انواع روشهایElisa

1- **روش رقابتی**: دوAb برای اتصال به یک Ag واحد رقابت دارند و OD نسبت عکس با ماده مورد نظر دارد.

2- **روش غیررقابتی**:

1) **روش ساندویچی (2 مرحله ای)** : روش بسیار حساسی است.

2) **روش یک مرحله ای** : Ab روی فاز جامد + Ag سرم بیمار + Ab نشاندار کمپلکسAb-Ag-Ab بعد از شستشو با کروموژن واکنش رنگی میدهد.

Solid phase(plate) :

1- پلی وینیل کلراید نمی شکند، خم می شود. سطح آن صاف و گرد است.

2- پلی استرن نمی شکند، خم نمی شود. سطح آن صاف است.

حجم سطح صاف=300میکرو لیتر و حجم سطح گرد= 200 میکرو لیتر

خطای Carry Over :

در الیزا حجم مورد نیازی که به داخل ول ها ریخته می شود یا تخلیه می شود باید حداکثر 200 λ باشد تا امکان ریزش به ول کناری وجود نداشته باشد. ومینیسک باید یکنواخت باشد.

پدیدهStacking یاLagering :

در عمل Coating پلیتهای الیزا اگر از پروتئینهایی با غلظت بالا یا ناخالص استفاده شود ممکن است پروتئینهاروی هم سوار شده و میزان Ab کمتری امکان اتصال پیدا کند و در نتیجه جواب منفی کاذب گرفته

شود. حتی اگر Ag کد شود باید کلاف پروتئینهای Ag باز باشد تااپی توپ های Ag برای اتصال بیرون و مشخص باشند.

پدیده Coating برگشت پذیر می باشد.

پدیده Leaching :

در درست استفاده نکردن از میکروپلیتدر عمل شستشو و عمل Taping بوجود می آید و باعث کاهش OD خوانده شده می شود. نور، گرما، سرما، تاریکی، رطوبت همگی در یک کیت الیزا برای plate آن تثبیت شده است و تغییر ناگهانی هر یک از این عوامل از ویژگی plate می کاهد مثلاً استفاده چندین بار از یک کیت که مرتباًآنرا داخل یخچال بگذاریم و برداریم و اگر میکروپلیت کاملاً استفاده نشود باید حتما در پاکت آلومینیومی قرار داده شود و عاری از نور و منفذ باشد. در مورد شستشو تعداددفعات آن فرقی ندارد ولی PH محلول Buffer Wash بسیار مهم است و باید دقت شود. همچنین عمل Taping باید استاندارد باشد.

پدیده اثر حاشیه ای یا edge effect : (ول هایی که در حاشیه هستندOD کمتری نسبت به ول های مرکزی دارند)

هر ولی از یک طرف یا دو طرف آن بسته است و میزان گرمایی که به آنها می رسد، متفاوت است.

راه حل: دما و شرایط انکوباسیون استاندارد باشد. از انکوباتور مخصوص میکروپلیت استفاده شود نه انکوباتور سرولوژی، معمولاً انکوباسیون با حرکت ,اثر حاشیه ای را کم می کند Orbital moution shaker که حرکت آن در همه جهات)مثل 8انگلیسی) است. برای دمای اتاق 25-18^{o}باید جای ثابتی با شد بدون جریان هوا و تغییرات دما کاملاً کنترل شود.

edge effect در عمل پدیده Coating هم اثر دارد مثلاً ممکن است wellهای حاشیه ای زودتر از well های وسطی کد شوند .

پدیدهStacking :

اگر تعداد plate هایی که در انکوباتور قرار می دهیم زیاد باشد، باید طوری قرار بگیرند که هوا بین آنها جریان داشته باشد.

موادی که در الیزا استفاده می شود:

1) **آنزیم**Horseradish peroxidase HRP : منشاء گیاهی دارد و ارزان است. از ترب سیاه گرفته می شود و بسیار به روش کالی متری حساس است. سوبسترای آن H2o2 می باشد و کروموژن آن سرطانزا و به نور حساس است.

انواع کروموژن: 1- تترا متیل بنزیدین(TMB)

2-ا فنیل دیامین(OPD)

2) **آنزیم آلکالن فسفاتاز**: از روده گوساله گرفته می شود با بافرتریس انجام می شود (پایدارتر ولی گران تر است) و سوبسترای آن پارانیتروفنیل فسفات است و Stop آن محلول بی کربنات می باشد.

انواع شستشو:

1-شستشو با دستگاه

2-**شستشوی دستی:**استفاده از سرنگ-پیپت-پیپتور غلط است و باید حتما از سمپلر چند کاناله استفاده شود و نباید wash buffer با فشار ریخته شود و یا ایجاد حباب کندچون حباب مانع اتصال مولکولها میشود.

3)Tap Water : شستشو با شیر اب است.

4)Sooking Time : یعنی بعد از ریختن wash بین 1 تا 5 دقیقه بماند و بعد تخلیه شود . در این صورت میتوان در صورت نیاز تعداد دفعات شستشو را کم کرد.

5) **عمل** Dipping : یعنی کل Plate داخل کاسه آب قرار گیرد.

انکوباسیون:

1- **روش ساکن** Stationary incubation باید مراقب Stacking و effect edge باشیم زیرا متغیرهای محیط زیاد است.

2- **روش چرخشی** Roatating incubation اثرات Stacking و edgo effect کمتر شده و زمان نیز کم می شود و صحیح تر است.

دما:

1. 37^{o}_{C}

2. 18-25º(room Temperature)

شرایط دماباید ثابت و بدون جریان هواباشد داخل کشوبا دمای ثابت مناسب است.نور آفتاب به آن نخورد و استفاده از انکوباتور سرولوژی 25^{o} نیز مناسب است.

3. $4\ ^{o}_{C}$ زیاد مناسب نیست چون یخچال رطوبت دارد .

تست Micro plate Test:

پلیت خالی داخل دستگاه گذاشته و OD همه خانه ها خوانده شود. اختلاف آنها نباید بیشتر از ±0/01 باشد در اینصورت اشکال از دتکتور دستگاه می باشد.

پدیده Shear effect یا قیچی کردن:

اگر سرم در فریزر 4- باشد، چون بتدریج یخ می زند آب سرم نیز یخ می زند و ایجاد کریستال می کند که در زمان ذوب شدن به پروتئینهای Ab آسیب می رساند و آنها را در اصطلاح قیچی می کند، بنابراین بهتراست برای نگهداری مدت طولانی در ^{o} 20- فریز کنیم.

گذاشتن کاور روی plate در زمان انکوباسیون جلوگیری از تبخیر محتویات ول ها در حین آزمایش می کند.

منبع : سایت علوم آزمایشگاهی Lab-scincse