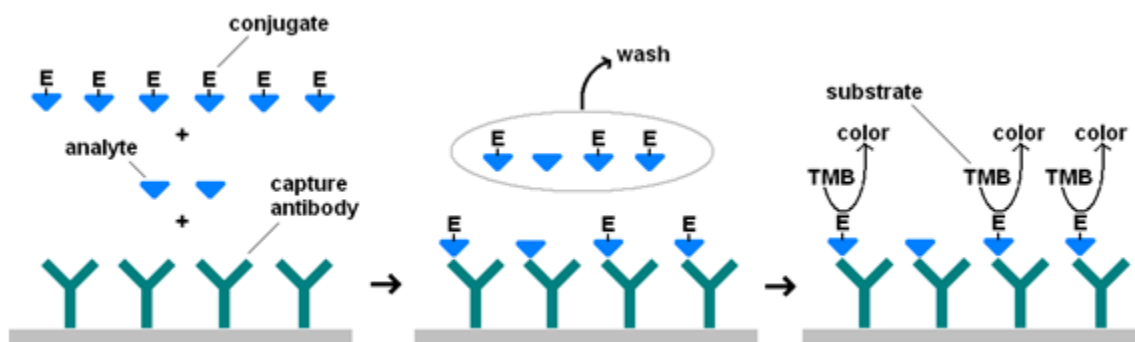
✓ در این تکنیک شدت رنگ حاصله با مقدار آنالیت رابطه معکوس دارد.

تصویر ۱: نمونه ای از منحنی استاندارد (با نیمرخ نزولی) در روش الایزای رقابتی



✓ تفسیر آزمایش: در این تکنیک به دلیل رقابت آنتی‌ژن کونژوگه با آنزیم و آنتی‌ژن غیر کونژوگه، برای اتصال به آنتی‌بادی کف پلیت، موجب ایجاد رابطه‌ی معکوس بین غلظت آنتی‌ژن مجهول و رنگ حاصله می‌شود. در واقع هرچقدر غلظت آنتی‌ژن مجهول در نمونه بیشتر باشد شدت رنگ حاصله کمتر خواهد بود.

تصویر ۲: روند الایزای رقابتی جهت شناسایی آنتی ژن



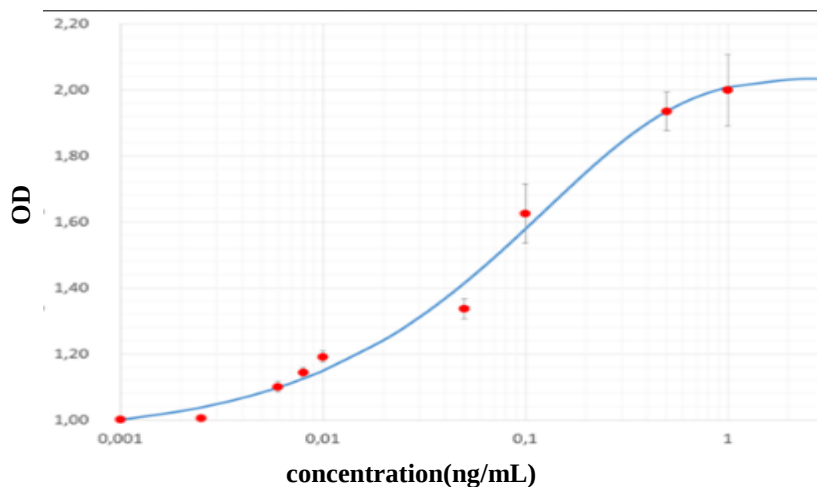
• روش رقابتی جهت شناسایی آنتی بادی

در این روش نیز همانند روش قبل رقابت وجود دارد. با این تفاوت که این بار کف چاهک الایزا با آنتی ژن پوشانده می شود. بعد از مرحله بلاکینگ نمونه‌ی حاوی آنتی بادی مجهول، به همراه محلول حاوی همان آنتی بادی اما متصل به آنزیم به چاهک اضافه و به مدت دو ساعت در دمای اتاق انکوبه می شود. بعد از سه بار شستشو، سوپسترای مناسب با آنزیم، به چاهک اضافه و بعد از گذشت چند دقیقه واکنش با افزودن اسید یا باز متوقف می شود. در این تکنیک نیز شدت رنگ حاصله با غلظت آنالیت رابطه‌ی معکوس دارد.

❖ روش غیر رقابتی (non competitive Enzyme immunoassay)

در الایزای غیر رقابتی برخلاف الایزای رقابتی، شدت رنگ چاهک با مقدار آنالیت رابطه‌ی مستقیم دارد.

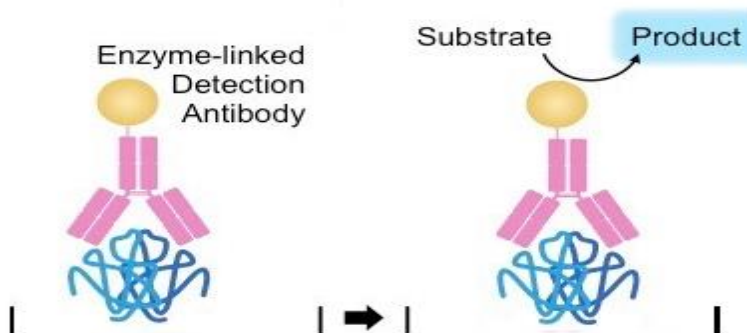
تصویر ۳: نمونه ای از منحنی استاندارد (با نیمرخ صعودی) در روش الایزای غیر رقابتی



• روش الایزای مستقیم (Direct Enzyme immunoassay) جهت شناسایی آنتی ژن

این روش برای شناسایی و اندازه گیری آنتی ژن های موجود در نمونه بندرت استفاده می شود. به گونه ای که ابتدا نمونه‌ی حاوی آنتی ژن به چاهک ها اضافه و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه‌ی سانتیگراد انکوبه می شود. بعد از خارج کردن آنتی ژن های متصل نشده از محیط واکنش بوسیله‌ی شستشو، آنتی بادی متصل به آنزیم علیه آنتی ژن مورد جستجو به چاهک ها اضافه می گردد. در نهایت با اضافه کردن سوپسترای مربوطه رنگ حاصله توسط دستگاه خوانشگر در طول موج مناسب خوانده می شود.

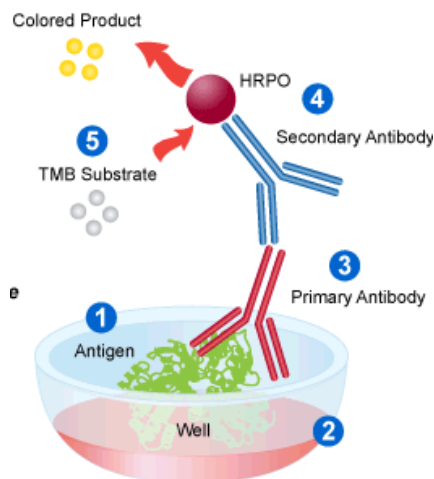
تصویر ۴: روند الایزای غیر رقابتی مستقیم جهت شناسایی آنتی ژن



• روش الایزای غیر مستقیم جهت شناسایی آنتی ژن (Indirect Enzyme immunoassay)

این تکنیک جهت شناسایی آنتی ژن‌های موجود در سرم (پلاسما) یا مایع رویی کشت سلولی بکار می‌رود. آنتی ژن مجهول جهت پوشاندن کف پلیت استفاده می‌شود. بعد از اضافه کردن آنتی بادی اولیه و انکوباسیون، آنتی بادی‌های متصل نشده به کف پلیت بوسیله شستشو خارج می‌شوند؛ در نهایت برای شناسایی میزان آنتی بادی‌های متصل شده به آنتی ژن کف پلیت، از محلول حاوی آنتی-آنتی بادی متصل به آنزیم استفاده می‌شود، که در حضور سوبسترای خاص تولید رنگ کرده و شدت رنگ حاصله، توسط دستگاه خوانشگر الایزا اندازه گیری می‌شود. در این روش شدت رنگ حاصل از واکنش آنزیم با سوبسترا، با غلظت آنالیت مورد سنجش رابطه مستقیم دارد.

تصویر ۵: بیان شماتیک از الایزای غیر رقابتی و غیر مستقیم جهت شناسایی آنتی ژن



مراحل الایزای غیرمستقیم

۱. پوشاندن کف پلیت با آنتی ژن مجهول و انکوباسیون به مدت یک شب در دمای اتاق، یا ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد
۲. شستشوی پلیت با محلول شستشو حاوی Tween 20
۳. افزودن بافر بلاک کننده به همه چاهک‌ها و انکوباسیون پلیت به مدت یک ساعت در دمای اتاق
۴. شستشوی پلیت
۵. افزودن نمونه حاوی آنتی بادی اولیه به چاهک‌ها و انکوباسیون پلیت به مدت ۱ ساعت

۶. شستشوی پلیت
۷. اضافه کردن آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی کونژوگه با آنزیم و انکوباسیون به مدت ۱ ساعت
۸. شستشوی پلیت
۹. اضافه کردن سوبسترای مناسب با آنزیم مورد استفاده و انکوباسیون به مدت چند دقیقه
۱۰. متوقف کردن واکنش با افزودن محلول متوقف کننده حاوی اسید یا باز
۱۱. خواندن رنگ حاصله بوسیله دستگاه خوانشگر الایزا

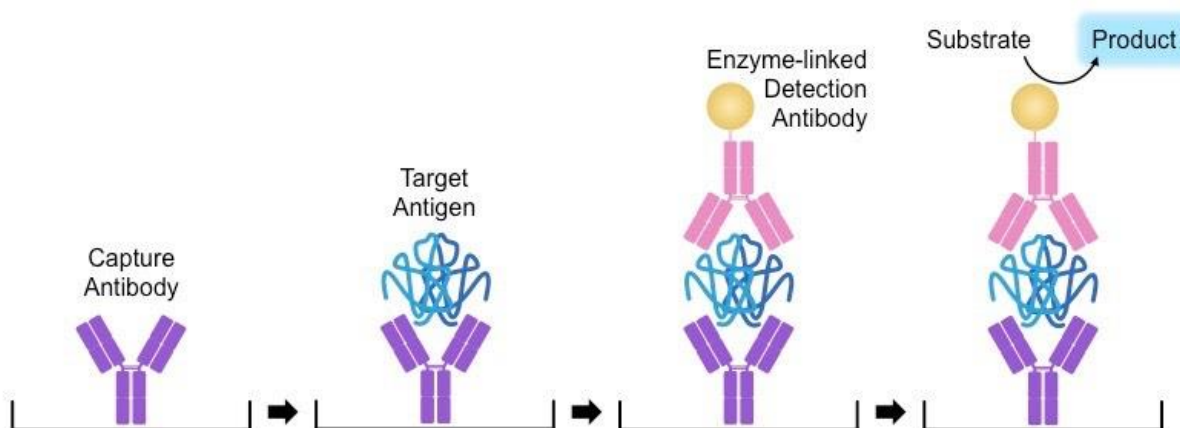
• روش دوطرفه (ساندویچ) (two side or Sandwich Enzyme immunoassay)

این روش جهت شناسایی و اندازه‌گیری آنتی‌ژن‌های محلول استفاده می‌شود، و حساسیت بالا در حدود 100 ng/ml دارد.

مراحل الایزای دوطرفه

۱. کف چاهک‌های الایزا با آنتی‌بادی علیه یک اپی‌توپ خاص از آنتی‌ژن مورد سنجش پوشانده می‌شود
۲. فضاهای خالی کف پلیت با افزودن محلول بلاک کننده حاوی BSA پوشانده می‌شود
۳. شستشوی پلیت
۴. نمونه حاوی آنتی‌ژن مورد سنجش به چاهک‌ها اضافه و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه می‌شود.
۵. شستشوی پلیت برای خارج کردن آنتی‌ژن‌های متصل نشده به کف پلیت
۶. افزودن آنتی‌بادی کونژوگه با آنزیم، علیه اپی‌توپ دیگر آنتی‌ژن مورد سنجش و انکوباسیون به مدت یک ساعت در دمای اتاق
۷. شستشوی پلیت
۸. افزودن سوبسترای مناسب آنزیم و انکوباسیون به مدت چند دقیقه در دمای اتاق
۹. متوقف کردن واکنش با افزودن اسید یا باز
۱۰. شناسایی غلظت آنالیت مجهول با بررسی رنگ حاصله از واکنش بوسیله دستگاه خوانشگر الایزا

تصویر ۶: روند الایزای دوطرفه جهت شناسایی آنتی‌ژن



در روش الایزای دوطرفه شدت رنگ حاصله از واکنش آنزیم-سوبسترا، با مقدار آنالیت رابطه مستقیم دارد. در این روش می‌توان جهت افزایش حساسیت تست از آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با بیوتین استفاده کرد. حساسیت روش الایزا به میل پیوندی (Affinity) آنتی‌بادی‌های مورد استفاده بستگی دارد.