

پردازش سطحی بسترهای سلولز و PVDF برای تثبیت آنتی بادی، به منظور استفاده از آنها در سیستم‌های تشخیصی

محمد هیات^۱، علی محمد لطیفی^{۲*}، مرتضی میرزایی^۳

۱- کارشناس ارشد، ۲- استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۰۷/۱۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۳/۲۰)

چکیده

تثبیت آنتی‌بادی بر روی بستر از مهم‌ترین مراحل در ساخت برخی از سیستم‌های تشخیصی می‌باشد. از جمله بسترهایی که به صورت معمول برای تثبیت آنتی بادی مورد استفاده قرار می‌گیرند PVDF و سلولز می‌باشند که در حالت پایه‌ای از کارآمدی پایینی برخوردارند. این تحقیق به مطالعه چگونگی فعال‌سازی بستر سلولز و PVDF می‌پردازد. سلولز و PVDF به ترتیب پس از تیمار با سیانوزن برماید و متانول، جهت تثبیت مؤثرتر آنتی‌بادی Anti-human آماده شدند. گروه‌های -OH سلولز در اثر تیمار سیانوزن برماید تشکیل سیکلیک ایمیدوکرپامات می‌دهد که مستعد واکنش با گروه آمین آنتی‌بادی می‌باشد. PVDF نیز پس از تیمار با متانول تا حدودی هیدروفیل شده و جذب سطحی آن افزایش می‌یابد. نتایج نشان دادند که تغییرات اعمال شده روی سطح بستر، اثرات قابل تأملی در جهت افزایش ظرفیت بسترها برای پذیرش آنتی‌بادی داشته‌است. نتایج همچنین نشان دادند که نسبت تثبیت آنتی‌بادی بر روی بستر سلولز بیش از بستر PVDF می‌باشد. فرایند فعال سازی می‌تواند خصوصیات فیزیکی و شیمیایی بستر مانند خاصیت موئینگی، انعطاف پذیری، با سطحی و ظرفیت سطحی را تغییر دهد.

کلید واژه‌ها: آنتی‌بادی، بستر، تثبیت، سلولز، PVDF.

Surface Processing of Cellulose and PVDF Supports for Immobilization of Anti-body for Diagnostic Application

M. Heiat, A. M. Latifi*, M. Mirzaei

Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences

(Received:10/09/2012, Accepted:06/09/2012)

Abstract

The immobilization of antibodies is one of the most important steps for the construction of biological diagnostic systems. Cellulose and PVDF are commonly used as supports for antibody immobilization despite their low efficiency. This study investigates the activation process of these supports in order to improve their immobilization capability. So as to apply a more operative immobilization of antibody, cellulose and PVDF were initially treated by cyanogen bromide and methanol respectively. In cellulose support which was treated by cyanogen bromide, the -OH groups constructed a cyclic imidocarbamate which is disposed to react with the amine groups of the antibody. In PVDF which was activated by methanol, hydrophilic property and surface adsorption were increased. After the activation procedure, anti-human antibody was immobilized on both supports and the immobilization quality was evaluated. The results showed that the applied changes on the supports had promising effects on the antibody capturing capacity. It was also shown that antibodies were more immobilized on the cellulose supports in comparison to PVDF. The activation processes can alter the physiochemical features of the support such as capillararity, flexibility, surface charges and delicacy, which may intensively influence the quality of immobilization.

Keywords: Antibody, Cellulose, Immobilization, PVDF, Support.

* Corresponding Author E-mail: amlatify@yahoo.com

۱. مقدمه

تثبیت که معادل کلمه لاتین "Immobilization" می باشد در لغت به معنای باز ایستادن و در اصطلاح عبارت است از ساکن نمودن بیوماکرومولکول ها، سلول ها (مانند انواع باکتری ها) و بافت ها با شیوه های متنوع بر روی سطوح مختلف. اما این تعریف به خودی خود گویای واقعیت های مهندسی تثبیت نیست. به واقع در این راستا می بایست تثبیت به نحوی صورت پذیرد که بازدهی و راندمان استفاده از ماده ثابت شده افزایش یابد یا حداقل کم نشود. تثبیت بیومولکول ها بر روی بستر یکی از مهم ترین مراحل در طراحی و ساخت حسگرهای زیستی (مانند استریپ های نواری) و سیستم های تشخیصی بالینی می باشد. از جمله جزء پرکاربردترین سیستم های تشخیصی در مباحث پزشکی و بهداشتی سیستم های تشخیص سریع نواری می باشند.

از مهم ترین فاکتورهای مؤثر و همچنین یکی از اصلی ترین اجزای تشکیل دهنده این گونه سیستم های تشخیصی که مبتنی بر ایمنوکروماتوگرافی می باشند، بستر و نحوه تثبیت آنتی بادی بر روی آن است. انتخاب بستر مناسب برای کسب بهترین پاسخ از اساسی ترین مباحث در مهندسی تثبیت است. تثبیت بیومولکول ها بر روی بستر یکی از پیش نیازهای مهم در طراحی و ساخت حسگرهای زیستی می باشد. برای رسیدن به بهترین حالت تثبیت بایستی اصول مهندسی تثبیت رعایت گردد. ما در این تحقیق به مطالعه دو بستر سلولز و^۱ PVDF می پردازیم و چگونگی فعال سازی و تثبیت آنتی بادی بر روی آنها را مورد بررسی قرار می دهیم.

سلولز با فرمول شیمیایی $(C_6H_{10}O_5)_n$ در حقیقت یک پلی ساکارید مرکب از چند صد تا چند هزار مولکول D- گلولز می باشد که به صورت خطی با پیوند $\beta(1\rightarrow4)$ گلیکوزیدی به یکدیگر متصل شده اند [۱،۲]. سلولز ماده بدون طعم و بو و دارای خصوصیات هیدروفیلیک بوده [۳] و می توان آن را در اسید غلیظ و دمای بالا به مونومرهای گلوکز شکست [۴]. سلولز با دارا بودن گروه عاملی OH- می تواند ترکیبات متنوعی را تولید نماید. تلاش برای تثبیت آنتی بادی با استفاده از همین گروه یعنی (OH-) انجام می پذیرد. اما بستر می بایست ابتدا فعال گردد. از مهم ترین مواد فعال کننده می توان به موادی چون اتیلن کلروفورمات، کربو دی ایمیدازول و N- هیدروکسی سوکسینیمید^۲ (NHS) اشاره نمود [۵،۶،۷].

قالب فعالیت همه مواد فعال کننده در یک محدوده می باشد و آن عبارت است از ایجاد یک گروه فوق العاده فعال که به طور معمول بسیار ناپایدار بوده و آماده واکنش با بیوکاتالیست مورد نظر می باشد. یکی از معروف ترین مواد فعال کننده که در این تحقیق از آن استفاده گردید سیانوژن برامید (CNBr) می باشد.

مکانیسم عملکرد این ماده به این ترتیب است که با گروه هیدروکسیل واکنش داده و یک گروه واکنش گر ایجاد می نماید و این گروه به راحتی می تواند شکسته شود و با گروه آمین آنتی بادی وارد واکنش شود و یک پیوند کوالان تشکیل دهد [۸]. سیانوژن برامید با گروه OH- واکنش داده و یک ترکیب بسیار فعال به نام (Very active cyanate ester) سیانات استر تشکیل می گردد که این ترکیب حد واسط می تواند در سه مسیر متفاوت عمل کند شکل (۱).

۱- مسیر اول یک ترکیب پایدار خنثی به نام کربامات را تشکیل می دهد که این ترکیب مسیر را برای انجام فرایند مورد نظر مسدود می نماید.

۲- مسیر دوم بدین ترتیب است که استر سیانات به یک ایزومر ناپایدار دیگر به نام سیکلیک ایمیدو کربونات تبدیل می گردد که مستعد واکنش با گروه آمین آنتی بادی می باشد و در نهایت نیز N-Substituted imidocarbonate تولید می نماید این فرآورده نیز می تواند با یک فرایند هیدرولیز تولید N-Substituted carbamate می نماید.

۳- مسیر سوم که منجر به تولید ایزو اوره می گردد و این فرآورده در حقیقت بهترین مدل تثبیت آنتی بادی می باشد [۹].

PVDF (پلی وینیلیدن فلوراید) یک پلیمر نیمه بلورین می باشد که شامل یک زنجیره خطی از توالی (CH_2-CF_2) است. ساختار مولکولی زیگزاگ این پلیمر از لحاظ ترمودینامیکی پایدار می باشد. اگر به ساختار PVDF توجه شود یک تقارن منظم در این مولکول مشاهده می گردد. PVDF یک غشاء مطلوب باشد که از آن به طور گسترده برای مقاصد مختلف استفاده می شود از جمله آن ساخت فیلترهای مختلف و بسترهای متنوع می باشد. بسترهای PVDF دارای مقاومت شیمیایی زیاد، پایداری گرمایی و قدرت مکانیکی خوب می باشند.

از کاربردهای امید بخش و نوظهور PVDF استفاده از آن در فیلترهای هومودیالیز و فیلترهای پروتئینی و غیره می باشد [۱۰،۱۱]. PVDF به خودی خود انرژی سطحی پائینی دارد و بسیار هیدروفوب بوده و گروه فعال واکنشگری برای واکنش مستقیم با سایر مواد ندارد [۱۲].

PVDF به طور معمول به عنوان بستر جامد برای سنجش های متنوع ایمنولوژیکی به کار برده می شود به خاطر قابلیت بالای اتصال PVDF به پروتئین یک غشاء ایده آل برای این قبیل فعالیت ها می باشد. از جمله این فرایندها ELISpot^۳ و میکروآرای^۴ می باشد که در آنجا نیاز به غلظت بالای موضعی، از یک واکنش گر تثبیت شده مثل آنتی بادی و یا پروتئین می باشد.

³ Enzyme-linked Immunosorbent spot (ELISPOT)

⁴ Microarray

¹ Polyvinylidene difluoride

² N-Hydroxysuccinimide

۲. بخش تجربی

نوارهای سلولز و PVDF از شرکت میلی پور، سیانوژن برماید (CNBr)، سدیم هیدروکسید، دی متیل فرمامید (DMF)، متانول، BSA (به عنوان بلاکر)، آنتی بادی های مورد نیاز (آنتی هیومن IgG بز و آنتی-آنتی هیومن IgG موشی کانژوگه شده با آنزیم HRP) و سوبسترای BM Blue از شرکت Roche خریداری شدند.

۲-۱. تثبیت آنتی بادی بر روی بستر سلولز

۲-۱-۱. تهیه نوارها و فعال سازی بستر سلولز

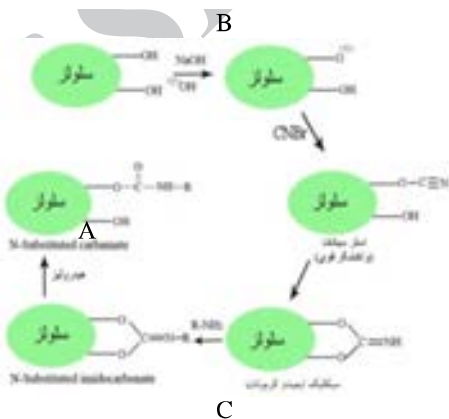
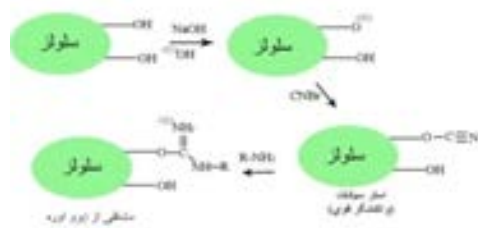
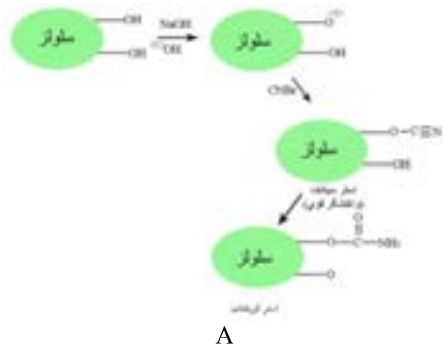
نوارها در ابعاد یکسان با اندازه 50mm×5mm برش داده شد. یک انتهای نوار به عنوان ناحیه آزمون در نظر گرفته شد و پس از علامت گذاری آن ناحیه (تا حدود ۲ سانتی متر) در دی متیل فرمامید به مدت ۱۰ دقیقه قرار شدند و در ادامه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد در سدیم هیدروکسید ۱ نرمال قرار گرفت و پس از شستشو با 0.5X PBS خشک گردیدند. باید در نظر داشت که تنها همان ۲ سانتی متر باقی مانده به انتهای نوار به عنوان ناحیه فعال مورد ارزیابی قرار می گیرد. لذا می بایست تا قبل از آن که خاصیت موئینگی نوار سلولزی، مواد فعال کننده را به بالای محدوده علامت گذاری شده بکشد نوارها را خارج نموده و حرکت را متوقف کرد.

در مرحله بعد، انتهای نوارها در محلول 25 mg/ml سیانوژن برماید به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد [۱۵]. سپس نوارها خارج و ۳ بار با محلول 0.5X PBS شستشو داده شدند و در دمای اتاق بین دو لایه شیشه ای خشک گردیدند.

نکته بسیار مهم آنکه به دلیل سمیت فوق العاده بالای سیانوژن برماید تمامی مراحل کار با سیانوژن برماید می بایست در شرایط کاملاً ایمن زیر هود شیمیایی همراه با ماسک شیمیایی و دستکش لاتکس انجام پذیرد.

۲-۱-۲. تثبیت آنتی بادی بر روی بستر سلولز

نوارهای فعال سلولز در محلول آنتی بادی (آنتی هیومن IgG بز) با غلظت 0.1 mg/ml در 1X PBS به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد غوطه ور گردیدند. سپس نوارها طی سه مرحله ۵ دقیقه ای با 0.5X PBST شستشو داده شدند. در ادامه جایگاه های فعال بستر به مدت ۵ ساعت با محلول 0.1mg/ml BSA^۱ در 1X PBS بلوکه و مابین دو لایه شیشه ای خشک شدند. برای مقایسه بین حالت فعال و غیر فعال بستر، یک نوار خام سلولز، بدون فعال سازی با روش بیان شده در بند ۲-۱-۱ تنها با آنتی بادی مذکور با مدت مشابه مواجه گردید و جایگاه های فعال باقی مانده آن با مواد بلاک کننده مسدود گردید و در مرحله آزمون مورد ارزیابی قرار گرفت.



شکل ۱. سه مسیر متفاوت حد واسط استر سیانات

- A- تشکیل ترکیب پایدار خنثی به نام استر کربامات
- B- تولید یک ایزومر ناپایدار به نام سیکلیک ایمیدو کربونات
- C- تولید ایزو اوره به عنوان بهترین مدل تثبیت

بنابراین اگر قرار بر استفاده از بستر PVDF باشد برای دستیابی به این چنین خصوصیتی (توانمندی اتصال فوق العاده به پروتئین و آنتی بادی) ابتدا نیاز است تا PVDF فعال گردد. از آنجا که PVDF به صورت ذاتی به خودی خود دارای خصوصیات شدید هیدروفوبیک بوده و از نظر قدرت اتصال بسیار ضعیف است می بایست در این خصوصیات تغییرات عمده ایجاد گردد [۱۳، ۱۴]. فعال سازی به طور معمول از طریق تیمار غشاء با متانول و یا اتانول صورت می پذیرد این مواد در حقیقت بستر را تا حدودی هیدروفیل کرده و به محلول های آبی اجازه می دهد تا درون غشاء نفوذ کرده و مولکول ها بتوانند به بستر متصل شوند و از این طریق ظرفیت انتقال را افزایش می دهند.

¹ Dimethylformamide
² Horseradish peroxidase
³ Bovine serum albumin

۲-۲. تثبیت آنتی بادی بر روی بستر PVDF

۲-۲-۱. فعال سازی بستر PVDF

در ابتدا نوارها در ابعاد $50\text{mm} \times 5\text{mm}$ برش داده شدند و با آب مقطر شستشو شدند. علت شستشو با آب مقطر این است که گرد و غبار به شدت به این غشاء تمایل دارند و به راحتی بر روی این غشاء می‌نشینند و با شستشوی اولیه با آب این گرد غبار احتمالی شسته می‌شود. همانند بستر قبلی پس از مشخص نمودن ناحیه آزمون در یک انتها از نوارها هر کدام از آنها به مدت ۱۰ دقیقه در متانول یا اتانول ۱۰۰ درصد قرار داده شدند. در ادامه کار نوارها خارج شده و با آب شستشو داده شدند و مابین دو لام شیشه‌ای خشک گردیدند. برای تثبیت آنتی‌بادی بر روی این بستر فعال شده همانند فرایند تثبیت آنتی‌بادی بر روی سلولز انجام گردید.

۲-۲-۲. تثبیت آنتی‌بادی روی بستر PVDF

نوارهای فعال PVDF نیز همانند نوارهای فعال سلولزی در محلول آنتی‌بادی (آنتی هیومن IgG بز) با غلظت 0.1 mg/ml در $1\times\text{PBS}$ به مدت یک شب تا صبح در دمای 4°C درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور گردیدند و پس از شستشو با $0.5\times\text{PBST}$ جایگاه‌های فعال بستر نیز همانند بسترهای سلولزی بلوکه و مابین دو لایه شیشه‌ای خشک شدند [16]. جهت مقایسه نمونه‌های تیمار شده با نمونه‌های فاقد هرگونه تیمار از یک بستر PVDF که هیچ گونه فرایند فعال سازی بر روی آن انجام نشده بود به عنوان کنترل منفی استفاده شد. بدین ترتیب که بستر خام PVDF با آنتی‌بادی مذکور با مدت مشابه مواجه گردید و جایگاه‌های فعال باقی مانده آن با مواد بلاک کننده مسدود گردید و در مرحله آزمون مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲-۳. آزمون نوارها

پس از تهیه یک محلول $1:5000$ از آنتی بادی (آنتی IgG Goat خرگوشی) کانژوگه شده با آنزیم HRP نوارهای کنترل و آزمون درون آن غوطه‌ور گردیدند و به مدت ۳ ساعت در دمای 4°C درجه سانتی‌گراد در این حالت ماندند. در ادامه نوارها سه مرتبه با بافر $0.5\times\text{PBST}$ به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند و سپس بین دو لام شیشه‌ای کاملاً خشک گردیدند.

$20\mu\text{l}$ از سوبسترای آنزیم (BM Blue) بر روی نوارها ریخته شد و زمان انجام واکنش از لحظه آغاز واکنش تا پدیدار شدن رنگ در منطقه مورد نظر، با کرنومتر اندازه‌گیری و در نهایت با یکدیگر مقایسه شدند. همچنین غلظت رنگ ایجاد شده از طریق اسپکتوفوتومتری با دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. بدین ترتیب که پس از خاتمه واکنش یک میکرولیتر از ماده رنگی ایجاد شده بر روی نوار به نانودراپ منتقل و میزان جذب آن در مقایسه با سوبسترای آنزیم محاسبه گردید.

۳. نتایج و بحث

نوارهای آزمون و کنترل سلولز به فواصل زمانی ۱ دقیقه مورد آزمایش قرار گرفتند (شکل ۲). بدین معنی که پس از تماس ۲۰ میکرولیتر از سوبسترای آنزیم (BM Blue) با هر کدام از نوارها فواصل زمانی ۱ دقیقه میزان جذب نوری ایجاد شده بر روی نوارها مورد آنالیز قرار گرفتند. همانگونه که در شکل (۲) مشاهده می‌گردد به مرور زمان غلظت رنگ بیشتر می‌گردد.

افزایش میزان جذب نور توسط سوبسترای رنگی شده بر روی نوارها در فواصل زمانی مختلف مؤید افزایش غلظت رنگ در اثر عملکرد آنزیم متصل به آنتی‌بادی ثانویه می‌باشد. بهترین پاسخ در نوار آزمون مربوط پس از گذشت مدت زمانی معادل ۸ دقیقه به دست آمد. بدین ترتیب که سوبسترای رنگی با OD مساوی $1/21$ حداکثر میزان واکنش آنزیمی را نشان داد. در سویی دیگر بهترین پاسخ برای نمونه کنترل پس از گذشت ۸ دقیقه گزارش گردید که با $OD=1/4$ بیانگر بیشترین میزان عملکرد آنزیمی بود.

داده‌های نمودار نشانگر اختلاف معنی‌دار بین حداکثر جذب نمونه کنترل و حداکثر جذب نمونه آزمون می‌باشد. شایان ذکر است حد اکثر کارآمدی تثبیت آنتی بادی تنها در ناحیه‌ای از نوار که تحت فرایند فعال سازی قرار گرفته بود مشاهده شد، در حالی که در سایر قسمت‌ها چنین اتفاقی رخ نداد. این نتایج بیانگر کارا بودن عملیات انجام شده روی بستر مورد نظر می‌باشد.

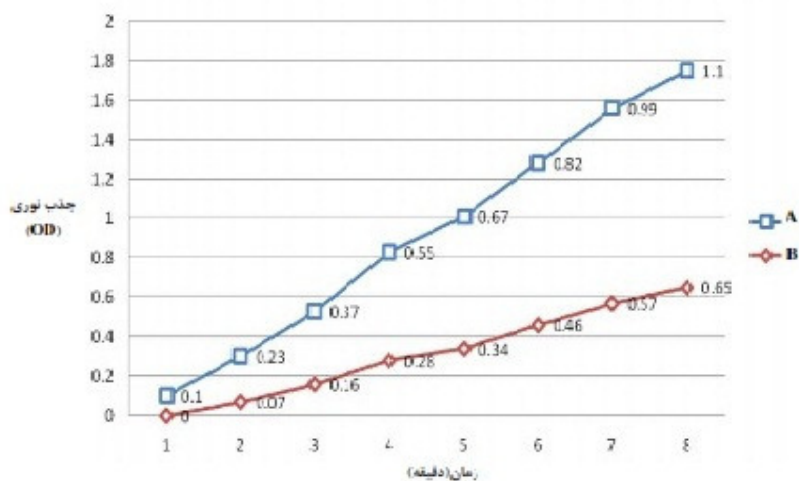
نوارهای آزمون و کنترل PVDF نیز به فواصل زمانی ۱ دقیقه از دقیقه ۱ تا دقیقه ۸ همانند روش سلولز مورد آزمایش قرار گرفتند (شکل ۳).

با گذشت زمان به مرور غلظت رنگ ایجاد شده افزایش یافت و به تبع آن جذب‌های نوری رنگ‌های ایجاد شده بر روی هر یک از نوارها افزایش پیدا کردند. همانگونه که از داده‌های شکل (۳) برمی‌آید حداکثر واکنش آنزیمی در نوار آزمون در دقیقه ۸ و با جذب نوری $1/1$ گزارش گردید. در سویی دیگر بیشترین جذب نوری در نوار کنترل در دقیقه

هشتم پس از آغاز واکنش آنزیمی با $OD=1/65$ گزارش گردید. در این مورد نیز کارآمدی تثبیت آنتی بادی تنها در ناحیه‌ای از نوار که تحت فرایند فعال سازی قرار گرفته بود مشاهده شد و در قسمت‌ها دیگر چنین اتفاقی رخ نداد.

سیستم‌های تشخیصی که بر پایه ایمونوکروماتوگرافی، با محوریت آنتی بادی طراحی می‌شوند عموماً دارای محدودیت در میزان حساسیت می‌باشند. بدین معنی که در مقایسه با سایر روش‌های تشخیصی، مقدار آنالیت بیشتری برای سنجش مورد نیاز می‌باشد و آنالیت‌هایی که غلظت آنها پایین تر از آستانه تشخیص سیستم باشد شناسایی نمی‌شوند.

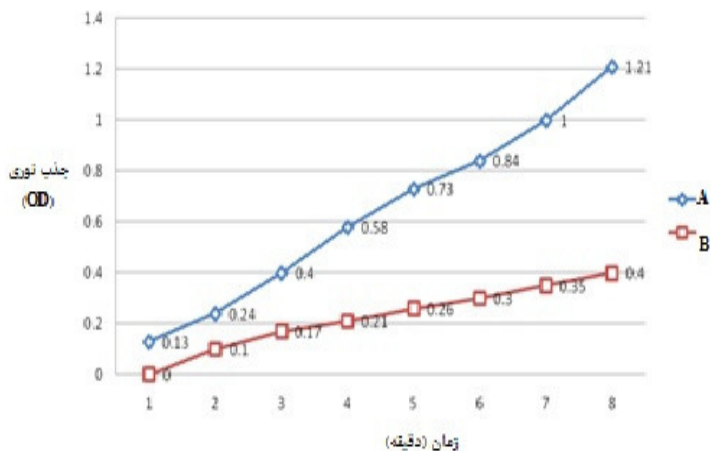
¹ Optical Density



شکل ۲. داده‌های مربوط به آزمون نوارهای سلولز در زمان‌های مختلف بر اساس OD حاصل از پیشرفت واکنش آنزیمی

A- روند افزایش جذب نور توسط سوبسترای رنگی موجود بر روی نوار سلولز فعال شده در زمان‌های مختلف می‌باشد

B- روند افزایش جذب نور توسط سوبسترای رنگی موجود بر روی نوار سلولز خام در زمان‌های مختلف می‌باشد.



شکل ۳. داده‌های مربوط به آزمون نوارهای PVDF در زمان‌های مختلف بر اساس OD حاصل از پیشرفت واکنش آنزیمی

A - روند افزایش جذب نور توسط سوبسترای رنگی موجود بر روی نوار PVDF فعال شده در زمان‌های مختلف می‌باشد

B - روند افزایش جذب نور توسط سوبسترای رنگی موجود بر روی نوار PVDF خام در زمان‌های مختلف می‌باشد.

تا با مطالعه ساختار و ظرفیت‌های این بستر، تا حدودی بتواند گوشه‌هایی از نقاط قوت و ضعف این بستر را به چالش بکشد. حرکت جریان مایع بر روی نوار سلولزی بسیار سریع و به گونه‌ای مهار نشدنی می‌باشد که این خود می‌تواند در روش‌هایی که مبتنی بر کروماتوگرافی و حرکت فاز مایع بر روی بستر می‌باشد باعث ایجاد پاسخ‌های کاذب و یا خطاهایی از این قبیل گردد. بنابراین کار کردن با این چنین بسترهایی بسیار سخت می‌باشد چون در مراحل فرآوری استریپ‌ها که نیاز به دقت و اندازه‌گیری‌های دقیق دارد استفاده از چنین بسترهای مهار نشدنی مشکل می‌باشد.

از طرفی در فرایند فعال سازی بستر سلولز از ماده فوق‌العاده سمی سیانوزن برماید استفاده می‌گردد. از این رو در یک نگاه جامع نسبت به این بستر می‌بایست اینگونه عنوان کرد که با وجودی که قابلیت نوارهای سلولزی برای تثبیت آنتی‌بادی بالاتر از نوارهای PVDF می‌باشد اما بنا به دلایل مذکور استفاده از این نوارها تا حدودی با مشکلاتی رو برو خواهد بود. نتایج حاصل از مطالعه بر روی بستر PVDF نیز بسیار نزدیک به نوار سلولز بود و فرایند آزمی متعلق به آنتی‌بادی کانژوگه به خوبی نوار سلولز بودند اما مهم‌ترین خاصیت PVDF این است که به دلیل هیدروفوبیسیته بالا، جریان مایع با کندی بسیار زیاد حرکت می‌کند که این خصیصه می‌تواند در برخی از روش‌ها مفید و در برخی دیگر نامطلوب باشد. از دیگر خواص PVDF آن است که تشکیل رنگ به واسطه عمل آنزیم روی این بستر تنها به شکل رسوب روی بستر ظاهر می‌شود و هیچگونه نفوذ رنگی درون این بستر صورت نمی‌پذیرد و با مالیدن شدن بستر رنگی به یک سطح ثانویه رنگ تا حدود زیادی پاک می‌شود. این نقیصه به احتمال فراوان در صورت استفاده از کانژوگه‌های غیر آزمی قابل رفع باشد.

۴. نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این مقاله می‌توان به چند نتیجه منطقی در رابطه با بسترهای مورد مطالعه دست یافت. نخست آنکه فعال سازی بسترها اثرات عمیقی بر روی افزایش ظرفیت پذیرش آنتی‌بادی دارد، دوم اینکه ظرفیت پذیرش آنتی‌بادی توسط بستر سلولز فعال شده بیشتر از PVDF فعال شده می‌باشد. همچنین می‌بایست به این نکته اشاره نمود که سرعت حرکت مایع بر روی نوار سلولزی نسبت به PVDF بسیار سریع می‌باشد که این خود می‌تواند باعث سختی کار با این گونه بسترها گردد.

۵. تشکر و تقدیر: از مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی به دلیل حمایت‌های مالی و همچنین از کلیه محققان مرکز بیوتکنولوژی کاربردی و دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند تشکر و تقدیر می‌نماییم.

از جمله راه‌هایی که باعث افزایش حساسیت سیستم و بهبود کیفیت تشخیص می‌شود استفاده از خصوصیات ذاتی فیزیک و شیمیایی بسترهای نواری مانند نرخ حرکت موئینه، تخلخل، ترکیب شیمیایی می‌باشد، بهره‌گیری از روش‌های شیمیایی به عنوان ابزارهایی سودمند برای ایجاد تغییرات در ساختار بسترها و تغییر در ساختار این قبیل سیستم‌ها می‌باشد. این مطالعه با بهره‌گیری از مهندسی شیمیایی گروه‌های عاملی بسترها ضمن بررسی میزان افزایش ظرفیت آنها برای پذیرش آنتی‌بادی، به مقایسه این بسترها با یکدیگر می‌پردازد. یکی از مهم‌ترین پارامترهای تأثیرگذار در کم و کیف این سامانه‌ها، تثبیت اصولی بیوکاتالیست روی بستر است. از طرفی نوع و کیفیت بستر مورد استفاده نیز نقش بسزایی در فرایند مهندسی تثبیت و در نهایت کارآمدی سامانه تشخیصی دارد. به همین جهت مهندسی سطح بسترها از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. این تحقیق به بررسی دو نمونه از بسترهای رایج پرداخته است و با فعال نمودن آنها و مقایسه ظرفیت‌های آنها با یکدیگر تصویر صحیحی را از هر کدام ارائه نموده است. از جمله مدل‌های تثبیت، اتصال بیوکاتالیست به صورت کووالان و یا جذب سطحی به بستر می‌باشد که در این تحقیق هر دو روش بررسی گردید. تکنیک اتصال کووالان با استفاده از فعال کننده‌های بستر (CNBr) برای تثبیت آنتی‌بادی بر روی سلولز و جذب سطحی آنتی‌بادی بر روی بستر PVDF انجام پذیرفت.

در تحقیق مشابهی که آقای Toshiba Haider و همکارانش در سال ۲۰۰۹ انجام دادند آنزیم β -گالاکتوزیداز که از منبع اسپرژیلوس آریزا به دست آمده بود بر روی بیدهای سلولز تثبیت نمودند [۱۵]. در این فرایند آنها ابتدا آنتی‌بادی علیه آنزیم مذکور را بر روی بیدهای سلولزی تثبیت کرده و در ادامه کار با استفاده از این بستر ایمونوآفینیتی، آنزیم β -گالاکتوزیداز را با شیوه جذب سطحی به بستر متصل نمودند و در ادامه کار به بررسی خواص و تغییرات عملکردی آنزیم پرداختند.

همچنین آقای Ruming yang و همکارانش در سال ۲۰۰۸ آنزیم پروکسیداز را به منظور زدایش ترکیبات فنولی همراه با کلر به طور مستقیم بر روی نانوکریستال‌های سلولز تثبیت کردند [۹]. تفاوت‌های عمده‌ی کار این محققین با تحقیق پیش رو، عبارتند از اینکه در این مطالعه به جای استفاده از بیدهای سلولزی و یا میله‌های نانوکریستالی سلولز، از نوارهای سلولزی استفاده شده است تا بتوان در نهایت از آن به عنوان بستری برای سیستم‌های تشخیصی نواری استفاده نمود. از طرفی چون محوریت سیستم‌های تشخیصی با آنتی‌بادی می‌باشد تمرکز بر روی آنتی‌بادی‌های متصل شده و میزان کارایی آن مورد ارزیابی قرار گرفت. PVDF که به عنوان بستری نوظهور توجه محققین را به خود جلب نموده است. با توجه به مجهول بودن زوایای کار با این بستر این مطالعه سعی بر این دارد

- ع. مراجع
- [10] Laroche, G.; Marois, Y.; Guidoin, R.; King, M. W.; Martin, L.; How, T.; Douville, Y. "Polyvinylidene Fluoride (PVDF) as a Biomaterial: From Polymeric Raw Material to Monofilament Vascular Suture."; *J. Biomed. Mater. Res.* 1995, 29, 1525-36.
- [11] Hester, J. F.; Banerjee, P.; Mayes, A. M. "Preparation of Protein-Resistant Surfaces on Poly(vinylidene fluoride) Membranes *via* Surface Segregation."; *Macromolecules* 1999, 32, 1643-1650.
- [12] Li, P. Z.; Jing, Z. Y.; You, Y. X.; Zhen, Y. X.; Bao, K. Z. "Surface Modification of PVDF Porous Membranes *via* Poly(DOPA) Coating and Heparin Immobilization."; *Biointerfaces* 2009, 69, 152-155
- [13] Klee, D.; Ademovic, Z.; Bosserhoff, A.; Hoecker, H.; Maziolis, G.; Erli, H. "Surface Modification of Poly(vinylidene fluoride) to Improve the Osteoblast Adhesion."; *Biomaterials* 2003, 24, 3663-3670.
- [14] Qiu, G. M.; Zhu, L. P.; Zhu, B. K.; Xu, Y. Y.; Qiu, G. L. "Grafting of Styrene/Maleic Anhydride Copolymer onto PVDF Membrane by Supercritical Carbon Dioxide: Preparation, Characterization and Biocompatibility Supercritical Fluids."; *J. Supercrit. Fluids.* 2008, 45, 374-383.
- [15] Haider, T.; Husain, Q. "Immobilization of Galactosidase from *Aspergillusoryzae* *via* Immunoaffinity Support."; *Biochem. Eng. J.* 2009, 43, 307-314
- [16] Tarlton, J. F.; Knight, P. J. "Clarification of Immunoblots on Polyvinylidenedifluoride (PVDF) Membranes for Transmission Densitometry."; *J. Immunol. Methods* 1996, 191, 65-69.
- [1] Glazer, A. N.; Nikaido, H. "Microbial Biotechnology Fundamentals of Applied Microbiology."; Cambridge University Press: Cambridge UK, 2007
- [2] Updegraff, D. M. "Semimicro Determination of Cellulose in Biological Materials."; *Anal. Biochem.* 1969, 32, 420-424.
- [3] Charles, A. B. "Vacuum Deposition onto Webs, Films, and Foils."; William Andrew Press: Waltham MA, 2007
- [4] Ófeigsdóttir, G. I. "Production and Utilization of Biomass with Microbes."; Ph.D. Thesis, Island university, Reykjavik, 2009.
- [5] Matejtschuk, P. "Affinity Separations: A Practical Approach."; IRL Press: Oxford, 2002.
- [6] Gustavsson, P. E.; Mosbach, K.; Nilsson, K. "Super Porous Agarose as an Affinity Chromatography Support."; *J. Chromatogr. A.* 1997, 776, 197-203.
- [7] Comfort, A. R.; Mutton, C. J.; Langer, R.; "The Influence of Bond Chemistry on Immobilized Enzyme Systems for *ex vivo* use."; *Biotechnol. Bioeng.* 2004, 32, 554-563.
- [8] Bartling, G. J.; Brown, H.; Forrester, L. J.; Koes, M. T.; Mather, A. N.; Stasiw, R. O. "A study of the mechanism of cyanogens bromide activation of cellulose."; *Biotechnol. Bioeng.* 1972, 14, 1039-1044.
- [9] Yang, R. T. H.; Wei, F.; Shuangfei, W. "Peroxidase Conjugate of Cellulose Nanocrystals for the Removal of Chlorinated Phenolic Compounds in Aqueous Solution."; *Biotechnology* 2008, 7, 233-241

Archive of SID