

کلینیک



آزمون الیزا (ELISA)

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

مهندس رضا پور مهدی علمدارلو
کارشناس مرکز تحقیقات کاربردی
شرکت توسعه کشت دانه های روغنی



۲. در مرحله دوم $200 \mu\text{l}$ از عصاره نمونه های گیاهی مشکوک که در بافر عصاره گیری استخراج شده به چاهک ها اضافه شده و روی پلیت با پارافیلیم پوشانده شده و به مدت یک شب در داخل یخچال با دمای 4 تا 6 درجه سانتی گراد نگهداری می شود. سپس پلیت را از یخچال خارج نموده و مانند مرحله قبل شستشو با بافر تکرار می شود.

۳. در مرحله سوم آنتی بادی متصل شده به آنزیم (IgG-Conjugate) در بافر مربوطه رقیق شده و $200 \mu\text{l}$ از آن به چاهک ها اضافه می شود. روی پلیت پوشانده شده و به مدت 5 ساعت در انکوباتور با دمای 30 درجه سانتی گراد قرار داده می شود و سپس عمل شستشو تکرار می شود.

۴. در مرحله چهارم ماده سوبسترا (پارانیتره فنیل فسفات) در بافر سوبسترا حل شده و $200 \mu\text{l}$ از آن به چاهک ها اضافه می شود. سپس پلیت در دمای اتاق (20 تا 25 درجه سانتی گراد) نگهداری می شود. پس از 30 تا 120 دقیقه واکنش تغییر رنگ در چاهک ها مشاهده و وضعیت آلودگی به ویروس در نمونه ها مشخص می شود.

آزمون الیزا یکی از روشهای سرولوژیکی تشخیص آزمایشگاهی می باشد که بر اساس واکنش آنتی بادی با آنتی ژن صورت می گیرد و از دقت و حساسیت بالایی برخوردار بوده و کاربردهای زیادی در پزشکی، داروسازی، بیماری شناسی گیاهی و ... دارد. آزمون الیزا به روشهای مختلفی انجام می گیرد که یکی از رایج ترین آنها ساندویچ دو طرفه (Double Antibody Sandwich ELISA) DAS-ELISA می باشد که در این روش آنتی ژن در بین دو لایه آنتی بادی قرار می گیرد که آنتی بادی ثانویه متصل به آنزیم است. در کلینیک گیاهپزشکی شرکت توسعه کشت دانه های روغنی تشخیص ویروس تریستزا مرکبات با استفاده از این روش انجام می گیرد که مراحل انجام آزمایش به شرح زیر می باشد:

۱. در مرحله اول آنتی بادی (IgG) ویروس در بافر پوششی رقیق شده و $200 \mu\text{l}$ از آن به چاهک های پلیت اضافه می شود. روی پلیت با پارافیلیم پوشانده شده و به مدت 4 ساعت در انکوباتور با دمای 30 درجه سانتی گراد نگهداری می شود. سپس پلیت را از انکوباتور خارج نموده و چاهک را تخلیه کرده و حداقل 3 بار با بافر شستشو شسته می شود.

برای اطمینان از نتیجه آزمایش شاهد های مثبت (نمونه آلوده) و منفی (نمونه سالم) در کنار نمونه های مشکوک در پلیت ها استفاده می شود. نتیجه تغییر رنگ در چاهک ها با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (ELISA-READER) در طول موج 405 نانومتر قراعت شده و آلوده یا سالم بودن نمونه ها معلوم می شود.