



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم / قسم الكيمياء

تقنية جهاز الاليزا وفوائده المخبرية في

مجالات الكيمياء السريرية

بحث تقدمت به الطالبة

غفران فالح مهدي

إلى مجلس قسم الكيمياء-كلية العلوم في جامعة القادسية

وهي من متطلبات نيل شهادة بكالوريوس في الكيمياء

بإشراف

م.م. نوال خنطيل جبّار

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

﴿وَلْيَعْلَمَ الَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ أَنَّهُ الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ﴾

الحج/54

الإهداء

إلى مروه التي تُرفرف في جنانِ الرَّحمن . . . أبي

إلى الإنسنة التي علقتُ عليها آمالي في اجتياز هذا الدرب الطويل . . . أمي

إلى شقيق الرّوح وظلالها الدافئة . . . أخي حسين

إلى رفیق دربي بكلِّ الحبِّ والوفاء . . . نروحي أكرم

عُفْران

الشكر والتقدير

الشكر لله وحده الذي كان لي خير معين ونصير.

أنتدّم بجزيل الشكر إلى عمادة كلية العلوم/جامعة القادسية, ولاسيما قسم الكيمياء, ثمّ أقدم أسمى آيات الشكر و العرفان إلى الاستاذة نوال خنطيل جبار التي مهّدت لنا طريق العلم والمعرفة, واطّعت بعلمها وتوجيهاتها المباركة عقولنا. فلك منّي كلّ التقدير والوفاء.

فهرس المحتويات

| أرقام الصفحات | الموضوع |
|---------------|---------------------------------------|
| 4-3 | المقدمة |
| 8-5 | التمهيد : التحاليل المناعية المرتبطة |
| 13-9 | المبحث الأول : نشأة الاليزا |
| 10 | اولا : تاريخ Elisa |
| 10 | ثانيا : تعريف تقنية Elisa |
| 11 | ثالثا : مبدأ Elisa |
| 11 | رابعا :مزايا Elisa |
| 12 | خامسا : تطبيقات Elisa |
| 13 | الفرق بين Elisa و Spector photometer |
| 19-14 | المبحث الثاني : أنواع وقياسات الاليزا |
| 17-15 | أقسام Elisa |
| 19-18 | مكونات Elisa |
| 21-20 | فهرس المصادر والمراجع |

الْقَلْبِ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

الحمدُ لله الذي بَرَأَ النَّسْمَ , وعلم بالقلم , وعلم الإنسان ما لم يعلم , وأفضل الصلاة و السلام على مُحَمَّدٍ و آلِهِ سادة الأمم .

أما بعدُ

فقد كانت الأمراض والمشاكل الصحيّة تُورِّق كثيراً من الناس، فلم يكن هناك علاج متاح، ولم يكن هناك مراكز طبيّة متطورة، ولكن مع تقدّم العلم وتطوّره، ظهرت العديد من التقنيات التي سهّلت عمل المراكز الصحيّة، وتمكن العلماء من إيجاد علاج لكثير من الأمراض التي كانت منتشرة، وظهرت معدّات طبيّة جديدة ومتطورة، أتاحت الكشف عن الأمراض بشكل أسرع، وعلاجها بشكل فوري، وأصبحت التقنيات الطبيّة متناهية في الصغر، ودقيقة، وتمكّن الأطباء من إجراء العديد من العمليّات عن بعد، وبدأ الإنسان في تطوير الروبوتات الطبيّة، والتي تساعد في العمليّة العلاجيّة للمرضى , ومن هنا جاءت هذه الدّراسة التي حملت عنوان (تقنيّة جهاز الاليزا و فوائده المختبريّة في مجالات الكيمياء السريريّة), لتسليط الضوء على ماهيّة هذا الجهاز وكيفيّة علمه وأقسامه و مكوناته.

وقد اقتضت طبيعَةُ الحث تقسّمه على تمهيدٍ و مبحثين , وقد تناولت في التمهيد (التحليل المناعيّة المرتبطة) .

أما المبحث الأوّل فتناولت فيه (نشأة الاليزا) . وقد قُسم علي خمسة فقرات :

الأولى: تأريخ الاليزا , والثانية: تعريف الاليزا , والثالثة: مبدأ الاليزا , والرابعة: مزايا الأليزا , والخامسة: تطبيقات الاليزا .

أما المبحث الثاني فتناولت فيه (أنواع قياسات الاليزا) .

وفي الختام أدعو الله مخلصاً أن يوفقنا لخدمة العلم والمعرفة وأخر دعوانا أن الحمد لله ربّ العالمين .

الباحثة

التعريف:

التحاليل المناعية المرتبطة

Enzyme Linked

Immunosorbent

Assay

التمهيد: التحاليل المناعية المرتبطة

Enzyme linked Immunosorbent Assay

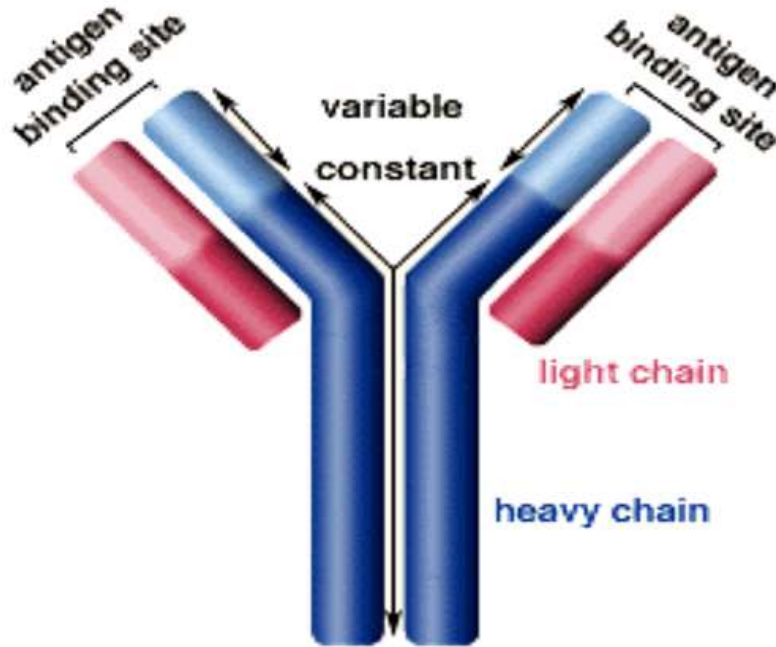
تقنية الاليزا او ما يعرف بتقنية الاجسام المناعية المرتبطة هي تقنية بايوكيميائية تستعمل لتعيين مادة معينة في العينة الخاضعة للاختبار تعرف **Antigen** الذي عادة ما يتواجد في العينة التي يراد اجراء الاختبارات عليها, وهذا يتطلب وجود مادة تتوافق مع الانتيجين تدعى **Antibody** حيث لكل **Antigen** يوجد **Antibody** خاص به :

-الأجسام المضادة **Antibody**:

هي مركبات موجودة ضمن الجهاز المناعي للجسم وتصنع بشكل خاص عند تعرض الجسم لأجسام غريبة .

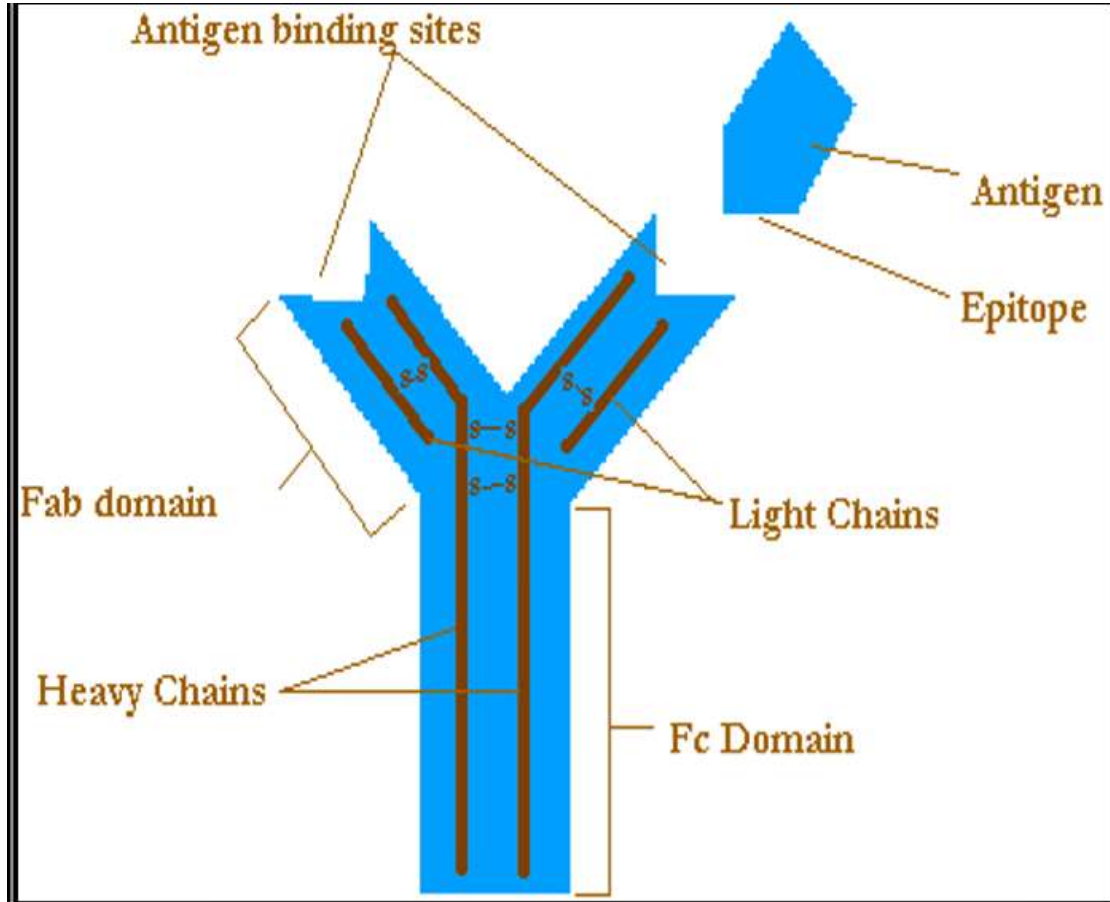
-المستضدات **Antigen**:

هو جسم مسؤول عن إثارة الجهاز المناعي للجسم وبالتحديد إثارة الأجسام المضادة.



-التحاليل المناعية Immuno assay:

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



-المادة المحللة Analyte:

هي المادة الحيوكيميائية التي يتم قياسها .

وفي التحاليل المناعية يكون **Analite** أما :

. Antibody-1

. Antigen-2

-حالات Antigen :

يكون **Antigen** أمّا :

- موجود في الجسم بشكل طبيعي مثل الهرمونات.
- يتم تصنيعه في الجسم في حالات مرضية , مثل هرمون **HCG** الذي يفرز من خلايا المشيمة بشكل طبيعي أثناء الحمل , كما يمكن إفرازه في بعض أنواع السرطانات حتى عند الرجال .
- غير موجود في الأحوال العادية , مثل :المخدرات .

طرائق تصنيع الأجسام المضادة الخاصة بالتحاليل المناعية

يتم تصنيع الأجسام المضادة في حال التعرض للأجسام الغريبة **Antigen** وتكون هذه الأجسام المضادة ذات تخصصيّة **Spccific Affinity** للأجسام الغريبة التي أثارت تصنيعها. هناك أكثر من طريقة لتصنيع الأجسام المضادة , واحدة من أكثر هذه الطرق شيوعاً لتصنيع **Antibody** مخصص لجسم ما (**Antigen**) هو حقن هذا الجسم الحيوان وبعد ذلك يتم استخلاص **Antibody** يسمى **Polyclonal** لأنه ناتج تصنيع عدة خلايا.

هنالك طريقة تصنيع **Antibody** أكثر تخصصاً **Monoclonal Antibody** هو ناتج تصنيع مجموعة خلايا متماثلة تماماً **Cell Line** .

ونحصل على هذه الخلايا بدمج خلية مصنعة للجسم المضاد مع خلية سرطانية لها القدرة على الانقسام إل ما لا نهاية.

المبحث الأول:

نشأة الاليزا

The origin of
Eliza

المبحث الأول : نشأة Elisa

The origin of Eliza

أولاً : تاريخ Elisa

في عام 1971م قام بيتر بيرلمان و ايفا انغفال في جامعة ستوكولم في السويد , وأنطونسكارزوبايك فان وييمين في هولندا بنشر أوراق بحثية تولدت هذه المعرفة في أساليب أداء الأثر البيئي Elisa.

وفي عام 2012م كان اختبار الحساسية Elisa القائم على الأنزيم ذلك باستخدام الجسيمات النانوية كمُرسل لوني قادر على إعطاء إشارة بالعين المجردة , يظهر اللون الأزرق للحصول على نتائج إيجابية , ولون أحمر للحصول على نتائج سلبية

ثانياً : تعريف تقنية Elisa

هو اختبار سريع و هذه التقنية تُستخدم لقياس تركيز مادة جزيئية مثل الهرمونات والمستضدات البكتيرية و الأجسام المضادة تستخدم البروتينات بدلاً من الجزيئات الصغيرة و الأيونات بدل الكلوكوز والبولتاسيوم . موجودة في السائل الحيوي كالسيرم . هذه المادة الجزيئية تُقاس عن طريق معرفة كمية الأجسام المضادة Antibody والتي ارتبطت بـ Antigen .



ثالثاً : مبدأ Elisa

تستند هذه التقنية على مبدأ **Enzyme immunoassay EIA**. في هذه التقنية تثبت الاضداد او المستضدات في حفر صفيحة بلاستيكية تدعى **Microtiter plate**. توضع عينات مصل المرضى وعينات السيطرة في حفر الـ **Microtiter plate** فيحدث ارتباط بين الاضداد و المستضدات. و بعد ساعة من الحضانة في درجة حرارة الغرفة، تغسل الصفيحة بواسطة محلول غسل خاص لإزالة المواد غير المرتبطة. بعد ذلك يضاف انزيم مرتبط بجزيئة الضد **Enzyme conjugate** و يحضن لمدة نصف ساعة. وبعد خطة غسل اخرى يتم اضافة المادة الاساس **Substrate** وتحضن الصفيحة لمدة 20 دقيقة ، حيث يظهر لون (أزرق عادةً) في الحفر. ثم يضاف بعد ذلك محلول **Stop solution** حيث يتغير اللون من الازرق الى الاصفر. تقاس شدة اللون باستخدام جهاز المطياف بطول موجي 450 nm. يتناسب تركيز الضد او المستضد المراد قياسه مع شدة اللون تناسباً طردياً.

رابعاً : مزايا Elisa

- 1- أقل تكلفة , و أكثر أماناً .
- 2- سهولة التصور من النتائج مع مستوى عالٍ من الدقة .
- 3- فحوصاته محددة وحساسة للغاية التي يمكن الكشف عن البروتين في pm, ومجموعة nm.
- 4- تتم بسهولة لأداء أعداد كبيرة من الاختبارات .
- 5- تتطلب الحد الأدنى في الكواشف (الكشف النوعي , او القياس الكميّ أمّا مستضد أو الأجسام المضادة).
- 6- يمكن القيام به من الموظفين مع الحد الأدنى من التدريب .

خامساً : تطبيقات Elisa

- 1- تحليل الهرمونات , و الفيتامينات .
- 2- رصد المخدرات العلاجية .
- 3- اجراءات التشخيص .
- 4- يستخدم في التشخيص الطبي للإنسان و الحيوانات .
- 5- يستخدم لقياس مستوى الأجسام المضادة (الحساسية , و اللقاحات) .
- 6- الكشف عن الفيروسات (التهاب الكبد , و أمراض فيروس نقص المناعة البشرية التناسلية) .
- 7- الكشف عن التغيرات الهرمونية (الحمل) .
- 8- الكشف عن علامات التهابات الدورة الدموية .

Elisa و فرقه عن Spector photometer

مقياس الطيف الضوئي Spector photometer :

هو دراسة كمية الطيف الكهرومغناطيسي , حيث يتعامل فقط مع الضوء المرئي , و الأشعة فوق البنفسجية , و الأشعة تحت الحمراء القريبة , وتعتمد فكرة الجهاز التحليل الطيفي على تسليط حزمة مركزة من شعاع ضوئي على العينة المراد تحليلها . ثم قياس شدة الضوء الممتص في العينة , و بالتالي تقدير تركيز مادة الاختبار .



الفرق بين Elisa و Spector photometer

الفرق الرئيسي بين القارئ لوحة الاليزا والمطياف هو أن قراءة الاليزا تستخدم عادة لقياس التراكيز على عدد كبير من العينات حيث يمكنك أيضا استخدام حجم صغير جدا من العينة. ويبدو أن المقياس الطيفي أكثر تعقيدا وأكثر تفصيلا .

المبحث الثاني :

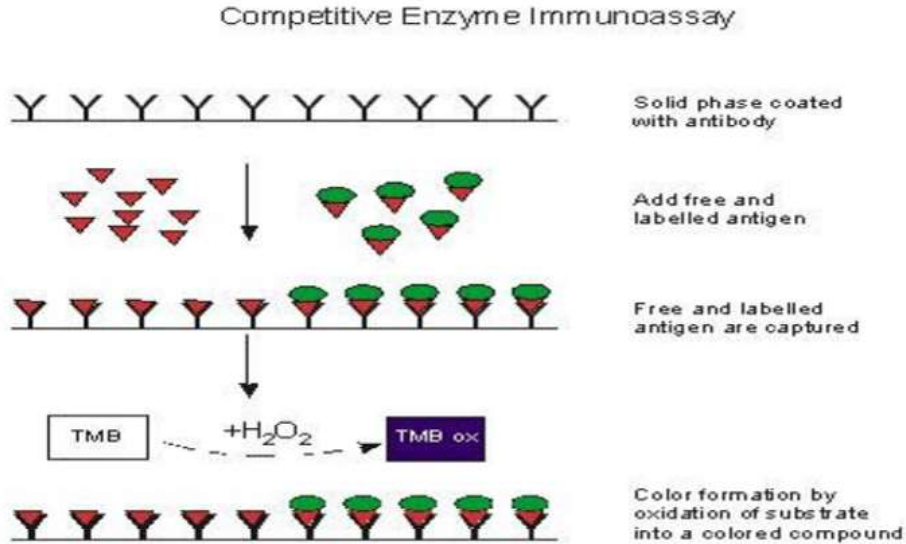
أنواع قياسات
الاليزا (Elisa)

المبحث الثاني : أنواع و قياسات Elisa

- أقسام تقنية Elisa :

أولاً : قياسات مناعية تنافسية Competitive Elisa

في هذه الحالة يتنافس **Antigen** المطلوب قياسه في العينة مع **Labeled Antigen** للارتباط بالجسم المضاد . و في هذه الحالة تكون العلاقة عكسية بين كمية **Antigen** المطلوب قياسه مع **Labeled Antigen** .



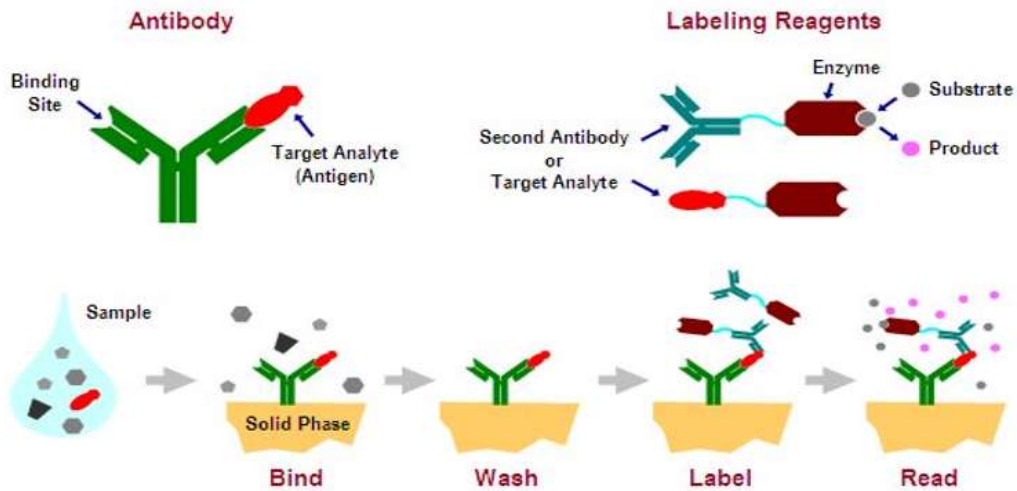
ثانياً : قياسات مناعية غير تنافسية Sandwich Elisa وتسمى أيضا قياسات مناعية مباشرة Direct ELISA

يكون المطلوب الكشف عن **Antigen** , و قياس تركيزه في العينة , فيكون طبق الاليزا مغطى بالجسم المضاد **Antigen** .

عندما يكون المطلوب الكشف عن **Antigen** وقياس تركيزه في العينة , ففي هذه الحالة :

- 1 يرتبط **Antigen** في العينة مع الجسم المضاد .
- 2 يتم غسل الطبقة لإزالة الأجسام المضادة غير المرتبطة .
- 3 بعد ذلك تتم إضافة أجسام مضادة أخرى و تكون هذه الاجسام المضادة مرتبطة بإنزيم .
- 4 يتم غسل الطبقة أيضاً لإزالة الأجسام المضادة غير المرتبطة .
- 5 ثم تضاف المادة الاساس للإنزيم , ويتم حساب كمية **Antigen** عن طريق قياس كمية ناتج التفاعل .

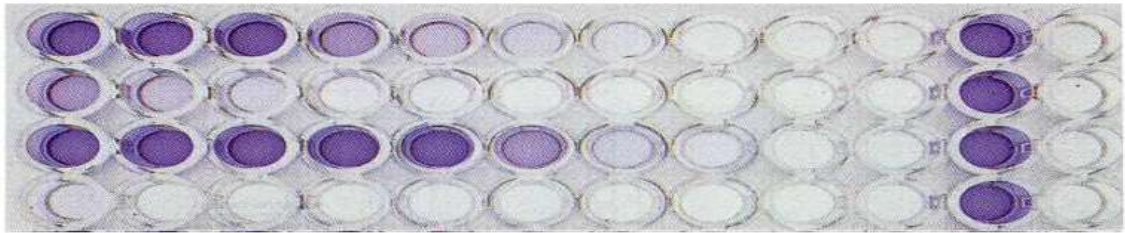
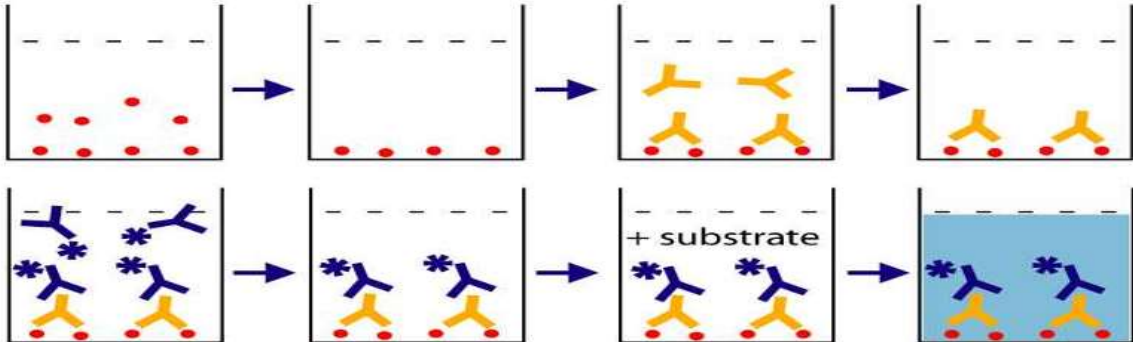
ELISA



ثالثاً : قياسات مناعية غير مباشرة Indirect Elisa

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

- 1 يُضاف **Antigen** المخصص لطبق الاليزا و يُترك فترة حتى يلتصق .
- 2 يُضاف السيرم المحتوي على أنواع مختلفة من **Antibody** تُسمى **Primary Antibody** .
- 3 يرتبط **Antibody** في السيرم مع **Antigen** الموجودة في الطبقة .
- 4 يتم غسل الطبقة لإزالة **Antibody** غير المرتبط .
- 5 يُضاف **Antigen** آخر مرتبط بإنزيم **Secondary Antibody** وهذا يمكنه الارتباط فقط في حال ارتباط **Primary Antibody** بالعينة الموجودة بالطبق .
- 6 يتم غسل الطبقة لإزالة **Antibody** غير المرتبط .
- 7 تُضاف المادة الأساس للإنزيم , ويتم حساب كمية **Antibody** عن طريق قياس كمية ناتج التفاعل .



- مكونات Elisa

لوحة (Well) مع 8 شرائط عمودية و 12 تتضمن 96 well (حجيرة) يحدث التفاعل داخلها

انتيجن Antigen

الاجسام المضادة Antibodies

محاليل مظهرة للون

محاليل لوقف التفاعل

ومن شروطه يكون الشحن في حزمة باردة و تكون على شكل طبقات .

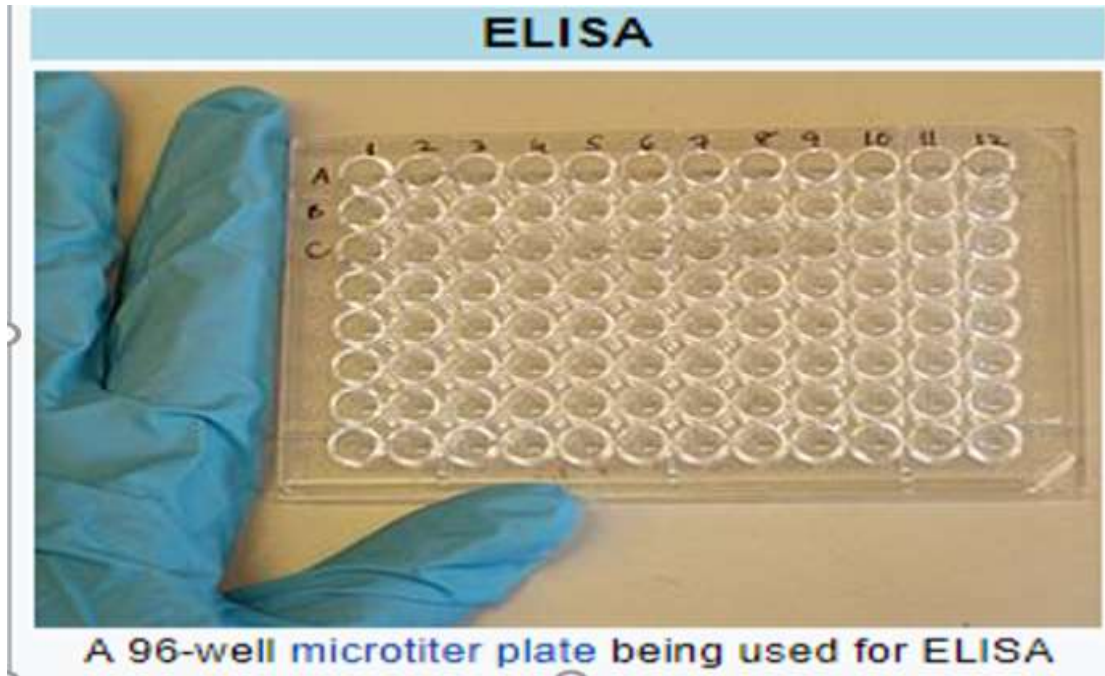
- شكل اللوحة :

تستخدم اللوحات مسطحة مكونة من 96 جدار مصنوعة من البوليسترين

او كلوريد البولي فينيل في الغالبية العظمى .

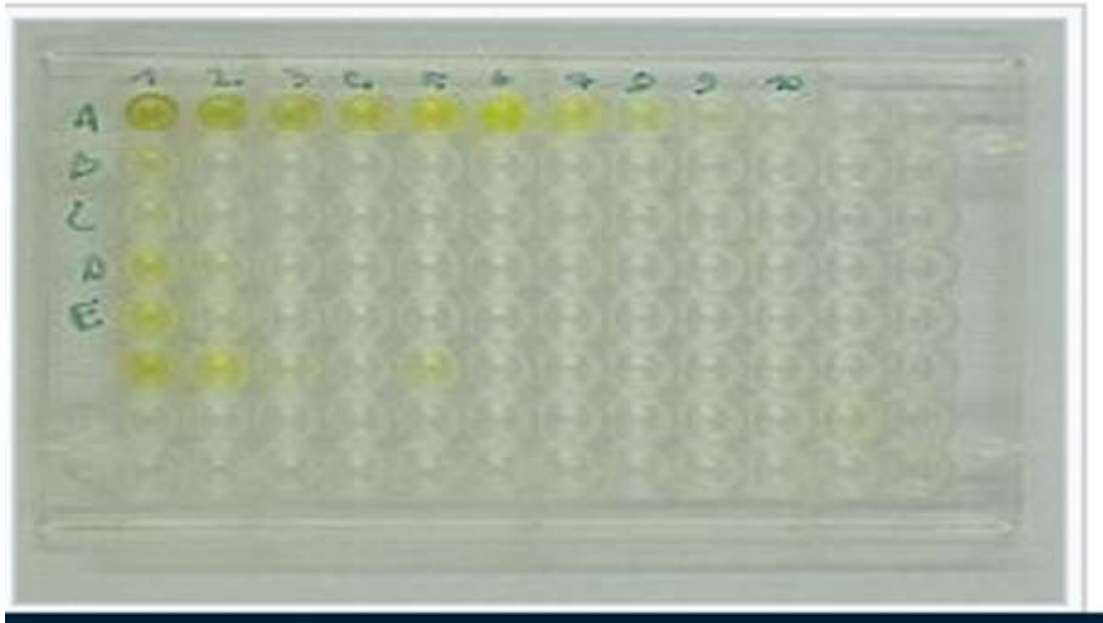
- خصائص اللوحة :

من المهم استخدام لوحات مخصصة للاليزا ؛ لأنها يتم تصنيعها للحفاظ على الالتصاق و التقليل من آثار الحافة و توفير الظروف البصريّة الأمثل لجميع البيانات .



- المخازن المؤقتة القياسية للاليزا :

تستخدم عدة مخازن مختلفة خلال الاليزا , واحدة للطلاء , و واحدة للحجب , وأخرى للغسيل, و أخرى لعينة و تجفيف الأجسام المضادة .



فهرس المصادر و المراجع

- المصادر والمراجع :

- 1- Yalow, Rosalyn S.; Berson, Solomon A. (1960). .
"Immunoassay of endogenous plasma insulin in man". The
Journal of Clinical Investigation. 39: 1157–75.
- 2- Lequin, R. M. (2005). "Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-
Linked Immunosorbent Assay (ELISA)".
Clinical Chemistry. 51 (12): 2415-8
- 3- Engvall, Eva; Perlmann, Peter (1971). "Enzyme-linked
immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of
immunoglobulin G". Immunochemistry. 8 (9): 871–4.
- 4- Van Wee men, B.K.; Schuurs, A.H.W.M. (1971).
"Immunoassay using antigen—enzyme conjugates". FEBS
Letters. 15 (3): 232–236.
- 5-Leng, S. X.; McElhaney, J. E.; Walston, J. D.; Xie, D.; Fedarko,
N. S.; Kuchel, G. A. (2008). "ELISA and Multiplex Technologies
for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging
Research". The Journals of Gerontology Series A: Biological.
Sciences and Medical Sciences. 63 (8): 879–84.