آشنایی با دستگاه الایزا ریدر از تئوری تا عمل

مقدمه

اساسا واکنش‌های بین آنتی ژن و آنتی بادی را می‌توان هم درIn vivo و هم In vitro بررسی نمود و لذا مقوله بررسی واکنش‌های بین آنتی ژن وآنتی بادی، یکی از مهم‌ترین شاخه‌های تحقیقاتی و کاربردی به شمار رفته، بطوریکه گاه نقطه عطفی در این میان پدید آمده و روش جدیدی مطرح گردیده که تا رسیدن به نقطه عطف دیگر و روشی تازه، تحقیقات در جهت اصلاح و بهبود روش قبلی ادامه یافته است. چرا که مسلما هر روشی محاسن و معایب خاص خود را داشته که با توجه به آن گسترش یافته و یا محدود می‌شود؛ اما آنچه که مسلم است، اینست که روش‌های جدید همواره جایگزین روش‌های قبلی نبوده، بلکه به موازات آنها از محدودیت‌های موجود می‌کاهند.

طبقه بندی واکنش‌های بین آنتی ژن و آنتی بادی در Invitro

اصولا واکنش‌های بین آنتی ژن و آنتی بادی در In vitro طی دو مرحله واکنش‌های اولیه و ثانویه اتفاق افتاده و بر این اساس دو روش کلی برای بررسی این واکنش‌ها در In vitro وجود دارد:

الف: روش‌های ایمونولوژیک که توانایی نشان دادن اتصال یک مولکول از آنتی‌ژن را به یک مولکول آنتی‌بادی را در مراحل اولیه داشته و لذا مقادیر جزئی از آنتی‌ژن و آنتی‌بادی را می‌توانند شناسایی نمایند. بنابراین از حساسیت، ویژگی و پتانسیل خاصی برخوردارند.

ب: روش‌های سرولوژیک که برخلاف روش‌های ایمونولوژیک، توانایی آنها در نمایش واکنش‌های بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در مقادیر زیادی از آنتی‌ژن و آنتی‌بادی بارز شده و لذا یا تقویت شده واکنش اولیه بین آنتی‌ژن و آنتی بوده و یا اثرات ناشی از چنین واکنش‌هایی را نشان می‌دهند. این گروه از واکنش‌ها را بر اساس شکل آنتی‌ژن که ممکنست ذره‌ای، محلول و یا کلوئیدی باشد، به ترتیب به انواع آگلوتیناسیون، پرسیپیتاسیون و فلوکولاسیون تقسیم‌بندی می‌نمایند.

تقسیم بندی واکنش‌های ایمونولوژیک

با توجه به این که برای انجام واکنش‌های ایمونولوژیک اولا بایستی از یک ماده نشاندار که ممکنست رادیواکتیو، آنزیم یا فلوئورسانس بعنوان ردیاب یا نشانگر استفاده شود، ثانیا بر اساس این که آنالیت مورد سنجش یعنی آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی بایستی با این ماده نشاندار کونژوگه گردد و ثالثا واکنش بین آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی در فاز یا محیط جامد و یا مایع انجام می‌گیرد، واکنش‌های ایمونولوژیک را براساس ترکیب ماده نشاندار، نوع آنالیت نشاندار شده و فاز واکنش تقسیم‌بندی می‌نمایند.

واکنش‌های ایمونولوژیک را براساس نوع ماده نشاندار که ممکنست رادیواکتیو، آنزیم یا فلوئورسانس باشد، به انواع رادیوایمونواسی، آنزیم ایمونواسی و ایمونوفلوئورسانس تقسیم می‌نمایند. بدیهی است که در روش الایزا با توجه به اینکه از آنزیم برای نشاندارسازی استفاده شده است، لذا در واکنش‌های آنزیو ایمونواسی قرار می‌گیرد.

بر اساس نوع فاز واکنش، واکنش‌های ایمونولوژیک را به دو گروه تقسیم می‌نمایند:

الف: واکنش‌های هموژن که در فاز مایع انجام گرفته و ماده نشاندار در واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی دخالت دارد. لذا نیازی به جداسازی و شستشوی مولکول‌های واکنش دهنده از مولکول‌های آزاد نیست. این روش معمولا برای شناسایی و اندازه گیری داروها و هاپتن‌ها کاربرد داشته و لذا بطور معمول در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی کاربردی ندارند.

ب: واکنش‌های هتروژن که بر خلاف روش‌های هموژن در فاز جامد انجام گرفته، ماده نشاندار در واکنش‌های بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی دخالتی نداشته، بلکه فقط بعنوان ردیاب مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابراین جداسازی مولکول‌های واکنش کننده از مولکول‌هایی که وارد واکنش نشده‌اند، امری الزامی و ضروری می‌باشد. لازم بذکر است که این واکنش‌ها در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی کاربرد گسترده‌ای داشته و روش الایزا در این گروه قرار می‌گیرد.

براساس نوع آنالیت نشاندار شده که ممکن است آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی با رادیواکتیو، آنزیم و یا فلوئورسانس نشاندار شده باشد، واکنش‌های ایمونولوژیک را نیز به دو گروه تقسیم نموده و لذا از آنجائی که هدف ما بررسی واکنش‌های الایزا می‌باشد، از اینرو انواع واکنش‌های الایزا براساس نوع آنالیت نشاندار شده عبارتست از:

الف: آنزیم ایمونواسی یا Enzymo Immunometric Assay که در آن آنتی‌ژن نشاندار شده و آنتی‌بادی به کف چاهک پلیت الایزا چسبیده است. اساس واکنشEIA ، رقابت بین آنتی‌ژن نشاندار و آنتی‌ژن آزاد موجود در نمونه مورد سنجش بر سر اتصال به آنتی‌بادی چسبیده به کف چاهک می‌باشد.

از آنجائیکه اساس روش EIA رقابت بوده و رقابت نیز در محدودیت معنا می‌یابد، به این روش، معرف محدود (Restirected Reagent)نیز می‌گویند. ضمنا از آنجائیکه هر چه میزان آنتی‌ژن موجود در نمونه بیشتر باشد، آنتی‌ژن نشاندار کمتری به آنتی‌بادی متصل می‌گردد، لذا میزان کمپلکس نشاندار با کمپلکس غیر نشاندار مورد سنجش، رابطه معکوس داشته و از این رو منحنی استاندارد آن سیر نزولی دارد.همچنین با توجه به افزودن همزمان آنتی‌ژن آزاد و نشاندار، واکنش یک مرحله‌ای و مستقیم می‌باشد.

ب: ایمونوآنزیمومتریک اسی یا Immuno Enzymo Meteric Assay که در آن آنتی‌بادی بصورت نشاندار بوده و بسته به اینکه هدف سنجش آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی باشد، به روش ساندویچی انجام می‌گیرد. لذا در صورتیکه آنتی‌ژن مورد سنجش باشد، روش را آنتی‌بادی ساندویچ یا Ag Capture و اگر آنتی‌بادی مورد سنجش باشد، روش را آنتی‌ژن ساندویچ یا Ab Capture گویند.

در روش IEMA بدلیل اینکه رقابت وجود نداشته و برای اطمینان از کفایت آنتی‌بادی‌ها برای تشکیل کمپلکس در غلظت‌های بالای آنالیت همواره مقادیر زیادی از آنتی‌بادی‌ها بکار می‌روند، لذا این روش را، معرف مازاد (Excess Reagent)نیز می‌گویند. در این روش با توجه به اینکه به ازاء هر آنالیت یک کمپلکس نشاندار تشکیل می‌گردد، لذا رابطه مستقیم میان آنالیت و کمپلکس برقرار بوده و بنابراین منحنی استاندارد سیر صعودی دارد.

مزایای روش IEMA نسبت بهEIA

نشاندار سازی آنتی‌بادی بجای آنتی‌ژن در روش IEMA مزایای متدولوژیک زیادی را به ارمغان می‌آورد، که برخی از مهمترین آنها عبارتست از:

۱ -سهولت نشاندارسازی: با توجه به اینکه درروش EIA مولکول‌های آنتی‌ژن اغلب از جنس هاپتن بوده که مولکول‌هایی با جرم مولکولی کمتر از هزار دالتون می‌باشند، لذا محدودیت گروه‌های عاملی در مولکول‌های مورد نظر، نشاندارسازی را محدود ساخته و اغلب نیاز به واکنش‌های تخصصی و پیچیده دارد. اما در روش IEMA چون نشاندارسازی بر روی مولکول بزرگ آنتی‌بادی صورت می‌گیرد که دارای انواع گروه‌های عملکردی است؛ لذا نشاندارسازی آن براحتی با روش‌های ساده و عمومی امکان‌پذیر است.

۲ -افزایش ویژگی: در روش EIA با توجه به اینکه از یک آنتی‌بادی برای شناسایی منفرد استفاده شده، درحالیکه در روش IEMA استفاده از دو آنتی‌بادی امکان شناسایی مضاعف را میسر می‌سازد، از این رو ویژگی IEMA نسبت به EIA بیشتر است.

۳ -افزایش حساسیت: باتوجه به اینکه در روش IEMA به ازاء تک تک آنالیت‌ها، کمپلکس نشاندار وجود داشته و همچنین جایگاه‌های نشاندارسازی بالقوه آن بیشتر است؛ لذا هم بدلیل رابطه یک به یک بین آنالیت و کمپلکس نشاندار و هم بیشتر بودن جایگاه‌های بالقوه نشاندارسازی، حساسیت روش IEMA نسبت به EIA بیشتر است.

۴ -کاهش زمان انکوباسیون: با نظر به اینکه واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی یک واکنش تعادلی دو طرفه بوده که طبق اصل لوشاتلیه با افزودن هر یک از مواد در یکی از طرفین معادله، تعادل به سمت طرف دیگر پیشرفت می‌نماید، از این رو بدلیل اینکه در روش IEMA غالبا رقابت وجود نداشته و برای حصول اطمینان ازکفایت آنتی‌بادی‌ها به منظور تشکیل کمپلکس در غلظت بالای آنالیت، همواره مقادیر زیادی از آنتی‌بادی بکار می‌رود؛ در نتیجه غلظت بالای مواد اولیه، سرعت به تعادل رسیدن یا زمان انکوباسیون را کاهش می‌دهد.

۵ -افزایش محدوده عملکرد :(Work of range) محدوده عملکرد که محدوده قابل اندازه گیری برای آنالیت بوده و فاصله بین اولین و آخرین نقطه استاندارد را شامل می‌شود، در روش IEMA حدود صد برابر بیشتر از EIAاست.

۶ -کاهش اثر هوک :(Hook Effect) اثر هوک که عبارتست از کسب نتایج منفی کاذب در غلظت بالای آنالیت می‌باشد، در واکنش‌های ایمونولوژی اتفاق افتاده و معادل پدیده پروزون در واکنش‌های سرولوژی است. در این پدیده غلظت آنالیت که می‌تواند آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی باشد، از بالاترین استاندارد نیز بسیار بالاتر بوده و لذا علیرغم زیاد بودن آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی مورد آزمایش در سرم، نتیجه منفی کاذب حاصل می‌گردد.

بدلیل نتایج منحرف کننده و نامطلوبی که اثر هوک می‌تواند بر آزمون‌های ایمنی سنجی باقی گذارد، تحقیقات زیادی در زمینه شناخت این پدیده و چگونگی خنثی‌سازی آن انجام شده است؛ که یکی از آنها با توجه به اینکه پدیده هوک در روش EIA بدلیل تک مرحله‌ای و مستقیم بودن روش آزمایش، شایع‌تر از روش IEMA می‌باشد؛ عدم استفاده از این چنین کیت‌هایی می‌باشد. در شرایطی که ناچار به استفاده از چنین کیت‌ها باشیم، برای اطمینان از صحت نتیجه، اولا از کیت‌هایی استفاده شود که محدوده شروع پدیده هوک در آن قید شده باشد و ثانیا بایستی هر جواب منفی را با رقت‌های بالاتری از همان سرم تکرار نمود.

البته باید توجه داشت که اگرچه پدیده هوک غالبا در اثر فزونی آنالیت اتفاق می‌افتد، ولی تحقیقات انجام شده توسط محققان ثابت نموده که منحصرا بالا بودن میزان آنالیت تنها عاملی نیست که در بروز این پدیده دخالت

شرکت پرتو آزمون
PARTO AZMOON CO

داشته و لذا عوامل دیگری نیز نظیر توزیع و پراکندگی اپی‌توپ‌ها، وجود اپی‌توپ‌های مشابه و یا استفاده از دو آنتی‌بادی مونوکلونال که بر ضد دو اپی‌توپ مختلف تهیه شده‌اند، می‌تواند در بروز پدیده هوک موثر باشد؛ که نمونه آن نیز ایجاد پدیده هوک در روش‌های IEMA علیرغم دو مرحله‌ای بودن آنها می‌باشد؛ که علت آن در نتیجه استفاده از دو آنتی‌بادی مونوکلونال بر ضد دو اپی‌توپ مختلف می‌باشد.

الایزا ریدر چیست؟

«الایزا ریدر» یا خوانشگر الایزا که به اسامی «میکروپلیت ریدر» و «خوانشگر میکروپلیت فتومتریک» نیز معروف است، یک اسپکتروفتومتر تخصصی بوده که به منظور قرائت نتایج تست الیزا طراحی شده است. این وسیله به منظور تعیین حضور آنتی بادی ها یا آنتی‌ژن های اختصاصی در نمونه ها به کار می‌رود. این تکنیک بر اساس تشخیص یک آنتی‌ژن یا آنتی بادی ها روی یک سطح جامد به صورت مستقیم یا ثانویه به کمک آنتی بادی های نشاندار و ایجاد محصولاتی استوار است که می‌توانند توسط اسپکتروفتومتر خوانده شوند. واژه الایزا ELISA، اختصاری از کلمات Enzyme-Linked Immuno sorbent Assay است.

تعریف نهایی روش الایزا

با توجه به کلیات فوق الذکر در مورد انواع واکنش‌های ایمونولوژی، روش الایزا را می‌توان بطور خلاصه بصورت ذیل توصیف نمود:

الایزا، روش In vitro بررسی واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی به طریق ایمنی سنجی در فاز جامد بوده که از آنزیم برای نشاندار سازی و ردیابی آنالیت مورد نظر استفاده شده است.

وسایل و تجهیزات مورد نیاز در روش الایزا

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

الف: کیت الایزا که خود متشکل از موارد ذیل است:

۱ -یک یا دو عدد پلیت ۹۶ خانه‌ای که در ۱۲ ستون هشت خانه‌ای قرار گرفته‌اند. هر یک ازخانه‌ها را چاهک یا Wellو هر ستون هشت خانه‌ای را یک استریپ (Strip) گویند. جنس چاهک‌ها از پلی استیرن، پلی وینیل کلراید و یا پلی پروپیلن بوده، عمقی حدود cm1 داشته و به اشکال ته صاف و یا ته گود می‌باشند، که بطور ایده

آل چاهک‌های ته صاف برای قرائت اسپکتروفتومتری در سنجش‌هایی کـه در آنهـا پیشـرفت رنـگ وجـود دارد، پیشـنهاد مـی‌شـود. لـذا چاهـک‌هـای تـه گـود بـرای قرائـت اسـپکتروفتومتری مناسـب نمـی‌باشـند.
۲ -ویال‌های استاندارد، کنترل منفی و مثبت، که با توجه به نوع کیت می‌تواننـد بصـورت محلـول یـا لیـوفیلیزه باشند.
۳ -رقیق‌کننده نمونه (Sample Diluents) که مزیت آن اینست که با توجه به رقیق سازی نمونه، اثر هوک را تـا حدود زیادی خنثی می‌نماید.
۴ -کونژوگه نشاندار شده با آنزیم که از مهم‌ترین آنزیم‌های مورد استفاده در الایزا مـی‌تـوان از پراکسـیداز تـرب کوهی یاHRP ، آلکالن فسفاتازوپنی سیلیناز نام برد که عمدتا از پراکسیداز استفاده شده و از آلکالن فسـفاتاز بـه علت گرانی، در کارهای تحقیقاتی استفاده می‌شود. بایستی متذکر شد که آنزیم مورد استفاده برای نشاندارسازی، نقـش مهمـی در تعیـین نـوع سوبسـترا و نیـز نـوع محلـول متوقـف‌کننـده دارد.
۵ -محلول شستشو که متشکل از بافر فسفات سالین(PBS) ، تواین ۲۰ و تایمرسال می‌باشد. بایـد توجـه داشـت که هر چند PBS با تنظیم قدرت یونی و PHمناسب، اتصـال غیـر اختصاصـی بـه جـدار چاهـک را بـه حـداقل می‌رساند؛ با اینحال برای افزایش دقت و نیز کاهش اتصالات غیر اختصاصـی، از مقـدار کمـی پـروتئین ودتـرژان یعنی تواین ۲۰ استفاده می‌شود. همچنین از آنجائی که محیط‌های بافری غالبـا بـرای رشـد میکروارگانیسـم‌هـا بسیار مناسب می‌باشند، لذا از ترکیبات نگهدارنده نظیر تایمرسال و سدیم آزید استفاده می‌شود؛ که البته با توجه به اینکـه سـدیم آزیـد مهـار کننـده آنـزیم پراکسـیداز مـی‌باشـد، از ایـن رو از تایمرسـال اسـتفاده مـی‌گـردد.
۶ -محلـول سوبسـترا- کرومـوژن کـه مـی‌توانـد هـم بصـورت منفـک از یکـدیگر و یـا بصـورت ترکیبـی باشـد. لازم بذکر است که در واکنش‌های آنزیمی، سوبسترا بر اساس حلالیت، می‌تواند محلول یا غیر محلول باشد؛ کـه در سنجش الایزا بایستی سوبسترا محلول باشد. زیرا اگـر غیـر محلـول باشـد، نمیتـوان محصـول را بـا دسـتگاه خوانشگر الایزا یا الایزا ریدر قرائت نمود و توضـیحا اینکـه، سوبسـترای غیـر محلـول در روش دات الایـزا (Dot ELISA)و بلاتینگ کاربرد دارد.

در مورد نوع سوبسترا نیز بایستی در نظر داشت، نوع سوبسترا بسـتگی بـه کونژوگـه آنزیمـی داشـته و لـذا اگـر کونژوگه آنزیمی HRP باشد، سوبسترا می‌تواند تترامتیل بنزیدین (TMB) و یا ارتوفنل دی آمین (OPD) بـوده 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.

۷ -محلول متوقف کننده یا بلوکر (Stopping or Blocking Solution) که با توجـه بـه نـوع کونژوگـه آنزیمـی، می‌تواند اسیدی یا قلیایی باشد. بدین ترتیب که اگر کونژوگه آنزیمی HRP باشد، برای توقف واکـنش بایسـتی از محلول‌های اسیدی نظیر اسید کلریدریک و یا اسید سولفوریک استفاده نمـود. ولـی اگـر کونژوگـه ALP باشـد، بایستی از محلول‌های قلیایی نظیر NaOH استفاده کرد. لازم بذکر است که در اثر توقف واکنش توسـط متوقـف کننده اسیدی، رنگ آبی تبدیل به زرد شده، در حالیکه تغییـر رنـگ حاصـل از کـاربرد متوقـف کننـده قلیـایی، بصورت تبدیل رنگ زرد به قهوه‌ای خواهد بود.

ب: دستگاه خوانشگر الایزا یا الایزا ریدر :(ELISA Reader) دستگاه الایزا ریدر که در نهایی‌ترین مرحله آزمایش الایزا مورد استفاده قرار گرفته و جزء لاینفک تکنیک الایزا می‌باشد، در واقع شبیه اسپکتروفتومتر بوده، با این تفاوت که نوع کووت، مسیر خوانش و تعداد فیلترها تغییر نموده است. بدین ترتیب که بجای کووت، از چاهک استفاده شده و مسیر خوانش آن نیز بر خلاف تکنیک‌های فتومتری، بصورت عمودی می‌باشد. همچنین با توجه به اینکه در تکنیک الایزا از آنزیم‌ها و سوبستراهای مشخصی استفاده می‌شود، از فیلترهای محدودی استفاده شده است.

کاربرد میکروپلیت ریدر

میکروپلیت ریدر برای خواندن نتایج تست‌های الایزا مورد استفاده قرار می گیرد. این تکنیک کاربردی مستقیم در ایمنولوژی و سرولوژی دارد. از میان کاربردهای دیگر این وسیله به تایید حضور آنتی بادی ها یا آنتی‌ژن‌های یک عامل عفونی در یک ارگانیزم، آنتی بادی های یک واکسن یا اتوآنتی بادی ها برای مثال در آرتریت روماتوئید می توان اشاره کرد.

شرکت پرتو آزمون
جوانه خراسان
PARTO AZMOON CO

اصول کار

الایزا ریدر یک اسپکتروفتومتر اختصاصی است. بر خلاف اسپکتروفتومترهای معمولی که قرائت جذب نوری را در گستره وسیعی از طول موج ها تسهیل می کنند، الایزا ریدر دارای فیلترها یا گریتینگ های انکساری بوده که گستره طول موج ها را محدود کرده و معمولا بین ۴۰۰ تا ۷۵۰ نانومتر عمل می کنند. برخی از الایزا ریدرها در گستره ماوراء بنفش عمل کرده و قرائت را در محدوده ۳۴۰ تا ۷۰۰ نانومتر انجام می دهند. سیستم نوری موجود در این دستگاه ها توسط تعدادی از کارخانه ها با استفاده از فیبرهای نوری به منظور تامین نور جهت چاهک های حاوی نمونه در میکرو پلیت طراحی می شود. ابتدا یک شعاع نوری از نمونه ای که دارای قطری بین ۱ تا ۳ میلی متر است عبور کرده و سپس یک سیستم آشکار کننده، نور عبوری از نمونه را آشکار و تقویت می کند. در مرحله بعد، سیگنال مربوط به جذب نوری نمونه‌ها ثبت شده و سیستم خوانشگر نیز آن را به اطلاعاتی تبدیل می کند که سبب تفسیر نتایج تست می شوند. برخی از الایزا ریدرها با استفاده از سیستم های شعاعی نوری دوتایی کار می کنند.

نمونه های مورد آزمایش در پلیت هایی که به این منظور طراحی شده اند و دارای تعداد خاصی چاهک هستند، قرار می گیرند. پلیت های ۸ ستونی همراه با ۱۲ ردیف که در مجموع ۹۶ چاهک را تشکیل می دهند، رایج تر از بقیه هستند. برای کاربردهای اختصاصی تر، تعداد چاهک ها افزایش می یابد که در برخی موارد تا پلیت های ۳۸۴ چاهکی را نیز شامل می شود. افزایش تعداد چاهک ها به منظور کاهش مقدار مصرف معرف ها و نمونه ها است. موقعیت سنسور نوری الایزا ریدر بر اساس نوع کارخانه سازنده متغییر است؛ به طوری که در برخی موارد ممکن است در بالای پلیت حاوی نمونه و گاهی نیز مستقیما در زیر پلیت قرار گیرد. امروزه میکرو پلیت ریدرها دارای کنترل هایی هستند که به وسیله میکروپروسسورها تنظیم شده اند.

وسایل لازم جهت انجام تکنیک الایزا

جهت انجام آزمایش الایزا تجهیزات زیر مورد نیاز است:

۱- الایزا ریدر

۲- میکرو پلیت واشر (شستشو دهنده چاهک ها)

۳- سیستم توزیع کننده مایع (که در این مورد ممکن است از پیپت ها چند کاناله استفاده شود)

۴- انکوباتور

تجهیزات مورد نیاز در انجام تست های الایزا

مراحل مکانیکی انجام تکنیک الایزا

یک تست الیزا به طور رایج شامل مراحل زیر است:

۱- شستشوی اولیه پلیت که ممکن است با استفاده از میکرو پلیت واشر انجام شود.

۲- استفاده از یک توزیع کننده مایع (دیسپنسر) یا پی پت چند کاناله.

۳- پلیت در انکوباتور قرار داده می شود که دارای دمای کنترل شده بوده و واکنش ها در آن محل انجام می شوند.

شرکت پرتو آزمون
جوانه خراسان
PARTO AZMOON CO

بسته به نوع تست، مراحل ۱، ۲ و ۳ ممکن است چندین بار تکرار شوند، تا این که معرف‌های اضافه شده، واکنش ها را کامل کنند.

سرانجام، وقتی تمام مراحل انکوباسیون کامل شد، پلیت به الایزا ریدر منتقل شده و سپس با قرائت جذب نوری نمونه ها، نتیجه آن ها مشخص می شود.

مراحل بیوشیمیایی تکنیک الیزا

۱- چاهک های موجود در پلیت با آنتی‌بادی‌ها و آنتی ژن ها پوشیده (Coat) می‌شوند.

۲- نمونه ها، کنترل ها و استانداردها به چاهک‌ها اضافه شده و در دمای اتاق یا ۳۷ درجه سانتیگراد برای یک مدت زمانی معین، طبق دستورالعمل تست انکوبه می شوند. در طول انکوباسیون، بسته به حضور یا عدم حضور و مقدار آنتی ژن یا آنتی بادی موجود در نمونه، آنتی ژن نمونه به آنتی بادی کوت شده به پلیت، یا آنتی بادی موجود در نمونه به آنتی ژن Coat شده در پلیت باند می شود.

۳- پس از انکوباسیون، آنتی ژن‌ها یا آنتی‌بادی‌های آزاد، شستشو داده شده و با استفاده از میکرو پلیت واشر و یک بافر شستشوی مناسب، برداشته می شوند.

۴- در مرحله بعد، یک آنتی بادی ثانویه، به نام کونژوگه، اضافه شده که حاوی آنزیمی است که به منظور ایجاد یک تغییر رنگی، با یک سوبسترا واکنش خواهد داد.

۵- سپس یک دوره زمانی ثانویه از انکوباسیون شروع می شود که در طی آن، کونژوگه با کمپلکس آنتی ژن- آنتی بادی در چاهک ها پیوند برقرار خواهد کرد.

۶- پس از انکوباسیون، یک دوره شستشوی جدید انجام می شود که سبب برداشت کونژوگه متصل نشده از چاهک ها خواهد شد.

۷- در مرحله بعد، سوبسترا اضافه می شود. آنزیم با سوبسترا واکنش خواهد داد و سبب تغییر رنگ محلول خواهد شد. این واکنش نشان خواهد داد که چه مقدار کمپلکس آنتی‌ژن- آنتی بادی در پایان تست وجود خواهد داشت.

۸- وقتی که زمان انکوباسیون کامل می شود، یک معرف برای توقف واکنش آنزیم- سوبسترا به آن اضافه شده که از تغییرات بیشتر در شدت رنگ ایجاد شده، جلوگیری می‌کند. این معرف عموما یک اسید رقیق است.

۹- در پایان، پلیت بوسیله الایزا ریدر خوانده می شود. نتایج حاصله برای تعیین مقادیر اختصاصی یا حضور آنتی ژن ها یا آنتی بادی ها در نمونه به کار برده می شوند.

توجه: برخی از چاهک ها برای استانداردها و کنترل ها استفاده می شوند. استانداردها برای تعریف نقاط cut-off به کار برده می شوند. استانداردها و کنترل ها مقادیر معینی هستند و برای اندازه گیری نتایج تست و ارزیابی اطلاعات در مقابل غلظت‌های مشخصی برای هر کنترل به کار برده می شوند. فرایند توصیف شده در بالا عمومی است؛ اگرچه بسیاری از تست های الایزا وجود دارند که همراه با مراحل یا متغیرهای اختصاصی هستند.

نصب تجهیزات

به منظور عملکرد صحیح الایزا ریدر، نکات زیر لازم است تا رعایت شود:

۱- یک محیط تمیز و عاری از گرد و غبار

۲- یک میز کار ثابت و به دور از تجهیزاتی از قبیل سانتریفوژ، شیکر و ... که سبب لرزش آن می شوند. این میز باید دارای اندازه مناسبی باشد به طوری که در کنار الایزا ریدر، فضای کاری مناسبی وجود داشته باشد. تجهیزات تکمیلی مورد نیاز برای انجام تکنیک توصیفی بالا عبارتند از: واشر، انکوباتور، دیسپنسر و کامپیوتر همراه با وسایل جانبی آن.

۳- یک منبع تغذیه الکتریکی، که سازگار با استانداردها و معیارهای کشور باشد. در کشورهای آمریکایی به طور مثال، عموما فرکانس های ۶۰ هرتز و ۱۱۰ ولت استفاده می‌شود، در حالی که در نواحی دیگر از جهان ۲۲۰ تا ۲۴۰ ولت و ۵۰ تا ۶۰ هرتز به کار برده می شود.

دستگاه‌های الایزا ریدر براساس نوع و سیستم خوانشگر به سه دسته تقسیم می‌گردند، که عبارتست از:

۱ Single Reader -که تنها یک چاهک را بطریق دستی قرائت نموده و هیچگونه مد محاسباتی ندارند؛ لذا بایستی منحنی استاندارد تست‌های کمی توسط آزمایشگر بطریق دستی رسم گردد. بهمین علت از قیمت و کیفیت پائیینی برخوردار بوده و خوشبختانه چنین دستگاه‌هایی دیگر مورد استفاده قرار نگرفته و از صحنه بازار محو شده‌اند.

۲ Strip Reader -که تعداد ۳-۱ استریپ ۸ یا ۱۲ تایی را بصورت اتومات قرائت نموده و در عین حال منحنی تست‌های کمی را بر اساس مد محاسباتی، رسم می‌نمایند. علاوه بر این، بعلت دارا بودن فیلترهای افتراقی (Differential Filters)قابلیت خوانش در دو طول موج (Bichromatic Reading) را که بدلایل متعددی مورد نیاز می‌باشد را، بطور همزمان دارند، که این دلایل عبارتست از:

الف: حذف رنگ زمینه آبی که در اثر واکنش آنزیم HRP با TMB بعد از نوآرایی رنگ آبی به زرد قرائت در طول موج رفرانس مورد نیاز می‌باشد.

ب: باتوجه به اینکه رنگ زرد دارای طیف بلند گذر می‌باشد که طول موج‌های بالاتر از nm500 را به خوبی عبور داده و جذب آن در طول موج‌های حدود nm 600 صفر است، لذا نمونه بایستی در طول موج رفرانس نیز قرائت شود و بدین جهت استفاده از طول موج رفرانس، نیاز به استفاده از بلانک را نیز منتفی می‌سازد. زیرا در روش (Bichromatic Reading)نمونه در طول موج‌های گوناگون خوانده شده و سپس تفاضل جذب‌های حاصله، مبنای تعیین غلظت قرار می‌گیرد.

۳ Plate Reader -که قابلیت خوانش یک پلیت ۹۶ تایی را در حداقل زمان دارا بوده و لذا از سرعت، دقت و صحت بیشتری نسبت به دستگاه‌های Strip Reader برخوردارند. از این رو قیمت بالاتری نیز دارند.

کالیبراسیون الایزا ریدر

کالیبراسیون الایزا ریدر، یک مرحله اختصاصی است که باید توسط یک تکنسین یا مهندس آموزش دیده که به دستورالعمل های سازنده دستگاه آشنایی دارد، انجام شود. برای انجام کالیبراسیون، داشتن یک مجموعه از فیلترها که از لحاظ اندازه، یکسان هستند، الزامی است. سازندگان این دستگاه ها، پلیت های کالیبراسیون را برای هر طول موجی که دستگاه به کار می برد فراهم می کنند.

پلیت های کالیبراسیون مجهز به حداقل سه مقدار جذب نوری از قبل تعیین شده (پایین، متوسط و مقدار بالا)، در دامنه اندازه گیری هستند.

برای انجام کالیبراسیون مراحل زیر را باید دنبال کرد:

۱- پلیت کالیبراسیون را روی دستگاه قرار دهید.

۲- یک خوانش کامل را با پلیت کالیبراسیون انجام دهید. مشخص کنید که آیا تفاوت‌هایی در قرائت های به دست آمده از یک چاهک به چاهک دیگر وجود دارد یا خیر. چنانچه اختلافی مشاهده شد، پلیت را به اندازه ۱۸۰ درجه چرخانده و قرائت را مجددا تکرار کنید تا از اختلافاتی که به خود پلیت نسبت داده می شوند، جلوگیری کنید. به طور کلی، اگر نتایج پلیت در دو طول موج، به میزانی باشد که انتظار داریم، گفته می‌شود که دستگاه به کالیبراسیون دیگری احتیاج ندارد.

۳- تایید کنید آیا خوانشگر به کالیبراسیون احتیاج دارد یا خیر. چنانچه به کالیبراسیون احتیاج دارد، راهنمایی های رایج کارخانه سازنده دستگاه را برای کالیبراسیون دنبال کنید. تایید کنید که خطی بودن)linearity(خوانشگر تا حد امکان قابل قبول است.

شرکت پرتوآزمون
PARTO AZMOON.CO

۴- اگـــر دستگـاه حـاوی یـک پلیـت کـالیبـراسیـون نیسـت، یـک محلـول رنگـی را در چاهک‌های یک پلیـت از آن ریخته و فوری نتایج را قرائت کنید. سپس پلیت را به اندازه ۱۸۰ درجه چرخانده و دوباره قرائـت را انجـام دهید. اگر هر دو خوانش ها و میانگین مقادیر در هر ردیف یکسان هستند، خوانشگر کالیبر است.

۵- تایید کنید که خوانشگر به صورت ستون به ستون نیز کالیبر اسـت. یـک پلیـت تمیـز و خـالی را در محـل مخصوص قرار دهید و قرائت را انجام دهید. اگر اختلافی بین هر یک از خوانش های میانگین از اولین تا آخـرین ستون وجود ندارد، می توان فرض را بر این گذاشت که خوانشگر کالیبر است.

حفظ و نگهداری رایج

نـگـهــداری اســاســی (تـکـرار بـه صـورت روزانه)

۱- مـرور ایـنـکـه سنسورهای نوری هـر کانـال تـمـیــز هـسـتـنــد. چـنـانـچــه کـثـیــف هــستند، سـطح پنجره‌های عبور دهنده نور و سنسورها را با یک برس کوچک تمیز کنید.

۲- تایید کنید که سیستم نوری تمیز است.

۳- تایید کنید که کالیبراسیون خوانشگر کافی اسـت. وقـتـی کـارهـای روزانه شروع می شود، اجـازه دهـید تـا خوانشگر برای مدت ۳۰ دقیقه گرم شود. در مرحله بعد، قرائت Blank را انجام دهـیـد و سـپـس یــک پــلیت کامل از سوبسترا را قـرائـت کـنـیـد. خـوانـش هـا مـی بـایـست یکسان بـاشند. اگر ایـن طـور نبـود، پلیـت را چرخانده و قرائت را به منظور تعیین این که آیا اختلاف در پلیت یا در خوانشگر است، تکرار کنید.

۴- سـیـسـتــــم کـشـنــــده اتــومــاتـیــــک اســلایــدهــا (Automatic drawer sliding system) را بـــررسـی کنید که باید نرم و ثابت باشد.

نـگـهـداری بـازدارنـده (تـکـرار هـر سه ماه یکبار)

۱- پــایــداری لامــپ را تــایـیــد کـنـیــد. پـلـیــت کالیبراسیون را به کار برده، قرائت را بـا فاصـله ۳۰ دقیقه مجددا با همان پلیت انجام دهید. قرائت ها را مقایسه کنید که هیچ تفاوتی نبایـد میـان آن هـا مشـاهده شود.

۲- سیستم نوری دتکتور و سیستم های نوری را تمیز کنید.

۳- کشنده پلیت (Plate drawer) را تمیز کنید.

۴- مکان قرار گیری هر چاهک را با استفاده از سـیـسـتـم هـای انتشار نور و آشکار کننده تایید کنید.

جمع آوری : پوریا زیبائی

منابع:

[۱]WHO. Maintenence manual for lavoratory equipment. 2008. 2nd Edition.

[۲]Fitzgerald A., Kingsley C. and Kusko A. Electric machinery. 1971.

[۳]Johns W.L. Selection of basic laboratory equipment for laboratories with limited resources. 2000.