



گزیده‌ای از روش‌های ایمونوشیمی و کاربرد آن در تشخیص بالینی

تالیف:

دکتر کبری امیدفر

عضو هیات علمی پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر ملیحه پاک نژاد

عضو هیات علمی گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر سهیلا کاشانیان

عضو هیات علمی گروه شیمی، دانشکده شیمی، دانشگاه رازی کرمانشاه

با همکاری:

زینب شیروانی

پژوهشگر، پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

عنوان و نام پدیدآور: گزیده‌ای از روش‌های ایستوفی و گازبرد آن در تشخیص بالینی / تألیف کبری امیدفر، ملیحه پاک‌نژاد، سهیلا کاشانیان، با همکاری زینب شیروانی.

مشخصات نشر: تهران: ویستا؛ دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، مرکز تحقیقات غده درون‌ریز و متابولیسم، ۱۳۸۹.

شماره: 978-964-2997-51-0

یادداشت: کاتنامه.

موضوع: ایمنی شماسی شیمائی

شناسه افزوده: پاک نژاد، ملیحه، ۱۳۴۵

شناسه افزودن: کاشانیان، سهیلا، ۱۳۴۱

شماره افزوده: شيراز، زمين، ۱۳۷۱

شانه افزوده: دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، مرکز تحقیقات غده درون ریز و متابولیسم

داده بندی، کنگره: ۱۳۸۹/۱۸۳/۱QR الف ۱۳۸۹

ردہ بندی دیوے : ۶۱۷۰۷۹

شماره گاشناسی، علمی: ۸۰۵۶۶۱۲

نام کتاب:	گزیده‌ای از روش‌های ایمنوشیمی و کاربرد آن در تشخیص بالینی
تألیف:	دکتر کبری امیدفر و همکاران
ناشر:	ویستا
نوبت چاپ:	ویرایش اول، چاپ اول ۱۳۸۹
شمارگان:	۱۰۰۰ جلد
بها:	۲۵۰۰۰ ریال

پارو هشنگده علوم عدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران: تهران، خیابان فارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، کد پستی: ۱۴۱۱۴، تلفن: ۸-۸۴۲۰۰۳۷، نمابر: ۸۴۲۰۰۵۲، پست الکترونیک: emro@iums.ac.ir

حق چاپ محفوظ است

شماره: ۹۷۸-۹۷۴-۲۹۹۷-۵۱-۰

ISBN: 978-964-2997-51-0



لیتوگرافی، چاپ و صحافی: سازمان چاپ و انتشارات

پیش گفتار

همکاری علوم پایه و بالینی راه اصلی در تحقیقات آینده پزشکی است. تلاشهای متعدد و سیاست علمی در این بخش طراحی نقشه راهی است که بتواند علوم پایه و بالینی را با هم همراه سازد. این کار باعث عمق و دقت افزون تر در تحقیقات بالینی و همچنین یافتن کاربردهای بالینی برای تحقیقات پایه می شود.

امروزه با استفاده از فناوریهای ایمونوشیمی شناسایی تغییرات ایجاد شده در مایعات بیولوژیک، سلولها و ارزیابی درمان بیماریها و بسیاری از ناشناخته های دیگر علوم پزشکی توسط دانشمندان کشف و مورد بررسی قرار گرفته است. استفاده از آنتی بادیها در کمک به تشخیص بالینی بیماریها امری متداول و رایج گشته به نحوی که بیشتر کیت های آزمایشگاهی براساس واکنش آنتی ژن - آنتی بادی ساخته می شوند. سال های اخیر شاهد رشد چشم گیر این فناوریها بوده به ترتیبی که محققان توانسته اند حتی تعداد کمی از یک آنالیت را در حجم اندکی از نمونه مورد شناسایی و ارزیابی قرار دهند.

در این کتاب سعی ما بر این است که ابتدا با توجه به نقش بارز تکنیکهای ایمونوشیمی، توانایی این تکنیکها را در تشخیص بالینی بیماریها نزد کلیه محققین علوم پایه و پزشکی و ضرورت داشتن اطلاعات بیشتر در خصوص توانایی این تکنیکها و همچنین کاربرد وسیع آن در تشخیص بالینی نمایان سازیم. در ادامه به نحوه انتخاب نمونه، جداسازی، نگهداری و روش اندازه گیری تعدادی از آنالیتها که در آزمایشگاه تشخیص طبی اندازه گیری می شوند خواهیم پرداخت.

فهرست

۳۰ mRNA	۱-۴-۲-۴-۱ نمایش	۱ مقدمه‌ای بر ایمنونوشیمی
۳۰ mRNA-DNA	۵-۲-۲-۴-۱ نمایش پروتئین	۵ تست‌های سریع
۳۰ نمایش ریبوزومی	۶-۲-۲-۴-۱	۶ ایمنونوکروماتوگرافی
۳۱ فناوری نمایش فازی	۷-۲-۲-۴-۱	کیت‌های ایمنونوکروماتوگرافی ۶
۳۲ ۵-۱ تولید آنتی‌بادی		۷ سنجش‌های ایمنی و روند روبه‌رشد آن
۳۲ ۱-۵-۱ انتخاب حیوان برای تولید آنتی‌بادی		۹ ۱- آنتی‌بادی
۳۳ الف- خرگوش		۱۰ ۱-۱ مروری بر ساختار آنتی‌بادی ها
۳۳ ب- مرغ		۱۵ ۲-۱ معرفی آنتی‌بادی‌های ششی
۳۴ ج- موش		۱۷ ۳-۱ سیستم ایمنی در پستانداران و پرندگان
۳۴ د- رت، هامستر و خوکچه هندی		۱-۳-۱ سیستم ایمنی سلولی
۳۵ ۵- حیوانات مزروع		۱۸ ۲-۳-۱ پاسخ ایمنی همورال به آنتی‌ژن‌های پروتئینی
۳۵ ۵-۱-۲-۵-۱ سن، جنسیت و تعداد		۱۸ ۴-۱ انواع آنتی‌بادی
۳۶ ۳-۵-۱ پروتکل‌های ایمنونیزاسیون		۲۰ ۱-۴-۱ آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال
۳۶ الف- اندازه و حالت آنتی‌ژن		۲۴ ۲-۴-۱ آنتی‌بادی مونوکلونال
۳۸ ب- تهیه مخلوط‌های آنتی‌ژن برای تزریق		تهیه آنتی‌بادی مونوکلونال با استفاده از فناوری ادغام
۳۸ ج- مقدار آنتی‌ژن		سلولی
۳۹ د- نوع و تعداد جایگاه‌های تزریق		۲۵ تکثیر کلونی‌ها در آزمایشگاه
۴۰ ه- روش معمول جهت ترسیمات ثانویه (بوسترها)		۲۸ تکثیر کلونی‌ها در موجود زنده
۴۰ و- جدول زمانی ایمنونیزاسیون		۲-۴-۱-۲ روش‌های نوین تولید آنتی‌بادی مونوکلونال
۴۰ ۴-۵-۱ ادجوانت‌ها		۲۹ تهیه آنتی‌بادی مونوکلونال با استفاده از روش‌های
۴۱ الف- ادجوانت فروند		مهندسی ژنتیک
۴۱ ب- نمک‌های آلومینوم		۲۹ ۱-۲-۲-۴-۱ هیپریدسازی
۴۲ ج- ادجوانت آلبومین سرم گاوی متیله شده		۲۹ ۲-۲-۲-۴-۱ انسانی کردن
۴۲ Borderella pertusis		۳۰ ۳-۲-۲-۴-۱ تراریختگی
۴۲ ۶-۱ تخلیص آنتی‌بادی		
۴۲ الف- مراحل تخلیص IgG از سرم		

- ب- مراحل تخلیص IgG از محیط کشت هیبریدوما
 ۴۲.....
 ۱-۶-۱ رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات..... ۴۳
 ۲-۶-۱ روش‌های کروماتوگرافی برای خالص‌سازی
 IgG..... ۴۴
 ۱-۲-۶-۱ کروماتوگرافی تعویض یون..... ۴۴
 ب- آماده‌سازی تبادل‌کننده یونی..... ۴۴
 ج- انتخاب بافر برای تبادل‌کننده یونی..... ۴۴
 د- آماده‌سازی رزین ماده‌کننده DEAE سلولز..... ۴۵
 ه- انتقال نمونه به ستون..... ۴۵
 و- آماده‌سازی رزین ماده‌کننده کاتیونی کربوکسی
 متیل سلولز (CM-سلولز)..... ۴۶
 ۲-۲-۶-۱ تخلیص با ستون کروماتوگرافی افقی
 پروتئین A یا پروتئین G..... ۴۶
 ۳-۲-۶-۱ تخلیص با پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG)..... ۴۶
 ۴-۲-۶-۱ اندازه‌گیری خلط آنتی‌بادی تخلیص شده
 با روش برادفورد..... ۵۱
 معرف برادفورد..... ۵۲
 - استاندارد پروتئینی..... ۵۲
 - ظروف مورد استفاده..... ۵۲
 ۲- طراحی سنجش..... ۵۲
 ۱-۲ تثبیت واکنش‌دهنده‌های ایمنی بر روی سطح
 جامد..... ۵۳
 ۱-۱-۲ استفاده از پلاستیک به عنوان فاز جامد..... ۵۴
 الف - جذب غیرکوالان پروتئین بر سطوح
 پلاستیک..... ۵۴
 ب- اتصال کوالان پروتئین بر سطوح پلاستیکی..... ۵۵
 ج- اتصال آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن بر سطوح پلاستیکی
 توسط پل زدن بوسیله مولکول‌ها..... ۵۶
 ۲-۱-۲ استفاده از غشای نیتروسلولز و کاغذ به
- عنوان فاز جامد..... ۵۶
 ۳-۱-۲ استفاده از شیشه به عنوان فاز جامد..... ۵۶
 ۴-۱-۲ فازهای جامد ذره‌ای..... ۵۷
 ۵-۱-۲ فازهای جامد آگارز، سلولز و سفاکریل..... ۵۷
 ۶-۱-۲ ذرات لاتکس (ذرات آلی)..... ۵۷
 ۷-۱-۲ ذرات معدنی..... ۵۸
 ۸-۱-۲ ذرات طلا..... ۵۸
 ۹-۱-۲ Nanodevice..... ۵۹
 ۲-۲ کونژوگاسیون..... ۵۹
 ۱-۱-۲-۲ روش‌های متداول اتصال آنتی‌بادی به
 آنزیم..... ۶۰
 ب- اتصال بواسطه گروه‌های آلدهیدی پس از
 اکسیداسیون توسط پریدات..... ۶۰
 روش انجام کونژوگاسیون..... ۶۱
 ج- کونژوگاسیون با استفاده از مالئیمید/گروه‌های
 SH..... ۶۲
 ۲-۲-۱ آنزیم‌های مارکر..... ۶۲
 ۳-۱-۲-۲ خالص‌سازی کتروگه آنزیمی..... ۶۳
 ۴-۱-۲-۲ پایدارسازی و ذخیره کتروگه آنزیمی..... ۶۴
 ۲-۲-۲ اتصال آنتی‌بادی به بیوتین..... ۶۴
 ۳-۲-۲ نشانگرهای رادیوایزوتوپ..... ۶۴
 ۱-۳-۲-۲ اتصال آنتی‌بادی به پد رادیوایزوتوپ..... ۶۵
 ۳- سنجش‌های ایمنی..... ۶۸
 ۴- کاربرد ایمونوئیمی در تشخیص بالینی..... ۷۹
 آنتی‌ژن اختصاصی پروستات (PSA)..... ۸۳
 تست‌شرون..... ۸۳
 آنتی‌ژن کارسینوما امبریونیک..... ۸۴
 گنادوتروپین کوریونی انسان..... ۸۴
 هورمون انسولین..... ۸۵
 پپتید C..... ۸۶

- ۹۶..... گیرنده نوع اول کمپلمان (CR₁ یا CD₃₅)
- ۹۷..... گیرنده نوع دوم کمپلمان (CR₂ یا CD₂₁)
- ۹۷..... گیرنده نوع سوم کمپلمان (CR₃)
- ۹۷..... گیرنده نوع چهارم کمپلمان (CR₄ یا CD₃₅, CD₃₁, CD₁₈)
- ۹۷..... گیرنده های قطعات آنافیلاتوکسین C_{3a}, C_{4a}, C_{5a}
- ۹۸..... خواص بیولوژیکی قطعات آنافیلاتوکسین
- ۹۸..... آدیونکتین
- ۹۸..... لپتین
- ۹۹..... فاکتور نکروزدهنده تومور (TNF- α)
- ۱۰۰..... ایترلوکین ۱
- ۱۰۱..... اثرات بیولوژیک
- ۱۰۱..... ایترلوکین ۲
- ۱۰۳..... مراجع
- ۱۷..... هورمون پاراتیروئید (PTH)
- ۱۸..... هورمون محرک قشر آدرنال (ACTH)
- ۱۹..... ۲۵ هیدروکسی ویتامین D (25 (OH)D₃)
- ۹۰..... سیکلوسپورین
- ۹۱..... فاکتور رشد شبه انسولین ۱
- ۹۱..... کانکول آمین ها
- ۹۲..... FT₄ و FT₃
- ۹۳..... هورمون محرک تیروئید (TSH)
- ۹۳..... T₃
- ۹۴..... T₄
- ۹۵..... T₃ uptake
- ۹۶..... تیروگلوبولین
- ۹۶..... گیرنده برای پروتئین های کمپلمان

مقدمه‌ای بر ایمونوشیمی

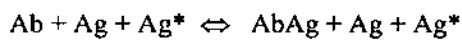
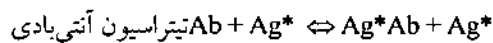
ایمونواسی^۱ یکی از انواع سنجش‌های اتصالی است که اساس آن اتصال ویژه یک مولکول اتصال دهنده به یک لیگاند می‌باشد. این سنجش‌ها بطور وسیع به منظور شناسایی میزان آنتی‌بادی و یا آنتی‌ژن‌های آلی مانند هورمون‌ها، پروتئین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها، هاپتن‌ها، پپتیدها، هیدروکربن‌های آروماتیک، داروها، توکسین‌ها و و هم‌چنین مولکول‌های معدنی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

سنجش‌های ایمنی بسیار دقیق، حساس و اختصاصی بوده و امروزه بخش بسیار مهمی از اندازه‌گیری‌های رایج در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و آزمایشگاه‌های کنترل کیفیت مواد غذایی، آزمایشگاه‌های کنترل کیفیت آب و هوا و اجزاء محیط زیست و بسیاری دیگر از زمینه‌های پزشکی، اقتصادی و صنعتی توسط روش‌های مبتنی بر این نوع سنجش استوار است. اساس سنجش‌های ایمنی که عمده‌ترین سنجش تشخیصی بوده و هنوز هم یکی از سریع‌ترین فناوری‌های در حال رشد به منظور آنالیز بیومولکول‌ها می‌باشند، آنتی‌بادی است. آنتی‌بادی ترکیبی است که به طور اختصاصی بر علیه گروه‌های شیمیایی موجود در پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، اسیدهای نوکلئیک و یا حتی ترکیبات ساده‌تر مانند هاپتن‌ها با وزن مولکولی

کمتر از ۱۰۰۰ دالتون تهیه و تولید می‌شوند. کاربرد این گونه ترکیبات (آنتی‌بادی‌ها) به منظور شناسایی، تعیین، تخلیص و یا ایزوله کردن مولکول‌های مختلف در مایعات بیولوژیک و یا در سطح سلول موجب ایجاد انقلابی در تحقیقات بیولوژیکی شده است. بیش از ۷۵ سال است که آنتی‌بادی به عنوان عنصری کارآمد و با ویژگی و تمایل بالا مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد که مؤید این مطلب بیش از $10^3 \times 3$ گزارش بوده که نشان‌دهنده بازده موفقیت‌آمیز دانشمندان در زمینه توسعه این فناوری می‌باشد.

اگرچه آنتی‌بادی تنها مولکولی نیست که برای اندازه‌گیری آنتی‌ژن مورد استفاده قرار می‌گیرد ولی کاربردی‌ترین و اختصاصی‌ترین آنها نسبت به سنجش‌های بیواسی، گیرنده و آنزیم‌ها می‌باشد. کاربرد آنتی‌بادی به عنوان عنصری کارآمد در تعیین و اندازه‌گیری کمی و کیفی مولکول آنالیت در سال ۱۹۵۹ برای اولین بار با کار یالو و برسون^۲ در خصوص اندازه‌گیری مولکول انسولین، شکل گرفت و روش RIA با استفاده از (I^{131}) متصل شده به باقیمانده‌های تیروزین مولکول انسولین به منظور اندازه‌گیری این مولکول در سال ۱۹۶۰ توسط این دو دانشمند به جهان معرفی شد که در نهایت منجر به دریافت جایزه نوبل پزشکی در سال ۱۹۷۷ توسط آنها گردید. دهه هفتاد، سال‌های رشد و گسترش

ابتدا برای مولکول‌های پروتئینی و هاپتن طراحی گردید، بدین ترتیب است که آنتی‌بادی در غلظت مناسب به مقادیر مشخصی از آنتی‌ژن رادیواکتیو شده (آنتی‌ژن گرم) اضافه می‌شود و مقادیر مختلف آنتی‌ژن سرد از نمونه یا استاندارد نیز به لوله‌ها اضافه و با اجرای رقابت بین آنتی‌ژن‌ها و در نهایت عمل جداسازی فراکشنهای واکنش داده و واکنش نداده امکان اندازه‌گیری انتهای واکنش فراهم می‌گردد. شمای ذیل به صورت ساده چنین واکنشی را نشان می‌دهد؛ علاوه بر آنکه اساس و مبنای تمام سنجش‌های ایمنی نیز می‌باشد.



منحنی استاندارد

جداسازی بخش کمپلکس Ag^*Ab با استفاده از آنتی‌بادی ثانویه، با افزودن پلی‌مر یا نمک‌سولفات آمونیوم از آنتی‌ژن‌های آزاد، اولین تلاش برای اندازه‌گیری آنتی‌بادی (تیتراسیون) و یا اندازه‌گیری آنتی‌ژن سرد (منحنی استاندارد) بود.

در دهه هشتاد ایمنونواسی با نشانگر رادیواکتیو

فقط شاهد ایجاد تغییر در روش‌های جداسازی است. با دستیابی دانشمندان به این مفهوم که آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن را می‌توان به سطوح پلی‌مری پوشانید، جداسازی دستخوش تحول شد. به این ترتیب علاوه بر لوله‌های پلی‌مری، از سطوح پلی‌مری کوچکتر مثل ذرات لاتکس و چاهک‌های

سنجش‌های ایمنی بر پایه نشانگرهای رادیواکتیو بود و با گسترش دانش بشری در زمینه تولید آنتی‌بادی علیه مولکول‌های کوچک، طراحی، بهینه‌سازی و تولید انبوه انواع تست‌ها به منظور آنالیز مولکول‌ها گسترش پیدا کرد و بدین ترتیب مسیر توسعه و استفاده از این گونه فناوری‌ها بویژه در تحقیقات پزشکی و شیمی بالینی هموار گردید. در نسل اول سنجش‌ها، بیشتر تحقیقات مبتنی بر طراحی سنجش برای مولکول‌های جدید بود و ایجاد نوآوری در نحوه اجرای سنجش مدنظر قرار نمی‌گرفت. نیاز آزمایشگاهی برای استفاده از بخش‌های جدید آنچنان گسترده بود که فرصتی برای ایجاد تغییر در نحوه انجام آزمایش فراهم نبود. بنابراین دو روش اصلی برای مولکول‌های کوچک و پروتئینی، طراحی شد و در سال‌های اول براساس آنها اندازه‌گیری‌ها انجام پذیرفت.

دومین واقعه شگفت‌انگیز در زمینه فن‌آوری آنتی‌بادی، تولید آنتی‌بادی مونوکلونال توسط کوهلر و ملیستن^۱ در سال ۱۹۷۵ بود که منجر به خلق سنجش‌های ساندویچ گردید.

سنجش‌های ایمنی بر مبنای واکنش کلی که در محلول انجام می‌گیرد به دو دسته، سنجش ایمنی همگن (هم‌وزن) و سنجش ایمنی ناهمگن (هتروژن) تقسیم می‌شوند. سنجش‌های ایمنی با نشانگر رادیواکتیو فقط بطور هتروژن طراحی می‌شوند. اساس این نوع سنجش‌ها که

شده در محلول می‌شوند ولی وقتی همین مولکول‌ها به آنتی‌بادی‌ها متصل می‌شوند، بعلت آهسته‌تر شدن حرکت، نورقطبی منتشر شده را قطبی‌تر می‌کنند و درجه قطبی شدن، مقدار مولکول ردیاب متصل شده به آنتی‌بادی را نشان می‌دهد (این روش برای اندازه‌گیری آنالیت‌های کوچک مناسب است).

آنزیم‌ها مولکول‌های پروتئینی با خاصیت کاتالیزوری هستند که در مقادیر ناچیز نیز قادر به تبدیل میزان قابل توجه سوسترها به محصول واکنش می‌باشند و این تبدیل گاهی با تغییرات رنگی (کروموزنیک)، فلورسنتی یا لومینوسنتی مشخص در سوسترها همراه است. این خصوصیات آنزیم‌ها باعث شد که دو گروه از محققین (انگوال و پرلمان^۱) و (وون ویمان و شورش^۲) در سال ۱۹۷۱ آنزیم را به عنوان نشانگر مناسب برای واکنش ایمونواسی معرفی نمایند. واکنش اصلی در سنجش ایمنی آنزیمی (EIA) به شرح ذیل است:

$Ab + Ag-E + Ag \rightleftharpoons Ab-AgE + Ab-Ag$
در این واکنش آنتی‌ژن نشاندار (AgE) و آنتی‌ژن غیرنشاندار (Ag) برای اتصال به آنتی‌بادی ویژه (Ab) با یکدیگر رقابت می‌کنند. میزان تغییرات رنگی حاصل از تبدیل سوسترها به محصول، موید میزان آنتی‌ژن نشاندار متصل به آنتی‌بادی است و رابطه عکس با مقادیر آنتی‌ژن غیر نشاندار دارد. اولین

کم‌حجم^۱ استفاده گردید. در بخش نشانگر رادیواکتیو بعد از سال‌های ابتدایی که I^{131} به کار می‌رفت، I^{125} مورد استفاده قرار گرفت و تا به امروز دیگر تحول شگرفی صورت نگرفته هر چند دیگر نشانگرهای رادیواکتیو در موارد محدودی مثل H^3 , CO^3 , P^{32} , C^4 و ... نیز مورد نظر بوده است.

علیرغم اینکه سنجش‌های ایمنی با نشانگر رادیواکتیو بسیار دقیق و حساس بودند ولی به دلایل متعدد استفاده از مواد رادیواکتیو مورد سوال قرار گرفت. از جمله موارد می‌توان به خطر استفاده از مواد رادیواکتیو، دفع زباله، نیمه عمر کوتاه، گران بودن دستگاه‌های اندازه‌گیری پرتوهای رادیواکتیو و مشکل بودن خودکاری سنجش اشاره کرد و بالاخره دانشمندان به فکر استفاده از نشانگرهای دیگر افتادند.

نشانگرهای دیگر شامل آنزیم، رنگ‌های فلورسنت، مولکول‌های کمی لومینسانس، ذرات کلونید فلزات و ... می‌باشند که به نشانگرهای غیرایزوتوپی معروفند.

در روش‌های فلورسنتس ایمونواسی (FIA)، آنالیت (لیگاند) به مشتق فلورسنت متصل می‌شود و مولکول ردیاب^۲ را ایجاد می‌کند. مولکول‌های ردیاب در حالت آزاد (متصل نشده به آنتی‌بادی) دارای حرکت سریع و اتفاقی هستند، در نتیجه سبب غیرقطبی شدن پرتوهای نور قطبی منتشر

1- Micro well

2- Tracer

اتوماسیون و آماده‌سازی بدون خطر مواد واکنشگر می‌باشد. دیری نپایید که استفاده از نشانگرهای جایگزین دغدغه اصلی دانشمندان فعال در این حوزه شد و دهه نود در واقع به دهه طراحی سنسجش‌های ایمنی بر پایه نشانگرهای غیر رادیواکتیو تبدیل گردید. هزاران مقاله چاپ شده از نیمه دوم دهه هشتاد و سراسر دهه نود نشان دهنده این رویکرد دانشمندان و ضرورت نیاز این علم برای جایگزین مواد رادیواکتیو است. در این گستره و علیرغم تلاش‌های فراوان دانشمندان فقط چند نشانگر قابلیت کاربرد وسیع پیدا کردند که مهمترین آنان آنزیم بود. تولید بیش از ۵۰ درصد کیت‌های تشخیصی بر مبنای نشانگر رادیواکتیو و ۱۸ درصد براساس نشانگر آنزیم در سال ۱۹۸۰ و روند روبه رشد آن در سال ۱۹۹۰ به ترتیب ۵۴ درصد و ۲۶ درصد براساس آنزیم و رادیواکتیو نشان دهنده گسترش موفقیت‌آمیز این جایگزینی می‌باشد.

شایان ذکر است که در ابتدای سال ۲۰۰۰، بیش از ۷۰ درصد کیت‌ها از نشانگر آنزیمی و فقط ۱۰ درصد کیت‌ها از نشانگر رادیواکتیو استفاده کرده‌اند.

هم‌چنین استفاده از نشانگر فلئورسانس و سایر نشانگرها از ۸ درصد در دهه ۸۰ به ۱۵ درصد در دهه ۹۰ رسیده و هم‌اکنون به ۲۵ درصد افزایش یافته است که خود نشان دهنده نوعی رویکرد به نشانگرهای غیر آنزیمی و یا نشانگرهای آنزیمی با

سنسجش ایمنی آنزیمی و همچنین هموزن (نیازی به جداسازی فراکنش‌های کمپلکس از آزاد وجود ندارد) در سال ۱۹۷۲ توسط محققى به نام روبنستین^۱ معرفی شد. در این نوع سنسجش تفاوتی بین علائم ایجاد شده توسط آنتی‌ژن نشاندار که به آنتی‌بادی متصل می‌شود و آنهایی که آزاد باقی مانده‌اند، وجود دارد در نتیجه نیاز به جداسازی دو جز از یکدیگر نیست.

رایج‌ترین نوع ELA همگن (هموزن) Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (EMIT) است. در این روش ردیاب یک آنتی‌ژن متصل به آنزیم است و اتصال آنتی‌بادی به کمپلکس آنتی‌ژن - آنزیم، سبب غیرفعال شدن آنزیم می‌شود. آنتی‌ژن غیرنشاندار با آنتی‌ژن نشاندار بر سر اتصال به آنتی‌بادی رقابت می‌کنند در نتیجه فعالیت آنزیم در آنتی‌ژن نشاندار آزاد (متصل نشده به آنتی‌بادی) حفظ می‌شود و میزان فعالیت آنزیم تقریباً متناسب با غلظت آنتی‌ژن غیرنشاندار است. در مصارف کاربردی سنسجش‌های ایمنی EMIT به تشخیص آنتی‌ژن‌هایی با وزن مولکولی پایین نظیر داروها و هورمون‌ها محدود می‌شوند.

همانطور که اشاره شد یکی از بهترین جایگزین‌ها به عنوان نشانگر، آنزیم است. از جمله مهمترین خصوصیات نشانگر آنزیمی، عدم خطر کار با مواد رادیواکتیو، نیمه‌عمر طولانی، ارزان بودن و سائل اندازه‌گیری واکنش آنزیمی، امکان

روش‌هایی گردیده که نیاز به امکانات و وسایل پیچیده دارند.

تست‌های سریع، حساسیتی شبیه یا حتی بیشتر از کیت الایزا دارند و برای بسیاری از آنالیت‌ها تشخیص در حد یک نانوگرم در میلی‌لیتر یا کمتر صورت گرفته است. در این تست‌ها از طریق چشم می‌توان به وجود آنالیت با دقتی در حد نانوگرم در میلی‌لیتر پی برد.

مزایای این تست‌ها شامل موارد ذیل می‌باشد:
نتایج سریع قابل ارزیابی می‌باشند، برای تشخیصی که دارای تخصص نیستند نیز قابل استفاده می‌باشد، دارای وزن کم، حجم کوچک و دوام بالا هستند، هیچ وسیله و نیروی الکتریکی مورد نیاز نمی‌باشد، در یک تست می‌توان چند آنالیت را اندازه گرفت، در استفاده از آنها ایمنی کامل وجود دارد و به راحتی قابل عرضه هستند، نتایج بدون تغییر برای مدت طولانی باقی می‌ماند (در مورد ایمنوگرافیک) نتایج به طور دائم روی کاغذ باقی می‌مانند، حجم نمونه لازم کم می‌باشد، انواع نمونه‌ها شامل خون کامل، سرم، ادرار، بزاق، آب و ... قابل استفاده است، انواع سنجش شامل بیوشیمی، ایمونوشیمی را می‌توان بکار برد، شرایط نگهداری خاصی نیاز نمی‌باشد، در تست‌های سریع کنترل قرار داده شد تا در هر بار آزمایش اذدرست کار کردن تست اطمینان حاصل شود، در تولید زیاد قیمت ساخت ارزان درمی‌آید.

استفاده از سوبستراهای فلئوروژنیک به جای سوبسترای کروموزنیک است.

تست‌های سریع

فشار ناشی از هزینه‌های پزشکی و تشخیصی و ضرورت اتوماسیون بیشتر، گسترش سیستم‌های اطلاعاتی و به حداقل رساندن مراحل آزمایش را در آزمایشگاه‌های تشخیصی موجب شد. از این رو، دانشمندان جلب روش‌هایی گردیدند که بهترین سرویس‌دهی را با توجه به هدف، زمان و محیط مورد نظر ارائه دهد.

یک راه برای کاهش دادن هزینه‌های پزشکی، کاهش هزینه‌های آزمایشگاهی و تشخیصی می‌باشد که این امر از طریق بکارگیری وسایل ساده ایمنونواسی و طراحی روش‌های سریع برای تشخیص میسر شد.

با پیشرفت‌هایی که در زمینه ساده‌تر کردن وسایل و روش‌ها ایجاد گردید، تست‌هایی طراحی شده است که در محل‌های اورژانس و حتی توسط فرد در منزل بکار گرفته می‌شود.

تکنیک‌های ایمنونواسی ذکر شده به دلیل دقت و حساسیت روش‌ها برتر بوده اما به دلیل نیاز به وسایل و صرف زمان و هزینه زیاد برای تشخیص آنالیت‌ها در مراکز کوچک و در مراکز با امکانات کم و حتی در منزل امکان‌پذیر نمی‌باشند. لذا امروزه وارد مرحله‌ای شده‌ایم که تست‌های سریع با دقت و حساسیت طراحی و جایگزین

**ایمونوکروماتوگرافی**

ایمونوکروماتوگرافی تستی براساس آنتی‌بادی می‌باشد و امروزه اغلب آنتی‌بادی نشاندار شده با کلونید طلا بکار می‌رود طبق خاصیت موئینگی در غشاء حرکت نموده و متعاقب این حرکت جداسازی ترکیبات و شناسایی آنها صورت می‌گیرد. در ایمونوکروماتوگرافی لازم است حساسیت محصولات، اختصاصی بودن، زمان لازم برای واکنش، سیستم ردیاب بکار برده شده (مثل لاتکس، فلزات کلونیدی، آنزیم و) مشخص شده باشد. خط تست، خط کنترل، آنتی‌بادی‌ها، مواد آشکارگر، وسایل ساخت، انتخاب پدهای جاذب، انتخاب غشاء (ترکیب پلیمری، خروجی، ضخامت غشاء، زمینه و دترجنت‌های بکار برده شده برای غشاء) در طراحی ایمونوکروماتوگرافی هر آنالیت بسیار مهم است.

کیت‌های ایمونوکروماتوگرافی

طی ده سال اخیر، بسیاری از تست‌های تشخیصی که به‌طور تجاری وجود دارند براساس ایمونوکروماتوگرافی طراحی شده‌اند.

اولین آنالیتی که فورمت ایمونوکروماتوگرافی برای آن شکل گرفت هورمون گونادوتروپین جفت انسانی (HCG) بود که از این هورمون برای تشخیص حاملگی استفاده می‌نمایند. برای تست حاملگی از نمونه ادرار یا پلاسما استفاده می‌شود و از کونژوگه لاتکس، سلنیوم یا طلا به عنوان ردیاب استفاده می‌شود.

موارد استفاده از این‌گونه تست‌ها به شرح ذیل می‌باشد:

الف) کاربرد بالینی

- آلرژن‌ها، شاخص‌های قلبی، داروهای مخدر^۱، باروری و تعیین جنسیت جنین، پزشکی قانونی، ایمنوتایپینگ^۲، بیماری‌هایی که از طریق جنسی منتقل می‌شوند، شاخص‌های استرس، توکسیکولوژی، تومور مارکرها، عوامل عفونی.

ب) کاربرد در کشاورزی

- موارد مربوط به سلامت مواد غذایی^۳، بیماری‌های گیاهان و غلات.

ج) کاربرد در مطالعات محیط زیست

- آلودگی بیولوژیک، آلودگی محیط زیست^۴ (د) کاربرد در دامپزشکی

- کاربرد آن مشابه موارد بالینی در خصوص انسان می‌باشد.

در سنجش‌های سریع به وسایل مخصوص و ریجنت‌های^۵ متعدد نیاز نمی‌باشد و اغلب براساس آگلوتیناسیون ذرات، ایمونوکروماتوگرافی غشایی نقطه‌ای^۶ و ایمونوکروماتوگرافی غشایی طولی^۷، فورمت عمومی این تست‌ها شکل می‌گیرد.

1- Drugs of abuse

2- Immunotyping

3- Food Safety

4- Reagent

5- Flow – through

6- Lateral – flow