جمهوری اسلامی ایران

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان حفظ نباتات کشور

راهنمای شناسائی و ردیابی

آفت قرنطینه خارجی

روش های آزمون الیزا

ELISA Technical Guide

تهیه و تنظیم:

معصومه فرجی

دفتر پایش و تحلیل خطر

زمستان ۱۳۹۳

روش های آزمون الیزا

مقدمه:

ELISA مخفف عبارت Enzyme-Linked Immunosorbent Assay یک روش آزمایشگاهی بیوشیمیایی ساده با حساسیت بسیار بالا است که امکان آنالیز تعداد زیادی نمونه را به صورت همزمان فراهم می کند. پایه و اساس آزمون الایزا براساس واکنش آنتی‌بادی با آنتی‌ژن می‌باشد. در آزمون‌های الایزا یک آنتی‌بادی اختصاصی با یک آنتی‌ژن مشخص واکنش داده و سپس با استفاده از یک آنتی‌بادی اتصال یافته با یک آنزیم بعنوان سیستم نشانگر، آزمون ادامه یافته و درنهایت با افزودن سوبسترای آنزیم و تبدیل سوبسترا به محصول که یک مادهٔ رنگی می‌باشد آزمون الایزا به پایان می‌رسد طول موج رنگ بدست آمده که نشانگر حضور یک آنتی‌بادی (و یا آنتی‌ژن) و نیز غلظت آن می‌باشد توسط یک دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شده و ثبت می‌گردد.

بعنوان مثال در یکی از رایج‌ترین روشهای الایزا (روش غیر مستقیم) که برای شناسایی حضور و یا عدم حضور آنتی‌بادی برعلیه یک آنتی‌ژن موردنظر بکار می‌رود ابتدا یک آنتی‌ژن برروی سطح جامد پوشش داده می‌شود سپس نمونهٔ مجهول که حضور و یا عدم حضور آنتی‌بادی برعلیه این آنتی‌ژن درون آن مورد بررسی قرار می‌گیرد بر روی این سطح جامد پوشش داده شده با آنتی‌ژن, افزوده می‌شود. پس از آن آنتی‌بادی ثانویه یا در حقیقت آنتی‌بادی برعلیه این آنتی‌بادی اولیه که متصل به آنزیم نیز می‌باشد افزوده می‌شود و در نهایت سوبسترای آنزیم در اختیار آنزیم قرار داده می‌شود و پس از گذشت مدت زمان لازم واکنش آنزیمی خاتمه داده شده و رنگ بدست آمده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت می‌شود.

انواع روشهای الایزا:

۱- الایزای مستقیم (Direct ELISA)

۱-۱ الایزای مستقیم براساس جذب یا پوشش‌دهی آنتی‌ژن

۱-۲ الایزای مستقیم براساس جذب یا پوشش‌دهی آنتی‌بادی

۲- الایزای ساندویچ (Sandwich ELISA)

۲-۱ ساندویچ مستقیم

۲-۲ ساندویچ غیر مستقیم

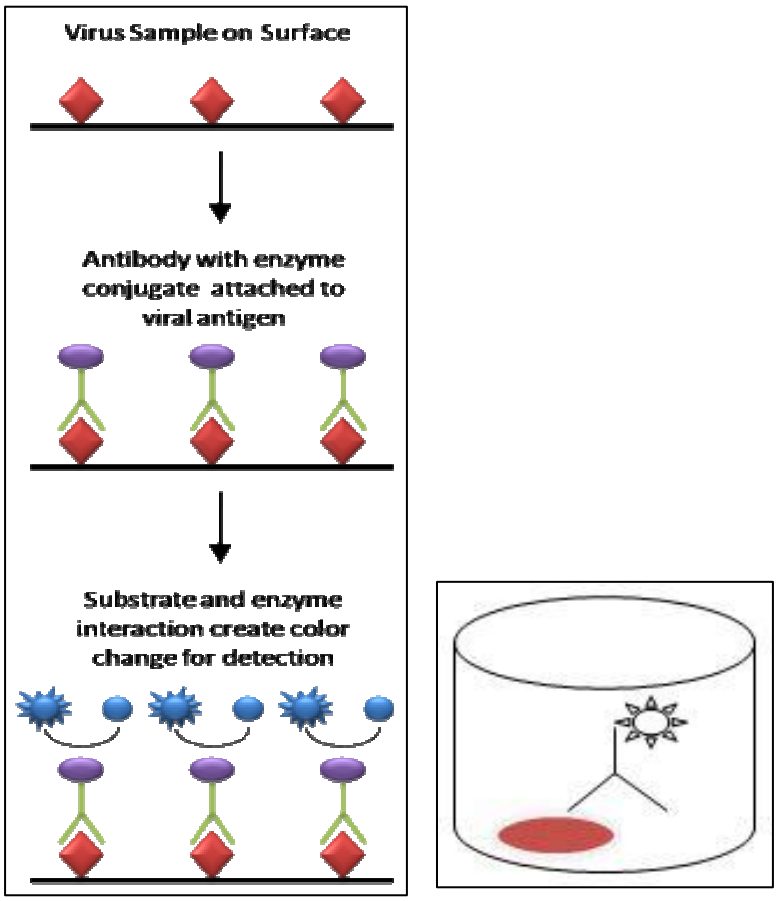
۳- الایزای غیر مستقیم (Indirect ELISA)

۱– الایزای مستقیم (Direct ELISA) :

۱–۱ الایزای مستقیم براساس جذب یا پوشش‌دهی آنتی‌ژن

- مرحلهٔ اول: پوشش‌دهی آنتی‌ژن بر روی پلیت‌ها
- مرحلهٔ دوم: شستشو
- مرحلهٔ سوم: افزودن کونژوگه (آنتی‌بادی اتصال یافته با آنزیم) و گذراندن زمان انکوباسیون
- مرحلهٔ چهارم: شستشو
- مرحلهٔ پنجم: افزودن سیستم رنگی
- مرحلهٔ ششم: قرائت پلیت با الایزاریدر

در این نوع الایزا، آنتی‌ژنی که به ته پلیت متصل می‌شود مستقیما با کونژوگه وارد واکنش می‌شود. این نوع روش الایزا، فقط در موارد مشخص استفاده می شود و آن موردی است که می خواهیم بدانیم که کونژوگه ما برای انجام واکنش مناسب هست یا خیر. یعنی در اینجا آنتی ژن معمولا IgG می‌باشد. بنابراین راه اصلی سنجش واکنش یا عدم واکنش کونژوگه‌ای که علیه یک آنتی‌بادی تهیه شده است ، این روش می‌باشد. تیتر کونژوگه را نیز می‌توان با استفاده از این روش الایزا سنجید. امروزه برای سنجیدن واکنش مونوکلونال آنتی‌بادی کونژوگه شده با یک آنزیم که برعلیه یک آنتی‌ژن خاص می‌باشد از این روش استفاده می‌کنند.



طرح کلی الیزای مستقیم

۲-۱ الایزای مستقیم براساس جذب یا پوشش‌دهی آنتی‌بادی

- مرحلهٔ اول: پوشش‌دهی آنتی بادی بر روی پلیت‌ها
- مرحلهٔ دوم: شستشو
- مرحلهٔ سوم: افزودن کونژوگه (آنتی‌بادی اتصال یافته با آنزیم) و گذراندن زمان انکوباسیون
- مرحلهٔ چهارم: شستشو
- مرحلهٔ پنجم: افزودن سیستم رنگی
- مرحلهٔ ششم: قرائت پلیت با الایزاریدر

این نوع روش الایزا نیز فقط در موارد مشخصی استفاده می‌شود. کلا آنتی‌ژن در موارد بسیار معدودی کونژوگه می‌شود و استفاده از این روش بستگی به نوع کار تحقیقاتی دارد.

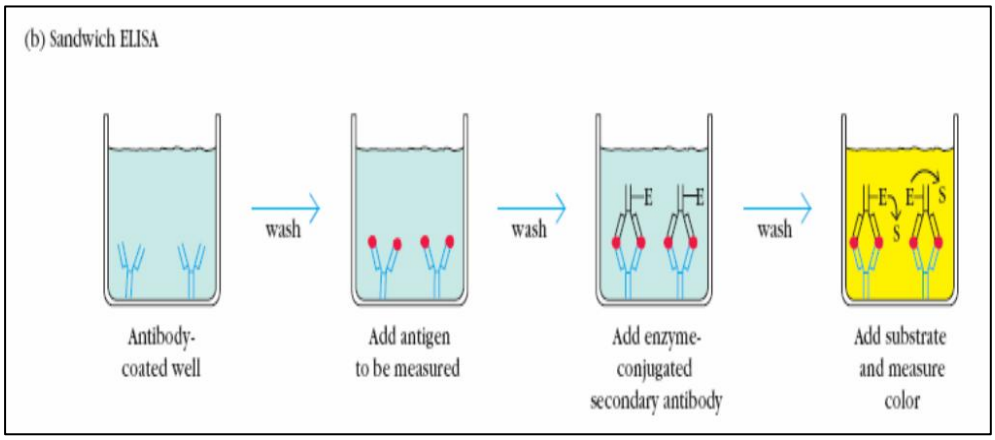
۲- الایزای ساندویچ (Sandwich ELISA)

۲-۱ ساندویچ مستقیم (Double Antibody Sandwich or DAS-ELISA)

- مرحلهٔ اول: پوشش‌دهی آنتی‌بادی
- مرحلهٔ دوم: شستشو
- مرحلهٔ سوم: افزودن آنتی‌ژن و گذراندن زمان انکوباسیون
- مرحلهٔ چهارم: شستشو
- مرحلهٔ پنجم: افزودن آنتی‌بادی کونژوگه شده با آنزیم و گذراندن زمان انکوباسیون
- مرحلهٔ ششم: افزودن سیستم رنگی
- مرحلهٔ هفتم: قرائت پلیت توسط الایزاریدر

دو آنتی‌بادی که در این سیستم بکار می‌روند می‌توانند هر دو از یک گونه باشند و یا می‌توانند از گونه‌های متفاوتی از موجودات بدست آیند. گاهی اوقات به آنتی‌ژنی که در این سیستم بکار می‌رود آنتی‌ژن تسخیر شده یا به دام افتاده می‌گویند. در این روش استفاده از محلولهای بلوکه کننده یا افزودن محلولهای بلوکه کننده به محلول پوشش‌دهی و محلولهای شستشو

بسیار مهم است. نکتهٔ مهم در این روش آنست که باید بدانیم که آنتی‌ژن ما حداقل دو محل اتصال به آنتی‌بادی داشته باشد تا بتواند به این آنتی‌بادی‌ها متصل شود. این آزمون به طور مفصل شرح داده خواهد شد.

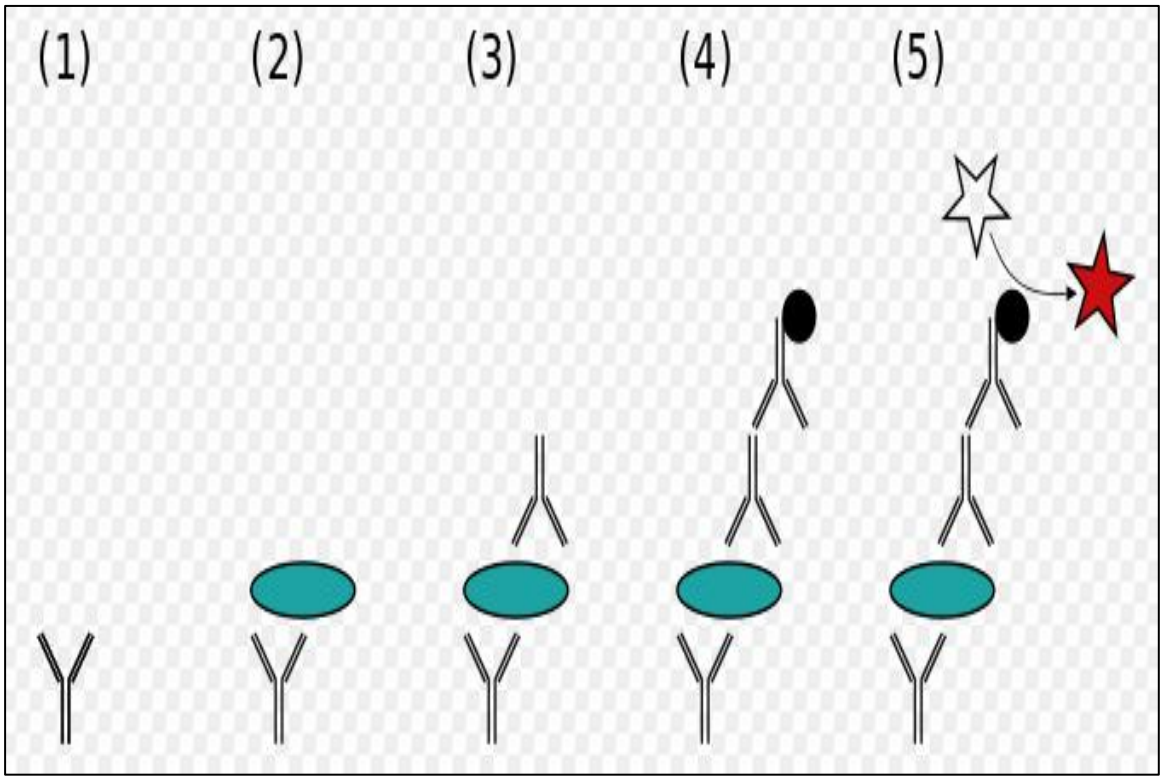


طرح کلی الایزای ساندویچ مستقیم

۲-۲ ساندویچ غیر مستقیم (Triple Antibody Sandwich or TAS-ELISA)

- **مرحلهٔ اول: پوشش‌دهی آنتی‌بادی**
- **مرحلهٔ دوم: شستشو**
- **مرحلهٔ سوم: افزودن آنتی‌ژن و گذراندن زمان انکوباسیون**
- **مرحلهٔ چهارم: شستشو**
- **مرحلهٔ پنجم: افزودن آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن**
- **مرحلهٔ ششم: شستشو**
- **مرحلهٔ هفتم: افزودن آنتی‌بادی سوم کونژوگه شده با آنزیم (علیه آنتی‌بادی دوم)**
- **مرحلهٔ هشتم: شستشو**
- **مرحلهٔ نهم: قرائت پلیت توسط الایزاریدر**

مشخص است که آنتی‌بادی دوم باید از یک گونهٔ متفاوت از موجودات تهیه شود.

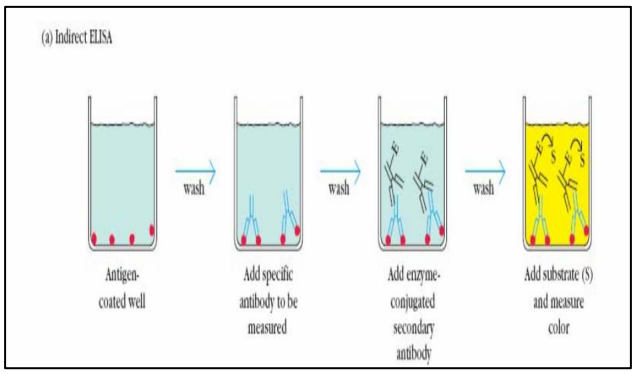


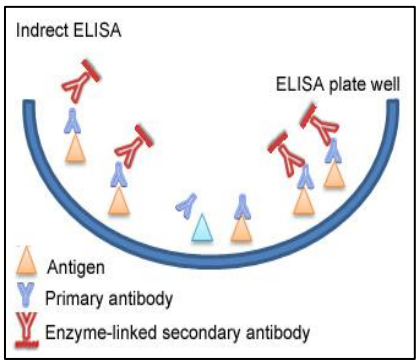
طرح کلی الایزای ساندویچ غیرمستقیم

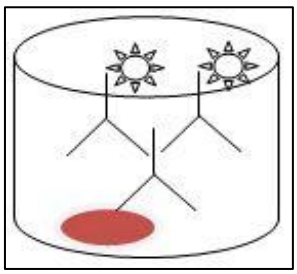
۳- الایزای غیر مستقیم (Plate Trapped Antigens or PTA-ELISA or Indirect-ELISA):

این روش بسیار رایج می‌باشد و معمولا برای مشخص نمودن آنتی‌بادی علیه یک پاتوژن خاص یا علیه یک مادهٔ خاص درون سرم از این روش استفاده می‌شود. مراحل آن به شرح ذیل است:

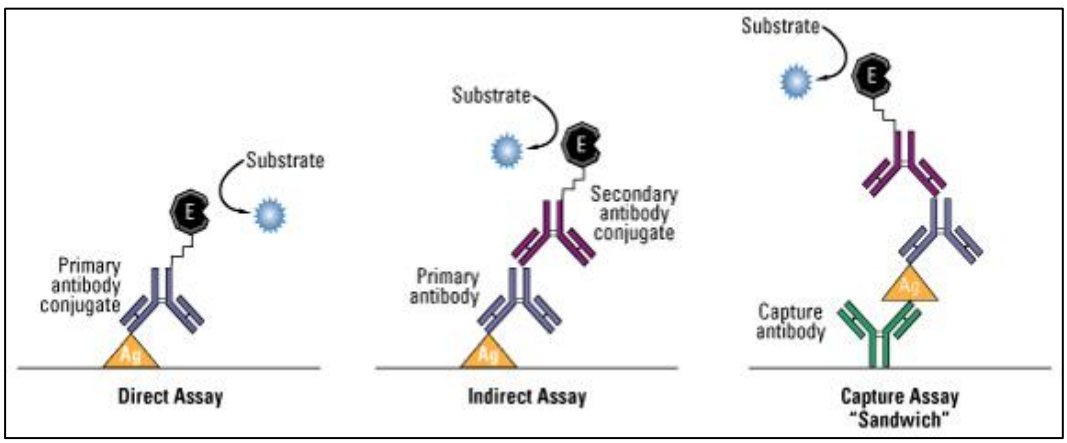
- **مرحلهٔ اول: پوشش‌دهی آنتی‌ژن**
- **مرحلهٔ دوم: شستشو**
- **مرحلهٔ سوم: افزودن آنتی‌بادی (علیه آنتی‌ژن پوشش داده شده) و گذراندن زمان انکوباسیون**
- **مرحلهٔ چهارم: شستشو**
- **مرحلهٔ پنجم: افزودن کونژوگه (آنتی‌بادی ثانویهٔ همراه با آنزیم علیه آنتی‌بادی اولیه) و گذراندن زمان انکوباسیون**
- **مرحلهٔ ششم: شستشو**
- **مرحلهٔ هفتم: افزودن سیستم رنگی**
- **مرحلهٔ هشتم: قرائت پلیت با الایزاریدر**







طرح کلی الایزای غیر مستقیم



مقایسه روشهای متداول الیزا با یکدیگر

روش و مراحل کار الایزای ساندویچ مستقیم (Double Antibody Sandwich or DAS-ELISA):

مراحل کار آزمون الایزای ساندویچ مستقیم به ترتیب ذیل می باشد:

۱–آماده سازی نمونه

۲– انتخاب چاهک و میزان حجم نمونه بافر

۳– پوشش دهی(Coating)

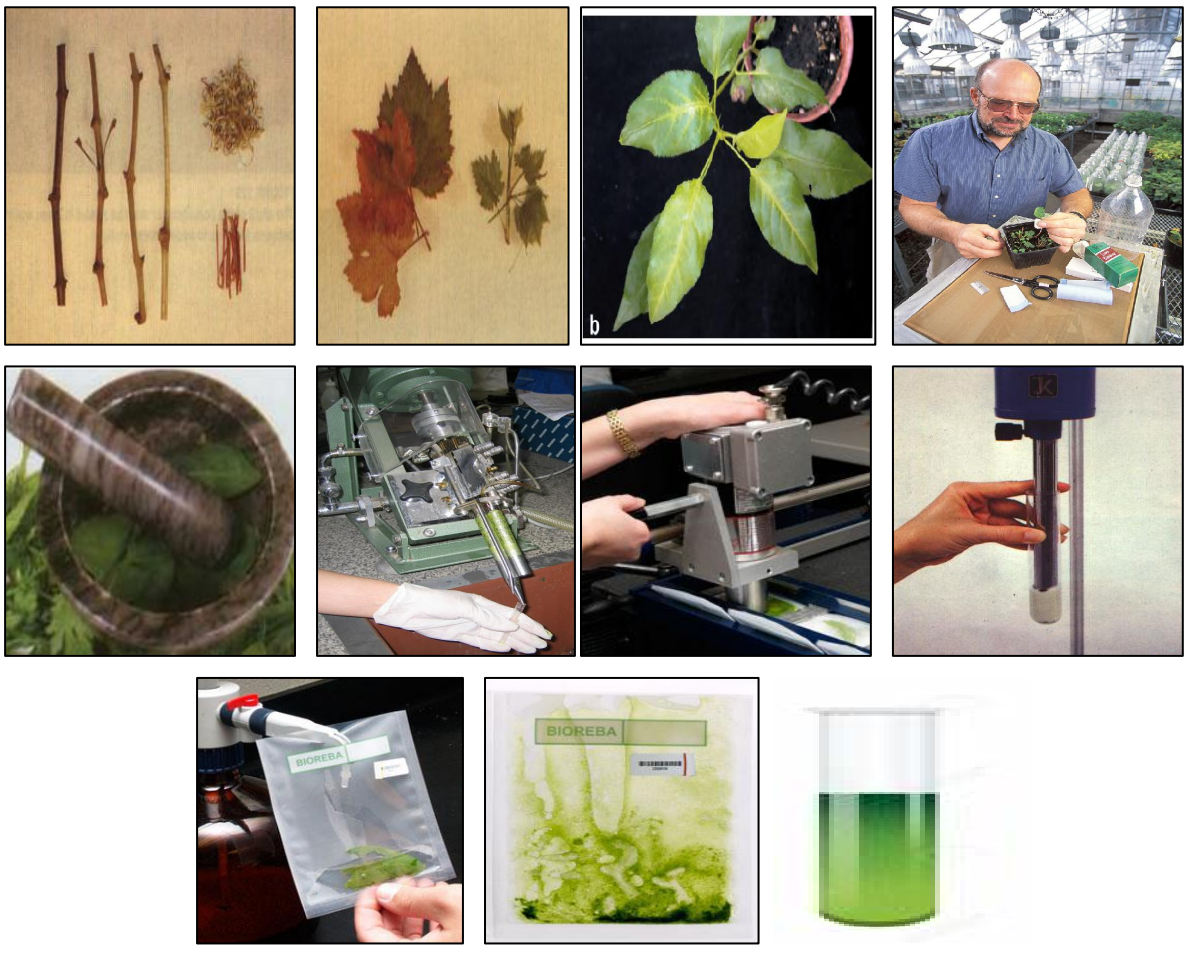
۴– افزودن آنتی ژن

۵– افزودن آنتی بادی اختصاصی نشاندار(کونژوگه) با آنزیم آلکالین فسفاتاز(IgG Conjugated)

۶– اضافه نمودن ماده سوبستراآنزیم جهت تشخیص واکنش دهنده ها

۱– آماده سازی نمونه:

برای انجام آزمونهای الایزا اولین گام تهیه عصاره گیاهی است. برای این کار، برگهایی را که به آنها مشکوک هستیم و حاوی ویروس مورد نظر است را به قطعات ریز تکه تکه کرده و رگبرگ اصلی همراه با ساقه ها و دمبرگ ها جدا شده و فقط از پهنک برگ استفاده می شود. سپس قطعات برگ درون هاون چینی یا کیسه پلاستیکی و یا لوله تیوب ریخته شده و بافر عصاره گیری به نسبت **یک دهم گرم** از بافت برگ به **یک میلی لیتر** بافر اضافه گردید و سپس عصاره گیری با روش له کردن در هاون چینی،کوبیدن و یا با دستگاه عصاره گیری انجام شده و به مقدار**۱۰۰ میکرو لیتر**ازعصاره را درچاهک ها می ریزیم. لازم به ذکر است که کلیه مراحل استخراج عصاره بایستی برروی یخ انجام شده و تیوپ های اپندورف بعد از پر کردن با عصاره در داخل یخ قرار داده شوند تا فعالیت آنزیم ها به حداقل کاهش یابد.



۲- انتخاب چاهک و میزان حجم نمونه بافر:

پلیت های الیزا **۹۶** خانه ای هستند که شامل **۱۲** ستون (**۱۲-۱**) وهشت ردیف (**A-H**) برای این منظور پس از مشخص کردن تعداد نمونه طبق فرمول ذیل تعداد چاهک ها را انتخاب می نمائیم:

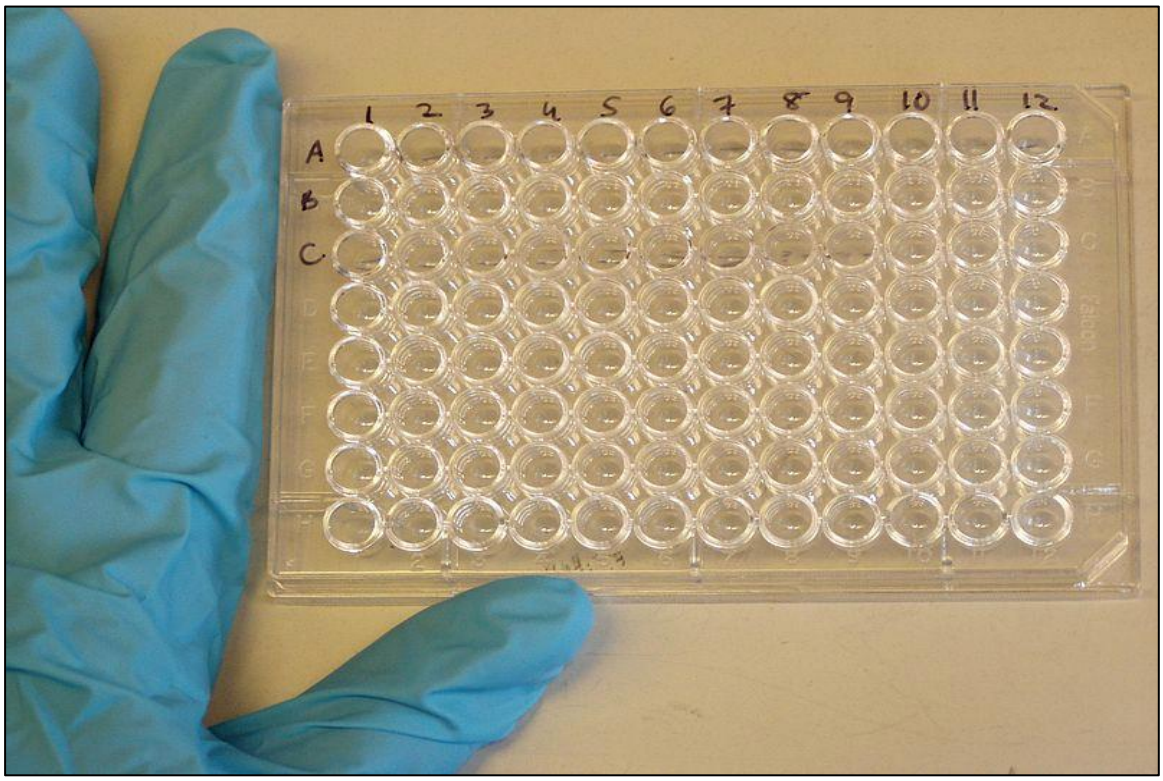
تعدا بافر(۶) +کنترل منفی (۲) +کنترل مثبت(۲) + ۲* تعداد نمونه = **تعداد چاهک**

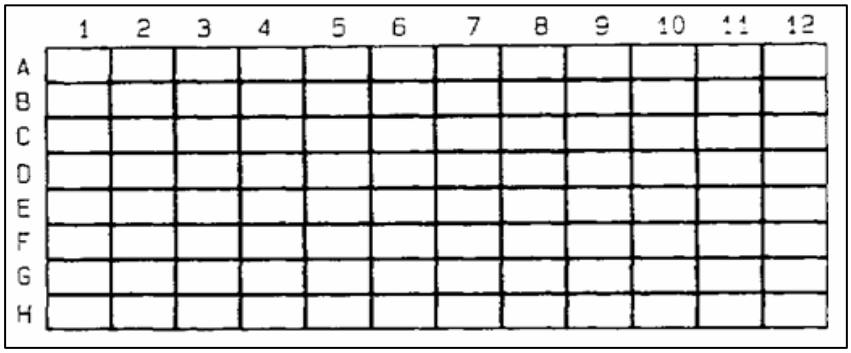
برای یک بررسی **۵۰** نمونه ای ما برای هر چاه **۱۰۰** میکرو لیتر و برای کل چاهک ها، محلول مورد نیاز برابر است با:

میکرو لیتر ۱۱۰۰ = ۱۰۰*۱۱= تعدا بافر(۶) + ک. منفی(۲)+ ک. مثبت(۲) + ۲*۵۰نمونه= **مقدار محلول**

طبق محاسبه انجام شده ما **۱۱۰۰ میکرو لیتر** محلول بافر نیاز داریم به دلیل خطای آزمایشی در طی آزمایش معمولا مقدار بافر مورد نیاز را کمی بیشتر از مقدار بافر محاسبه شده در نظر میگیریم(**۱۲۰۰** میکرو لیتر بافر تهیه میکنیم).

سپس بر اساس غلظت معین شده ۱:۱۰۰۰ یا ۱:۲۰۰ (غلظت تهیه شده توسط دو شرکت Bioreba و Agdia به ترتیب) IGg مورد نظر در این بافر حل می شود. بدین ترتیب ۱/۲ میکرولیتر IGg (غلظت معین شده ۱:۱۰۰۰) و ۶ میکرولیتر IGg (غلظت معین شده ۱:۲۰۰) را توسط سمپلر به بافر پوشش دهی انتقال داده و کاملا مخلوط می کنیم.

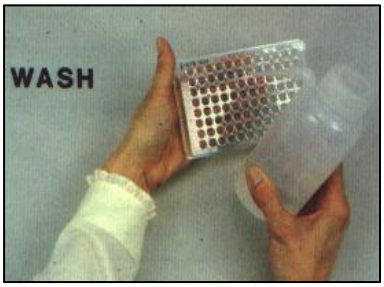


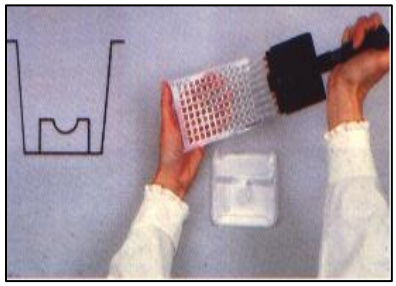


پس از آماده سازی نمونه و انتخاب نقشه آزمون سپس بقیه مراحل آزمون را به نرتیب ذیل انجام می دهیم:

۳- پوشش دهی(Coating):

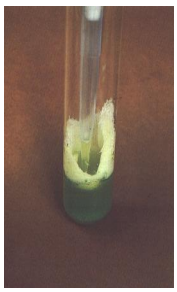
هدف این مرحله اتصال آنتی بادی اختصاصی به چاهک ها می باشد،مقدار **۱۰۰ میکرو لیتر** از محلول آنتی بادی مورد نظر را در چاهک ها ریخته و سپس درب پلیت را بسته و برای مدت **۳ ساعت** در دمای **۳۷ درجه سانتی گراد** در انکوباتور نگهداری می کنیم، پس از این مدت سه بار همرا با تکان دادن(Shake)پلیت ها را با بافر شستشو(Washing buffer) داده وکاملا تمیز میکنند(همچنین می توان شستشو را با دستگاه انجام داد).

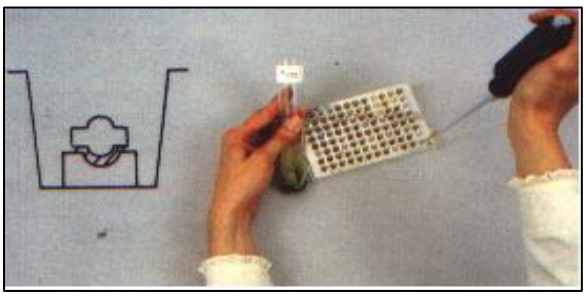




۴- افزودن آنتی ژن:

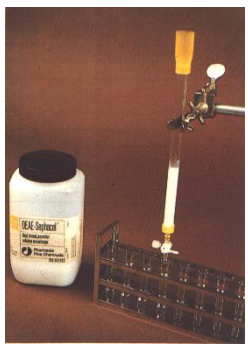
سپس طبق نقشه که در آن محل نمونه ها ی مورد نظر،کنترل مثبت و منفی و بافر ها مشخص شده اند، از عصاره نمونه ها به مقدار**۱۰۰ میکرو لیتر** در چاهک های مورد نظر ریخته و برای مدت **یک شب** (**Over night**) در دمای **۴ درجه سانتی گراد** نگهداری می کنیم، در روز بعد پلیت ها را خالی و شستشو میدهیم،دراین مرحله در صورت آلوده بودن نمونه بین آنتی بادی و آنتی ژن(عصاره گیاهی) اتصال برقرار میگردد.





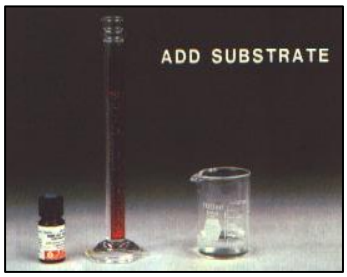
۵- افزودن آنتی بادی اختصاصی نشاندار(کونژوگه) با آنزیم آلکالین فسفاتاز(IgG Conjugated)

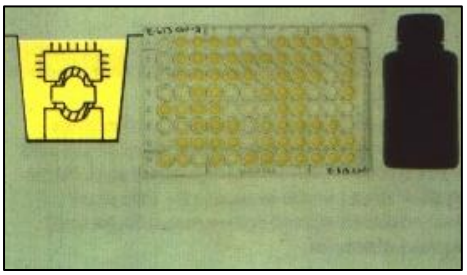
مشابه عمل پوشش دهی همان میزان محلول از IgG Conjugated مورد نظر را به چاهک ها اضافه کرده و برای مدت **۳ ساعت** در دمای **۳۷ درجه سانتی گراد** نگهداری و سپس سه بار شستشو می دهیم.

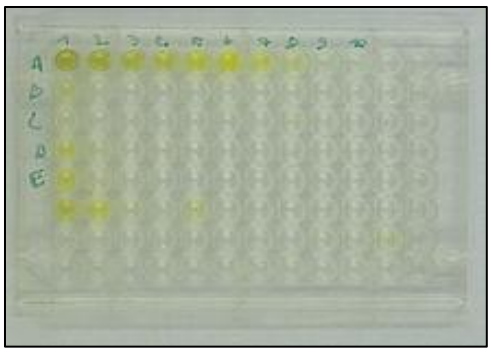


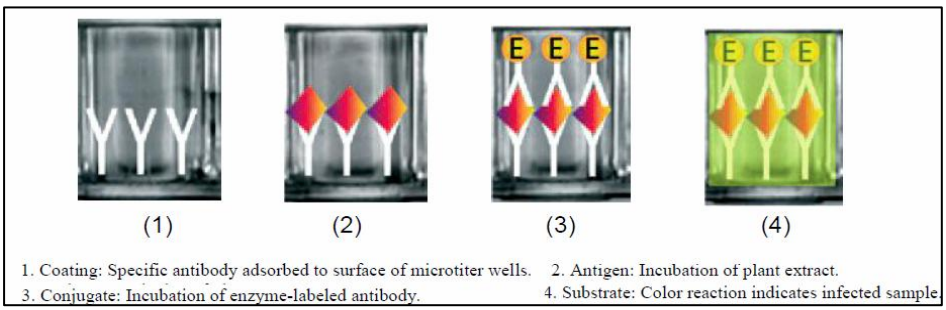
۶- اضافه نمودن ماده سوبسترا آنزیم جهت تشخیص واکنش دهنده ها:

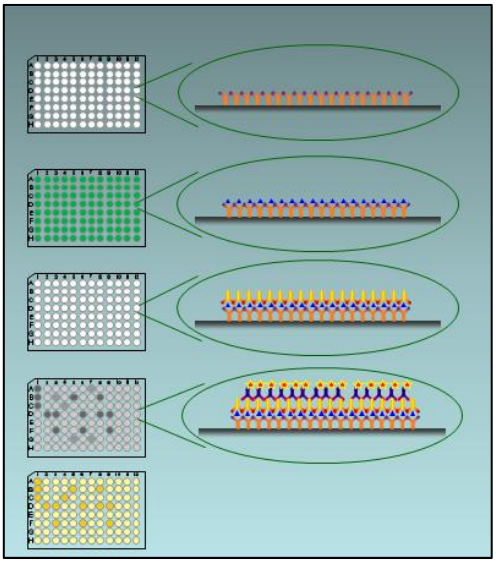
ماده سوبسترا بی رنگ بوده ودارای پارا نیتروفنیل فسفات است که آنزیم آلکالین فسفاتاز باعث تسریع در واکنش در آن شده و تغیر رنگ آن به سمت طیف زرد را باعث میشود، لذا با حضور ویروس و آنتی بادی نشاندار ایجاد یک ترکیب زردرنگ می نماید،ماده مذکور بصورت قرص دردسترس بوده و برای تهیه محلول آن **یک میلی گرم** از قرص را در **یک میلی لیتر** بافرسوبسترا(Substrate buffer) حل کرده ، وبه مقدار **۱۰۰ میکرو لیتر** به چاهک ها اضافه می نمائیم و برای مدت**۴۰- ۳۰** دقیقه در محل تاریک محیط اطاق قرار میدهیم.











فرمولاسیون بافرها:

تمامی بافرها بایستی در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شوند . این بافرها به مدت ۱ تا ۲ ماه پس از تهیه قابل استفاده هستند.

PBS: pH: 7.4: (for 1000 ml)

1.	NaCl	8g
2.	KCl	0.2g
3.	$Na_2HPO_4.12H_2O$	2.9g
4.	KH_2PO_4	0.2g
5.	dH_2O	
6.	NaN_3	0.2g

Washing buffer (PBST)

1.	Tween 20	0.5ml
2.	PBS	1 liter

Extraction buffer

1.	PVP	2%
2.	PBST	

Conjugate buffer

1.	PVP	2%
2.	Egg albumin	0.2%
3.	PBST	

Coating buffer (pH: 9.6): (for 1000 ml)

1.	Na_2CO_3	1.59g
2.	$NaHCO_3$	2.93g
3.	NaN_3	0.2g
4.	dH_2O	
5.	NaN_3	0.2g

Substrate buffer (pH: 9.8): (for 1000 ml)

1.	Diethanolamine	97ml
2.	dH_2O	
3.	NaN_3	0.2g

نقشه الیزا جهت استفاده در آزمون های مورد استفاده:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												

منابع:

- ایزدپناه، ک.، ارشاد، ج.، بنی‌هاشمی، ض. و شریفی‌تهرانی، ع. ۱۳۷۸. فرهنگ کشاورزی و منابع طبیعی، جلد دوم "بیماری‌شناسی گیاهی". انتشارات دانشگاه تهران. شماره ۹۳۷۰.
- فرزدافر،شیرین ،گلنراقی و پوررحیم ،۱۳۸۰ ،لیست ویروس های گیاهی ایران،انتشارات سمن، ۲۰۳ ص.
http://www.fao.org/documents/en S.M. Garnsey and M. Cambra, Enzyme-linked
/immunosorbent assay (ELISA),
http://www.bioreba.ch/files/Product_Info/ELISA_Reagents/ASPV_DAS_ELISA.pdf
http://www.ipm.msu.edu/diseases/apple_latent_viruses

mfaraji@ut.ac.ir