محمد علی محمدی، کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
مراد رستمی، کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

اصول عملکرد و کارایی الایزا ریدر

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

کاربرد میکروپلیت ریدر

میکروپلیت ریدر برای خواندن نتایج تست های الایزا مورد استفاده قرار می گیرد. این تکنیک کاربرد مستقیم در ایمونولوژی و سرولوژی دارد. از میان کاربردهای دیگر این وسیله به تایید حضور آنتی بادی ها یا آنتی ژن های یک عامل عفونی در یک ارگانیزم، آنتی بادی های یک واکسن یا

اتو آنتی بادی ها برای مثال در آرتریت روماتوئید می توان اشاره کرد.

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 می عمل می کنند. برخی از الایزا ریدرها در گستره ماوراء بنفش هم عمل کرده و قرائت را در محدوده ۳۴۰ تا ۷۰۰ نانومتر انجام می دهند. سیستم نوری موجود در این دستگاه ها با استفاده از فیبرهای نوری به منظور تامین نور جهت چاهک های حاوی نمونه در میکروپلیت 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 نمونه ها 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 پی پت های چند کاناله استفاده شود)

۴-انکوباتور

مراحل مکانیکی انجام تکنیک الایزا

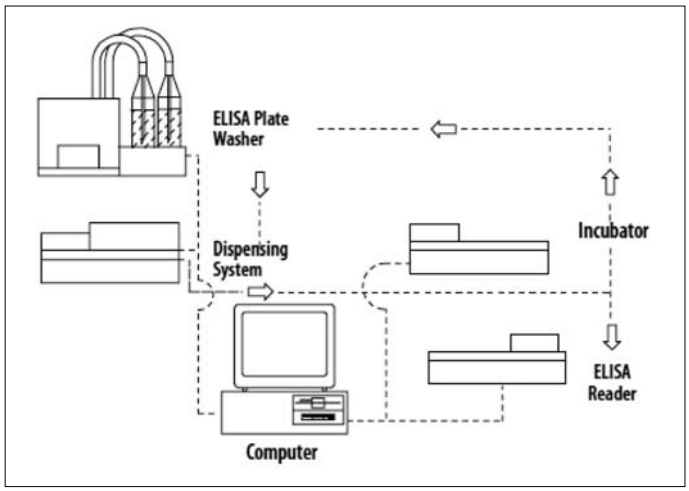
یک تست الیزا به طور رایج شامل مراحل زیر است:

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.

بسته به نوع تست، مراحل ۱، ۲ و ۳ ممکن است چندین بار تکرار شوند، تا



این که معرف های 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 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 مقدار آنتی ژن و 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 به وسیله 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.

نصب دستگاه

به منظور عملکرد صحیح الایزا ریدر، نکات زیر لازم است در زمان نصب 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 می شود، در حالی که در نواحی دیگر از جهان ۲۲۰ تا ۲۴۰ ولت و ۵۰ تا ۶۰ هرتز به کار برده می شود.

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 تفاوت هایی 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 می شود 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 روتین کارخانه سازنده دستگاه را برای کالیبراسیون دنبال کنید. تایید کنید که خطی بودن (linearity) خوانشگر تا حد امکان قابل قبول است.

۴- اگر دستگاه حاوی یک پلیت کالیبراسیون نیست، یک محلول رنگی را در چاهک های یک پلیت ریخته و فوری نتایج را قرائت کنید. سپس پلیت را به اندازه ۱۸۰ درجه چرخانده و دوباره قرائت را انجام 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 است. یک پلیت تمیز و خالی را در محل مخصوص قرار دهید و قرائت را انجام دهید. اگر اختلافی بین هر یک از خوانش های میانگین از اولین تا آخرین ستون وجود ندارد، می توان فرض را بر این گذاشت که خوانشگر کالیبر است.

حفظ و نگهداری رایج

● نگهداری اساسی (تکرار به صورت روزانه):

۱- بررسی اینکه سنسورهای نوری هر کانال تمیز هستند. چنانچه کثیف هستند، سطح پنجره های 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 است. وقتی کارهای روزانه شروع می شود، اجازه دهید تا خوانشگر برای مدت ۳۰ دقیقه گرم شود. در مرحله بعد، قرائت بلانک را انجام دهید و سپس یک پلیت کامل از سوبسترا را قرائت کنید. خوانش ها می بایست یکسان باشند. اگر این طور نبود، پلیت را چرخانده و قرائت را به منظور تعیین این که آیا اختلاف در پلیت یا در خوانشگر است، تکرار کنید.

۴- سیستم کشنده اتوماتیک اسلایدها (Automatic drawer sliding system) را بررسی کنید که باید نرم و ثابت باشد.

● نگهداری بازدارنده (تکرار هر سه ماه یکبار):

۱- پایداری لامپ را تایید کنید. پلیت کالیبراسیون را به کار برده، قرائت را با فاصله ۳۰ دقیقه مجددا با همان پلیت انجام دهید. قرائت ها را مقایسه کنید که هیچ تفاوتی نباید میان آن ها مشاهده شود.

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

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

۴- مکان قرارگیری هر چاهک را با استفاده از سیستم های انتشار نور و آشکار کننده تایید کنید.

منابع

[1] WHO. Maintenance manual for laboratory equipment. 2008. 2nd Edition.

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

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