مروری بر روش ELISA

دکتر کمال‌الدین خدمتی
و دکتر شهین مسعودی
اعضاء هیأت علمی مؤسسه تحقیقاتی رازی

مقدمه

امروزه استفاده از روش ELISA[1] در آزمایشگاههای تشخیصی در حال افزایش است و پیشرفتهای جدیدی که در روش ELISA بوجود آمده در رابطه با پادگنهای نوترکیب اختصاصی بیماریهای اتوایمیون و پادتن منوکلونال می‌باشد. به دلیل آنکه ELISA حساسیتی قابل مقایسه با RIA[2] داشته و نیز مشکلات ناشی از مصرف مواد رادیواکتیو و کوتاه بودن نیمهٔ عمر این مواد را ندارد لذا در بسیاری از آزمایشگاهها جایگزین RIA شده است.

بطور کلی روشهای Enzyme immunossay به دو دسته تقسیم‌بندی می‌شوند:

روش هموژنوس و روش هتروژنوس.

در روش هموژنوس فعالیت آنزیم به عنوان بخشی از واکنش ایمونولوژیک تغییر می‌کند و باوجود مناسب بودن این روش در اندازه‌گیری داروها و هاپتن‌ها بدلیل مشکلات خاصی که در اندازه‌گیری پروتئین ایجاد می‌کند در آزمایشگاههای ایمونوپاتولوژی استفاده نمی‌شود.

در این روش مقدار ثابتی از کونژوگهٔ آنزیم - پادگن را با مقدار ثابتی از پادتن ضد پادگن همراه با مقادیر متغیری از پادگن آزاد انکوبه می‌کنند. در صورتیکه پادتن باکونژوگه آنزیم - پادگن واکنش دهد فعالیت آنزیمی کاهش می‌یابد. اما اگر در نمونه پادگن باشد پادگن با پادتن واکنش داده و کونژوگه در محیط آزاد است و آنزیم فعالیت طبیعی خود را دارد.

روش هتروژنوس که همان روش ELISA است در ایمونولوژی کاربرد زیادی دارد. در این روش فعالیت آنزیمی ایمونو راکتانت نشاندار شده مستقیماً تحت تأثیر واکنش ایمونولوژیکی قرار نمی‌گیرد.

انواع ELISA

اساس کار ELISA استفاده از یک پادتن یا پادگن کونژوگه شده با یک آنزیم است. این آنزیم بعد از واکنش با سوبسترای خود محصول رنگی تولید می‌کند و تغییر رنگ با چشم یا با استفاده از اسپکتروفتومتر سنجیده شده و در نتیجه با توجه به شدت رنگ و میزان جذب مقدار مادهٔ مورد آزمایش تعیین می‌گردد. ELISA دو شکل عمده دارد رقابتی و غیر رقابتی.

روش رقابتی

این روش معمولاً برای اندازه‌گیری پادگن بکار می‌رود و با پادتن یا پادگن تثبیت شده روی فاز جامد (Solid phase) صورت می‌گیرد. روش رقابتی انواع مختلفی دارد: هنگامیکه پادتن اختصاصی پادگن روی فاز جامد تثبیت شده باشد نمونه مشکوک و پادگن نشاندار شده با آنزیم، همزمان اضافه می‌شوند و در صورت وجود پادگن در نمونه این دو برای اتصال به فاز جامد با یکدیگر رقابت می‌کنند همزمان با نمونه استاندارد هم کار می‌شود. فعالیت آنزیم متصل شده به کمپلکس ایمنی فاز جامد انکوباسیون بعدی با سوبسترای آن تعیین می‌گردد. مقدار محصول نسبت عکس با مقدار پادگن موجود در نمونه و استاندارد را دارد (شکل ۱). نوع دیگری از این روش دو مرحله‌ای است. در مرحلهٔ اول پادگن مورد آزمایش با پادتن اختصاصی انکوبه می‌شود. سپس کملکس پادگن - پادتن تشکیل شده با شستشو حذف شده و پادگن نشاندار با آنزیم اضافه می‌گردد تا به پادتنهای آزاد در صورت وجود متصل شوند.

در مرحلهٔ دوم ذراتی (bead) که با پادتن نشاندار با آنزیم که در مرحلهٔ قبل تشکیل شده‌اند متصل شده و سپس با سانتریفوژ رسوب را جداکرده و مقدار پادگن با توجه به فعالیت آنزیمی کمپلکس، تعیین می‌شود.

در شکل سوم روش رقابتی پادگن را روی فاز جامد پوشانده و پادتن با آنزیم نشاندار می‌شود.

در این روش پادگن موجود در نمونه مورد آزمایش به پادتن نشاندار متصل شده و از اتصال پادتن نشاندار به پادگن متصل به فاز جامد جلوگیری می‌کند. در این روش می‌توان از پادتن ثانوی هم استفاده کرد و این پادتن را نشاندار کرد. پادتن ثانوی یک آنتی‌ایمونوگلوبولین است و روش غیر مستقیم می‌شود. مقدار محصول نسبت عکس با غلظت پادگن موجود در نمونه دارد.

در مقایسه با روش غیر رقابتی، این روش ویژگی بیشتری دارد و برای اندازه‌گیری ملکول‌های نسبتاً کوچک که آنها را با خلوص نسبی و به مقدار کافی، با یک آنزیم براحتی نشاندار کرد ایده‌آل است. و با توجه به اینکه در روش رقابتی مقدار کمی پادتن مورد نیاز است این روش برای استفاده در سیستم‌هایی که پادتن در دسترس اندک است مفید است و در تعدادی از تست‌های درمانگاهی مانند تعیین مقدار انسولین و استروژن کاربرد فراوانی دارد.

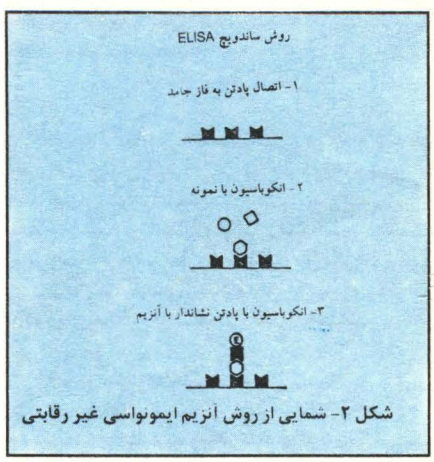
روش غیر رقابتی

این روش یکی از متداولترین روشهایی است که در آزمایشگاههای تشخیصی کاربرد دارد و مانند روش رقابتی دو شکل اصلی دارد که یا پادگن و یا پادتن را روی فاز جامد تثبیت می‌کنند. وقتی پادگن تثبیت می‌شود پادتن اختصاصی در نمونه به فاز جامد متصل شده و با پادتن ثانوی که یک آنتی‌ایمونوگلوبولین نشاندار با آنزیم است ردیابی می‌شود. این تکنیک برای اندازه‌گیری وضعیت ایمنی در برابر بیماریهای عفونی و اتوآنتی‌بادیها استفاده می‌شود.

نوع دیگری از روش غیررقابتی روش Sandwich یا Capture است. در این حالت پادتن روی فاز جامد تثبیت شده و پادگن موجود در نمونه به آن اضافه و انکوباسیون صورت می‌گیرد. بعد از شستشو، پادتن ثانوی نشاندار شده با آنزیم به پلیت اضافه می‌شود. این پادتن با اپی‌توپهای دیگر پادگنهای دیگر پادگن اتصال برقرار می‌کند. پادگن می‌تواند ایمونوگلوبولین، پروتئین ویروسی یا هر پادگن دیگری که حداقل دارای دومارکر پادگن است، باشد. می‌توان از پادتن مونوکلونال برعلیه دواپی‌توپ متفاوت پادگن استفاده کرد. در هر دو نوع روش غیر رقابتی غلظت محصول حاصل از واکنش آنزیم با سوبسترا ارتباط مستقیم با غلظت پادگن مورد آزمایش و استاندارد دارد (شکل ۲).

با اضافه کردن تعداد ایمونوراکتانتهای شرکت کننده در ELISA می‌توان حساسیت آنرا افزایش داد اما این عمل مستلزم صرف هزینه و زمان بیشتری است و

شکل ۱- شمایی برای روش آنزیم ایمونواسی رقابتی



شکل ۲- شمایی از روش آنزیم ایمونواسی غیر رقابتی

بیشترین کاربرد مستقیم اخیر در کمپلکس آویدین-بیوتین پراکسیداز است، که به میزان قابل توجهی قابلیت ردیابی ELISA را افزایش می‌دهد. در این حالت آنتی‌ایمونوگلوبولین بیوتینه شده به عنوان پادتن ثانوی در روش ساندویچ استفاده می‌شود سپس این مجموعه با مخلوطی از آویدین و پراکسیداز بیوتینه شده واکنش می‌دهد.

سیستم‌های دیگری مانند استفاده از روش پراکسیداز-آنتی‌پراکسیداز و شرکت لکتین به عنوان ملکول رابط وجود دارند این روشها عمدتاً در Immunohistochemistry بکار می‌روند.

اجزای آزمایش

فاز جامد

سطوحی که به عنوان فاز جامد در ELISA استفاده می‌شوند از جنس پلاستیک، نیتروسلولز، آگارز، شیشه، پلی اکریل آمید و دکستران هستند. فاز جامد می‌تواند به شکل ذرات (bead)، لوله، وپلیت استفاده شود. در صورتی که فاز جامد به صورت ذرات باشد در مراحل شستشو و جداکردن راکتانت‌ها باید از سانتریفوژ بهره برد. در هنگام استفاده از ذرات مغناطیسی برای جداکردن آنها میدان مغناطیسی بکار می‌رود. متداولترین فاز جامد پلاستیک است، که بیشتر به شکل میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی وجود دارد، همچنین به صورت نوارهایی دارای ۸ یا ۱۲ چاهک برای مواردی که تعداد نمونه کم باشد ساخته می‌شوند.

پلاستیک به شکل پلی‌استیرن یا پلی‌وینیل کلراید استفاده می‌شود. پلی‌وینیل کلراید پروتئین بیشتری جذب می‌کند معهذا شرکت‌های تجارتی پلیت‌هایی از پلی‌استیرن ساخته‌اند که میزان جذب پروتئین آنها نسبت به قبل افزایش یافته است.

پادتنها و پادگنها از طریق اندرکنش‌های هیدروفوبیک به فاز جامد متصل می‌شوند. غلظت پروتئین برای تثبیت روی فاز جامد معمولاً بین ۱-۵۰ mg/ml است و بافر مورد استفاده جهت تثبیت بیشتر، کربنات بافر با pH بالا (۹/۶) است با این حال برای هر سیستمی باید بافر مطلوب به صورت رابطه و تجربی تعیین گردد. بافرهای دیگر شامل Tris-Salim, PBS هستند. در مورد معتبر بودن و قابلیت تکرار پلیت‌های پلاستیکی به عنوان فاز جامد مطالعات متعددی در دسترس می‌باشد. مقدار جذب بستگی به غلظت و نوع پادگن، خصوصیات سطحی پلاستیک، زمان و درجه حرارت دارد. دی متیل سولفوکساید (DMSO) و سدیم دو دسیل سولفات (SDS) از اتصال پروتئین به فاز جامد جلوگیری می‌کنند. معذالک برای جذب پروتئین‌های نامحلول (مانند پروتئین‌های نوترکیب) از SDS برای محلول کردن آنان و جذب به فاز جامد استفاده می‌شود. هم چنین از K_2HPO_4 به مقدار ۰/۵-۰/۱ mol/l برای رسوب دادن SDS به صورت پتاسیم دو دسیل سولفات استفاده می‌شود.

استفاده از غلظت بیش از حد پادگن یا پادتن منجر به افزایش تعداد لایه‌های پروتئینی جذب شده به فاز جامد می‌شود (پادگن یا پادتن) و معرف بعدی که اضافه می‌شود، لایه‌ای دیگر در اثر اندرکنش پروتئین - پروتئین اضافه می‌گردد. این واکنش‌ها بسیار ناپایدار بوده و در خلال آزمایش امکان دارد این پروتئین‌ها وارد بافر شده و مشکلات زیادی ایجاد کنند. بعلاوه در طی انکوباسیون جدا شدن پروتئین‌های متصل شده با فاز جامد، روی داده که در نتیجه این پروتئین‌ها با پادگن آزاد رقابت می‌کنند (شکل ۳).

برای اجتناب از این مشکل بعد از هر مرحله انکوباسیون حداقل ۳ بار شستشو یا حتی بیشتر (۶-۳ بار) ضروری است.

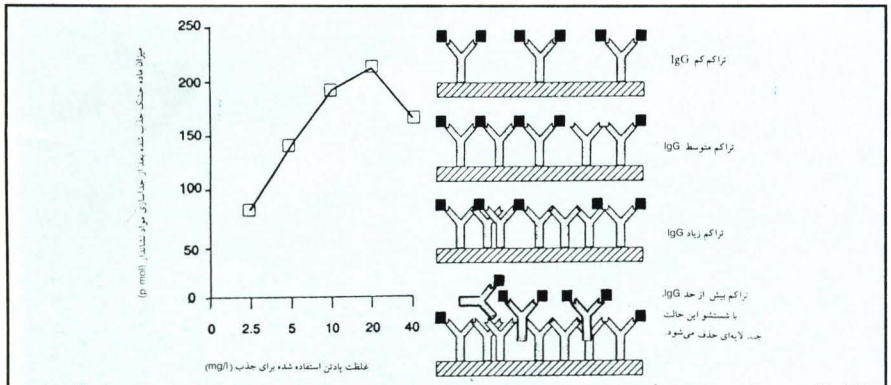
خواص فیزیکی پادگن مانند نقطه ایزوالکتریک و ترکیب شیمیایی آن می‌توانند روی توانایی پادگن در اتصال به فاز جامد اثر بگذارند. برخی پادگنها مانند پادگنهای لیپیدی (کاردیولیپین) در بدست آوردن قابلیت تکرار اتصال به فاز جامد مشکل دارند. در این نوع پادگنها چندین نوع پلیت باید بررسی شوند. همچنین خصوصیات فیزیکی میکروپلیتهای ۹۶ چاهکی، متغیر مهمی است. مشخص شده است که چاهکهای اطرافی در یک پلیت امکان دارد پروتئین بیشتری از چاهکهای داخلی جذب کنند این پدیده به نام Edge effect موسوم است. معذالک برخی معتقدند که حالت تغییرپذیری از چاهکی به چاهک دیگر بیشتر از Edge effect است لذا برای طراحی یک روش پلیت‌های مختلف از کمپانی‌های مختلف باید مورد آزمایش قرار گیرند.

جهت پوشاندن پادگن یا پادتن به فاز جامد، بعدازاضافه کردن یکی از این دو معرف (بسته به روش آزمایش) به فاز جامد انکوباسیون به صورت overnight در ۴°C و یا ۲ ساعت در درجه حرارت اتاق انجام می‌شود.

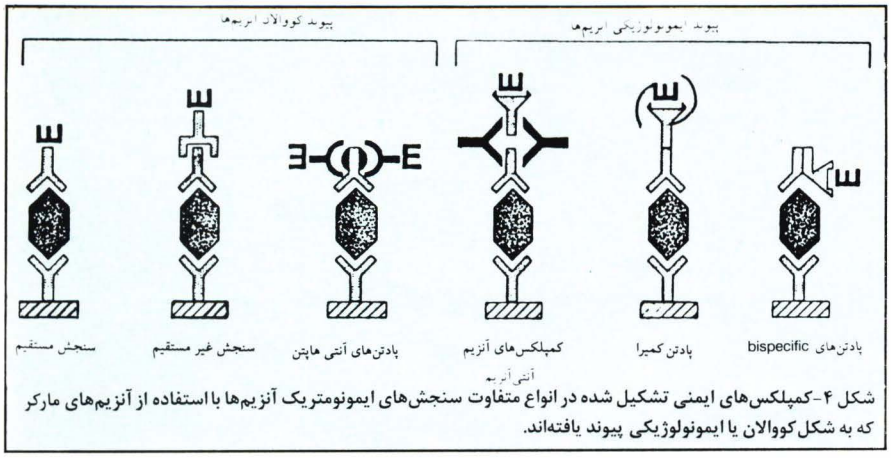
فرآیند جذب برخلاف اندرکنش پادگن - پادتن غیر اختصاصی است بنابراین در خلال انکوباسیون پروتئین تثبیت شده روی فاز جامد با پروتئین نشاندار با آنزیم، امکان دارد معرف نشاندار علاوه بر واکنش اختصاصی با راکتانتها فاز جامد، مستقیماً جذب فاز جامد شود. لذا جهت جلوگیری از این اتصال باید مکان‌های خالی فاز جامد را بلوکه نمود. بدین منظور می‌توان از Triton ۱۰۰ x، Tween ۲۰، BSA[۳]، ژلاتین و یا شیر پس‌چرخ استفاده کرد.

این مواد در واکنش پادگن و پادتن دخالت نکرده اما از واکنش‌های هیدروفوبیک جدید بین پروتئینهای اضافه شده به فاز جامد و فاز جامد جلوگیری می‌کنند. پلیت‌هایی که پروتئین به آنها باند شده چندین هفته تا چندین ماه بسته به شرایط نگهداری پایدار هستند.

اکثر پادگنها هنگامیکه در بسته‌های آلومینیومی قرار داده شوند پایداری بیشتری دارند و معمولاً کیت‌های تجارتی بدین صورت بسته‌بندی می‌شوند و این بسته‌بندی موضوع نیمه عمر آنها را بیشتر می‌کند. یک عمل اساسی که همواره باید قبل از استفاده از



شکل ۳- تعیین قابلیت اتصال آنتی‌بادیها به فاز جامد در رابطه با غلظت پادتن استفاده شده جهت جذب به سطح فاز جامد با استفاده از آنتی‌بادیها ضد α_1- فتوپروتئین (چپ) و شکل شماتیک اتصال پادتن به فاز جامد مورد غلظت‌های متفاوت.



شکل ۴- کمپلکس‌های ایمنی تشکیل شده در انواع متفاوت سنجش‌های ایمونومتریک آنزیم‌ها با استفاده از آنزیم‌های مارکر که به شکل کووالان یا ایمونولوژیکی پیوند یافته‌اند.

پلیت‌ها انجام داد شستن آنها می‌باشد تا هر گونه پروتئینی که در خلال نگهداری از فاز جامد جدا شده حذف گردد.

کونژوگه نمودن پادگن یا پادتن

بسته به روش مورد استفاده در ELISA یک پادگن یا پادتن کونژوگه شده با آنزیم وجود دارد. شرایط لازم برای آنزیم در تابلوی ۱ ارائه شده است. متداولترین آنزیم‌های مورد استفاده در ELISA عبارتند از الکالین فسفاتاز و HRP[۴]، آنزیم‌های دیگری مانند بتاگالاکتوزیداز، گلوکز اکسیداز، اوره‌آز، کربونیک آنهیدراز نیز می‌توانند استفادهٔ شوند اما این آنزیم‌ها در روشهای ایمونولوژیکی کاربرد کمتری دارند. در تابلوی ۲ تعدادی از آنزیمهای مورد استفادهٔ ELISA و خصوصیات آنها و سوبسترای مربوط آورده شده است. پادتنهای مورد استفاده در کونژوگه کردن می‌توانند پادتن پلی‌کلونال، قطعات IgG یا $F(ab')_2$ بدست آمده از پادتن پلی کلونال و یا پادتن منوکلونال و یا پادتن پلی‌کلونال که از طریق Affinity chromatography تخلیص شده است باشد. برای ایجاد یک روش انواع مختلف پادتن را کونژوگه نموده و پادتنی که نتیجهٔ مطلوب دهد و در عین حال ارزان باشد انتخاب می‌کنند. پادتن پلی‌کلونال خلوص کمتری داشته و ارزان است اما این پادتنها دورنمای بالایی دارند. با استفاده از قطعات IgG از همان سرم می‌توان این مشکل را برطرف کرد. رویهم رفته پادتن خالص Affinity، بهترین جواب را می‌دهد. این نوع پادتنها توسط شرکت‌های متعددی تولید شده‌اند و با توجه به اینکه می‌توان تا $\frac{۱}{۵۰۰۰}$ و حتی بیشتر آنها را رقیق کرد نسبتاً ارزان هستند. منوکلونال گرانترین پادتنها هستند اما درمواردی استفاده از آنها لازم است.

تابلوی ۱- خصوصیات آنزیم به عنوان نشانگر

۱- بالا بودن فعالیت اختصاصی آنزیم (Turnover number) به فرم آزاد یا نشاندار
۲- در دسترس بودن آنزیم محلول و خالص با قیمت کم و دارا بودن کیفیت قابلیت تکرار
۳- پایداری بالای آنزیم در زمان نگهداری و آزمایش به شکل آزاد و کونژوگه
۴- وجودگروههای فعال‌درملکول‌آنزیم برای اتصال کووالان
۵- ساده و ملایم بودن روشهای نشاندار کردن آنزیم
۶- وجود سوبسترای ارزان و پایدار غیر رسمی که تشکیل محصول کروموژن یا فلوروژنیک پایدار دهد.

روشهای کونژوگاسیون

کونژگه کردن آنزیم با پادتن به سه شکل اصلی می‌تواند صورت گیرد.

الف - اتصال شیمیایی

در این روش آنزیم با پادتن یا پادگن با پیوند کووالان متصل می‌شود.

ب - اتصال ایمونولوژیکی

در این حالت پادتن بر علیه آنزیم تولید شده و این پادتن قادر است آنزیم را به کمپلکس ایمنی متصل نماید. باید مراقب بود که فعالیت کاتالیتیک آنزیم در اثر پیوند با پادتن از بین نرود.

ج - اتصال با ایجاد پل رابط

همهٔ سیستم‌های زنده براساس شناسایی بین مولکولهای آن سیستم پایه‌گذاری شده‌اند. برخی از این سیستم‌ها که در ELISA کاربرد دارد شامل سیستم آویدین - بیوتین است.

در کونژوگه کردن چهار پارامتر مهم را باید در نظر گرفت: کونژوگه کردن yield، فعالیت ایمنی کمپلکس، فعالیت آنزیمی کمپلکس و اندازهٔ کونژوگه کردن .شرایط لازم برای نشاندار کردن پادتن یا پادگن با آنزیم در تابلوی ۳ آمده است.

اتصال شیمیایی

در این روش آنزیم با پادتن با پیوند کووالان متصل می‌شود و این اتصال از طریق ایجاد گروههای فعال صورت می‌گیرد. مواد مورد استفاده برای اتصال دو پروتئین معمولاً غیر اختصاصی عمل می‌کنند و با گروههای کاربردی که در همهٔ پروتئین‌ها مشترک هستند واکنش نشان می‌دهند. برخی از متداولترین این مواد همراه با منابع مربوطه در تابلوی ۴ ارائه گردیده است.

مناسبترین موادی که به عنوان عوامل این اتصال استفاده می‌شوند عبارتند از: گلوتارالدئید و یا سدیم پریودات.

گلوتارالدئید یک دی‌آلدئید بوده و بین دو پروتئین از طریق گروههای فعال آمین ۴ اسیدآمینه لیزین پروتئین با تشکیل Shiff's bases اتصال برقرار می‌کند. گلوتارآلدئید برای پروتئین‌هایی که با آنزیم الکالین فسفاتاز و یا بتاگالاکتوزیداز نشاندار می‌شوند بکار می‌رود. در مقابل سدیم پریودات برای الحاق پروتئین‌ها با آنزیم پراکسیداز (HRP) استفاده می‌شود. سدیم پریودات گروههای کربوهیدرات را در آنزیم اکسید کرده و گروههای آلدئیدی ایجاد می‌کند. این گروهها با گروه آمین پروتئین (پادگن یا پادتن) واکنش می‌دهند.

بطور کلی واکنش نشاندار کردن از قانون عمل جرم پیروی می‌کند و میزان کونژوگه بدست آمده به غلظت آنزیم فعال شده و معرف بستگی دارد. در صورتیکه بخواهیم در مدت زمان اندکی الحاق انجام شود نیاز به غلظت بالای آنزیم فعال و معرف داریم (>۱۰mg/ml).

کمپلکس‌های ایمنی تشکیل شده در انواع متفاوت روش ساندویچ که در آنها آنزیم با باند کووالان یا ایمونولوژیکی به پادتن متصل شده در شکل ۴ ارائه شده است.

جهت اتصال آنزیم به پادتن با پیوند کووالان می‌توان پادتن Tag را با آنزیم نشاندار کرد و یا اینکه از پادتن ضدگونه‌ایی استفاده نمود و آنرا با پیوند کووالان به آنزیم متصل نمود. روش دیگری نیز وجود دارد که می‌توان پادتن مخصوص تجزیه را با یک هاپتن کونژوگه کرده و آنزیم را به پادتن ضدهاپتن با پیوند کوولان متصل کرد.

اتصال ایمونولوژیکی

در این روش آنزیم به یک پادتن ضد آنزیم متصل می‌شود و این مجموعه یعنی پادتن آنزیم و ضد آنزیم به کمپلکس ایمنی که در فاز جامد تشکیل شده متصل می‌شود. سه شکل عمدهٔ این روش عبارتند از.

تابلوی ۳- شرایط لازم برای روشهای نشاندار کردن

۱- ساده و سریع بودن روش کار
۲- قابل تجدید بودن ملکول‌های کونژوگه (ثابت بودن نسبت مولی آنزیم و معرف) هموژن بودن ملکول‌های کونژوگه
۳- بالابودن تعداد ملکول‌های نشاندار شده، پائین بودن تعداد همه پلیمرهای آنزیم و معرف
۴- کم بودن میزان غیر فعال شدن آنزیم و معرف
۵- قابل تنظیم بودن درجهٔ نشاندار کردن ملکول‌های و معرف
۶- سادگی روش‌های جداسازی ملکول‌های نشاندار شده از ملکول‌های غیر نشاندار و آنزیم آزاد
۷- پایداری طویل المدت بدون از دست دادن فعالیت ایمونولوژیکی و آنزیمی

تابلوی ۲- آنزیم‌های متداول مورد استفاده به عنوان نشانگر در ELISA

آنزیم	منبع	pHاپتیمم	فعالیت ویژه در ۳۷°C (u/mg)		سوبسترای رنگی
الکالین فسفاتاز	رودهٔ گوساله	۹-۱۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰۰۰	p-نیتروفنیل - فسفات λ= ۴۰۵ نانومتر (PNP)
بتا-گالاکتوزیداز	*E. coli*	۶-۸	۶۰۰	۵۴۰۰۰۰	O- نیتروفنیل -بتا-دی- گالاکتو-پیرانوزید (ONPG) λ= ۴۲۰ نانومتر
					کلروفنولیک رد-بتا-دی - گالاکتوپیرا-نوزید (CPRG) λ = ۵۷۴ نانومتر
پراکسیداز	ریشه خردل	۵-۷	۴۵۰۰	۴۰۰۰۰	۲،۲/H2O2 - آزینو- دی (۳- اتیل - بنزتیازولین سولفونیک اسید- ۶) (ABTS) λ=۴۱۵ نانومتر O/H2O2 - فنیلین دی آمین (OPD) λ= ۴۹۲ نانومتر
گلوکوز اکسیداز/ پراکسیداز	*Aspergillus niger*	۴-۷	۲۰۰	۱۸۶۰۰۰	گلوکز +کرموژن HRP
اوره آز پراکسیداز	جک بین نایجر				گلوکز +کرموژن HRP
اوره آز	جک بین	۶/۵-۷/۵	۱۰۰۰۰	۴۸۳۰۰۰	اوره / برم‌کرزول زرد λ= ۵۸۸ نانومتر

۱- روش پادتن پل

در این حالت مجموعه پادتن آنزیم و ضد آنزیم از طریق یک پادتن ضد ایمونوگلوبولین به کمپلکس پادگن- پادتن فاز جامد متصل می‌شود.
پادتن مخصوص تجزیه و پادتن ضد آنزیم باید در یک گونه حیوان آزمایشگاهی تهیه شوند. در صورتیکه ضد-آنزیم از نوع منوکلونال باشد حساسیت آزمایش در بالاترین میزان خود خواهد بود.

۲- روش پادتن کیمرا

در این روش پادتن اختصاصی پادگن و پادتن اختصاصی آنزیم را با استفاده از گلوتارآلدئید با پیوند کووالان به هم متصل می‌کنند.

۳- روش پادتن Bispecific

در این روش پادتنهای Bispecific منوکلونال با فیوژن سلول هیبریدومایی که پادتن منوکلونال اختصاصی پادگن را ترشح می‌کند با سلول هیبریدومایی که پادتن منوکلونال ضد آنزیم را تولید می‌کند، تهیه می‌شوند. بنابراین پادتن تولید شده هم بر علیه آنزیم و هم بر علیه پادگن است و به هر دو متصل می‌شود. (شکل ۴). گرچه این روش بدلیل ویژگی پادتنهای ضد آنزیم امکان استفاده از آنزیمهای Crud را با همان حساسیت روش شیمیائی می‌دهد اما به دلیل مراحل بیشتر آن کاربرد کمی دارد. معذالک این روش در زمانیکه نشاندار کردن مستقیم پادتنها باعث کاهش فعالیت آنها می‌شود، یک روش آلترناتیو است. هم چنین حساسیت این روش‌ها در آزمایشهای Immunohistochemistry بیشتراز Immunoassay است.

اتصال با ایجاد پل رابط

سیستم اویدین - بیوتین در این دسته قرار می‌گیرد. مزیت اختصاصی این سیستم بیوتینه شدن راحت ایمونوراکتانت‌ها است. تاثیر آویدن برای بیوتین بسیار بالا بوده و ثابت تجزیه معادل M^{-15} ۱ دارد که معادل نیمه عمری برابر ۱۶۰ روز است (تقریباً معادل پیوندکووالان).
آویدین دارای ۴ ساب یونیت است و هر ساب یونیت یک جایگاه با اثر بالا برای اتصال به بیوتین دارد. لذا این سیستم به عنوان پل یا Sandwich در رابطه با واکنش پادگن - پادتن استفاده می‌شود. ملکول بیوتین را می‌توان به راحتی فعال کرد و به پادگن یا پادتن متصل کرد بدون آنکه فعالیت آن از بین برود. متعاقباً آویدین با آنزیم کونژوگه شده و به عنوان یک معرف ثانوی که برای بیوتین اثر بالایی دارد اضافه می‌شود.
و در نتیجه اندازهٔ پروتئین مورد آزمایش و قدرت ارسال پیام را بالا می‌برند. سیستم آویدین - بیوتین به ۳ شکل بکار می‌رود.

۱- آویدین-بیوتین نشان‌دار شده

در این شکل پادگن با پادتن اولیه به فاز جامد متصل می‌شود زمانی که هدف اندازه گیری پادتن باشد، پادگن به فاز جامد متصل شده و سپس نمونه مشکوک به پلیت اضافه می‌گردد و پس از انکوباسیون و شستشو پادتن ثانوی که با بیوتین همراه است به پلیت اضافه

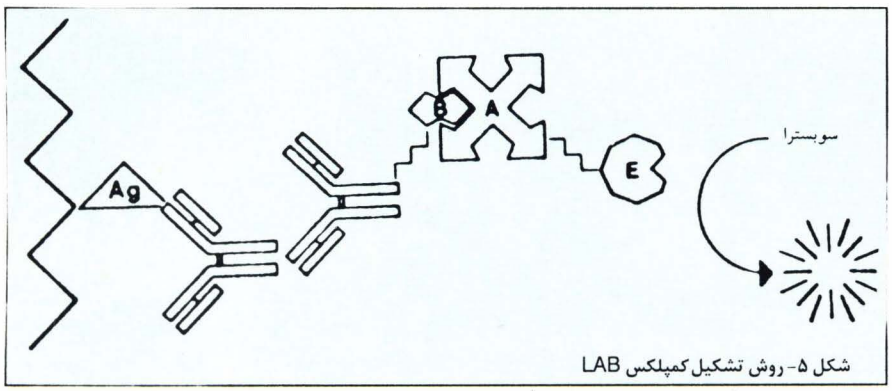
تابلو ۴

معرفهای مورد استفاده برای اتصال آنزیم‌ها به پروتئین‌ها		
ترکیب	گروه واکنش دهندهٔ پروتئین	منابع
گلوتارآلدئید	-NH2	a , b
تولوئن دی ایزوسیانات	-NH2	c , d
p-دی‌فلورو – m', m- دی نیتروفنیل سولفون	-NH2	e
کربودی‌آمید	-COOH	f , g
	-NH2	
p-بنزوکوئینون	-NH2	h
	-SH	
N-'O-N-فنیلن روی مالمید	-SH	i
m- پریودان	-NH2, CHOH	j , k

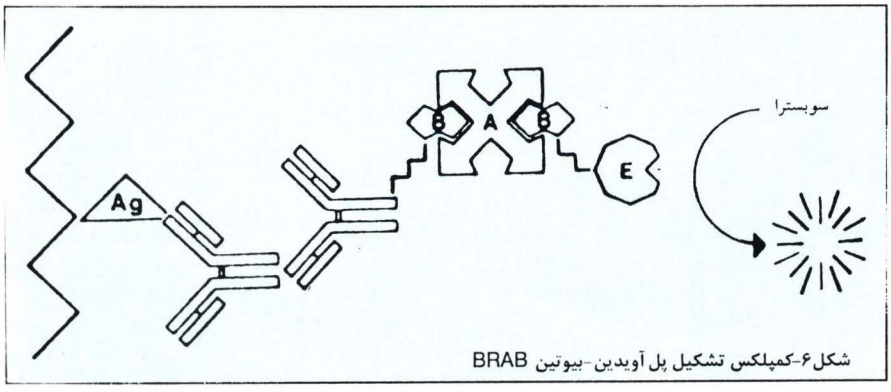
A- S. Avrameas, Immunochemistry 6, 43 (1969). B- S. Avrameas and T. Temynck. Immunochemistry S. 1175 (1971). C- A. F. Schick and S.J. Singer, J. Biol. Chem. 236 2477 (1961). D- R.R. Modesto and A. J. Pesce. Biochim. Biophys. Acta 229, 384 (1971). E- S.S. Tawde and J. S. Ram. Arch. Biochem. Biophys. 97, 426 (1962). F- S Avrameas and J. Uriel. C.R. Acad. Sci. 262, 2543 (1966). G- P.K. Nakane, J. S. Ram. and G.B. Pierce. J.Histochem. Cytochem. 14, 789 (1966). H- T.Ternynck and S. Avrameas, Immunochemistry 14, 767 (1977). I- K. Kato. Y. Hamaguchi, H. Fukui, and E. Ishikawa, J. Biochem. 78, 235 (1975): Eur. J. J- Biochem. 62, 285 (1976). J- P.K. Nakane and A. Kawaoi, J. Histochem. Cyochem. 2, 1084 (1974). K- A. Murayama, K. Shimada. and T. Yamamoto. Immunochemistry 15, 523 (1978).

تابلوی ۵- شرایط لازم برای سوبسترا‌های کروموژن

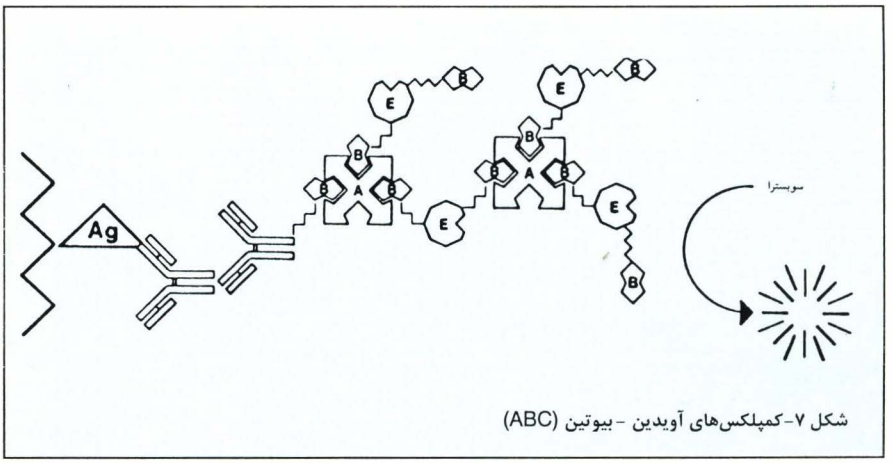
۱- محلول در آب بی‌بو، بی‌رنگ، فاقد خاصیت موتاسیون‌زائی، غیرسمی، ۲- Extinction coefficient مولی محصول تشکیل شده بالا بوده و طیف جذب نوری حداکثر باشد (بین ۴۰۰ تا ۶۰۰نانومتر)، ۳- بالابودن ثابت اتصال سوبسترابرای آنزیم (پائین‌بودن مقدار km)، ۴- پایداری بالای سوبسترا در زمان نگهداری و نیز پایداری بالای محصول تشکیل شده بعد از متوقف نمودن واکنش (به عنوان مثال: عدم حساسیت محصول به نور)، ۵- وجود رابطه خطی بین‌شدت رنگ و غلظت آنزیم در یک دامنه وسیع، ۶- عدم وجود سوبسترا در نمونه بخصوص در سنجش بروش هموژنوس



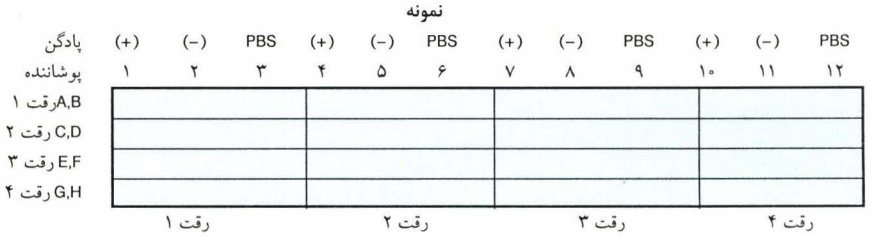
شکل ۵- روش تشکیل کمپلکس LAB



شکل۶-کمپلکس تشکیل پل آویدین-بیوتین BRAB



شکل ۷-کمپلکس‌های آویدین - بیوتین (ABC)



شکل ۸- شمایی از عیار سنجی بروش Checkerboard برای تعیین غلظت مطلوب پادگن Coating و رقت پادتن کونژوگه شده چهار غلظت متفاوت از پادگن بطور افقی در پلیت ریخته می‌شود نمونه‌های مورد آزمایش عبارتند از: کنترل مثبت (+) با عیار بالا، کنترل منفی (-) و بافر به تنهایی. چهار رقت از پادتن کونژوگه شده در جهت عمودی استفاده می‌شوند.

می‌شود و در مرحلهٔ بعد کونژوگه آویدین-آنزیم اضافه می‌گردد. و در مرحلهٔ آخر سوبسترای آنزیم به کار می‌رود و شدت رنگ حاصل با غلظت پادتن اولیه بستگی دارد. اگر هدف اندازه‌گیری پادگن باشد می‌توان پادتن را به پلیت متصل کرد (شکل ۵).

۲- پل بیوتین-آویدین

اصول این روش مشابه روش اول است با این تفاوت که آویدین با آنزیم کونژوگه نشده بلکه آویدین به صورت یک پل بین پادتن ثانویه بیوتینه شده و آنزیم بیوتینه شده عمل می‌کند. با توجه به اینکه آویدین چندین جایگاه برای بیوتین دارد تعداد بیشتری آنزیم بیوتینه شده می‌توان به کار برد تا شدت رنگ حاصله از واکنش آنزیم با سوبسترا افزایش یابد (شکل ۶).

۳- کمپلکس بیوتین-آویدین

در این روش ابتدا آنزیم بیوتینه شده با آویدین انکوبه شده و در نتیجه کمپلکس‌های بزرگی تشکیل می‌شود که متعاقباً با پادتن بیوتینه شده انکوبه می‌شوند. بدین منظور آویدین و آنزیم بیوتینه با نسبتهای خاصی با هم مخلوط می‌شوند و انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت اتاق صورت می‌گیرد. سپس مجموعه به پلیت اضافه می‌شود. و در این جا سایت‌های دیگر آویدین به بیوتین متصل به پادتن ثانوی متصل می‌گردند. در نتیجه غلظت بیشتری از آنزیم در فاز جامد داریم و حساسیت آزمایش افزایش می‌یابد (شکل ۷).

ویژگیهای آنزیم کونژوگه شده

اکثر روشهای کونژوگاسیون منجر به تولید محصولی هتروژن از نظر اندازه و ترکیب می‌شوند. بعد از کونژوگاسیون پادگن یا پادتن با آنزیم، محصول واکنش کونژوگاسیون دارای پادگن یا پادتن آزاد، آنزیم آزاد و Conjugant است. وجود آنزیم آزاد باعث افزایش زمینه مناسب می‌گردد. پادگن یا پادتن آزاد با کونژوگانت برای اتصال به analyte رقابت می‌کنند. بنابراین باعث کاهش انتشار خبر از کمپلکس ایمنی می‌گردند. لذا خارج کردن مولکول‌های غیر نشاندار از مخلوط کونژوگانت عملی ضروری در افزایش حساسیت است. روشهای خالص سازی کونژوگانت براساس اصول زیر استوار است:

۱- متفاوت بودن حلالیت پادتنهای نشاندار با آنزیم آزاد (رسوب با سولفات آمونیوم).

۲- متفاوت بودن وزن مولکولی معرف نشاندار شده با آنزیم و غیر نشاندار و آنزیم آزاد (ژل فیلتراسیون، دیالیز).

۳- متفاوت بودن شارژ معرف‌های آزاد و نشان‌دار با آنزیم و آنزیم آزاد (کروماتوگرافی تعویض یونی).

۴- متفاوت بودن ساختمان باری مثال گروههای کربوهیدرات معرف (پادتنها) و آنزیم Ligand (HRP) chromatography روی Con A-Sepharose و Protein A).

تیتراسیون Checkerboard

برای انتخاب رقت صحیحی از کونژوگانت و پادتن از این روش استفاده می‌شود. در این روش ابتدا پلیت را با چهار غلظت متفاوت از پادگن یا پادتن بر حسب مورد به صورت دوتایی در جهت افقی می‌پوشانیم. بعد از پوشاندن و بلوک کرن سطح پلیت با BSA، ژلاتین، یا شیرخشک بدون چربی از نمونه مورد آزمایش یک کنترل مثبت با غلظت بالا، یک کنترل منفی و یک PBS به تنهایی استفاده می‌شود. سپس ۲-۱ ساعت انکوباسیون در درجه حرارت اتاق صورت می‌گیرد. بعد از انکوباسیون پلیت را ۶-۳ بار بافر PBS-T شستشو می‌دهند و بعد چهار رقت متفاوت از کونژوگانت در جهت عمودی به پلیت‌ها اضافه می‌شود. و پس از انکوباسیون و شستشوی پلیت سوبسترا اضافه شده و میزان جذب گرفته می‌شود. انتخاب مطلوب، غلظتی از پادگن و رقتی از کونژوکانت است که در آن (OD) جذب PBS کمتر از ۰/۰۵، کنترل منفی کمتر از ۰/۲ و کنترل مثبت بیشتر از ۱/۰ باشد (شکل ۸).

سوبسترا

در مورد انتخاب سوبسترا چندین فاکتور را باید مد نظر داشت:

۱- سوبسترا باید محصولی محلول و قابل اندازه‌گیری تولید کند. در اکثر مواقع این محصول رنگی است.

۲- سایر متغیرها شامل حساسیت، زمینهٔ جذب، پایداری ترکیب، سمیت و قیمت سوبسترا است.

سمیت سوبسترا باید مورد توجه قرار گیرد زیرا برخی از سوبستراهای پیشنهاد شده کارسینوژن هستند. در صورتیکه رنگ تولید شده از طریق اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری می‌شود. حداکثر طول موج جذب فاکتوری است که باید مد نظر باشد.

آنزیم پراکسیداز (HRP) بیشترین کاربرد را داشته و سوبستراهای متعددی دارد و این آنزیم پراکسیداز هیدروژن را احیا کرده و سوبسترای ثانوی را اکسیده می‌کند و محصول رنگی تولید می‌شود. بنابراین در زمان استفاده از HRP پراکسید هیدروژن همواره مورد نیاز است. همراه با یک سوبسترای دیگر، سوبستراهایی که برای این آنزیم استفاده می‌شوند عبارتند از: (OOD) O-Phenylenediamine، (OPD) 5-Aminosalicylic acid، 2-2-azino-di (3-ethylbenz-o -thiazoline- 6-sulfonate و (TMB) 3, 3', 5, 5'-Tetramethyl benzidine). برای طراحی و دایر کردن یک روش باید سوبستراهای متعددی را بررسی و مهمترین آن‌ها را انتخاب نمود. پراکسید هیدروژن در واکنش کاتالیتیکی HRP اهمیت زیادی دارد. پراکسید هیدورژن اغلب به صورت محلول ۳۰٪ نگهداری می‌شود ولی پایداری کمی‌دارد و امکان دارد مسئول تفاوتهایی باشد که در بین آزمایش‌ها دیده می‌شود.

مناسبترین سوبسترا الکالین فسفاتاز P-Nitrophenylphosphate(P-NPP) است.

جذب P-NPP در طول موج ۴۰۵nm است. P-NPP معمولاً در بافردی اتانل آمین حاوی Mg با pH بالا OD (Optical density) حل می‌شود. استفاده از PBS به عنوان بافر شستشو دهنده در سیستم AP

امکان دارد باعث کم شدن OD شود. زیرا فسفات مهار کنندهٔقوی AP است و چون احتمال دارد که بعد از شستشو فسفات در پلیت‌ها بماند و از واکنش آنزیمی ممانعت به عمل آورد باید بجای PBS در این سیستم از بافر Tris استفاده کرد. زیرا این بافر باعث افزایش فعالیت آنزیم می‌شود.

زمان مورد نیاز تبدیل سوبسترا به محصول رنگی بین ۳۰-۱۰ دقیقه است و با اضافه کردن محلول متوقف کننده که اکثراً محلولهای اسید یا قلیا هستند واکنش متوقف می‌گردد.

سنجش واکنش رنگی

واکنش رنگی را به دو صورت می‌توان بررسی کرد: روش کیفی و روش کمی در روش کیفی شدت رنگ مشاهده شده بررسی می‌شود. جهت حساستر کردن روش کیفی و هم چنین برای بررسی کمی واکنش از اسپکتروفتومتر استفاده می‌شود. اکثراً آزمایش EIISA در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی انجام می‌شود و برای خواندن میکروپلیت‌ها از فتومترهای چند کانال استفاده می‌شود.

تفسیر نتایج

تفسیر نتایج ELISA بدو شکل صورت می‌گیرد:

۱- تعیین مقدار analyte (معمولاً پادگن) به میکروگرم یا نانوگرم در میلی‌لیتر.

۲-گزارش مقدار (OD) یا واحدهای دلخواه دیگر برای ELISA (معمولاً پادتن)

برای تعیین مقدار analyte در یک میلی لیتر نمونه از یک نمونه مرجع به عنوان منبع Calibration استفاده می‌شود. این نمونه‌های استاندارد را می‌توان از شرکت‌های تجارتی، مؤسسات تحقیقاتی و مراکز دولتی تهیه کرد. برای رسم منحنی استاندارد همزمان با آزمایش روی نمونهٔ مشکوک با غلظت‌های متفاوت نمونه استاندارد هم کار می‌شود. سپس منحنی را براساس مقدار OD استاندارد در مقابل log غلظت رسم می‌کنند و منحنی خطی بدست می‌آوردند. سپس از روی این منحنی با توجه به اینکه میزان OD نمونه را دارند غلظت آنرا تعیین می‌کنند.

روشهای دیگر برای رسم منحنی مانند Spline-logite-log و حتی Point-to-point در برخی موارد می‌توانند مناسبتر باشند. هم چنین پکیج‌های کامپیوتری برای رسم منحنی ELISA در دسترس می‌باشند.

برای گزارش نتایج به صورت مقدار جذب مطلق روش متداول تعیین جذب متوسط نمونه‌های افراد نرمال است. و نمونه بیمار را زمانی مثبت اعلام می‌کنند که ۳-۲ انحراف معیار از مقدار خوب متوسط افراد سالم بالاتر باشد.

مشکلات کاری در ELISA

محدوده و زمینهٔ بالا

محدوده یک روش با بررسی OD چاهک PBS و نمونه منفی نمونه بیمار تعیین می‌شود. چاهکهای PBS آنهایی هستند که در آنها تمام ترکیبات آزمایشی وجود دارند با این تفاوت که بجای نمونه مشکوک PBS اضافه می‌شود. جذب این چاهکها باید کمتر از ۰/۱ واحد OD باشد (ترجیحاً کمتر از ۰/۰۵) اگر جذب بیشتر باشد امکان دارد به دلیل عدم شستشوی کافی و یا ناشی از کونژوگه آنزیم باشد. برای حل این مشکل اولین اقدام افزایش دفعات شستشو و بالاترین کارآیی آن است. در صورتیکه این اقدام مؤثر نبود رقت و خلوص آنزیم کونژوگه باید بررسی گردد. اگر کونژوگه را بدون تأثیرروی حساسیت آزمایش نتوان بیشتر رقیق کرد می‌توان از کونژوگه‌ای با تمایل بیشتر و یا از یک affinity-purified کونژوگه استفاده کرد. و هم چنین می‌توان سرم نرمال (۵-۱٪) از همان گونه‌ای که کونژوگه در آن تهیه شده به بافر رقیق کنندهٔ کونژوگه اضافه کرد. بعلاوه استفاده از ۵-۱٪ BSA یا پروتئین غیر اختصاصی دیگری برای اتصال به جایگاههای خالی فاز جامد امکان دارد موثر باشد. مشکل بزرگتر دیگر وجود جذب بسیار بالا OD (۰/۲unit) در نمونه منفی بیمار است. با این مشکل نیز مانند مورد فوق می‌توان برخورد کرد.

اثر Hook

در مواردی که نمونه مشکوک دارای مقدار زیادی از analyte است امکان دارد اگر از روش استاندارد برای تهیه رقت استفاده شود نتایج بالا را بدهد و متعاقب رقیقتر کردن نمونه نتایج خارج از محدوده بالا شود. علت این پدیده هنوز بدرستی شناخته نشده است. عده‌ای از محققین بر این تصورند که امکان دارد بدلیل زیادی پادگن و در نتیجه پرشدن اکثر جایگاههای اتصال به پادگن باشد و همچنین بدلیل وجود آنتی‌بادیهای با کشش تمایل پائین، شستشوی ناقص و یا پائین بودن غلظت پادتن نشاندار می‌تواند در رقت اول جواب بدهد، در حالیکه نمونه رقیق‌تر خارج از محدوده مورد نظر باشد آزمایشگاه باید به امکان وجود اثر Hook بیندیشد. استراتژیهای دیگر برای کاهش این مشکل عبارتند از: اطمینان از شستشوی کافی بعد از هر مرحله، بخصوص پس از اضافه کردن پادتن - ارتباط صحیح باسازندگان کیت‌ها - آزمایش کیت‌های جدید با کار در روی نمونه‌هایی با مقدار بالای analyte و بالاخره در ارتباط با کلینیسین برای آگاهی از مواردی که امکان دارد نمونه بیماردارای مقادیر زیادی از analyte باشد.

تابلوی ۶- راهنمایی‌هایی برای حل مشکلات آزمایش ELISA

مشکل	راه حل
OD کنترل PBS> ۰/۱	- افزایش دفعات شستشو
OD کنترل منفی > ۰/۲	- بلوکه نمودن جایگاهی خالی فاز جامد با BSA، شیر بدون چربی، ژلاتین و....
	- رقیقتر کردن کونژوگه
	- استفاده از پادتن کونژوگه‌ای که بروش Affinity chromatography خالص شده باشد.
	- اضافه کردن ۵-۱ درصد سرم نرمال همان گونه‌ای که کونژوگه در آن تهیه شده به بافر رقیق کنندهٔ کونژوگه
OD کنترل مثبت با عیار بالا < ۰/۵	- حصول اطمینان از Coating کامل فاز جامد
	- افزایش خلوص پادتن یا پادگن مصرفی برای Couting فاز جامد
	- افزایش مدت انکوباسیون کنترل مثبت با فاز جامد
	- اصلاح روش کار با اضافه کردن یک ایمونوراکتانت اضافی مانند ABC
نمونه در رقت پائین نتایج متوسطی می‌دهد و رقتهای بالاتر باعث Out of-range (بالا) نتایج می‌شود	اثر Hook، رقیق‌تر کردن نمونه
نتایج کلی آزمایش پائین است (۰/۱ یا کمتر)	- درستی سوبسترا و بافر بررسی شود
	از صحیح بودن pH بافر سوبسترا اطمینان حاصل شود
	بررسی مدت نگهداری پلیت‌هاو تاریخ مصرف کونژوگه.
نتایج نمونهٔ بیمار با علائم کلینیکی همخوانی ندارد	- بررسی برای وجود آنتی‌بادیهای هتروفیل

پادتنهای هتروفیل

اینگونه پادتنهای در روش ساندویچ اشکال ایجاد می‌کنند. اگر چه پادتنهای هتروفیل بر علیه گونه‌های متفاوت (گوسفند، بز، خرگوش) دیده می‌شود اما تعداد موارد نتایج اشتباه ناشی از پادتن anti-mouse بیشتر است. وجود این پادتنها می‌تواند باعث جواب مثبت کاذب شود که به دلیل Cross-link دو پادتن روش ساندویچ بوسیله هتروفیل پادتن است. معمول اضافه کردن ایمونوگلوبولین‌های غیر ایمن از گونه مناسب این مشکل را برطرف می‌کند. در این حال باید حیوانی که سرم نرمال از آن تهیه می‌شود و حیوانی که پادتن منوکلونال از آن بدست می‌آید از یک گونه باشند. برخی از نمونه‌ها نیاز به غلظت بالایی (۲۵٪<) از سرم نرمال همراه با انکوباسیون طولانی دارند. لذا جهت رفع این مشکل بایستی بطور معمول سرم نرمال هترولوگ به بافر رقیق کنندهٔ روش ساندویچ اضافه کرد. همچنین به نمونه‌هایی که نتایج آزمایشگاهی آنان با اطلاعات درمانگاهی مخالف است توجه خاصی باید مبذول داشت زیرا امکان دارد نشاندهندهٔ پادتن هتروفیل مقاوم به روشهای استاندارد باشد.

در تابلوی ۶ راهنمائیهای لازم در مورد مشکلاتی که در روش ELISA با آن ممکن است مواجه ارائه شده است.

پاورقی‌ها

1- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
2- Radioimmunoassay
3- Bovine Serum Albumin
4- Horse Radish Peroxidase