Archive of SID

کاربرد پادتن های پلی کلونال در اندازه گیری آبسیزیک اسید در جلبک سبز تک یاخته ای دونالیه لا سالینا *Dunaliella salina*

جنت سرمد، منصور شریعتی[۱،*]، محمد جواد رسایی[۲]

۱ – اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

۲ – تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه بیوتکنولوژی پزشکی

تاریخ دریافت ۸۵/۸/۲۷ تاریخ پذیرش: ۸۶/۳/۱۹

چکیده

بدنبال مشخص شدن اهمیت اندازه گیری فیتوهورمون آبسیزیک اسید (ABA) در جلبک سبز تک یاخته ای دونا لیه لا و بررسی میزان حساسیت درجه اطمینان و تکرارپذیری روش های مختلف، روش آزمون ایمنی آنزیمی (الایزا) از نوع رقابتی غیرمستقیم انتخاب شد. بعلت هاپتن بودن ملکولABA، ازآلبومین سرم گاوی (BSA) بعنوان پروتئین حامل در آماده سازی ایمن ساز مناسب استفاده شد. پس از اتصال ABA به BSA و ارزیابی فرآیند همیوغی، مراحل ایمن سازی درخرگوش انجام شد. پس ازخون گیری از خرگوش ایمن شده، ایمونو گلوبولین ها از سایرپروتئین ها و اجزای سرم جدا شدند. در الیزای رقابتی، ابتدا همیوغ BSA-ABA، برسطح پلیت الایزا تثبیت شد. با رقابت پادگن آزاد و پادگن پوشش داده شده، در اتصال به پادتن و با استفاده از پادتن ثانوی نشاندار شده با آنزیم پراکسیداز HRP ، نتیجه واکنش آنزیمی پس از اضافه نمودن گهرمایه (TMB)، بطریق رنگ سنجی تعیین شد. منحنی استاندارد براساس جذب نوری درطول موج ٤٥٠ نانومتر دربرابر غلظت ABA آزاد رسم ، و غلظتABA در نمونه های جلبکی خالص شده تعیین شد. جذب نوری غلظت های ABA آزاد در محدوده ۱۰۰ پیکو گرم تا ۱۰۰۰ نانو گرم خطی بوده وضریب تغییرات (CV٪) درارزیابی های درون و بین آزمونی منحنی های استاندارد، بیانگر مقادیر قابل قبول (کمتر از ۱۰) می باشد. همچنین درصد بازیافت ABA (%RC) درآزمون الیزا در حد مطلوب (۱۰۹٪) ارزیابی شد. آزمون توازی (پارالیزم) دررقت های مختلفی از یک نمونه جلبکی استخراج شده، انجام شد. داده های دال بر هماهنگی منحنی حاصل از نمونه با منحنی استاندارد بود. ثابت تمایل (Ka) پادتن مورد نظر $۱۰^{۹} \times ۰/۳۲$ لیتر بر مول تعیین گردید. جمع بندی نتایج حاصل از موارد فوق نشان دهندهٔ صحت آزمون الیزا دراین تحقیق می باشد. در مرحله بعد مقادیر ABA در کلیه نمونه های شاهد (بدون تنش) ونمونه های تحت تنش شوری اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که ABA در جلبک دونا لیه لا سالینا بعنوان یک ترکیب داخلی و نیزیک هورمون تنش وجود دارد. در یاخته های شاهد غلظت ABA درون یاخته پایین بوده و تولید آن شش ساعت پس از شوک شوری افزایش می یابد. همچنین محتوای ABA درون یاخته ای در محیط ۳/۵ مولار نمک همواره بیشتر از محیط ۱/۵ مولار نمک می باشد.

واژه های کلیدی:

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱۳۳۱۵۹۹۹۲، پست الکترونیک: mansour_shariati@yahoo.com Email:

مقدمه

دونالیه لایک جلبک سبزتک یاخته ای مقاوم به نمک با پراکنش وسیع جغرافیایی است .این جلبک بعلت فقدان دیواره یاخته ای (سلولوزی) و ساده بودن ساختار یاخته ای می تواند بعنوان یک سازگان مدل در مطالعات فیزیولوژی گیاهی مورد توجه قرار گیرد(۵). اسید آبسیزیک بعنوان یک هورمون بازدارنده رشد در دهه ۱۹۵۰ با ساختمان سزکویی ترپن شناسایی گردید(۱). این فیتوهورمون دارای نقش کلیدی در بسیاری ازفرایند های رشد و نموی درگیاهان مانند خفتگی دانه وجوانه، پیری، بسته شدن روزنه می باشد. نقش ABA درپاسخ به برخی تنش ها مانند خشکی، شوری

www.SID.ir

Archive of SID

و سرما باعث شده است که آن را بعنوان یک هورمون تنش نیزمعرفی کنند(۱). یکی از راههای بررسی نقش ABA درفیزیولوژی تنش، شناسایی واندازه گیری کمی، ABA درون یاخته ای در گیاه است که انجام آن با توجه به اندازه کوچک این ملکول وغلظت کم آن (نانو گرم درگرم وزن تر) همیشه کار آسانی نیست. ازمتداول ترین روش ها در اندازه گیریABA روش HPLC بهمراهGC-FD یا GC-ECD است. انجام این روش وقت گیر و گران بوده و نیازبه خالص سازی زیاد نمونه دارد(٦) .بعلاوه هنگام استفاده از این روش نمی توان چندین نمونه را به طورهمزمان اندازه گیری نمود. از اینرو امروزه بیشتر از آزمون های ایمنی (Immunoassay) درشناسایی و اندازه گیری ABA استفاده می شود(۱۹). این نوع آزمون با توجه به نوع نشان بکاررفته در دو گروهRIA(نشانگررادیواکتیو) و EIA (نشانگر آنزیمی) تقسیم می شود(۱۸). اساس این نوع آزمون برمبنای اتصال ویژه پادگن- پادتن قرار دارد. پادتن که محصول سازگان ایمنی هومورال محسوب می شود با ایمن سازی حیوان مناسب با پادگن مورد نظر تولید می گردد. در بهره گیری از ویژگیهای اختصاصی اتصال آنتی بادی، در اندازه گیری ABA، دو نوع مختلف پادتن که از دو طریق کاملا" متفاوت تهیه می شود، مورد استفاده قرار می گیرد. نوع اول، آنتی بادی منوکلونال می باشد که امروزه بصورت کیت آماده و تجارتی برای انداز گیری ABA وجود دارد(۱۱، ۱۸) که علی رغم دقت آن، بعلت نیاز به مقادیر زیاد آن در مراحل آزمون الایزا (درحد میلی گرم) استفاده از آن گرانقیمت می باشد. نوع دیگر، پادتنهای پلی کلونال است که بصورت تجاری وجود ندارد و با توجه به مراحل تولید آن ارزانتر بوده و کاربرد آن در طراحی آزمون الایزا برای اندازه گیری ترکیب مورد نظر (در اینجا ABA) بهتر می باشد. استفاده از پادتنهای پلی کلونال برای اندازه گیری ABA در گیاهان گزارش شده است (۱۰،۱٦، ۱۷) ولی در خصوص جلبک دونالیه لا تاکنون تولید و بهینه نشده است. هدف این بررسی، تولید پادتن پلی کلونال برای ABA وتعیین خصوصیات آن و همچنین اندازه گیری ABA درون یاخته ای جلبک سبز تک یاخته ای دونا لیه لا درپاسخ به تنش شوری با روش آزمون ایمنی آنزیمی (الیزا) طراحی شده توسط محققان این تحقیق بوده است.

مواد و روشها

کشت جلبک و آماده سازی نمونه ها: گونه جلبک دونا لیه لا سالینا سوش8-MUR از آزمایشگاه پروفسور Borowitzka واقع در دانشگاه مورداک استرالیا تهیه شد و در محیط کشت مایع تغییریافته جانسون و همکاران (۱۹٦۸) توسط Shariati و همکارش در ۱۹۹٤ (۱٤) که حاوی ۱/۵ مولار نمک NaCl است کشت شد، و در شرایط روشنایی۱٦۰ میکرومول فوتون بر مترمربع برثانیه و دمای ۳ ± ۲۵ درجه سانتی گراد و دورهٔ نوری ۱۲ ساعت روشنایی و۸ ساعت تاریکی قرار گرفت. اعمال تنش شوری از ۱/۵ به ۳/۵ مولار نمک و برای کنترل از۱/۵ به ۱/۵ مولارنمک روی نمونه های جلبکی برداشت شده درابتدا وانتهای مرحله لگاریتمی رشد انجام شد.

استخراج، خالص سازی وجدا سازیABA: درکلیه نمونه ها ابتدا سوسپانسیون یاخته ای به یک لولهٔ آزمایش منتقل و در دورrpm ۳۰۰۰ در دمای ٤ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ (Ependorf 5810R) شد. محلول رویی خارج، و وزن تر تعیین شد. رسوب یاخته ای حاصل پس از قرار گرفتن در ازت مایع، به دستگاه لیوفیلیز (-RTO Olimann 6360 Friedberg-Germany) منتقل ،خشک وسپس وزن شد. درمرحله استخراج به هر نمونه جلبکی پودرشده، ۳ میلی لیترمتانول ۸۰ درصد افزوده و بمدت ۲٤ ساعت دریخچال ودر تاریکی برروی شیکر با دورrpm ۸۰ قرارداده شد. سپس عصاره متانولی حاصل در دور rpm ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ (Ependorf 5810R) شد. محلول رویی خارج ورسوب حاصل دو بار، هربار با ۵۰۰ میکرولیتر متانول ۸۰ درصد استخراج ومحلول های حاصل به محلول اولیه اضافه شد، عصاره متانولی حاصل، جهت صاف شدن و خالص سازی (حذف لیپیدها و رنگیزه ها) از ستون C18-reversed phase prepacked column (SEP-PAK. Waters) عبور داده شد. آماده سازی ستون، همچنین انتخاب حلال و غلظت های مختلف آن جهت

www.SID.ir

Archive of SID

استخراج ABA بر اساس روش پیشنهاد شده Weiler و همکاران صورت گرفت(۲۰). سپس مرحله جداسازی ABA با اتیل استات انجام شد ودر انتها اتیل استات، تحت گاز ازت به طورکامل تبخیرشد(۲). به رسوب حاصل، یک میلی لیترمتانول ۱۰۰درصد اضافه شد. عصاره متانولی حاصل تا زمان آزمون، در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

مراحل تولید پادتن پلی کلونال علیه ABA و تعیین خصوصیات آن :

طرز تهیه همیوغ ABA- BSA و ارزیابی فرآیند همیوغی: بدلیل هاپتن بودن ABA و وزن ملکولی بسیار کم هاپتن ها، از آلبومین سرم گاوی (BSA) بعنوان پروتئین حامل درآماده سازی ایمن زا (ABA-BSA) برای تزریق به حیوان آزمایشگاهی استفاده شد. بمنظورتهیه همیوغ ABA-BSA ابتدا ۵۸ میکرو مول (۱۵/۳ میلی گرم) ABA را در ۰/٤ میلی لیتر دی متیل فرم آمید (DMF) حل نموده و به آن ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. مقدار ۵۰ میلی گرم BSA را در ۲ میلی لیتر آب مقطر حل نموده و به مخلوط قبلی اضافه شد. pH محلول حاصل باسدیم هیدروکسید یک نرمال روی ۸ تنظیم شد. سپس ٤۰ میلی گرم ۱- اتیل- ۳ (۳- دی متیل آمینوپروپیل-کربو دی ایمید هیدرو کلرید) (EDC) به آرامی طی دو ساعت، در دمای اتاق به مخلوط حاصل که برروی همزن قرار داشت اضافه شد. پس از آن بمدت ۲٤ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی گراد و در تاریکی برروی همزن قرار داده شد و سپس به مدت ٤ روز درآب مقطر تحت همان شرایط دیالیزگردید. محتوای کیسه دیالیز پس ازانجماد لیوفیلیزه شد. برای ارزیابی فرآیند همیوغی از روش اسپکتروسکپیUV افتراقی بر اساس متدWeiler استفاده شد(۱۸).

روش ایمن سازی: ۸ خرگوش نر سفید نیوزیلندی، حدود ٤ ماهه، انتخاب شد. به ازای هر خرگوش ۲ میلی گرم از همیوغ، ABA-BSA در ۳ میلی لیتربافر PBS حل شد. ودر یک حجم مساوی با بافر، در ادجوانت کامل فروند(FCA) بخوبی مخلوط شد و بصورت زیر جلدی، حداقل در ٤ نقطه در پشت خرگوش تزریق شد. به دو خرگوش بعنوان کنترل فقطBSA تزریق شد. یک ماه پس از تزریق اول، تزریق یاد آور انجام شد. در این مرحله به ازای هر خرگوش ۱ میلی گرم از ایمن زا در ۳ میلی لیتر بافر PBS حل شد و با ۳ میلی لیتر ادجوانت ناقص فروند (FIA) بخوبی مخلوط شد. این بارتزریق به داخل عضله انجام شد (۳).

خون گیری و جداسازی سرم از خرگوش های ایمن شده: خون گیری ازخرگوش ها یک ماه پس از تزریق یاد آور و با اطمینان ازایمن شدن خرگوش ها انجام شد. عملیات خون گیری از طریق ورید حاشیه ای گوش خرگوش ها انجام و با استفاده ازسانتریفوژسرم ازلخته جدا شد.

تخلیص پادتن: بمنظورجداسازی ایمونوگلوبولین ها ازسایر پروتئین ها و اجزاء سرم از روش Salting out بواسطه آمونیوم سولفات اشباع استفاده شد (۹). محلول حاصل پس از دیالیز منجمد و لیوفیلیزه شد. پودرحاوی ایمونو گلوبولین ها تا زمان آزمایش دریخچال نگهداری شد.

تیتراسیون پادتن وپادگن یا چکربورد با استفاده ازروش الیزا: دراین مرحله تیتر مناسب پادتن و پادگن با تهیه رقت های متوالی به شرح زیر تعیین شد.

الف- غلظت های متفاوت از ایمن ساز (ABA-BSA) وبه موازات آن غلظت های مشابه ازBSA بمنظوربررسی اتصالات غیرویژه در بافرPBS تهیه شد و سپس بمیزان ۱۰۰ میکرو لیتر در هر چاهک از ردیف های مربوطه در کف پلیت الیزا، پوشش داده شد و بمدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

ب- بمنظور مسدود کردن (Blocking) جاهای خالی روی دیواره چاهکها، تمامی آنها با مسدود کننده (Blocker) مخصوص (محلول ۳ درصد شیرخشک بدون چربی در بافر PBS) پر شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

ج- پلیت تخلیه شده را پنج مرتبه با بافر فسفات شستشو داده و بافر باقیمانده، با روش شستشو زیر شیر آب (Tapping) بدقت خارج شد.

د- رقت های متوالی ازپادتن دربافر EIA (حاوی BSA در PBS) تهیه و بمیزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه و یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

ه- شستشو مطابق بند ج انجام شد.

و- پادتن ثانوی (پادتن بر علیه ایمونوگلوبولین خرگوش) همیوغ با آنزیم HRP ،به میزان ۱۰۰ میکرولیتر درهرچاهک اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

ز- شستشو مطابق بند ج انجام شد.

ح- درهرچاهک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول گهرمایه TMB (تترا متیل بنزیدین) اضافه وپس از۱۰-۵ دقیقه قرار گرفتن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، واکنش آنزیمی با استفاده از محلول سولفوریک اسید ۲ نرمال (۵۰ میکرولیتر در هر چاهک) متوقف شد. شدت رنگ (OD) چاهک ها در طول موج ٤٥٠ نانومتر، با دستگاه الایزا ریدرمولتی کانال قرائت گردید (٦).

رسم منحنی استاندارد آبسیزیک اسید به روش الیزای رقابتی: غلظت مناسب پادگن ورقت مناسب پادتن بر اساس روش چکربورد انتخاب شد. پادگن همیوغ در غلظت ۰/۰۱۵میکروگرم و به موازات آن BSA درردیف های مربوطه، درکف پلیت الیزا، کوت و بلاک شد. پس از شستشو ابتدا غلظت های مختلف پادگن آزاد (استاندارد) که از استوک متانولی آبسیزیک اسید تهیه شده بود بمیزان ۵۰ میکرو لیتر بصورت دوتایی به چاهک ها اضافه شد (به دوچاهک برای تعیین غلظت صفر پادگن، فقط بافر اضافه شد). سپس ۵۰ میکرولیتر پادتن با رقت ۱:۲۵۰ به هرچاهک اضافه شد. سپس پلیت بمدت یک ساعت در دمای ۳۷ در جه سانتی گراد بر روی شیکر درrpm ۱۸۰ قرار گرفت وادامه مراحل مشابه بخش قبل انجام شد. براساس OD اندازه گیری شده درصد اتصال (binding٪) درمنحنی استاندارد محاسبه شد. برای ترسیم منحنی استاندارد آبسیزیک اسید، درصد اتصال روی محور Y وغلظت پادگن آزاد بر حسب $ng.well^{-1}$ روی منحنی X در نظر گرفته شد(۱۳).

اندازه گیری غلظت ABA در نمونه های مجهول با روش الیزای رقابتی: در کلیه نمونه های استخراج شده، ابتدا متانول تحت شرایط گاز ازت خارج و رسوب باقیمانده درحجمی از بافرEIA معادل حجم حلال، حل شد و بمدت یک شب برروی شیکر قرار داده شد. سپسABA موجود در نمونه ها بهمراه استانداردها با روش الیزای رقابتی و بر اساس رابطه معکوسی که بین فعالیت آنزیمی باغلظت پادگن آزاد (استاندارد)، اندازه گیری شد(۱۲).

بررسی کارآیی آزمون الیزا در اندازه گیریABA:

حساسیت(Sensitivity): حساسیت آزمون براساس منحنی استاندارد محاسبه گردید. این مقدار در تعریف حداقل مقداری از پادگن است که با دو SD (انحراف معیار) تفاوت واضح از استاندارد صفر رانشان می دهد. حساسیت در این آزمون بر اساس بمیزان $pg.well^{-1}$ ۱۰۰ تعیین شد.

ثابت تمایل یا افینیتی (Affinity) پادتن: ثابت تمایل (Ka) با روش اسکا چارد محاسبه شد.

ارزیابی درون آزمونی (intra assay) و بین آزمونی (inter assay) : سه محلول استاندارد ABA با غلظت های ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم را انتخاب کرده و سه مرتبه و برای هر کدام از غلظت ها به صورت چهار تایی آزمون انجام شد. با توجه به OD مشاهده شده میزان CV٪ و انحراف معیار برای ارزیابی تکرار پذیری درون و بین آزمونی محاسبه شد.

آزمون دقت (Precision) : این آزمون بر اساس گونا گونی آزمون های درونی و بیرونی (intra and inter assay) در دو غلظت متفاوت ABA (مربوط به دو نمونه) انجام شد. با توجه به OD اندازه گیری شده میزان CV٪ و انحراف معیار مربوطه تعیین شد.

www.SID.ir

Archive of SID

صحت(Accuracy) : صحت روش الیزا توسط آزمون های توازی (پارالیزم) وبازیافت(Recovery) به شرح زیر بررسی شد.

آزمون پارالیزم: در این آزمایش ازیک نمونه مشخص استخراج شده، رقت هایی به نسبت های ۱:۲ ، ۱:٤ ، ۱:۸ تهیه شد. ABA موجود در این نمونه ها همراه با استانداردها به روش الیزا رقابتی اندازه گیری وغلظت های مشاهده شده باغلظت های مورد انتظار مقایسه و منحنی های مربوطه ترسیم شد.

جدول شماره۱ : بررسی دقت در روش الیزا با استفاده ازضریب تغییرات (٪CV), تکرار پذیری و دقت در درون و بین آزمون ها در دو نمونهٔA و B از جلبک تک یاخته ای دونالیه لا سالینا.

درون آزمون					
٪CV	B میانگین ± انحراف معیار	٪CV	A میانگین ± انحراف معیار	تکرار	دفعات آزمایش
۹	۰/ ۹۰۹± ۰ /۱	۳/ ۲	۱/ ۰٤۹± ۰ /۰۳	٤	۱
٤/ ۳	۰/ ۹۵۰± ۰ /۰٤	۳/ ۷	۱/ ۱۳± ۰ /۰٤	٤	۲
بین آزمون					
۲/ ۲	۰/ ۹۲۹± ۰ /۰۲	۳/ ۹	۱/ ۰۸± ۰ /۰٤	۲×٤	

مقادیر میانگین چهار تکرار ± انحراف معیار می باشد.

جدول شماره۲: ارزیابی درون آزمون و بین آزمون با استفاده ضریب تغییرات (٪CV) بر اساسOD مشاهده شده در سه غلظت استاندارد: کم ۱۰ نانوگرم, متوسط ۱۰۰ نانوگرم, زیاد ۱۰۰۰ نانوگرم ABA.

درون آزمون							
٪CV	زیاد میانگین ± انحراف معیار	٪CV	متوسط میانگین ± انحراف معیار	٪CV	کم میانگین ± انحراف معیار	تکرار	دفعات آزمایش
٦/ ٦	۱/ ۲± ۰/ ۰۸	۸/ ۸	۱/ ۹± ۰/ ۱۷	٤/ ۵	۲/ ۲± ۰/ ۱	٤	۱
٤/ ۸	۱/ ۵± ۰/ ۰۷	۵/ ۸	۱/ ۸± ۰/ ۱	۳	۲/ ۱± ۰/ ۰٦	٤	۲
٤/ ۵	۱/ ۷۵± ۰/ ۰۸	۲/ ۸	۲/ ۳± ۰/ ۰٦	۱/ ۷	۲/ ۵± ۰/ ۰٤	٤	۳
بین آزمون							
۱٤	۱/ ٤۸± ۰/ ۲	۸/۸	۰± ۰/ ۱۷	۷/ ۹	۳± ۰/ ۱۸	۳×٤	

مقادیر میانگین چهار تکرار ± انحراف معیار می باشد.

جدول شماره۳: میزان درصد بازیافت(ABA (%RC پس از حذف ABA در نمونه های جلبکی در سه غلظت استاندارد: کم ۱۰ نانوگرم, متوسط ۱۰۰ نانوگرم, زیاد ۱۰۰۰ نانوگرم ABA به روش الیزا براساس مقدار مشاهده شده OD و ضریب تغییرات (CV ٪) .

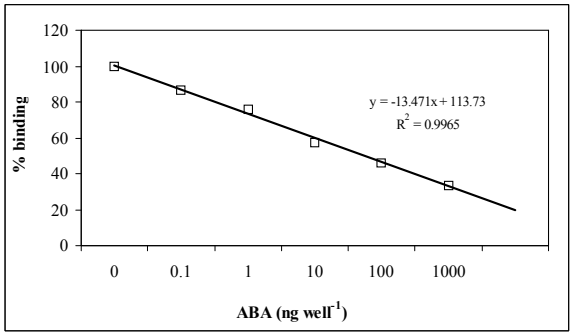
درصد بازیافت(RC ٪)	مقدار OD مشاهده شده	%CV	تکرار	غلظتABA افزوده شده
۱۰۹	۲/ ۳	۷/ ۹	۱۲	کم
۱۰۸	۲	۸/ ۸	۱۲	متوسط
۱۱۲	۱/ ٤	۱٤	۱۲	زیاد

مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می باشد.

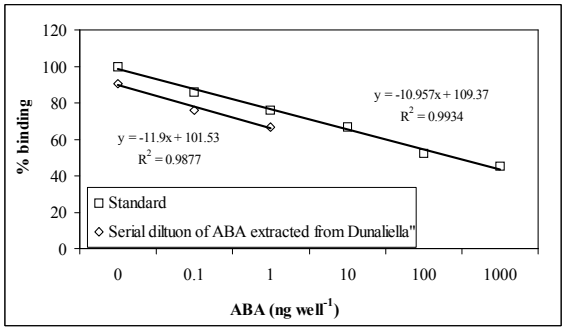
www.SID.ir

Archive of SID

بازیافت (Recovery): دراین مطالعه، مقدار مشخصی آبسیزیک اسید در سه غلظت ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم به عصاره جلبکی خالص شده افزوده شد و عمل بازیافت انجام گرفت. با توجه به OD، مقادیر مشاهده شده با مقادیر مورد انتظار مقایسه و درصد بازیافت تعیین شد.



شکل ۱– منحنی استاندارد آبسیزیک اسید با روش الیزای رقابتی. مقادیر میا نگین سه تکرار می باشد



شکل ۲ – آزمون پاراللیزم برای نمونه های استاندارد و نمونه های ABA استخراج شده از جلبک تک یاخته ای دونالیه لا سالینا در رقت های متوالی. مقادیر میا نگین سه تکرار می باشد.

نتایج و بحث

ارزیابی فرآیند همیوغی ABA-BSA با روش اسپکتروسکوپی افتراقی UV، نشان داد که بیش از ۱۰ مول از ملکول ABA به هرمول ازملکول BSA متصل می شود که این نتیجه، موثربودن فرآیند همیوغی را نشان می دهد. معمولا" دانسیتهٔ اپی توپی یا تعداد گروههای هاپتنی متصل به پروتئین حامل، می بایستی بین ۲۵–۸ باشد (۹). یکی دیگرازمراحل مهم درفرآیند تهیه پادتن، اتخاذ روش مناسب ایمن سازی، جهت القاء پاسخ ایمنی مطلوب، در مدت زمان کوتاه می باشد. انتخاب گونه مناسب برای ایمن سازی و اتخاذ الگوی مناسب ایمن سازی (از لحاظ شکل مناسب پادتن، دوز آن، راه ارائه و زمان بندی برای انجام تزریقات اولیه و یاد آور) تهیه هر چه مطلوب تر پادتن را امکان پذیرمی سازد (۳). دراین تحقیق کلیه موارد مذکور در نظرگرفته شد. جهت بدست آوردن بهترین شرایط درآزمون ایمنی آنزیمی (ELISA) اولین قدم تعیین غلظت های مناسب از پادگن و پادتن است که میزان اتصال ترکیب مورد آزمون (دراینجا ABA) به آنها، نزدیک به بیشینه باشد. بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایش چکربورد بهترین غلظت پادگن همیوغ جهت پوشش دادن درهرچاهک پلیت الیزا معادل ۰/۰۱۵میکروگرم و رقتی ازپادتن که بهترین محدوده حساسیت و فعالیت آنزیمی را آشکار سازد ۱:۲۵۰ تعیین شد. لذا این رقت در کلیه آزمایش ها مورد استفاده قرارگرفت. شکل ۱ منحنی استانداردABA را نشان می دهد که به روش الیزای رقابتی رسم شده است. درسازگان رقابتی بین سیگنال (فعالیت آنزیمی) و غلظت پادگن رابطه معکوس وجود دارد که در نتایج حاصل در شکل۱ بخوبی مشاهده می شود. نتایج حاصل ازبررسی منحنی استاندارد نشان می دهد که میزان جذب نوری غلظت های پادگن آزاد (استاندارد) درمحدوده ۰/۱ تا ۱۰۰۰ نانو گرم خطی و حسا سیت آزمون ۰/۱ نانو گرم (۱۰۰ پیکو گرم) می باشد، و منحنی استاندارد از تکرارپذیری خوبی برخوردار است. هرآزمون ایمنی زمانی بخوبی قابل انجام است که در آن پادتن اختصاصی با تمایل (افینیتی) بالا مورد استفاده قرارگیرد. . پادتن پلی کلونال تولید شده در این تحقیق تمایل بالایی به ABA نشان داد. ثابت تمایل (Ka) پادتن در این تحقیق بر اساس روش اسکاچارد $۱۰^{۹} \times ۰/۳۲$ لیتر بر مول تعیین شد. آزمون دقت در دو نمونه A وB با غلظت های مختلف ABA تحت شرایط یکسان در یک روز و درحالت درون آزمونی(Intra assay) وسپس در روز دیگر با همان شرایط در حالت بین آزمونی (inter assay) انجام گرفت که در جدول ۱ نشان داده شده است. همچنین جدول شمارهٔ ۲ ارزیابی درون آزمونی و بین آزمونی مربوط به سه غلظت کم، متوسط و زیاد استاندارد ABA را نشان می دهد. نتایج حاصل از جدولهای ۱ و ۲ نشا نگرآن است که ضریب تغییرات (CV٪) در محدوده زیر ۱۰ می باشد که محدودهٔ قابل قبولی است. جدول شمارهٔ ۳ میزان بازیافت(ABA(%RC را در آزمون الیزا نشان می دهد. با

www.SID.ir

Archive of SID

توجه به اینکه در صد بازیافت بین ۹۰ تا۱۱۰ محدودهٔ قابل قبولی می باشد، نتایج بیانگر آن است که بازیافت آزمون ABA درسطح مطلوب می باشد. شکل ۲ منحنی های مربوط به آزمون پاراللیزم نمونه های استاندارد ABA ونمونه های استخراج شده از جلبک تک یاخته ای دونالیه لا سالینا را در رقت های متوالی نشان می دهد. هدف ازاین بررسی آن است که آیا با استفاده ازرقت های مختلف یک نمونه نتیجه‌گیری یکسان است یا خیر. نتا یج نشان دهنده هماهنگی منحنی حاصل از نمونه رقیق شده با منحنی استاندارد است. این نتیجه علاوه برتا ئید صحت آزمون الیزا نشان دهنده آن است که در جریان روند استخراج، خالص سازی وجداسازی ABA از نمونه های جلبکی، بسیاری از ترکیبات ناخواسته ومشابه حذف شده و لذا اتصال غیراختصاصی به حداقل رسیده است. گزارشها حاکی از آن است که در طی یک مرحله خالص سازی عصاره های جلبکی با استفاده از ستو ن های Sep-Pak-C_{18}بیشتر ترکیبا ت ناخواسته و مشابه با آبسیزیک اسید حذف ولذا حساسیت آزمون ایمنی الایزا افزایش می یابد(۲، ۸). با توجه به گزارشهای موجود برخی گونه های جلبک دونالیه لا دارای متابولسیم ABAمی باشند(٤ ، ۸) و از طرفی هدف دیگر ما از این تحقیق بررسی متابولیسم ABAدر این جلبک در پاسخ به تنش شوری می باشد لذا، تجمع ABA در ٦ و ٢٤ ساعت پس ازتنش شوری (شوک نمکی ۱/۵ به ۳/۵ مولارنمک) در قیاس با شاهد (۱/۵ به ۱/۵ مولار نمک) مورد بررسی قرار گرفت(جدول٤). نتایج حاکی ازآن است که درابتدای مرحله لگاریتمی، در ساعات اولیه (٦ ساعت) پس ازاعمال تنش شوری. مقدارABA در یاخته های دونا لیه لا، چند برابر (۷۷۳درصد) نسبت به یاخته های شاهد افزایش می یابد. با گذشت ٢٤ ساعت، این مقدار به حدود ٣٤٥ درصد کاهش می یابد. مشابه همین روند درانتهای مرحله لگاریتمی رشد نیزمشاهده می شود. مقدار ABA در ساعات اولیه (٦ ساعت) پس از اعمال تنش شوری۱۲۲۱ درصد نسبت به یاخته های شاهد افزایش می یابد و با گذشت ٢٤ ساعت، این مقدار به حدود ۲۸۰ درصد کاهش می یابد. بر اساس این نتایج، دراین جلبک همانند گیاهان عالی، ABA بعنوان یک ترکیب داخلی و درنقش یک هورمون در پاسخ به تنش شوری وجود دارد(٤، ۸، ١٤). در این جلبک همچنین، تنش شوری به طورچشمگیری بیوسنتز ABA را فعال می سازد بطوریکه مقدار این هورمون در یاخته های شاهد (فاقد تنش) بسیارکم بوده اما مقدار آن در پاسخ به تنش شوری بطور ناگهانی افزایش می یابد. افزایش سطوحABA در شرایط تنش های غیر زیستی مانند شوری اساسا" از طریق سنتز de novo می باشد(۵). این افزایش در شرایط تنش به نفع موجود است چون ABA تغییراتی را در سطح یاخته ودر کل گیاه ایجاد می کند که موجب کاهش آسیب ناشی از تنش می گردد. بعبارت دیگرABA بعنوان یک میانجی در تنظیم پاسخ های سازشی یاخته به تنش ها ی محیطی عمل می کند(۲، ۵). در این آزمایش در انتهای مرحلهٔ لگاریتمی بواسطه نامساعد شدن شرایط محیطی (بویژه کمبود مواد غذایی) درصد تغییرات ABA در قیاس با ابتدای مرحلهٔ لگاریتمی، افزایش بیشتری می یابد. بنظرمی رسد، اولین پاسخ جلبک دونالیه لا سالینا به افزایش شوری محیط، کاهش سریع حجم بر اساس جریان اسمزی آب به سمت خارج یاخته است که چند دقیقه پس از تنش روی می دهد(١٤). در پی کاهش حجم، تغییرات فرا ساختاری و بیوشیمیایی زود گذری در شامه پلاسمایی رخ می دهد که می تواند آغازگر واکنش های متابولیسمی متعددی باشد که می توان از افزایش سنتز گلیسرول بعنوان یک محلول سازگار، افزایش موقت مقدار ABA داخلی و تجمع بتا کاروتن نام برد(٤، ١٥). افزایش سنتز ABA بواسطه تنش اسمزی، موقتی بوده و پس از آن که یاخته ها به اندازهٔ اولیهٔ و عادی از نظر میزان آب و پتاسیل آب درون یاخته ای قرار گرفتند پس از ٢٤ ساعت مقدار این هورمون کاهش می یابد وتا پایان آزمایش کم وبیش ثابت می ماند. نشا ن داده شده است که سطوح ABA به شدت تحت تاثیر غلظت نمک موجود در محیط کشت قرار دارد(١٥). نتایج حاصل از این تحقیق، نیز نشان می دهد که محتوای ABA در محیط کشت ۳/۵ مولار نمک NaCl همواره بیشتر از محیط کشت ۱/۵ مولار است. با توجه به نتایج این تحقیق می توان جمع بندی نمود که اولا متد الیزا با استفاده از

www.SID.ir

Archive of SID

پادتن های پلی کلونال در اندازه گیری ABA داخلی در جلبک سبز تک یاخته ای دونالیه لا بعنوان هدف اصلی این تحقیق بخوبی عمل نموده و بخوبی تغییرات میزان ABA را در این جلبک اندازه گیری می نماید و در قیاس با سایر روش ها، یک روش سریع ، حساس و ارزان می باشد. ثانیا جلبک تک یاخته ای دونا لیه لا سالینا در پاسخ به تنش شوری مقدار ABA داخلی خود را افزایش و پس از برقراری تعادل پتانسیل اسمزی با محیط بیرون مقدار آن را کاهش می دهد. با توجه به ارتباط سنتز بتا کاروتن و مقدار ABA، بررسی تغییرات میزان بتاکاروتن با مقدار ABA درون یاخته ای در این جلبک ضروری به نظر می رسد.

جدول ٤- آزمون آبسیزیک اسید داخلی در یاخته های گونه جلبک سبزتک یاخته ای دونالیه لا سالینا، آزمایش درابتدای مرحله لگاریتمی رشد، ۵ روز پس از تلقیح با تعداد یاخته ۱۰٦×۱۱ و در انتهای مرحله لگاریتمی رشد، ۸ روز پس از تلقیح با تعداد یاخته ۱۰٦×۱۵ با شوک نمکی از ۱/۵ به ۳/۵ مولار نمک تحت روشنایی ۱٦۰ میکرو مول فوتون بر متر مربع بر ثانیه و دمای ۳ ± ۲۵ درجه سانتی گراد و دورهٔ نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در قیاس با شاهد (شوک نمکی از ۱/۵ به ۱/۵ مولارنمک) انجام شد. مقدار ABA ٦ و ٢٤ ساعت پس از شروع آزمایش تعیین شد.

	ابتدای مرحله لگاریتمی	انتهای مرحله لگاریتمی
	میزان ABA (نا نو گرم بر میلی گرم) وزن خشک ٦ ساعت پس از شوک نمکی	
شاهد	۰ /۳۹ ±۷/ ۳	۰ /۱۹ ±۵/ ۲
شوک نمکی	۸ /۱ ±٦۳/ ۸	۸ /۳ ±٦۸/ ۷
درصد تغییرات ABA	۷۷۳	۱۲۲۱
	میزان ABA (نا نوگرم بر میلی گرم) وزن خشک ٢٤ ساعت پس از شوک نمکی	
شاهد	۰/۱۲ ±۸/۱	۰/۲ ±۵/۱
شوک نمکی	۲/۵۳ ±۳٦/۱۲	۰/۹۲ ±۱۹/٤
درصد تغییرات ABA	۳٤۵	۲۸۰

مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می باشد

منابع

1-Addicott, F.T., and Carns, H.R. (1983) History and introduction. In: Abscisic Acid (Addicott, F.T., ed), pp 1-21, Praeger, New York

2-Bopp-Buhler, M.L., Wabra, P. Hartung, W. and Gimmler, H. (1991) Evidence for direct ABA synthesis in *Dunaliella* (Volvocales). Crypt. Bot. 2/3: 192-200

3-Catty, D. (1990) Antibodies: a Practical approach. Vol 1, IRL Press. Oxford

4-Cowan, A. K. and Rose, P. D. (1991) Abscisic acid metabolism in salt-Stressed cells of *Dunaliella salina*. Plant Physiol. 97: 798-803

5-Cowan A.K., Rose, P. D. and Horne, L. G. (1992) *Dunaliella salina*: A model system for studying the response of plant cells to stress. J. Exp. Bot. 43, 1535-1547

6- Dorffling, K. and Dietman, T. (1983) Methods for the detection and estimation of abscisic acid and related compounds. In: Abscisic Acid (Addicott, F.T., ed), pp 23-80 Praeger, New York

7-Hallaj, S., Rasaee, M.J., Haerian, M., Paknejad, M., Kashanian, S., Rahbarizadeh, F., Omidfar, K. and Malekaneh, M. (2003) A heterologous enzyme linked immunosorbent assay of morphine using Penicillinase as label. Iranian J. Biotech. 1: 239-249

8- Hirsch, R., Hartung, W. and Gimmler, H. (1989) Abscisic acid content of algae under stress. Botanica Acta. 102: 326-334

9-Hurn, B. A. L and Chantler, S. M. (1980) Production of reagent antibodies. Methods in enzymology; 70: 104-147, Acadamic Press Inc,

10-Leroux, B., Maldiney, R., Miginiac, E., Sossountzov, L. and Sotta, B. (1985) Comparative quantitation of abscisic acide in plant extracts by gas-liquid chromatography and an enzyme-linked immunosorbent assay using the avidine-biotine system. Planta. 166.524-529

11-Mertens, R., Deus-Neumann, B., and Weiler, E. W. (1983) Monoclonal antibodies for the detection and quantitation of the endogenous plant growth regulator, abscisic acid. FEBS Lett. 160: 269-272

12-Malekaneh, M., Rasaee, M.J., Madani, K., and Pourfathollah, A. A. (1998) Enzyme-linked immunosorbent assay of neopetrin using

www.SID.ir

Archive of SID

penicillinase as label. Med. J. Islamic Rep. Iran 12: 259-264

13-Mohammadnejad, J., Rasaee, M.J., Saqhafi, B., Rajabibazl, M., Rahbarizadeh, F., and Omidfar, K. (2006) A new competitive enzyme linked immunosorbent assay (MRP83-CA15-3) for MUC1 measurement in breast cancer. J. Iimmunoas. Immunochem. 27: 139-149

14-Shariati, M., and Lilley, R. McC. (1994) Loss of intracellular glycerol from *Dunaliella* by electroporation at constant osmotic pressure: subsequent restoration of glycerol content and associated volume changes. Plant, Cell and Environ. 17:1295-1304.

15-Tominaga, N., Takahata, M.,Tominaga,H.(1993) Effects of NaCl and KNO_3 concentrations on the abscisic acid content of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta). Hydrobiologia, 267: 163-168

16- Weiler, E.W. (1979) Radioimmunoassay for determination of free and conjugated abscisic acid in plant extracts. Planta, 144, 255-263.

17- Weiler, E.W. (1980) Radioimmunoassay for the differential and direct analysis of free and conjugated abscisic acid in plant extracts. Planta, 148: 262-272

18- Weiler, E.W. (1982) An Enzyme Immunoassay for cis (+)- Abscisic acid. Physiol. Plant. 54: 510-514

19- Weiler, E.W. (1984) Immunoassay of plant growth regulators. Ann. Rev. Plant Physiol. 35, 85-95

20- Weiler, E.W., Eberle, J., Mertens, R., Atzorn, R., Feyerabend, M., Jourdan, P.S., Arnscheidt, A. and Wieczorek, U. (1986) Antisera and monoclonal antibody-based immunoassay of plant hormones. In: Immunology in plant science (Wang, T. L. ed). Society for Experimental Biology; Seminar Series 29: pp27-58 Cambridge University Press, Cambridge

Application of polyclonal antibodies for ABA measurement in unicellular alga *Dunaliella salina*

Sarmad J., Shariati M.[1], Rasaee M.J.[2]

1- Biology Dept., University of Isfahan, Isfahan, I.R. of IRAN

2- Medical Biotechnology Dept., University of Tarbiat Modares, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

The measurement of the phytohormone ABA was determined following to study of sensitivity, validity and reproducibility of different techniques. An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to the quantitative analysis of ABA in *Dunaliella salina* was selected. Because of its small size, ABA is not itself immunogenic. Therefore it counts as a Haptenn. The bovine serum albumin (BSA) as a protein carrier can be used for preparation of suitable immunogen. The ABA was coupled to bovine serum albumin. The evaluation of conjugates was determined by UV-spectroscopic analysis. Then the immunizations of rabbits were performed. Immune rabbits were bled after booster injection. The immunoglobulin fraction was isolated from other proteins of serum. In competitive Elisa, free and coated antigens compete for binding sites on the antibody. The second antibody enzyme labeled with peroxidase was added. Bound enzyme activity was calorimetrically determined after addition of substrate (TMB). The standard curve of Elisa was obtained by plotting absorbance at 450 nm versus the log of ABA concentration in the assay. Absorbance was linear between 100 pg and 1000 ng ABA concentration. The evaluation of coefficient of variation (%CV) in inter and intra assay of standard curves were accepted in the range (below 10). When known amounts of ABA were added as internal standard to purified alga extracts, the recovery was evaluated about 109%. This high recovery confirms both the specificity and accuracy of the assay. When the parallelism test was performed in purified alga extracts and in a serial diluted samples, the parallel pattern to the standard curve was observed. The Ka (affinity coefficient) values of antibodies were found to be 0.32×10^{9} $L.mol^{-1}$. In conclusion, our results showed the accuracy of the Elisa assay for measurement of ABA content of *D.salina*. Then the ABA contents of algal samples were measured in control (1.5M NaCl) and stressed (3.5M NaCl) *Dunaliella* cells. Results indicated that ABA was found to be as an endogenous compound and also as a stress hormone in *D.salina*. In *D. salina* cells, the ABA content was low and the rate of ABA production was increased when the cells were exposed to 3.5 M NaCl in the medium.

Key words: *Dunaliella salina*, ELISA, endogenous ABA, polyclonal antibody

www.SID.ir