Archive of SID

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره دوم، شماره ششم، بهار ۱۳۹۱

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بکارگیری تکنیک‌های نوین مهندسی تثبیت جهت افزایش کارآمدی تثبیت آنتی بادی بر روی سطح بستر های نیترو سلولز و نایلون برای استفاده در سامانه‌های تشخیصی

محمد هیئت[۱]، علی‌محمد لطیفی*[۲]، حسین آقاملایی[۱]

[۱]کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران
[۲]استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: تثبیت بیومولکول‌ها بر روی بسترهای مختلف به گونه‌ای که خاصیت آن حفظ گردد و بازدهی افزایش یابد اساسی‌ترین پیش‌نیاز برای طراحی و ساخت حسگرهای زیستی می‌باشد. آنتی‌بادی‌ها از دسته مهم‌ترین مولکول‌های کارا برای نیل به این منظور می‌باشد. این مطالعه با هدف افزایش کار آمدی تثبیت آنتی‌بادی بر روی بسترهای نیترو سلولز و نایلون انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق جهت پردازش (فعال سازی و بلاکینگ) سطح بسترهای نیتروسلولز و نایلون از مواد و لایه‌های پلیمری مختلف نظیر PEI و MAMEC استفاده گردید. افزایش تعداد گروه های عاملی در بستر نیتروسلولز و ایجاد گروه فعال جدید بر سطح نایلون از مهم‌ترین تغییرات انجام شده بر روی بسترها بودند. پس از تثبیت آنتی‌بادی بر روی بسترها، کارامدی فرایند مورد سنجش قرار گرفت و با نمونه های کنترل مقایسه گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تغییرات اعمال شده روی سطح بسترها، باعث افزایش ظرفیت تقریبی ۲ و ۳ برابری تثبیت آنتی‌بادی به ترتیب بر روی بستر های نیتروسلولز و نایلون شده است.

نتیجه گیری: بسته به نوع بستر نوع پردازش ممکن است متفاوت باشد، همچنین این امکان وجود دارد که خواص فیزیک و شیمیایی بستر نظیر خاصیت موئینگی، انعطاف‌پذیری، بارهای سطحی و غیره دچار تغییر شده و بر روی کیفیت تثبیت اثرات منفی بگذارد.

کلمات کلیدی: آنتی‌بادی، بلاکینگ، تثبیت، فعال سازی، نایلون، نیتروسلولز

مقدمه

سامانه‌های تشخیصی نواری که بر اساس فرایند ایمونوکروماتوگرافی طراحی می‌شوند کاربردهای زیادی در تشخیص گستره وسیعی از عوامل بیولوژیک و شیمیایی دارند. در طراحی این گونه سیستم‌ها چندین شاخصه کلیدی وجود دارند. از جمله این پارامترها حساسیت (حدود تشخیص)، اختصاصیت (قدرت تباین)، دقت (تکرار پذیری) بالا، سرعت عملکرد و چندین شاخصه دیگر می‌باشد. یکی از مهم ترین فرایندهای تأثیرگذار بر شاخصه‌های مذکور چگونگی تثبیت بیوکاتالیست ها به ویژه آنتی‌بادی‌ها بر روی بستر می‌باشد. تثبیت بیومولکول‌ها بر روی بستر یکی از پیش‌نیازهای اساسی در طراحی و ساخت حسگرهای زیستی می‌باشد (۷). تثبیت آنزیم‌ها و آنتی‌بادی‌ها مزایای ویژه‌ای دارد، از جمله اینکه پایداری آن‌ها افزایش می‌یابد و این قابلیت را پیدا می‌کنند که چندین بار مورد استفاده قرار گیرند (۹). آنتی بادی‌ها و آنزیم‌ها معمولاً با فرایند تثبیت پایدار می‌شوند و با پیوندهای قوی‌تری به سطح بستر متصل می‌مانند. هر چند تثبیت ناصحیح می‌تواند به کاهش فعالیت آنزیم و آنتی‌بادی بیانجامد (۱۰،۲). بیوکاتالیست‌ها را می‌توان با روش‌های متنوع تثبیت نمود به گونه‌ای که عمر آن‌ها در شرایط مختلف محیطی بالا رود و

آدرس نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران
Email:amlatify@yahoo.com
تاریخ دریافت:۱۳۹۱/۰۳/۰۹
تاریخ پذیرش:۱۳۹۱/۰۳/۱۸

www.SID.ir

Archive of SID

در عین حال از کارایی آن کاسته نشود. از آنجایی که آنزیم‌ها قیمت بالایی دارند و به طور ذاتی از پایداری کمی برخوردند همچنین دستورزی با آن‌ها در حالت آزاد نیاز به ایجاد شرایط ویژه‌ای نظیر درجه حرارت و غیره دارد، از این رو تثبیت آن‌ها می‌تواند راه‌حلی برای مرتفع نمودن این مشکل باشد (۶ ،۸).در بحث مهندسی تثبیت چندین شاخصه وجود دارد که مهم‌ترین آن‌ها بستر، سوبسترا، فعال‌کننده‌ها و بلاکرها می‌باشند. بسترها بخش تفکیک ناپذیر مهندسی تثبیت به شمار می‌آیند. یکی از بسترهای مناسب در فرایند تثبیت آنتی‌بادی، نیتروسلولز می‌باشد. نیترات سلولز بوسیله واکنش سلولز با اسید نیتریک در حضور اسید سولفوریک تهیه می‌گردد (۵). نیترات سلولز در آب، اتانول، اتر و بنزن نامحلول و در متانول، نیتروبنزن و استونیترل حل می‌شود (۵). در حال حاضر بسترهایی از جنس نیترات سلولز با عنوان کاغذ نیتروسلولز در دسترس می‌باشد که سطح آن به دلیل حضور گروه نیترات دارای بار الکتریکی منفی است. شارژ منفی نیتروسلولز یکی از اساسی‌ترین خواص این ماده می‌باشد که می‌توان از آن به منظور تثبیت ماکرومولکول‌ها به ویژه آنتی‌بادی‌ها بهره گرفت. نیترو سلولز با پیوند الکترواستاتیکی بین استرهای نیترات و باندهای پپتیدی به پروتئین متصل می‌شود (۴). با فعال کردن بستر نیترو سلولز با استفاده از فعال‌کننده‌هایی چون استونیتریل می‌توان بستر را کاملا فعال نمود تا آنجایی ظرفیت آن برای اتصال به آنتی‌بادی چندین برابر شود و بتواند با افزایش میزان آنتی‌بادی‌ها، حساسیت سیستم تشخیصی را نیز افزایش دهد. یکی دیگر از بسترهای مناسب جهت تثبیت آنتی‌بادی نایلون می‌باشد. نایلون ۶،۶ به عنوان یک پلی آمید از دو مونومر آدیپیل کلراید و هگزامتیلن‌دی‌آمید ساخته شده است. پلی‌آمیدها ترکیباتی هستند که واحد (–CO–NH–) در آن‌ها تکرار شده است. یکی از مهمترین پلی‌آمیدها نایلون ۶،۶ می باشد که بسیار شبیه نایلون ۶ می‌باشد (۱۲،۱). از بستر نایلون می‌توان جهت تثبیت آنتی‌بادی‌ها بهره جست. اما در ابتدا می‌بایست بستر نایلون را به بهترین وجه تیمار نمود تا به حداکثر ظرفیت خود برای دریافت بیوکاتالیست برسد. منظور از تیمار مناسب افزایش، تغییر و سامان‌دهی آرایش گروه های فعال سطح بستر می‌باشد که می‌تواند اصول فرایند تثبیت را تأمین نماید. برای رسیدن به این منظور می‌توان از فعال‌کننده‌ها و پلیمرهای دیگر استفاده نمود. در فرایند فعال سازی بستر نایلون ۶،۶، اسید HCl نقش مهمی را ایفا می‌نماید بدین ترتیب که گروه‌های COOH و NH۲ بیشتری تولید می نماید. این گروه‌های کروبوکسیل و آمین ایجاد شده در حقیقت پایه‌های ابتدایی برای ساخت بسترها و پلیمرهای بعدی محسوب می‌شوند که در بخش روش‌ها به آن پرداخته می‌شود. نایلون ۶/۶ پایدار و دارای انعطاف‌پذیری بالایی است. این الیاف در برابر پاره شدن، تغییر شکل دادن، سایش و فرسایش مقاومت زیادی دارند. اسیدها و قلیاهای ضعیف و مواد شوینده، روی آن بی‌اثرند. ما در این مقاله فرایندی را گزارش کرده ایم که طی آن آنتی بادی بر روی نایلون و نیتروسلولز با کارایی بالا تثبیت می گردد. این مطالعه قصد دارد تا با مهندسی پردازش سطح و بررسی دو بستر متفاوت و پرکاربرد، آن‌ها را با یکدیگر مقایسه نموده و مزایای هر کدام را مورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش‌ها

کاغذهای نیتروسلولز Hi-Flow Plus HF۱۸۰، Hi-Flow Plus HF۱۳۵ و Glass fiber خریداری شده از شرکت میلی‌پور، ااایلون۶،۶ ، (-dicyclohexyl) DCC، PEI (polyethyleneimine) carbodiimid) MEMAC (Maleic Anhydride Methylvinyl Ether Copolymer)، خریداری شده از شرکت Sigma، آنتی‌بادی موشی مونوکلونال anti-Beta HCG خریداری شده از شرکت DCN، آنتی‌ژن Beta-HCG خریداری شده از Abcam، آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوشی anti-Beta HCG کانژوگه شده با آنزیم HRP، HCL، استونیتریل، اسید فرمیک، BSA، توئین ۲۰ از شرکت مرک خریداری شدند، پروتئین نوترکیب IpaD (Invasion plasmid antigen D)تولید شده در پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)

۱- روش تثبیت بر روی نوار نیتروسلولز

برای این منظور از دو روش متفاوت استفاده گردید

فرایند فعال سازی بستر نیترو سلولز و در پی آن تثبیت آنتی‌بادی بر روی بستر فعال.

www.SID.ir

Archive of SID

تهیه نوارها

در این مطالعه نوارهای باریکی به ابعاد ۵ mm × ۴۰mm از جنس نیتروسلولز با استفاده از دستگاه کاتر برش داده شدند. بخش کوچکی از انتهای هر نوار جهت آماده سازی برای تثبیت آنتی‌بادی معین گردید و فرایند فعال‌سازی و بلاکینگ روی آن اعمال شد.

فعال‌سازی بسترها

برای فعال‌سازی بستر از استونیتریل به عنوان یکی از مواد فعال کننده بسترهای نیتروسلولز استفاده گردید. برای بدست آوردن غلظت بحرانی استونیتریل یک سریال رقت از استونیتریل تهیه گردید بدین منظور غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ و ۳۰ درصد از استونیتریل خالص در 1X PBS تهیه گردید و نواحی انتهایی نوارها به مدت ۱ ساعت درون هرکدام از رقت ها غوطه ور شدند. پس از آغاز واکنش فعال‌سازی نوارهای موجود در محلول ۳۰ درصد استونیتریل شروع به واپاشی نموده و نوارهای موجود در محلول ۲۵ درصد استونیتریل به عنوان بهترین نوار فعال‌سازی شده انتخاب و سایر فعالیت‌ها بر روی آن انجام گردید. سپس نوارها شستشو داده شدند و مابین دو صفحه شیشه‌ای در دمای محیط خشک شدند.

تثبیت آنتی بادی بر روی نوارها

برای ارزیابی کم و کیف تثبیت آنتی‌بادی روی بخش فعال شده نیتروسلولز، نوارها به صورت کامل در محلول آنتی‌بادی موشی مونوکلونال anti-Beta HCG با غلظت۰/۱ mg/ml در 1X PBS به مدت ۳ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور گردیدند. سپس نوارها ۲ مرتبه هر بار به مدت ۱۰ دقیقه با ۰/۵ X PBST شستشو داده شدند. در این مرحله از بخش‌های فعال نشده نوار نیترو سلولزی به عنوان کنترل منفی برای بخش فعال شده استفاده گردید.

بلاکینگ بسترها

به منظور مسدود نمودن جایگاه‌های فعال بستر باقی مانده از مرحله تثبیت آنتی بادی، نوارها به مدت ۱ ساعت با محلول ۱/. mg/ml BSA در 1 X PBS بلوکه شدند. و پس از ۲ بار شستشو ۱۰ دقیقه‌ای با ۰/۵ XPBST، مابین دو لایه شیشه‌ای خشک شدند.

فرایند همزمان فعال سازی و تثبیت آنتی‌بادی بر روی بستر نیتروسلولز

در روش دوم که فعال‌سازی به همراه تثبیت می‌باشد پس از تهیه نوارهای نیتروسلولز در ابعاد ۵ mm × ۴۰mm آن ها در محلول آنتی‌بادی موشی مونوکلونال anti-Beta HCG با غلظت ۱/. میلی‌گرم در میلی‌لیتر در محلول ۲۵ درصد از استونیتریل در بافر XPBST ۱ به مدت ۳ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور گردیدند. پس از شستشوی نوارها با ۰/۵ XPBST ،مرحله بلوکه سازی مطابق آنچه بیان شد انجام گردید (۱۰).

۲- تهیه نمونه کنترل

برای مقایسه بین حالت فعال و غیر فعال بستر یک نوار خام نیتروسلولز بدون فعال‌سازی با استونیتریل 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 تست مورد ارزیابی قرار گرفت.

تثبیت آنتی‌بادی بر روی بستر نایلون

تهیه بستر نایلون به عنوان اولین پلیمر

مرحله نخست فراهم آوردن یک لایه نازک از بلورهای نایلون می باشد. بدین منظور نواری از جنس glass fiber (پشم و شیشه) در ابعادcm ۰/۵× ۵ برش داده شد. mg ۱۰۰ از نایلون۶ ،۶ در یک میلی لیتر از اسید فرمیک حل شد و بر روی بخش معینی از نواحی انتهایی نوار glass fiber پهن گردید و در دمای اتاق (۲۵درجه سانتی گراد) به مدت ۱ ساعت خشک گردید.

فعال سازی بستر نایلون

لایه نایلون توسط اسید هیدروکلریک ۲/۵ نرمال به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد فعال گردید و بدین ترتیب تعداد گروه های COOH و NH۲ بیشتری بر روی بستر نایلونی ایجاد گردید.

سوار نمودن پلیمر دوم بر روی نایلون

برای ساخت پلیمر دوم یک محلول ۱/۲۵درصد از پلیمر PEI و ماده DCC در متانول ۸۷/۵ درصد تهیه شد و لایه نایلون به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با آن مواجه

www.SID.ir

Archive of SID

گردید و سپس ما بین دو لایه شیشه‌ای خشک گردید. برای تسریع در فرایند اتصال PEI به نایلون از DCC استفاده شد که نقش یک عامل چگالنده [1] را به منظور آغاز و کاتالیز واکنش ایفا می‌نماید.

سوار نمودن پلیمر سوم بر روی پلیمر ثانویه

نواحی انتهایی مورد نظر هرکدام از بسترها در محلول ۲ درصد کوپلیمر مالئیک انیدرید متیل ونیل اتر (MAMEC) تهیه شده در استون خالص به مدت ۱۲ ساعت در دمای محیط قرار گرفتند. پس از آن نوارها خارج شدند و۲ بار با 1X PBS شستشو داده شدند. نوارها بین دولایه شیشه‌ای قرار گرفتند و در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت خشک شدند. گرفتند. پس از آن، نوارها خارج شدند و ۲ بار با 1X PBS شستشو داده شدند. نوارها بین دو لایه شیشه‌ای قرار گرفتند و در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت خشک شدند.

۳ - تثبیت آنتی‌بادی بر روی بستر فعال

جهت تثبیت آنتی‌بادی، بسترهای فعال در محلول mg/ml ۰/۱ آنتی‌بادی موشی مونوکلونال anti-Beta HCG تهیه شده در 1X PBS به مدت ۳ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد غوطه‌ور شدند و سپس بین دولایه شیشه‌ای در دمای اتاق به مدت ۳ ساعت خشک گردیدند (۳).

۵- بلاکینگ بستر

در این مرحله به منظور مسدود نمودن جایگاه‌های فعال پلیمر سوم که از مرحله قبل بر جای مانده اند، بسترهای خشک شده به مدت ۱ ساعت با محلول BSA ۰/۱ mg/ml در 1X PBS مواجه شدند و پس از۲ مرتبه شستشو با XPBST ۰/۵ مابین دو لایه شیشه‌ای خشک شدند.

۶- تهیه نمونه کنترل

جهت مقایسه نمونه‌های تیمار شده با نمونه‌های فاقد هر گونه تیمار از یک بستر نایلون که هیچ گونه فرایند فعال‌سازی بر روی آن انجام نشده بود به عنوان کنترل منفی استفاده شد. بدین ترتیب که بستر خام نایلون با آنتی‌بادی مذکور با مدت مشابه مواجه گردید و جایگاه‌های فعال باقی مانده آن با مواد بلاک کننده مسدود گردید و در مرحله تست مورد ارزیابی قرار گرفت.

۷- تست نوارها و سنجش ویژگی آن‌ها

ابتدا تمامی نوارها (نوارهای نیتروسلولز و نایلون و نوارهای کنترل) در محلول آنتی‌ژن Beta HCG با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در 1 X PBS به مدت ۱ ساعت غوطه‌ور گردیدند. پس از تهیه یک محلول ۱:۵۰۰۰ از آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوشی anti-Beta HCG کانژوگه شده با آنزیم HRP نوارها درون آن غوطه‌ور شدند و به مدت ۳ ساعت در دمای ۴ درجه در این حالت باقی ماندند. در ادامه کار پس از خروج نوارها، سه مرتبه با بافر PBST X ۰/۵ شستشو داده شدند و سپس بین دو لایه شیشه‌ای قرار داده شدند تا کاملاً خشک گردیدند. نوارهای خشک شده برای تست آماده می‌باشند. بر روی نوارها µl ۲۰ از سوبسترای آنزیم (TMB) ریخته شد و زمان انجام واکنش یعنی از لحظه ریخته شدن سوبسترا تا پدیدار شدن رنگ در منطقه مورد نظر اندازه گیری و در نهایت با یکدیگر مقایسه شدند. همچنین غلظت رنگ ایجاد شده از طریق اسپکتوفوتومتری با دستگاه نانودراپ اندازه گیری شد بدین ترتیب که پس از خاتمه واکنش، µl ۱ از ماده رنگی ایجاد شده بر روی نوار را به نانو دراپ منتقل و میزان جذب آن در مقایسه با سوبسترای آنزیم محاسبه گردید. در کاری مجزا برای سنجش میزان ویژگی آنتی‌بادی‌های تثبیت شده بر روی نوارهای فعال شده، از آنتی‌ژن IpaD (ماژور آنتی ژن شیگلا دیسانتری) نوترکیب به عنوان یک آنتی ژن جایگزین (به جای آنتی ژن Beta HCG با غلظت مشابه) استفاده گردید و تمامی مراحل تست برای این آنتی‌ژن نیز تکرار گردید.

۸- آزمون آماری

برای تایید نتایج و اطمینان از صحت فرایند تثبیت، هر کدام از آزمایشات با حفظ شرایط سه بار تکرار شدند و میانگین نتایج آن گزارش گردید. نمونه کنترل نیز در مورد هر کدام از بسترها سه بار در شرایط یکسان مورد آزمایش قرار گرفت.

یافته ها

تثبیت آنتی‌بادی بر روی نیتروسلولز فعال شده

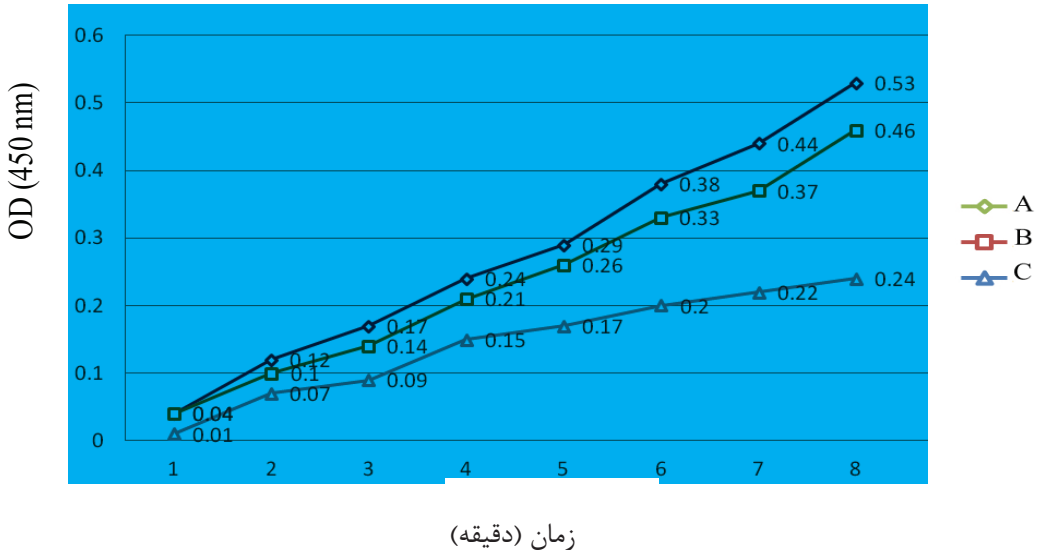
حالت رزونانس ایجاد شده بین دو اتم اکسیژن متصل به اتم نیتروژن حالت جزیی منفی ایجاد نموده که در مجموع بستر نیتروسلولز را به بستری با بار منفی تبدیل می نماید.

1 - Condensing Agent

www.SID.ir

Archive of SID

در اثر مواجهه بستر نیترو سلولز با غلظت‌های پایین استونیتریل، بستر به گونه‌ای تغییر یافت که بارهای سطحی آن افزایش یافته و شرایط برای اتصال هر چه بیشتر و قوی‌تر آنتی‌بادی‌ها فراهم گردید. آنتی‌بادی‌ها از طریق پیوند الکترواستاتیک و با شیوه جذب سطحی به بستر فعال شده نیتروسلولز متصل شدند. میانگین نتایج بدست آمده از سه بار تکرار آزمایش تثبیت، نشان داد که نواحی انتهایی فعال شده بستر نیتروسلولز در مقایسه با سایر نواحی غیر فعال و نوارهای کنترل، مقادیر بسیار بیشتری از آنتی‌بادی موشی مونوکلونال anti-Beta HCG را بر روی سطح خود تثبیت نموده است. ارزیابی کمی و کیفی تثبیت آنتی‌بادی در فواصل زمانی مختلف صورت پذیرفت که نتایج بدست آمده حاکی از تثبیت تعداد بیشتری از مولکول آنتی‌بادی در محل فعال سازی شده بستر می‌باشد. همان گونه که در نمودار ۱ مشاهده می‌گردد به مرور زمان غلظت رنگ افزایش یافته است که در نتیجه آن میزان جذب نور توسط سوبسترای رنگی شده بر روی نوارها در فواصل زمانی مختلف افزایش پیدا کرده است. این میزان از دقیقه اول آغاز واکنش آنزیمی تا دقیقه هشتم، برای نمونه تست وکنترل مورد سنجش قرار گرفت. میانگین $OD_{۴۵۰nm}$ نمونه تست در مدل نخست تثبیت در دقیقه هشتم معادل ۰/۵۳، میانگین $OD_{۴۵۰nm}$ نمونه تست مدل ثانویه تثبیت در همان زمان، معادل ۰,۴۶ و میانگین $OD_{۴۵۰nm}$ نمونه کنترل در زمان ۸ دقیقه معادل ۰,۲۴ گزارش گردید. شایان ذکر است حداکثر کارامدی تثبیت آنتی بادی تنها در ناحیه‌ای از نوار که تحت فرایند فعال‌سازی قرار گرفته بود مشاهده شد، در حالی که در سایر قسمت‌ها چنین اتفاقی رخ نداد. این نتایج بیانگر کارا



نمودار ۱- داده های مربوط به تست نوارهای نیتروسلولز در زمان‌های مختلف بر اساس $OD_{۴۵۰nm}$ حاصل از پیشرفت واکنش آنزیمی. A- میانگین روند افزایش جذب نور توسط سوبسترای رنگی موجود بر روی نوار نیتروسلولز فعال شده در مدل اول تثبیت در زمان‌های مختلف پس از سه بار تکرار آزمایش. B- میانگین روند افزایش جذب نور توسط سوبسترای رنگی موجود بر روی نوار نیتروسلولز در مدل ثانویه تثبیت در زمان‌های مختلف پس از سه مرتبه تکرار آزمایش، C- میانگین جذب های نوری بدست آمده از نوار نیتروسلولز خام به عنوان نمونه کنترل.

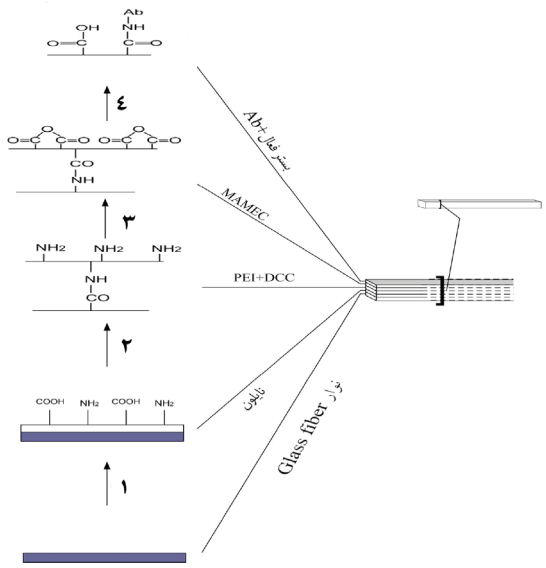
www.SID.ir

Archive of SID

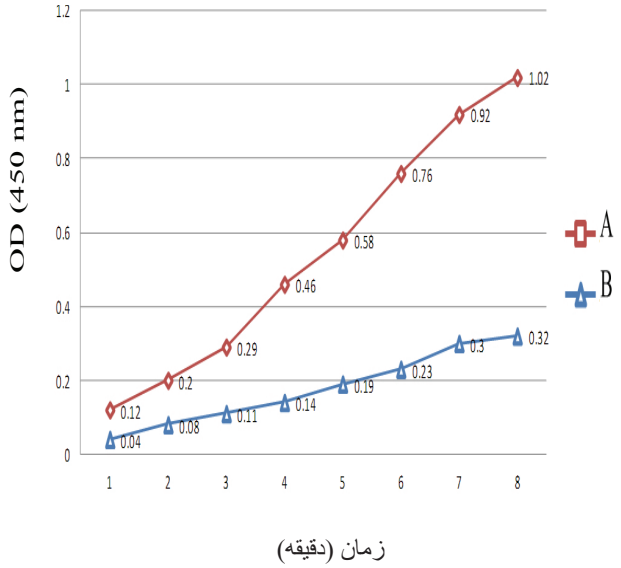
تثبیت آنتی بادی روی بستر نایلون فعال شده نوار نایلون تحت

یک فرآیند چهار مرحله‌ای پس از فعال‌سازی سطحی، جهت تثبیت آنتی بادی آماده گردید (شکل ۱).

همان گونه که در شکل مشاهده می‌شود در نتیجه فرآیندهای چهارگانه انجام شده بر روی بستر، گروه‌های عاملی یکدستی ایجاد شده است که کاملا مناسب اتصال آنتی‌بادی با شرایط مد نظر می‌باشد. سنجش‌های مربوط به سرعت واکنش و جذب نوری سوبسترا رنگی برای این بستر سه مرتبه تکرار گردید که میانگین نتایج آن در نمودار ۲ خلاصه شده است. میزان جذب نوری از دقیقه اول آغاز واکنش آنزیمی تا دقیقه هشتم با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر، برای نمونه تست و کنترل مورد سنجش قرار گرفت. میانگین $OD_{۴۵۰nm}$ نمونه تست در دقیقه هشتم ۱/۰۲و میانگین $OD_{۴۵۰nm}$ نمونه کنترل در همان زمان معادل ۰/۳۲، گزارش گردید. در این مورد نیز کارامدی تثبیت آنتی بادی تنها در ناحیه‌ای از نوار که تحت فرآیند فعال سازی قرار گرفته بود مشاهده شد و در قسمت ها دیگر چنین اتفاقی رخ نداد.



شکل ۱- نمایی از چگونگی فرایند ساخت پلیمر های چندگانه بر روی یکدیگر برای دستیابی به بستر مناسب جهت تثبیت آنتی‌بادی.۱-استفاده از نوار glass fiber که از آن به عنوان یک تکیه گاه- ساخت لایه نایلون با ریختن محلول نایلون ۶،۶ حل شده در اسید فرمیک.۲- تیمار بستر نایلون با HCL ۲،۵ درصد و قرار گیری گروه‌های NH_2 پلیمر PEI بر روی گروهای کربوکسیل نایلون.۳- ایجاد گروه های یکنواخت و متراکم NH_2 پلیمر PEI برای واکنش با پلیمر سوم (MAMEC)، گروه های انیدرید این پلیمر پایه‌های درگیر با آنتی‌بادی را تشکیل می‌دهند.۴- تثبیت آنتی‌بادی به صورت کووالان بر روی پایه‌های گروه های انیدریدی.



نمودار ۲- داده های مربوط به تست نوارهای نایلون در زمان‌های مختلف بر اساس $OD_{۴۵۰nm}$ حاصل از پیشرفت واکنش آنزیمی، A- روند افزایش جذب نور توسط سوبسترای رنگی موجود بر روی نوارنایلون فعال شده و میانگین میزان جذب نور در زمان‌های مختلف پس از سه بار تکرار آزمای، B- روند افزایش جذب نور توسط سوبسترای رنگی موجود بر روی نوار نایلون خام و میانگین جذب نور در زمان‌های مختلف پس از سه مرتبه تکرار آزمایش.

نتایج بدست آمده از آزمایشات فوق حاکی از اثر بخشی فرایندهای فعال کننده بستر در جهت افزایش نرخ تثبیت آنتی‌بادی می‌باشد. تغییرات اعمال شده روی سطح بسترها، باعث افزایش ظرفیت تقریبی ۲ و ۳ برابری تثبیت آنتی‌بادی به ترتیب بر روی بسترهای نیترو سلولز و نایلون شده است به این ترتیب می‌توان نتیجه گیری نمود که با فعال‌سازی بسترها از طریق پردازش سطحی آن‌ها می‌تواند کارآمدی فرایند تثبیت آنتی بادی را افزایش داد و آن‌ها را برای ساخت سامانه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

تشخیصی مهیا نمود. تست نوارها با آنتی‌ژن IpaD نیز به انجام رسید. نتیجه حاصل از این تست بیانگر عدم اتصال آنتی‌بادی به بستر بود. این کار خود می‌تواند تایید کننده ویژگی و کیفیت تثبیت آنتی‌بادی‌های اولیه باشد.

بحث

امروزه استفاده از سامانه های تشخیصی نواری (استریپ نواری) به عنوان یک ابزار کارآمد در تشخیص عوامل بیولوژیک به شدت در حال توسعه می‌باشد. 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 فرآیند مهندسی تثبیت و در نهایت کارآمدی سامانه تشخیصی دارد. به همین جهت مهندسی سطح بسترها از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشند. یکی از بسترهای مورد مطالعه در این تحقیق نیترو سلولز بود. همانگونه که از ساختار نیتروسلولز مشخص است (شکل ۱) حالت رزونانس ایجاد شده بین دو اتم اکسیژن متصل به اتم نیتروژن حالت جزیی منفی ایجاد نموده که در مجموع بستر نیتروسلولز را به بستری با بار منفی تبدیل نموده است. در اثر مواجهه بستر نیتروسلولز با غلظت‌های پایین استونیتریل بستر به گونه ای تغییر می‌یابد که بارهای سطحی آن افزایش یافته و شرایط را برای اتصال هر چه بیشتر و قوی‌تر آنتی‌بادی‌ها فراهم می‌آورد. آنتی بادی‌ها از طریق پیوند الکترواستاتیک و با شیوه جذب سطحی به بستر فعال شده نیتروسلولز متصل می‌گردند. عمده تحقیقات انجام شده در این زمینه توسط آقای Sun و همکارانش در سال ۲۰۰۱ انجام شده است. در تحقیق مذکور صرفاً روش تثبیت همزمان مورد استفاده قرار گرفته است بعلاوه میزان تثبیت آنتی‌بادی در غلظت‌های مختلف استونیتریل نیز مورد ارزیابی قرار نگرفته‌است. از سوی دیگر هیچگونه مقایسه‌ای میان نمونه تست و کنترل صورت نپذیرفته و غلظت‌های خورنده استونیتریل گزارش نشده است (۱۰). نواقص تحقیق آقای Sun مانع از درک صحیح و تصمیمات درست در ارتباط با نحوه استفاده از نیتروسلولز فعال شده در سیستم‌های تشخیصی می‌گردد. بستر دیگری که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت نایلون ۶،۶ بود. نایلون به خودی خود با گروه‌های محدود آمین و کربوکسیلی خود توانمندی تثبیت آنتی‌بادی را در مقیاس وسیع ندارد بنابراین جهت تبدیل آن به یک بستر ایده‌آل لازم است که قبل از استفاده از طریق تیمارهای فعال‌سازی، وضعیت بار سطحی آن را جهت اتصال صحیح آنتی‌بادی با حداکثر ظرفیت (تعداد آنتی‌بادی تثبیت شده در واحد سطح بستر) مناسب نمود. در شکل ۲ مراحل مختلف و تیمارهای ترتیبی بر روی بستر نایلون در نهایت گروه‌هایی را فراهم می‌آورد که برای تثبیت آنتی بادی از ناحیه گروه امین بسیار مناسب می‌باشند. هوندا و همکاران در سال ۱۹۹۵ برای اولین بار تکنیکی مشابه را پایه گذاری نمودند که چندین تفاوت با مطالعه حاضر دارد (۳). بدین ترتیب که هیچ اشاره‌ای به نحوه بکارگیری نایلون به منظور ساخت لایه‌ای آن نشده است و حلال مناسب آن مورد بررسی قرار نگرفته است. در مطالعه هوندا بلاکینگ اختصاصی بستر انجام نشده است که در پی عدم انجام این مرحله واکنش‌های غیر اختصاصی فوق‌العاده‌ای به وقوع خواهد پیوست. همچنین مقایسه‌ای بین حالت فعال شده نایلولن و غیر فعال آن صورت نگرفته است. در مقاله هوندا و همکارانش برای سنجش میزان تثبیت آنتی بادی از آنزیم آلکالین فسفاتاز استفاده شده است. آن ها با استفاده از تکنیک الیزا میزان جذب را در $OD_{۴۵۰nm}$ معادل ۲ گزارش نمودند که نتایج آن مطالعه به دلیل تفاوت در نوع روش، دامنه سنجش و آنزیم مورد استفاده با نتایج مطالعه پیش رو مغایرت دارد. به دلیل استفاده از کاغذ و محدودیت در سنجش OD به وسیله دستگاه نانودراپ در رقت‌های پایین، میزان حساسیت این تکنیک در مرحله استفاده عملی از این سیستم یعنی در سامانه تشخیصی نواری LFIA مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج قابل توجهی منطبق بر نتایج مطالعه پیش رو حاصل گردید. ویژگی و کیفیت آنتی بادی تثبیت شده بر روی باندها نیز با به کارگیری آنتی‌ژن غیر مرتبط IpaD (ماژور آنتی ژن شیگلا دیسانتری) به عنوان یک آنتی‌ژن جایگزین مورد ارزیابی قرار گرفت که اتصال آنتی‌بادی به آن منفی گزارش گردید (هر چند که برای بررسی میزان ویژگی یک سیستم بایستی از آنتی‌ژن‌های بسیار مشابه با آنتی‌ژن اصلی استفاده نمود). این تست تا حدود زیادی تایید

www.SID.ir

Archive of SID

کننده ویژگی آنتی‌بادی‌های تثبیت شده اولیه باشد. با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق می‌توان نتیجه‌گیری نمود که ظرفیت پذیرش آنتی‌بادی توسط نایلون فعال شده بیشتر از بستر نیتروسولز فعال می‌باشد اما در سوی دیگر حرکت موئینه در بستر نایلون به شدت افت می‌نماید بنابراین استفاده از نایلون برای طراحی سیستم‌هایی که به نوعی وابسته به حرکت موئینه می‌باشند پیشنهاد نمی‌گردد. نوارهای نیتروسلولز حساسیت و ظرافت بیشتری نسبت به بستر نایلون از خود نشان می‌دهند و همچنین کار با بستر نیتروسلولز نیاز به صرف مواد، هزینه و وقت کمتری نسبت به بستر نایلون دارد. این تحقیق تا حدودی زیادی توانسته است علاوه بر شرح تمامی زوایای پنهان تثبیت بر روی بسترهای نیتروسلولز و نایلون، توانمندی‌ها و نقاط ضعف هر کدام از روش‌ها را بیان کند و تصویر واقعی از مکانیسم افزایش میزان کارآمدی تثبیت را ارائه نماید.

تشکر و قدردانی

از کلیه دانش پژوهان مراکز تحقیقاتی بیوتکنولوژی کاربردی و بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم بقیه ا...(عج) که مارا در انجام این تحقیق یاری نموده اند تشکر و قدردانی می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

(1)- Charles E, Synthesis of Caprolactam and Nylon 6. J Chem Educ, 1978; 55: 51.

(2)- Gupta MN. Thermostabilization of Proteins. Biotechnol Appl Biochem,1991;14: 1–11.

(3)- Honda T, Miwatani T, Yabushita Y, Koike N, Okada K. A Novel Method To Chemically Immobilize Antibody on Nylon and Its Application to the Rapid and Differential Detection of Two Vibrio Parahaemolyticus Toxins in a Modified Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Clin Diag Immunol, 1995;177–181.

(4)-Iheoma A. The Density of Cellulose Nitrate. J Appl Polymer Sci, 1978; 22: 309–313.

(5)- Iheoma Adekunle. Production of Cellulose Nitrate Polymer from Sawdust. E-Journal of Chemistry, 2010: 7 (3); 709-716.

(6)- Klibanov A. Enzyme stabilization by immobilization. Anal Biochem, 1979; 93: 1–25.

(7)- Malhotra B, Turner A, Advances In Biosensors, Published by: JAI Press, 2003; 5.

(8)- Mateo C, Palomo J, Fernandez-Lorente G, Guisan J, Lafuente RF. Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity via Immobilization Techniques, Enzyme Microbial Technol, 2007;40: 1451–1463.

(9)- Nunes GS, Marty JL. Immobilization of Enzymes on Electrodes. Methods in Biotechnology, 2006; 22: 239-250.

(10)- Roddy DA, Immobilised nucleases. Crit Rev Biotechnol, 1993; 13: 255–73.

(11)- Sun S, Mo WJ, Ji Y, Liu S. Use of Nitrocellulose Film for Affinity Direct mass for Spectrometry for the Analysis of Antibody/Antigen Hnteractions. Rapid commun.Mass Spectrom, 2001;15:1743-1746.

(12)- http://www.psrc.usm.edu/macrog/nylon.htm.

www.SID.ir