زندگی صحنه یکتای هنرمندی ماست

هر کسی نغمه خود خواند و از صحنه برود

صحنه پیوسته به جاست

خرم آن نغمه که مردم سپارندبه یاد

توجه: تمامی حقوق مادی و معنوی این اثر برای ناشر محفوظ است.
این کتاب مشمول قانون حمایت از مؤلفان، مصنفان و هنرمندان مصوب ۱۳۴۸/۱۱/۱۱ و قانون ترجمه و تکثیر کتب، نشریات و آثار صوتی مصوب ۱۳۵۰/۱۰/۶ می‌باشد.
بازنویسی، خلاصه برداری یا برداشت بخشی از متن، شکل‌ها یا جدول‌های کتاب و انتشار آن در قالب کتاب‌های ترجمه، تألیف، خلاصه، جزوه، تست یا نرم افزار بدون اجازه کتبی از ناشر، غیرقانونی و شرعاً حرام بوده و موجب پیگرد قانونی می‌شود.

الایزا

مترجم:

دکتر جواد محمدنژاد اروق

بیوشیمیست بالینی و دانشیار دانشگاه تهران

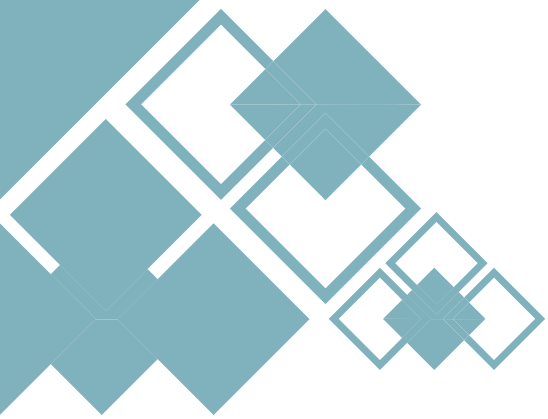
ویراستار:

دکتر شهروز همتی

دکترای علوم آزمایشگاهی بالینی

دکتر علیرضا لطفی کیان

دکترای علوم آزمایشگاهی بالینی



اندیشه رفیع
ناشر کتب علوم پزشکی
www.andisherafi.com

این کتاب با حمایت انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران به چاپ رسیده است

نام کتاب:	**الایزا**
مؤلف:	Samira Hosseini
مترجم:	دکتر جواد محمدنژاد اروق
ویراستاران:	دکتر شهروز همتی، دکتر علیرضا لطفی کیان
ناشر:	انتشارات اندیشه رفیع
صفحه آرایی:	شادی حمیدی
نوبت چاپ:	اول – ۱۴۰۰
شمارگان:	۱۵۰۰ جلد
لیتوگرافی:	ندای دانش
چاپ:	منصور
صحافی:	بعثت
شابک:	۹۷۸-۶۲۲-۲۷۳-۰۱۸-۵
بها:	۶۰۰۰۰ تومان

دفتر مرکزی: **اندیشه رفیع**
خیابـــان انقلاب – خیابـــان ۱۲ فروردین – خیابان شـــهدای ژاندارمری
مقابل اداره پســـت – ساختمان ۱۲۶– طبقه دوم – تلفکس: ۶۶۹۵۰۳۹۳
تلفن: ۶۶۹۷۱۴۱۴ – ۶۶۹۷۰۵۱۷ – ۶۶۹۷۰۵۱۸

نمایندگی های **فروش:**
- بابل کتابفروشی اندیشه
- مشهد کتابفروشی مجددانش
  معاونت پژوهشی جهاد دانشگاهی
- تبریز کتابفروشی شبرنگ
  کتابفروشی بابک
- شیراز کتابفروشی جمالی
  انتشارات دانشگاه شیراز
- کرمان کتابفروشی پاییروس
- ارومیه شاهد و ایثارگران
- اردبیل کتابکده خیام
- اهواز کتابفروشی رشد
- خرم آباد کتابفروشی نشر و قلم
- زاهدان کتابفروشی بیماری های خاص
- گرگان کتابفروشی جلالی
- قم کتابفروشی فانوس اندیشه
- بوشهر نمایشگاه دائمی دانشگاه پزشکی
- سمنان کتابفروشی اشراق
- شهرکرد کتابفروشی کالج
- قزوین کتابفروشی حکیم
- کاشان خانه کتاب
- همدان روزاندیش
- یاسوج خانه کتاب
- یزد کتابفروشی آرمان
- اصفهان کتابفروشی پارسا
  کتابفروشی مانی
- ساوه کتابفروشی کوثر
- ایلام کتابفروشی رشد

مقدمه نویسندگان

الایزا، از A تا Z با هدف ارائه پوشش مناسب برای خوانندگان نوشته شده و همه جنبه‌های ELISA از اصول سیستم ایمنی بدن و تاریخچه روش‌های آنالیزی تا قبل از اختراع ELISA گرفته، تا انتخاب مواد برای طراحی فرمت‌های الایزا، برهمکنش‌های زیست مولکولی، پروتکل‌های مختلف و پارامترهای ارزیابی یک آزمایش الایزا را در برمی‌گیرد. این کتاب به واسطه مراحل مختلف سنجش‌های آنالیتیکی، خوانندگان را راهنمایی کرده و همزمان آنها را با منشاء خطاهای احتمالی در روش الایزا آشنا می‌کند. این کتاب دیدگاه‌های مفصلی در مورد تکنیک‌های تثبیت مورد استفاده برای اتصال پروتئین، روشهای مختلف ارزیابی سنجش و محاسبات پارامترهای مهم در روش‌های آنالیتیکی مانند حساسیت، ویژگی، دقت و حد تشخیص دارد. مزایا و کاستی‌های الایزای معمولی و همچنین تلاش‌های متعدد برای بهبود عملکرد این روش در این کتاب آمده است. ادغام و یکپارچگی فنآوری‌های مختلف با الایزا به طور گسترده‌ای، افق‌ها و فرصتی‌های مناسبی برای پیشرفت این سنجش ایمنی فراهم کرده است. از این نظر، این کتاب آخرین پیشرفت‌های مربوط به روش‌های سنجشی یکپارچه مانند ELISpot، الایزای پلاسمونیک، الایزاهای مبتنی بر کره / مهره، الایزاهای مبتنی بر کاغذ / فیبر و همچنین الایزا در دستگاه‌های میکرو، ارائه می‌دهد.

Monterrey, Mexico Samira Hosseini
Patricia Vázquez-Villegas
Marco Rito-Palomares
Sergio O. Martinez-Cha

مقدمه ویراستار

سنجش‌های جذب ایمنی متصل به آنزیم (ELISA) از رایج‌ترین روش‌هایی هستند که امروزه مورد استفاده قرار می‌گیرند. ELISA از طرح سنجش قدیمی، Radiometric Immuno-Assay اولین بار توسط Engvall و Perlmann در سال ۱۹۷۱ متولد شد. در RIA از معرف‌های رادیواکتیو استفاده می‌شود، که درصورت استفاده نادرست از آنها خطر قابل‌توجهی برای سلامتی و ایمنی انسان ایجاد می‌گردد. اولین ELISA ها برای دور زدن این خبر و ایجاد یک جایگزین سریع، ساده و ایمن ساخته شده‌اند. اگرچه RIA ها هنوز در بعضی از زمینه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند، ولی تا حد زیادی توسط ELISA جایگزین شده‌اند. مانند RIA، الایزا یک روش مبتنی بر آنتی‌بادی است که برای تشخیص کمی تا نیمی کمی یا کیفی یک آنالیت خاص در یک نمونه طراحی شده است.

آنالیت‌هایی که با استفاده از روش ELISA مورد سنجش قرار می‌گیرند معمولا (و نه لزوما) پروتئین هستند و انواع نمونه‌ها می‌توانند مایعات بیولوژیکی خام (به عنوان مثال پلاسما، سرم، ادرار، عرق) یا محیط کشت سلولی تصفیه شده یا پروتئین نوترکیب خالص در محلول باشند.

در حالی که انواع مختلفی از ELISA وجود دارد، اما اصل اساسی در انجام سنجش کاملاً ساده است.

روش ELISA دارای چندین مزیت است، یک روش سریع، مقیاس‌پذیر با حساسیت و ویژگی بالا است که آن را به ابزاری قدرتمند و ضروری در جعبه ابزار یک پژوهشگر تبدیل می‌کند. نتایج به دست آمده می‌تواند کیفی، نیمه کمی یا کاملا کمی باشد (بستگی به طرح سنجش انجام شده دارد). تکنیک ELISA از لحاظ سادگی کاملا مبتکرانه بوده و یک تکنسین یا کارشناس با حداقل آموزش می‌تواند فقط در طی چند ساعت چندین نمونه را مورد آزمایش قرار دهد.

الایزا بدون محدودیت نیست. ماهیت اساسی یک روش ELISA استفاده از یک روش واحد را برای تشخیص یک هدف واحد محدود می‌کند. از آنجا که این روش وابسته به آنالیت توسط آنتی‌بادی است، ELISA است نمی‌تواند بین آنالیت‌های یکسان آنتی‌ژنی (اهداف مختلفی که توسط همان آنتی‌بادی شناخته می‌شوند) تمایز قائل شود. به عنوان مثال نمی‌تواند بسیاری از ایزوفرم‌های مختلف پروتئین یکسان را در یک نمونه تشخیص می‌دهد. این روش همچنین برای انجام سریع آزمایش نیاز به در دسترس بودن برخی از تجهیزات تخصصی مانند دستگاه‌های خوانشگر و شستشو دارد که استفاده از آن را در مناطق دورافتاده محدود می‌کند. ELISA به عنوان یک ابزار تشخیصی در پزشکی، آسیب‌شناسی گیاهان و بیوتکنولوژی و همچنین بررسی کیفیت در صنایع مختلف مورد استفاده قرار گرفته است.

در این کتاب به اصول، انواع روش‌های الایزا، مزایا و معایب هر روش پرداخته شده است و مشکلاتی که هنگام انجام ELISA رخ می‌دهد را به همراه راه‌حل‌های آن ارائه می‌کند.

فهرست مطالب

فصل ۱: مبانی و تاریخچه الایزا: تکامل سنجش‌های ایمنی تا اختراع الایزا ۱۱

۱.۱ تکامل سنجش ایمنی تا زمان اختراع الایزا ۱۱

۱.۱.۱ نظریه زنجیره جانبی..... ۱۱

۱.۱.۲ نظریه اتصال آنتی‌ژن و آنتی‌بادی..... ۱۲

۱.۱.۳ کشف ساختار آنتی‌بادی..... ۱۳

۱.۱.۴ اختراع رادیوایمونواسی (RIA)..... ۱۳

۱.۱.۵ اختراع سنجش جذب ایمنی مرتبط با آنزیم (ELISA)..... ۱۴

۱.۲ اصول سیستم ایمنی بدن ۱۵

۱.۲.۱ تولید آنتی‌بادی در بدن انسان..... ۱۵

۱.۲.۲ انواع مختلف آنتی‌بادی..... ۱۵

۱.۲.۳ اتصال آنتی‌ژن و آنتی‌بادی ۱۹

۱.۳ برهمکنش بیومولکولی بین آنتی‌بادی و آنتی‌ژن..... ۲۰

۱.۳.۱ پیوند هیدروژنی ۲۱

۱.۳.۲ برهمکنش‌های آبگریز ۲۱

۱.۳.۳ جاذبه یونی..... ۲۲

۱.۳.۴ نیروهای واندروالسی..... ۲۳

فصل ۲: مرور کلی در مورد کاربردهای الایزا..... ۲۹

۱.۲ کاربردهای الایزا..... ۲۹

۲.۱.۱ صنایع غذایی..... ۲۹

۲.۱.۲ توسعه واکسن ۳۰

۲.۱.۳ ایمونولوژی..... ۳۰

۲.۱.۴. تشخیص ۳۲
۲.۱.۵ سم شناسی ۳۴
۲.۱.۶ پایش دارویی و صنعت داروسازی..... ۳۴
۲.۱.۷ پیوند ۳۵

فصل ۳: گام به گام با ELISA: مکانیسم عمل، اجزای اساسی، پروتکل‌های مختلف و فهم نحوه تثبیت و شناسایی وجود انواع بیومولکول‌های مختلف..... ۴۱

۳.۱ مکانیسم عملکرد ۴۱
۳.۲ اجزای مختلف سنجش..... ۴۲
۳.۲.۱ فاز جامد..... ۴۲
۳.۲.۲ جاذب ها..... ۴۲
۳.۲.۳ عوامل شستشو..... ۴۴
۳.۲.۴ عوامل بلاک کننده..... ۴۴
۳.۲.۵ آنزیم‌ها و سوبستراها..... ۴۴
۳.۲.۶ فرآیند توقف ۵۰
۳.۲.۷ تکنیک‌های خوانش..... ۵۱
۳.۲.۸ دستگاه خوانش ۵۲
۳.۲.۹ کنترل ها..... ۵۳
۳.۳ پروتکل‌های مختلف..... ۵۴
۳.۳.۱ الایزای مستقیم ۵۴
۳.۳.۲ الایزای غیرمستقیم ۵۴
۳.۳.۳ الایزای ساندویچ ۵۴
۳.۳.۴ الایزای ساندویچ دوگانه ۵۴
۳.۳.۵ الایزای رقابتی..... ۵۵
۳.۴ برهمکنش اولیه مولکول‌های زیستی با سطح ۵۵
۳.۵ تکنیک‌های تثبیت برای اتصال پروتئین ۵۷
۳.۵.۱ تثبیت فیزیکی ۵۷
۳.۵.۲ تثبیت از طریق به دام انداختن ۵۸
۳.۵.۳ تثبیت کووالانسی..... ۵۸
۳.۵.۴ تثبیت جهت دار ۶۰

فصل ۴: ارزیابی نتایج تشخیصی حاصل از ELISA ۶۵
۴.۱ انجام یک سنجش مطمئن ۶۵
۴.۱.۱ منابع خطا در ELISA ۶۶
۴.۱.۲ عیب یابی ۶۶
۴.۲ پارامترهای کلیدی در ارزیابی ELISA ۷۰
۴.۲.۳ صحت ۷۲
۴.۲.۴ حد تشخیص (LOD) ۷۲
۴.۳ واحدهای قابل اندازه‌گیری در ELISA ۷۲

فصل ۵: مزایا، معایب و تغییرات الایزای معمولی ۷۵
۵.۱ اهمیت الایزای معمولی ۷۶
۵.۲ کاستی‌های الایزای معمول ۷۶
۵.۳ مواد انتخابی برای ساخت پلیت‌های چاهک ELISA ۷۷
۵.۴ انواع مختلف چاهک‌های پلیت ELISA ۷۸
۵.۵ پلتفورم‌های اصلاح شده ELISA ۷۹
۵.۵.۱ ELISA در پلتفورم‌های پوشش داده شده ۸۰
۵.۵.۲ الایزای نقطه‌ای ۸۲
۵.۵.۳ الیزای پلاسمونیک ۸۳
۵.۵.۴ الایزا بر پایه کره / بید ۸۸
۵.۵.۵ الایزا بر پایه کاغذ ۹۲
۵.۵.۶ ELISA بر پایه فیبر ۹۸
۵.۵.۷ ELISA در دستگاه‌های میکرو ۱۰۷
۵.۵.۸ سایر استراتژی‌ها ۱۱۲

فصل ۱

مبانی و تاریخچه الایزا: تکامل سنجش‌های ایمنی تا اختراع الایزا

چکیده

این فصل پیشـــینه و تاریخچه سنجش‌های ایمنی را تا زمان اختراع الایزا بررسی می‌کند. از این منظر، تحولات مهـــم در این زمینه از جمله، تئوری زنجیره جانبی، تئوری آنتی‌ژن و آنتی‌بادی، کشـــف ســـاختار آنتی‌بادی، اختراع رادیوایمونواسی (RIA) و اختراع سنجش جذب ایمنی مرتبط با آنزیم (ELISA) بررسی می‌شود. این فصل همچنین اصول سیســـتم ایمنی بدن مانند تولید آنتی‌بادی با کلاس‌های مختلف در بدن انســـان و همچنین اتصال آنتی‌ژن و آنتی‌بـــادی و ویژگی چنین برهمکنشـــی را توصیـــف می‌کند. از این نظر، این فصل همچنین منشـــاء برهمکنش بیومولکولـــی بین دو مولکول (آنتی‌بادی و آنتی‌ژن) را بررســـی می‌کند. نیروهای غالـــب که در برهمکنش فیزیکی آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌ها غالب هســـتند شامل پیوندهای هیدروژنی (پیوند H)، برهمکنش‌های آبگریز، جاذبه یونی و واندروالســـی، نیروهایی مانند نیروهای پراکندگی لاندنی، برهم کنش‌های دو قطبی – دو قطبی و یون دو قطبی، با جزئیات بیشتری معرفی می‌شود.

۱-۱ تکامل سنجش ایمنی تا زمان اختراع الایزا

۱.۱.۱ نظریه زنجیره جانبی

در ســـال ۱۸۷۸ *پاول ارلیخ*، پزشـــک و دانشمند آلمانی، رابطه‌ای را منتشـــر کرد که در آن چگونگی برهمکنش سلول‌ها با محیط پیرامون خود توضیح داده شده بود، در حالیکه در آن زمان هنوز درباره ماهیت و ساختار موجودات زنده، اطلاعات کمی در دســـت بود [۱]. این انتشـــار، نتیجه نهایی تحقیقات چندین ساله‌ای بود که باعث شد *ارلیخ* به همراه *الی* چنیکف جایزه نوبل فیزیولوژی یا پزشـــکی را در ســـال ۱۹۰۸ به خاطر ارائه یک مبنای تئوریک برای ایمونولوژی دریافت کند. نظریه وی فرض کرد که سلول‌ها دارای "زنجیره‌های جانبی" هستند که به عناصر مغذی متصل شده و این اتصال برای حفظ حیات آنها لازم است. این نظریه بعداً به عنوان "نظریه زنجیره جانبی" شناخته شد، که بیشتر برهمکنش‌های خاص بین آنتی‌بادی‌ها و آنتی‌ژن‌ها را در خون توضیح می‌داد [۲، ۳]. ارلیخ این نظریه را مطرح کرد که آنتی‌بادی‌های تولید شـــده توسط گلبول‌های سفید به عنوان زنجیره‌های جانبی غشای سلول عمل

می‌کنند. او معتقد بود که زنجیرهای جانبی با ساختارهای شیمیایی مخصوص خود، به اجسام بیگانه متصل می‌شوند. او این ساختارهای شیمیایی را گیرنده‌ها نامید. ارلیخ پیشنهاد کرد که پدیده ارتباط بین گیرنده و یک عامل عفونی شبیه قفل و کلید است که کاملا مکمل و مناسب هم هستند [۴]. همچنین *ارلیخ* این فرضیه را مطرح کرد که سلول‌های قرار گرفته در معرض میکرو ارگانیسم‌های خارجی، زنجیره‌های جانبی اضافی را برای جذب عناصر سمی گسترش می‌دهند. این زنجیره‌های جانبی اضافی، که برای عبور از جریان گردش خون طراحی شده اند، به عنوان آنتی‌بادی شناخته می‌شدند. طبق نظریه وی، زنجیره‌های جانبی زیادی در سطح گلبول‌های سفید وجود دارد که می‌توانند با آنتی‌ژن‌های مختلف پیوندهای شیمیایی ایجاد کنند. برای هر آنتی‌ژن خاص، حداقل یک زنجیره جانبی با یک محل اتصال دقیق وجود دارد که می‌تواند سلول را تحریک کند تا همان نوع از آنتی‌بادی را به میزان بیشتری در جریان خون تولید و آزاد کند. این‌ها آنتی‌بادی‌هایی بودند که ارلیخ ابتدا آنها را "گلوله‌های جادویی" تعریف کرد، بیومولکول‌هایی که به طور اختصاصی، نوعی سم یا پاتوژن را هدف قرار می‌دهند، بدون اینکه آسیبی به بدن برسد [۴، ۵]. ارلیخ، بر اساس عبارت معروف "مردی با گلوله جادویی"، توصیف کرد که ویژگی گیرنده قبل از قرار گرفتن در معرض آنتی‌ژن، تعیین می‌شوند، بنابراین این آنتی‌ژن بود که گیرنده مناسب را انتخاب می‌کرد [۶]. پاول ارلیخ به عنوان پدر ایمونولوژی مدرن اولین کسی بود که مدلی برای مولکول آنتی‌بادی، یک ساختار شاخه‌ای متشکل از چندین محل اتصال به عوامل خارجی (آنتی‌ژن ها) پیشنهاد داد [۷]. این مدل با تئوری "قفل و کلید" برای آنزیم‌ها که در ابتدا توسط امیل فیشر ارائه شده بود سازگاری داشت [۶، ۸].

۱.۱.۲ نظریه اتصال آنتی‌ژن و آنتی‌بادی

از زمان ظهور نظریه زنجیره جانبی، نظرات مخالف *پل ارلیخ و ژول بورده* ماهیت این واکنش را زیر سوال بردند. ارلیخ معتقد بود که این واکنش کاملاً شیمیایی است، در حالی بورده ادعا کرد که این یک جذب فیزیکی است که روی یک جز بر روی دیگری اتفاق می‌افتد. نظریه بورده بیان می‌کرد که واکنش اتصال از نوع شیمی کلوئید است که به جای ماهیت شیمیایی واکنش دهنده‌ها، به ویژگی‌های سطح، متکی است. بعداً بورده، همراه با دانشمندان دیگر از جمله *Svante Arrhenius* و *Thorvald Madsen*، این واکنش را به عنوان یک مدل خنثی‌سازی اسید و باز برگشت‌پذیر توصیف کردند. *کارل لندشتاینر*، زیست شناس، پزشک و ایمونولوژیست اتریشی، دیدگاه‌های مخالف با عقاید ارلیخ داشت. وی بعداً شواهدی پیدا کرد که نشان می‌داد ویژگی آنتی‌ژنی وابستگی زیادی به بار آنتی‌ژن دارد، بنابراین اثبات می‌کند که واکنش به هر دو ویژگی فیزیکی سطح و همچنین ماهیت شیمیایی آنتی‌ژن متکی است.

در سال ۱۹۳۴ *جان آر. ماراک* دانسته‌های موجود در این زمینه را در کتاب مشهور خود "شیمی آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌ها" جمع‌آوری کرد [۹]. وی همچنین واکنش آنتی‌ژن – آنتی‌بادی جدیدی بر اساس مدل شبکه کریستالی پیشنهاد کرد. او پیشنهاد کرد که رابطه بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی به دنبال همبستگی بین مولکول‌های داخل یک شبکه بلوری است. مولکول‌های کریستال نه از طریق ظرفیت‌های شیمیایی که ارلیخ پیشنهاد داده است، بلکه از طریق نیروهای کوتاه برد که یک مولکول را احاطه کرده اند، به هم پیوند می‌خورند. چنین نیروهای انتخابی خاص، مولکول‌ها را برای ساخت یک ماتریس بلوری تعیین می‌کنند. ماراک همچنین معتقد بود که واکنش آنتی‌ژن و

آنتی‌بادی در مقایسه با تشکیل کریستال از ویژگی کمتری برخوردار است، زیرا محل اتصال فقط بخش کوچکی از کل مولکول را پوشش می‌دهد. ماراک پیشنهاد کرد که آنتی‌بادی‌ها بیش از یک محل اتصال دارند، بنابراین آنتی‌ژن – آنتی‌بادی مزدوج شده، یک شبکه تشکیل می‌دهد [۹]. ماراک به کار خود در مورد واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی ادامه داد و تعدادی مقاله مهم تحقیقاتی، مروری، و همچنین ویرایش دوم کتاب خود، "شیمی آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌ها" [۱۰–۱۲] را منتشر کرد. ایده‌های ماراک در رابطه با شیمی پروتئین با گذشت زمان تغییر کرد. با این وجود، یافته‌های وی در رابطه با واکنش آنتی‌بادی– آنتی‌ژن، که در زمان مناسب در تاریخ سنجش ایمنی شرح داده است، حتی هشتاد و سه سال پس از انتشار کتاب او نیز معتبر است.

۱.۱.۳ کشف ساختار آنتی‌بادی

در سال ۱۹۴۸، *آسترید فاگرئوس*، ایمونولوژیست سوئدی کشف کرد که پلاسماسل‌های B مستقیماً در تولید آنتی‌بادی نقش دارند [۱۳]. تقریباً یک دهه بعد در سال ۱۹۵۷، دانشمند استرالیایی به نام *فرانک مک فارلین برنت*، ایده‌های دیوید *تالماج*، ایمونولوژیست آمریکایی را توسعه داد و "نظریه انتخاب کلونال" را ارائه داد [۱۴، ۱۵]. این تئوری توصیف می‌کند که وقتی آنتی‌ژنی وارد جریان خون یا مایعات بافتی می‌شود، به سطح لنفوسیت‌هایی متصل می‌شود که دارای جایگاههای واکنش دهندهٔ مربوط به عوامل تعیین کننده آنتی‌ژنی آن است [۱۴، ۱۶]. در نتیجه، سلول فعال می‌شود بنابراین تحت تکثیر ترجیحی قرار می‌گیرد تا نسل‌های زیادی تولید کند. تکثیر فقط به کلون‌های واکنشی که با عوامل تعیین کننده آنتی‌ژنی مطابقت دارند محدود می‌شود. نسل‌های بعدی تولید شده منجر به آزادسازی آنتی‌بادی محلول در جریان خون می‌شوند [۱۴، ۱۶].

تئوری انتخاب کلونال، پایه و اساس سایر دانشمندان برای پیشرفت در این زمینه را ایجاد کرد. در سال ۱۹۵۹، جرالد *ادلمن* و *رودنی پورتر* به طور مستقل یافته‌های خود را در مورد ساختار مولکولی آنتی‌بادی گزارش کردند [۱۷، ۱۸]. در سال ۱۹۷۲، جایزه نوبل فیزیولوژی یا پزشکی به طور مشترک به ادلمن و پورتر "بخاطر کشف ساختار شیمیایی آنتی‌بادی‌ها" اعطا شد [۱۹]. اولین ساختار قطعه آنتی‌بادی با وضوح اتمی در سال ۱۹۷۳ به جامعه علمی ارائه شد [۲۰]. این یافته با یک جهش بزرگ دیگر همراه بود، زمانی که *ژرژ کوهلر* و *سزار میلشتاین* در سال ۱۹۷۵ با موفقیت آنتی‌بادی مونوکلونال را با استفاده از کشت مداوم سلول‌های ذوب شده، تولید کردند [۲۱]، که دوره مدرن تحقیق و کشف آنتی‌بادی را رقم می‌زند.

۱.۱.۴ اختراع رادیوایمونواسی[1] (RIA)

رادیو ایمونواسی (RIA) برای اولین بار توسط دانشمندان آمریکایی، *سلومون برسون* و *روزالین یالو*، در سال ۱۹۶۰ برای اندازه‌گیری انسولین معرفی شد [۲۲]. بعدا جایزه نوبل فیزیولوژی یا پزشکی به یالو به دلیل "توسعه RIA برای هورمون‌های پپتیدی" [۲۳] اهدا شد. اما، به دلیل مرگ ناگهانی برسون در سال ۱۹۷۲، او جایزه را با یالو تقسیم نکرد.

تکنیک‌های سنجش ایمنی نشاندار با رادیواکتیو به سرعت مورد توجه محققان و پزشکان قرار گرفت. پس از آن روش‌های مختلفی توسعه داده شد و RIAهای دهه بعدی، برای آنالیت‌های جدید معرفی شد. در سال ۱۹۶۸، روش

1. Radioimmunoassay (RIA)

"ایمونورادیومتریک" توسط مایلز و هالز ایجاد شد که در آن آنتی‌بادی‌ها به جای آنتی‌ژن برای اندازه‌گیری انسولین در پلاسمای انسان، با عوامل رادیواکتیو نشاندار می‌شدند [۲۴، ۲۵].

در مراحل اولیه اســتفاده از RIA به عنوان یک روش ســنجش ایمنی گسترده، از ید ۱۳۱ به عنوان برچسب یا نشانه استفاده شد زیرا در آن زمان گزینه دیگری در دسترس نبود. خطرات احتمالی سلامتی مربوط به استفاده از مواد رادیواکتیو با ورود ید ۱۲۵- (تابش ضعیف) به بازار تا حدودی کاهش یافت. با این حال، مسائل مربوط به بهداشت و درمان برای پرسنل آزمایشگاه و مواد زائد رادیواکتیو همچنان به عنوان نگرانی عمده باقی مانده است.

۱.۱.۵ اختراع سنجش جذب ایمنی مرتبط با آنزیم[1] (ELISA)

در طول روند تکامل ســنجش ایمنی، ایده اســتفاده از نشانه‌های آنزیمی با تردید و عدم باورپذیری جدی روبرو شد. اعتقاد بر این بود که آنزیم‌ها به عنوان مولکول‌های زیستی برای نشاندار کردن بسیار بزرگ هستند و وجود آنها به احتمال زیاد باعث ایجاد ممانعت فضایی می‌شوند. این نظرات با برنامه‌ریزی دقیق و اجرای آزمایش‌ها، که امکان سنجی آنزیم‌ها را به عنوان برچسب نشان می‌داد، برطرف شدند. موفقیت سنجش الایزا در مراحل اولیه، اشتباه افراد مشکوک را ثابت کرد و مسیر پیشرفت بیشتر سنجش‌های ایمنی را هموار کرد.

بین ســال‌های ۱۹۶۶ و ۱۹۶۹، *Avrameas* و همکاران اتصال موفقیت‌آمیز آنتی‌ژن و آنتی‌بادی به آنزیم‌هایی مثل آلکالین فسفاتاز و گلوکز اکسیداز را نسبت به بقیه آنزیم‌ها گزارش کردند [۲۶، ۲۷]. Avrameas و همکاران مراحل بعدی نشاندار سازی و اتصال از طریق شیمی گلوتارآلدئید را بهینه‌سازی کردند. مولکول‌های زیستی نشاندار با آنزیم (آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی) برای شناسایی بیومولکول‌های مکمل توسط ایمونوفلورسانس استفاده شد [۲۶، ۲۷]. ایمونواسی آنزیمی (EIA) توسط *Anton Schuurs and Bauke van Weemen* در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی ارگانون در هلند ساخته شد.

ســنجش جذب ایمنی مرتبط با آنزیم (ELISA) در دانشگاه استکهلم سوئد توسط *Peter Perlmann and Eva Engvall* در ســال ۱۹۷۱ مفهوم سازی شــد. پرلمن و انگوال به همراه *Schuurs and van Weemen* جایزه علمی "Biochemische Analytik" کشور آلمان را در سال ۱۹۷۶ برای این اختراع دریافت کردند [۲۴]. اولین آزمایش ELISA، اندازه‌گیری کمی آنتی‌بادی خرگوشــی با آلکالین فســفاتاز به عنوان نشان گزارشگر انجام شده بود [۲۸]. ELISA از جنبه‌های تجاری‌سازی، موفق‌تر از EIA شده است. انواع مختلفی از تکنیک‌های فاز جامد برای ساخت میکروپلیت اســتفاده شد [۲۹، ۳۰]. در میکروپلیت‌های توســعه یافته، آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی مورد نظر به صورت غیر کووالانسی به ماده پشتیبان کننده متصل می‌شود. اتصال بعدی مولکول‌های زیستی مکمل و نشاندار با آنزیم منجر به تولید سیگنال تشخیصی می‌شود [۲۹، ۳۰].

تأثیر EIA و ELISA در ســنجش‌های ایمنی تشخیصی و سیستم مراقبت‌های بهداشتی تقریباً بی نظیر است. تعدد تحقیقات آنالیتیکی و بالینی انجام شده در سراسر جهان بر اساس دانش EIA و ELISA نجومی است و تعداد اندازه‌گیری‌ها با اســتفاده از این روش‌های ایمنی برای مراقبت‌های معمول بیماری، بســیار زیاد اســت. تقریباً هیچ آزمایشگاه تشخیصی در سراسر جهان وجود ندارد که با چاهک‌های پلیت ELISA کار نکرده باشد[۲۴].

1. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

۱.۲ اصول سیستم ایمنی بدن

۱.۲.۱ تولید آنتی‌بادی در بدن انسان

ایمونوگلوبولین‌ها (Igs)، که به عنوان آنتی‌بادی‌ها نیز شـــناخته می‌شوند، پروتئین‌هایی هستند که توسط سیستم ایمنی بدن تولید می‌شوند تا به مبارزه با مواد بیگانه کمک کنند. طبق تعریف، هر عنصر بیگانه که باعث شود سیستم ایمنی بدن با تولید آنتی‌بادی به حضور آنها پاسخ دهد، می‌تواند به عنوان یک آنتی‌ژن در نظر گرفته شود. آنتی‌ژن‌ها شامل موجودات زنده از طیف گسترده‌ای از خانواده‌ها از جمله ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها، مواد شیمیایی، دانه‌های گرده یا مواد حساســیت زای غذایی هســتند. با این وجود، همه آنتی‌ژن‌ها بیگانه نیســتند زیرا ممکن است برخی از آن‌ها مانند سلول‌های ســرطانی در بدن تولید شوند. مواد بسیار آنتی‌ژنیک و برخی مواد شیمیایی خاص مانند رزین موجود در گیاه پیچک ســمی، سموم ناشی از گزش حشرات و خزندگان، حلال‌ها، فرمالین و آزبست به احتمال زیاد باعث واکنش ایمنی در انواعی از سلول‌های ایمنی بدن می‌شود. عوامل عفونی ویروسی و باکتریایی نیز پاسخ ایمنی را فعال می‌کنند. به دنبال تلاش بدن برای تمییز عنصر بیگانه که در اندامها یا جریان خون رخ می‌شــود، اندام‌های پیوندی گاهی اوقات می‌توانند توسط بدن رد شوند. در این مورد خاص، پروتئین‌های موجود در سطح ارگان اهدایی نیز می‌توانند در بدن فرد گیرنده به عنوان آنتی‌ژن عمل کنند.

۱.۲.۲ انواع مختلف آنتی‌بادی

پنج نوع آنتی‌بادی مختلف با اشکال و اعمال خاص در بدن وجود دارد. این آنتی‌بادی‌ها شامل IgG، IgA، IgM، IgD و IgE هستند. حروف بزرگ در نام این آنتی‌بادی‌ها به موارد زیر اشاره دارد:

G: در فرآیند جداسازی پروتئین، این آنتی‌بادی در باند گاما ظاهر می‌شود.

A: در فراینــد جداســازی پروتئین، این آنتی‌بــادی در باند بتا و گاما ظاهر می‌شــود. در ابتدا b2A و گاما 1A نامگذاری شد، اما بعداً به عنوان آلفا گلوبولین تغییر نام یافت.

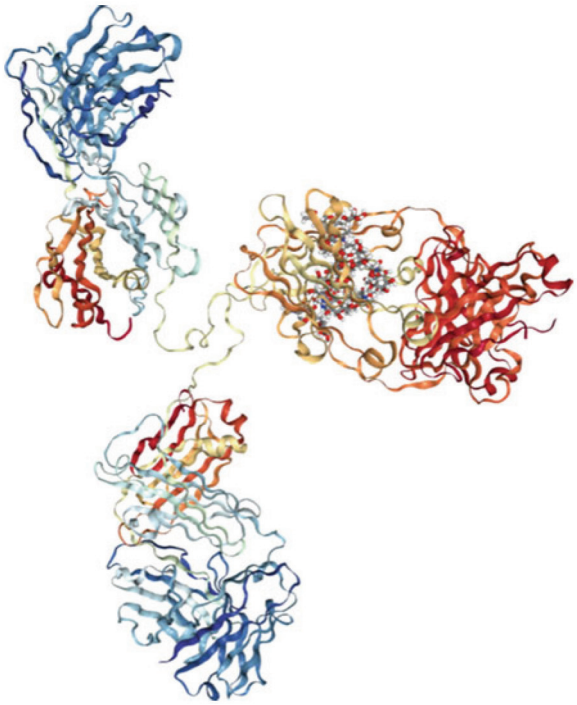
M: این آنتی‌بادی به دلیل روند رسوب سریعتر از IgG، ماکروگلوبولین نام دارد.

D: در فرآیند جداسازی پروتئین، این آنتی‌بادی بعد از باندهای بتا و گاما ظاهر می‌شود. به همین دلیل، از موقعیت آن به عنوان باند دلتا (δ) delta یاد می‌شود.

E: این آنتی‌بادی فقط پس از قرار گرفتن در معرض برخی از آنتی‌ژن‌های آلرژیک که عامل بیماری اریتم هستند (واکنش آلرژیک پوستی) تولید می‌شود.

۱.۲.۲.۱ ایمونوگلوبولین G (IgG)

در بین انواع مختلف آنتی‌بادی‌ها، IgG با داشــتن تقریباً ۷۵ درصد آنتی‌بادی سرم در انسان، غالب‌ترین نوع در نظر گرفته می‌شــود [۳۱]. این آنتی‌بادی‌ها توسط پلاسما ســل‌های B تولید و در جریان خون آزاد می‌شوند. IgG اصلی‌ترین آنتی‌بادی در برابر میکروب‌ها اســت که با پوشاندن آنها برای تسریع در حذف آنها از سیستم ایمنی بدن



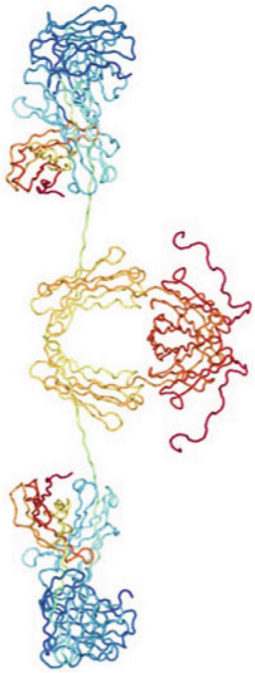
شکل ۱.۱ ساختار IgG [۳۳]

عمل می‌کند. وجود IgG در بدن یک ایمنی طولانی مدت در برابر عوامل عفونی ایجاد می‌کند. IgGها مولکول‌های نسبتاً بزرگ تترامری دارای ساختار چهارم (۱۵۰ کیلو دالتون) هستند که از چهار زنجیره پپتیدی، دو زنجیره سنگین گامای یکسان و دو زنجیره سبک یکسان تشکیل شده اند [۳۲]. هر IgG دارای دو محل اتصالی برای اتصال با آنتی‌ژن‌ها است (شکل ۱.۱). IgGها عمدتا در خون و مایعات خارج سلولی وجود دارند.

IgGها می‌توانند بسیار قابل انتشار باشند. آنها توانایی عبور از جریان خون یا بین سلول‌ها به اندام‌ها یا حتی به پوست را داشته و در آنجا میکروارگانیسم‌های مهاجم را خنثی می‌کنند. این تحرک در طبیعت IgG ها، به آنها امکان می‌دهد تا از طریق جفت، از مادر به جنین منتقل شوند، از این رو یک دفاع موقتی در بدن کودک متولد نشده ایجاد می‌کنند. IgGها حتی پس از تولد، تا حدی از طریق شیردهی به بدن کودک منتقل می‌شوند. وجود IgGهای منتقل شده از طریق انتقال جفت، به کودک تا زمان شروع تولید آنتی‌بادی در بدن کودک به سیستم ایمنی در مقابله با عفونت‌ها کمک می‌کند.

۲.۲.۲.۱ ایمونوگلوبولین A (IgA)

ایمونوگلوبولین A (IgA) را می‌توان در دو ایزوتایپ IgA-1 و IgA-2 یافت که هر دوی آنها پروتئین‌های گلیکوزیله هستند [۳۴]. IgA در اشک، بزاق، مخاط و ترشحات دستگاه تنفس، تولید مثل، گوارش و ادرار وجود دارد و در خنثی‌سازی باکتری‌ها و ویروس‌ها و جلوگیری از ورود آنها به بدن یا دسترسی به اندام‌های داخلی نقش



شکل ۱.۲ مدل IgA انسانی [۳۵]

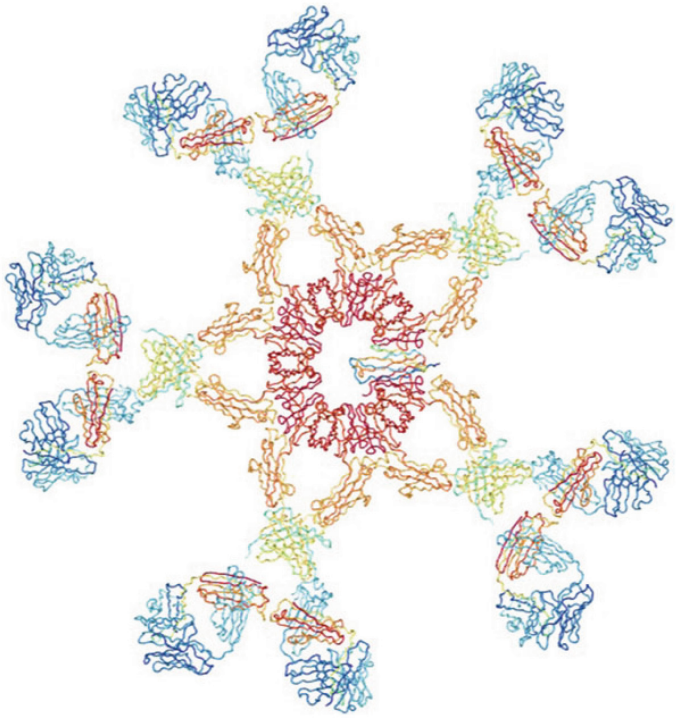
حیاتی دارد. IgA همچنین در غلظت‌های بسیار کم در سرم خون یافت می‌شود. از آنجایی که IgAها دارای برخی شباهت‌های اساسی هستند، بنابراین هر IgA به طور خاص برای دفاع از بدن در برابر نوع خاصی از مهاجم که ممکن است از طریق ورودی‌های مختلف بدن حمله کند، طراحی شده است (شکل ۱.۲).

۱.۲.۲.۳ ایمونوگلوبولین M (IgM)

ایمونوگلوبولین M (IgM) متشکل از پنج شکل Y فعال بوده و بزرگترین آنتی‌بادی در بین همه آنتی‌بادی‌ها است، بنابراین در برابر میکروارگانیسم‌های بزرگتر موثرتر است (شکل ۱.۳). IgM موجود در خون در دفاع از بدن در برابر آنتی‌ژن ها، عملکردی مشابه IgG دارد. با این حال، به دلیل اندازه بزرگ، نمی‌تواند از غشاهای بافتی عبور کند. IgMها معمولاً مسئول حفاظت اولیه در برابر میکروارگانیسم‌های مهاجم هستند، در حالی که محافظت موثرتر توسط IgGهای تولید شده توسط پلاسما سل‌ها ایجاد می‌شود [۳۶]. نسبت IgM و IgG با مراحل مختلف بیماری ارتباط مستقیمی دارد. میزان IgMها در مراحل اولیه بیماری غالب است. با پیشرفت بیماری، میزان بیشتری IgG در مقایسه با IgM وجود دارد.

۱.۲.۲.۴ ایمونوگلوبولین D (IgD)

ایمونوگلوبولین D (IgD) بیشتر در سطح سلول‌های B وجود دارد زیرا به این گروه از سلول‌ها کمک می‌کند تا انواع خاصی از آنتی‌ژن‌ها را شناسایی کنند. به همین دلیل، غلظت IgDهای آزاد در سرم خون بسیار کم است (۰/۲۵٪). شکل ۱.۴ ساختار IgD میلومای انسانی را نشان می‌دهد. به طور معمول، IgDها به همراه IgMها در



شکل ۱.۳ ساختار IgM انسانی [۳۷]

ســطح سلول بیان می‌شــوند. جرم مولکولی تقریبی IgD ۱۸۵ کیلو دالتون است و برای ۲/۸ روز فعال است [۳۹]. IgDهــا در گونه‌های مختلف از ماهی‌های غضروفی گرفته تا انســان ایمونولوژیکال وجود دارد [۴۰]. وظیفه IgD در ســلول‌های B، سیگنال دهی به داخل سلول‌ها اســت بنابراین می‌تواند آنها را فعال کرده تا در مکانیسم دفاعی شرکت کنند.

۱.۲.۲.۵ ایمونوگلوبولین E (IgE)

آنتی‌بادی‌های ایمونوگلوبولین E (IgE) مســئول واکنش‌های آلرژیک هســتند. آنها به سطح ماست سل‌هایی متصل می‌شــوند که غالباً حاوی ترکیباتی هســتند که در طی واکنش آلرژیک آزاد می‌شوند. IgEها توسط پلاسما ســل‌ها سنتز می‌شــوند. IgEها از چهار زنجیره پپتیدی، دو زنجیره ســنگین (زنجیره اپسیلون) و دو زنجیره سبک تشــکیل شده‌اند (شــکل ۱.۵) [۴۱]. عملکرد اصلی آنها دفاع در برابر انگل‌هایی مانند شیستوزوما مانسونی، تریشنا اســپیرالیس، پلاسمودیوم فالســیپاروم و فاسیولا هپاتیکا می‌باشــد [۴۳–۴۷]. IgEها مهمترین محصولات بدن در واکنش‌های ازدیاد حساســیت نوع I هســتند که در واکنش‌های مختلف آلرژیک مانند آســم آلرژیک، بیشتر انواع ســینوزیت، رینیت آلرژیک، آلرژی غذایی، انواع خاصی از کهیر مزمن و درماتیت آتوپیک بروز می‌کند [۴۸]. با اینکه IgE به عنوان کمترین فراوانی (۰/۰۵٪) در ســرم خون در نظر گرفته می‌شــود، ولی قادر به فعال سازی قوی‌ترین پاسخ‌های التهابی در بدن است [۴۹].