پایه ریزی روش غیر مستقیم الیزا (ELISA) جهت شناسایی زیرکلاسهای اختصاصی ضد آلرژنهای گرده گیاه زعفران

دکتر عبدالرضا وارسته، فاطمه واحدی، مجتبی سنکیان، هومن کاغذیان، شیما تولایی، فروغ گلساز شیرازی،

دکتر مجید عارفی عنبرانی، دکتر محمود محمودی

بخش ایمونوبیوشیمی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تاریخ دریافت مقاله: ۸۲/۴/۲۵ ، تاریخ پذیرش مقاله: ۸۳/۶/۴

خلاصه

گرده گیاهان یکی از عوامل مهم ایجاد بیماریهای آلرژیک یا ازدیاد حساسیت نوع یک می باشد. در مطالعات اخیر، آلرژی زائی گرده گیاه زعفران نیز به اثبات رسیده است. نقش IgE در ایجاد علائم بالینی به خوبی مشخص گردیده است، اما عوامل دیگری نیز ممکن است در ایجاد یک طیف متعدد از علائم بالینی آلرژی دخیل باشند. حضور زیر کلاس های اختصاصی IgG علیه آلرژنها، به عنوان عوامل دخیل در ایجاد علائم بالینی آلرژی نیز مطرح می باشند.

هدف از انجام این مطالعه، پایه ریزی روش ELISA برای شناسائی زیر کلاسهای اختصاصی ضد عصاره گرده زعفران می باشد. به طور خلاصه روش کار استفاده شده عبارت است از، پوشش (Coat) عصاره تام گرده زعفران بر روی دیواره های میکروپلیت مخصوص ELISA و سپس اشباع جایگاههای اشغال نشده سطح پلیت توسط آلبومین سرم گاو(BSA). با افزودن سرم افراد مورد مطالعه، آنتی بادی ضد یکی از زیر کلاس های IgG (کونژوگه با آنزیم پراکسیداز) اضافه می گردد. در مرحله نهائی با افزودن TMB و تعیین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز موجود در پلیت، حضور زیر کلاس IgG مشخص می گردد. در پایان با افزودن اسید کلریدریک، جهت توقف واکنش آنزیمی، می توان میزان جذب نوری در ۴۵۰nm که ارتباط مستقیم با میزان آنتی بادی اختصاصی را دارد، مشخص نمود. جهت بررسی کارائی روش ELISA پایه ریزی شده، حضور زیر گروه IgG اختصاصی در دو گروه از افراد بررسی شده است. این دو گروه شامل افرادی بودند که در مناطق زعفران خیز و غیر زعفران خیز زندگی می کنند. نتایج حاصل اختلاف معنی داری را به لحاظ حضور میزان زیر کلاس IgG اختصاصی ضد عصاره گرده زعفران میان دو گروه مشخص می نماید.

کلمات کلیدی: الیزا، زعفران، گرده، IgG.

مقدمه

رینیت آلرژیک یکی از علائم بالینی آلرژی فصلی و آلرژی شغلی می باشد. گرده گیاهان به عنوان یکی از مهمترین عوامل ایجاد رینیت های آلرژیک مطرح هستند (۱۵) مطالعات قبلی نشان داده اند که حدود ۳۰٪-۲۰ از آلرژی های بینی به آسم منتهی می شوند (۶). مواد متعددی با منشاء گیاهی باعث ایجاد آلرژی شغلی می شوند. ۴۰٪ از کارگرانی که در معرض این مواد می باشند، علائم آلرژی را ظاهر می نمایند. ۲ تا ۱۵٪ از افرادی که از آسم رنج می برند دچار آلرژی شغلی نیز می باشند (۴).

گیاه زعفران (*Corcus sativus*) متعلق به خانواده زنبقمی باشد که پرچمهای آن به عنوان افزودنی غذایی مورد استفاده قرار می گیرد. زعفران در ایران، اسپانیا و مناطقی دیگر از دنیا کشت می شود. مهمترین منطقه کشت زعفران در ایران، استان خراسان می باشد. گرده گیاه زعفران به عنوان آئروآلرژن برای افرادی که در مناطق زعفران خیز زندگی می کنند گزارش شده است. به عنوان مثال در گزارش‌های قبلی، به شیوع اپیدمیک یک بیماری شبیه آنفلوآنزا درطی فصل گرده افشانی زعفران اشاره شده است (۵، ۱۰). آزمایشات کلینیکی نقش گرده گیاه زعفران را در ایجاد آلرژی تایید نمود (۱۴). واکنش نسبت به آلرژنها معمولا به عنوان واکنشهای ایمونولوژیک به واسطه IgE در نظر گرفته می شود (۲). IgG اختصاصی آلرژن در سرم انسان دیده شده است، اما نقش آن در ایجاد حساسیت به آلرژنها مشخص نیست (۱۷). روش الیزا جهت مطالعه پاسخهای

نویسنده مسئول: دکترعبدالرضا وارسته، تلفن: ۵-۷۶۲۷۶۰۱-۰۵۱۱، نمابر: ۷۶۱۸۰۸۸-۰۵۱۱، Email: a-varasteh@mums.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

هومورال در مطالعات سرواپیدمیولوژیک گسترده، از کارآیی مناسبی برخوردار می باشد. هدف از این تحقیق، طراحی روش الیزا برای شناسایی زیر کلاسهای اختصاصی IgG علیه گرده زعفران در سرم انسان می باشد.

مواد و روش کار

تهیه آنتی ژن (عصاره گرده گیاه زعفران): عصاره گرده گیاه زعفران با ایجاد تغییراتی در روش Harfi (۸) آماده گردید که به طور مختصر در زیر شرح داده شده است. گرده های زعفران از پرچم این گیاه در ماههای گرده افشانی (مهر- آبان) تهیه شد. گرده ها به وسیله استن سرد به نسبت ۱ به ۱۰ (یک گرم در ۱۰سی سی) همراه با تکان مداوم به مدت ۱۶ ساعت چربی زدائی گردید. پس از آن استن از طریق مکش با استفاده از ارلن بوخنر و قیف مخصوص آن جدا شد. گرده های فوق، در بافر فسفات ۰/۰۱ مولار (pH=۷/۴) حاوی EDTA ۲۰ میلی مولار و PMSF ۱ میلی مولار و به مدت ۱۸ ساعت به هم زده شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در g ۵۶۰۰ سانتریفوژ و محلول رویی در برابر بافر فسفات ۰/۰۱ میلی مولار به مدت ۴۸ ساعت دیالیز گردید. بعد از این مرحله عصاره آماده شده از فیلتر µm ۰/۲۲ عبور داده می شود. تمام مراحل فوق در ۴ درجه سانتی گراد انجام می گیرد. غلظت پروتئین های عصاره گرده گیاه زعفران توسط روش Bradford اندازه گیری شد (۱).

تهیه سرم افراد : ۴۴ نمونه سرم از زعفران کاران ساکن در مناطق زعفران خیز جنوب استان خراسان (بیرجند و قاین) که دارای علائم بالینی آلرژی به گرده زعفران بودند تهیه شد. این نمونه ها به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. جهت کنترل منفی، ۲۰ نمونه سرم نیز از داوطلبان سالم که در مناطق کشت زعفران زندگی می کردند تهیه شد.

روش الایزا: روش الیزا بر روی پلیتهای میکروتیتر (Nunc - Covalink) انجام شد. در هر یک از چاهک های پلیت های الیزا ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گرده زعفران ریخته و به مدت یک شب در ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت. غلظت پروتئینی عصاره مورد استفاده برای کوتینگ ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد که در ۲ بافر با pH های متفاوت (بافر فسفات pH = ۳ و pH = ۸/۲) رقیق شده بود. در مرحله بعد پلیت توسط بافر شستشو دهنده (بافر فسفات، pH = ۷/۴ حاوی ۰/۰۵٪ از Tween 20 و ۰/۰۵٪ BSA) سه مرتبه شستشو داده شد. درمرحله بعد محلول اشباع کننده (BSA ۱٪ در بافر فسفات) به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر به هر چاهک افزوده شد و در ۲ حالت متفاوت یکی در ۴ درجه سانتی گراد به مدت یک شب و دیگری در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت قرار گرفت. سپس پلیت ها دو نوبت با بافر شستشو داده شدند و نمونه ها به صورت دوتایی به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک در ۲ رقت متفاوت ۱ به ۱۰ و ۱ به ۵۰ اضافه گردید و پلیت ها به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. بعد از این مرحله و شستشوی مجدد، آنتی بادی موشی علیه کلاسهای IgG انسانی mouse anti human $IgG_{1,2,3,4}$ (منوکلونال آنتی بادی، تهیه شده از شرکت Sigma)، به طور مجزا به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید.

بعد از شستشوی مجدد ، محلول کونژوگه پراکسیداز-IgG (anti mouse HRP) تهیه شده از شرکت sigma به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک در رقتهای متفاوت اضافه گردید و پلیتها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت قرار داده شد. در نهایت بعد از شستشو، از محلول سوبسترای آنزیم که شامل ۵۰ میکرولیتر TMB(3,3,5,5 Tetra Methyl Benzidine) با غلظت ۰/۳ mg/ml در DMSO و ۵ میلی لیتر بافر استات سدیم pH= ۵/۵ همراه با ۱ میکرولیتر (H_2O_2 ۳۰٪) می باشد به پلیتها اضافه گردید. پلیت ها در تاریکی و در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. واکنش به وسیله اضافه نمودن ۵۰ میکرولیتر HCl ۲ نرمال متوقف و میزان جذب نوری نمونه در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مخصوص الیزا تعیین گردید. در تمام مراحل نگهداری، سطح پلیتها به وسیله پارافیلم به منظور جلوگیری از تبخیر پوشانده می شد.

آنالیز آماری: جذب متوسط نمونه ها در هر سرم با جذب متوسط سرم شاهد مقایسه گردید. جذبهای بین نمونه های مختلف نیز به وسیله برنامه آماری SPSS با هم مقایسه شد. میزان p با مقدار کمتر یا مساوی ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد. در صورتی که میزان جذب نوری یک نمونه بالاتر از حد cut-off (2SD+ متوسط جذب نوری کنترل منفی=cut-off) بود، این نمونه به عنوان فرد حساس به زعفران در نظر گرفته شد.

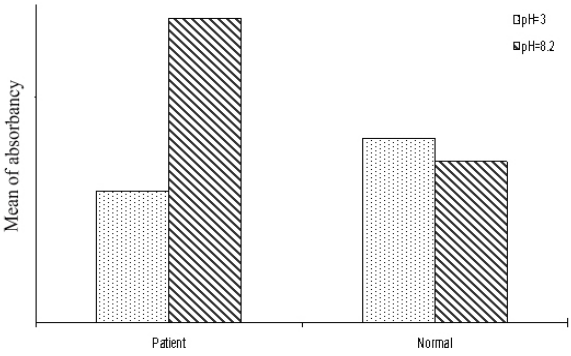
Archive of SID

www.SID.ir

نتایج

بافرهای کوتینگ (coating buffer)

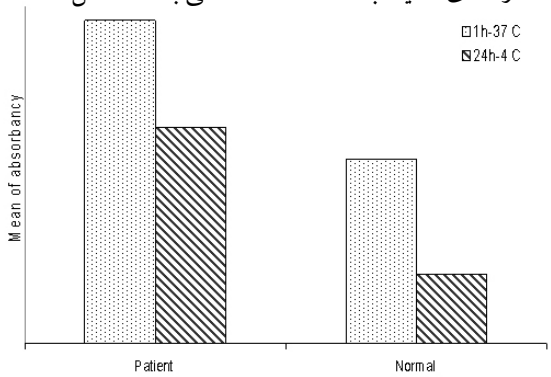
به منظور ارزیابی بافر نگهدارنده، مقایسه بین متوسط جذبهای خوانده شده در نمونه کنترل و نمونه های مورد آزمایش در ۲ حالت مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت بین بافر فسفات ۰/۰۱۵ مولار pH= ۸/۲ با pH=۳ در میان ۲ گروه مورد مطالعه معنی دار بود. (شکل ۱)



شکل ۱ : مقایسه بین بافرهای نگهدارنده متفاوت (pH= ۸/۲ , pH= ۳) جهت الیزای غیر مستقیم به منظور ارزیابی آلرژنهای گرده زعفران.

شرایط اشباع شدن

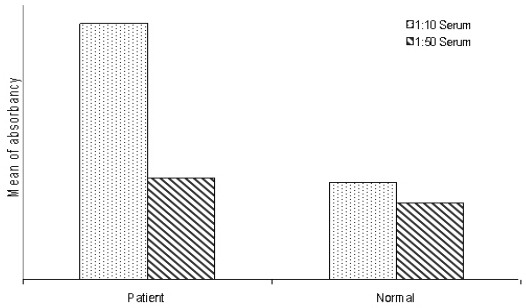
مقایسه بین ۲ حالت اشباع شدن نشان داد که اشباع شدن در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت یک شب موثرتر از اشباع شدن در دمای محیط به مدت ۱ ساعت می باشد (شکل ۲).



شکل ۲ : مقایسه بین شرایط مختلف اشباع کردن جهت الیزای غیر مستقیم به منظور ارزیابی آلرژنهای گرده زعفران.

رقتهای سرم

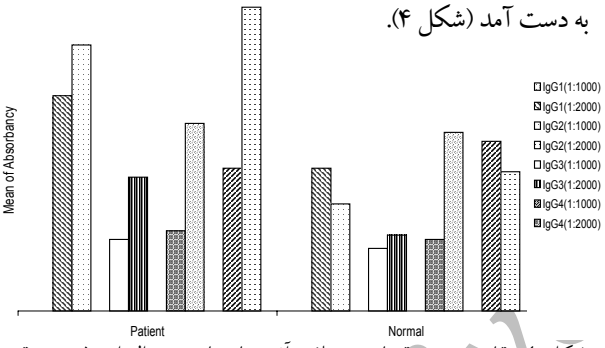
به منظور یافتن بهترین رقت سرم، رقتهای متفاوت ۱۰ : ۱ و ۱:۵۰ تعیین شد و بهترین رقت،۱:۱۰ مشخص شد (شکل ۳).



شکل ۳: ارزیابی رقتهای مختلف سرم جهت الیزای غیر مستقیم به منظور ارزیابی آلرژنهای گرده زعفران.

رقتهای آنتی بادی

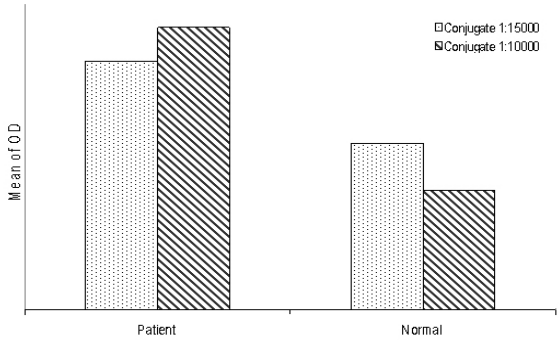
با به کار بردن رقتهای (۱ : ۲۰۰۰ - IgG4 ، ۱ : ۱۰۰۰ - IgG3، ۱ : ۱۰۰۰ - IgG2 ، ۱ : ۱۰۰۰ - IgG1) آنتی بادی‌ها نتایج بهتری به دست آمد (شکل ۴).



شکل ٤: مقایسه بین رقتهای مختلف آنتی بادیها جهت الیزای غیر مستقیم به منظور ارزیابی آلرژنهای گرده زعفران.

رقتهای کونژوگه

رقتهای متفاوت کونژوگه (HRP-Antiglobulin) ، ۱:۵۰۰۰ و ۱:۱۰۰۰۰ و ۱:۲۰۰۰۰ توسط روش الیزا در حالت دوگانه مورد آزمایش قرار گرفت. رقت ۱:۱۰۰۰۰ از کونژوگه کمترین پس زمینه و بالاترین جذب را برای نمونه های حساس نشان داد (شکل ۵).



شکل ۵: مقایسه بین رقتهای مختلف کونژوگه جهت الیزای غیر مستقیم به منظور ارزیابی آلرژنهای گرده زعفران.

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

در فردی که ایمونیزه نشده و در معرض آنتی ژن (به عنوان مثال آئروژنها مانند علف و چمن و دانه ها و گرده) قرار می‌گیرد سطح آنتی بادی‌های اختصاصی او معمولا خیلی پائین بوده یا غیر قابل اندازه‌گیری می‌باشد. بنابراین حساسیت یک روش اندازه گیری که برای سنجش این نمونه سرمها به کار می رود مهم می‌باشد. زیرا سطح نانوگرم بر میلی لیتر آنتی بادی IgG اختصاصی باید در حضور سطح میلی گرم بر میلی لیتر IgG غیراختصاصی اندازه گیری شود. در مقابل افرادی که آنتی ژن‌ها را به صورت تزریقی دریافت کرده‌اند مثلا به صورت اتفاقی در معرض آن قرار گرفته باشند یا تحت ایمونوتراپی با آلرژن فعال باشند، می‌توانند سطح بالای میکروگرم بر میلی لیتر از IgG اختصاصی را تولید کنند. در این سطح‌ها اتصال غیر اختصاصی و حساسیت سنجش بسیار با اهمیت می باشد (۱۳).

اگرچه روشهای مختلفی مانند RIA و EIA برای سنجش کمی IgG اختصاصی آنتی ژن و سرم انسان طراحی شده است (۱۷)، این تحقیق بر روی سنجش کیفی IgG اختصاصی آنتی ژن در سرم انسان تمرکز نموده است.

سطوح آنتی بادی IgG اختصاصی سرم برای تخمین در معرض قرار گرفتن شغلی به آنتی ژن‌ها، مورد ایراد قرار گرفته است و پیشنهاد شده که به عنوان بیومارکر در معرض قرار گرفتن به آنتی ژن‌ها در نظر گرفته شود (۳).

در مطالعات قبلی به این اشاره شده است که آنتی بادیهای IgG اختصاصی علیه آئروآلرژنها (قارچها، اکتینومیست ها و غیره) می تواند در سرم افراد نرمال تعیین گردد، اگرچه این سطوح معمولا پائین تر از بیماران آلرژیک می باشد (۱۰ ، ۱۲). نتایج تحقیق حاضر اختلاف معنی داری را بین دوگروه نشان می دهد، بنابراین توصیه می شود که آئروآلرژنهای زعفران در لیست (panel) آلرژنها محسوب گردد. زمانی که بیماران آلرژیک در معرض قرار می گیرند (مخصوصا افرادی که در مناطق زعفران خیز زندگی می کنند)، استفاده از آنتی ژن‌های خالص در سنجش ایمنی سبب کاهش قابل ملاحظه احتمالی واکنشهای متقاطع می شود (۹). در این تحقیق آنتی ژن خام مورد استفاده قرار گرفت و چون گیاهان دارای آلرژنهای مشترک هستند، انتظار می رود که با آنتی ژنهای خام واکنشهای متقاطع از خود نشان دهند (۱۱). در این تحقیق روش حساسی که می تواند برای درک نقش سطوح زیر کلاسهای مختلف IgG در حالتهای آلرژیک و رابطه آنها با تظاهرات بالینی مورد استفاده قرار گیرد طراحی گردید. این روش می تواند به عنوان روشی ساده برای ردیابی تاثیر ایمونوتراپی مفید باشد که انتظار می رود در طی ایمونوتراپی تولید آنتی بادی‌های بلوک کننده IgG را تحریک نماید. همچنین می تواند به طور کلی در جمعیت جهت مطالعات گسترده سرواپیدمیولوژیک مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به خاطر تامین هزینه های مورد نیاز و همکاری سرکارخانم دکتر کرمانی و آقای انانی برای جمع آوری نمونه ها تشکر و قدردانی به عمل می آید.

References

1. Bradford M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of micrigram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal. Biochem.,72:248-56.
2. Burrows B., Martinez F. D., Halonen M., 1989, Association of asthma with serum IgE levels and skin test reactivity to allergens. N Engl. J. Med., 320:271-7.
3. Edward W., 1995, IgG antibodies against moulds and actinomycets as biomarkers of exposure in the work environment. Occup Hyg., 1:247-260.
4. Brito F. F., *et al.* 2002, Occupational rhinoconjuctivitis and asthma in a wool worker caused by dermestidase spp., Allergy, 7(12): 1191-1200.
5. Feo F., Martinez J., Galindo P. A. , Cruz A., Garcia R., Guerra F., 1997, Occupational allergy in Saffron workers. Allergy, 52:633-641.
6. Grendelmeier S. H., 2001, Pollen as the cause of allergies, Ther. Umsch., 58 5: 285-91.
7. Hamilton R. G., Adkinson N. F., 1979, Solid phase radioimmunoassay for quantitation of antigen specific IgG in human serum with I-125 protein A from *Staphylococcus aureus*. J. Immunol., 122:1073-1079.
8. Harfi H.A., Kwaasi A.A., Tripirneni P., Pahar R. S., Groff Lonnervig V., Al-Sedairy S. T., 1992, Characterization of antigens and allergens of date palm pollen, Allergy, 47:535-544.
9. Heiss S., Fischer S., Muller W. D., Weber B., 1996, Identification of a 60 Kd cross-reactive allergen in pollen and plant-derived food, J. Allergy Clin. Immunol., Nov, 985pt1: 938-47.
10. Katia M. L., Ojanen T. H., Mantyjarvi R. A., 1986, Significance of IgG subclass antibodies against environmental microbial antigens in a farming population, Clin. Allergy, 16: 459-467.

Archive of SID
www.SID.ir

11. Martinez A., Martinez J., Palacios R., 1995, The pan allergic character of profiling, Allergy Clin. Immunol. News, 73: 85-94.
12. Pulumbo S., Di Felico G., Mari A., Bonini S., 1994, IgG subclass antibodies against parietaria judica in normal and 8 allergic subjects, Allergy., Apr, 494: 229-9.
13. Rose N. R., Friedman H., Manual of Clinical Laboratory Immunology, American Society for Microbiology, Washington D. C., 1992, 112-122.
14. Samei A., Varasteh A. R., 2000, Development of an ELISA method for detection of specific IgE to saffron pollen's, Feiz., 13; 1- 6, (In persian).
15. Solomon W. R., 1984, Aerobiology of polleniosis, J. Allergy Clin. Immunol., 585: 285-91.
16. Varasteh A. R. , Rahimzadeh Oskuee M., Farid Hosseini R., Rohani M., 2000, Determination of saffron pollen allergenicity, Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 3; 33-37 (In persian).
17. Wilson A. B., Deighton J., Lachmann P. J., Ewan P. W., 1994, A comparative study of IgG subclass antibodies in patients allergic to wasp or bee venom, Allergy, Apr, 494: 272-80.

Archive of SID

www.SID.ir