دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی
سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه ایمونولوژی

جلسه دهم:

تستELISA

(ELISA)

- تست الایزا(ELISA) روشی عمومی در بیوشیمی غربالگری است. تست الیزا در اصل برای کنترل کیفیت در گیاه‌پزشکی بوجود آمد و سپس به عنوان روش تشخیص آزمایشگاهی در برخی بیماری‌های انسان بکار گرفته شد.

- الایزا یک آزمایش استاندارد برای کشف ویروس در خون است و استانداردی جهانی برای استفاده در بیمارستان‌ها، بانک خون و سازمان‌های انتقال خون بویژه در تشخیص ایدز می‌باشد.

- در الایزا خود ویروس جستجو نمی‌شود بلکه میزان آنتی‌بادی که در بدن شخص آلوده به یک ویروس(مانند (HIV)تولید شده، اندازه گرفته می شود.

- تست الایزا یک آزمایش ارزان و نسبتاً دقیق است و در آن یک نمونه خونی گرفته شده و در دور بالا سانتریفوژ می‌شود. پس از جداسازی سرم خون از ذرات، یک ماده معرف(بسته به ویروس مورد ردیابی) به سرم خون اضافه می‌شود که محلول را رنگی می‌کند و وجود پادتن‌های ضد ویروس موردنظر را مشخص می سازد.غالبا برای جلوگیری از نتایج مثبت کاذب در الیزا، پس از مثبت شدن الیزا از تست وسترن بلات برای تأیید استفاده می‌شود.

- در این روش بجای رادیو ایزوتوپ برای نشاندار کردن از یک آنزیم استفاده می شود . چنانچه آنتی ژن نشاندار شود
- EIA (Enzyme Immunoassay)
- و اگر آنتی بادی نشاندار شود(Immunoenzymometric Assay) IEMA
- نامیده می شود.
- ELISAنامی است عمومی برای اینگونه روشها ، که به صورت رایج استفاده می شود
- واژه الایزا ELISA، اختصاری از کلماتEnzyme-Linked Immuno Sorbent Assay است

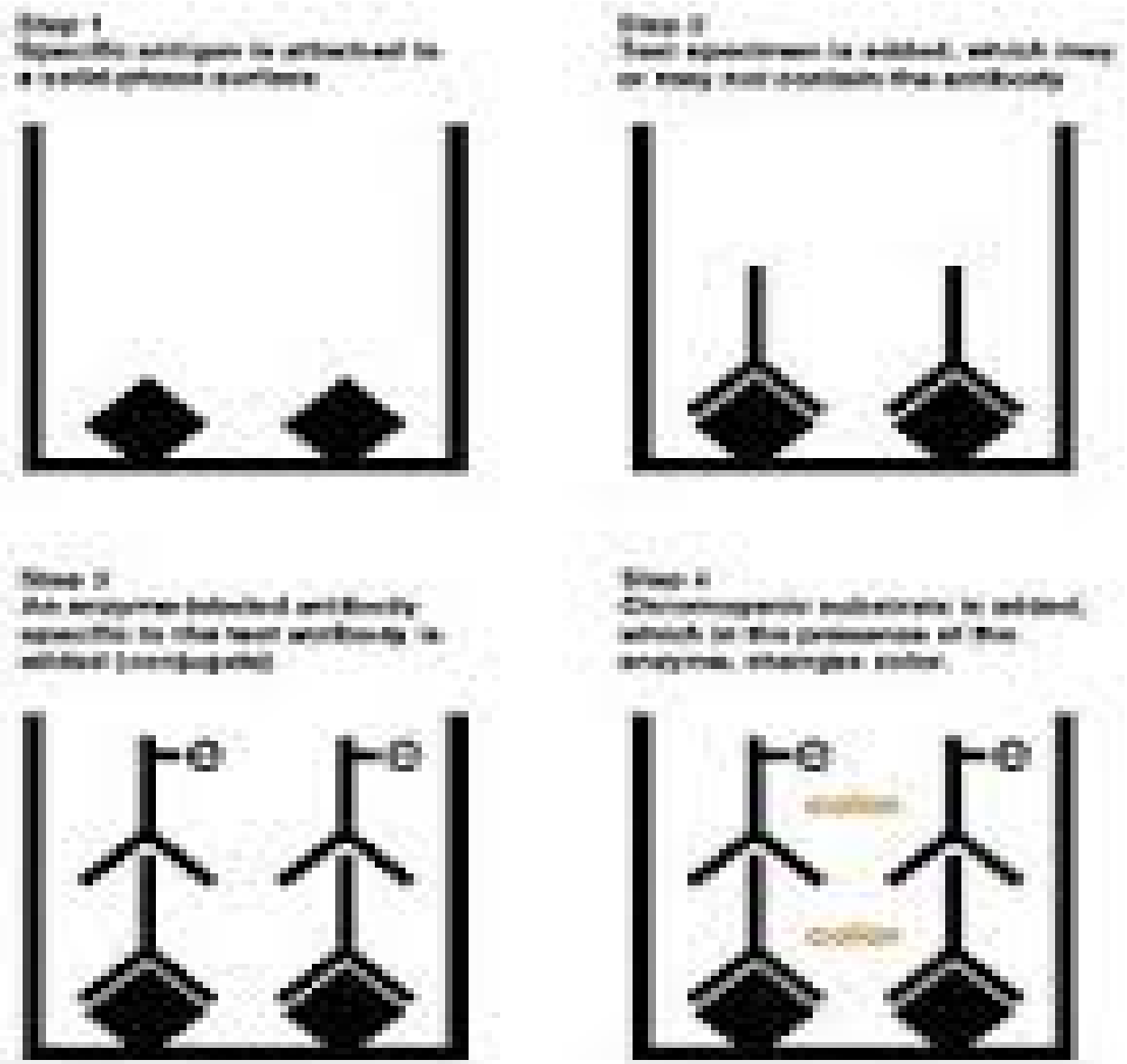
- ELISAیک تست سریع (Rapid) برای شناسایی و اندازه گیری آنتی بادی یا آنتی ژن در برابر ویروس ها وباکتری ها و یامواد دیگراست .در تکنیک الایزا ، فاز جامد از یک پلیت ۹۶ خانه جنس پلی استرن یا مواد دیگر تشکیل شده است .عملکردفاز جامد ثابت کردن آنتی ژن یا آنتی بادی در نمونه است که با اتصال به فاز جامد اتفاق می افتد

طبقه بندی الایزا :

- تکنیک الایزا به چند روش تقسیم می شود :
  - ۱- الایزای مستقیم Direct Elisa
  - ۲- الایزای غیر مستقیم Indirect Elisa
  - ۳- الایزای ساندویچی Sandwich Elisa
  - ۴- الایزای رقابتی Competitive Elisa

الایزای مستقیم

- در این روش آنتی ژن یا آنتی بادی موجود در نمونه ای 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 نشاندار شده است به سیستم اضافه می شود. 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.



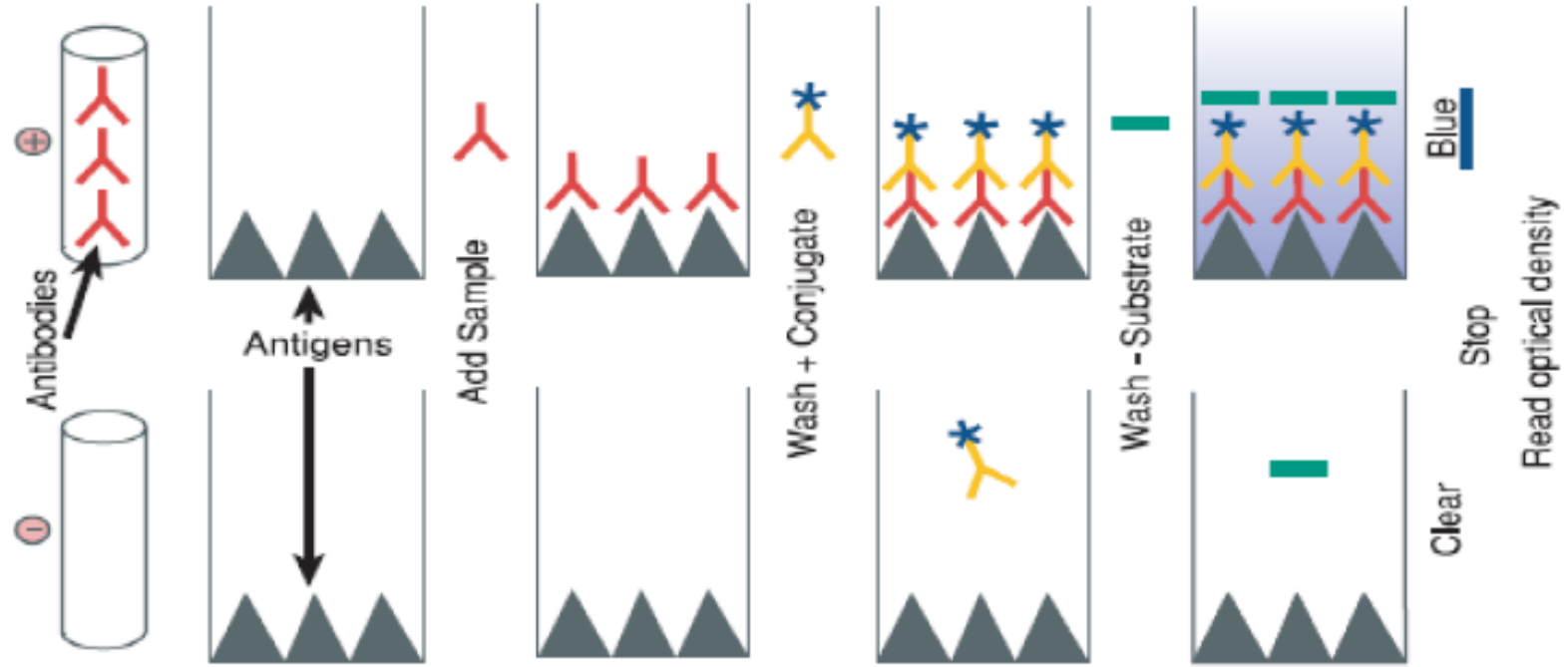
الایزای غیرمستقیم

- 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 ویال یا چاهک) اضافه می شود. آنتی ژن کوت شده آنتی ژن اختصاصی مربوط به آنتی بادی است که قرار است در نمونه ردیابی شود.

- پس از افزودن نمونه و طی زمان انکوباسیون و یک مرحله شستشو آنتی هیومن گلوبولین نشاندار شده با آنزیم به چاهک اضافه می شود . بر حسب اینکه چه کلاسی از آنتی بادی برای ردیابی اهمیت دارد نوع آنتی ایمنوگلوبولین مورد استفاده نیز متفاوت است مثلا برای ردیابی آنتی بادی کلاس IgG از آنتی هیومن IgG و برای ردیابی کلاس IgA از آنتی هیومن IgA استفاده می شود.

- بهترین مثالها در مورد این روش تعیین آنتی بادی بر علیه توکسوپلاسما، روبلا، ویروس سیتومگال و هلیکوباکترپیلوری از کلاسهای IgM و IgA و IgG در سرم می باشد. البته امروزه برای تعیین IgM بر علیه این عوامل عموما از روش capture استفاده می شود در روش capture آنتی بادی های موجود در نمونه از کلاس IgM به روی چاهکهای کد شده با آنتی هیومن IgM جذب شده و سپس برای تشخیص، از آنتی ژن اختصاصی مربوطه که آنزیم نشاندار شده است و یاآنتی بادی نشاندار ضد آن به صورت مزدوج استفاده می شود.

Steps in an **Indirect ELISA**

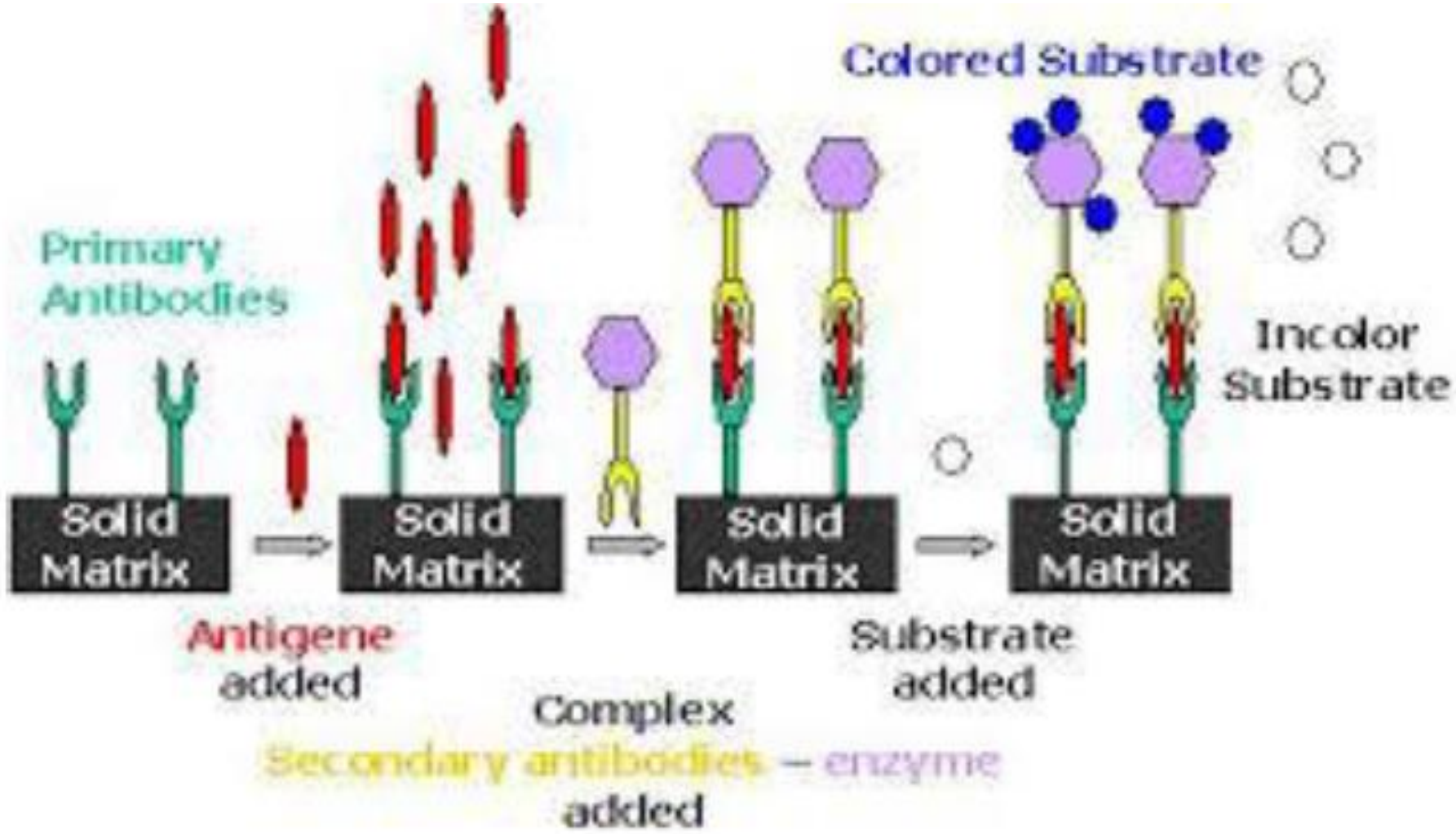


الایزای ساندویچی

روش ساندویچ الایزا خود به ۲ دسته تقسیم می شود:

روش Ag capture یا Ab sandwich

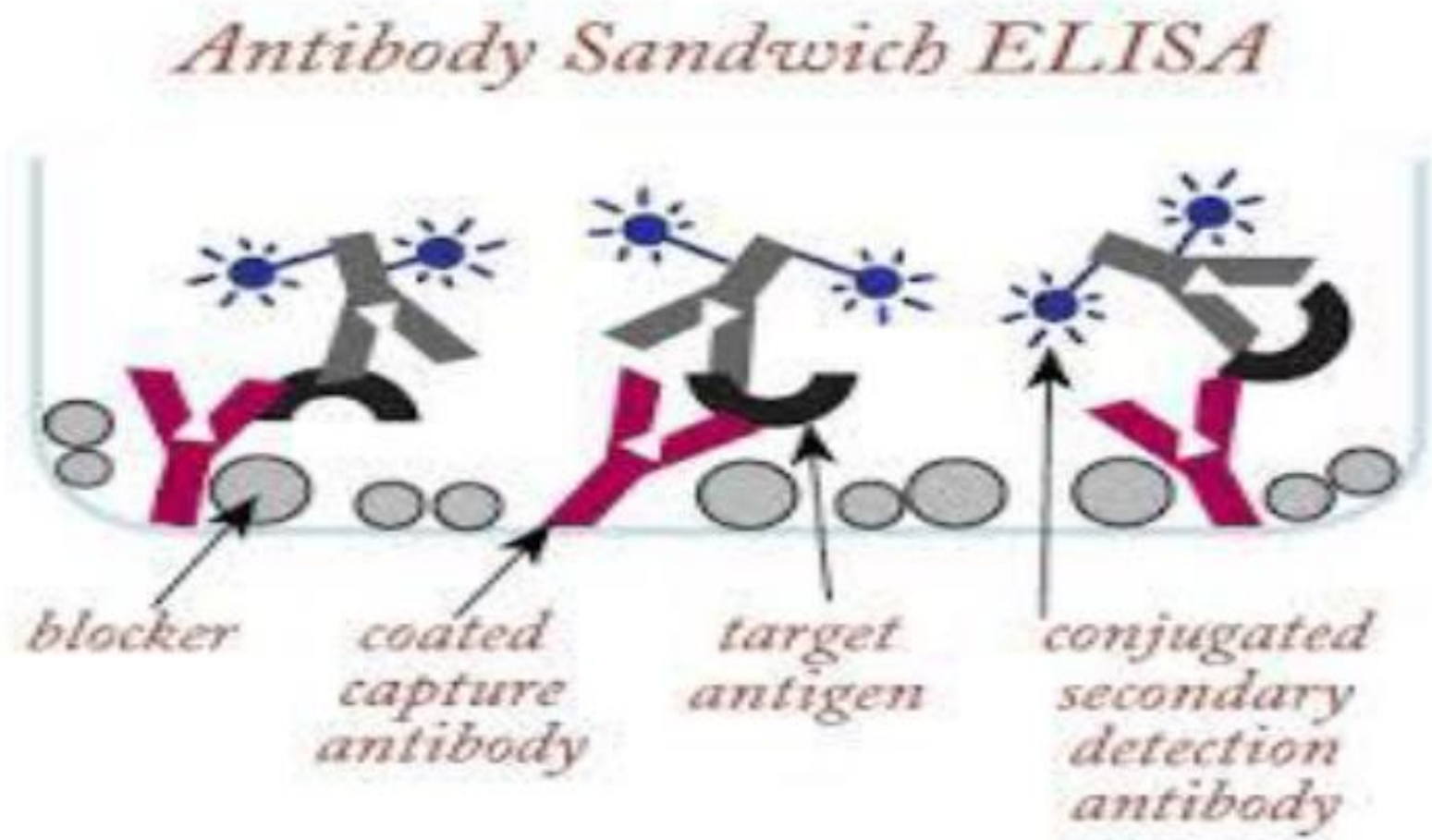
Ag capture: در این روش یک آنتی ژن در بین ۲ آنتی بادی اختصاصی قرار می گیرد این روش شایعترین روش الایزا محسوب می شود دراین روش از یک آنتی بادی برای به دام انداختن آنتی ژن بر روی چاهکهای الایزا استفاده می شود و آنتی بادی دوم که با آنزیم نشاندار شده است به عنوان شناساگر عمل می کند. قابل ذکر است که در این روش آنتی ژن باید حداقل دارای ۲ ناحیه ی
آنتی ژنیک متفاوت باشد تا قادر به اتصال هر ۲ آنتی بادی باشد مثالهای بارز این روش اندازه گیری PSA، FSH، LH، TSH، HCG و... است


Colored Substrate
Primary Antibodies
Incolor Substrate
Solid Matrix
Solid Matrix
Solid Matrix
Solid Matrix
Antigene added
Substrate added
Complex
Secondary antibodies – enzyme
added

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 دیگرخود(Fab) پذیرای همان آنتی ژن اما به صورت نشاندار می باشد در نتیجه آنتی بادی اختصاصی در بین ۲ آنتی ژن ساندویچ می گردد. در این روش آنتی بادی توتال از هر کلاس ایمونوگلوبولین میسر است و یکی از اختصاصی ترین و حساس ترین روشها برای تشخیص آنتی بادی در نمونه است مثال بارز این روش کیت اندازه گیری آنتی بادی بر علیه پلاسمودیوم ویواکس،ترپونما پالیدوم و HBs Abمی باشد


Antibody Sandwich ELISA
blocker
coated capture antibody
target antigen
conjugated secondary detection antibody

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 غیرنشاندار 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 بلوکینگ 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 T_3و T_4می باشد. انواع روشهای رقابتی عبارتند از:

روش رقابتی یا مهاری برای آنتی ژن:

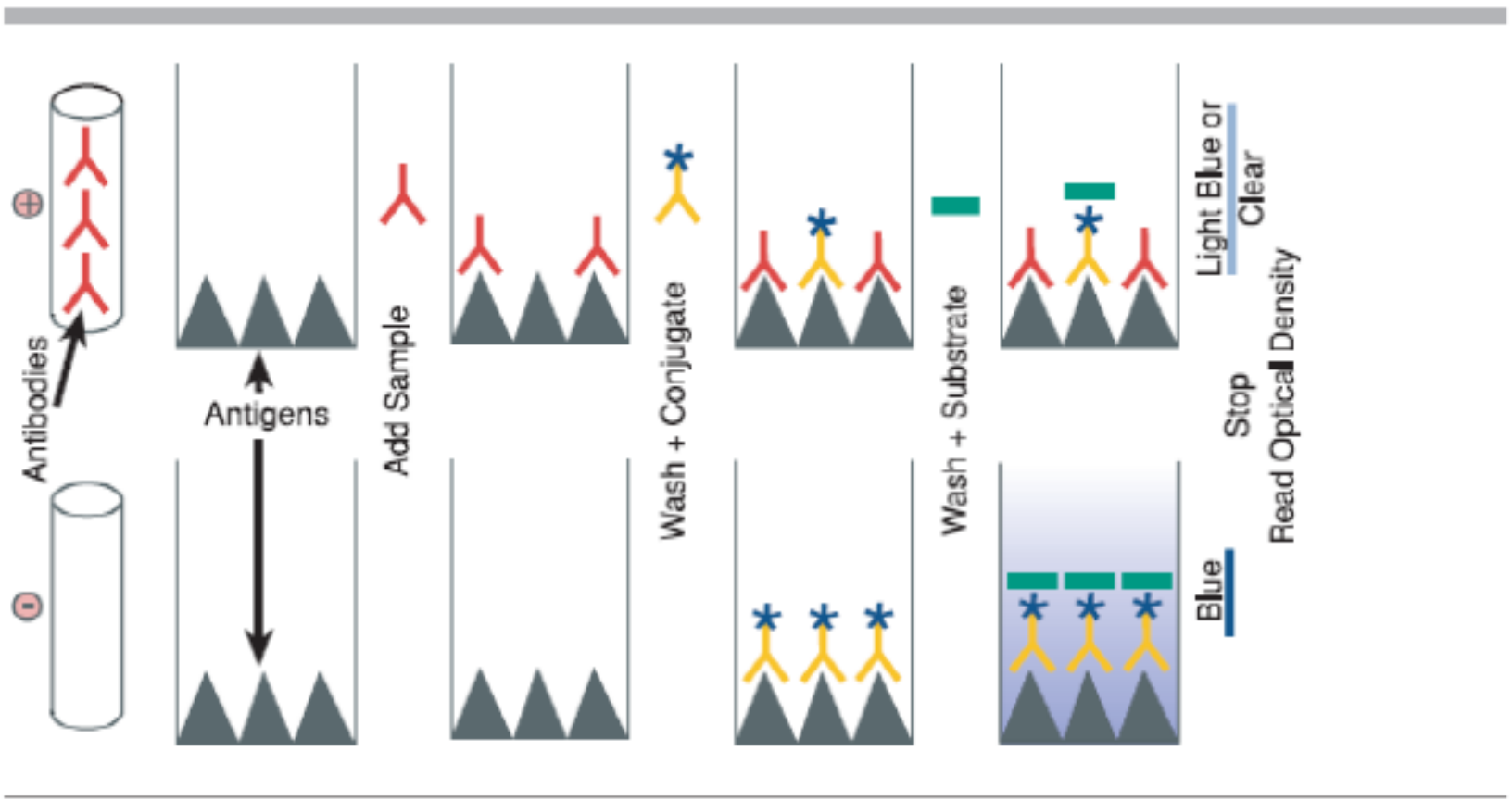
اساس این روش بر رقابت بین آنتی ژن نشاندار و آنتی ژن موجود در نمونه برای اتصال به یک آنتی بادی اختصاصی کوت شده در چاهک استوار است. در این روش مقدار آنتی بادی کوت شده باید محدود باشد و ملکول سیگنال دهنده همان آنتی ژن نشاندار است، اساس RIAو EIA کلاسیک به همین روش استوار است.

روش رقابتی برای آنتی بادی:

دراین روش رقابت بین دو آنتی بادی یکی در نمونه به صورت غیرنشاندار و یکی به صورت نشاندار شده با آنزیم برای اتصال به یک آنتی ژن کوت 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 استاندارد نیز معکوس می باشد.

شاخص ترین مثال این روش اندازه گیری آنتی بادی ضد HBcاست.

Steps in **Blocking ELISA**



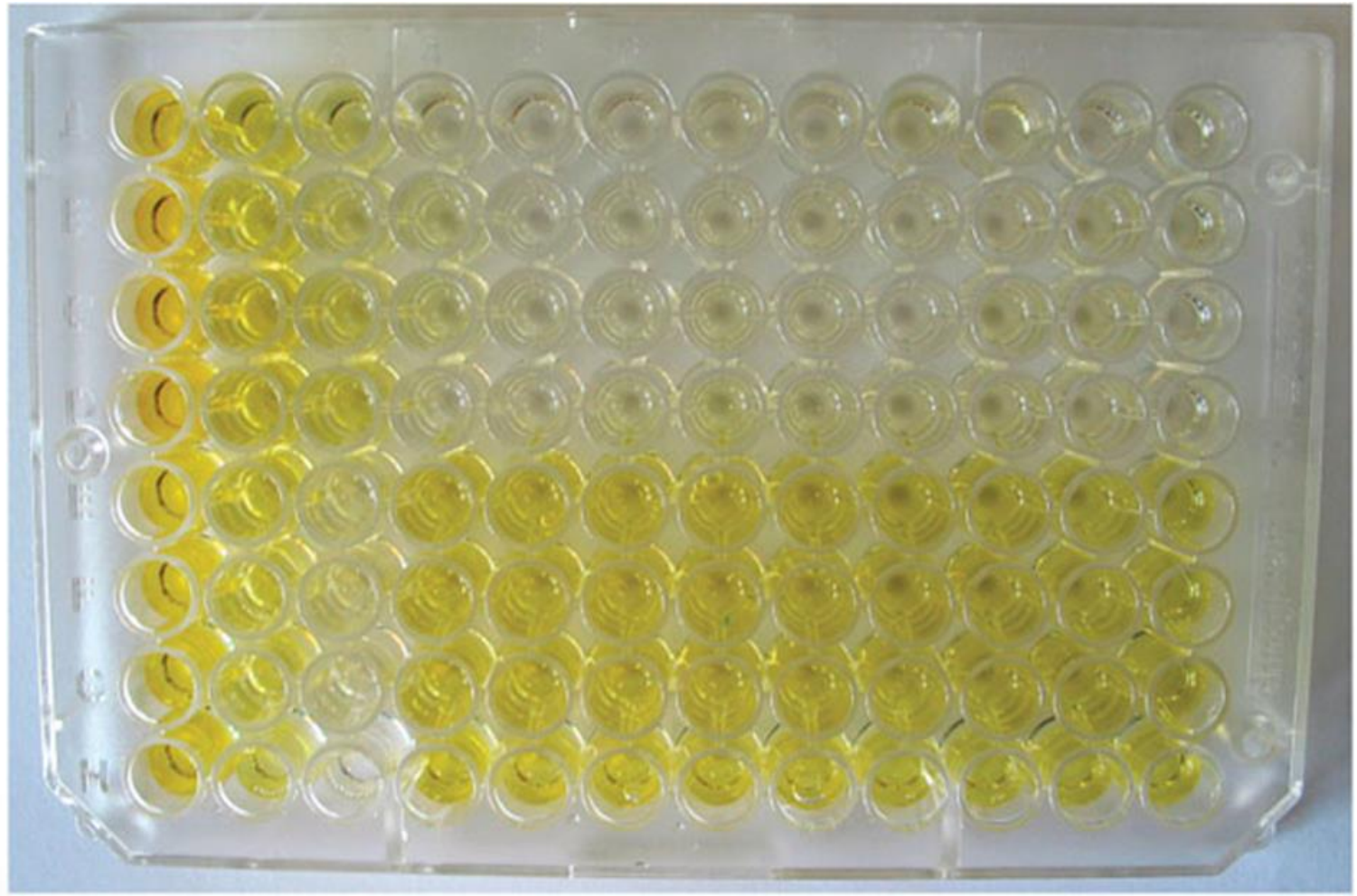
اجزاء الایزا:

در متد الایزا عناصری در کنار یکدیگر قرار می گیرند که واکنش این عناصر با یکدیگر در نهایت منجر به تشخیص واندازه گیری بیومولکول مورد نظر می گردد در ادامه به معرفی این عناصر خواهیم پرداخت .

میکروپلیت های الایزا :

میکروپلیت های الایزا عمدتا شامل ۶۶ میکروول (microwell) می باشند که می تواند در جنس ، رنگ و خواص فیزیک و شیمیایی تنوع زیادی داشته باشند برای مثال جنس این میکروپلیت ها می تواند پلی استیرن ، پلی پروپیلن باشند. رنگ پلیتها نیز بسته به متد الایزا میتواند شفاف ، سیاه و یا سفید باشد.

از خواص فیزیکوشیمیایی این میکروپلیتها می توان به ظرفیت اتصال آنها اشاره کرد تقسیم بندی در این مبحث عمدتا به سه دسته پلیتهای با ظرفیت اتصال پایین ، پلیتهای با ظرفیت اتصال متوسط ، و پلیت های با ظرفیت اتصال بالا تقسیم بندی می گردند از دیگر خواص فیزیکوشیمیایی میکروپلیت ها می توان به شکل ظاهری این میکروول ها اشاره کرد که می توانند ته صاف(flat buttom) ته گرد (round buttom) و vشکل باشند. چنین پلیتهایی به پلیتهای خام (uncoated) معروف هستند. میکروپلیتها در متد الایزا درواقع نقش یک فاز یا محیط جداکننده را بازی می کنند.



در متد الایزا بسته به متد بکار رفته بیومولکهای خاصی را در سطح داخلی این میکرویال های کوت (coating) می کنند این بیومولکولها می توانندشامل آنتی ژنها ، آنتی بادی ها ، هاپتنهای متصل به پروتئین، رسپتورها و پروتئین ها باشند. کوتینگ این بیومولکول ها به سطوح داخلی میکرویال های به دو صورت عمده انجام می شود که شامل کوتینگ به کمک اتصالات غیرکووالانسی و کوتینگ به کمک اتصالات کووالانسی. از مزیتهای کوتینگ به کمک اتصالات کووالانسی می توان به پایین بودن مصرف بیومولکول کوت شونده ، عدم تغییرساختار فضایی بیومولکول کوت شونده ، جهت یابی فضایی درست بیومولکول ها ، محکم بودن اتصالات به پلیت و بالطبع پایداری بسیار بالای میکروپلیت های کوت شده اشاره کرد .

استانداردها :

در الایزا معمولا از چندین استاندارد استفاده می شود و این از آنجا ناشی می شود که رفتار برهم کنش شیمیایی آنتی بادی آنتی ژن اگر چه وابسته به غلظت است همانند دیگر واکنش های شیمیایی اما دقیقا همانند یک واکنش شیمیایی ساده از یک معادله خطی تبعیت نمی کند که بتوان با داشتن دو استاندارد به معادله آن دست یافت در واقع رفتار برهم کنش اجزا الایزا در یک معادله درجه ۲ و بالاتر مطابقت می کند. درچنین حالتی هرچه تعداد نقاط بیشتر باشد شکل درست تری از منحنی استاندارد خواهیم داشت. در الایزا از عمدتا ۶ استاندارد استفاده می گردد تا بتوان مقادیر پایین ، نرمال و بالا را مورد سنجش قرار داد .

کونژوگه :

کونژوگه ها در متد الایزا می تواند به اشکال عمده کونژوگه هاپتن به آنزیم و کونژوگه آنتی بادی به آنزیم و یا کونژوگه آویدین به آنزیم باشد. آنزیمی که در متد الایزا کاربرد زیادی دارد (HRP) Horse Radish Peroxidaseاست اما ازآنزیمهای دیگری مانند آلکالین فسفاتاز هم استفاده می شود. از آنجا که در کونژوگه ها از آنزیم استفاده شده است وآنزیم ها بیومولکولهای ناپایداری محسوب می گردند چه ازنظر ساختاری و چه ازنظر فعالیت آنزیماتیک در برابر عواملی مانند دما ، آلودگی و مهار کننده ها حساس هستند.

بنابراین پایدار نگه داشتن کونژوگه ها مقوله مهمی می باشد. کونژوگه ها را معمولا در محلولهای پایدار کننده که دارای مواد نگه دارنده نیز هستند تهیه می کنند میزان پایداری کنژوگه ها به نوع این محلولهای پایدارکننده ، به غلظت این محلولها و به غلظت کنژوگه بستگی دارد البته دمای نگه داری محلولی که کنژوگه در آن تهیه شده است را نباید فراموش کرد. از آنجایی که هرچه غلظت کنژوگه در محلول پایدار کننده بیشتر باشد پایداری آن نیز بیشتر است .

سوبسترا و کروموژن :

سوبسترا ماده شیمیایی است که آنزیم برروی آن بصورت اختصاصی تاثیر می گذارد سپس با ردیابی رنگ یا ترکیبات ثانویه ایجاد شده از این واکنش ، سنجش آنالیت مورد نظر) آنتی بادی یا آنتی ژن (میسر می گردد .

لازم به ذکر است که این پروسه در مورد آنزیم های مختلف متفاوت است بطور مثال سوبسترای آنزیم آلکالن فسفاتاز به عنوان کروموژن) ماده رنگزا (نیز عمل می کند ، در صورتیکه در مورد آنزیم HPR Horse Radish Peroxidase، سوبسترا آب اکسیژنه ، بعنوان معرف رنگزا عمل نمی کند و باید از ترکیب دیگری مانند TMB، ABTS و OPD بعنوان معرف رنگزا استفاده کرد .

کروموژن یا ماده رنگزا ماده ایست که تحت تاثیر مواد تجزیه شده از سوبسترا دچار تغییر رنگ می گردد .

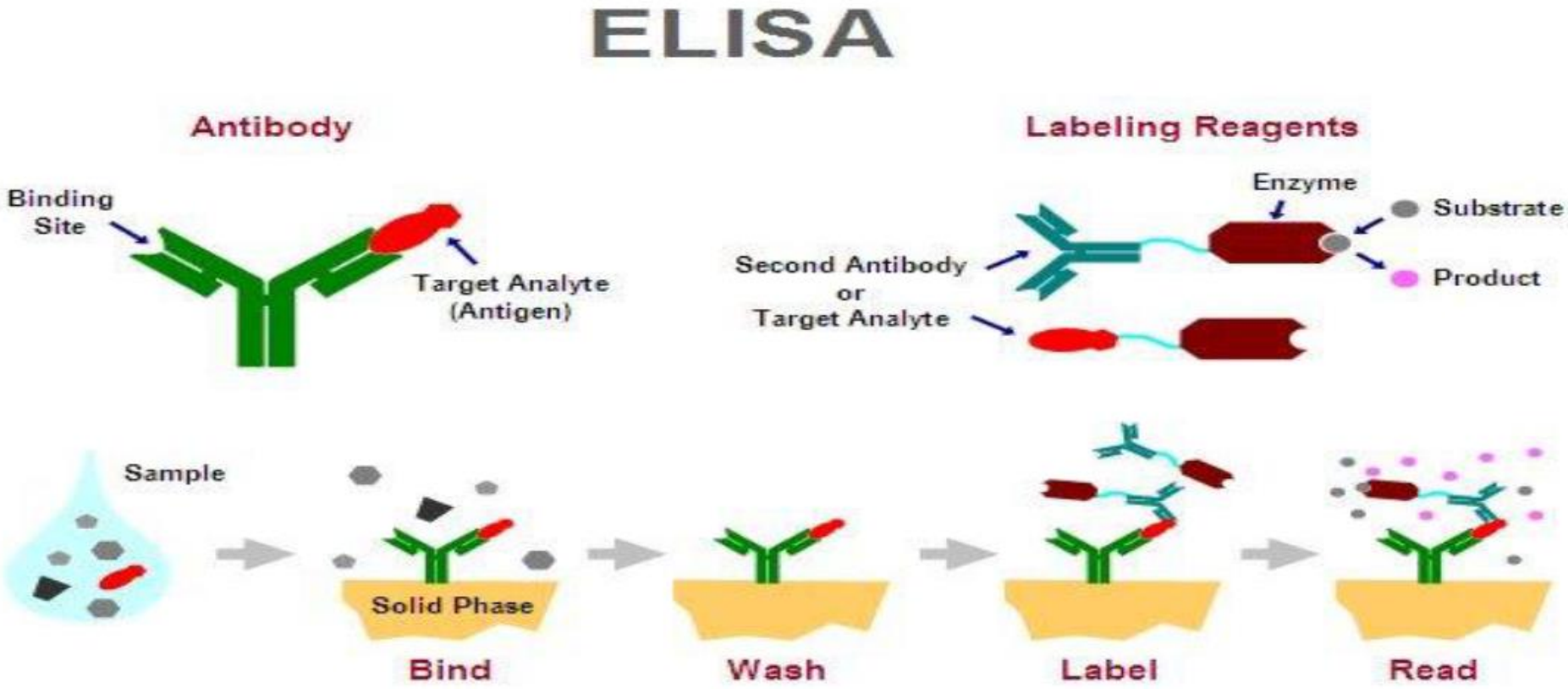
محلول شستشو :

محلولی است متشکل از بافر PBS یا Trisبه انضمام درصد مشخصی از یک دترجنت مانند Tweenجهت شستشو بین مراحل الایزا ،که باعث جداسازی پیوندهای غیر اختصاصی متصل شده به چاهک می شود .

محلول متوقف کننده :

بسته به اینکه جهت بررسی میزان فعالیت آنزیم از چه متدی استفاده شود محلول متوقف کننده ممکن است مورد نیاز باشد
یا نباشد. به عبارتی دیگر اگر شیوه بررسی فعالیت آنزیم کینتیک است به محلول متوقف کننده نیازی نیست و اگر end point است باید استفاده گردد. محلولهای اسیدی مانند HCl و H_2SO_4 برای توقف فعالیت آنزیم HRP و محلول NaOH برای توقف فعالیت آنزیم ALPمورد استفاده قرار می گیرد

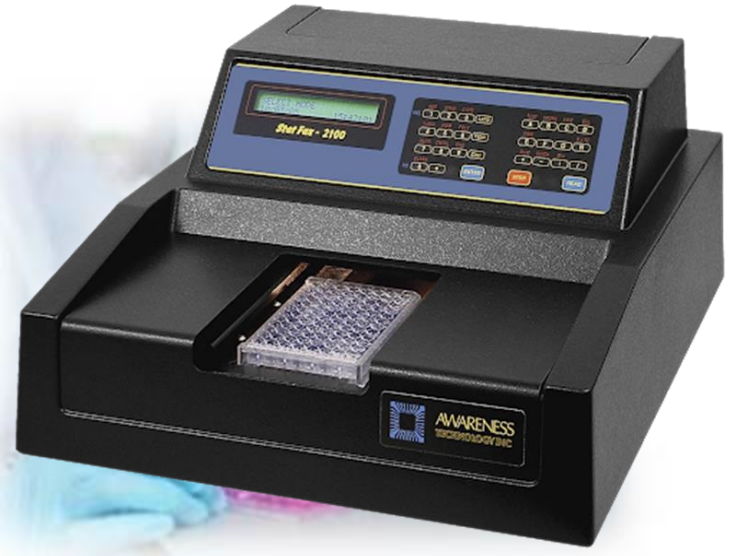
مراحل الايزا

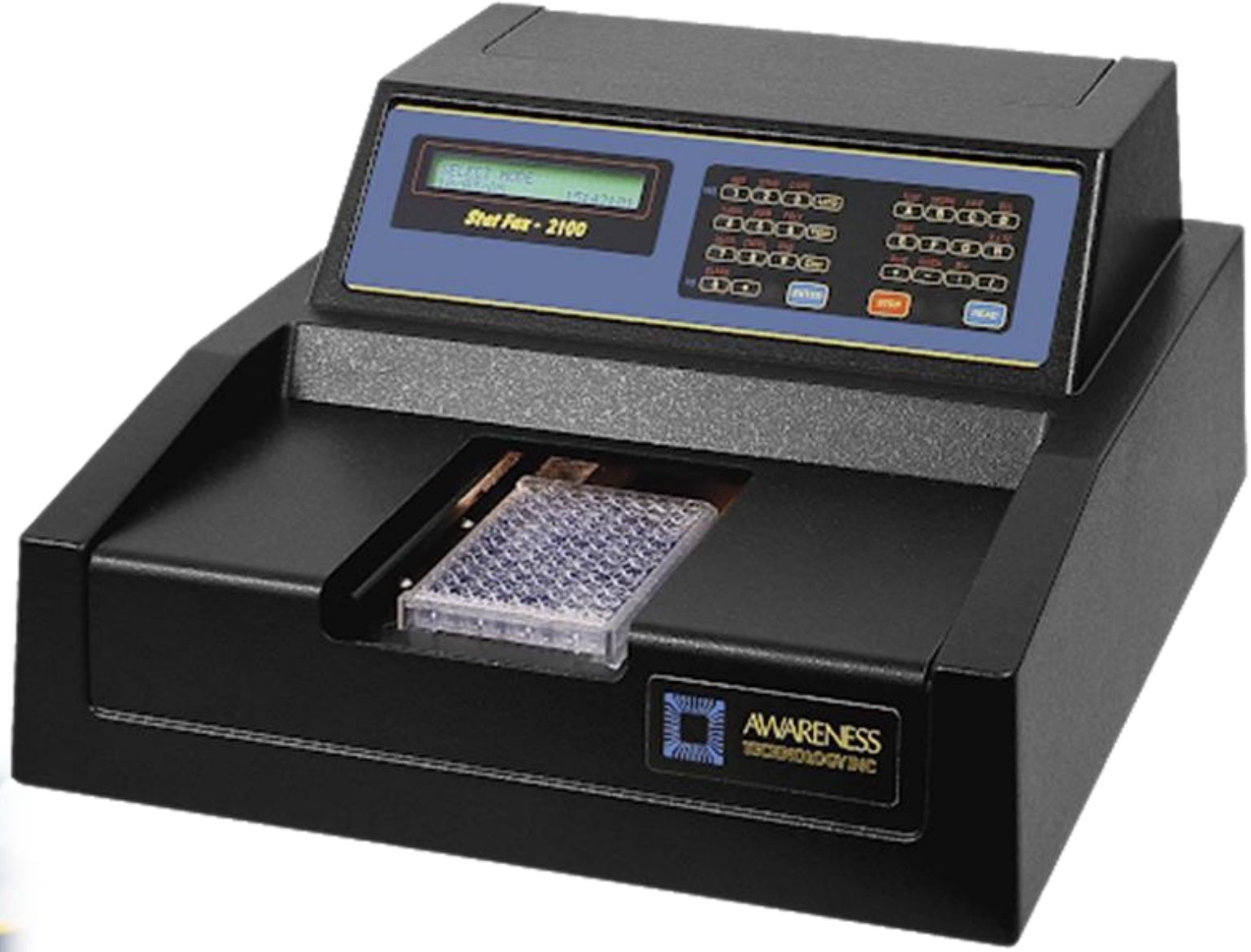


الایزا ریدر

الایزا ریدر یا خوانشگر الایزا که به اسامی میکروپلیت ریدر و یا خوانشگر میکروپلیت فتومتریک نیز معروف است ، یک اسپکتروفتومتر تخصصی بوده که به منظور قرائت نتایج تست الایزا طراحی شده است. این وسیله به منظور تعیین حضور آنتی بادی ها یا آنتی ژن های اختصاصی در نمونه ها به کار می رود.

این تکنیک بر اساس تشخیص یک آنتی ژن یا آنتی بادی هاروی یک سطح جامد به صورت مستقیم یا ثانویه به کمک آنتی بادی های نشاندار و ایجاد محصولاتی استوار است که می توانند توسط اسپکتروفتومتر خوانده شوند این دستگاه قادر به خواندن مونو کروماتیک یا بیکروماتیک پلیتها با ۴ فیلتر ۴۰۵،۴۵۰،۴۶۲،۶۳۰ نانومتر می باشد. مزیت خوانش در سیستم های دو موج آن است که از مزیت تصحیح جذب نوری برخوردارند و در آنها نقصهای ناشی از سیستم نوری، تغییرات چاهک به چاهک و حجم نهایی چاهکها بطور اتوماتیک بر طرف می گردد. به این فیلترها فیلتر افتراقی(Differential Filters) می گویند.




Stat Fax - 2100
AWARENESS

میکرو پلیت واشر (شستشو دهنده چاهک ها)

از دیگر مراحل مهم تست ELISA، شستشو است که در هر مرحله از تست به منظور دفع و تخلیه کامل مولکول های غیر اختصاصی از محیط واکنش انجام می گیرد. شستشو به دو صورت دستی و خودکار انجام می شود. ابتدایی ترین روش شستشو، شستشوی دستی است بدین ترتیب که مایع شستشو را با پیپت بر روی چاهک ها ریخته و سپس آن را در سینک خالی می کنند.

فشار بالای شستشو در روش دستی که به علت تخلیه سریع بافر به وجود می آید، منجر به جداشدن و حذف اتصالات اختصاصی از کف چاهک ها و کاهش کاذب می شود، همچنین فشار پائین شست شو ناشی از تخلیه آهسته بافر، باعث عدم دفع کامل اتصالات غیر اختصاصی و افزایش کاذب جذب نوری می شود.

بهتر است در روش دستی تا نزدیک لبه فوقانی چاهک ها از محلول شستشو پر شود، در صورت پر شدن لب به لب چاهک ها،احتمال آلودگی چاهک به چاهک افزایش پیدا می کند. همچنین باید از سرریز شدن محلول شستشو، ایجاد حباب هوا درچاهک ها و تماس با کف چاهک جلوگیری کرد.

در هنگام تخلیه چاهک ها نیز باید مکش و تخلیه به طور کامل انجام شده و دقت شود که حتی ذره ای از مایع بافر در کف چاهک ها باقی نماند. اما این روش شستشو (شستشوی دستی) بسیار وقت گیر بوده و خطر آلودگی محیط و کاربر را در پی دارد. از این رو دستگاه های خودکار واشر ELISA برای شستشوی پلیت ها به وجود آمده است که علاوه بر دقت و ایمنی بالاتر، سریع تر و راحت تر عمل شستشو را انجام می دهند.

سمپلرها و تقسیم کننده ها

سمپلرهای بکار رفته در سنجش ایمنی معمولا به صورت تک ، ۸ و ۱۲ کاناله می باشند و برای استفاده از آنها از نوک های یکبار مصرف استفاده می گردد . در سمپلرهای چند کاناله هر کانال دارای یک پیستون بوده و برای کالیبراسیون نیز باید هریک از کانالها به صورت جدا بررسی و کالیبر شوند. نوکهای یکبار مصرف نیز در کیفیت و اندازه با یکدیگر متفاوت بوده و باید موقع انتخاب به این مسئله توجه شود .

تقسیم کننده های اتوماتیک نیز به صورت تک و ۶۶ کاناله می باشند که استفاده از آنها زیاد شایع نیست .

نحوه کاربرد صحیح نوک سمپلر و سمپلردر ELISA

۱- در صورت الزام به استفاده از نوک سمپلر مصرف شده نوک سمپلر بایستی اتوکلاو شده و بازبودن نوک تک تک نوک سمپلر ها چک شده باشد

۲- محکم نشدن نوک روی بدنه سمپلر منجر به ریزش نمونه یا معرف و بروز خطا می گردد -

۳- بد جا انداختن اورینگ سمپلر در هنگام نظافت و سرویس سمپلر منجر به ریزش مایع از نوک سمپلر وبروز خطا می گردد.

۴- تماس دست با نوک سمپلر و الودگی باکتریال ان می تواند منجر به الودگی محلول کنژوکه و تضعیف یا خنثی شدن معرف کنژوکه گردد. استاف و استرپتوکوک بواسطه رسپتور FC قادر به جذب غیر اختصاصی ایمونوگلوبین G در محیط بوده و منجر به جذب انتی بادی کنژکه و تضعیف تیتر کنژوکه می گردد.

۵- چسبندگی ترکیبات پروتئینی سرم و پلاسما به سطح نوک سمپلر) خصوصا البومین (خصوصا زمانی که نوک را داخل لوله غوطه ور می نماییم منجر به تخلیه سرم اضافی و بروز خطا می گردد) راه حل اساسی برداشت نمونه از سطح خارجی سرم و عدم غوطه ورکردن نوک در سرم یا پاک کردن متناوب نوک ها با گاز یا دستمال بدون پرز می باشد.

۶- کنترل روزانه یا هفتگی مخروط سمپلر به لحاظ الودگی به سرم یا معرف یا اسید باید انجام شود.
۷- اشنائی به تکنیک برداشت معکوس نمونه در حجم های پایین سرم لازم است.
۸- کنترل کیفی وزنی سمپلرها باید به طور مرتب انجام شود
۹- نوک را حتی الامکان تا حد صحیح در نمونه پائین ببرید (۲ تا ۵ میلی متر پائین تر از تقعر سطح نمونه در لوله)
۱۰- نوک سمپلر نبایستی با ته چاهک تماس یابد و نبایستی از بالا به داخل چاهک چکانده شود.

Pipetting a Sample

Draw up the calibrated volume of sample into the tip.

The drop on the tip needs to be removed.

Touch the side of the tube with the tip to remove the excess liquid.

Ensure that you have the proper volume of sample in the tip.

Proper Pipetting

Proper position to dispense reagents into empty wells using a multichannel pipette; in the lower corner of each well

Proper position to dispense reagents into wells containing liquid using a multichannel pipette; above the liquid

انکوباتور

پلیت در انکوباتور قرار داده می شود که دارای دمای کنترل شده بوده و واکنش ها در آن محل انجام می شوند . (برای همه روش های الایزا لازم نیست)

نکاتی مهم در مورد دما :

- تقریباً نیم ساعت قبل از شروع تست تمامی اجزای کیت را به دمای اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد) برسانید .

دمای انکوباتور را بطور مرتب چک کنید. دمای پائین تر از حد لازم می تواند باعث کاهش ابزوربنس شده و دمای بالاتر از آن باعث افزایش ابزوربنس میشود.

دمای مناسب برای انکوباسیون در دمای اتاق ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد می باشد

شیکر الایزا

تکان دادن میکروپلیت ها(shaking) از مهم ترین بخش های تکنیک ELISA است، چرا که تاثیر زیادی در تغییر رنگ محیط آنزیمی پس از افزودن محلول اسیدی دارد. استفاده از روتاتور معمولی با قطر چرخش زیاد و تعداد دور کم و در نتیجه تکان دادن آهسته میکروپلیت ها باعث خوب مخلوط نشدن معرف ها و در نتیجه ادامه و پیشرفت جزئی واکنش در طی زمان وبروز خطا می شود.

همچنین تکان شدید این پلیت ها نیز باعث آلوده شدن چاهک های میکرو پلیت با هم می شود.

شیکر ELISAدستگاهی است که برای مخلوط کردن محتویات میکروپلیت ها به کار گرفته می شود. شیکر ELISAباحرکت سریع با قطر چرخش کم باعث اختلاط مناسب معرف ها و در نتیجه پیشرفت واکنش در طی زمان می شود. شیکرهای امروزی مجهز به سیستم کنترل زمان و کنترل دور به صورت دیجیتال است .

مراحل بیوشیمیایی تکنیک الایزا

۱- چاهک های موجود در پلیت با آنتی بادی ها و آنتی ژن ها پوشیده(Coat) می شوند.

۲- نمونه ها، کنترل ها و استانداردها به چاهک ها 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 مقدارآنتی 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 ژن ها یا آنتی بادی های 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 آنتی ژن 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 می کند. 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 غلظت های 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.

ISO 10002 ISO 13485 inpe

روش انجام آزمایش hCG Rapid بصورت شمانیک

چاهک های کوت شده با آنتی بادی ضد hCG

محلول‌ها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
استانداردها	۵۰ میکرولیتر	–	–
سرم کنترل	–	۵۰ میکرولیتر	–
نمونه	–	–	۵۰ میکرولیتر

دهانه چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید. **۵ دقیقه** در دمای اتاق انکوبه کنید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهک ها را خالی کنید. طبق دستور شستشو **۵ بار** چاهک ها را بشویید.

آنزیم کنژوگه	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر

دهانه چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید. **۵ دقیقه** در دمای اتاق انکوبه کنید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهک ها را خالی کنید. طبق دستور شستشو **۵ بار** چاهک ها را بشویید.

محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر

۵ دقیقه در دمای اتاق و در **تاریکی** انکوبه کنید.

محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر

جذب نوری چاهک ها را در طول موج **۴۵۰ نانومتر** (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید.

تهران ، شهرک گلستان ، بلوار گلها ، خیابان یاس سوم ، نبش خیابان یاسمن ، پلاک ۱

کدپستی ۱۲۹۲۷۳۳۴۶۳ تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰(خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷

sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

Seramun

با تشکر از حسن توجه شما