

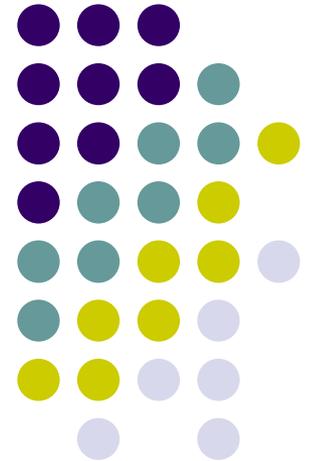
Always End the
Day With a
Positive Thought.

No Matter How Hard
Things Were,
Tomorrow's a Fresh
Opportunity to Make
it Better.

ELISA

Enzyme Linked Immunosorbent
Assay

المقايضة الامتصاصية المناعية للأنزيم
المرتبط

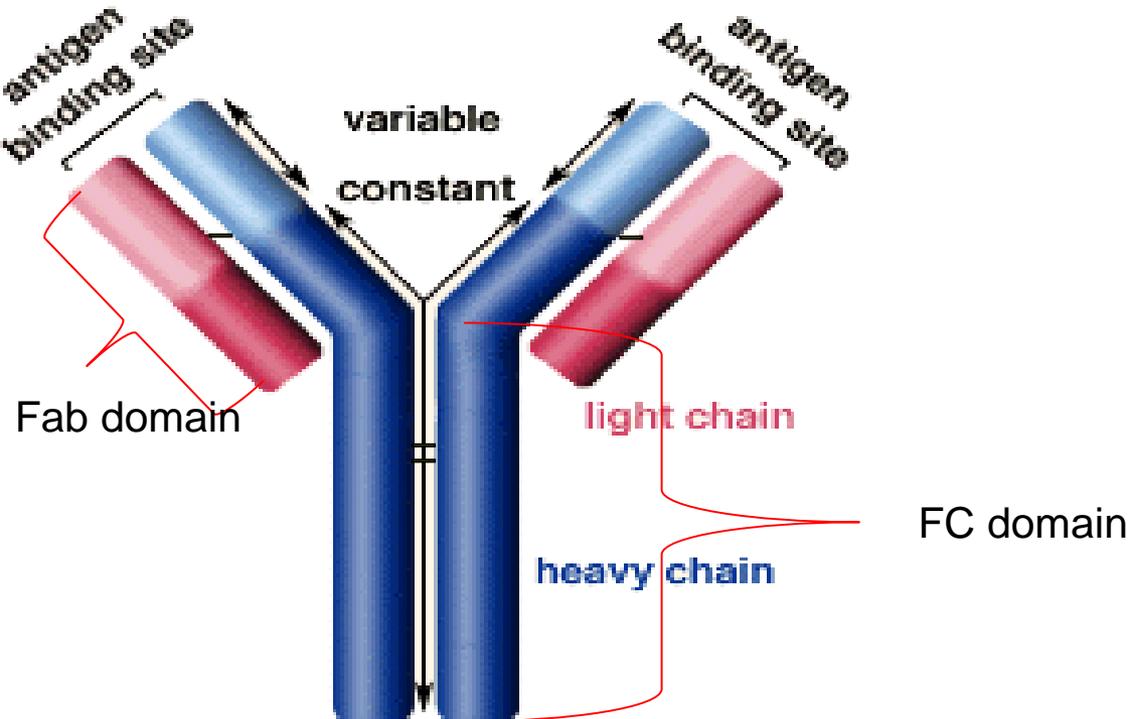


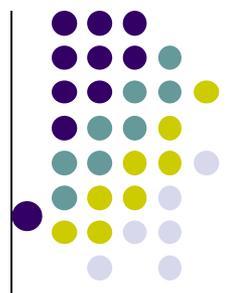


تعريفات عامة

ما هي الأجسام المضادة **Antibody**

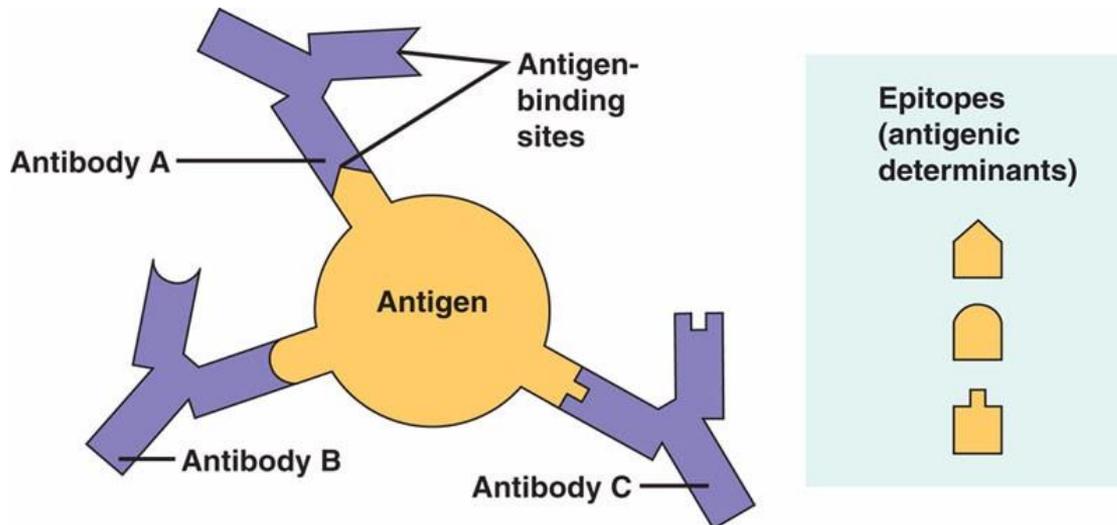
هي بروتينات غلوبولينية مناعية (Ig) تأخذ شكل حرف Y تظهر في الدم والسوائل الأخرى عند الإنسان . تنتجها الخلايا البلازمية.





يتم تصنيع الأجسام المضادة Antibodies في حال التعرض لأجسام غريبة Antigens وتكون هذه الأجسام المضادة ذات تخصصية والفة Specific Affinity للأجسام الغريبة التي أثارت تصنيعها.

- تتعرف الأجسام المضادة على جزء محدد من المستضد يدعى antigenic determinant or epitope





تعريفات عامة

Antigen ●

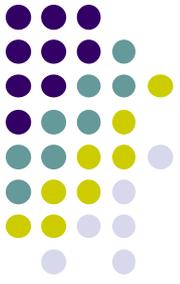
المستضد هو جزيء يمتلك القدرة على إثارة الجهاز المناعي للجسم وبالتحديد إثارة الأجسام المضادة .

يكون Antigen إما:

● موجود في الجسم بشكل طبيعي مثل الهرمونات. مثال: هرمون HCG الذي يفرز من خلايا المشيمة بشكل طبيعي أثناء الحمل

● يتم تصنيعه في الجسم في حالات مرضية مثال: هرمون HCG يمكن إفرازه في بعض أنواع السرطانات حتى عند الرجال. أو قد يكون بروتين لفيروس أو لبكتيريا

المقايسة المناعية Immunoassay



هي اختبارات بيوكيميائية لقياس مستوى مادة معينة **Analyte** في السائل الحيوي (مصل, بول, لعاب, دموع) بواسطة ارتباط **Antigen** مع **Antibody** المخصص له.

Analyte

هي المادة البيوكيميائية التي يتم قياسها وفي المقايسة المناعية يكون **Analyte** إما **Antibody** أو **antigen**

طرق تصنيع الأجسام المضادة الخاصة بالتحاليل المناعية



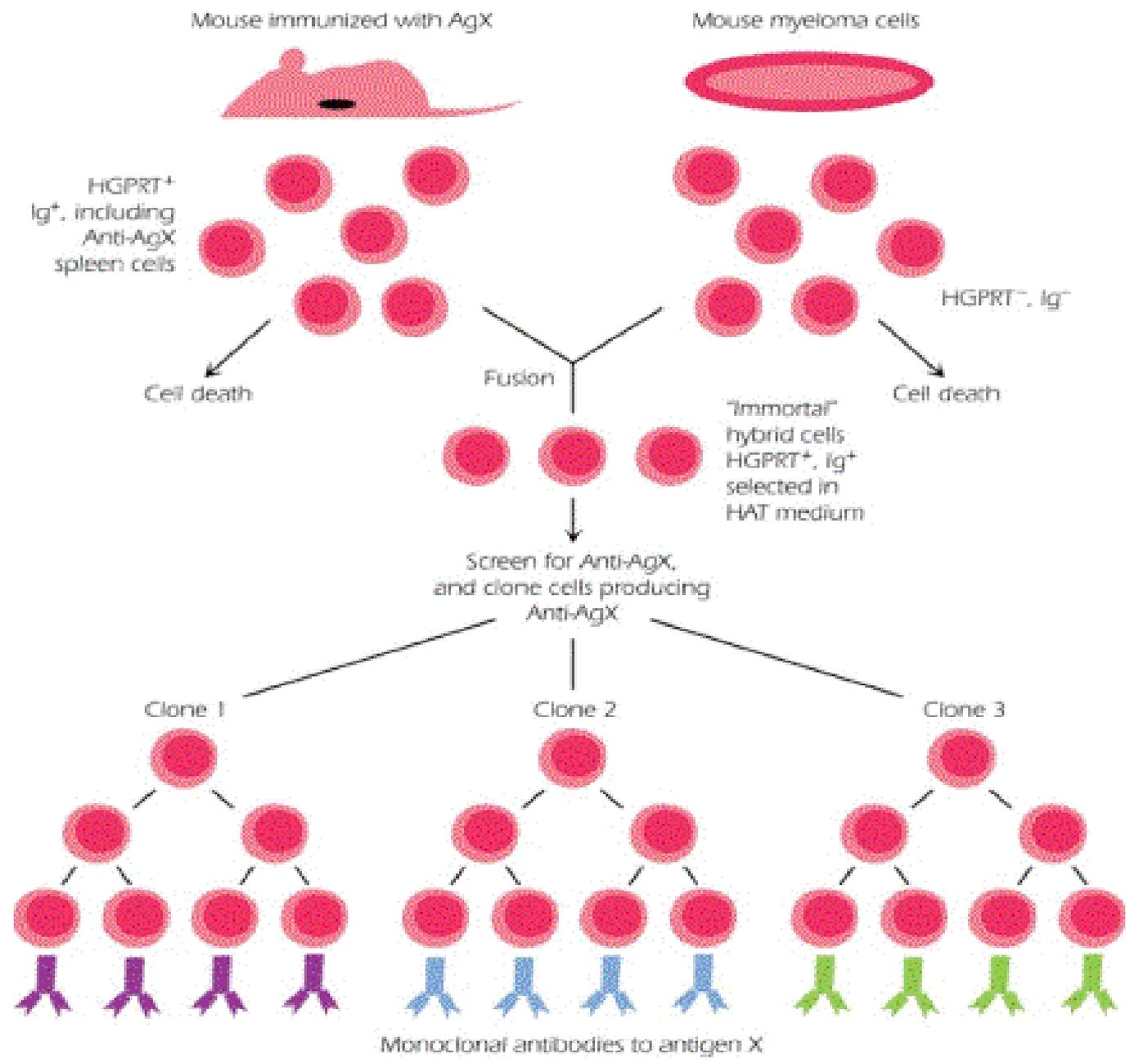
هناك أكثر من طريقة لتصنيع الأجسام المضادة و أحد أكثر هذه الطرق شيوعا لتصنيع Antibody مخصص لجسم ما (Antigen) هو حقن هذا الجسم لحيوان وبعد ذلك يتم استخلاص Antibody المطلوب من سيرم هذا الحيوان.

ولكن هذا Antibody يسمى polyclonal متعدد النسيلات لأنه ناتج تصنيع عدة خلايا.

تابع- طرق تصنيع الأجسام المضادة الخاصة بالتحاليل المناعية



هناك طريقة لتصنيع Antibody أكثر تخصصا
monoclonal Antibody وحيد النسيلات وهو ناتج
تصنيع مجموعة خلايا متماثلة تماما cell line ونحصل
على هذه الخلايا بدمج خلية مصنعة للجسم المضاد مع خلية
سرطانية لها القدرة على الانقسام إلى ما لا نهاية.





ما هي تقنية ELISA

هذه التقنية تستخدم لقياس تركيز مادة جزيئية مثل الهرمونات والعقاقير والأجسام المضادة وبروتين لجرثوم معين في السائل الحيوي كالمصل .

هذه المادة الجزيئية تقاس عن طريق معرفة كمية الأجسام المضادة Antibody التي ارتبطت ب Antigen.

تقنية ELISA



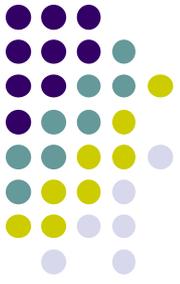
تنقسم إلى:

1- قياسات مناعية تنافسية Competitive ELISA

2- قياسات مناعية غير تنافسية Sandwich ELISA
وتسمى أيضا قياسات مناعية مباشرة Direct ELISA

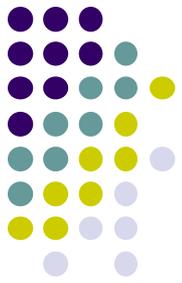
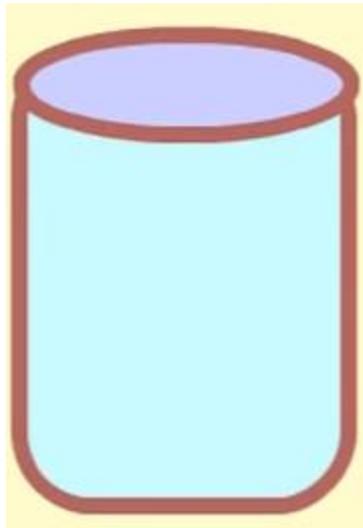
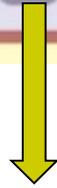
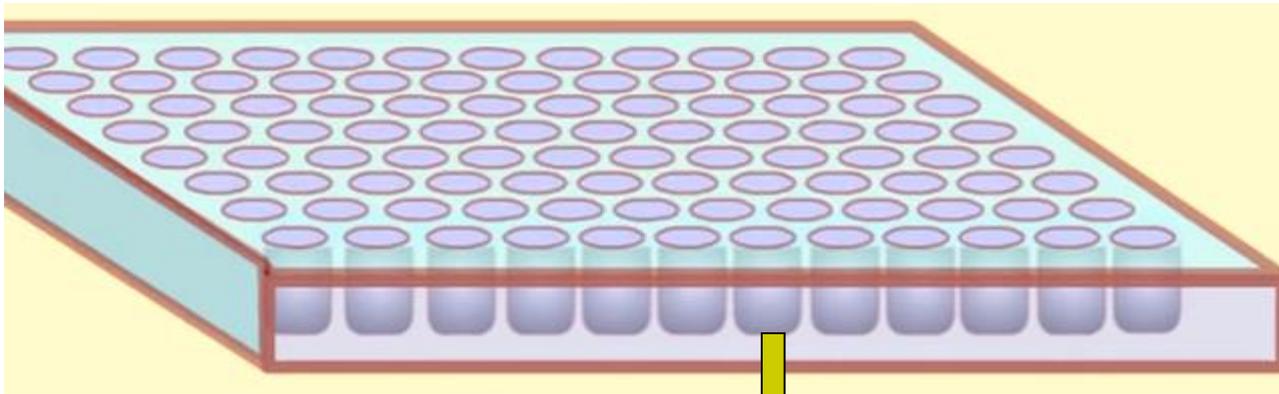
3- قياسات مناعية غير مباشرة Indirect ELISA

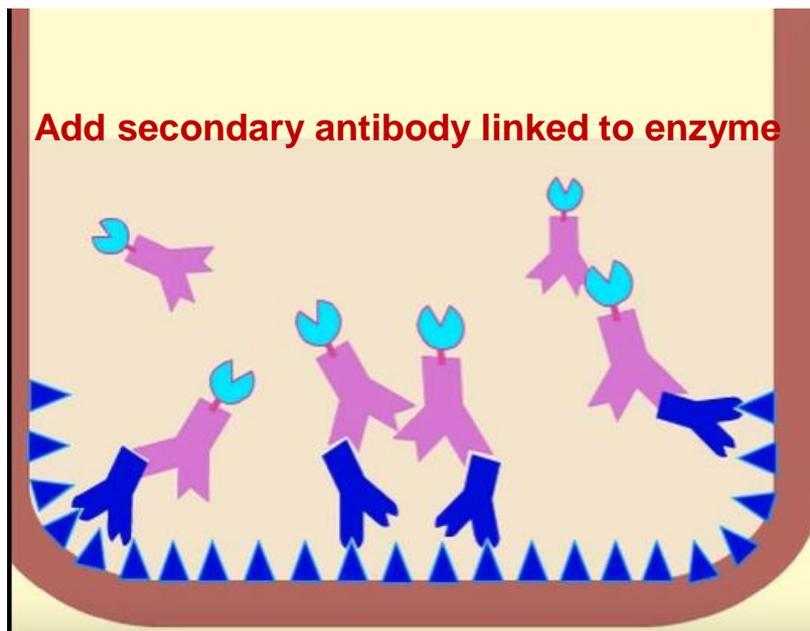
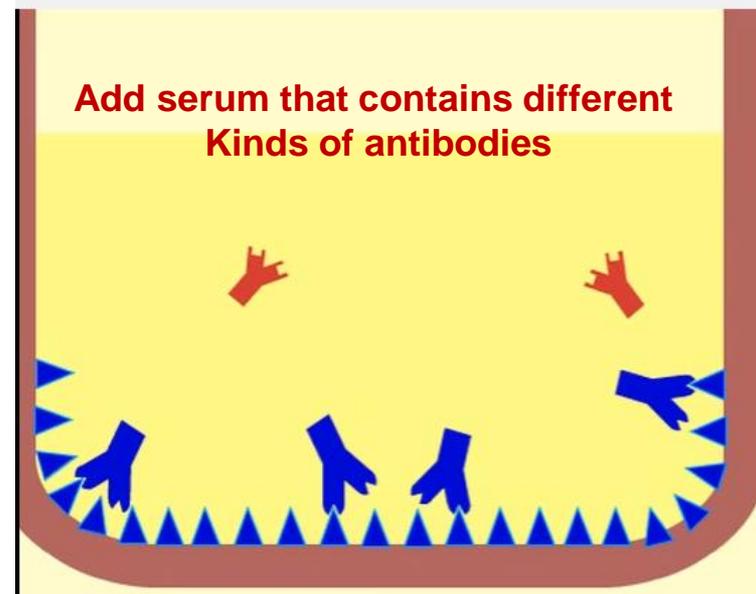
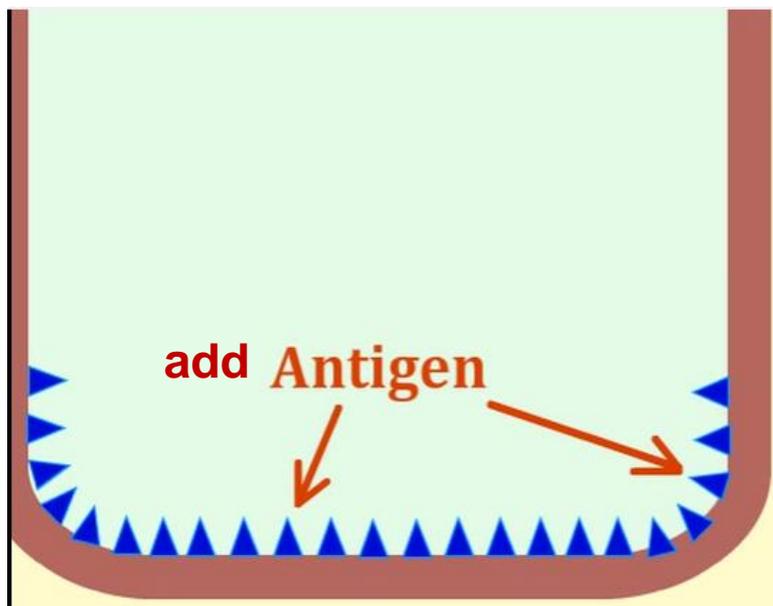
Indirect ELISA



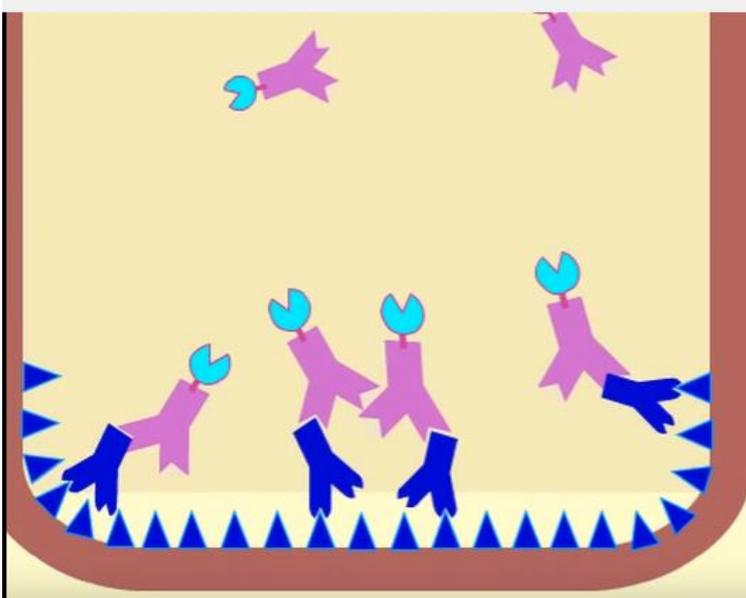
عندما يكون المطلوب الكشف عن Antibody وقياس تركيزه في العينة ففي هذه الحالة:

- 1- يضاف Antigen المخصوص لطبق الاليزا ويترك فترة حتى يلتصق.
- 2- يضاف المصل المحتوي على أنواع مختلفة من Antibody تسمى primary Antibody.
- 3- يرتبط Antibody في المصل مع Antigen الموجود في الطبقة .
- 4- يتم غسل الطبقة لإزالة Antibody غير المرتبط.
- 5- يضاف Antibody آخر مرتبط بإنزيم Secondary Antibody وهذا يمكنه الارتباط فقط في حال ارتباط Primary Antibody بالعينة الموجودة في الطبقة.
- 6- يتم غسل الطبقة لإزالة Antibody غير المرتبط.
- 7- تضاف المادة الأساس للإنزيم ويتم حساب كمية Antibody عن طريق قياس كمية ناتج التفاعل.

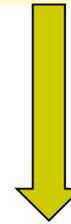




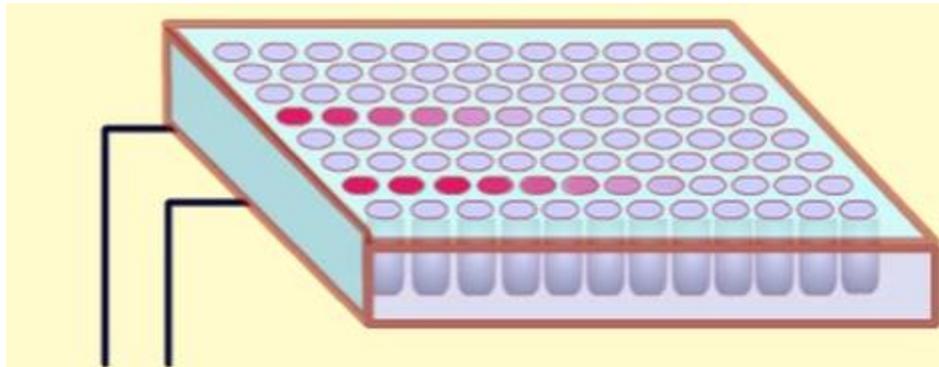
Wash to remove non bound antibodies



Add substrate that can link to enzymes



The color will be changed as substrate linked to enzymes

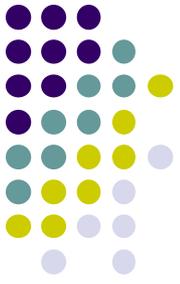


**Patients
with positive
ELISA tests**



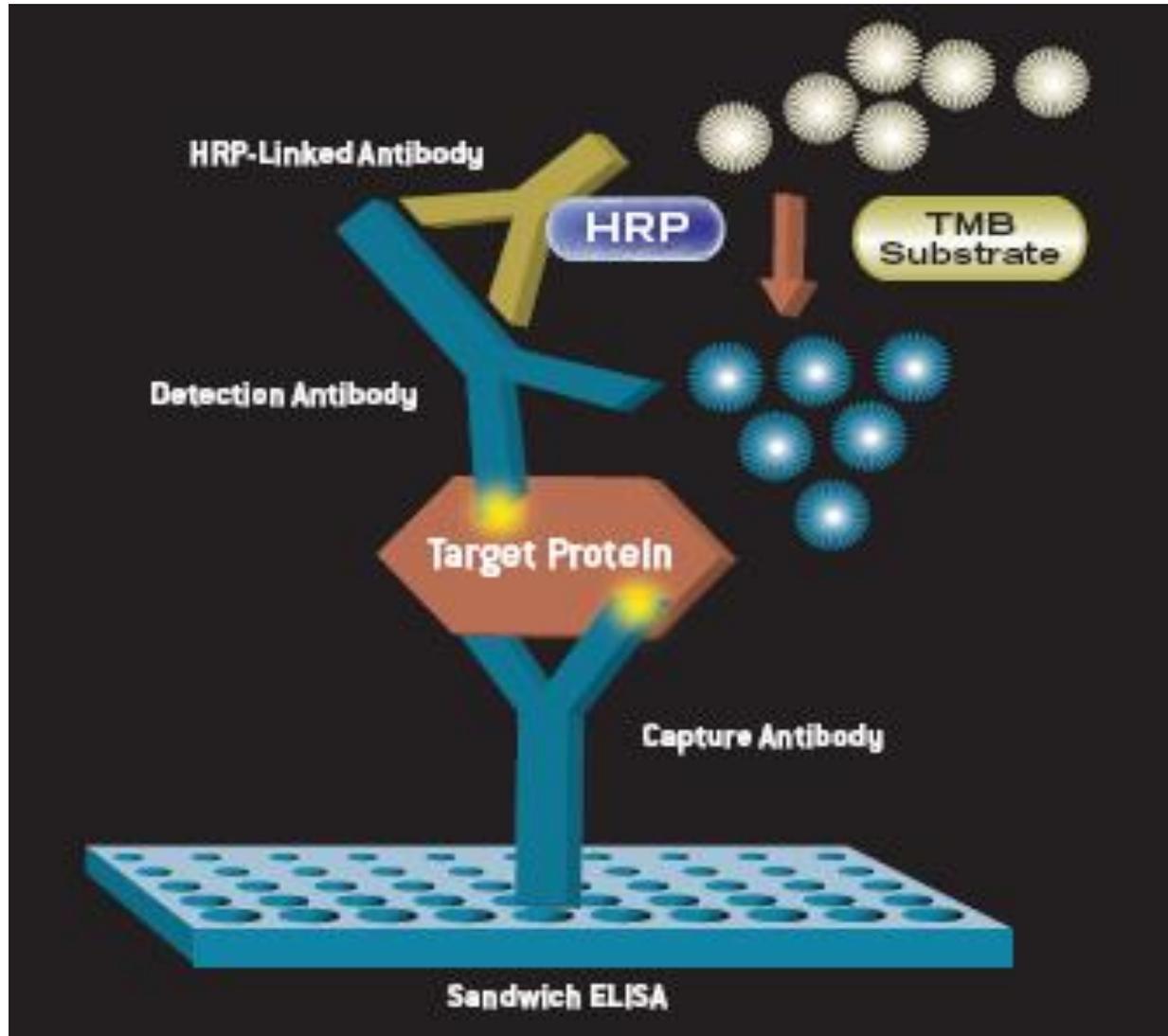
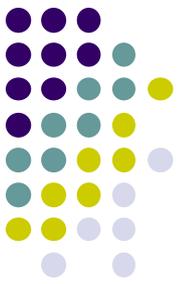
Detection and analysis will be done by a spectrophotometer

Sandwich ELISA (Direct)



1. يكون المطلوب الكشف عن Antigen وقياس تركيزه في العينة فيكون طبق الاليزا مغطى بالجسم المضاد Antibody .
- 2- يرتبط Antigen في العينة مع الجسم المضاد .
- 3- يتم غسل الطبق لإزالة الأجسام المضادة غير المرتبطة .
- 4-وبعد ذلك تتم إضافة أجسام مضادة أخرى وتكون هذه الأجسام المضادة مرتبطة بإنزيم .
- 5- يتم غسل الطبق أيضا لإزالة الأجسام المضادة غير المرتبطة.
- 6- ثم تضاف المادة الأساس للإنزيم ويتم حساب كمية Antigen عن طريق قياس كمية ناتج التفاعل.

Sandwich ELISA- Cont





مثال على طريقة عمل ELISA

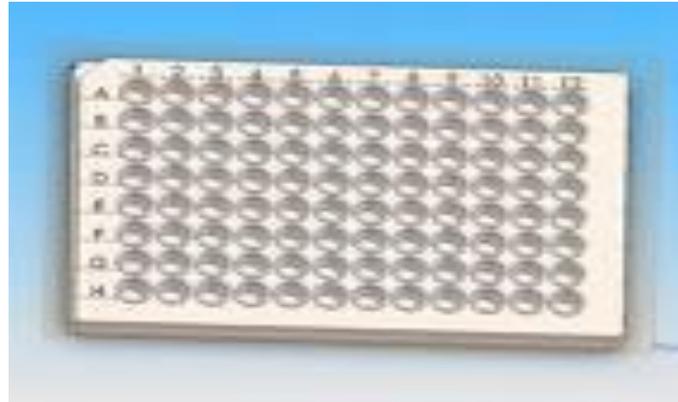
قبل الشروع في العمل يجب قراءة التعليمات بدقة شديدة لأن أي خطأ قد يؤدي الى فساد التجربة وخسارة قيمة **Kit** وهي مكلفة جدا

نستخدم **Kit** (مجموعة المحاليل المستخدمة في التحاليل المناعية) حيث أن لكل جسم مطلوب الكشف عنه **Kit** مخصوص.

تابع- مثال على طريقة عمل ELISA

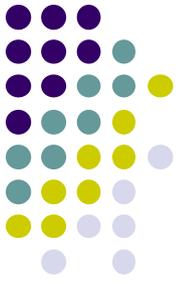


- 1- يتم ترقيم الطبق الخاص المكون من 96 خانة (wells) بدقة وتستخدم الخانات الأولى لرسم المنحنى القياسي Standard curve .



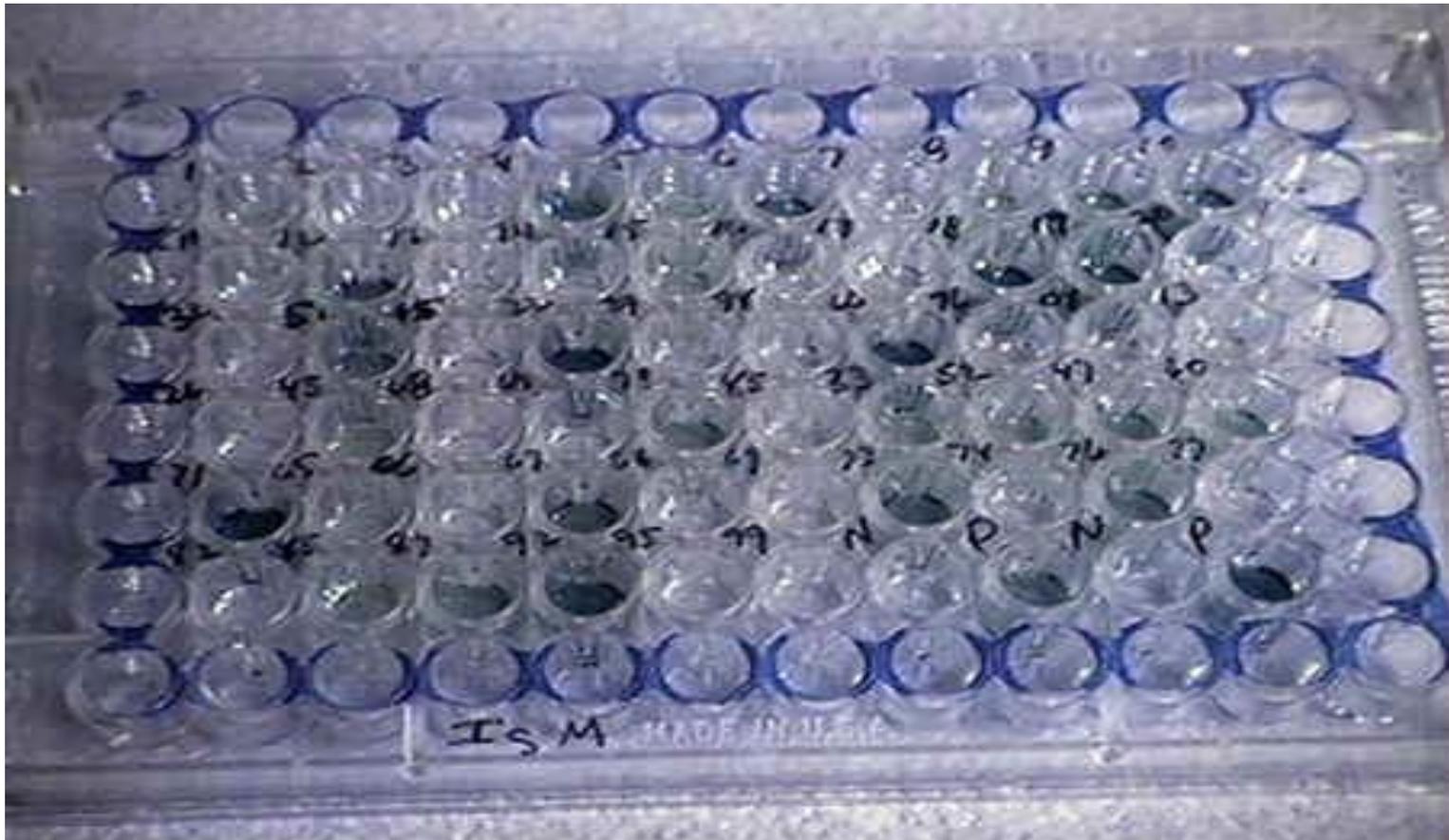
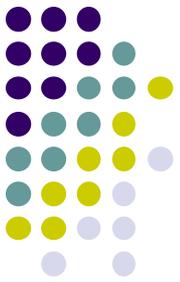
تابع- مثال على طريقة عمل

ELISA



2- ثم يتم وضع العينة المراد فحصها في الطبق ويفضل تكرار كل عينة مرتين أو ثلاث مرات Duplicate or Triplicate وبعد ظهور النتائج يؤخذ المتوسط.

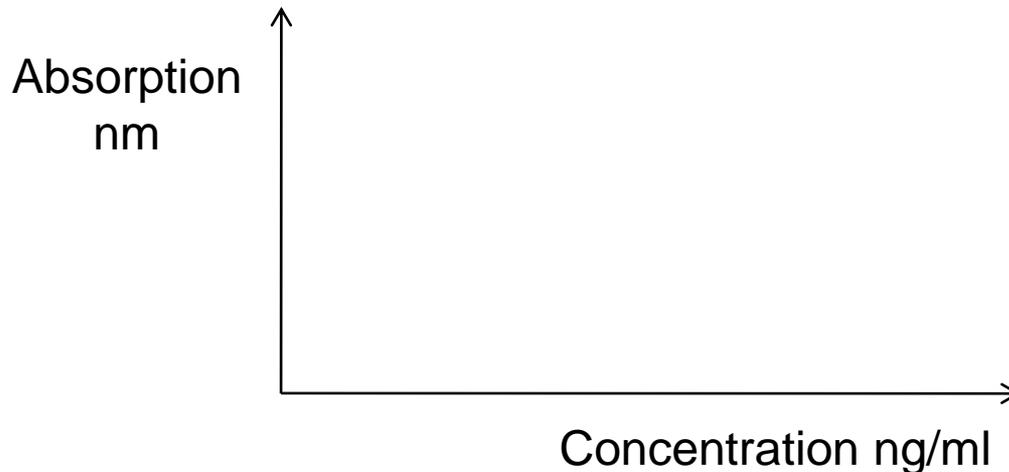
3- تستخدم عينة ضابطة Quality control sample وهذه العينة تأتي مع Kit (مجموعة المحاليل) وهي ذات تركيز محدد من قبل الشركة المصنعة وتعامل تماما مثل العينة المفحوصة.



النتائج



- بعد قراءة نتائج الإمتصاص في جهاز قارئ الاليزا نقوم برسم المنحنى القياسي على ورق الرسم البياني بحيث نستخدم المحور السيني x-axis للتركيز concentration والمحور الصادي y-axis للإمتصاص Absorption .
- نقوم بتحديد تركيزات المحاليل القياسية standards على المنحنى السيني x-axis ثم نحدد قراءة كل محلول قياسي على المنحنى الصادي y-axis ونرسم المنحنى القياسي.
- ونستفيد من المحلول المعياري للتأكد ما إذا كان التركيز الناتج في الاليزا هو نفس التركيز الذي ذكرته الشركة لنستطيع تقييم عملنا.



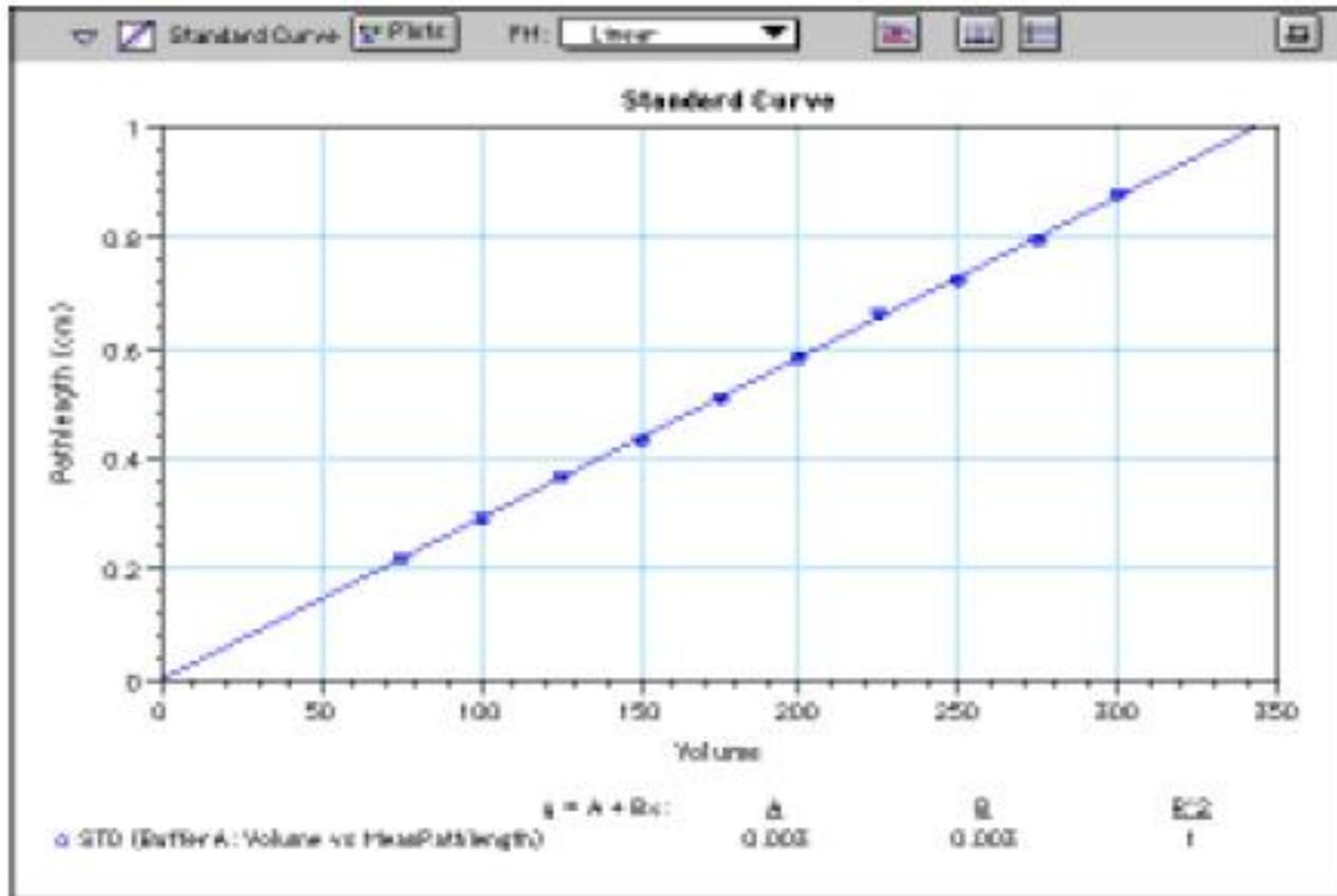
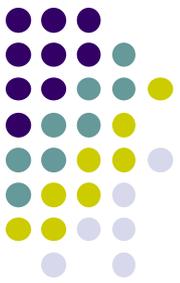
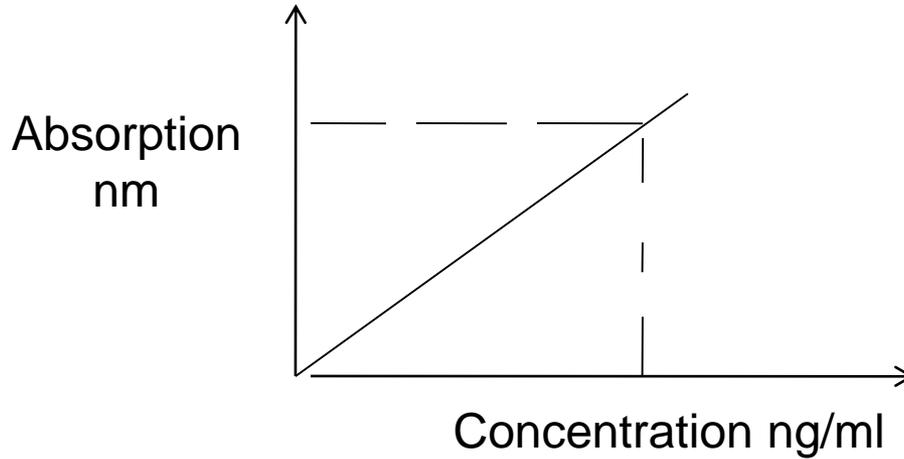


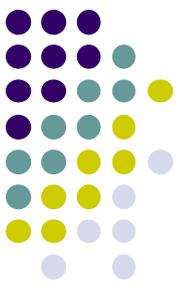
Figure 8: The calibration curve relating well volume to pathlength

تابع-النتائج



- يستخدم هذا المنحنى لقياس تركيز كل عينة بحيث نأتي عند قراءة الإمتصاص على المحور الصادي ونحدد النقطة المقابلة لها على المنحنى وبعد ذلك نحدد التركيز على المنحنى السيني.





APPLICATIONS OF ELISA

- **Serum Antibody Concentrations**
- **Detecting potential food allergens**
 - (milk, peanuts, walnuts, almonds and eggs)
- **Disease outbreaks- tracking the spread of disease**
 - e.g. HIV, bird flu, common, colds, cholera, STD etc
- **Detections of antigens**
 - e.g. pregnancy hormones, drug allergen, GMO, mad cow disease
- **Detection of antibodies in blood sample for past exposure to disease**
 - e.g. Lyme Disease, trichinosis, HIV, bird flu