جـــــــامعة الانبـــــار
الكلية : التربية للعلوم الصرفة

القسم أو الفرع : علوم الحياة

استاذ المادة : م.م. وجدان حميد عبدالرزاق صلبي الكبيسي

اسم المادة باللغة العربية : علم المناعة ـ العملي

اسم المادة بالإنكليزي Immunology- practical :

اسم المحاضرة العاشرة باللغة العربية : الفحوصات المناعية

اسم المحاضرة العاشرة باللغة الإنكليزية : Immuno - Assays

علم المناعة العملي

Lab 10 **Practical Immunology** 2024-2023

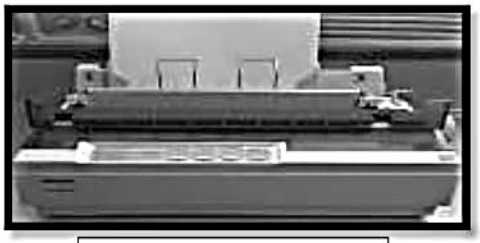
الفحوصات المناعية (Immuno-Assays)

1- فحص اليزا او فحص الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .

- يعتبر فحص اليزا من الفحوصات المناعية الشائعة والأكثر حساسيه، ويمكنه الكشف عن تراكيز واطئة من المواد المفحوصة.
- له اهمية في ايجاد نوع وتركيز المادة المراد تحليلها (Ab او Ag غالبا) الموجودة في محلول.
- يستعمل في تشخيص الكثير من الامراض مثل الايدز وداء المقوسات وغيرها.
- له اهمية في الصناعات الغذائية وخصوصا تشخيص المواد المسببة للحساسية في الاغذية مثل الحليب والجوز والبيض وغيرها.
- يستعمل في علم السموم كفحص سريع لأصناف معينة من العقاقير.

المواد الاساسية المستعملة في فحص ELISA

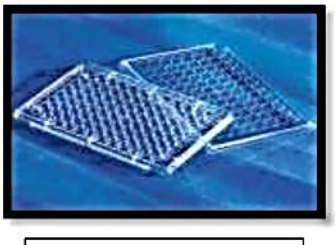
تستعمل في فحص ELISA مواد مختلفة اهمها جهاز اليزا القارئ (ELISA Reader) والطابعة (Printer) والعدة الخاصة بالفحص (ELISA kit) ولكن تختلف مكونات العدة حسب الشركة المصنعة واهم مكوناتها هي الاجسام المضادة او المستضدات النوعية (Specific Abs or Ags) ومحاليل الغسل والغلق والكشف وغيرها من المحاليل كما قد تحتوي على طبق المعايرة الدقيق (Microtiter plate) وغيرها من المكونات. ومن المواد الاخرى المستعملة هي الماصة الدقيقة (Micropipette). وفيما يلي صور لاهم المواد المستعملة في تحليل ELISA:-



Printer

ELISA Reader

Micropipette



Microtiter plate

ELISA Kit

خطوات فحص اليزا Steps of ELISA

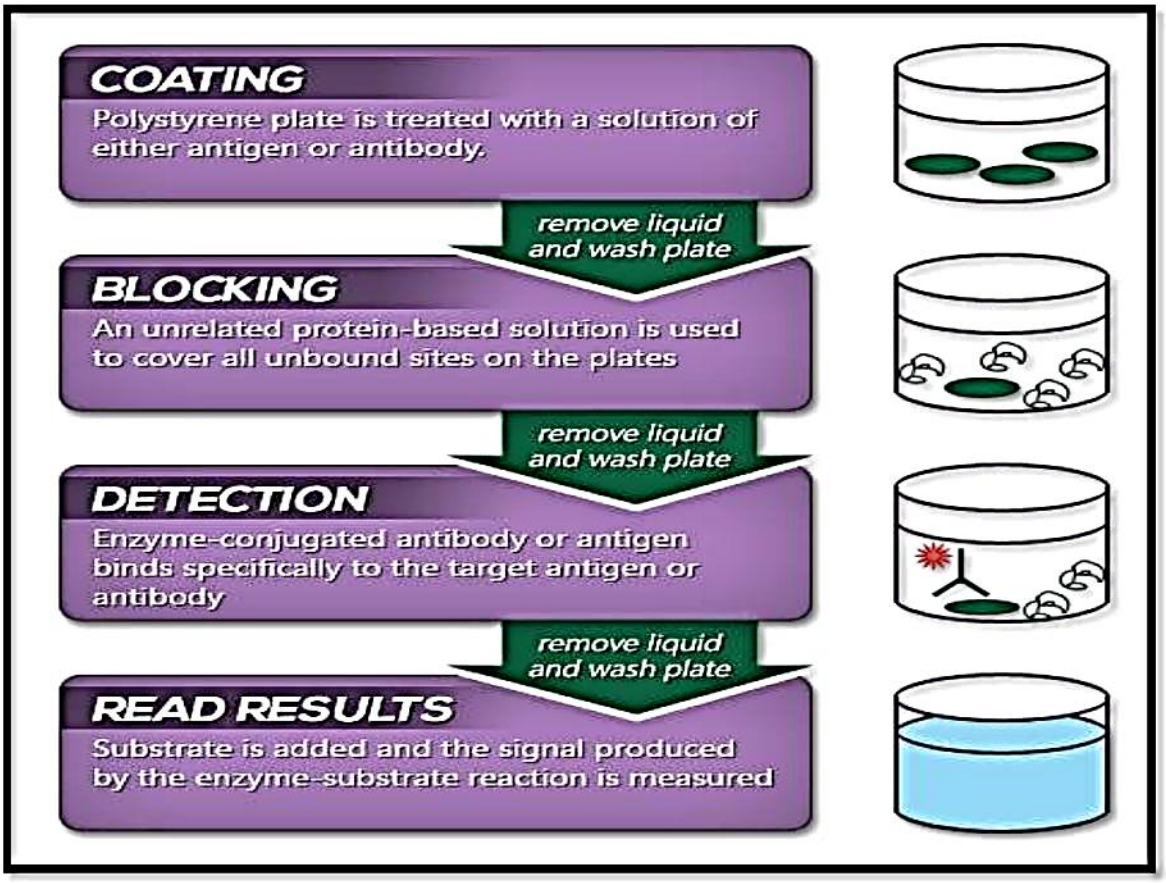
1- التغليف او الطلاء Coating: تغلف الحفر في طبق المعايرة الدقيق Microtiter plate بمحلول الجسم المضاد أو المستضد.

2- الاغلاق Blocking : تغطى جميع الاماكن غير المغلفة في الخطوة الاولى بمحلول بروتيني يختلف تماما عن البروتين في خطوة التغليف (الجسم المضاد او المستضد) غالبا ما يستعمل محلول دارئ الفوسفات المتعادل PBS.

3- الكشف Detection: اضافة المستضد او الجسم المضاد النوعي المرتبط بالإنزيم، حيث يرتبط مع الجسم المضاد او المستضد المستهدف.

4- قراءة النتائج Read results: تضاف المادة الاساس Substrate التي يعمل عليها الانزيم، وتقاس الاشارة (تغير اللون) الناتجة من تفاعل الانزيم مع المادة الاساس اذا كانت النتيجة موجبة (تقاس امتصاصية الضوء النافذ من خلال المحلول بجهاز ELISA Reader).

ملاحظة: تجرى عملية التخلص من المحلول الزائد والغسل بعد كل خطوة من خطوات الفحص.

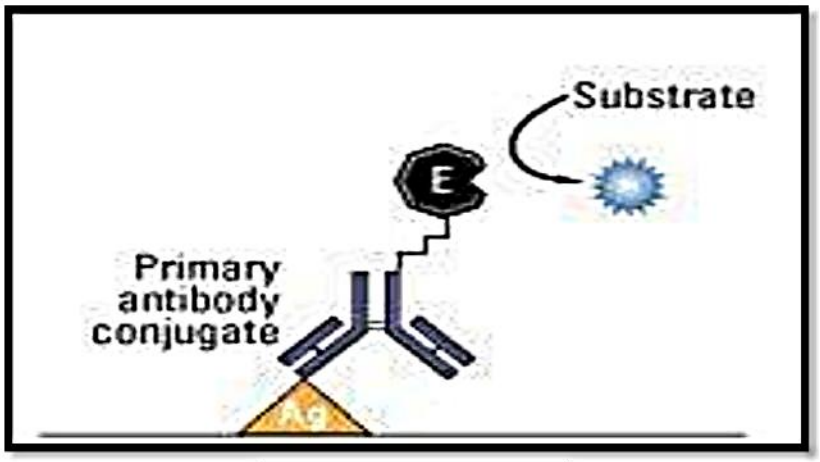


Steps of ELISA

انواع فحص اليزا Types of ELISA

1- فحص اليزا المباشر Direct ELISA

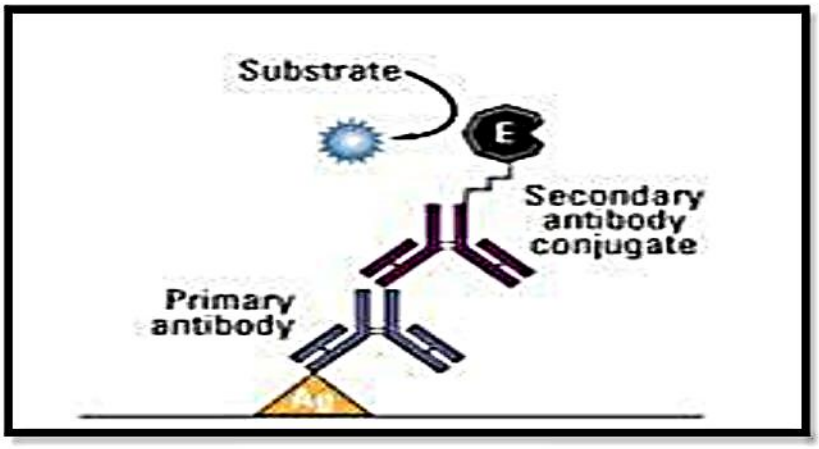
- يغلف الطبق بالمستضد المراد تشخيصه Antigen of interest.
- يضاف الجسم المضاد المرتبط بالإنزيم (Primary Conjugated Ab) مباشرة.



Direct ELISA

2- فحص اليزا غير المباشر Indirect ELISA

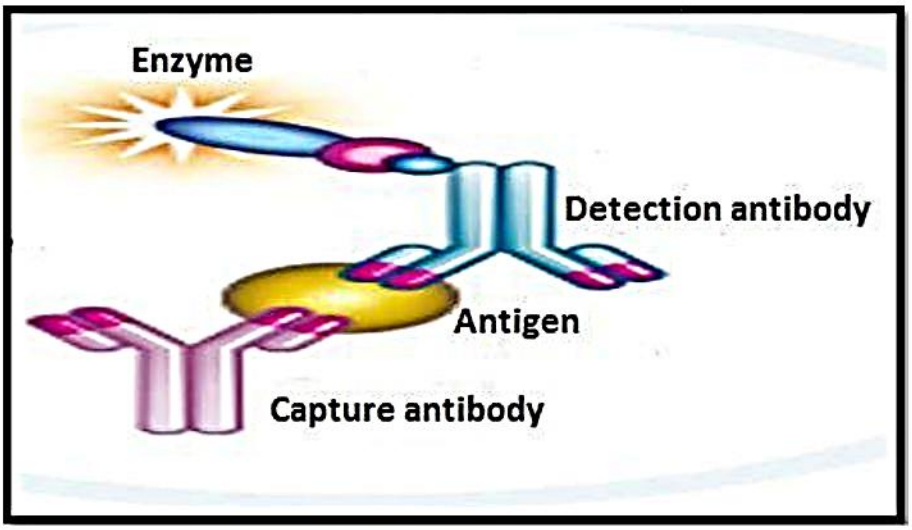
- يغلف الطبق بالمستضد المراد تشخيصه Antigen of interest.
- يضاف الجسم المضاد الاول غير المرتبط بالإنزيم Primary Unconjugated Ab.
- يضاف الجسم المضاد الثاني المرتبط بالإنزيم Secondary Conjugated Ab.



Indirect ELISA

3- فحص اليزا الشطيرة Sandwich ELISA

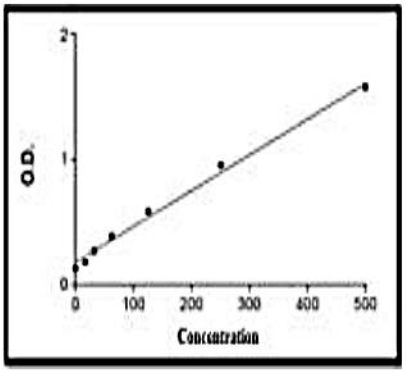
- يغلف الطبق بجسم مضاد غير مرتبط بالإنزيم يسمى Capture Ab.
- يضاف المستضد المراد تشخيصه Antigen of interest.
- يضاف الجسم المضاد المرتبط بالإنزيم ويسمى Detection Ab.



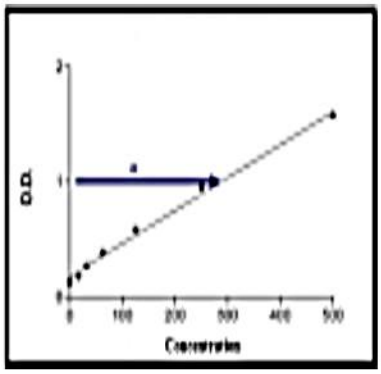
Sandwich ELISA

حساب النتائج

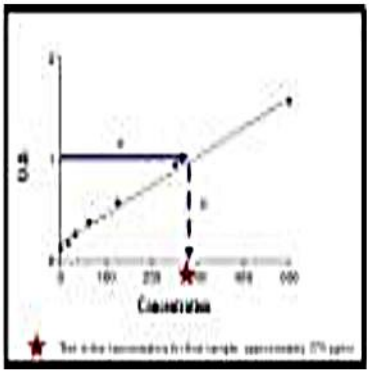
يجب ان يحضر محلول قياسي بتراكيز مختلفة معلومة وتقاس الامتصاصية لكل تركيز من التراكيز وتستعمل هذه المعلومات في رسم المنحنى القياسي Standard Curve، وبعد ذلك تقاس الامتصاصية للمادة المراد الكشف عنها وتثبت قيم الامتصاصية على المحور الصادي ومن ثم يرسم خط يمتد الى المنحنى القياسي ومن ثم خط آخر من المنحنى القياسي الى المحور السيني ويستخرج التركيز المجهول كما موضح في الصور التالية.



1



2



3

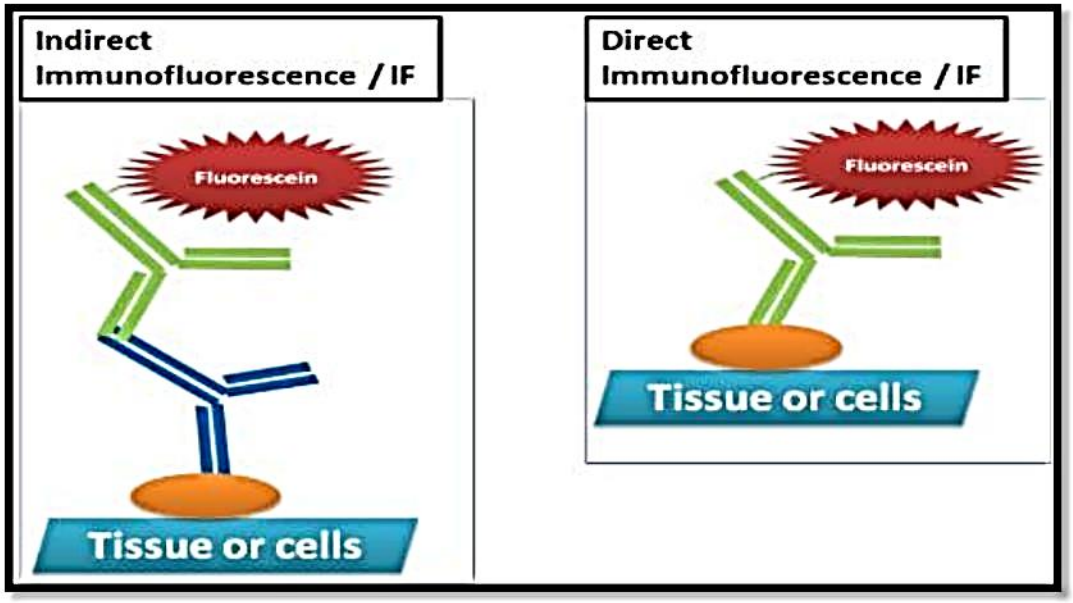
2- التألق المناعي Immunofluorescent (IF)

- اساس الفحص هو التفاعل بين المستضد الموجود في النسيج او الخلايا المفردة مع الجسم المضاد.
- يربط الجسم المضاد مع الصبغة المتألقة Fluorescent dye، Fluorochrome اوFluorophore مثال عليها صبغة **(FITC) fluorescein isothiocyanate**.
- تشاهد المعقدات المناعية عن طريق انواع مختلفة من المجاهر منها Ultraviolet Microscope و Fluorescent Microscope وغيرها من المجاهر.

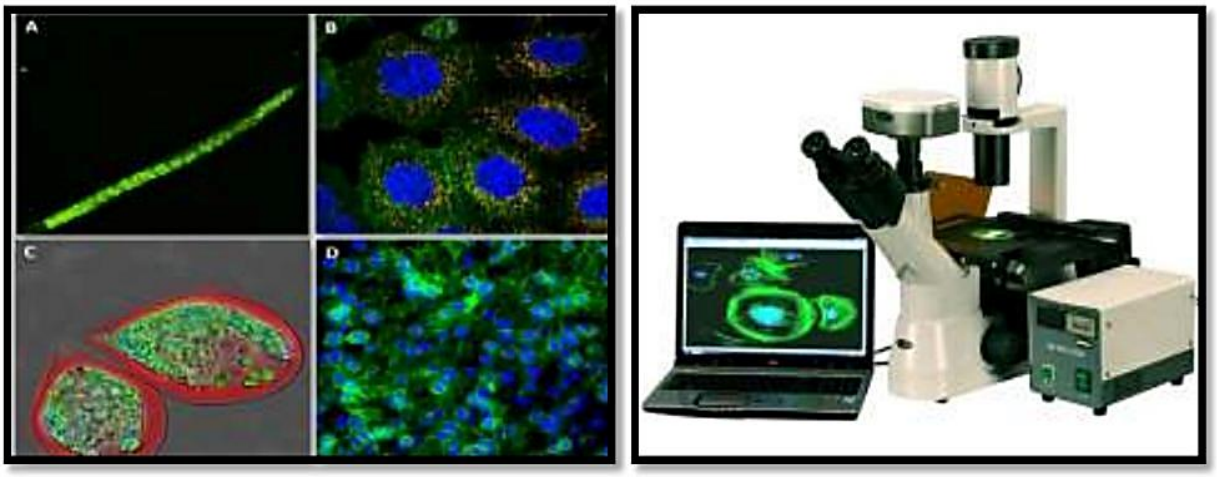
أنواع فحص التالق المناعي

1- التألق المناعي المباشر Direct IF: يستعمل فيه جسم مضاد واحد Primary Ab معلم بالصبغة المتألقة، لذا فهو يحتاج الى وقت قليل لإنجازه بسبب قلة عدد خطواته ودقته اقل لكن تكلفته منخفضة قياسا بالنوع الاخر.

2- التالق المناعي غير المباشر Indirect IF: يستعمل فيه نوعين من الاجسام المضادة الاول غير معلم بالصبغة المتألقة ويسمى Primary Ab بينما يكون الجسم المضاد الثاني معلم بالصبغة المتألقة ويسمى Secondary Ab وبما ان خطواته اكثر بسبب وجود نوعين من الاجسام المضادة لذا فان تكلفته اعلى ويستغرق وقت اكثر لكن دقته اعلى من النوع الاول.



Types of IF



Fluorescent Microscope

Ultraviolet Microscope

المصادر العربية

١- الوافي في المناعة / د. اسامة ناظم نجرس / جامعة سامراء العراق ٢٠١٧

٢- اساسيات علم المناعة / د . محمد عبدالعزيز ٢٠١٦

٣- اساسيات علم المناعة / د.غسان العبدالرحمن & د.صباح بلاج ٢٠٠٥

جامعة حلب كلية العلوم

المصادر الاجنبية

1- Williams, C. A., and Chase, M. W. (Eds.). (2014). Antigen-Antibody Reactions In Vivo: Methods in Immunology and Immunochemistry, Vol. 5 (Vol. 5). Academic Press.

2- Linars, PPAM, Rotterdam, Quidam, MA, Wester, PW, Bowmans, V., Klasin, E., and Hendriksen, CFM (1998). Evaluation of side effects from the injection of different combinations of auxiliary substances/antigens in rabbits and mice. Laboratory animals, 32 (4), 387-406.

3- Machholz, E., Mulder, G., Ruiz, C., Corning, B. F., and Pritchett-Corning, K. R. (2012). Manual restraint and common compound administration routes in mice and rats. JoVE (Journal of Visualized Experiments), (67), e2771.

4- **Atcha, Z., Rourke, C., Neo, A. H., Goh, C. W., Lim, J. S., Aw, C. C., ... and Pemberton, D. J. (2010).** Alternative method of oral dosing for rats. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 49(3), 335-343

5-Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pillai, S. (2014). Basic immunology: functions and disorders of the immune system. Elsevier Health Sciences

6- Vashist, S. K., and Luong, J. H. (2018). Immunoassays: an overview. Handbook of Immunoassay Technologies, 1-18