دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی(PhD) در رشته بیوشیمی بالینی

عنوان

تولید آنتی بادیهای مونوکلونال بر علیه مارکر تروپونین I قلبی (cTnI) و طراحی تست ایمونواستریپ بر پایه نانو ذرات طلا برای تشخیص بالینی آن در سرم انسان.

نگارش

مجید آســیابانــها رضایی

استاد راهنما

دکتر محمد جواد رسایــی

اساتید مشاور

دکتر جواد محمد نژاد

دکتر ملیحه پاک نژاد

شهریور 1395

بسم الله الرحمن الرحیم
علی شیرازی

تأییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع

بعد از دفاع از حوزه پژوهشی دانشکده دریافت و بعد اسکن نمایید.

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی

دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسآنها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده 1- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده 2- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

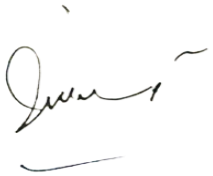
ماده 3- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه(اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده 4- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده 5- این آیین‌نامه در 5 ماده و یک تبصره در تاریخ 87/4/1 در شورای پژوهشی و در تاریخ 87/4/23 در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ 87/7/15 شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **مجید آسیابانها رضایی** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** ورودی سال تحصیلی **1390** مقطع **دکتری تخصصی بیوشیمی بالینی**دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا



تاریخ 95/7/12

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده 1 : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده 2 : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

کتاب حاضر، حاصل **پایان‌نامه دکتری تخصصی** نگارنده در رشته **بیوشیمی بالینی** است که در سال **1395** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر محمدجواد رسایی** ، مشاوره **دکتر جواد محمد نژاد و دکتر ملیحه پاک نژاد** از آن دفاع شده است.

ماده 3 : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مآزاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

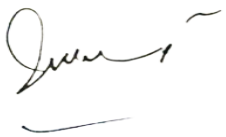
ماده 4 : در صورت عدم رعایت ماده 3، 50٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده 5 : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده 4 را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده 6 : اینجانب **مجیدآسیابانهارضایی**دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** مقطع **دکتری بیوشیمی بالینی** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی: مجید آسیابانها رضایی

تاریخ و امضا 95/7/12



دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی(PhD) در رشته بیوشیمی بالینی

عنوان

تولید آنتی بادیهای مونوکلونال بر علیه مارکر تروپونین I قلبی (cTnI) و طراحی تست ایمونواستریپ بر پایه نانو ذرات طلا برای تشخیص بالینی آن در سرم انسان.

نگارش

مجید آســیابانــها رضایی

استاد راهنما

دکتر محمد جواد رسایی

اساتید مشاور

دکتر جواد محمد نژاد

دکتر ملیحه پاک نژاد

شهریور 1395

تقدیم به :

خانواده گرانقدرم

و

همه آنهایی که مصداق "مَن عَلَّمَنی حَرفَا" هستند

تشکر و قدردانی:

پروردگار متعال را به خاطر همه نعمت هایی که به من ارزانی نموده و می نماید شاکر هستم.سپاس گزار ذات پاک او هستم که مسیری را در زندگی من قرار داد که بهترین مسیر هاست و ارزو میکنم مصداق فرمایش حضرت رسول (صلی الله علیه) باشم که فرمودند جوینده دانش در کنف عنایت خداوند است. برخود لازم میدانم در نهایت خضوع تشکر و سپاس خود را از استاد فرزانه **جناب آقای دکتر محمد جواد رسایی** به خاطر قبول زحمت رساله اینجانب ابراز بدارم که در طی این مدت طولانی صبورانه و مدبرانه در پیشبرد کار زحمات فراوانی را متقبل شده اند.از اساتید گرامی**جناب آقای دکتر جواد محمد نژاد و سرکار خانم دکتر ملیحه پاک نژاد** که همیشه و در همه حال در طول کار مرا صمیمانهیاری فرمودند تشکر فراوان دارم.

همچنین برخود لازم میدانم از اساتید محترم گروه بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس ونیز اساتید گرامیگروه بیوتکنولوژی دانشگاه تربیت مدرس صمیمانه تشکر داشته باشم.همچنین برخود فرض می دانم از اساتید محترم گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی تهران، بویژه سرکار خانم دکتر ملیحه پاک نژاد به جهت سعه صدر و راهنمایی های ارزنده تشکر فراوان داشته باشم.همچنین از دانشجویان محترم گروه بیوشیمی و بیوتکنولوژی دانشگاه تربیت مدرس و نیز دانشجویان گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی تهران که در طی این مدت صمیمانه مرا راهنمایی و کمک فرمودند تشکر نمایم.همچنین از کارشناسان محترم گروه بیوشیمی و بیوتکنولوژی دانشگاه تربیت مدرس سرکار خانم افشار نادری ،سرکار خانم اعتمادی و جناب آقای کروندیان تشکر فراوان داشته باشم.همچنین لازم است از اساتید گرانقدر جناب آقای دکتر تقی خانی، دکتر مصباح نمین، دکتر بطحائی،دکتر مدنی،دکتر انصاری که با قبول زحمت در جلسات مختلف شش ماهه و نیز داوری رساله شرکت فرمودند کمال تشکر و امتنان را داشته و از خداوند متعال برای همه آنها طلب سلامتی و سعادت داشته باشم.

خلاصه

مقدمه:امروزه پزشکی برخلاف گذشته صرفا براساس شرایط بالینی نیست.زیرا شرایط پیچیده بیماری ها و تشخیص افتراقی آنها بسیار سخت تر از گذشته است.به همین خاطر نقش تشخیص آزمایشگاهی بسیار با اهمیت است.از طرفی تشخیص آزمایشگاهی براساس تست‌ها و روش‌هایی با حساسیت و اختصاصیت بالاست که می‌تواند در تشخیص درست بیماری کمک کننده باشد. در این میان زمان انجام یک تست نیز بسیار اهمیت دارد.به همین خاطردردهه اخیر سرعت رشد تولید تست‌های تشخیصی سریع بسیار افزایش یافته و مورد توجه قرار گرفته است.این از آن جهت است که تشخیص زودهنگام در درمان موثرتر یک بیماری اهمیت بسیاری دارد.امروزه بیماری‌های قلبی و بویژه آنفارکتوس میوکاردیال یکی از مهمترین عوامل مرگ و میر به شمار می‌روند.درکشور ما این بیماری به عنوان دومین عامل مرگ می‌باشد.تشخیص زودهنگام این بیماری از اهمیت صد چندانی برخوردار است. امروزه روشهای گوناگونی در تشخیص تروپونین I قلبی مورد استفاده قرار می‌گیرند که البته هر کدام محدودیت‌های خاص خودشان را دارند. روش ایمونوکروماتوگرافی یکی از سنجش های ایمنی است که سریع، دقیق و دارای حساسیت کافی می‌باشد و همچنین نیاز به تجهیزات خاص و تکنسین های آموزش دیده ندارد.امروزه تولید کیت های سریع تروپونین I برای تشخیص آنفارکتوس در اولویت تولید قرار دارند.زیرا تشخیص به هنگام این بیماری در جلوگیری از نکروز گسترده و مرگ حتمی بسیار موثر است.

مواد و روش ها:به منظور تولید آنتی بادی مونوکلونال از موش بالب سی استفاده گردید.ایمونیزاسیون با استفاده از پروتئین نوترکیب تخلیص شده با ستون نیکل از باکتری Ecoliانجام گردید.بعد از ایمونیزاسیون سلولهای طحال موش و سلولهای Sp2/0 با استفاده از پلی اتیلن گلیکول با یکدیگر ادغام شدند. سپس غربالگری اولیه و بعد از آن دوبار رقت سازی محدود برای رسید به کلون با افینیتی بالا انجام گردید.نهایتا بعد از تخلیص آنتی بادی‌ها با وسترن بلاتینگ تائید و سپس تعیین ایزوتایپ شدند.از آنتی بادی های مونوکلونال و پلی کلونال برای طراحی تست ایمنوکروماتوگرافی با نانوکونژوگه طلا استفاده شد.با استفاده از نمونه های سرمی از بیماران با مقدار مشخص تروپونین I مبتلا به آنفارکتوس میوکارد cutoff یک نانوگرم بر میلی لیتر طراحی و کنترل کیفی گردید.

نتایج و یافته‌ها:موشهای ایمن شده با پروتئین نوترکیب انتخاب و فیوژن انجام گردید.از بین حدود 800 کلون که سوپرناتانت آنها با آنتی‌ژن پروتئین نوترکیب با الایزا واکنش مثبت داشت یک کلون مترشحه پایدار دارای آنتی‌بادی با تیتر بالا انتخاب و پس ازرقت سازی محدود تک کلون بودن آنها تایید گردید. نهایتا 5 کلون داری بیشترین افینیتی نسبت به تروپونین I قلبی انتخاب و با تزریق کلون‌ها به موش آسیت گرفته شد و سپس مونوکلونال آنتی بادیبا استفاده از پروتئین Gتخلیص گردید.ایزوتایپ آنتی بادی ها از نوع IgG2a و زنجیره سبک از نوع کاپا (k) بود.با استفادهاز آنتی بادی پلی کلونال و مونوکلونال تولید شده تست ایمنوکروماتوگرافی با cutoff یک نانوگرم بر میلی لیتر بر پایه نانوذره طلا طراحی گردید. با استفاده از50نمونه بالینی این تست مورد ارزیابی از نظر حساسیت(100٪)،اختصاصیت(96.1٪)،صحت(98٪) و دقت(100٪) قرارگرفت.

بحث و نتیجه‌گیری:نتایج تحقیق بیانگر این است که آنتی بادی های تولید شده قابلیت لازم در تشخیص تروپونینI قلبی درسرم را داشته و می توانند در تشخیصآنفارکتوس میوکارد مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: تروپونین I قلبی، آنتی بادی مونوکلونال،نانوکونژوگه طلا، تست ایمونوکروماتوگرافی

فهرست مطالب

فصل اول 1

مقـــــدمه و مروری بر مطالعات گذشته 1

1-1- انفارکتوس میوکارد حاد 1

1-2- معیار های تشخیص انفارکتوس میوکارد حاد 1

1-3- نیاز به مارکرهای قلبی با حساسیت و اختصاصیت بالا 3

1-4- آنژین ناپایدار 3

1-5- ترومبولیتیک تراپی 4

1-6- تشخیص افتراقی 4

1-7- مارکرهای قلبی 5

1-8- ویژگی مارکرهای قلبی 6

1-9- انواع مارکرهای قلبی 8

1-9-1- لاکتات دهیدروژناز(LDH) 8

1-9-2- کراتین کیناز MB (CK-MB) 9

1-9-3- تروپونین ها(TROPONINS) 11

1-9-4- پروتئین متصل شونده به اسید چرب قلبی(H-FABP) 12

1-9-5- کوپپتین(COPEPTIN) 13

1-9-6- پپتید ناتریورتیک-B (B-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE) 13

1-9-7- پروتئین واکنشگر-C (HSCRP) 14

1-9-8- فاکتور رشد جفتی (PLACENTAL GROWTH FACTOR ,PLGF) 14

1-9-9- فاکتورمهار مهاجرت ماکروفاژی(MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR) 14

1-9-10- فاکتور رشد تمایز 15 (GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR 15) 15

1-10- مقایسه مارکر های قلبی با تروپونین I 16

1-11- ساختار تروپونین I قلبی 19

1-11-1- تروپونین قلبی I (cTnI) 20
1-11-2- تروپونین C (cTnC) 20
1-11-3- تروپونین T(cTnT) 20
1-12- تخلیص پروتئین از بافت 21
1-12-1- مرحله آماده سازی 22
1-12-2- مرحله تخلیص 22
1-13- روشهای مختلف تخلیص پروتئین از بافت 23
1-13-1- جداسازی با روش آمونیوم سولفات 24
1-13-2- کروماتوگرافی تعویض یون 24
1-13-3- افینیتی کروماتوگرافی: 25
1-13-4- ژل فیلتراسیون: 26
1-14- تولید و تهیه پروتئین های نوترکیب 27
1-14-1- استفاده از ابزار بیوانفورماتیکی برای تعیین اپی توپ های غالب 27
1-14-2- روش های آزمایشگاهی 27
1-14-3- روش های مبتنی بر ایمنوانفورماتیک 28
1-15- فناوری تولید پروتئین نو ترکیب 31
1-15-1- انتخاب وکتور بیانی مناسب 32
1-15-2- انتخاب میزبان برای بیان پروتئین نوترکیب 32
1-15-3- انتخاب برچسب مناسب 34
1-15-4- تخلیص پروتئین نوترکیب 35
1-16- ساختار آنتی بادی 35
1-17- سازماندهی ژنهای ایمونوگلوبولین 37
1-18- آنتی بادی منوکلونال 38
1-19- آنتی بادی پلی کلونال 41
1-20- مزایای آنتی بادی های منوکلونال در مقایسه با آنتی بادی های پلی کلونال 42
1-21- معایب استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال 44

1-22- سنجش های اتصالی 45
1-22-1 سنجش های بیولوژیک 45
1-22-2- سنجش های ایمنی 45
1-22-2-1- سنجش های ایمنی ایزوتوپی 46
1-22-2-2- سنجش های ایمنی غیرایزوتوپی 46
1-23- طراحی سنجش های ایمنی 48
1-24- پوشش دهی آنتی بادی بر سطوح مختلف 50
1-25- استفاده از پلاستیک به عنوان فاز جامد 51
1-25-1- جذب غیر کووالان پروتئین بر سطوح پلاستیک 51
1-25-2- اتصال کووالان پروتئین بر سطوح پلاستیکی 52
1-25-3- اتصال آنتی بادی با آنتی ژن بر سطوح پلا ستیکی توسط پل زدن بوسیله مولکول ها 53
1-26- استفاده از غشاء نیتروسلولز و کاغذ به عنوان فاز جامد 53
1-27- استفاده از شیشه به عنوان فاز جامد 54
1-28- فازهای جامد ذره ای 54
1-28-1- آگارز،سلولز و سفاکریل 54
1-28-2- ذرات لاتکس (ذرات آلی) 55
1-28-3- ذرات معدنی 56
1-29- تست های سریع 56
1-29-1- تست های کَمّی و نیمه کَمّی 57
1-29-2- مزایای تست های سریع 57
1-29-4-کلویید طلا به عنوان نشانگر و تست های سریع 59
1-30- چگونگی تشکیل کلویید طلا و ماهیت آن 62
1-30-1- ماهیت ذره طلا 63
1-30-2- اتصال کونژوگه آنتی بادی- کلویید طلا و مکانیسم جذب پروتئین به طلا 63
1-30-3- مکانیسم جذب کونژوگه طلا- پروتئین و شرایط پایداری 64
1-31- تست های ایمونوکروماتوگرافی 65

1-31-1- ویژگی های ایمونوکروماتوگرافی 67
1-31-1-1-آنتی بادی 67
1-31-1-2-معرف های آشکار کننده 68
1-31-1-3-خصوصیات غشاء 68
1-32- عوامل موثر درحرکت نمونه در تست های ایمنوکروماتوگرافی 69
1-32-1-سرعت جریان موئینه 69
1-32-2-پد نمونه 70
1-32-3-پد کونژوگه 71
1-32-4-پد جاذب 72
1-33- روش های آزمایشگاهی معمول برای تشخیص تروپونین 72
1-33-1- بررسی روشهای تشخیص تروپونین I قلبی در سرم 72
1-34- اهداف، فرضیات و سوالات تحقیق 75
1-34-1- اهداف اصلی: 75
1-34-2- اهداف اختصاصی: 75
1-34-3- اهداف کاربردی: 75
1-34-4- سوالات اصلی تحقیق 75
1-34-5- فرضیات 76
2-1- مواد مصرفی و کیت های مورد نیاز 77
2-2- دستگاههای مورد نیاز 80
2-3- تخلیص پروتئین تروپونین I قلبی از قلب موش و انسان 82
2-3-1- جداسازی بافت قلب از موش(RAT,ALBINO N MARY) 82
2-3-2-جداسازی بافت قلب از انسان(HUMAN HEART) 82
2-3-3- هموژنایز کردن بافت قلبی 82
2-3-5- صاف نمودن هموژنات: 83
2-3-6-دیالیز: 83
2-3-7- سانتریفوژ: 83
2-3-8- ترسیب نمکی (SALTING OUT) 83

2-3-9- کروماتوگرافی تعویض یون(DEAE) 84
2-4- بررسیهای کامپیوتری به منظور انتخاب پپتید های ایمنودومیننت 85
2-4-1- پپتیدهای ایمنودومیننت 85
2-4-2- انتخاب اپی توپ های قالب 85
2-4-3- جستجو برای توالی های مشابه 86
2-5- بیان پروتئین نوترکیب تروپونین I قلبی 87
2-5-1- سنتز ژن 87
2-5-2- تهیه باکتری مستعد شده برای واکنش شیمیایی 87
2-5-3- ترانسفورماسیون باکتری BL21 (DE3) 88
2-5-4- القای بیان پروتئین 89
2-5-5-آمادهسازی نمونه برای آنالیز بیان با SDS-PAGE 90
2-5-6-تائید بیان با وسترن بلاتینگ 90
2-6- اپتیمم سازی بیان پروتئین 91
2-6-1- بهینهسازی غلظت IPTG 91
2-6-2- بهینهسازی مدت زمان القاء 92
2-6-3- بهینهسازی دمای القاء 92
2-7- تعیین حلالیت پروتئین 93
2-8- آماده سازی لیزات سلولی تحت شرایط طبیعی 94
2-9- آمادهسازی ستون نیکل برای شرایط طبیعی 95
2-9-1- تخلیص پروتئین در شرایط طبیعی 96
2-10- ایمونیزاسیون 97
1-10-1- اثرات ادجوانتها : 97
2-11- تهیه آنتی بادیهای پلی کولونال خرگوشی 98
2-11-1- تهیه آنتی بادی پلی کلونال با استفاده از تروپونینI قلبی تخلیص شده از بافت قلب 98
2-11-1-1- ایمونیزاسیون خرگوش 98
2-11-2-تهیه آنتی بادی پلی کلونال با استفاده از تروپونین I قلبی نوترکیب 99

2-11-2-1- ایمونیزاسیون خرگوش 99
2-11-3- تهیه آنتی بادی پلی کلونال با استفاده ازپپتیدهای انتخاب شده 100
2-11-3-1- ایمونیزاسیون خرگوش 100
2-12- تولید آنتی بادی مونوکلونال بر علیه تروپونین I قلبی نوترکیب 101
2-12-1- طرز تهیه ایمونوژن 101
2-12-2- تزریق ایمونوژن 101
2-13- تهیه بافرها در الایزا 102
2-13-1- بافر پوشش دهی 102
2-13-2- محلول بلاکه کننده 103
2-13-3- بافر سنجش 103
2-13-4- سوبسترای TMB 103
2-13-5- معرف متوقف کننده 104
2-14- تیتراسیون سرم موش در آزمون الایزای غیر مستقیم 104
2-15- تولید سلولهای هیبریدوما 105
2-15-1- کشت سلول 106
2-15-1-1-تهیه محیط کشت RPMI-1640 106
2-15-1-2- تهیه محیط کشت نهایی 106
2-15-2- تهیه آنتی بیوتیک 107
2-15-3-1- کشت سلول های منجمد شده میلومای موشی SP2/0 107
2-15-4- تهیه سوپ کشت سلول های ماکروفاژ 108
2-15-4-1- جداسازی سلول های طحال از موش های ایمونیزه شده 109
2-15-5- تعیین درصد زنده ماندن سلول های Sp2/0 110
2-15-6- پروتکل فیوژن 111
2-15-7- غربالگری سلول های هیبریدوما 112
2-15-8- کلون کردن با روش رقت سازی کاهشی 113
2-15-8-1- روش اول: 113
2-15-8-2- روش دوم: 116
2-15-9- تولید آسیت برای تهیه مقادیر انبوه آنتی بادی های منوکلونال موشی 117

2-16- تخلیص و تعیین خصوصیات آنتی بادی های منوکلونال موشی.....118
2-16-1- تعیین کلاس (ایزوتیپ) منوکلونال آنتی بادی با استفاده از کیت ISOSTRIP.....118
2-16-2- تخلیص آنتی‌بادی.....119
2-16-2-1- تخلیص آنتی بادی پلی کلونال خرگوشی با استفاده از ستون DEAE.....119
2-16-2-2-تخلیص آنتی بادی های منوکلونال ضد تروپونینI قلبی با ستون افینیتی G.....120
2-17- روش برادفورد.....121
2-17-1- تهیه معرف برادفورد.....122
2-17-2- تهیه استانداردهای پروتئینی.....122
2-17-3- روش کار.....123
2-18- الکتروفورز روی ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE).....124
2-18-1- روش کار :.....126
2-18-2- ر نگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید با کوماسی بلوR-250.....128
2-19- وسترن بلاتینگ.....129
2-20-1- روش کار :.....132
2-20- تعیین افینیتی (AFFINITY) آنتی بادی.....134
2-21- تعیین میزان تداخلات ماتریکس سرمی با آنتی بادی مونوکلونال.....137
2-22-تهیه کلوئید طلا.....138
2-22-1- تعیین غلظت اپتیمم طلا- آنتی بادی.....139
2-22-2- نشان دار کردن آنتی بادی با کلوئید طلا.....139
2-23- مونتاژ استریپ ایمونوکروماتوگرافی.....140
2-24- جمع آوری نمونه.....141
2-25- ارزیابی حد تشخیص.....141
2-26- کنترل کیفی.....142
2-26-1- اختصاصیت:.....142
2-26-2- صحت.....142

2-26-3- حساسیت 143
2-26-4- دقت 143
2-26-4-1- روش انجام آزمایش دقت 143
2-27- بررسی واکنش آنتی بادی های مونوکلونال با اپی توپ های انتخاب شده..... 144
فصل سوم 146
نتـایـج و یافــته ها 146
3-1- تخلیص پروتئین تروپونین I قلبی از بافت قلب موشی و انسان:..... 147
3-1-1-اندازه گیری OD فرکشنهای جمع آوری شده از کروماتوگرافی 147
3-1-2- بررسی میزان خلوص تائید پروتئین با استفاده از SDS PAGE : 148
3-2- ایمونیزاسیون خرگوش با استفاده از پروتئین تروپونین I تخلیص شده از بافت قلب موش 150
3-2-1- تعیین تیتر آنتی بادی درسرم خرگوش ایمن شده 150
3-3-انتخاب اپی توپهای ایمونودومینانت:..... 151
3-4- ایمونیزاسیون خرگوش با استفاده از پپتیدهای کونژوکه شده با سرم آلبومین گاوی 160
3-4-1- تعیین تیتر آنتی بادی درسرم خرگوش ایمن شده 160
3-5-کلونینگ پروتئین تروپونین I قلبی:..... 161
3-5-1- نتیجه واکنش هضم آنزیمی به منظور تایید کلونینگ 161
3-6- بیان پروتئین 162
3-6-1- تائید بیان پروتئین با وسترن بلاتینگ 163
3-7- انتخاب کلنی با ظرفیت بیان بالا 164
3-8- اپتیمم سازی بیان پروتئین 165
3-8-1- بهینهسازی غلظت IPTG..... 165
3-8-2- انتخاب مدت زمان انکوباسیون..... 166
3-9- بررسی تاثیر بیان پروتئین بر رشد باکتری 167
3-10-تعیین حلالیت 167

3-11- تخلیص پروتئین 168
3-12- تعیین تیتر آنتی بادی درسرم خرگوش ایمن شده با تروپونین I نوترکیب 169
3-13- الایزای رقابتی غیر مستقیم برای تعیین میزان مهارتروپونین توسط اپی توپ های انتخاب شده 170
3-14- تعیین تیتر آنتی بادی درسرم موش ایمن شده با استفاده از پروتئین نوترکیب تروپونین I قلبی 172
3-15- فیوژن سلولهای طحالی موش ایمونیزه شده و سلولهای میلومای موشی 173
3-15-1- تهیه لایه مغذی 174
3-15-2- غربالگری سلول های هیبریدوم تولید کننده آنتی بادی ضد تروپونین I قلبی 175
3-15-3- انتخاب کلون های نهایی مولد آنتی بادی منوکلونال ضد تروپونین I قلبی 175
3-16- تعیین ایزوتایپ آنتی بادی های منوکلونال ضد تروپونین I قلبی 181
3-17- نتایج رقیق سازی اولیه (LIMITING DILUTION) 181
3-18- نتایج رقیق سازی حد ثانویه (LIMITING DILUTION) کلون 21 182
3-19- انتخاب کلون های مترشحه مونوکلونال آنتی بادی 183
3-19-1- نامگذاری کلونهای تولید کننده مونوکلونال آنتی بادی 183
3-20-تولید آسیت در موش با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال 5 کلون نهایی 184
3-15- تخلیص جذبی آنتی بادی های منوکلونال IGG ضد تروپونین I قلبی با استفاده از پروتئین G 184
3-15-1-نتایج مربوط به تهیه آنتی بادی خالص پس از عبور از ستون افینیتی کروماتوگرافی پروتئین ها 185
3-21- واکنش دهی آنتی بادی های تخلیص شده ضد تروپونین I قلبی در الایزای غیر مستقیم 186
3-22- رسم منحنی استاندارد برادفورد 188
3-23- تائید آنتی بادی های مونوکلونال تخلیص شده باوسترن بلاتینگ 189
3-24- تعیین افینیتیآنتی بادی 190
3-25- تعیین ویژگی آنتی بادی با بررسی واکنش متقاطع 192
3-26- خصوصیات کلویید طلای ساخته شده 193
3-26-1- تعیین غلظت اپتیمم آنتی بادی 193
3-27- ساخت استریپ تشخیصی تست ایمنوکروماتوگرافی 194

3-27-1-آماده سازی اجزای تست ایمنوکروماتوگرافی 195
3-22-1-1-پد نمونه 195
3-27-1-2-پد جاذب 195
3-27-1-3- غشاء نیتروسلولز 196
3-28- تعیین حد تشخیص بالاتر از 0/5 نانوگرم بر میلی لیتر 196
3-29- کنترل کیفی نتایج 197
3-29-1- تعیین حساسیت 197
3-29-2- تعیین اختصاصیت 198
3-29-3- تعیین صحت: 198
3-29-4- تعیین دقت 198
3-30- بررسی واکنش متقاطع 199
3-31- بررسی واکنش آنتی بادی های مونوکلونال با اپی توپ های انتخاب شده با استفاده از الایزای غیر مستقیم ... 200
فصل چهارم 181
بحث و نتیجه گیری 181
4-1- تخلیص پروتئین نوترکیب از بافت قلب موش وانسان 201
4-2- انتخاب پپتید های ایمونودومیننت 202
4-3- بیان پروتئین نوترکیب تروپونین I قلبی 205
4-4- الایزای رقابتی 205
4-5- هیبریدوما و تولید آنتی بادی مونوکلونال 206
4-6- تروپونین ، ارزش تشخیصی و روشهای تشخیصی آن 207
پیشنهادات: 212
منابع 214
ABSTRACT 221

فهرست اشکال

شکل 1-1: واکنشآنزیمیمربوطبهلاکتاتدهیدروژناز 9

شکل 1-2: واکنشآنزیمیمربوطبهکراتینکیناز 10

شکل 1-3- تصویرشماتیکازکینتیکمارکرهایقلبیبدنبالسکتهقلبی. 12

شکل 1-4: نقشMIFدرهنگامآسیبهمیوکاردیال 15

شکل 1-5: ساختارتروپونینقلبیدرمیوسیتهادرحالتنرمالوبعدنکروزبافتی 19

شکل 1-6 -آمادهسازیومراحلسهگانهتخلیصپروتئین 23

شکل 1-7 :کروماتوگرافیتعویضیون 25

شکل 1-8 : افینیتیکروماتوگرافی 25

شکل 1-9 : ژلفیلتراسیون 26

شکل 1-10- ساختارشماتیکآنتیبادی؛زنجیرهایسبکوسنگین،محلاتصالانتیژن 36

شکل 1-11: شکلشماتیکتولیدآنتیبادیمونوکلونالباتکنیکهیبریدوما 41

شکل 1-12- مکانیسماتصالپروتئینبهذراتکلوییدیطلا 65

شکل 1-13- اساستستهایایمنوکروماتوگرافی(LFIA) 66

شکل 2-1- نحوهتهیهسرنگامولسیوفرواستفادهازآنجهتتهیهامولسیونادجوانتباایمونوژن 101

شکل 2-2- تککلونسازیباروشرقتسازیمحدود 115

شکل 3-1: نمودارجذبمربوطبهپروتئینهایجداشدهموشیبااستفادهازکروماتوگرافی 147

شکل 3-2: الکتروفورزپروتئینهایتخلیصشدهازبافتقلبموشوانسان 148

شکل 3-3- بررسیمیزانپایداریتروپونینتخلیصشدهازبافتقلبموش،انسانوتروپونینIنوترکیب 150

شکل 3-4- ساختاردومتروپونینIقلبیبرگرفتهازسایتUNIPROT. 153

شکل 3-5- تعدادااسیدآمینه،وزنملکولیوساختارسهبعدیتروپوینتقلبیIپسازبیاندرECOLI 153

شکل 3-6- ساختار PFAMازتروپونین Iقلبی. مناطقهلیکسبارنگقرمزنشانداده‌شده‌هاست. 154
شکل 3-7- ساختارسه‌بعدیتروپونین Iقلبی.هلیکسهابصورترنگآبیهستند 154
شکل 3-8- نمودارآنالیزتروپونین Iقلبیبااستفادهازنرمافزار EMINI. 155
شکل 3-9- نمودارآنالیزتروپونین Iقلبیبااستفادهازنرمافزار KARPLUS 156
شکل 3-10- نمودارآنالیزتروپونین Iقلبیبااستفادهازنرمافزار CHOU & FASMAN 157
شکل 3-11- نمودارآنالیزتروپونین Iقلبیبااستفادهازنرمافزار KOLASKAR 157
شکل 3-12- نمودارآنالیزتروپونین Iقلبیبااستفادهازنرمافزار PARKER 158
شکل 3-13- تائیدترانسفورماسیونباهضمدوگانه. 161
شکل 3-14- بررسیبیانپروتئینباSDS-PAGEرویژل 12٪. 162
شکل 3-15- تائیدبیانپروتئینباواکنشوسترنبلاتینگ. 163
شکل 3-16- انتخابکلنیباظرفیتبیانیبالا 164
شکل 3-17- بهینهسازیغلظت IPTGبرایبیانتروپونین Iنوترکیب. 165
شکل 3-18: بهینهسازیمدتزمانالقاءبرایبیانپروتئین 166
شکل 3-19: تخلیصپروتئینباستفادهازستونیکل 168
شکل 3-20- تیتراسیونخرگوشهایایمنشدهباستفادهازآنتیژننوترکیبتروپونین Iقلبی 170
(طوسی :قبلازتزریق؛قرمز/آبی:موشهایایمنشده). 170
شکل 3-21- نمودارمهاریالایزایرقابتیبرایاپیتوپهایپپتیدیانتخابشدهبرایتروپونین Iقلبی 171
شکل 3-22- تیتراسیونموشهایایمنشدهباستفادهازانتیژننوترکیبتروپونین Iقلبی 173
شکل 3-23- سلولهایمغذیتهیهشدهبرایفیوژن 174
شکل 3-24: هیبریدوماهایدرحالرشددرروزهایمختلفپسازفیوژن 176
شکل 3-25: تعییناایزوتیپآنتیبادیهایمنوکلونالموشیباروش ISOSTRIP 181
شکل 3-26: موشآسیتیشدهدرمقایسهباموشنرمال 184

شکل 3-27- جذبنوریفراکشنهایحاصلازستونکروماتوگرافیمیلترکیبیمربوطبه 5 کلونهایی 186

شکل 3-28- تیتراسیونآنتیبادیهایمونوکلونالتولیدشدهدرآسیتموش 187

شکل 3-29- منحنیاستانداردحاصلازغلظتهایمختلفپروتئینBSAبامعرفبرادفورد. 188

شکل 3-30- وسترنبلاتینگآنتیبادیتخلیصشدهکلونA (P1D2E3) وکلونB (P2E4D3) 189

شکل 3-31- درصداتصالآنتیژن-آنتیبادیدرغلظتهایمختلف. 192

شکل 3-32 :تشکیلنانوذراتطلابامحلولسیتراتسدیم 194

شکل 3-33- تصویرتستاستریپتهیهشدهباCUTOFF VALUE1 نانوگرمدرمیلیلیتر 196

فهرست جداول:

جدول 1-1- خلاصه بیومارکرهای قلبی در آنفارکتوس میوکارد یال 7

جدول 1-2- بیومارکرهای قلبی و تغییرات دینامیکی در طول انفارکتوس میوکارد یال 8

جدول 1-3- مقایسه آنتی بادی مونوکلونال و پلی کلونال 44

جدول 1-4- پلیمرهای مختلف و انواع اتصالات آنها 69

جدول 2-1- ایمونیزاسیون خرگوشها با استفاده از تروپونین I تخلیص شده از بافت قلبی موش 98

جدول 2-2- غلظت پروتئین توتال کیب، نوعاد جوان در تزریقهای اول، بوسترونهائی در خرگوشها 99

جدول 2-3- غلظت پپتیدها، نوعاد جوان در تزریقهای اول، بوسترونهائی در خرگوشها 100

جدول 2-4- جدول غلظت تروپونین I نوترکیب 102

جدول 2-5- روشتهیه استاندارد های پروتئین با غلظتهای مختلف 123

جدول 3-1: تخلیص پروتئین تروپونین I قلبی از قلب موش (RAT) 149

جدول 3-2: تخلیص پروتئین تروپونین I قلبی از قلب انسان 149

جدول 3-3- تیتراسیون سرم خرگوشهای ایمنشده با تروپونین I قلبی موش 151

جدول شماره 3-4- ساختار دومتروپونین I قلبی 151

جدول 3-5- ترادف آمینو اسید پروتئین تروپونین I قلبی (P19429-1) در فرمت BLAST 153

جدول شماره 3-6- پپتیدهای غالب ایمنی پیشگویی شده توسط نرم افزار EMINI 156

جدول شماره 3-7- پپتیدهای غالب ایمنی پیشگویی شده توسط نرم افزار KOLASKAR 158

جدول شماره 3-8: ترادف امینو اسید یا پپتوپهای شناخته شده توسط آنتی بادیها در کیتهای تجاری 159

جدول شماره 3-9- ترادف امینو اسید پپتیدهای انتخاب شده بعنوان پپتید غالب ایمنی 160

جدول 3-10 : تیتراسیون سرم خرگوشهای ایمنشده با استفاده از پپتیدهای انتخاب شده 160

جدول 3-11- تیتراسیون سرم خرگوشهای ایمنشده با آنتی ژن نوترکیب تروپونین I 169

جدول 3-12- بررسی میزان مهار اپیتوپهای پپتیدی انتخاب شده با پروتئین تروپونین نوترکیب 171

جدول 3-13- تیتراسیونسرمموشایمنشدهباآنتی ژننوترکیبتروپونینIقلبیب 172

جدول 3-14: نتایجالایزایغیرمستقیمبعدازفیوژندرچاهکهایباکلونمثبت 149

جدول3-15: نتایجرقیقسازیحداولیهکلونشماره 21..... 182

جدول3-16- نتایجرقیقسازیحدثانویه (کلون 21)..... 182

جدول 3-17- نامگذاریکلونهاینهایی 183

جدول 3-18 : نتایجتخلیصآنتیبادیازاسیتموشهایآسیتیشده 185

جدول 3-19- غلظتهایمختلفاستانداردBSAجذبهایمختلفیدارند..... 188

جدول 3-20- غلظتهایمختلفآنتیبادی 190

جدول 3-21- جذبمربوطبهغلظتهایمختلفتروپونینIقلبینوترکیب 190

جدول 3-22- درصدهایاتصالمربوطبهغلظتهایمختلفآنتیژنوآنتیبادی 191

جدول 3-23- تعیینمیزاناختصاصیتآنتیبادیهایتخلیصشده..... 192

جدول 3- 24- بررسیحساسیتواختصاصیت 2 ×2 :..... 197

جدول3-25- نتایجدرونسنجشوبینسنجش..... 199

جدول 3-26- الایزایرقابتیبرایبررسیاپیتوپهایغالبایمنی..... 200

فصل اول

مقـــدمه و مروری بر مطالعات گذشته

1-1- انفارکتوس میوکارد حاد

سندرم کرونری حاد(ACS[1]) شامل گروهی از بیماریهای قلبی عروقی است که بر اساس تحقیقات به سه گروه بیماران انفارکتوس میوکارد(MI[2]) ، بیماران دارای آنژین صدری ناپایدار[3] و غیره تقسیم می‌شوند(1، 2).

نتیجه مطالعات نشان می‌دهد که 2٪ از مریضان اورژانسی با MI حاد به اشتباه به منزل ارجاع داده می‌شوند(3).به همین خاطراستفاده از نوع مارکرقلبی در تشخیص سریع و قطعی بیماری و اعمال نظر درمورد اینکه مراجعه کننده باید بستری گردد یا خیربسیار مهم است(4، 5).

مطابق آمارها و بررسی‌های معتبر منتشر شده توسط مراجع قانونی کشور از جمله وزارت بهداشت و پزشکی قانونی انفارکتوس میوکارد حاد یا سکته قلبی بعنوان دومین عامل مرگ و میر در کشور مطرح می‌باشد.(6) در تمام دنیا انفارکتوس میوکارد بعنوان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر مطرح است. از طرفی تشخیص زودهنگام این بیماری تاثیر بسیاری در امید به حیات در بیماران خواهد داشت.

1-2- معیار های تشخیص انفارکتوس میوکارد حاد

براساس شاخص ها و معیار سازمان بهداشت جهانی (WHO) برمبنای دو یافته از سه یافته مثبت پایدار است(7، 8).این شاخص ها شامل:

- تاریخچه ی بالینی از علائم طولانی مدت درد قفسه سینه[4]
- تغییرات مشخص در الکتروکاردیوگرام (ECG)
- افزایش در غلظت های مارکرهای قلبی پلاسما

[1]Acute Coronary Syndrome
[2]Myocardial Infarction
[3]Unstable angina
[4]Chest Pain

دو شاخص اولیه بالا شامل علائم بالینی و ECG به آسانی به محض پذیرش بیمار در بیمارستان می‌توانند مشخص شوند اما فاقد حساسیت و ویژگی لازم برای تشخیص AMI هستند.

سندرم کرونری حاد زنجیره به هم پیوسته ای از علائم را نشان می‌دهد.این علائم به هم پیوسته شامل آنژین(آسیب های برگشت پذیر بافتی)، آنژین ناپایدار،عمدتا مرتبط با آسیب های کوچک میوکاردیال،انفارکتوس میوکارد حاد و توسعه بافت نکروزی همراه است(9).

شروع ناگهانی AMI با حمله شدید و پایدار درد قفسه سینه مشابه آنژین مشخص می‌شود.تشخیص دقیق بر مبنای علائم بالینی بیمار به محض ورود به بخش اورژانس برای AMI بسیار مهم است.هرچند که علائم در بیشتر از یک سوم بیماران می‌تواند غیر اختصاصی نیز باشد به ویژه در دیابتی ها و سالمندان که معمولا با علائم آتیپیک ایسکمیک مراجعه می‌کنند(9).

شاخص دوم ،تغییر در ECG ،هنوز نیز بعنوان یک شاخص مهم در شناسایی AMIمی‌باشد که بایستی به سرعت و به محض پذیرش افراد مشکوک به AMI انجام شود زیرا افزایش بیش از 1mV در بخش ST نوار قلبی و یا بلوک شاخه چپ ، فرد را کاندید فوری پرفیوژن تراپی[1]می‌نماید(10).

با این وجود،ECG به هیچ عنوان کامل نیست زیرا حساسیت تشخیص آن ممکن است زیر50 درصد باشد.همچنین الگوی ECG بیشتر از 24 ساعت بعد از انفارکتوس باقی نمی‌ماند.تغییرات از ECG نرمال تایک الگوی بدون عوارض انفارکتوس تاحدودی از یک مکان و یک درجه منطقه آسیب دیده می‌تواند متفاوت باشد(9، 11، 12).

شاخص سوم، شامل مونیتورینگ تغییرات موقتی در مارکرهای قلبی نکروز بافتی است.بااینکه دوشاخص اول برای تشخیص فاقد حساسیت و اختصاصیت لازم هستند اما این شاخص برای تشخیص AMI بسیار مهم و قطعی هستند.

[1] Perfusion Therapy

1-3- نیاز به مارکرهای قلبی با حساسیت و اختصاصیت بالا

حدود 40 درصد از بیمارانی که در اورژانس بیمارستان ها پذیرش می‌شوند و مشکوک به AMI هستند علائم واضح و مشخص و نیز تغییرات ECG واضح دارند که میبایستی درمان بدون هیچگونه وقفه ای آغاز گردد.اندازه‌گیری مارکرهای قلبی می‌تواند برای تائید AMI و بررسی سایز و میزان توسعه انفارکتوس مورد استفاده قرار بگیرد.اگرچه در حدود 60 درصد موارد نیز AMI نمی‌تواند به آسانی تشخیص داده شود.شیوع AMI در این گروه تنها حدود 10 درصد است و اکثرا از آنژین و یا آنژین ناپایدار رنج میبرند(13).

1-4- آنژین ناپایدار

آنژین ناپایدار نیزتوسط WHO به عنوان یک دوره گذرا از درد قفسه سینه که به واسطه ورزش و یا وضعیت های دیگر بوجود میاید تعریف می‌شود که سبب افزایش نیاز به اکسیژن توسط بافت میوکاردی تعریف می‌گردد(14).غالبا درد به واسطه ی استراحت ویا مصرف داروهایی که میزان تقاضای اکسیژن را توسط بافت قلبی کاهش می‌دهند درمان می‌شود.همچنین آنژین پایدار به واسطه رسوب آترواسکلروتیک پلاکهای چربی بر روی عروق کرونری که سبب کاهش جریان خون تامین کننده قلب می‌شوند نیز ایجاد می‌گردد.این در واقع نقطه ورودی برای بیماران با سندرم کرونری حاد که به عنوان آنژین ناپایدار و AMI تعریف می‌شود می‌باشد(15).

آنزین ناپایدار اصولا به عنوان یک درد قفسه سینه در حال استراحت تعریف می‌شود و در واقع فرمی از آنژین است که درد افزایش یابنده ای به طور فراوان وجود دارد(15).

معمولا آنژین ناپایدار در نتیجه توسعه پلاکهای اترواسکلروتیک و یا انسداد های مشابه آن و عموما مواد نامحلولی که در جریان خون واسکولاتور شریانی وجود دارند ایجاد می‌شود.در مقایسه با آنژین ناپایدار AMI، خطر تهدید زندگی بیشتری دارد که بخاطرآسیب بافتی قلب و نیز نکروز عضلات قلبی

است(12، 16، 17). بنابراین تشخیص افتراقی آنژین ناپایدار از AMI در بیماران بسیار مهم است زیرا جهت درمان بسیار کمک کننده و نیز حیاتی است زیرا در مورد AMI بلافاصله بایستی درمان های لازم و حیات بخشی صورت بگیرد در صورتی که در مورد آنژین ناپایدار بایستی مریض ترخیص گردد(15، 18).

1-5- ترومبولیتیک تراپی[1]

ترومبولیتیک تراپی به طور وسیعی برای AMI استفاده می‌شود اما بایستی در ابتدا انفارکتوس در بیمار تائید شود و نیز بایستی در 6 ساعت اولیه بعد از شروع علائم آغاز گردد تا میزان آسیب به بافت قلبی به حداقل ممکن برسد. ترومبولیتیک ها،ازجمله پلاسمینوژن اکتیویتور بافتی[2](tPA) گران هستند و نیز می‌توانند سبب آسیب های جدی از جمله به مغز در 1 درصد از موارد اگر به طور اشتباه به یک بیمار بدون AMI مثلا بیماری که آنژین دارد داده شود گردد.این در واقع همان علتی است که بایستی بیماران AMI به طور دقیق از سایر بیمارانی که درد قفسه سینه دارند تشخیص افتراقی داده شوند(10، 19).

1-6- تشخیص افتراقی

اگرچه در مواقعی که درد قفسه سینه در مواقع استراحت با ECG غیر نرمال وجود دارد پزشک نمی‌تواند بین آنژین ناپایدار و AMI غیر موج Q (non Q wave AMI) و یا یک انفارکتوس میوکاردی که در حال پیشرفت هست و هنوز علائم ECG و مارکرهای قلبی را درسترس ندارد تشخیص افتراقی بدهد(20).

اکثر بیمارانی که با درد قفسه سینه به بخش اورژانس فرستاده می‌شوند در واقع کسانی که قابلیت شناسایی توسط علائم بالینی و تاریخچه بالینی و ECG هستند در واقع غیر AMI هستند و می‌توانند در صورتی که به درستی تشخیص داده شوند ترخیص گردند(21).

[1]Thrombolytic Therapy
[2]Tissue Plasminogen Activator

آنژین ناپایدار و نیز نارسایی احتقانی قلبی[1](CHF) در واقع بخش اصلی بیمارانی را تشکیل می‌دهند که غیر AMI هستند ولی با درد قفسه سینه مراجعه کرده اند(14، 22).

بنابراین در حوزه کاردیولوژی هدف خیلی مهم تشخیص افتراقی بین افرادی است که واقعا AMI هستند و آنهایی که با درد قفسه سینه مراجعه کرده اند ولی AMI نیستند.در حقیقت تشخیص درست این افراد علاوه بر کاهش زمان اتلاف وقت بیمار و پزشک سبب کاهش هزینه های درمانی و عوارض ناشی از آن می‌شود.

در ایالات متحده امریکا در سال حدود 2/7 میلیون پذیرش در سال به دلیل درد قفسه سینه وجود دارد که در نهایت AMI در آنها رد می‌شود و ترخیص می‌شوند(23).آمار مشخص و دقیقی برای ایران در این زمینه وجود ندارد.

دپارتمان های دولتی در سراسر دنیا بسیار علاقمند هستند تا هزینه های درمان AMI را به حداقل ممکن برسانند که اینکار را از طریق کاهش بیماران بستری در بیمارستان بواسطه شناسایی بیماران مبتلا به AMI از طریق تشخیص های افتراقی با سایر بیماریهایی که با درد قفسه سینه همراه هستند انجام دهند.این امر از طریق انجام ECG و نیز استفاده از مارکرهای قلبی با حساسیت و اختصاصیت بالا امکان پذیر خواهد بود.بنابراین یک نیاز مبرم، استفاده از تست هایی با اختصاصیت بالا و حساسیت بالا برای تشخیص افتراقی AMI از Non AMI وجود دارد.

1-7- مارکرهای قلبی[2]

اندازه گیری تغییراتسریالی در مارکرهای قلبی یکی از شاخص های مهم برای تشخیص AMI ،مانیتورینگ، تخمین ریسک و مونیتورینگ رپرفیوژن[3] است(24). از آنجائی که مطالعات گسترده ای برای شناسایی مارکرهای اختصاصی و با حساسیت بالا برای تشخیص AMI وجود دارد این امکان وجود دارد که در آینده مارکرهای دیگری نیز به این مارکرها اضافه شوند.

[1]Cardiac Heart Failure
[2] Cardiac Markers
[3]Reperfusion

مارکرهای قلبی عموما آنزیم ها ویا پروتئین های سیتوپلاسمیک و یا ساختاری قلبی هستند که به دنبال آسیب غیر قابل برگشت قلبی به داخل فضای خارج سلولی آزادمی‌شوند و سپس در جریان خون رها می‌شوند(25، 26).

غلظت های خونی مارکرهای قلبی عمدتا در افراد نرمال در حد بسیار پائین و یا غیر قابل شناسایی می‌باشد.یک مارکر ایده ال ومناسب برای تشخیص AMI مارکری هست که علاوه بر اختصاصیت بالا برای عضله قلبی و تشخیص افتراقی آن از آسیب های عضلانی دیگر ،حساسیت بالایی نیز داشته باشد طوری که در آسیب های بسیار کوچک نیز قابل شناسایی باشد(25، 27، 28).

تروپونین I قلبی در واقع مارکری است که واجد هر دو شاخص ذکر شده(حساسیت، اختصاصیت) برای تشخیص زود هنگام AMIمی‌باشد.این مارکر یکی از بهترین مارکرهای موجود برای تشخیص AMIمی‌باشد.از طرفی شایان ذکر است که ممکن است حقیقتا یک مارکر به تنهایی واجد همه شاخص های مورد نیاز یک مارکر خوب نباشد لذا ترکیب این شاخص ها برای تشخیص AMI ما را به یک تشخیص خوب و افتراقی از سایر بیماریهایی که مرتبط با AMI هستند کمک می‌کند.

1-8- ویژگی مارکرهای قلبی

مارکرهای قلبی شامل دو گروه مارکرها هستند.مارکرهایی که زود افزایش پیدا می‌کنند[1]و مارکرهایی که افزایش دیر هنگام[2] در خون به دنبال AMI دارند(25، 27، 28). همچنین این مارکرها ممکن است دوره متفاوتی از جهت حضور در گردش خون دارا باشند. دوره زمانی مارکرهای اختصاصی قلبی در گردش خون توسط فاکتور های مختلفی تعیین می‌شود. ویژگی ساختاری مارکرهای قلبیاز جهت موقعیت درون سلولی[3] نقش بسیار مهمی در سرعت آزاد سازی این مارکرها در خون بعد از AMI دارند. بنابراین آزاد سازی مارکرهای سیتوپلاسمیک بسیار سریع تر خواهد بود زیرا فقط نیاز به تخریب غشای سلولی دارند در صورتی کهآزاد سازی مارکرهایی که در ساختارهای درونی تر سلولی قرار دارند

[1] Early markers
[2] Late markers
[3]Compartmentation

نیاز به تخریب غشایی و نیز تخریب یا تجزیه ساختارهای انقباضی سلول قلبی دارند و بنابراین با سرعت آهسته تری وارد خون می‌شوند(25، 26).

فاکتور مهم دیگر وزن ملکولی مارکر قلبی است.مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که مارکرهایی که وزن ملکولی یک شاخص مهم در سرعت آزاد سازی در خون است زیرا مارکرهایی که وزن ملکولی کمتری دارند براحتی از کمپارتمان های سلولی آزاد و ازطریق انتشار بواسطه میکرو واسکولار ها نیز می‌توانند وارد جریان خون شوند در صورتی که ملکول های بزرگ و با وزن ملکولی بالا باسرعت کمتری دیفیوژن می‌یابند(8، 25، 27، 29).بنابراین مارکهای کوچکتر معمولا مارکرهای سریع تری هستند و زودتر در خون افزایش می‌یابند در صورتی که مارکرهای سنگین تر دیرتر افزایش پیدامی‌کنند.البته بایستی اشاره کرد که مارکرهای کوچکتر زودترکاتابولیزه شده و نیز از خون از طریق کلیه ها پاک می‌شوند در حالیکه مارکرهای بزرگتر مدت زمان بیشتری در خون می‌مانند.

دوره زمانی مارکرهای قلبی در جدول های زیر بطور خلاصه آورده شده است(30):

جدول1-1- خلاصه بیومارکرهای قلبی در آنفارکتوس میوکاردیال

Marker	Isoenzyme/Isoform	Reference range	First Detectable (post MI)	Peak of Release (post MI)	Sensitivity/ Specificity
Creatine Kinase	CK-MB	<6U/L	4-8h	18-24h	90%/80%
Lactate Dehydroge-nase	LD1/LD2 ratio	<1.0	8-12h	24-72h	90%/90-99%
Myoglobin	N/A	15-120 ug/L	2-4h	10-12h	99%/70%
Troponin	cTnI, cTnT	<0.08 ug/L	2-8h	18-24h	99%/99%

بیومارکرهای قلبی و دینامیک تغییرات آنها در طول انفارکتوس میوکارد در جدول 1-2 خلاصه شده است(31).

جدول 1-2- بیومارکرهای قلبی و تغییرات دینامیکی در طول انفارکتوس میوکاردیال

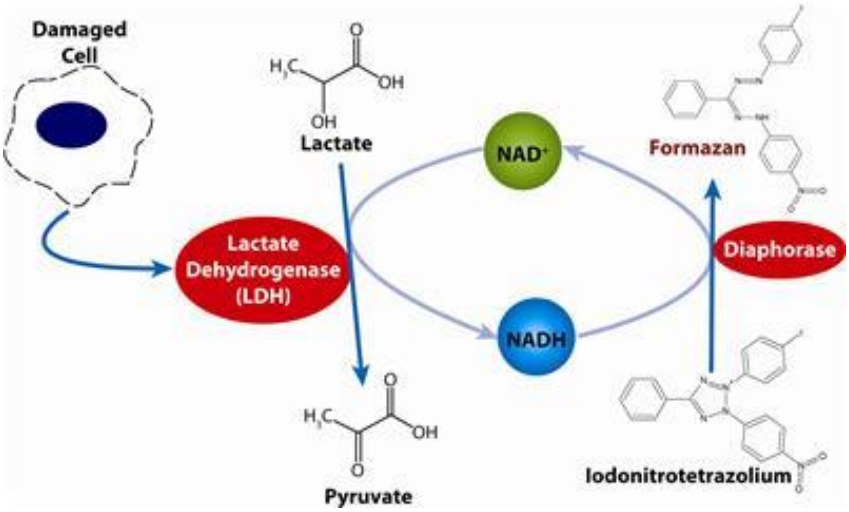
Marker of necrosis	Onset of the plasma levels increase (h)	Max. increase – without reperfusion (h)	Duration of the increase
cTnI	2–6	12–30	1–10 days
cTnT	2–6	12–75	1–15 days
hs-cTn I/T	1	–	–
CK-MB mass	3–8	9–24	1–3 days
CK	3–8	8–58	1–4 days
Myoglobin	1–3	5–8	<12 h
GPBB	0.5	1	<4 h
h-FABP	0.5	1–3	–

cTnI, cardiac troponin I; cTnT, cardiac troponin T; hs-cTnI/T, high sensitive assay for troponin I or T; CK-MB mass, creatine kinase MB isoenzyme mass; CK, total creatine kinase; GPBB, glycogen phosphorylase isoenzyme BB; h-FABP, heart type fatty acid binding protein.

1-9- انواع مارکرهای قلبی

1-9-1- لاکتاتدهیدروژناز(LDH)

لاکتاتدهیدروژناژنیزبعنوانیکیدیگرازمارکرهایقلبیاستکهشاملپنجنوعاستکهدربافتقلبی LDH1زیادواختصاصی استبدنبالآسیبیافتعضلهقلبیمیزان LDH1>LDH2می گرددکهبهاینحالت Flipped LDگفتهمی شود.البتهاینمارکرنیزبدلیلاینکهانواعمختلفآندرسایربافتهایبدنپراکندههستندخیلیاختصاصینیستود رمواردبسیاریخطانشانمی دهدبه علاوهاینکهحدوددوروزپسازسکتهشروعبهبالارفتنمی کند(25، 31).

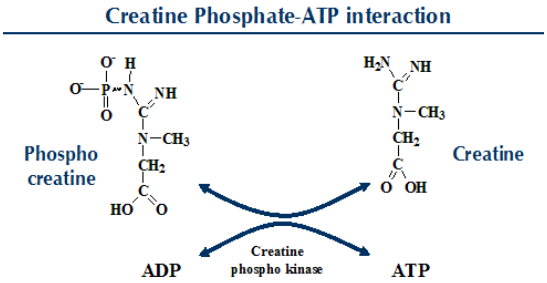


شکل 1-1: واکنش آنزیمی مربوط به لاکتات دهیدروژناز

1-9-2- کراتین کیناز MB (CK-MB)

کراتین کیناز(EC 2.7.3.2 ؛ آدنوزین تری فسفات :کراتینN-فسفوترانسفراز) بصورت دیمر وجود دارد .این آنزیم نقش کلیدی در تنظیم تولید انرژی و مصرف آن در باقت های منقبض شونده دارد.این آنزیم

انتقال برگشت پذیر اتصال رزیدوی فسفات پرانرژی را بین ATP و کراتین کاتالیز می‌کند و به طور عمده به عنوان بافر انرژی موقتی عمل می‌کند و در انتقال انرژی از میتوکندری به سیتوزول نقش دارد(25، 31).



شکل ۱-۲: واکنش آنزیمی مربوط به کراتین کیناز

کراتین کیناز(CK) یک ملکول دیمری است که از دو زیر واحد B ویا زیر واحد M و سه ایزوزیم تشکیل شده است که شامل CK-MB, CK-BB, CK-MMمی‌باشد. از قدیم CK-MB بعنوان یک مارکر طلایی برای تشخیص AMI از حدود سال 1960 استفاده می‌شده است.این مارکر به طور وسیعی از طریق سازمان بهداشت جهانی (WHO) و نیز انجمن قلب امریکا(AHA) به عنوان یک شاخص تشخیصی مناسب و ترجیهی مورد تائید قرار گرفته و مورد استفاده قرار گرفته است.به جای فعالیت آنزیمیCK-MB در این موارد میزان غلظت پروتئینی این آنزیم توسط روشهای موجود مورد سنجش قرار می‌گیرد.این روش میزان تداخلات آنزیمی را که ممکن است توسط آنزیم های مشابهی از جمله CK-BB, CK-MM ، ماکرو CK و آدنیلات کیناز باعث مثبت کاذب شوند به واسطه سنجش ایمونواسی به کمترین مقدار میرساند(9، 32).

ایزوآنزیم CKMB در مقایسه با سایر مارکرها دیرتر به لحاظ زمانی وارد جریان خون می‌گردد و به دلیل حساسیت پائین تری که دارد ارزش کمتری نیز دارد. CKMB به دلیل اندازه بزرگی که دارد نمی‌تواند از طریق گلومرولها تصفیه گردد و بنابراین نمی‌تواند از طریق کلیه ها تصفیه گردد.مخازن دیگری از CKMB نیز وجود دارد که بخصوص در هنگام آسیب اسکلتی و نیز در هنگام عادت قائدگی آزادمی‌شود و میزان آن در خون افزایش می‌یابد.در این افراد و بویژه در آسیب اسکلتی نسبت CKMB/total افزایش می‌یابد هرچند که این افزایش حساسیت بالایی ندارد(27، 33).

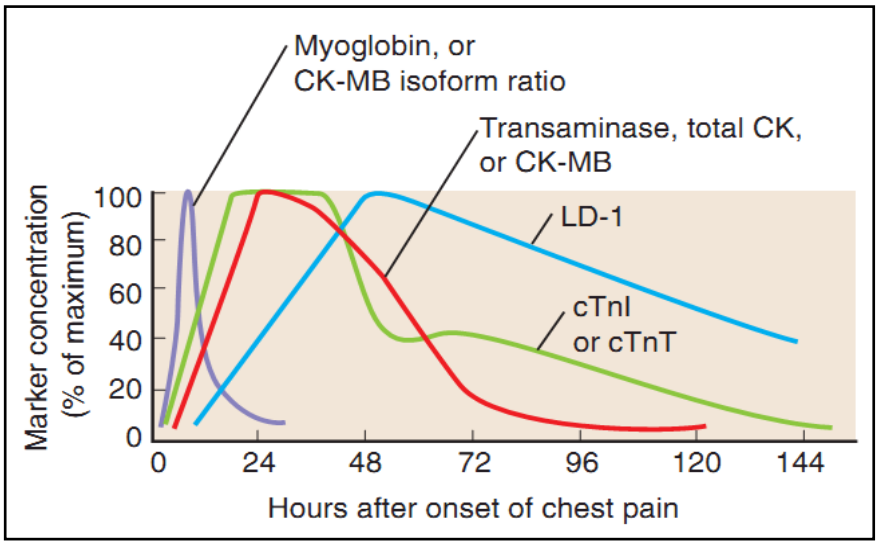
CKMB در واقع یک مارکر ایده ال برای تشخیص AMI نیست.این مارکر همچنین در مواردی که همولیز گلبولهای خونی وجود داشته باشد نیز بطور کاذب بالا خواهد بود.همچنین برخی دارو ها مثل کوکائین و الکل نیز سبب افزایش کاذب میزان کراتین کیناز می‌گردد(34).

1-9-3- تروپونین ها(Troponins)

تروپونین ها پروتئین های انقباضی بافت عضلانی هستند.پروتئین های انقباضی و تنظیمی مهمترین پروتئین های میوکاردی قلبی هستند.تروپونین در ساختار قلبی ازسه نوع تروپونین C، T، I تشکیل گردیده است.تروپونین در ساختار قلبی با ساختار موجود در بافتهای دیگر فرق دارد.این تفاوت بخصوص در مورد تروپونین I و تروپونین T بارزتر است.

هر دومارکر تروپونین I و T به عنوان مارکرهای تشخصی در تشخیص آسیب های میوکاردیال و سندرم کرونری قلب کاربرد دارند.اخیرا این مارکرها بعنوان مارکرهای طلایی تشخیصی در این بیماریها معرفی شده اند. تروپونین قلبی در یک بازه زمانی مشخص حدودا 6-4 ساعت پس از نکروز بافتی قلب آزادمی‌شود که قابل شناسایی است و سپس در حدود 16-14 ساعت به پیک خود می‌رسد و نیز بمدت 7 روز قابل شناسایی است(35-38). تروپونین بعنوان یک مارکر تشخیصی در بیماران قلبی توسط انجمن کاردیولوژی اروپا(European Society of Cardiology)و همچنین AHA/ACC[1] معرفی شده است که نسبت به سایر مارکرهای قلبی ارجحیت دارد. مطالعات جدیدتر بطور مستقیم TnI و TnT را بایکدیگر مقایسه می‌کنند.از نظر حساسیت هر دوی اینها برای تشخیص MI و آسیبهای جزئی میوکارد یکسان هستند اما TnI بسیار اختصاصی تر است. در یک مطالعه آماری حساسیت TnT به میزان 47٪ و NPV به میزان 95٪ مشخص گردید و همچنین حساسیت TnI به میزان 57٪ و NPV به مقدار 98٪ مشخص شده است. اما منفی بودن تروپونین لزوما به معنی رد آسیب قلبی(تکرار 6 ساعت بعد لازم است) نیست(39).

[1]American Heart Association/American Collage Of Cardiology



شکل ۱-۳- تصویر شماتیک از کینتیک مارکرهای قلبی بدنبال سکته قلبی.

کراتین کیناز(CK)،کراتین کیناز(CKM B)،تروپونین(cTnI)،تروپونین(cTnT)،لاکتات دهیدروژناز(LDH).

1-9-4- پروتئین متصل شونده به اسید چرب قلبی(H-FABP)

پروتئین های متصل شونده به اسید چرب(FABP) در بسیاری از بافت ها ازجمله بافت‌هایی که محتویات اسید چرب بالایی دارند ازجمله کبد،بافت چربی،ماهیچه ها و قلب یافت می‌شوند.FABP سیتوپلاسمیک به خانواده پروتئین های اینتراسلولاری که در انتقال ترکیبات لیپوفیلیک نقش دارند یافت می‌شود و این خانواده شامل پروتئین هایی با وزن ملکولی بین 9-17 کیلو دالتون با ظرفیت اتصال به صورت غیرکوالان به ترکیبات لیپوفیلیک است(40).مطالعات نشان داده است که FABP به طور نرمال در جریان خون وجود ندارد ولی به دنبال AMI ناشی از آسیب و نکروز بافت قلبی وارد فضای بین سلولی وسپس خون شده و قابل شناسایی می‌شود.بنابراین FABP بعنوان یک مارکر قلبی با حساسیت و اختصاصیت بالا برای تشخیص AMIمی‌باشد.به دلیل سایز کوچک ملکولی FABP بلافاصله به دنبال AMI ، در خون افزایش می‌یابد و بنابراین بعنوان مارکر زودرس در تشخیص AMIمی‌باشدولی

به همین دلیل نیز بلافاصله از جریان خون توسط کلیه ها برداشته می‌شود.برداشت سریع FABP توسط کلیه ها می‌تواند در تخمین انفارکتوس مجدد(reinfarction) کاربرد داشته باشد(41).

این پروتئین بلافاصله بعد از جراحات قلبی و اسیب میوکاردیال آزادمی‌شود وبه نظر میرسد نسبت به میوگلوبین ارجحیت داشته باشد.بزرگترین ایراد این پروتئین این است که برای قلب اختصاصی نیست و در سایر عضلات اسکلتی نیز یافت می‌شود.هرچند این میزان بسیار کمتر است.به علاوه این فاکتورر در تمایزریسک حتی در افرادی که تروپونین و BNP در آنها منفی است نیز نقش دارد(42).

1-9-5- کوپپتین(copeptin)

کوپپتین قطعه C- ترمینال هورمون پیش ساز وازوپرسین است که در پاسخ به کاهش فشار خون آزاد میگردد.مشخص گردیده است که اندازه گیری این مارکر ارزش پیشگویی منفی[1] بسیار بالایی همراه با تروپونین در تشخیص انفارکتوس میوکاردیال دارد.به علاوه مقدار کوپپتین بلافاصله وقتی که علائم بلافاصله بعد AMI شروع میگردد قابل شناسایی است این درحالیاست که هنوز تروپونین افزایش نیافته است(43-46).

1-9-6- پپتید ناتریورتیک-B(B-type natriuretic peptide)

پپتید ناتریورتیک-B (BNP)در واقع یک نوروهورمون است که از سلولهای قلبی و به دنبال استرس دیواره عمودی و نیز کشیدگی میوسیت ها آزادمی‌شود(44).هر دو فرم فعال BNP ونیزغیر فعال NT-proBNP-می‌توانند بعنوان مارکرهای استرسی همودینامیک اندازه گیری شوند.درحالیکه مطالعات نشان داده اند که سطح خونی NT-proBNP و BNP پیشگویی کننده میزان مرگ و نارسایی قلبی

[1]Negative Predictive Value

هستند،ولی برای تشخیص AMI و یا عود آن مناسب نیستند.تحقیقات جهت توسعه کاربردی این تست برای سندرم کرونری حاد ادامه دارد(29، 30).

1-9-7- پروتئین واکنشگر-C (hsCRP[1])

C-reactive protein یک مارکر التهابی است و ممکن است بخشی از مکانیسم تولید پلاکهای اترواسکلروزیس نیز باشد.افزایش این مارکر بعنوان مارکر پیشگویی کننده بعد از نارسایی قلبی و انفارکتوس میوکردیال است.hsCRP برای التهاب قلبی اختصاصی نیست.اگرچه اندازه گیری فرمهای اختصاصی قلبی آن در حال توسعه هستند و ممکن است برای قلب اختصاصی تر باشند(30، 47).

1-9-8- فاکتور رشد جفتی (placental growth factor ,PlGF)

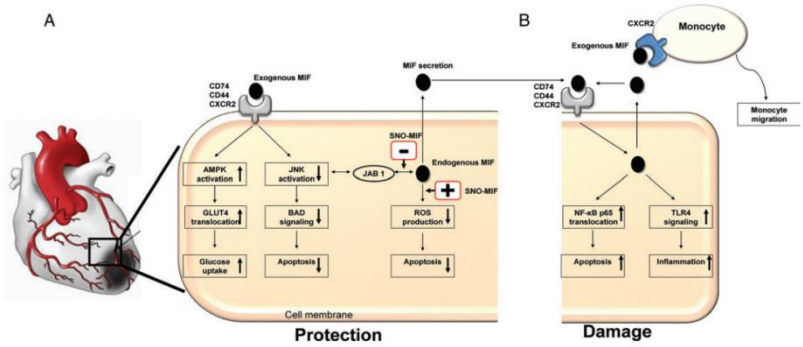
PlGF در واقع یک اندیکاتور و شاخص مفید برای ناپایداری پلاک است.ممکن است اندازه گیری شود و به طور بالقوه میتواند درمان دارویی برای جلوگیری از AMI باشد (30، 48).

1-9-9- فاکتورمهار مهاجرت ماکروفاژی(macrophage migration inhibitory factor)

فاکتور مهار مهاجرت ماکروفاژی دارای نقش دوگانه در AMIمی‌باشد همانگونه که در شکل مشخص است این فاکتور هم نقش محافظتی در آسیب ناشی از ایسکمی میوکاردیال دارد که این عمل را از طریق ترشح پاراکرینی و اتوکرینی انجام می‌دهد(30).همچنین می‌تواند نقش تخریبی در ایسکمی های طولانی مدت(حدودا بعد از 60 دقیقه) داشته باشد. این کار را از طریق افزایش بیان TLR4 انجام می‌دهد.نتیجه این افزایش بیان افزایش سرعت آپوپتوزیس سلولهای قلبی است.بنظر می‌رسد در آینده از این فاکتور

[1]High Sensitivity C--Reactive Protein

بتوان برای تشخیص زودهنگام انفارکتوس میوکاردیال استفاده نمود.شکل زیر وقایع مربوط به نقش این فاکتور را نشان می‌دهد(49).



شکل 1-4: نقش MIF در هنگام آسیب همیوکاردیال

1-9-10- فاکتور رشد تمایز 15(Growth differentiation factor 15)

فاکتور رشد تمایز 15 (GDF 15) یک فاکتور رشد تکاملی است.کاردیومیوسیت ها در شرایط ایسکمی و رپرفیوژن این فاکتور را ترشح می‌کنند.این نظریه وجود دارد که ممکن است این فاکتور یک نقش محافظتی داشته باشد.این فاکتور در ماکروفاژها و بسیاری از بافت های بدن به دنبال جراحی ،ایسکمی و سایر شرایط استرسی یافت می‌شود(50).

1-9-11- کولین خون تام و پلاسما (whole blood and plasma choline)

کولین خون تام (WBCHO) که در واقع اندازه گیری کولین در اریتروسیت های همولیزات است.کولین از بافت های ایسکمیک به داخل خون آزاد می‌شوند.در پلاسما این فاکتور نهایتا توسط سلولهای خونی برداشته می‌شود(از اینرو تفاوت وجود دارد بین این دو اندازه گیری).سنجش پلاسمایی کولین و نیزخون تام آن در پیشگویی ایسکمی قبلی در بیمارانی که تروپونین آنها منفی است کاربرد

دارد(51).استفاده از کولین برای سنجش سطح خونی آن می‌تواند احتمالا درتعیین پایداری پلاک ها نقش داشته باشد.درنهایت می‌توان گفت این فاکتورها بتوانند در پیشگویی انفارکتوس میوکاردیال نقش داشته باشند(30، 51).

1-10- مقایسه مارکر های قلبی با تروپونین I

پروتئین های انقباضی از سال 1970 به عنوان پروتئین های مهم در تشخیص جراحت های میوکاردیال هستند،در واقع از آن زمانیکه این پروتئین ها به عنوان یک ایزوفرم یونیک و منحصر به فرد در مقایسه با سایر عضلات شناخته شدند(25).

برخلاف تروپونین C ،تروپونین I و تروپونین T فقطدر بافت قلبی وجود دارند؛ایزوفرم های اسکلتی با کشش سریع و آرام[1] توسط ژن های اختصاصی هم کد می‌شوند.تروپونین I دارای 31 امینو اسید اضافی در ناحیه N- ترمینال که همین سبب اختصاصی شدن این تروپونین در حدود 40٪ نسبت به سایر ایزوفرم های تروپونین Iمی‌گردد(52، 53).

تروپونین T قلبی تنها بین 6-11 امینو اسید باایزوفرمهای اسکلتی فرق دارد و تنها 10-30 ٪ از ترادف امینواسیدی آن هومولوژی پائینی با ایزوفرم اسکلتی TnT دارد، به همین خاطر خیلی مشکل بنظر می‌رسد که بتوان آنتی بادی برعلیه این مارکر برای استفاده در تست های ایمونولوژیکی تولید کرد(53).تروپونین قلبی I بطور مشخص در هیچیک از عضلات اسکلتی بیان نمی‌شود مستقل از محرکی بنام بیماری وپیشرفت آن است.

به همین خاطر cTnI تقریبا 100٪ اختصاصی بافت قلبی است و به همین خاطر یک مارکر بسیار خوبی برای تشخیص در آسیب های میوکاردیال قلبی در سرم می‌تواند استفاده قرار بگیرد.

[1]Slow And Fast Twitch

فرم قلبی به واسطه طراحی تست های ایمونولوژیکی می‌تواند افتراق داده شود. cTnI و cTnT به عنوان دو تست مهم در تشخیص با حساسیت بالا در بیماریهای میوکاردیال قلبی بویژه در تشخیص AMI مطرح شده‌اند.

هر دو مارکر cTnI و cTnT به عنوان مارکر های تاخیری در نظر گرفته می‌شوند که کینتیکی شبیه به CKMBدارند.

پس از بروزآنفارکتوس قلبی (AMI[1]) بصورت موازی تروپونین I به همراه تروپونین T با یک کینتیکی شبیه به هم شروع به افزایش می‌کند.این افزایش تا حدود 10–14 روز ادامه دارد.این پایداری در مقایسه با CKMB که ظرف 3–4 روز کاهش می‌یابد بسیار پایدارتر است(54).

تروپونین I نسبت به CKMBبیشتر بالا می‌ماند و این در حالیست که تروپونین T در مقایسه با این دو مارکر مدت زمان بیشتری را پایدار می ماند. از اینرو در مقایسه با این سه مارکر تروپونین T مارکر تاخیری(پایدارتر) مناسب تری است در حالیکه CKMBمارکر حساستری برای انفارکتوس مجدد است.

یک تست ایمونواسی برای تروپونین T در سال 1989 گزارش شده است و استفاده از این تست توسط Roche Boehringer Mannheim بصورت ثبت اختراعدر آمده است. این در حالیست که cTnI مارکر به نسبت قدیمی تری است. در واقع cTnI از لحاظ حساسیت و اختصاصیت یکی از بهترین تست های شناخته شده برای تشخیص آنفارکتوس قلبی می‌باشد(55).

چندین تست تجاری برای cTnI در بازار وجود دارد که اختلاف بین نتایج یکی از مشکلات اساسی این تست بخصوص بین آزمایشگاه های مختلف می‌باشد.در این مورد چندین مطالعه در جهت بررسی بین نتایج آزمایشگاه های مختلف انجام شده است که اجماعی بین نتایج مختلف بدست نیامده آنهم به این خاطر که مقادیر حتی تا حدود 10فاکتور و یا بیشتر تفاوت نشان داده اند.این تفاوت گسترده بیشتر ناشی از اختلاف در مواد رفرانس مورد استفاده در کالیبراسیون تست می‌باشد.فقدان استانداردسازیوسیعبویژه در تست CKMB قبل ازتوسعه این تست نیز وجود داشته است(56).کمیته استاندارد سازی تروپونینِ (cTnI) انجمن شیمی بالینی امریکا در واقع یک کمپلکس دوتایی و یا سه

[1]Acute Myocard Infarction

تایی ازمواد رفرانس را برای استاندارد اولیه تروپونین I تعیین کرده است زیرا در واقع اکثریت cTnI در جریان خون بصورت کمپلکس با تروپونین C است(57).

وقتی این استانداردها در دسترس تولید کننده های کیت تروپونین I قرار گرفتند،بطور قابل توجهی تفاوت بین آزمایش(Interassay) کاهش پیدا کرد.بایستی متذکر شدکه به هیچ عنوان این تورش بین آزمایش(Interassay biass) از بین نرفته است زیرا هر تست با فرمهای مختلف cTnI واکنش پذیری متفاوتی را داراست(58).

علیرغم اینکه تمام کیت های تجاری تشخیص CKMB از آنتی بادی مونوکلونال "conan " استفاده می‌کنند،در مورد تست cTnI ازآنتی بادی های مختلفی برای طراحی تست استفاده می‌گردد.به همین خاطر تفاوت در نوع آنتی بادی سبب شناسایی فرمهای مختلفی از cTnIمی‌شود که طبیعی و منطقی نیز می‌باشد.تعمیم صحیح نتایج وقتی منطقی است که تمام کمپانی های تولید کننده کیت تروپونین I ابتدا از یک آنتی بادی استاندارد برای کیت و طراحی آن استفاده کنند(58).

نکته بعدی این است که تروپونینI نسبت به پروتئولیز بسیار حساس و به همین خاطر تخریب پروتئولیتیکی نیز یکی از عوامل تغییرات بین آزمایشی(Interassay) می‌باشد.

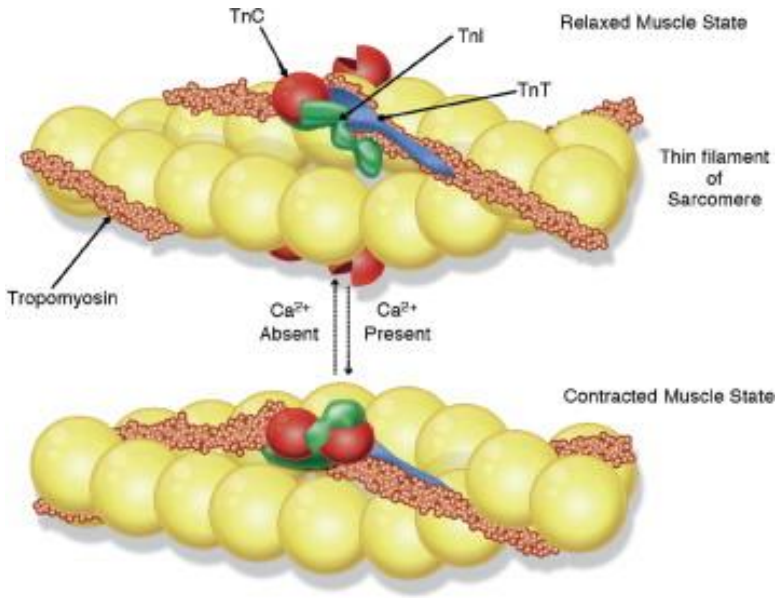
ناحیهNترمینال و C ترمینال در تروپونین I به طور وسیعی ناپایدار می‌باشند وبه همین خاطر براحتی توسط پروتئازهای اندوژنوس برداشته می‌شوند در حالیکه مناطق مرکزی (رزیدوی 110-30) نسبت به اثرات پروتئولیتیک مقاومتر است که این می‌تواند به دلیل محافظت بواسطه ارتباط و کمپلکسی است که با تروپونین C برقرار می‌کنند(59).

1-11- ساختار تروپونین I قلبی

پروتئین های انقباضی و تنظیمی قلبی مهمترین و بیشترین پروتئین های میوکاردی قلبی هستند.این پروتئین ها بسیار منظم و در ساختاری بنام سارکومر مرتب شده‌اند.در این ساختارفیلامانت های نازک و ضخیم قرار گرفته اند.فیلامانت ها ی نازک شامل فیلامان های اکتین و کمپلکس تروپونین/تروپومیوزین می‌باشد.از طرفی فیلامان های ضخیم در انتقال انرژی و توسعه کشیدگی عضلانی نقش اساسی دارند.این فیلامان ها در واقع ملکولهای میوزین هستند که بصورت نامتقارن[1] هگزامریک بسیار منظم قرار دارند.

تروپونین به همراه تروپومیوزین در واقع متعلق به یک خانواده از پروتئین های ساختاری هستند.این پروتئین ها در تنظیم انقباضی به واسطه کلسیم در تمام انواع ماهیچه های کششی نقش دارند(سریع- آهسته- قلبی)(35).

تروپونین در ماهیچه های صاف وجود ندارد. در واقع سه نوع تروپونین وجود دارد.تروپونین I ،تروپونین T ،تروپونین C.ساختار تروپونین قلبی در فرم طبیعی آن در میوسیت ها و نیز بعد از نکروز بافت قلبی در شکل زیر نشان داده شده است(36).



شکل 1-5: ساختار تروپونین قلبی در میوسیت ها در حالت نرمال و بعد نکروز بافتی

[1]Assymetric

1-11-1- تروپونین قلبی I (cTnI)

تروپونین I (24 kDa) یک ملکول کلیدی گلبولار است.این ملکول از انقباض عضله بواسطه تروپونین C از طریق مهار ATPase و درغیاب کلسیم جلوگیری می‌کند.بنابراین از این طریق از حرکت میوزین و جفت شدن اکتین و میوزین جلوگیری می‌کند(35).

1-11-2- تروپونین C (cTnC)

تروپونین C (18 kDa) یک پروتئین دمبلی شکل با دو دومن گلبولار است که توسط هلیکس مرکزی بلندی به هم متصل شده است.این پروتئین به کلسیم متصل می‌گردد و مسئولیت تنظیم فرایند فعالسازی فیلامان های نازک را در طول انقباض عضلانی ماهیچه های قلبی و اسکلتی به عهده دارد(35، 37).تروپونین Cمی‌تواند به 4 یون کلسیم متصل گردد و بدنبال آن سبب کاهش مهار اینترکشن اکتین میوزین را توسط القاء تغییر فضایی[1] و معکوس کردن عمل مهارکنندگی تروپونین I انجام می‌دهد.

تروپونین I و C به طور محکمی به هم متصل می‌شوند. قدرت اتصال این دو به یکدیگر به طور فزاینده‌ای به میزان اشباع بودن کلسیم در جایگاه اتصال در تروپونین C بستگی دارد(35، 37، 38).

1-11-3- تروپونین T(cTnT)

تروپونین T(37 kDa) یک پروتئین نامتقارن با دومن c ترمینال گلبولار مرکزی است. این پروتئین یک جایگاه اتصال برای تروپومیوزین دارد و مسئولیت اتصال کمپلکس تروپونین به تروپومیوزین را داراست از این رو در قرارگیری کمپلکس روی فیلامان نازک نقش دارد.

[1]Steric Shift

تروپونین T سبب فراهم نمودن فیکساسیون صحیح و درست تروپونین I و C بر روی فیلامانت اکتین /تروپومیوزین می‌گردد.اگرچه تروپونین T با هردو تروپونین I و C واکنش می‌دهد فلذا این تعامل[1] به اندازه تعامل کمپلکس TnI-TnC قوی نیست(35، 37).

نامگذاری TnT،TnC،TnI برای سه ساب یونیت کمپلکس تروپونین در سال 1973 ابداع شد.این نامگذاری بر اساس همان ویژگی های عملکردی ذکر شده در بالا می‌باشد(I:برای مهاری بودن؛T:برایاتصال تروپومیوزین؛C: برای اتصال کلسیم)(37).

1-12- تخلیص پروتئین از بافت

تخلیص پروتئین در واقع بکارگیری یکسری از روشهایی است که سبب جداسازی یک پروتئین از مجموعه پروتئین های موجود در کمپلکس آن می‌گردد.این کمپلکس می‌تواند بافت،سلول و یا حتی یک ارگانیسم کامل باشد.تخلیص پروتئین در نهایت منجر به افزایش خلوص آن از مجموعه کمپلکسی که در ان وجود دارد خواهد گردید.در واقع با بکارگیری روشهای مختلف سبب افزایش میزان خلوص پروتئین می‌گردد.

روشهای مختلفی در تخلیص پروتئین از بافت وجود دارد که هرکدام با توجه به ویژگیهایشان در مراحل مختلفی به کار گرفته می‌شوند.

برای بدست آوردن یک پروتئین با خلوص مناسب ،کارا و نیز از لحاظ اقتصادی به صرفه نیاز به بکارگیری روشهایی است که بتواند ضمن افزایش خلوص پروتئین از بافت بتواند ضمن حفظ ساختار فعالیت بیولوژیکی آن را نیز حفظ نماید. زیرا در بسیاری از موارد حفظ فعالیت بیولوژیکی بویژه در مورد آنزیم ها بسیار مهم است(60).

[1]Interaction

1-12-1- مرحله آماده سازی

در این مرحله بافت مورد نظر برای جداسازی پروتئین از موجود زنده جداسازی می‌گردد.سپس مراحل پاکسازی بافت و نیز آماده سازی بافت جهت تخلیص از جمله شفاف سازی[1] و چربی زدایی آن صورت می‌پذیرد(60).

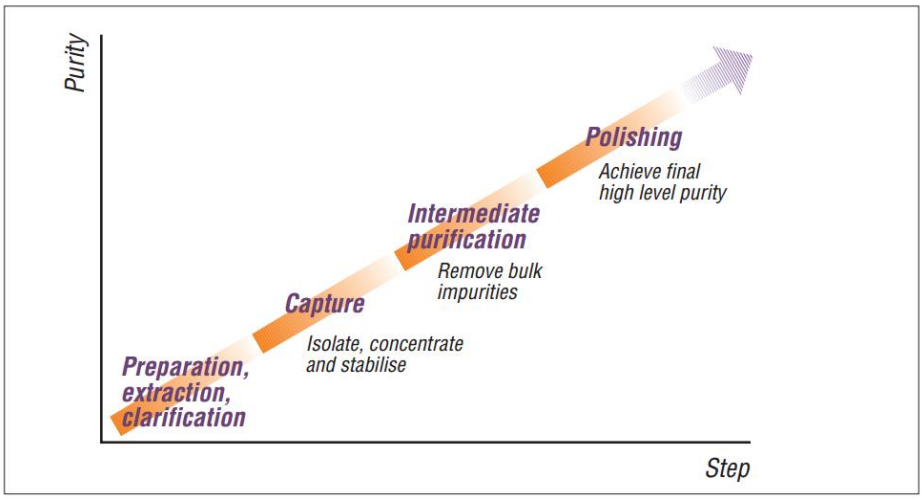
1-12-2- مرحله تخلیص

بعد از انجام این مرحله مرحله تخلیص پروتئین خواهد بود که به طور کلی سه استراتژی برای تخلیص مناسب یک پروتئین قابل ذکر می‌باشد.این سه استراتژی عبارتند از:

- فاز جذب پروتئین(capture phase): در این مرحله عمل جداسازی ،تغلیظ و نیز پایدار سازی پروتئین صورت می‌پذیرد.
- مرحله میانی تخلیص (intermediate purification):دراین مرحله هدف جداسازی ناخالصی های موجود در پروتئین از جمله جداسازی پروتئین های غیر مرتبط ،جداسازی اسید نوکلئیک،اندوتوکسین ها و... می‌باشد.
- مرحله صیقل دادن(polishing phase):هدف از این مرحله در واقع افزایش میزان خلوص پروتئین با جداسازی تمام ناخالصی ها می‌باشد.

در تمام مراحل سه گانه بالا بایستی علاوه بر انتخاب روش مناسب که سبب حفظ ساختار پروتئین و حفظ عملکرد آن می‌شود بایستی روشی را انتخاب نمود که سرعت بالا و نیز هزینه کم داشته باشد(60).

[1] Clarification



شکل1-6-آماده سازی و مراحل سه گانه تخلیص پروتئین

1-13- روشهای مختلف تخلیص پروتئین از بافت

روشهای متفاوتی با اهداف مختلفجهت جداسازی و تخلیص پروتئین از بافت مورد استفاده قرار می‌گیرد.هر کدام یک از این روشها می‌تواند باعث خلوص میزان مشخص از پروتئین گردد. در واقع توانایی هر یک از روشهای تخلیص پروتئین متفاوت بوده و بستگی به استراتژی در نظر گرفته شده دارد.بسته به اینکه چه میزان خلوص برای پروتئین مورد مطالعه مورد نیاز می‌باشد نوع استراتژی نیر متفاوت خواهد بود.ضمنا بایستی ذکر کرد که برای تخلیص پروتئین معمولا چند روش را بدنبال هم بکار میگیرند.با این کار هر روش باعث خلوص بیشتر پروتئین می‌گردد.در زیر به روشهای مهم تخلیص پروتئین اشاره میکنیم:

1-13-1- جداسازی با روش آمونیوم سولفات

اساس روش آموینوم سولفات برای جداسازی پروتئین مبتنی بر تغییر میزان خلالیت پروتئین است.حلالیت پروتئین ها بستگی به قدرت یونی محلول بستگی دارد و این قدرت یونی نیز به میزان نمک وابسته می‌باشد.دو تاثیر در خصوصیت جداسازی با نمک دیده می‌شود که کاملا از هم متفاوت هستند.اول اینکه در غلظتهای پائین نمک میزان حلالیت پروتئین افزایش پیدا می‌کند (salting in) و به تدریج با افزایش غلظت نمک و در واقع افزایش قدرت یونی محلول میزان حلالیت پروتئین کاسته شده و رسوب می‌کند(salting out).یکی از این نمکها که کاملا محلول در آب است و برای این روش جداسازی کابرد فراوان دارد آمونیوم سولفات است(61، 62).

1-13-2- کروماتوگرافی تعویض یون

کروماتوگرافی تعویض یون برای تخلیص پروتئین سبب جداسازی پروتئین با با استفاده از تفاوت در بار آنهامی‌گردد.جداسازی براساس اینتراکشن قابل بازگشت بین پروتئین باردار شده و بار مخالف موجود در ستون می‌گردد.پروتئین به ستون اضافه شده و بدلیل بار مخالف با ستون به آن چسبیده و سپس سایر پروتئین هایی که به ستونمتصل نشده اند از ستون جدا می‌شوند.در نهایت با تغییر میزان نمک و یا تغییر میزان pH پروتئین مورد نظر جداسازی می‌گردد(62)(شکل 1-8)

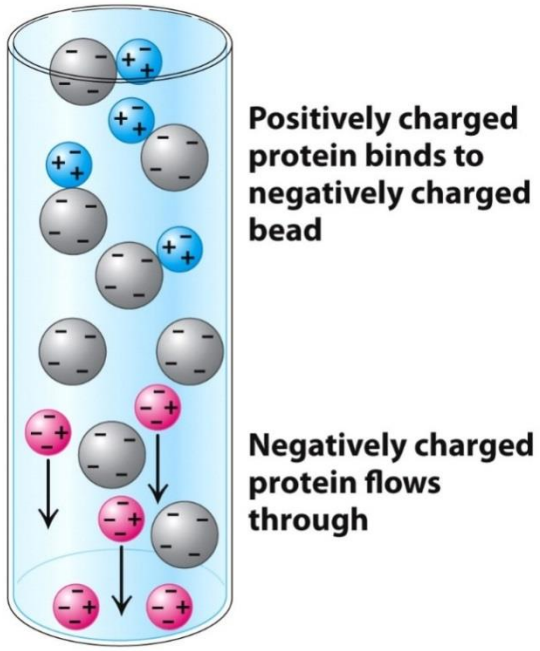
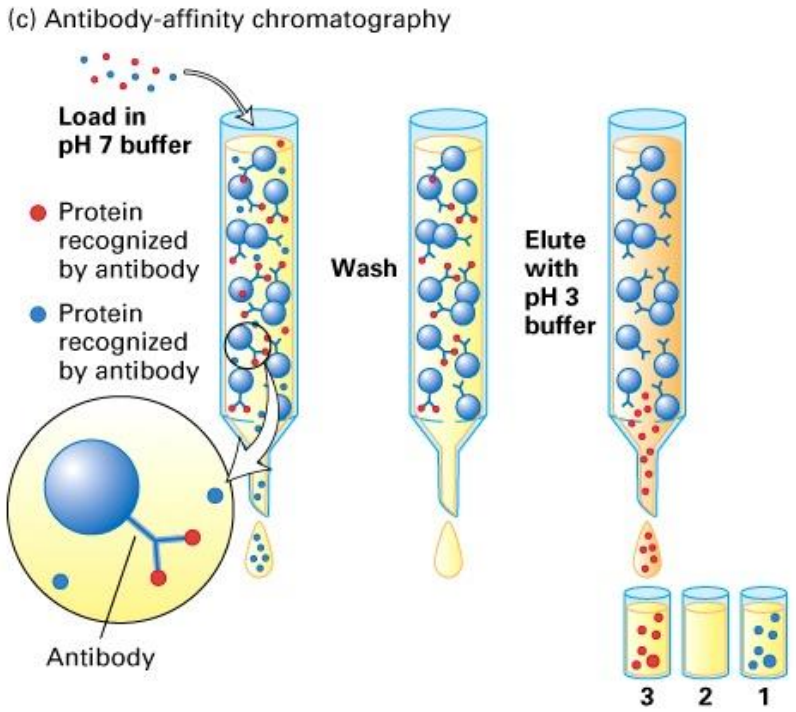


Figure 3.4
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

شکل ۱-۷ :کروماتوگرافی تعویض یون

1-13-3- افینیتی کروماتوگرافی:

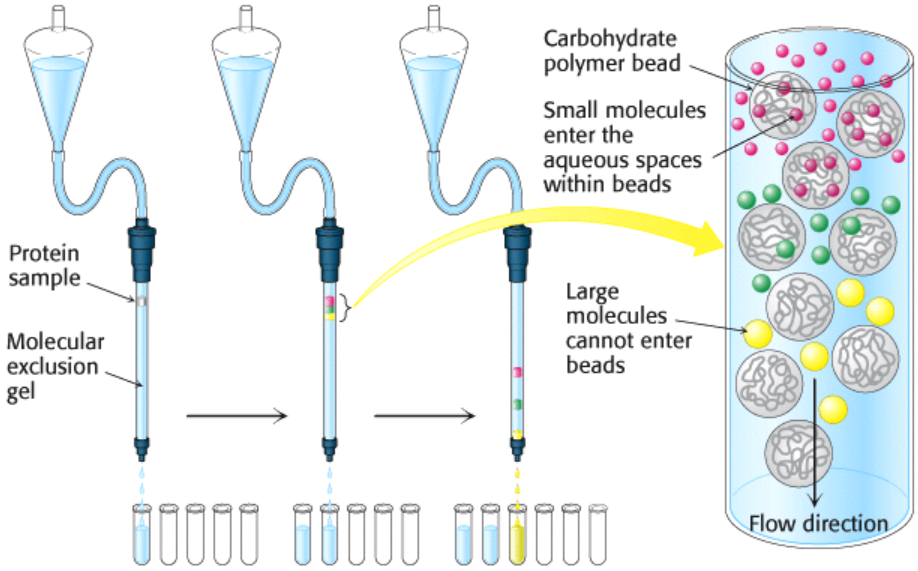
افینیتی کروماتوگرافی یا کروماتوگرافی تمایلی در واقع نوعی از کروماتوگرافی است که در آن اتصال قابل برگشت پروتئین به واسطه وجود لیگاند مربوط به ان درستون کروماتوگرافی صورت می‌پذیرد.این روش، در واقع این تکنیک هم برای مراحل اولیه جداسازی(capture) و هم مراحل میانی مناسب(intermediate phase) است.بخصوص زمانی که لیگاند مناسب مربوط به پروتئین وجود داشته باشد.مثلا در تخلیص آنتی بادی های مونوکلونال با استفاده از ستون G.در هر صورت این روش با حساسیت بسیار بالا سبب تخلیص پروتئین خواهد شد(60)(شکل 1-9).



شکل ۱-۸ : افینیتی کروماتوگرافی

1-13-4- ژل فیلتراسیون:

ژل فیلتراسیون روشی است که در آن جداسازی پروتئین براساس سایز ملکولی صورت می‌پذیرد.این روش برای مراحل پایانی کار و در واقع مرحله صیقل دادن(polishing phase) ،وقتی که حجم نمونه کاهش پیدا کرده است مناسب است.زیرا حجم نمونه بطور معنا داری سرعت جداسازی و نیز رزولوشن ژل فیلتراسیون را تحت تاثیر قرار می‌دهد(60).



شکل ۱-۹ : ژل فیلتراسیون

1-14- تولید و تهیه پروتئین های نوترکیب

مراحل متفاوتی برای تولید پروتئین نوترکیب وجود دارد مرحله ابتدایی و اولیه تعیین توالی مورد نیاز پروتئین است.این مسئله که تمام توالی پروتئین قابلیت بیان در سیستم مورد استفاده را دارد و یا خیر؟.بعد از اینکه توالی کامل و یا بخش مورد نظر پروتئین برای بیان در سیستم پروکاریوتی و یا یوکاریوتی انتخاب گردید مرحله بعد بردن ژن به داخل سیستم یوکاریوتی و یا پروکاریوتی خواهد بود.مراحل مختلف تولید پروتئین های نوترکیب از مرحله طراحی و انتخاب اپی توپ تا مرحله بیان در زیر توضیح داده خواهد شد.

1-14-1- استفاده از ابزار بیوانفورماتیکی برای تعیین اپی توپ های غالب

به طور کلی تولید آنتی بادی های اختصاصی در طراحی واکسن ها، تست های ایمنی، مطالعات پروتئومیکس، شناسایی بیومارکر های سرطانی و تولیدات تشخیصی بسیار مهم است. برای تولید چنین آنتی بادی هایی با تمایل بالا برای آنتی ژن هدف بایستی مناطق مهم آنتی ژن به لحاظ آنتی ژنیسیته را شناسایی کرد. لذا تعیین نقشه اپی توپی یک پروتئین و تولید آنتی بادی به صورت هدفمند علیه اپی توپ های غالب بسیار حائز اهمیت است. در واقع هدف اصلی تعیین نقشه اپی توپی تسهیل طراحی پپتید های کوچک است که به جای آنتی ژن کامل برای تولید آنتی بادی با هدف درمانی یا تشخیصی استفاده می‌شود

1-14-2- روش های آزمایشگاهی

برای تعیین اپی توپ می‌توان از روش های آزمایشگاهی گوناگونی از جمله کریستالوگرافی اشعه x، رزونانس مغناطیسی هسته ای (NMR)، اسپکتروسکوپی جرمی(MS)، قطعه قطعه کردن پروتئولیتیک، استفاده از تغییرات شیمیایی، تغییر شیمیایی تمایزی آنتی ژن، نمایش فاژی، استفاده از آرایه های پروتئینی،.... بهره جست. هرچند تعیین نقشه اپی توپی یک پروتئین با روش های آزمایشگاهی علی رغم کارایی بالای برخی روش ها محدودیت هایی نیز دارد. این روش ها زمان بر و پر هزینه بوده و نیاز به

منابع و تلاش فراوان دارند. این امر ضرورت استفاده از روش های بیوانفورماتیکی را برای به دست آوردن نتایج قابل اطمینان منعکس می کند(63).

1-14-3- روش های مبتنی بر ایمنوانفورماتیک

روش های کامپیوتری سریع و مقرون به صرفه هستند و در مقیاس وسیع قابل اجرا بوده و به هدفمند کردن تحقیقات آزمایشگاهی و نیز فهم بهتر اینتراکشن آنتی بادی- آنتی ژن کمک می‌کنند. وب سرور های فراوانی وجود دارند که پیش بینی مناطق اپی توپی یک پروتئین را به صورت اینترنتی انجام می دهند. هرچند مدل های کامپیوتری هنوز فرآیند های در حال تکامل هستند ولی تقش های کاربردی نه تنها در هدفمند کردن تحقیقات آزمایشگاهی بلکه در فرمولاسیون فرضیه های جدید قابل آزمایش از طریق تحلیل جزئی اطلاعات ایمنولوژیک که از طریق روش های سنتی قابل اجرا نیستند، ایفا می‌کنند.ایمینوانفورماتیک به عنوان شاخه ای از بیو انفورماتیک که در طراحی واکسن ها و تعیین نقشه اپی توپی کاربرد دارد، طی سال های اخیر به عنوان حوزه ضروری در تسریع تحقیقات ایمونولوژی مطرح شده است.

از مدت ها پیش مشخص شده است که روش ها و منابع کامپیوتری قابلیت تسریع تحقیقات ایمنی شناسی را دارند اما پیشرفت های اخیر در زمینه ژنومیکس و پروتئومیکس شرایط را به نحو بنیادینی متحول کرده است. توالی یابی ژنوم انسان و سایر موجودات مدل حجم زیادی از اطلاعات مرتبط با تحقیقات ایمنی شناسی را تولید کرده است. در همین زمان اطلاعات عملکردی، بالینی و اپیدمیولوژیکی فراوانی در مقاله های علمی گزارش می‌شوند. مجموع این اطلاعات موقعیت کنونی دانش ایمنی شناسی انسان و بیماری ها را نشان می دهد.

ضرورت سازمان دهی چنین منابع ایمنولوژیکی که به سرعت در حال رشد هستند، باعث ایجاد زمینه تحقیقاتی تحت عنوان ایمیونوانفورماتیک شده است. ایمیونوانفورماتیک یا ایمنی شناسی کامپیوتری شده جزء ضروری تحقیقات ایمنی شناسی مدرن است. این حوزه که در مرز بین علوم کامپیوتر و ایمنی

شناسی تجربی قرار می‌گیرد منعکس کننده کاربرد روش ها و منابع کامپیوتری برای فهم، تولید، فرآوری و ایجاد اطلاعات ایمنی شناسی است(64).

ایمنوانفورماتیک که بیش از 90 سال پیش با مدل سازی تئوریک اپیدمیولوژی مالاریا آغاز شد، شامل مطالعه و طراحی الگوریتم هایی برای تعیین نقشه اپی توپی سلول های B و T است که زمان و هزینه لازم برای بررسی آزمایشگاهی فرآورده های ژنی پاتوژن ها را کاهش می دهد.

ایمنوانفورماتیک حوزه های مختلفی از جمله ایمنوژنومیکس، ایمنوپروتئومیکس، پیش بینی اپی توپ و واکسیناسیون In Silicoرا در بر می گیرد.

ایمنومیکس قاعده نسبتا جدیدی است که از روش هایی با بازده بالا برای کشف و بررسی مکانیسم های ایمنی استفاده می کند. ایمنومیکس چندین حوزه از جمله انفورماتیک، ژنومیکس، پروتئومیکس، ایمنی شناسی و داروسازی بالینی را ترکیب می کند. امروزه تمرکز اصلی این حوزه بر توسعه الگوریتم هایی برای طراحی و کشف واکسن های جدید استوار است

ایمیونوم به تمام ژن ها و پروتئین های شرکت کننده در پاسخ ایمنی اشاره کرده و ژن هایی را که به طور گسترده در سایر انواع سلول های خارج از سیستم ایمنی بیان می‌شوند، شامل نمی‌شود.در تعریف دیگر این واژه به مجموع اپی توپ های گرفته شده از یک پروتئوم (انسانی یا پاتوژن) که در قالب MHC I / II به سیستم ایمنی عرضه شده یا با آنتی بادی های محافظتی در یک پاسخ ایمنی وارد واکنش می‌شوند، اطلاق می‌گردد(65).

به بیان Sette و همکاران تمام واکنش های ایمنی که در نتیجه تعاملات بین میزبان و پپتید های آنتی ژنیک ایجاد می‌گردند تحت عنوان واکنش های Immunome شناخته شده و مطالعه آن ها ایمنومیکس نامیدهمی‌شود(66).

روش های مختلفی برای مدل سازی و پیش بینی اپی توپ ها سلول های B گزارش شده اند. یکی از بزرگترین چالش ها در این زمینه فقدان استاندارد هایی برای تعریف اپی توپ های سلول B است که تاثیر مستقیمی روی انتخاب و توسعه ابزار های مناسب برای بررسی اپی توپ ها دارد. تلاش های کنونی در جهت طراحی ابزاری جهت پیش بینی اپی توپ های پیوسته هستند چرا که پیچیدگی کمتری

دارند. در حال حاضر از مقیاس های تمایل (Propensity) مانند هیدروفیلیسیته، خم ها،... برای پیشبرد تعیین نقشه اپی توپی استفاده می‌شود. روش های مبتنی بر آموزش ماشینی (Machine Learning) نیز در این راستا به کار گرفته شده اند اما در پیش بینی اپی توپ های پیوسته موفقیت کمی کسب کرده اند. از سوی دیگر پیش بینی های مبتنی بر ساختار در حال غالب شدن هستند چرا که تعداد ساختار های سه بعدی در دسترس کمپلکس های آنتی بادی– آنتی ژن روز به روز در حال افزایش هستند و از طرفی چنین روش هایی توانایی پیش بینی هر دو دسته اپی توپ های خطی و کنفورماسیونی را دارند. با وجود چنین محدودیت هایی دیتابیس هایی برای پیش بینی اپی توپ در دسترس هستند که اساس های مختلفی دارند(63).

در روش های سنتی برای پیش بینی اپی توپ های خطی از خواص فیزیکوشیمیایی آمینو اسید ها مانند آبدوستی (روش Parker)، انعطاف پذیری (تحت روش Karplus & Schulz) و تحرک، ساختار دوم (تحت روش Chou & Fasman)، سطح در دسترس (تحت روش Emini)، قطبیت و یا فراوانی آمینو اسید های خاصی در توالی استفاده می‌کنند. چنین روش هایی در پایگاه داده ایمنولوژیکی IEDB.org در دسترس هستند. مشکل اصلی چنین روش هایی کیفی بودن آن هاست به عبارت دیگر در این روش ها ابتدا نموداری بر اساس خاصیت فیزیکوشیمیایی خاصی رسم شده و سپس بر اساس پیک ها می‌توان مناطق اپی توپی را شناسایی کرد اما نمی‌توان مرز دقیق هر اپی توپ را شناسایی کرد(67).

از آن جایی که دقت این روش ها به تنهایی پایین است، بهتر است از همپوشانی نتایج چندین روش برای پیش بینی اپی توپ ها استفاده کرد. Bepipred به صورت اینترنتی و برنامه PEOPLE از ترکیبی از چند روش استفاده می‌کنند(68).

در روش های جدید با دقت بالاتر، کامپیوتر بر اساس توالی های پروتئینی شناخته شده آموزش داده می‌شود تا بتواند مناطق اپی توپی را در یک توالی پروتئینی شناسایی کند. وب سرور های ABCpred و BCEpred بدین صورت عمل می‌کنند(69).

در پیش بینی اپی توپ های کنفورماسیونی از سه روش استفاده می‌شود :

روش مبتنی بر توالی که از همان خواص فیزیکوشیمیایی استفاده کرده و مزیت آن عدم نیاز به ساختار سه بعدی پروتئین می‌باشد.

روش مبتنی بر ساختار که با داشتن ساختار سه بعدی پروتئین هدف کار خود را انجام می‌دهد. DiscoTope که در وب سرور IEDB.org در دسترس است با استفاده از اطلاعات ساختار فضایی و سطح در دسترس آمینو اسید ها محل اپی توپ ها را پیش بینی می کند.CEP و Ellipro ابزار اینترنتی دیگری در این زمینه هستند.

روش های مبتنی بر آنالیزmimotope که در این روش ها گروهی از پپتیدها با تمایل بالا برای آنتی بادی به صورت تصادفی در نمایش فاژی انتخاب می‌شوند. این پپتید ها mimotope نامی‌دهمی‌شوند و الزاما خود اپی توپ نیستند اما فرض می‌شود خواص فیزیکو شیمیایی و سازمان دهی اپی توپ های اصلی را دارند. Mapitope و Pepsurf نرم افزار هایی هستند که بر این اساس فعالیت می‌کنند(70، 71).

هر روش کامپیوتری مزایا و معایب خود را دارد لذا بهتر است از مجموعه نتایج چندین روش در انتخاب مناطق اپی توپی مورد نظر استفاده شود.

1-15- فناوری تولید پروتئین نو ترکیب

تولید پروتئین های نوترکیب به عنوان تکنولوژی بسیار کاربردی در علوم زیستی مطرح بوده و نقش بسیار مهمی در بیوتکنولوژی و زیست شناسی ساختاری دارد. پیشرفت های عظیم در فناوری پروتئین نوترکیب طی دهه های گذشته صد ها پروتئین درمانی را وارد کاربرد های بالینی کرده است. با توجه به حضور صد ها پروتئین درمانی دیگر در آزمایشات بالینی، محققان در تلاش در جهت بهبود این فناوری هستند. ظهور عصر سیستم بیولوژی نیروی پیش برنده مهمی در جهت پیشرفت و شکوفایی این فناوری محسوب می‌شود. علاقه به فهم عملکرد صد ها و هزاران پروتئینی که توالی آن ها به تازگی در دسترس قرار گرفته است، نیازمند روش های جدیدی است که بتوان هر پروتئین را در مقادیر و کیفیتی قابل تایید

با آنالیز های بیوشیمیایی و ساختاری به دست آورد. علاوه بر این، تنوع زیستی ذاتی موجود در توالی های پپتیدی و تغییرات پس از ترجمه ای به پیچیدگی ضرورت تولید پروتئین با فعالیت زیستی می افزاید چرا که این امر نه تنها مستلزم سنتز اسکلت ساختاری پروتئین بلکه نیازمند اعمال تغییرات پس از ترجمه ای صحیح نیز می‌باشد(72، 73).

1-15-1- انتخاب وکتور بیانی مناسب

وکتور های بیانی متعددی در جهت کلون کردن ژن و تولید پروتئین نوترکیب وجود دارند که از آن ها می‌توان به سیستم های بیانی مبتنی بر پروموتور λ PL و رپرسور CI (pLEX)، پروموتور Trc (pTrc)، پروموتور Tac (pGEX)، هیبرید پروموتور های lac/T5 (pQE) و نیز پروموتور T7 (pET) اشاره کرد. در این میان سیستم بیانی pET مبتنی بر T7 پر کاربرد ترین سیستم برای تولید پروتئین های نوترکیب محسوب می‌شوند به طوری که بیش از 90٪ سیستم های تولیدی پروتئین ها در PDBرا شامل می‌شود. بیش از 40 پلاسمید pET به صورت تجاری در دسترس هستند. این سیستم شامل پروموتور های هیبرید، جایگاه کلونینگ چند گانه برای کنار هم قرار دادن اجزای مختلف و جایگاه های برش پروتئازی به همراه تعداد زیادی عنصر ژنتیکی تغییر یافته برای اهداف بیانی مختلف می‌باشد. بیان این پلاسمید مستلزم حضور سویه میزبانی لیزوژن برای فاژ DE3 می‌باشد که RNA پلی مراز T7 را تحت کنترل پروموتور LacUV5 القا پذیر با IPTG کد می‌کند. LacI این پروموتور و پروموتور هیبرید T7/Lac کد شونده توسط پلاسمید بیانی را مهار می‌کند. یک کپی از ژن LacI در ژنوم E.coli و در برخی انواع pETروی پلاسمید حضور دارد. پس از اتصال IPTG و القای آزاد سازی LacI ترامری از اپراتور Lac، RNA پلی مراز T7 رونویسی و بیان شده که به نوبه خود منجر به رونویسی ژن هدف تحت کنترل پروموتور هیبرید T7/Lac می‌گردد. بیان زمینه ای پلاسمید بیانی pET به واسطه حضور لیزوزیم T7 که مهار کننده طبیعی RNA پلی مراز T7 است، کاهش می‌یابد. بیان هم زمان لیزیزیم T7 به واسطه ی پلاسمید pLysE یا pLysS صورت می گیرد. این پلاسمید ها ژن لیزوزیم T7 را در جهت های خاموش (pLysS) و بیان شونده (pLysE) دارا هستند که در ارتباط با پروموتور پاسخ دهنده به تتراسایکلین (Tc) می باشند.

1-15-2- انتخاب میزبان برای بیان پروتئین نوترکیب

سویه های بیانی بایستی در مخرب ترین پروتئاز های طبیعی نقص داشته باشند، پلاسمید بیانی را به طور پایدار نگه داری کنند و عناصر ژنتیکی مربوط به سیستم بیانی را دارا باشند. E.coli معمول ترین سویه برای تولید پروتئین با استفاده از تکنولوژی DNA نو ترکیب محسوب می‌شود به طوری که حدود 80٪ از پروتئین های مورد استفاده برای تعیین ساختار های سه بعدی وارد شده به PDB در سال 2003 در سیستم بیانی E.coli تولید شده‌اند.سیستم بیانی E.coli هم چنان به عنوان سیستم بیانی باکتریایی غالب مطرح بوده و سیستم ترجیحی برای تحقیقات آزمایشگاهی و توسعه اولیه فعالیت های تجاری و همچنین به عنوان محکی مناسب برای مقایسه قالب های بیانی مختلف به شمار می‌رود. ارجحیت E.coliبه عنوان میزبانی برای تولید هترولوگ پروتئین ها به دلایل زیر باز می‌گردد:

- سهولت کشت و دست ورزی با استفاده از ابزار آزمایشگاهی ساده
- در دسترس بودن ده ها وکتور و سویه میزبانی که در جهت افزایش بیان توسعه یافته اند.
- ژنتیک و فیزیولوژی شناخته شده
- بیان سریع و امکان تخلیص پروتئین در مقادیر میلی گرم در کمتر از دو هفته
- امکان تولید مقادیر نا محدود از پروتئین نوترکیب
- مطلوب بودن E.coli به لحاظ اقتصادی
-

علی رغم وجود چنین مزایایی عللی همچون ناتوانی E.coli در اعمال تغییرات پس از ترجمه‌ای، توانایی محدود در تشکیل پیوندهای دی سولفیدی گسترده، تولید نا محلول پروتئین به علت تا خوردگی نا مناسب و تجمع داخل سلولی پروتئین به شکل اجسام توده ای، بیان ناکافی به علت تجزیه پروتئین یا ترجمه نا کافی و نیز تمایل کدونی که گاهی منجر به کاهش بیان می‌گردد، بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب در این میزبان همیشه موفقیت آمیز نیست.

سویه Bl21 پر کاربرد ترین سیستم بیانی محسوب می‌شود که در دو پروتئازompT و lon که ممکن است در تخلیص پروتئین نوترکیب تداخلی ایجاد کنند، نقص دارد. مشتقاتی از BL21 شامل سویه های فاقد recA برای پایدار سازی پلاسمید های دارای توالی تکراری و نیز موتانت های Lac Y به

منظور تولید سطوح قابل تنظیم پروتئین های نوترکیب و همچنین موتانت های فاقد trx B/gor در جهت افزایش تشکیل پیوند های دی سولفیدی در سیتوپلاسم موجود می باشند(74، 75).

1-15-3- انتخاب برچسب مناسب

برچسب های پروتئینی ابزار بسیار مهمی در جهت افزایش بازده بیان پروتئین،تسهیل تخلیص پروتئین و تسریع تعیین ساختار و عملکرد پروتئین به شمار می روند. اکثر فیوژن ها به منظور تخلیص تمایلی اختصاصی پروتئین هدف به کار گرفته می‌شوند، همچنین می‌توانند از پروتئولیز داخل سلولی پروتئین هدف ممانعت کنند، حلالیت را افزایش دهند و یا به عنوان گزارشگر های بیانی ویژه استفاده شوند. برچسب های تمایلی مختلفی از جمله گلوتاتیون S- ترانسفراز (GST)، تیوردوکسین A (Trx A)، پروتئین متصل شونده به مالتوز (MBP)، پروتئین دی سولفید ایزومراز (DsbA)، پلی آرژینین و پلی هیستیدین وجود دارند.

تیوردوکسین ها اکسید و ردوکتازهایی هستند که از طریق تبادل تیوسولفید پیوند های دی سولفیدی را احیا می‌کنند. تیوردوکسین A (Trx A) پروتئین 11.6 کیلو دالتونی است که در سیتوپلاسم E.coli حلالیت بالایی از خود نشان داده و مقاومت ذاتی به حرارت دارد که به علت همین ویژگی ها برچسب تمایلی مناسبی به شمار می‌رود. Trx A به شکل برچسب در انتهای آمین یا کربوکسیل به منظور افزایش حلالیت پروتئین نوترکیب به کار می‌رود. علاوه بر افزایش حلالیت، Trx A به کریستالیزاسیون پروتئین نیز کمک می کند. بر خلاف MBP و GST، Trx A به تنهایی برای تخلیص پروتئین نوترکیب کافی نیست.

برچسب پلی هیستیدین پر کاربردترین برچسب تمایلی در بحث تخلیص پروتئین نوترکیب به شمار می‌رود. از مزایای این برچسب می‌توان به ایمنوژنیسیته پایین و نیز اندازه کوچک آن اشاره کرد. علاوه بر این، این برچسب در هر دو انتهای آمین یا کربوکسیل تداخلی در عملکرد پروتئین نداشته و می‌توان تخلیص پروتئین را تحت هر دو شرایط طبیعی و دناتوره پیش برد.

به طور معمول برچسب متصل به پروتئین پس از بیان به واسطه پروتئولیز در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از دو سرین پروتئاز معمول ترومبین و فاکتور Xa از پروتئین جدا می‌شود(76).

1-15-4- تخلیص پروتئین نوترکیب

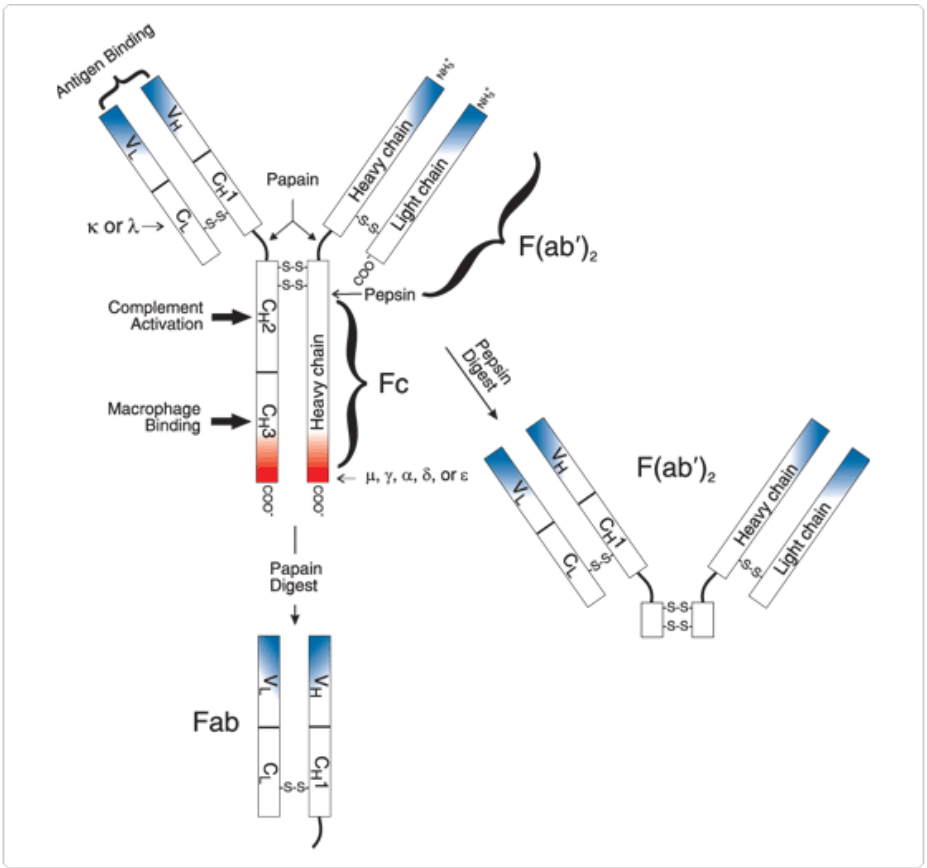
معمول ترین روش های تخلیص پروتئین همگی با کروماتوگرافی مرتبط هستند. برای تخلیص پروتئین های دارای برچسب پلی هیستیدین از کرواتوگرافی تمایلی فلز ثابت شده (IMAC) بر اساس تعاملات بین بار منفی هیستیدین و یون های فلزی (Ni،Co،Cu، Zn) متصل به ماتریکس استفاده می‌شود. Ni-نیتریلوتری استیک اسید (Ni^{2+}-NTA) که توسط هوآچی و همکاران طراحی شده است، تمایل بالایی برای ریشه های هیستیدین کنار هم نشان می دهد. لذا می‌توان با یک ماتریکس ارزان قیمت که چندین مرحله سخت تخلیص را تحمل کرده پروتتین نوترکیب را تخلیص نموده و به واسطه شیب غلظتی ایمیدازول، تغییر pH و حذف فلز آن را از ماتریکس جدا کرد.

البته اضافه کردن برچسب پلی هیستیدین ممکن است عملکرد پروتئین هدف را متاثر کند و یا به علت تغییر در بار پروتئین منجر به سست شدن اتصال پروتئین به ماتریکس گردد؛ هرچند می‌توان از طریق تغییر جایگاه برچسب یا اضافه کردن پلی لینکر انعطاف پذیر و یا افزایش تعداد ریشه های هیستیدین چنین مشکلاتی را حل کرد(77).

1-16- ساختار آنتی بادی

هر مولکول آنتی بادی یک ساختار کلی متقارن دارد که از دو زنجیره سبک (light, L) یکسان و دو زنجیره سنگین (heavy, H) یکسان تشکیل می‌شود (شکل 1-10). زنجیره های سبک و سنگین از یکسری واحدهای تکرار شونده و شبیه هم به طول تقریبی 110 اسید آمینه تشکیل شده‌اند که به طور مستقل و به شکل کروی چین خوردگی پیدا کرده و به نام دومن (domain) ایمونوگلوبولینی نامیده می‌شوند. هر دومن ایمونوگلوبولینی از دو لایه صفحه چین دار بتای سه تا پنج رشته ای شامل زنجیره

های پلی پپتیدی موازی ناهمسو تشکیل شده است. این دو لایه به وسیله یک پل دی سولفیدی کنار هم نگه داشته شده و زنجیره های مجاور هر صفحه بتا به وسیله حلقه های (loop) کوتاهی به هم متصل می‌شوند. اسیدهای آمینه بعضی از این حلقه ها برای شناسایی آنتی ژن مهم هستند(78).



شکل 1-10- ساختار شماتیک آنتی بادی؛زنجیره های سبک و سنگین ،محل اتصال انتی ژن

زنجیره های سنگین و سبک، هر دو دارای ناحیه متغیر (V:variable) در انتهای آمینی خود هستند که در شناسایی آنتی ژن نقش دارند و در انتهای کربوکسی خود دارای ناحیه ثابت (C:constant) هستندکه با سایر مولکولها و سلولهای اجرایی سیستم ایمنی واکنش متقابل داشته و اعمال اجرایی آنتی بادی ها را انجام می‌دهند. منطقه متغیر یک زنجیره سنگین (VH) در کنار منطقه متغیر یک زنجیره سبک

(VL)قرار گرفته و جایگاه اتصالی به آنتی ژن را تشکیل می دهد. از آنجائیکه واحد ساختاری هر مولکول آنتی بادی از دو زنجیره سبک و دو زنجیره سنگین تشکیل شده است، بنابراین هر مولکول آنتی بادی دارای دو جایگاه اتصالی به آنتی ژن می‌باشد(2).

1-17- سازماندهی ژنهای ایمونوگلوبولین

زنجیره های سنگین وسبک آنتی بادی ها توسط ژن های متعددی که بر روی جایگاههای کروموزومی متفاوتی قرار دارند، کد می‌شوند. در هر جایگاه، اگزون های کد کننده مناطق ثابت و نیز دسته ای از اگزون ها برای تشکیل دومن های متغیر منحصر بفرد وجود دارد. سه خانواده از قطعات ژنی که بخشهای متغیر زنجیره سنگین را کد می‌کنند، به نامهای متغیر (V)، تنوع (D) و اتصالی (J) می باشند. در مورد زنجیره سبک تنها قطعات ژنی V و J دومنهای متغیر را کد می‌کنند. در طی تکامل لنفوسیتB یک سری از وقایع نوترکیبی به نام V(D)J recombination روی می دهد که یک اگزون کد کننده دومن متغیر تشکیل می‌شود. یکی از چندین قطعه ژنی V زنجیره سبک با یکی از قطعات ژنی J ، و به همین صورت یکی از چندین قطعه ژنی V زنجیره سنگین با یکی از چندین قطعه ژنی D و یکی از چندین قطعه ژنی J ترکیب شده و اگزون کامل کد کننده دومن متغیر را بوجود می‌آورند. سپس این اگزون به همراه توالی سیگنال (لازم برای ترشح آنتی بادی) و توالی پروموتر/افزاینده (لازم برای نسخه برداری) با یکی از اگزونهای پایین دست مربوط به مناطق ثابت به هم پیوسته و سپس نسخه برداری و ترجمه صورت می‌گیرد(78).

به این ترتیب هر لنفوسیت B ، آنتی بادی با یک ویژگی منحصر بفرد ازحدود 10^{10} ویژگی ممکن را تولید می کند. این فرایند یک فرایند کاملاً اتفاقی بوده و نیاز به آنتی ژن ندارد. تنوع بیشتر در مناطق متغیر بدلیل اتصال غیر دقیق قطعات ژنی D،V و J و نیز اضافه شدن خودبخود نوکلئوتید های اضافی به هنگام اتصال قطعات ژنی به یکدیگر بدست می آید(2).

اگزون های مناطق ثابت که در پایین دست ژنهای مربوط به دومن های متغیر واقع شده‌اند، ایزوتیپ آنتی بادی تولید شده را تعیین می‌کنند. برای زنجیره سنگین، ابتدا ژن مربوط به IgM یعنی μ قرار دارد. با پیش رفتن پاسخ ایمنی، سلولهای B ژنهای کد کننده را به نحوی بازآرایی می‌کنند که آنتی بادی از کلاس های دیگر تولید می‌شود. این پدیده، تعویض ایزوتیپ (Isotype switching) نامیده می‌شود. همچنین از طریق فرایند هیپرموتاسیون توالی ژن های متغیر و سپس گزینش سلولهای تولید کننده آنتی بادی با افینیتی بالا، به مرور زمان پاسخ آنتی بادی به سمت افینیتی بالا پیش می‌رودکه فرایند بلوغ افینیتی (Affinity maturation) نامیده می‌شود. سلولهای برگزیده شده(مُنتخب)، سپس همان مراحل قبلی را که شامل تبدیل بعضی سلولها به پلاسماسل[1] و بعضی به سلولهای خاطره ای[2]می‌شود را طی می‌کنند(2).

1-18- آنتی بادی منوکلونال

توانایی تولید مقادیر نامحدودی از مولکول های آنتی بادی یکسان اختصاصی علیه یک شاخص آنتی ژنی انقلابی در ایمونولوژی ایجاد کرد که تأثیر شگرفی بر پژوهش های علمی در زمینه هایمختلف و نیز در طب بالینی گذاشت.

اولین و در حال حاضر متداول ترین تکنیک برای تولید آنتی بادی منوکلونال (MAb) موشی در سال 1975 توسط Georges Kohler و Cesar Milstein ارائه شده است(79). این تکنیک بر این اصل استوار می‌باشد که هر لنفوسیت B تنها می‌تواند آنتی بادی با یک ویژگی خاص تولیدکند. چون لنفوسیت های B طبیعی نمی توانند برای مدت زمان طولانی رشد کرده و زنده بمانند، برای بدست آوردنآنتی بادی با ویژگی خاص لازم است که سلول های B تولید کننده آنتی بادی اختصاصی فناناپذیر شوند. این کار با ادغام سلولی[3] سوماتیک یک سلول B طبیعی تولید کننده آنتی بادی و یک سلول میلومایی موشی انجام می شود. بعد از آن سلول های ادغام یافته ای که ویژگی تولید آنتی بادی ترشحی

[1]Plasmacell
[2] Memory Cell
[3] Hybridization

را از سلول B طبیعی گرفته اند، انتخاب شوند. چنین رده های سلولی فنا ناپذیر تولید کننده آنتی بادی را که از سلول های ادغام یافته حاصل شده‌اند، هیبریدوما[1] و آنتی بادی تولید شده توسط این سلول ها را آنتی بادی منوکلونال[2] گویند.

تکنیک تولید هیبریدوما نیاز به رده های سلولی میلومایی دارد که در محیط کشت طبیعی بتوانند رشد کنند اما در محیط کشت انتخابی به دلیل نقص در آنزیم های هیپوگزانتین-گوانین فسفوریبوزیل ترانسفراز (HGPRT) یا تایمیدین کیناز (TK) قادر به رشد نباشند. ادغام سلول های طبیعی با این رده های میلومایی معیوب (به عنوان شرکای ادغام) سبب می شود تا ژن های مورد نیاز برای سنتز DNA از سلول های طبیعی تامین شوند. علاوه بر این، خصوصیت رشد کنترل نشده سلول میلومایی، خاصیت فناناپذیری به چنین هیبریدهایی می‌دهد سلول های طبیعی جانوری، نوکلئوتیدهای پورین و تیمیدیلات (که هر دو پیش ساز DNA هستند) را با استفاده از تتراهیدروفولات در مسیر de novo سنتز می‌کنند. داروهای ضد فولات مانند آمینوپترین جلوی فعال شدن تتراهیدروفولات را می‌گیرند و در نتیجه باعث مهار ساخته شدن پورین ها و در نهایت مهار سنتز DNA از مسیر de novo می‌شوند. سلول هایی که تحت تاثیر آمینوپترین قرار می‌گیرند، از یک مسیر اضطراری (Salvage pathway) استفاده کرده و با استفاده از آنزیم HGPRT پورین را از هیپوگزانتین افزوده شده به محیط کشت و با استفاده از آنزیم TK، تیمیدیلات را از تایمیدین موجود در محیط کشت انتخابی سنتز می‌کنند.

بنابراین سلول ها می توانند به طور طبیعی در محیط کشت HAT رشد کنند. سلول های میلومایی فاقد HGPRT یا TK نمی توانند از مسیر اضطراری استفاده کنند و در نتیجه در محیط کشت انتخابی HAT[3] خواهند مرد. اما اگر سلول های HGPRT منفی یا TK منفی فیوژن داده شوند، سلول های B آنزیم های ضروری را تأمین می‌کنند و سلول های هیبرید حاصل DNA را ساخته و در محیط HAT رشد می نمایند.

برای تولید آنتی بادی منوکلونال اختصاصی علیه آنتی ژن خاص، ابتدا باید یک موش را با آن آنتی ژن ایمیونیزه کرده و سپس سلول های B را از طحال حیوان جدا نمود تا آنها را با رده سلولی فناناپذیر

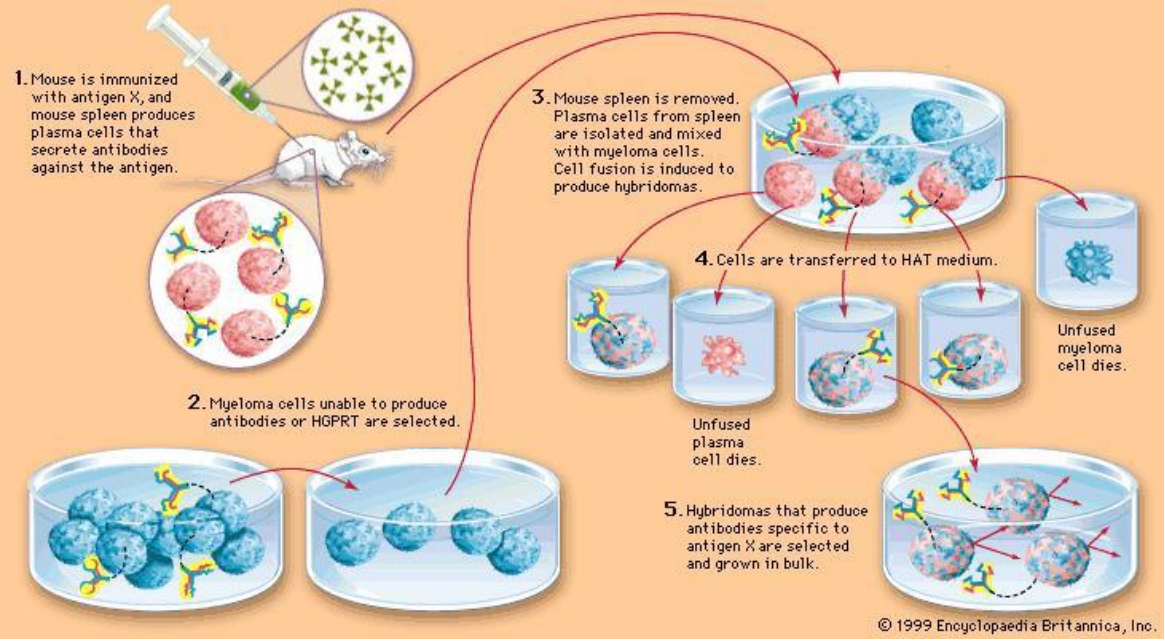
[1] Hybridoma
[2] Monoclonal Antibody
[3] Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine

مناسب ادغام کرد. امروزه از رده های میلومایی استفاده می‌شود که قادر به تولید ایمونوگلبولین نیستند و از پلی اتیلن گلیکول (PEG) برای ادغام سلول ها استفاده می‌کنند. تحت این شرایط، هیبریدها با استفاده از محیط HAT انتخاب می‌شوند، سلول های میلومایی ادغام نشده که فاقد آنزیم های HGPRT یا TK هستند، می‌میرند و سلول های B ادغام نشده نیز بیش از 1 تا 2 هفته زنده نمی‌مانند و تنها هیبریدها رشد می‌نمایند. سلول های ادغام شده طوری کشت داده می‌شوند که در هر حفره کشت فقط یک سلول هیبریدوما قرار بگیرد. بعد از آن مایع رویی هر حفره ای که در آن رشد سلولی مشاهده می‌شود، برای تعیین آنتی بادی اختصاصی علیه آنتی ژنی که جهت ایمونیزاسیون به کار رفته است، مورد آزمایش قرار می‌گیرد. روش غربالگری (screening) مورد استفاده متناسب با نوع آنتی ژن انتخاب می شود.در مورد آنتی ژن های محلول، تکنیک های متداول رادیوایمونواسی (RIA) یا الایــزا(ELISA)می باشند و در مورد آنتی ژن های سطحی سلول، از روش های مختلف تعیین آنتی بادی متصل شده به سلول های زنده از جمله فلوسیتومتری استفاده می‌شود. ابتدا حفرات مثبت (حفراتی که در آنها هیبریدوماهای تولید کننده آنتی بادی مورد نظر وجود دارند) مشخص می‌شوندو سپس سلول ها را با رقتهای مشخص کلون می‌کنند(limiting dilution) و با یک مرحله غربالگری دیگر، کلون های تولید کننده آنتی بادی جدا می شوند. این هیبریدوماهای کلون شده، آنتی بادی های منوکلونال با ویژگی مورد نظر را تولید می‌کنند.

هیبریدوماها را می توان در حجم های زیاد به صورت تومورهای آسیتی[1] در موش های هم ژن (syngeneic) رشد داد تا مقادیر زیادی آنتی بادی های منوکلونال تولید شوند(2).کاربردهای رایج آنتی بادی های منوکلونال عبارتند از:

- شناسایی شاخص های فنوتایپی منحصر به انواع سلول های خاص
- تشخیص ایمنی (Immunodiagnosis) مارکرهای عفونی، سرطانی و خود ایمنی
- درمان بیماری های عفونی، سرطانی و خود ایمنی
- بررسی فعالیت مولکول های ترشحی و سطحی سلول(80).

[1] Ascetic Tumors



شکل 1-11: شکل شماتیک تولید آنتی بادی مونوکلونال با تکنیک هیبریدوما

1-19- آنتی بادی پلی کلونال

آنتی بادی های پلی کلونال با ایمیونیزه کردن یک حیوان مناسب که معمولاً پستاندار می‌باشد، تولید می‌گردد. آنتی ژن مورد نظر به همراه ادجوانت مناسب به حیوان تزریق شده، آنتی بادی هایی از کلاس IgG علیه آنتی ژن در بدن حیوان توسط لنفوسیتهای B اختصاصی تولید شده، و این آنتی بادی ها از سرم حیوان تخلیص می‌گردند. بدین طریق، IgG اختصاصی با غلظت حدود 1-10 mg/ml را می‌توان بدست آورد. آنتی بادی های تولید شده با این روش، از لنفوسیتهای B اختصاصی علیه اپی توپهای متفاوت مشتق شده و لذا پلی کلونال (polyclonal) نامیده می‌شوند. معمولاً از بز، اسب، خوکچه هندی، هامستر، موش، رت، گوسفند، خرگوش و مرغ برای تولید آنتی بادی پلی کلونال استفاده می‌گردد. با این حال، موش بیشتر برای تولید آنتی بادی منوکلونال مورد استفاده قرار می گیرد. از پستانداران بزرگتر وقتی استفاده می‌شود که مقادیر زیادی از آنتی بادی مورد نیاز باشد. بعضی از محققین

از مرغ بهره می گیرند که آنتی بادیIgY تولید شده در کیسه زرده جمع شده و بدون نیاز به روشهای تهاجمی خونگیری از تخم مرغ قابل استحصال است. برای تولید آنتی بادی پلی کلونال، ادجوانت های متعددی وجود دارد که می‌توانآنها را به همراه آنتی ژن به حیوان مورد نظر تزریق کرد که از آن جمله هیدروکسید آلومینیوم، مورامیل دی پپتید و ادجوانت های ناقص[1](IFA) و کامل[2](CFA) فروند می باشند.CFA امولسیون آب در روغن حاوی میکروب های کشته شده مایکوباکتریوم می‌باشد، ولی IFA دارای میکروب کشته شده نمی‌باشد(81، 82).امروزه از مواد جدیدی نیز به عنوان ادجوانت در کار آزمایی های بالینی استفاده می‌شود که مهمترین آنها عبارتند از: لیگاندهای TLR4 (به عنوان مثال منوفسفریل لیپید A، MPLA)، لیگاند TLR9 (CpG)، لیگاند TLR7 (imiquimod)، توکسین دیفتری و سایتوکاین های IL-2 ، IL-12 و IL-15(83). مسیرهای تزریق متفاوتی برای تولید آنتی بادی پلی کلونال وجود دارد که روش اینترادرمال مؤثرترین مسیر برای آنتی ژن های محلول بدون ادجوانت بوده و روش های ترجیحی برای آنتی ژنهای ذره ای و نیز آنتی ژن های همراه با ادجوانت، زیر جلدی و درون صفاقی است(84).

1-20- مزایای آنتی بادی های منوکلونال در مقایسه با آنتی بادی های پلی کلونال

در دو، سه دهه اخیر مجددا استفاده از آنتی بادی ها برای درمان بیماری ها مورد توجه قرار گرفته است و به عبارتی درمان بیماری ها بااستفاده از آنتی بادی ها با معرفی آنتی بادی های منوکلونال توسط کهلر و ملشتاین متحول گردیده است(79).آنتی بادی های منوکلونال در مقایسه با آنتی بادی های پلی کلونال و آنتی بیوتیک ها مزایای فراوانی داشتند که استفاده از آنها را در اولویت قرار می داد. مهمترین این مزایا عبارت بودند از:

[1]Incomplete Freund's Adjuvant
[2]Complete Freund's Adjuvant

1. آنتی بادی های منوکلونال اختصاصیت بسیار بالایی داشته و میزان واکنش متقاطع[1] آنها با مولکول های بدن بسیار پائین می باشد.
2. آنتی بادی های منوکلونال در مقایسه با آنتی بادی های پلی کلونال هتروژنیسیتی بسیار پائین در تولیدات مختلف (lot to lot) داشتند.
3. آنتی بادی های منوکلونال غلظت بسیار کم و فعالیت بسیار بالا در مقایسه با آنتی بادی های پلی کلونال دارند
4. آنتی بادی های منوکلونال با ابداع تکنیک های مهندسی ژنتیک نظیر تولید آنتی بادی های انسانی شده و انسانی توکسیسیتی بسیار پائینی را از خود نشان می دهند.
5. آنتی بادی های منوکلونال خطر انتقال عوامل عفونی که همراه با سرم و یا پلاسما انتقال پیدا می کنند را ندارد(85).
6. آنتی بادی های منوکلونال بر خلاف آنتی بیوتیک ها که هم بر روی عوامل عفونی و هم بر روی فلور نرمال بدن تاثیر می‌گذارند، تنها بر روی آنتی ژن های هدف خود اثر گذاشته و آنها را از بین می برند. این مساله بسیار حائز اهمیت می باشد چون مشاهداتی مبنی بر ارتباط بین بیماری های مزمن نظیر آسم و بدخیمی ها با مصرف طولانی مدت آنتی بیوتیک ها گزارش گردیده است (86).
7. آنتی بادی ها بر خلاف آنتی بیوتیک ها که سبب ایجاد سویه های مقاوم به درمان می‌شوندتمام میکروب ها با توجه به اختصاصیت شان برای آن میکروب ها را از بین می برند و مشکلاتی نظیر ایجاد استافیلوکک ائوروس های مقاوم به متی سیلین و یا استافیلوکک ائوروس های مقاوم به ونکومایسین در درمان با آنتی بادی ها دیده نمی شوند(87).

[1] Cross Reactivity

8. آنتی بادی های منوکلونال سبب اثر بخشی بیشتر آنتی بیوتیک ها و نیز معرفی تارگت های جدید برای واکسن سازی می گردند(88).
9. اثر بخشی بهتر آنتی بادی های منوکلونال در افراد ایمونوساپرسیو و یا افراد با نقص در سیستم ایمنی نشان داده شده است به عنوان مثال اثر بخشی آنتی بادی palivizumab (آنتی بادی ضد RSV) در نوزادان نارس بسیار مناسب و قابل قبول است(89).

1-21- معایب استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال

با وجود مزایای بسیار زیاد آنتی بادی های منوکلونال که در بالا گفته شد معایبی هم در استفاده از آنتی بادی های منوکلونال وجود دارد که عبارتند از:

1. هزینه بسیار بالا با توجه به مشکلات تولید و نگهداری آنتی بادی های منوکلونال
2. شناسایی تعداد محدود اپی توپ در مقایسه با انتی باید پلی کلونال
3. قدرت سیگنال کمتر در مقایسه با آنتی بادی های پلی کلونال در تشخیص اپی توپ ها

جدول 1-3- مقایسه آنتی بادی مونوکلونال و پلی کلونال

Polyclonal antibodies	Monoclonal antibodies
Inexpensive to produce	Expensive to produce
Skills required for production are low	Training is required for the technology used
Relatively quick to produce	Hybridomas take a relatively long time to produce
Generate large amounts of non-specific antibodies	Generates large amounts of specific antibodies
Recognize multiple epitopes on any one antigen	Recognize only one epitope on an antigen
Can have batch-to-batch variability	Once a hybridoma is made, it is a constant and renewable source
	No or low batch-to-batch variability

1-22- سنجش های اتصالی

سنجش لیگاند- مولکول پروتئینی متصل شونده به آن یکی از مهمترین روش های تجزیه ای است. از زمان ۱۹۵۹ که اولین سنجش لیگاند با تکنیک رادیوایمونواسی انجام شد، تاکنون سنجش های لیگاند دچار تحول اساسی گردیده اند و با روش های موجود هورمون ها، تومورمارکرها، عوامل آلرژن، آنتی بادی ها و بسیاری از مواد را می‌توان اندازه گرفت. هدف اصلی تمام سنجش های اتصالی تعیین غلظت و یا تشخیص کیفی یک مولکول تحت عنوان آنالیت است که به آن لیگاند نیز گفته می‌شود.

1-22-1 سنجش های بیولوژیک

بیواسی یکی از شیوه های اندازه گیری است، در این شیوه فعالیت ماده اندازه گیری شده با میزان پاسخ تولید شده در یک سیستم بیولوژیک، تحت شرایط دقیقا کنترل شده بدست می آید(90).سنجش های بیواسی به صورت invivo وinvitro انجام می‌شوند.

1-22-2- سنجش های ایمنی[1]

اساس این نوع سنجش ها واکنش آنتی ژن با آنتی بادی ویژه آن است، این تکنیک کاربرد وسیعی در تخمین میزان آنتی ژن (یا آنتی بادی) مایعات بیولوژیک داشته و حساسیت نتایج درحد نانوگرم و پیکوگرم است. در صورت بالا بودن غلظت آنتی ژن و آنتی بادی این دو با یکدیگر تشکیل کمپلکس

1 - Immunoassay

داده و در نتیجه رسوب مشخصی ایجاد می‌شود، اما چون غلظت بعضی از آنتی ژن ها در مایعات بیولوژیک بسیار پایین است و با آنتی بادی ویژه خود رسوب مشخصی تولید نمی‌کنند، لذا با استفاده از یک پدیده ثانویه (استفاده از نشانه یا label) حضور این کمپلکس تایید می‌گردد. بر اساس نوع نشان مورد استفاده در ایمونواسی، این نوع سنجش ها به دو دسته تقسیم می‌شوندکه به قرار زیر است(90، 91) :

- سنجش های ایمنی ایزوتوپی
- سنجش های ایمنی غیر ایزوتوپی

1-22-2-1- سنجش های ایمنی ایزوتوپی

در سنجش رادیوایمونواسی (RIA) از مواد رادیواکتیو به عنوان نشان استفاده می‌شود. اولین بار برسون[1]و یالو[2]در سال ۱۹۶۰ با نشان دار کردن آنتی بادی علیه انسولین به وسیله ید نشان دار شده (I^{125}) میزان انسولین را در انسان اندازه گیری نمودند(92). ابداع این شیوه تحولی بزرگ در بیولوژی و پزشکی ایجاد نمود. با این فرض که نشان دار کردن روی ساختمان و فعالیت بیولوژیک ماده اثری نداشته باشد از نشان رادیواکتیو می‌توان برای انجام آزمایشات بیولوژیک استفاده کرد، به ترتیبی که مقادیر بسیار کم از ماده مورد نظر که نشان دار شده است با استفاده از شمارش گرهای دقیق، تشعشعات رادیواکتیو آن اندازه گیری می‌شود.

1-22-2-2- سنجش های ایمنی غیرایزوتوپی

نشانگرهای مورد استفاده در این نوع سنجش ها مواد رادیواکتیو نمی‌باشند و شامل موارد زیر می‌باشند :

2- Berson
3- Yalow

۱- آنزیم ها

۲- گلبول های قرمز

۳- ذرات کلوئیدی فلزات (طلا، نقره، مس، سلنیوم و...)

٤- مولکول های کمولومینسانس و فسفرسانس

۵- رنگ های فلورسنت

٦- رنگ ها (Foron Blue- Resolin Blue)

۷- لیپوزوم ها

۸- ذرات لاتکس

۹- باکتریوفاژها

۱۰- سیستم های بیولومینسانس

۱۱- کربن

نشان گرهای فوق که در سنجش های ایمونواسی بکار می‌روند هر کدام معایب و مزایای خاص خود را دارند.در سنجش های ایمنی اعم از سنجش های ایزوتوپی و غیر ایزوتوپی دو سیستم سنجش رقابتی و غیر رقابتی وجود دارد.

1-22-3-2-1- رقابتی

رادیوایمونواسی رقابتی که در این سیستم بین آنتی ژن نشاندار شده با ماده رادیواکتیو و آنتی ژن غیر نشاندار برای اتصال به آنتی بادی رقابت وجود دارد، این روش بسیار حساس و دقیق می‌باشد.

1-22-3-2-2- غیر رقابتی

یکی از انواع سنجش های ایمونورادیومتریک اسی[1] (IRMA)می‌باشد، این سنجش از نوع ساندویچ[2] است و در مورد آنتی ژن هایی با حداقل دو جایگاه آنتی ژنیک مختلف کاربرد دارد. در این سیستم دو آنتی بادی ویژه به دو جایگاه مختلف در آنتی ژن متصل می‌شوند که یکی از آنها به وسیله ماده رادیواکتیو نشان دار شده است.

با توجه به دقت، حساسیت و ویژگی بالای رادیوایمونواسی این روش کاربرد وسیعی در اندازه گیری هورمون ها، داروها و متابولیت های استروئیدی مایعات بیولوژیک دارد اما به دلیل معایب زیر در تحقیقات و آزمایشات از نشان گرهایی غیر از مواد رادیواکتیو استفاده می‌شود(93).

۱- گرانی وسایل شمارش گر و مواد مورد نیاز

۲- نیمه عمر کوتاه واکنش گر

۳- نیاز به وسایل مخصوص، آموزش پرسنل(مجوزهای اختصاصی)

٤- تدابیر خاص برای دفع زباله های رادیواکتیو

۵- مشکلات ایمنی ضمن کار با مواد رادیواکتیو

٦- به خاطر ماهیت رادیواکتیو، از آن به میزان زیاد نمی‌توان استفاده کرد.

1-23- طراحی سنجش های ایمنی

به منظور طراحی انواع سنجشهای ایمنی می بایست موارد خاصی را مد نظر قرارداد که برخی از آنها مختصرا به شرح زیر می باشند:

[1]- Immuno Radio Metric Assay (IRMA)
[2]- Sandwich

الف– فاز جامد: امروزه فازهای جامد متعددی به منظور پوشانیدن آنتی بادی و یا آنتی ژن مورد استفاده قرار می گیرند. از لوله ها که اولین فازهای جامد بودند تا انواع چیپ ها و یا تجهیزات نانو[1]از پلیمرها با توانایی اتصال بالا به پروتئین بطور معمول بیشترین کاربرد را داشته،این نوع پلیمرها می‌توانند به صورت لوله آزمایش،ذرات لاتکس,چاهک های کوچک،ورق های نیترو سلولز و... باشند.

ب– تثبیت آنتی ژن یا آنتی بادی بر سطوح پلیمر: از انواع تثبیت ها به صورت فعال و غیر فعال استفاده می‌شود. در تثبیت های فعال از موادی برای ایجاد پیوند های کووالانسی بین پروتئین و سطوح پلیمری استفاده می‌شود (مثل گلوتارآلدییید) و یا اینکه سطوح پلیمری خود حاوی گوه های فعال مثل اپوکسی و آمین آزاد می باشند. اما در تثبیت های غیر فعال از pH،غلظت مولی بافر،نوع بافر و افزودنی های موثر و ... برای تثبیت هر چه بیشتر و بهتر استفاده می‌شود.

ج – زمان و دمای تثبیت: از عوامل موثر در تثبیت پروتئین بر سطوح پلیمری دما و زمان است که با پروتکل های متعدد و متنوع انجام می‌شود.

د – شستشو: همانگونه که قبلا ذکر شد از جمله مهمترین مراحل سنجش های ایمنی مرحله جداسازی است که احتیاج به شستشوی موثر دارد. در این مرحله استفاده از شوینده ها (دترجنت ها) در غلظت مناسب می‌تواند از اتصال غیر ویژه پروتئین های اضافی جلوگیری کرده،آن را از واکنش های نا مطلوب عاری سازد.

ه – بلاک کننده ها: از بلوکه کننده های متعددی برای پوشاندن فضاهای اضافی بر سطوح پلیمری استفاده می‌شود که از جمله آنان می‌توان به پروتئین های غیر مرتبط با اجزاء سنجش مثل ژلاتین،کازیین،شیر بدون چربی و .. اشاره کرد(94).

[1] Nanodevice

1-24- پوشش دهی آنتی بادی بر سطوح مختلف

پلاستیک ها به علت سادگی روش کار با آنها یکی از مهمترین و کاربردی ترین فازهای جامد بوده که در اکثر تحقیقات آزمایشگاهی و بالینی مورد استفاده قرار می گیرند. ولی با این وجود آنها نیز دارای یکسری محدودیت هایی می باشند که به شرح ذیل است:

مقدار واکنش دهنده ایمنی استفاده شده در سطوح پلاستیکی حدودا ده برابر بیشتر از فازهای جامد ذره ای و غشاء نیتروسلولزی می‌باشد. میزان واکنش آنتی ژن با آنتی بادی نسبت به محلول یا فازهای جامد ذره ای کمتر می‌باشد.

غشاء های نیتروسلولزی عموما برای اندازه گیری آنالیتها در نمونه های بیولوژیکی قابل استفاده نمی‌باشد اما دریکسری از تحقیقات ممکن است جایگزین پلاستیک گردند که به شرح ذیل می‌باشد:

– می‌توان از این غشاءها به منظور اثبات حضور یک واکنش دهنده ایمنی نه اندازه گیری مقدار آن استفاده کرد. برای انجام آزمایش مقادیر اندکی از نمونه کافی می‌باشد. بنابراین زمانی که نمونه مورد آزمایش ناچیز است این روش نسبت به روشهای دیگر ارجحیت پیدا می کند.

– به واسطه این روش ها می‌توان آنتی ژن های محلول در دترجنت های یونی را نیز آزمایش کرد.

ذرات فاز جامد (آگاروز،سلولز،پلی آکریل آمید،دکستران)،ذرات معدنی و لاتکس نیز برای آنتی ژن و آنتی بادی در نمونه های بیولوژیک قابل استفاده بوده و در بیشتر اوقات واکنش دهنده ایمنی به صورت کووالان به آنها متصل می‌گردند.

1-25- استفاده از پلاستیک به عنوان فاز جامد

1-25-1- جذب غیر کووالان پروتئین بر سطوح پلاستیک

بافرها بر روی جذب پروتئین به سطوح پلاستیکی توسط اتصالات غیر کووالان تاثیر کمتری دارند. برخی از روشهای اتصال که بر اساس تماس هر چه بیشتر ناحیه های هیدروفوبیک پروتئین طراحی شده است،بر روی نتیجه نهایی آزمایش تاثیر بهتری داشته و سه تا از مهمترین متغیرها برای جذب پروتئین به سطوح جامد شامل حرارت،زمان و غلظت آن می‌باشد. با توجه به تحقیقات انجام شده نمی بایستی از دترجنت های غیر یونی (مانند Triton X100) به علت تداخل شدید و رقابت با پروتئین برای اتصال به فاز جامد و هم چنین جلوگیری از تشکیل تداخلات هیدروفوبیک در طی پوشاندن آنتی بادی بر سطوح جامد استفاده کرد. در برخی از موارد اگر کوت شونده تحت یکسری شرایط نسبی دناتوره قرار گیرند میزان سنجش آنزیمی آنها افزایش پیدا کرده و نتیجه حاصل از آزمایش مطلوب تر می‌باشد. بطور مثال اگر آنتی بادی در pH برابر ۲/۵ یا تحت تاثیر اوره و حرارت قبل از مرحله کوتینگ قرار گیرد به علت افزایش در هیدروفوبیسیته پروتئین میزان کوتینگ افزایش می یابد که علت آن را می‌توان چنین بیان کرد که ناحیه Fab نسبت به عوامل دناتوره کننده مقاومتر از ناحیه Fc گشته که موجب جذب بیشتر آن به سطوح جامد می‌گردد. بطور کلی تحقیقات نشان می دهد که مولکول Fab حاصل ازهضم آنزیمی آنتی بادی نسبت به فاز محلول تمایل بیشتری تا فاز جامد دارد.

علیرغم کاربرد گسترده اتصال غیر کووالان پروتئین به سطوح پلاستیک طرز عمل آن بدرستی شناخته شده نیست. جذب پروتئین به سطوح پلاستیکی تحت یکسری تداخلات هیدروفوبیک بوده و به بار خالص پروتئین ارتباط ندارد. اگرچه اتصال برای هر پروتئین به خصوصیات ویژه آن بستگی دارد،ولی بر طبق نتایج بدست آمده میزان جذب پروتئین به سطوح پلی استیرن هیچگونه ارتباطی به pH_i و وزن مولکولی ندارد.

1-25-2- اتصال کووالانپروتئین بر سطوح پلاستیکی

یک روش ساده برای اتصال بیشتر واکنش دهنده های ایمنی دارای گروه آمینی آزاد،فعال کردن سطوح توسط گلوتارآلدیید است. سطوح پلی استیرن در یک pH نسبتا پایین که گلوتارآلدیید تمایل زیادی به تشکیل پلیمر ندارد،فعال گشته است و بعد از افزودن آنتی بادی،pH به۸ یا ۹/۵ افزایش پیدا می‌کند. هر دو معرف گلوتارآلدیید و اتیل کلرفرمات به تنهایی بدین منظور استفاده می‌گردند. اما در صورت استفاده این دو ترکیب با هم نتیجه بهتری حاصل می‌گردد. مکانیزم عمل اتیل کلر فرمات بخوبی شناخته شده نیست اما ممکن است باعث جذب واکنش دهنده ایمنی با قطبیت کمتر و افزایش تداخلات هیدروفوبیک گردد.

پلیت هایی که بدین صورت فعال می‌شوند حداقل چهار هفته پایداری خود را حفظ می‌کنند.مشاهده شده است که اثر گلوتارآلدیید بر آنتی بادی پیش از مرحله کوتینگ نیز موجب افزایش اتصال و کاهش جدا سازی آنتی بادی از سطوح پلیمری گشته و میزان سنجش آنزیمی آن را افزایش می دهد،این اثر بویژه در مورد پلیت هایی است که تحت تاثیر اشعه توسط کارخانه سازنده قرار نگرفته باشند.

یک روش دیگر اتصال کووالان آنتی بادی به سطوح پلیمری تحت تاثیر اشعه UV قراردادن پلیت های پلی استیرن می‌باشد. گزارش شده است که اشعه UV موجب القاء تشکیل گروه های فعال بوسیله مکانیسمی شبیه واکنش های اکسیداسیون در سطوح پلی استیرن می‌گردد که بدین ترتیب موجب اتصال کووالان آنتی بادی به گروه های فعال ایجاد شده می‌شود(95، 96).

رزین های پلی استیرن با تغییرات شیمیایی خاص نیز به صورت تجاری ارائه شده است،مشتقات رزین های پلی استیرن ممکن است شامل گروه های هیدرازید،الکل آمین و ...باشند که پروتئین ها به صورت کووالان به رزین های فوق متصل می‌شوند.

روش کربودی‌ایمید و گلوتارآلدیید نسبتا ساده است و برای تهیه تعداد زیادی از پلیت های پوشیده شده با آنتی بادی یا آنتی ژن به منظور استفاده در آزمایشگاه های تحقیقاتی و بالینی مناسب می‌باشد. در این روش میزان جذب برابر آنتی بادی در واحد سطح نسبت به جذب غیرکووالان به سطوح نایلونی حدوداسی برابر می‌باشد.

1-25-3- اتصال آنتی بادی با آنتی ژن بر سطوح پلا ستیکی توسط پل زدن بوسیله مولکول ها

آنتی بادی یا آنتی ژن توسط مولکول هایی که نقش یک پل اتصالی را ایفا می‌کنند به سطوح پلاستیک متصل می‌شوند،به طور مثال BSA پروتئینی است که با میل اتصالی زیاد برای سطوح پلاستیکی می‌تواند به واسطه روشهای شیمیایی خاص (روش کربودی ایمید) با آنتی بادی مزدوج گردد.کاربرد اینگونه روش ها زمانی است که تهیه و تخلیص آنتی بادی یا آنتی ژن مورد استفاده پر هزینه باشد.در نتیجه ابتدا سطوح پلاستیکی را با یک پروتئین بی اثر که میل ترکیبی زیادی نیز با پلیمر دارد،می‌پوشانند (مانند BSA) و بعد با استفاده از ترکیبات دو عاملی مانند کربودی ایمید موجب اتصال کووالان BSA به آنتی بادی یا آنتی ژن مورد استفاده می‌گردند،که به واسطه این عمل از اتلاف آنتی ژن یا آنتی بادی جلوگیری می‌شود(95).

1-26- استفاده از غشاء نیتروسلولز و کاغذ به عنوان فاز جامد

غشاء های نیتروسلولزی پوشیده شده با آنتی بادی یا آنتی ژن به عنوان وسایلی برای تشخیص در آزمایشگاه های تحقیقاتی و بالینی استفاده می‌گردند. اینگونه غشاء ها یک روش سنجش انتخابی برای تعدادی از آزمایشات می‌باشد زیرا تنها مقدار ناچیزی از نمونه برای انجام آزمایش لازم می‌باشد که این خود یک مزیت است که بطور مثال برای ارزیابی حجم های خروجی از ستون،برای غربالگری کلون های هیبریدوما و برای ارزیابی آنالیت های موجود در نمونه های بیولوژیک به صورت کیفی (به طور مثال یک روش تشخیصی کیفی حاملگی استفاده از اینگونه غشاءها است) ونیمه کَمّی استفاده می‌گردند(95).

1-27- استفاده از شیشه به عنوان فاز جامد

آنتی بادی یا آنتی ژن ممکن است بر روی سطوح شیشه ای بوسیله گرما یا عوامل فیکساتیو مانند فرمالدیید یا توسط گلوتارآلدیید به میله های شیشه ایی دارای گروه امینوالکیل زایلیل تثبیت گردد.

شیشه های با خِلل و فُرج کنترل شده نیز بدین منظور استفاده می‌شوند.این‌گونه شیشه ها موجب افزایش سطح در مقایسه انواع بدون خلل و فرج می‌گردند،اما یکی از معایب آن افزایش اتصالات غیر ویژه در تعدادی از آزمایشاتمی‌باشد.

1-28- فازهای جامد ذره ای

فازهای جامد ذره ای برای اولین بار برای جداسازی کمپلکس انتی ژن/ آنتی بادی نشاندار از آنتی بادیآزاد نشاندار در سنجش ایمونومتریک استفاده شده است. انواع فازهای جامد ذره ای مورد استفاده در آزمایشگاه های تحقیقاتی و بالینی به شرح ذیل می باشند(97):

1-28-1- آگارز،سلولز و سفاکریل

اتصال واکنش دهنده ایمنی به سفارز 4B،آگارز،سفاکریل S1000 و ذرات سلولز فعال شده به واسطه ترکیبات شیمیایی مانند برمید سیانوژن،پرایودات سدیم و کلرید ۳-۱ نیتروبنزیل اوکسی متیل پیریدینیوم[1] انجام می‌گیرد.

علاوه بر این سفاکریل S1000 نیز جزء فازهای جامدی است که به علت داشتن خلل و فرج زیاد برای کمپلکس های بزرگتر مناسب است. بطور کلی اینگونه فازهای جامد به طور روتین در آزمایشگاه های بالینی کاربرد ندارند ولی در یکسری از تحقیقات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

[1] 1(3- Nitrobenzyloxymethyl) Pyridinium Chloride

1-28-2- ذرات لاتکس (ذرات آلی)

ذرات لاتکس کروی و از جنس پلی استیرن می‌باشند که با آنتی بادی یا آنتی ژن پوشیده شده‌اند. این ذرات کاربرد وسیعی در گسترش یکسری تست های تشخیصی ایمونولوژیکی دارند.

ذرات لاتکس پوشیده شده با آنتی بادیمی‌توانند به منظور تشخیص و تعیین حضور آنتی ژن اختصاصی در یک نمونه بیولوژیک استفاده گردند. علاوه بر این ذرات لاتکس پوشیده شده با آنتی ژن می‌تواند به منظور تشخیص حضور آنتی بادی در نمونه های بیولوژیک مورد استفاده قرار گیرد. به عنوان مثال به منظور تشخیص فاکتور روماتویید از ذرات لاتکس استفاده می‌شود که در این روش آنتی ژنی که به کار می برند IgG طبیعی انسان می‌باشد که به ذرات پلی استیرن لاتکس با پیوند یونی متصل می‌گردد. همچنین در آزمایش لاتکس CRP،آنتی بادی به صورت کووالان به منظور تعیین و تشخیص حضور CRP در مایعات بدن به این ذرات متصل می‌شود.

تست های لاتکس ایمونواسی جزء تست های کِیفی بوده اما بوسیله رقیق کردن سریالی آنتی ژن و آنتی بادی موجود در نمونه به صورت نیمه کمّی نیز می‌تواند استفاده گردد. آنتی بادی و آنتی ژن به صورت کووالان به این ذرات متصل می‌گردند(98).

1-28-3- ذرات معدنی

از ذرات معدنی هم به عنوان سطح جامد و هم به عنوان نشان استفاده می‌شود که با استفاده از آنها سنجش های ایمنی طراحی می‌گردد. این نوع سنجش ایمنی ذرات کلویید نیز نامیدهمی‌شود. در این نوع سنجش ها از آنتی بادی یا آنتی ژن فیکس شده بر روی ذرات کلویید معدنی بعنوان نشان استفاده می‌شود. ذرات کلوئید طلا و نقره از جمله فلزات استفاده شده در این روش می باشند. ذرات طلا با قطرهای مختلف بدین منظور استفاده می‌گردد، مزایای این روش عبارتند از:

- در اثر اتصال آنتی بادی یا آنتی ژن به ذرات کلوئید رنگ قرمز آن تغییر نمی‌کند.

- با تجمع ذرات، جذب در طول موج ٥٤٠ نانومتر کاهش یافته و رنگ آن تغییر می‌کند.

- ایمونواسی ذرات کلوئید طلا به دو روش هموژن و هتروژن انجام می‌شود(99).

1-29- تست های سریع[1]

لزوم سرعت در تشخیص، مطرح شدن اتوماسیون،گسترش سیستم های اطلاعاتی و کوتاه کردن روش ها درآزمایشگاه های تشخیص طبی و لزوم کاهش هزینه ها موجب گسترش روشهای سریع شدند.

با پیشرفتهایی که در زمینه ساده تر کردن وسایل و روش ها ایجاد شده است،تستها را می‌توان در محل های اورژانس و حتی توسط فرد در منزل بکار برد.

تکنیک های ایمونواسی مثل رادیو ایمونواسی،الایزا و... به دلیل دقت و حساسیت روش ها برتر می باشند،اما به دلیل نیاز به وسایل و صرف زمان و هزینه های زیاد برای تشخیص آنالیت ها در مراکز کوچک و در مراکز با امکانات کم امکان پذیر نمی‌باشند. لذا امروزه وارد مرحله ای شده‌ایم که تست

[1]- Rapid Tests

های سریع با دقت و حساسیت طراحی و جایگزین روش هایی شود که نیاز به امکانات و وسایل پیچیده دارند(95).

1-29-1- تست های کَمّی و نیمه کَمّی

تستهای سریع حساسیتی شبیه یا حتی بیشتر از کیت های الایزا دارند و برای بسیاری از آنالیت ها ،تشخیص در حد یک نانوگرم در میلی لیتر یا کمتر صورت گرفته است. در این تست ها بطور چشمی می‌توان حضور یا عدم حضور آنالیت را تشخیص داد.

1-29-2- مزایای تست های سریع

- نتایج به سرعت قابل ارزیابی می‌باشند.
- برای اشخاصی که دارای تخصص نمی‌باشند نیز قابل استفاده می‌باشند.
- وزن آنها کم،حجمشان کوچک و با دوام هستند.
- هیچ وسیله و نیروی الکتریکی مورد نیاز نمی‌باشند.
-در یک تست می‌توان چند آنالیت را اندازه گرفت.
- در استفاده از آنها ایمنی کامل وجود دارد و به راحتی قابل عرضه هستند.
- هیچ وسیله آزمایشگاهی نیاز ندارند.
- روش کار خاصی لازم نیست.
- نتایج بدون تغییر برای مدت طولانی باقی می‌ماند (در مورد ایمونوکروماتوگرافی نتایج به طور دایم روی کاغذ باقی می‌مانند).
- حجم نمونه لازم کم می‌باشد.

– انواع نمونه ها شامل خون کامل،سرم،ادرار،بزاق،آب و... قابل استفاده هستند.

– شرایط نگهداری خاصی نیاز نمی‌باشد.

– در تست های سریع کنترلی قرار داده می‌شود تا در هر بار آزمایش از درست کار کردن سیستم اطمینان حاصل شود.

– در تولید زیاد قیمت ساخت ارزان خواهد بود.

– قابل اعتماد است(95).

1-29-3- کاربرد تستهای سریع

– تشخیص آلرژنها،شاخص های قلبی،بیماری های دژنراتیو،داروها،باروری،پزشکیقانونی،ایمونوتایپینگ[1]، بیماری های منتقله از راه تماس جنسی، شاخص های استرس،توکسیکولوژی،تومور مارکرها،عوامل عفونی،هورمون ها،بیماری های متابولیک و بیوتروریسم از جمله موارد کاربرد تست های سریع در زمینه بالینی می باشد (41-34).

– موارد مربوط به صنایع غذایی و سلامت مواد غذایی[2]،بیماری های گیاهان و غلات در راستای کاربرد اینگونه تست ها در کشاورزی مطرح است(100-102).

– کاربرد در دامپزشکیمشابه موارد بالینی در خصوص انسان می‌باشد(103).

– کاربرد در مطالعات محیط زیست شامل تشخیص آلودگی بیولوژیک و آلودگی محیط زیست می شود(104، 105).

1Immunotyping
2 Food Saftey

در سنجشهای سریع به وسایل مخصوص و معرف های[1] متعدد نیاز نمی‌باشد و اغلب اساس عمومی این تستها بر اگلوتیناسیون ذرات،ایمونوکروماتوگرافی غشایی نقطه ای[2] و ایمونوکروماتوگرافی غشایی طولی[3]صورت می‌گیرد(106، 107).

1-29-4-کلوییدطلا به عنوان نشانگر و تست های سریع

بعد از بکار گیری میکروسکوپ الکترونی مطالعه فرآیند هسته دار شدن[4] و رشد ذرات طلا امکان پذیر شد. قانون رشد ذرات به صورت توانی می‌باشد.

اندازه ذرات طلا از قدرت تفکیک[5] میکروسکوپ نوری پایین تر می‌باشد،لذا برای مشاهده و اندازه گیری این ذرات از میکروسکوپ الکترونی استفاده می‌شود.

ماهیت محصولات کلوییدی تشکیل شده به میزان زیادی به شرایط و مواد استفاده شده بستگی دارد. شکل ذرات،اندازه ذرات،و ماهیت منحنی توزیع ذرات بستگی به سرعت نسبی دو مرحله مجزا هسته دار شدن و رشد دارد(108).

هسته دار شدن: یک ذره مجزا در حلال تشکیل می‌شود.

رشد: مرحله ای است که بر روی ذره تشکیل شده در فاز قبلی صورت می‌گیرد. در این مرحله مواد اضافی بر روی ذره رسوب می کند و اندازه ذرات افزایش می یابد(109).

مرحله هسته دار شدن در تشکیل کلوییدطلا مرحله ای زود گذر است. بسیاری از خواص کلوییدی سوسپانسیون به اندازه ذرات بستگی دارد.

1 Reagents
2 Flow Through
3Lateral Flow
4 Nucleation
5 Resolution

طی سالهای اخیر استفاده از کلویید طلا بسیار رایج گشته است. در سنتز کلویید طلا بدست آوردن کلوییدی با دانه های مجزا از هم و ذراتی با قطر کنترل شده و یک دست مهم می‌باشد. در این روش ها $HAuCl_4$ احیا شده وبه شکل اتم طلا در می آید و به طور کلی از یک احیاء کننده به عنوان دهنده الکترون به یون های طلا که دارای بار مثبت در محلول طلا می باشند،استفاده می‌شود(110). فرمول ذیل واکنش را نشان می دهد:

Gold tetracholoric acid + Reducer → Gold colloid

$$HAuCl_4 + e^- \longrightarrow Au^0$$

از مزایای کلوئید طلا این است که در صورتی که شرایط لازم برای جذب ماکرومولکول به ذره طلا تعیین گردد (مثل غلظت و pH)، این ذرات پایداری لازم را نشان می‌دهند.

استفاده از کلوئید طلا با توجه به قابلیت تکرار پذیری تهیه آن بر نشانگرهایی مثل گلبول قرمز و لاتکس ارجحیت دارد.

ذرات لاتکس در محدوده ای از pH بین ۵ تا ۸ پایدار می باشند و این در حالی است که ذرات طلا در محدوده ای وسیع از pH بین ٤ تا ۱۰ پایدار می‌باشند، به علاوه آگلوتیناسیون غیر اختصاصی و خودبخودی که در ذرات لاتکس مشاهده می‌شود در کلوئید طلا دیده نمی‌شود. از مزایای نشانگر کلوئید طلا بر گلبول قرمز تانن دار شده (Tanned RBC) این است که گلبول قرمز نشاندار شده به مقادیر pH کمتر از ٤/۳ و بیشتر از ۷/۲ حساس می‌باشد و با توجه به این محدودیت pH ، برای اتصال به ایمونوگلوبولین ها کارایی ندارد (pH ایزوالکتریک اغلب ایمونوگلوبولین ها بیشتر از ۷ می‌باشد) و پدیده پروزون[۲۱] در این ها زیاد مشاهده می‌شود و با توجه به عملکرد ذرات طلا در محدوده گسترده ای از pH از آنهامی‌توان برای اتصال به انواع ماکرومولکول ها از جمله آنتی بادی ها استفاده نمود(111).

برای تشخیص آنالیت ها روش‌های آگلوتیناسیون ذرات طلا نیز به کار رفته است. آگلوتیناسیون ذرات طلا با آگلوتیناسیون سایر ذرات (لاتکس و...) تفاوت دارد چون در اینجا وجود آنتی ژن با تغییر رنگ

[1] Prozone

مشخص می‌شود، واکنش یک مرحله ای است و نتایج مثبت به راحتی از نتایج منفی بطور چشمی قابل تشخیص می‌باشد(112).

ذرات طلا که با آنتی بادی پوشیده شده‌اند دارای رنگ قرمز می‌باشد و جذب ماکزیمم آنها در طول موج ۵۴۰-۵۲۰ نانومتر می‌باشد و در حضور آنالیت مورد نظر، ذرات آگلوتینه شده و رنگ آنها تغییر کرده و به رنگ بنفش در می آید و جذب آنها کاهش می‌یابد، البته نتایج از طریق چشم نیز قابل مشاهده می‌باشد .بر اساس آگلوتیناسیون ذرات طلا می‌توان آنالیت هایی از جنس پروتئین را مورد بررسی قرار داد.

هاپتن‌ها مثل استروئیدها و خیلی از داروها از لحاظ ایمونوشیمی منووالانت می‌باشند و از طریق آگلوتیناسیون مستقیم مشخص نمی‌شوند اما با جفت کردن مولکول هاپتن ها به حامل هایی مثل آلبومین سرم گاو (BSA) کمپلکس هاپتن-مولتی والانت به دست می آید که می‌تواند شبیه آنتی ژن بیووالانت یا مولتی والانت ،ذرات طلا پوشیده شده با آنتی بادی را آگلوتینه نماید(113).

آگلوتیناسیون ذرات طلا پوشیده شده با آنتی بادی آنتی مانان توسط مانان[1] در سال ۱۹۷۶ توسط هوریس برگر و راست انجام شد(114).آگلوتیناسیون ذرات طلا پوشیده شده با آنتی بادی علیه هورمون گونادوتروپین جفت انسان (HCG) توسط لورینگ[2]و همکاران در سال ۱۹۸۰ طراحی شد(115).

جستجوی خون در مدفوع با آگلوتیناسیون ذرات طلا پوشیده شده با آنتی بادی منوکلونال علیه هموگلوبین انسان در صورت وجود هموگلوبین انجام شد و حساسیت این تست ۰/۵ نانوگرم بر میلی لیترمی‌باشد و بر تست گایاک (تست روتین برای جستجوی خون در مدفوع می‌باشد و عواملی از جمله رژیم غذایی در این تست دخالت دارند) ارجحیت دارد چون در تست گایاک موادی مثل اسیداسکوربیک موجود در مدفوع اثر می‌گذارند، در حالی که با این روش نتایج خوبی حاصل می‌شود(112). همچنین آزمایش آگلوتیناسیون با ذرات طلا پوشیده شده با آنتی بادی و آنتی ژن روبلا[3] انجام شد (۱۰۱).

[1] Mannam
[2]Leuvering
[3] Rubella antigen

قطر مناسب برای ذرات طلا عموما ٤٠ نانومتر می‌باشد و در ذرات طلا با قطر بیش از ٧٥ نانومتر اتوآگلوتیناسیون خودبخودی رخ می دهد (١٠٢).

از نیمه ١٩٨٠ به جای استفاده از کونژوگه لاتکس که در آن زمان معمول بود در تست های سریع به جهت پایداری از کونژوگه طلا بیشتر استفاده شد و از اواخر ١٩٨٠ تشخیص اغلب آنالیت ها براساس ایمونوکروماتوگرافی طراحی شده است. تست ایمونوکروماتوگرافی، قابل اعتماد است و در زمان کوتاهی و به راحتی و بدون خطا و اشتباه توسط پرسنل غیرفنی تفسیر می‌گردد.

1-30-چگونگی تشکیل کلوئید طلا و ماهیت آن

سنتز کلوئید طلا بر اساس احیاء $HAuCl_4$ به اتم های طلا می‌باشد. در این روش از یک احیا کننده به عنوان دهنده الکترون به یونهای با بار مثبت طلا در محلول استفاده می‌شود که منجر به تشکیل اتم طلا می‌شود. در بیشتر موارد از سیترات سدیم به عنوان احیاء کننده استفاده می‌شود. قبل از اضافه کردن احیاء کننده،در محلول صد در صد یون طلا وجود دارد. شکل 1-12 رشد یون های طلا به اتم های طلا را با اضافه کردن احیاء کننده نشان می‌دهد. بلافاصله بعد از اضافه کردن احیاء کننده افزایش سریعی در اتم های طلا در محلول به وجود می آید تا به سطح فوق اشباع برسد،سپس تجمع[1] رخ می‌دهد. آنگاه در مرحله ای که هسته دار شدن نام دارد،هسته بیست وجهی مرکزی (ایکوزاهیدرال) از یازده اتم در محل های هسته دار شدن تشکیل می‌شود،این مرحله فوق العاده سریع رخ می دهد و به محض تشکیل،اتمهای طلای باقیمانده در محلول تحت گرادیانت کاهش انرژی به سایت های هسته دار متصل می‌شوند و بدین ترتیب همه اتم ها از محلول برداشت می‌شوند. تعداد هسته تشکیل شده در ابتدا تعیین کننده می‌باشد که چه تعداد ذره در محلول رشد نماید و تعداد هسته به میزان احیاء کننده اضافه شده بستگی دارد. مقدار زیاد احیاء کننده سایت های هسته ای زیاد ایجاد می نماید و بدین ترتیب تعداد زیادی ذره ایجاد می‌شود. لذا اندازه ذرات به میزان احیاء کننده اضافه شده بستگی دارد (١٠٣).

[1] Aggregation

1-30-1-ماهیت ذره طلا

کلوییید طلا شامل سوسپانسیونی از ذرات طلا است که توسط لایه ای با بار منفی ناشی از یون های منفی محلول پوشیده شده‌اند،این لایه پتانسیل زتا[1] نام دارد که وسیله ای برای دفع ذرات طلا از یک دیگر می باشند تا بتوانند برای مدت طولانی در سوسپانسیون محلول باقی بمانند.

ذرات طلا دارای اندازه یک نانومتر رنگ نداشته و دیده نمی‌شوند. اما در ذرات بالا،مساله ممانعت فضایی مطرح است و برای مثال ایمونوگلوبولین G که ۸ نانومتر طول دارد و فقط ٤ نانو متر آن به سطح ذره طلا متصل می‌شود و در ذراتی که اندازه آنها ۱۰۰ نانومتر می‌باشد ملاحظه می‌کنیم که نسبت سطح به حجم کاهش یافته و بنابراین عدم پوشش کامل این ذرات توسط پروتئین ها موجب تجمع دانه های طلا شده و ناپایداری آنها را موجب می‌شود (۱۰۳).

1-30-2-اتصال کونژوگه آنتی بادی- کلوییید طلا و مکانیسم جذب پروتئین به طلا

اتصال پروتئین به ذرات طلا شبیه اتصال به ذرات لاتکس می‌باشد و به طور پاسیو یا غیر فعال پروتئین سطح ذرات جذب می‌شود و جذب کووالانتی رخ نمی دهد. هورمون ها،داروها و مولکولهای کوچک که کمتر از ۱۰ کیلو دالتون وزن آنهامی‌باشد،ابتدا به یک پروتئین حامل دیگر مثل سرم آلبومین گاوی متصل می‌شوند و بعد اتصال غیر فعالی بین ذرات طلا و پروتئین انجام می‌گیرد. پروتئین حامل باید مولکولی خنثی باشد و بر فعالیت مولکول اتصالی کوچک اثر نگذارد. در بعضی موارد ممانعت فضایی از آشکار شدن مولکول کوچک جلوگیری می کند.

آنتی بادی از ناحیه ثابت (FC)[2] به طور محکم به ذره طلا متصل می‌شود،ناحیه متغیر (Fab)[3] از طریق لایه یونی دو گانه که ذره طلا را احاطه نموده است،ذره طلا را قادر می‌سازد تا به آنالیت متصل شود.آنتی بادیآزاد نباید وجود داشته باشد چون با آنتی بادی نشان دار رقابت می‌کند و منجربه نتایج

[1]Zeta
[2]Fragment Crystalization
[3] Fragment Antigen Binding

منفی کاذب در آزمایش هایی که از این کونژوگه استفاده می‌شود و نیز در دراز مدت پایداری کونژوگه طلا را تحت تاثیر قرار می دهد.

اتصال اپتیمم پروتئین به ذرات طلا در نزدیکی نقطه pH ایزوالکتریک رخ می دهد (۱۰۲-۱۰٤). ذرات طلا بار منفی دارند چون لایه ای از یون های منفی احیاء کننده ای که نمک طلا را به کلوئید طلا تبدیل می‌کنند در سطح آنها قرار دارد و این بار منفی پروتئین های باردار مثبت را جذب خواهد کرد. نواحی که در پروتئین غنی از لیزین یا آرژنین است شارژ مثبت قوی دارد و در pH کمتر از pH_i لیزین (10/٤ pH_i) و آرژنین (pH_i۱۲/٥) به طور قوی به سطح طلا متصل می‌شوند. هنگامی که پروتئین به قدر کافی به ذره طلا نزدیک شد (تقریبا یک نانومتر) نواحی هیدروفوبیک پروتئین با نواحی هیدروفوبیک سطح طلا در تماس می باشند. هر پروتئین غنی از اسیدهای آمینه غیر قطبی[1]مثل تریپتوفان،لوسین،ایزولوسین یا فنیل آلانین به طور قوی به سطح طلا باند می‌شوند.اتصالات داتیو[2]،اتصالات قوی می باشند،پروتئین هایی که حاوی تعداد زیاد اسیدآمینه سولفوردار (مثل سیستئین و متیونین) باشند به طور قوی به سطح ذره طلا متصل می‌شوند و این به علت جذب بین اتم های طلا و اتم های سولفور می‌باشد (۹٤).

1-30-3- مکانیسم جذب کونژوگه طلا- پروتئین و شرایط پایداری

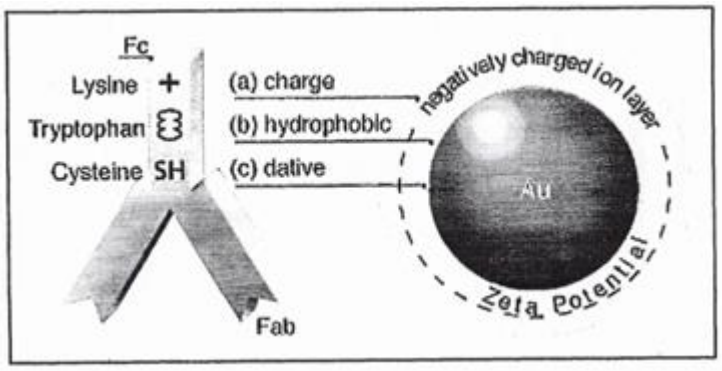
بطور کلی می‌توان گفت مکانیسم های جذب پروتئین به طلا عبارتند از:

- واکنش بین ذرات طلا با بار منفی با اسیدهای آمینه با بار مثبت پروتئین مثل لیزین و آرژنین
- جذب هیدروفوبیک پروتئین به سطح ذرات از طریق اسیدهای آمینه مشخص مثل تریپتوفان
- اتصالات داتیو بین اسیدهای آمینه سولفوردار پروتئین و ذرات طلا(شکل٤-۲)

[1]Apolar
[2]Dative

پایداری: کونژوگه طلا ـ پروتئین را باید بلوکه کرد تا از واکنش غیر اختصاصی سایت ها در سطح ذرات طلا جلوگیری بعمل آید و از طرفی به پایداری آن نیز کمک شود،آلبومین سرم گاوی،ژلاتین،و کازئین برای پایداری و بلوکه کردن استفاده می‌شوند. جهت ذخیره سازی نهایی، بافر با غلظت نمکی بالا و دارای سورفکتانت باید بکار رود،چون سبب آسیب یا هیدرولیز آنتی بادیمی‌شود.

نگهدارنده: نگهدارنده حاوی سولفور یا جیوه سبب کلاپس[1]شدن کونژوگه می‌گردد و بهترین نگهدارنده برای کونژوگه طلا سدیم آزید ۰/۱ ٪می‌باشد.خشک کردن کونژوگه در فاز جامد به طور صحیح کونژوگه را برای سالها پایدار نگاه می دارد (۹٤,۱۰۳).



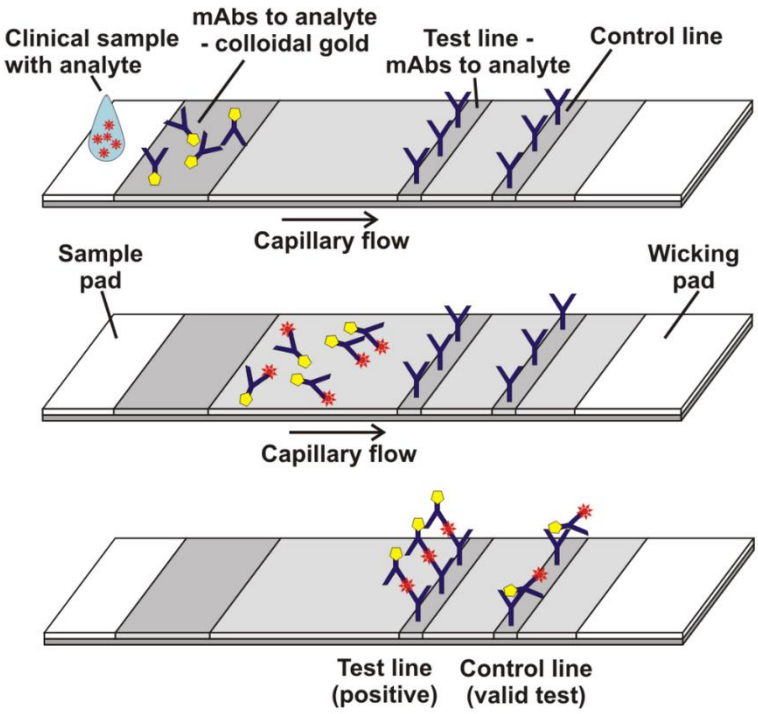
شکل 1-12- مکانیسم اتصال پروتئین به ذرات کلوییدی طلا

1-31- تست های ایمونوکروماتوگرافی

ایمونوکروماتوگرافی تستی بر اساس آنتی بادیمی‌باشد و امروزه اغلب آنتی بادی نشاندار شده با کلوئید طلا بکار می‌رود. طبق خاصیت مویینگی در غشاء حرکت نموده و متعاقب این حرکت جدا سازی ترکیبات و شناسایی آنها صورت می‌گیرد.اساس تست های ایمنوکروماتوگرافی بر تشکیل دو خط و نیز گاها یک خط (تست مستقیم و یا غیر مستقیم) بعنوان تشخیص استوار گردیده است.خط کنترل که

[1]Collapse

معمولا یک آنتی بادی کوت شده است که صرفا با آنتی بادی کونژوگه(عموما با نانوذره طلا) واکنش می دهد و سبب تشکیل خط می‌گردد.خط بعدی خط تشخیص تست(خط T) است. در این خط یک آنتی بادی و گاها یک آنتی ژن کوت شده است که با آنالیت موجود در مایعات بدن(عموما سرم و ادرار)واکنش داده و سپس آشکار ساز(عموما آنتی بادی کونژوگه با نانوذره طلا) سبب ظهور خط می گردد(شکل 1-13).



شکل 1-13- اساس تست های ایمنوکروماتوگرافی(LFIA[1])

در ایمونوکروماتوگرافی لازم است حساسیت روش[2]،اختصاصی بودن[3]، زمان لازم برای واکنش،سیستم ردیاب بکار برده شده (مثل لاتکس،فلزات کلوییدی،آنزیم و...) مشخص شده باشد. خط تست، خط کنترل، آنتی بادی ها، مواد آشکارگر، وسایل ساخت، انتخاب پدهای جاذب انتخاب غشاء (ترکیب پلیمری،خروجی،ضخامت غشاء،زمینه و درجنت های بکار برده شده برای غشاء) در طراحی ایمونوکروماتوگرافی هر آنالیت بسیار مهم می‌باشد.

[1]Latral Flow Immunochromatography Assay
[2] Sensitivity
[3] Specificity

طی سالهای اخیر، بسیاری از تستهای تشخیصی که بطور تجارتی ساخته شده‌اند بر اساس ایمونوکروماتوگرافی طراحی شده‌اند.اولین آنالیتی که طراحی تست ایمونوکروماتوگرافی برای آن انجام گرفت هورمون گونادوتروپین جفت انسانی[1] بود که از این هورمون برای تشخیص حاملگی استفاده می‌نمایند. برای تست حاملگی از نمونه ادار یا پلاسما استفاده می‌شود و از کونژوگه لاتکس,سلنیوم یا طلا به عنوان ردیاب استفاده می‌شود.

1-31-1- ویژگی های ایمونوکروماتوگرافی

قبل از ساخت استریپ باید به پارامترهای کلیدی تست توجه داشت مثل: محدوده تشخیص[2] (حساسیت)،ویژگی[3]، سرعت آزمایش،الگو وسیستم تشخیص،شکلخط تست،نحوه تفسیر نتایج،ماتریکس نمونه،طرح قالب (در صورت لزوم)،بسته بندی و قیمت گذاری (در صورت لزوم)(95).

1-31-1-1-آنتی بادی

آنتی بادی‌هایی که در تست های ایمونوکروماتوگرافی بکار می‌روند باید به اندازه کافی حساسیت و ویژگی،خلوص و پایداری داشته باشند. بر حسب طراحی آزمایش،آنتی بادی ها می‌توانند به عنوان یکآنتی بادی تَـله[4] در خط تست بکار روند یا به عنوان کونژوگه روی آشکار کننده قرار بگیرند و یا هر دو. هنگامی که آنتی بادی جذب یک محیط جامد می‌شود،باید فعال بماند و پس از خشک شدن کامل نیز ساختار خود را حفظ کند و وقتی که با نمونه،مجددا هیدراته شود،فعال گردد. آنتی بادی های مورد استفاده می‌توانند پلی کلونال یا مونوکلونال باشند.

[1] Human Chorionic Gonadotrophin
[2]Detection Limit
[3] Specificity
[4] Capture Antibody

1-31-1-2-معرف های آشکار کننده

برای رویت یک سیگنال می‌توان از معرف های آشکار ساز مختلفی استفاده کرد. رایج ترین موادی که در تست های تجاری موجود بکار می‌روند، دانه های لاتکس و ذرات کلوئید طلا هستند. درعین حال می‌توان از آنزیم، کونژوگه ها، سایر کلوئیدهای فلزی، رنگ ها، ذرات فلورسنت وذرات مغناطیسی استفاده کرد. یکی از خصوصیات مهم ذرات این است که تفرق نور در آنها یکسویه است و شکل آنها همواره کروی است. در هنگام انجام آزمایش، ذرات باید از ساختمان پیچ در پیچ منافذ غشاء عبور کنند. ذرات کوچکتر سریعتر از ذرات بزرگتر حرکت می‌کنند. استفاده از ذرات با اندازه و شکل مختلف ممکن است ایجاد حساسیت و ویژگی متفاوتی نمایند، حتی اگر سایر اجزاء یکسان باشند.

1-31-1-3-خصوصیات غشاء

غشاء یکی از مهمترین اجزاء استریپ تست های با حرکت جانبی[1] است. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی غشاء، خصوصیات حرکت موئینه آن را تحت تاثیر قرار می دهد. خصوصیات حرکت موئینه نیز به نوبه خود بر رسوب مواد، حساسیت آزمایش، ویژگی آزمایش و ثبات خط تست تاثیر می‌گذارد.

1-31-1-3-1- ترکیب پلیمر و اتصال پروتئین

برای نوار تست‌های با حرکت جانبی، غشاء باید بطور غیر قابل برگشت، در خط های تست و کنترل به معرف های گیرنده، متصل شود. پلیمری که غشاء از آن ساخته شده است، خصوصیات اتصالی آن را تعیین می کند. انواع پلیمر و خصوصیات اتصالی آنها در جدول (1-4) آمده است.

[1] Lateral Flow Test Strip(LFTS)

جدول 1-4- پلیمرهای مختلف و انواع اتصالات آنها

پلی‌مر غشاء	مکانیسم اتصال اولیه
نیتروسلولز	الکتروستاتیک
فلوراید پلی وینیلیدین	هیدروفوبیک
نایلون (تغییر بار یافته)	الکتروستاتیک (یونی)
پلی اتر سولفون	هیدروفوبیک

میزان اتصال پروتئین به غشاء به مساحتی از پلیمر که برای غیر متحرک سازی[1] است، بستگی دارد. مساحت غشاء بوسیله اندازه منفذ[2] ، پوروسیتی[3] (میزان هوا در ساختمان سه بعدی)، ضخامت و به میزان کمتر خصوصیات ساختمانی انحصاری پلیمر تعیین می‌شود.

مساحت غشاء به صورت غیر خطی با اندازه منفذها کاهش و به صورت خطی با ضخامت و به صورت غیر خطی با پوروسیتی افزایش می یابد.

غشاء نیتروسلولز بوسیله واکنش الکتروستاتیک، دو قطبی قوی، استر نیترات با دو قطبی قوی باند پپتیدی پروتئین به آن متصل می‌شود.غشاهای نیتروسلولزی بطور کامل خنثی بوده، فاقد پروتون اسیدی می باشند.

1-32-عوامل موثر درحرکت نمونه در تست های ایمنوکروماتوگرافی

1-32-1-سرعت جریان موئینه

سرعت جریان موئینه، سرعتی است که جلوی نمونه[1] در استریپ غشاء ، هنگامی که یک طرف آن درون مایع قرار می‌گیرد،به پیش می‌رود. اندازه گیری این مقدار بسیار دشوار است چرا که سرعت بطور

[1] Immobilization
[2] Pore Size
[3] Porosity

توانی کاهش می یابد. پارامتر آسان تر اندازه گیری زمان جریان موئینه می‌باشد و آن زمانی است که مایع لازم دارد تا استریپ را کامل طی کند. این مقدار را ثانیه برسانتی متر می نامند و بطور معکوس وابسته به سرعت جریان است. سرعت جریان یک غشاء به خصوصیات تجمع ساختمان خلل و فرج دار بستگی دارد.

شرکت میلی‌پور[۲] شش نوع غشاء مختلف تولید می کند که آنها را HF180، HF240، HF135، HF120،HF90 وHF75 نامگذاری کرده است و اعداد مربوطه بیانگر مدت زمانی بر حسب ثانیه است که جریان موئینه، چهار سانتی متر را طی می کند. در این صورت HF240 کمترین و HF75بیشترین سرعت جریان موئینه را داراست(95).

1-32-2-پد نمونه

پد نمونه به چند منظور بکار می‌رود که مهمترین آنها انتشار یکنواخت و کنترل شده نمونه به سوی پد کونژوگه می‌باشد. در عین حال سرعت ورود مایع به پد کونژوگه را کنترل می‌کند. پد نمونه وقتی با سایر اجزاء استریپ مثل پروتئین ها، دترجنت ها، افزایش دهنده های ویسکوزیته و نمک های بافر آغشته شوند می‌تواند :

- موجب افزایش ویسکوزیته نمونه شود (جریان را تنظیم می کند).

- توانایی نمونه[۳] را در حل کردن معرف آشکارساز[٤] افزایش دهد.

- مانع اتصال غیر اختصاصی کونژوگه و آنالیت به مواد پایین دست شود.

- ماهیت شیمیایی نمونه را طوری اصلاح می‌کند که، مستعد تشکیل کمپلکس ایمنی در خط تست شود.

دو نوع ماده وجود دارند که معمولا به عنوان پد نمونه بکار می‌روند: الیاف بافته شده و فیلترهای سلولز. الیاف بافته شده معمولا حجم نمونه را به خوبی و یکنواخت روی پد کونژوگه توزیع می‌کنند. آنها قدرت کشش خوبی دارند و به راحتی می‌توان با دست با آنها کار کرد حتی وقتی مرطوب هستند. الیاف

---

[1] Sample Front
[2]Milipore
[3] Sample
[4] Detector Reagent

حجم کوچکی از نمونه را (تقریبا ۱-۲میکرولیتربرسانتی متر مربع) نگاه می‌دارند. از طرف دیگر، نمی‌توانآن را به گونه ای تیمار کرد که وقتی ماده حل شونده روی آن قرار می‌گیرد، محتوای پروتئینی، pH، قدرت یونی یا ویسکوزیته نمونه را اصلاح کند.

فیلترهای سلولزی تقریبا خواصی عکس الیاف بافته شده دارند، ضخیم هستند (بیشتر از ۲۵۰ میکرومتر)، ضعیف و نسبتا ارزان می باشند. فیلترهای سلولزی حجم بیشتری از نمونه را نگاه می‌دارند (بیشتر از ۲۵ میکرولیتربرسانتی متر مربع)، به سختی قابل حمل هستند به خصوص اگر خیس باشند. فیلترهای سلولزی شایعترین ماده مورد مصرف در پد نمونه می‌باشد به خصوص اگر آزمایش مورد نظر برای ادرار طراحی شده باشد. فیلترهای سلولزی بخاطر حجم بستر[1] بزرگ آنها ارجح تر هستند چرا که می‌توانآنها را مملو از عوامل بلوکه کننده، معرف های آشکار سازو تغییر دهنده های pH و قدرت یونی نمود(106).

1-32-3-پد کونژوگه

مهمترین کاری که پد کونژوگه انجام می دهد انتقال یکنواخت معرف آشکارساز و نمونه بر روی غشاء می‌باشد. وقتی که جریان نمونه به پد کونژوگه می رسد، معرف شناساگر حل شده و مواد موجود روی این پد به همراه نمونه به غشاء می‌روند. پد کونژوگه ایده آل دارای خصوصیات زیر است:

- اتصال غیر اختصاصی پایین

- خصوصیات حرکتی یکنواخت و ثابت

- حجم بستر ثابت

مواد مُتخلخلی که معمولا برای پد کونژوگه استفاده می‌شود فیلترهای بافته نشده هستند که از فشرده کردن فیبرهای در هم تنیده شده سلولز، شیشه یا پلاستیک (مثل پلی استر، پلی پروپیلن یا پلی اتیلن) ساخته می‌شوند. آنها بر اساس اندازه فیبر، وزن پایه و استخراج پذیریشان تقسیم بندی می‌شوند.

[1]Bed Volume

اکثرا، قیمت اینها کمتر از غشاهاست. موادی که معمولا برای ساخت پد کونژوگه بکار می‌روند فیلترهای فیبر شیشه و فیلترهای سلولز می باشند(106).

1-32-4-پد جاذب

پد جاذب[1] در انتهای استریپ قرار می‌گیرد. وظیفه اولیه پد جاذب افزایش ورود حجم نمونه به استریپ می‌باشد. این افزایش حجم می‌تواند در شستن ذرات آشکارساز غیر متصل از خط های تست و کنترل و زمینه بکار رود و به این ترتیب زمینه را کاهش داده، حساسیت را افزایش دهد. پدهای جاذب بیشتر از فیلترهای سلولز ساخته شده‌اند. مواد باید بر اساس ضخامت، فشردگی و یکنواختی حجم بستر انتخاب شوند. بعد از انتخاب ماده جاذب، بهینه کردن برداشت حجم کل استریپ را می‌توان با تغییر ابعاد پد جاذب (معمولا طول آنها) تنظیم نمود.

1-33- روش های آزمایشگاهی معمول برای تشخیص تروپونین

- روش الایزا
- روش های کمی لومینسانس
- روش ایمنوکرماتوگرافی

1-33-1- بررسی روشهای تشخیص تروپونین I قلبی در سرم

تکامل تست استریپ های ایمونوکروماتوگرافی سریع که به ایمونواسی حرکت جانبی نیز شناخته می‌شوند، نتیجه تقارب رشته هایی است که می‌توانآنها را تا دهه ۱۹۵۰ دنبال کرد. اگرچه مفهوم تست های تشخیص سریع بر پایه مایعات بدن به پیش از این تاریخ باز می‌گردد.

شواهد مکتوب تشخیص بر پایه بزاق و ادرار از چندین هزار سال پیش وجود دارد. چینی های باستان جزء اولین استفاده کنندگان بزاق و ادرار در تشخیص بودند. یک عمل شایع، استفاده از بزاق در تشخیص سریع مجرم بوده است. در تست برنج، عدم توانایی در تولید کافی بزاق برای فرو بردن، در

[1]Absorption Pads

حالیکه مشتی برنج در دست بود، مدرکی کافی برای مجرمیت بود. به این ترتیب، یک نتیجه سریع بدست می آمد که اغلب با تشخیص نادرست همراه بود. یکی از اولین گزارش های مکتوب در مورد تست تشخیصی بر پایه ادرار برای تشخیص حاملگی در نوشته های مصریان پیدا شده است.

توجه به ادرار به عنوان یک محیط تشخیص سریع برای بسیاری از بیماری ها تا سده میانی ادامه یافت. ماجرا تا آنجا پیش رفت که عده ای ادعا کردند از روی رنگ ادرار، می‌توانند حالت های مختلف را تشخیص و تمایز دهند و تنها در اواسط قرن بیستم بود که تست های تشخیص سریع قابلیت تشخیص صحیح پیدا کردند(116).

اساس تکنیک ایمونواسی حرکت جانبی از تست آگلوتیناسیون لاتکس گرفته شد که اولین بار در سال ۱۹۵٦ توسط پلاتزو سینگر[1] تولید شده بود(117).در همان ایام تست های ایمونواسی بر اساس پلیت[2] هم در حال تکوین بودند. اولین بار رادیوایمونواسی توسط برسون و یالو[3] در دهه ۱۹۵۰ اختراع شد. آنزیم ایمونواسی هم در سال ۱۹٦۰ ارائه شد.

پیشرفت هایی نظیر جابجایی آنزیم با رادیوایزوتوپ، کوتاه تر شدن زمان واکنش، ویژگی بیشتر و نیمه عمر طولانی تر نیز با آن همراه شدند. اصول اولیه تکنولوژی حرکت جانبی در اوایل دهه ۱۹۸۰ اصلاح شدند و تا سال های آخر آن دهه تکامل یافت و شرکت هایی نظیر بکتون- دیکینسون[4] مواردی را در زمینه این تکنولوژی برای خود ثبت کردند.

اولین محصول در زمینه تست های سریع فاز جامد تست حاملگی بود که ادامه علاقه تاریخی بر استفاده از نمونه ادرار جهت اهداف تشخیصی است. کاربرد این تست به خصوص در سال ۱۹۷۰ گام بزرگی بود که نتیجه بهبود در تکنولوژی تولید آنتی بادی و بدست آوردن درک عمیق از بیولوژی hCG توسط وایتوکایتیس[5] و همکارانش بود. اگرچه برای تکامل بیشتر تست های حرکت جانبی، تکنولوژی های دیگر هم لازم بودند مثل تولید غشاهای نیتروسلولز، تولید آنتی بادی ها، وسایل پخش مایعات و در

[1] Plotz And Singer
[2] Plate Based Immunoassay
[3] Berson And Yallow
[4] Becton-Dickinson
[5] Vaitukaitis

عین حال یک بانک اطلاعاتی از متودولوژی های ساخت[1] نیز لازم بود. تمام این عناصر لازم بودند تا ترکیبی از مواد شیمیایی و بیولوژیکی، کاغذها، پلیمرها، افراد و روش ها در یک تست ساده و یک مرحله ای جمع شوند که ارزش تشخیصی داشته باشد.

بسیاری از این تکنولوژی ها در دهه اول ۱۹۹۰ تکامل بسیاری داشته اند. در نتیجه کارهای اولیه در تمامی این حیطه ها، اولین محصول حرکت جانبی در اواخر سال ۱۹۸۰ به بازار عرضه شدند. از آن زمان، تکنولوژی حرکت جانبی، کاربرد آن و صنعت هر سه متحول شده‌اند. از سال ۲۰۰۶ بیشتر از ۲۰۰ کمپانی در سراسر جهان از این تست ها تولید می‌کنند که ارزشی بالغ بر۲/۱ بیلیون دلار دارند. کاربرد این تکنولوژی از تشخیص بالینی تا حیطه هایی نظیر دامپزشکی، کشاورزی، صنایع غذایی، تشخیص مولکولی، داروئی و جنگ بیولوژیک گسترده شده است.

[1] Manufacturing Methodologies

1-34-اهداف، فرضیاتوسوالاتتحقیق

1-34-1- اهداف اصلی:

- تولید آنتی بادیهای مونوکلونال با تمایل بالا برای دو اپی توپ تروپونین با استفاده از پپتید ایمونودومینانت و تروپونین تام بعنوان شاخص انتخاب.

- طراحی روش ایمونوکروماتوگرافی برای اندازه گیری این مارکر در سرم انسان.

- مقایسهوارزیابیروشطراحیشدهباروشهایدیگرازنظرحساسیتودقت.

1-34-2- اهداف اختصاصی:

- تولیدکونژوگهآنتی بادی–نانوپارتیکلطلاباکیفیتبالابرایاستفادهازآندرطراحیتست.
- بررسیروشهایاحتمالیتقویتکننده(enhancer) شدت سیگنال تست در کونژوگاسیونآنتی بادی– نانوپارتیکل طلا.
- بررسی پایداری کونژوگه هایآنتی بادی– نانوپارتیکل طلا و انتخاب بهترین کونژوگه

1-34-3- اهداف کاربردی:

- تولیدمواداولیه برای تشخیص و تحقیقات علمی بر روی تروپونین.
- تولیدکیتتشخیصی سریعتروپونین

1-34-4- سوالات اصلی تحقیق

-آیا با استفاده از پپتید ایمونودومیننتمی‌توانآنتی بادیهایویژهبرایدواپیتوپمختلفتهیهنمود؟

-آیا با استفاده از آنتی بادی فوق می‌توان سنجش مناسب و قابل مقایسه با روش الایزا برای تعیین غلظت تروپونینI طراحی کرد.

1-34-5- فرضیات

- پپتیدغالب ایمونودومیننت برای انتخاب آنتی بادی های (پاراتوپ) تولید شده بر اثر تزریق آنتی ژن تام مناسب است .
- با استفاده از آنتی بادیهای بدست آمده ازانتخاب با پپتیدهایغالبایمونودومیننت مورد نظر امکان طراحی کیت ایمنوکروماتوگرافی با حساسیت و دقت مشابه با روشهایاستاندارد وجوددارد.

فصل دوم

مـواد و روشـــها

2-1- مواد مصرفی و کیت های مورد نیاز

نوع ماده مصرفی	شرکت سازنده	شماره کاتولوگ
موش BALB/c	انستیتو پاستور ایران	-
ادجوانتت کامل فروند	Sigma, USA	E 5881
ادجوانتت ناقص فروند	Sigma, USA	F 5506
پودر محیط کشتRPMI-1640	GIBCO, USA	-
سرم جنین گاو (Fetal bovine serum)	GIBCO, USA	-
PEG1500	Sigma, USA	P3515
سدیم پیروات	Gibco, Invitrogen, USA	11360039
محیط HAT	Sigma, USA	H0262
پنی سیلین – استرپتومایسین	Sigma, USA	-
بی کربنات سدیم	Sigma, USA	-
HEPES	Merck, Germany	-
Trypan blue	Sigma,USA	T6146
DMSO	Merck,Germany	317275
اسیدسولفوریک	Merck, Germany	-
اسیدکلریدریک	Merck, Germany	-
کلروفرم	Merck, Germany	-
ایزوپروپانول	Merck, Germany	-
اتانول	Merck, Germany	-
فیلتر استریل 0.2um	Millipore, USA	-
پلیت کشت 24 خانه با کف صاف	Falcon, USA	-
پلیت کشت 96 خانه با کف صاف	Nunk, Denmark	-

-	Nunk, Denmark	پلیت کشت 6 خانه با کف صاف
-	Nunk, Denmark	پلیت کشت 12 خانه با کف صاف
-	Nunk, Denmark	فلاسک کشت سلولی $25\ cm^2$
-	Nunk, Denmark	فلاسک کشت سلولی $75\ cm^2$
P2870	Sigma, USA	Pristane
M8770	Sigma, USA	آنتی بادی بزی ضد IgG موشی
11493027001	Roche Diagnostics, Germany	کیت IsoStrip موشی
-	Merck, Germany	Skim Milk
A9418	Sigma, USA	BSA
-	Sigma, USA	Tween 20
-	Sigma, USA	اکریلامید و بیس اکریلامید
-	Sigma, USA	آمونیوم پر سولفات
-	Sigma, USA	TEMED
-	Sigma, USA	SDS
-	Invitrogen, USA	Protein size marker
-	Sigma, USA	رنگ کوماسی بلو
-	Sigma, USA	رنگ پانسو S
-	شرکت رازی بیوتک	Rabbit -anti- Human HRP conjugated
-	Merck, Germany	PVDF
-	Sigma, USA	DAB
-	Roche, Germany	ژل آگاروز LE
-	Merck, Germany	اسید بوریک
-	Merck, Germany	اتیدیوم بروماید
-	Novagen, Germany	E-coli strain BL21 (DE3)
-	Biolife, Italy	Agar Agar
-	Merck, Germany	Yeast Extract
-	Biolife, Italy	Trypton

Ampicillin	بهدارو، ایران	-
Kanamycine	بهدارو، ایران	-
وکتور بیانی pE32a(+)	انستیتو پاستور ایران	-
گلیسرول	Merck, Germany	-
IPTG	Fermentas, Russia	R0392
ژل کروماتوگرافی Ni-NTA	Qiagen, USA	30210
ایمیدازول	Merck, Germany	104716
فیلترهای تغلیظ Amicon	Millipore, Germany	
TMB	پیشتاز طب، ایران	-
$(C_4H_{11}NO_3)$ Tris base	Boheringer Mannheim, Germany	-
کلرید سدیم (NaCL)	Merck, Germany	-
فسفات دی سدیک (NaH_2PO_4)	Merck, Germany	-
فسفات منوپتاسیک (KH_2PO_4)	Merck, Germany	-
کلرید پتاسیم (KCL)	Merck, Germany	-
سود (NaOH)	Merck, Germany	-
لام شمارش سلولی نئوبار	Boeco, Germany	-
فیلتر 0.22 میکرومتری	Acrodisc, Gelman Sciences, USA	-
لوله فالکون 15 میلی لیتر	Nunk, Denmark	-
لوله فالکون 50 میلی لیتر	Nunk, Denmark	-
سدیم آزاید (NaN_3)	Merck, Germany	-
پیپت پاستور	Normax, France	-
لوله های کرایو دو میلی لیتری	Nunc, Denmark	-
برومونفل بلو	Sigma, USA	-
اوره	Merck, Germany	-

2-2- دستگاههای مورد نیاز

نام	شرکت سازنده
اتوکلاو	Melag, Germany
فور	Melag, Germany
pH متر	Corning, Germany
میکروسکوپ نوری	Zeiss, Germany
میکروسکوپ نوری معکوس	Axivert 25, Zeiss, Germany
انکوباتور CO2	Memmert, Germany
انکوباتور ساده	Gallenkamp, UK
شیکر	Arthus H. Thomas Co., USA
هود کشت سلول	Ceag schrip, Reinraumtechnik, Germany
سانتریفیوژ یخچال دار	Damon/IEC, USA
تانک ازت	MVE, XC 47/11-10, USA
همزن مغناطیسی (Stirrer)	Heidolph, MR3001K, Germany
بن ماری	Memmert, Germany
فریزر 70- °C	New Brunswick Scientific, UK
فریزر 20- °C	Bosch, Germany
میکروسانتریفیوژ Hettich	Eppendorf-Germany
تانک الکتروفورز مدل SEU-7305	پایا پژوهش , ایران
منبع تغذیه (Power supply)	پایا پژوهش ، ایران
سمپلر 8 کاناله	Eppendorf-Germany
سمپلرهای متغیر در اندازه های متفاوت	Socorex, Germany
سمپلر متغیر 20-200µl	Gilson, France

سمپلر متغیر 10µl -0.5 و µl 2.5-0.1	Eppendorf-Germany
ترازوی دیجیتالی	OHAUS, USA
هیتر (Heater)	Corning, Germany
اسپکتروفوتومتر	Pharmacia, Sweden
کووت کوارتزی	Pharmacia, Sweden
ست کامل SDS-PSGE و ایمونوبلاتینگ	BioRad, USA
دستگاه ELISA reader	Organon Teknika Reader 210, Austria
دستگاه Shaker Incubator	Excella E24, New Brunswick Scientific, UK

2-3- تخلیص پروتئین تروپونین I قلبی از قلب موش و انسان

2-3-1- جداسازی بافت قلب از موش(Rat,Albino n mary)

در ابتدا با برداشتن سه موش رت albino n mary و در شرایط استریل و با رعایت اصول کار با حیوان موشها را کشته و قلب آنها را جدا کرده(هرکدام حدود 1/2 گرم) و در داخل یخ قرار داده و جهت انجام فرایند استخراج پروتئین cTnI مراحل زیر طی شد.

2-3-2-جداسازی بافت قلب از انسان(human heart)

با هماهنگی های انجام شده با پزشکی قانونی یک قلب انسان تهیه گردید.سپس مطابق با مراحل زیر همانند بافت قلب موشی مراحل هموژنایزر نمودن و نیز تخلیص تروپونین انجام گردید.

2-3-3- هموژنایز کردن بافت قلبی

در این مرحله ابتدا با خرد کردن بافت قلب آن را برای هموژنایز نمودن آماده نموده و در این مرحله پس از خرد نمودن بافت قلب آن را در محلول extraction buffer قرار داده(ده برابر ویا هر مقداری که بتوان صاف نمود) و سپس با دستگاه هموژنایزر بمدت حدود نیم ساعت کاملا هموژن نموده تا یک هموژنی از بافت قلبی ایجاد شود.

2-3-4- محلول بافر استخراج (extraction buffer)

Tris HCl75 mM
Urea 9 M
CaCl2 1 mM
2-ME (2- mecaptoethanol) 60 mM
PMSF 2mM/l
pH: 8.0

پس از اینکه بافت قلبیبطورکامل هموژن گردید محلول حاصل را در سانتریفوژ با دور 10000 g بمدت 20 دقیقه سانتریفوژ کرده و سپس محلول رویی رااز لوله خارج نموده و رسوب دور ریخته شد.

2-3-5- صاف نمودن هموژنات:

با استفاده از پشم شیشه و قیف محلول وسوپرناتنت(محلول رویی) حاصل از سانتریفوژ صاف کرده شد.محلول صاف شده سپس برای انچام فرایند دیالیز استفاده گردید.

2-3-6-دیالیز:

در این مرحله محلول صاف شده در دمای اتاق بمدت 5 ساعت دیالیز گردید.

دیالیز در محلول زیر انجام گردید:

TEA HCl 25 mM
Urea 8 M
EDTA 2mM
DTT 1mM
pH 7.5

2-3-7- سانتریفوژ:

در این مرحله محلول دیالیز شده بمدت 30 دقیقه در دور 6000 g سانتریفوژ گردید.حاصل سانتریفوژ ایجاد دو فاز شامل محلول رویی (supernatant) و رسوب بود.در این مرحله محلول رویی برای انجام رسوب نمکی[1] آماده شد.

2-3-8-ترسیب نمکی (Salting out)

با استفاده از نمک سولفات آمونیوم یک محلول 30٪ ساخته شد(بصورت وزنی حجمی یعنی حجم محلول استخراج را اندازه گرفته به اندازه 30 درصد ان سولفات آمونیوم وزن می‌کنیم وسپس آرام آرام

[1]Salting Out

آن را اضافه می‌کنیم(داخل ظرف یخ روی استیرر اینکار انجام شود). سپس این محلول در سانتریفوژ با دور 6000 g بمدت 10 دقیقه سانتریفوژ گردید.مجددا دو فاز تشکیل گردید.محلول رویی مجددا برای ایجاد محلول 60٪ از سولفات آمونیوم با اضافه نمودن نمک آماده گردید.سپس مجددا سانتریفوژ بمدت 10 دقیقه با دور g6000 انجام گردید. در این مرحله نیز دو فاز شامل فاز رویی و فاز رسوبی تشکیل گردید.با احتساب فاز رسوبی ایجاد شده در 30٪ سولفات آمونیوم دو رسوب (30 و 60 درصد)و نیز یک محلول رویی 60 ٪ داریم.این سه فاز را مجددا در بافر استخراج بطور کامل حل نموده و دوباره بمدت 2 ساعت دیالیز نمودیم. بعد از این مدت محلولهای حاصله برای کروماتوگرافی تعویض یون آماده شدند.

2-3-9- کروماتوگرافی تعویض یون(DEAE)

بعد از نمک زدایی با استفاده از سولفات آمونیوم و بدست آوردن رسوب 30٪ و 60٪ و نیز محلول رویی و سپس دیالیز این 3 محلول آنها را بطور جداگانه با استفاده ازستون کروماتوگرافی DEAE جداسازی کرده و بصورت فرکشنهای 1 سی سی در داخل میکروتیوپ جمع آوری نمودیم.از هر یک از 3محلول ذکر شده در بالا حدود 10 فرکشن جدا سازی شد.

2-3-10- شناسایی پروتئین با الکتروفورز (SDS PAGE)

پس از تخلیص پروتئین تروپونین قلبی با استفاده از الکتروفورز میزان تخلیص و شدت خلوص آن بررسی گردید.

2-4- بررسی‌های کامپیوتری به منظور انتخاب پپتید های ایمنودومیننت

2-4-1- پپتیدهای ایمنودومیننت

پپتیدهای ایمنودومیننت در واقع پپتیدها و توالی های پپتیدی در ساختار یک پروتئنی هستند که به دلیل تفاوت ساختاری می‌توانند سبب تحریک سیستم ایمنی گردند. با توجه به اینکه در ساختار هر پروتئین برخی از ترادف های آمینواسیدی دارای آنتی ژنیسیتی بیشتر هستند و درواقع توانایی بیشتری برای تحریک سیستم ایمنی دارند به همین خاطر برای رسیدن به این پپتید ها و درواقع اپی توپ ها نیاز به بررسی با استفاده از نرم افزارها و سایت های بررسی ساختار پروتئین بود.این پپتیدهای ایمنودومیننت برای بررسی و به منظور انجام مطالعات انتخابی جهت آنتی بادی پلی کلونال تولید شده در خرگوش و نیز آنتی بادی مونوکلونال مورد استفاده قرار میگیرند.

از طرفی با توجه به اینکه امروزه برای انجام کارهای تجربی و به منظور افزایش سرعت و نیز کاهش ریسک خطا در مطالعات از مطالعات بیوانفورماتیکی جهت پیشگویی نتایج احتمالی استفاده می‌گردد به همین خاطر در این مطالعه نیز با توجه به اینکه نیاز به سنتز پپتید برای استفاده از آن به عنوان ایمونودومیننت وجود دارد لذا با نرم افزارهای مختلف پیشگویی درباره ساختار تروپونین I قلبی ونیز بررسی میزان ویژگی‌های ساختاری این پروتئین اعم از انتی ژنیسیتی ،هیدروفوبیسیتی و.....پرداخته گردید. این پیشگویی کمک زیادی در جهت رسیدن و انتخاب پپتیدهای ایمونودومیننت خواهد نمود.به همین دلیل از نرم افزارهای انلاین و غیر انلاین برای این پیشگویی و انتخاب پپتیدها استفاده شد.

برای بررسی ساختار پروتئین تروپونین I قلبی از بانک اطلاعاتی Uniprotتوالی تروپونین I قلبی انسان استخراج شدند. این بانک اطلاعاتی در آدرس اینترنتی http://www.uniprot.org قابل دسترسی است.

2-4-2- انتخاب اپی توپ های قالب

مطالعات کتابخانه ای برای پیدا کردن اپی توپ های غالب ایمنی و در عین حال خطی برای آنتی ژن های انتخاب شده صورت گرفت. بررسی‌ها برای پیش بینی اپی توپ های غالب ایمنی پروتئین تروپونین I قلبی با استفاده ازسایت های آنلاین

IEDB analysis (tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input)

IMED (http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.html)

برای بررسی ساختار پروتئینتروپونین I قلبی و انتخاب پپتیدهای غالب ایمنی استفاده گردید.برای رسیدن به این هدف از ویژگیهای مختلف ساختاری این پروتئین از جمله ساختار خطی، هیدروفوبیسیتی،آنتی ژنیسیتی،انعطاف پذیری،ساختار بتا(ساختار دوم) با استفاده از نرم افزارهای انلاین موجود در این سایت به شرح ذیل استفاده گردید:

Chou & Fasman Beta-Turn Prediction

Emini Surface Accessibility Prediction

Karplus & Schulz Flexibility Prediction

Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity

Parker Hydrophilicity Prediction

Bepipred Linear Epitope Prediction

2-4-3- جستجو برای توالی های مشابه

از جستجوی تطابقی (Blast)در پایگاه پروتئینی در سایت Uniprot و NCBI برای یافتن تمامی توالی های مشابه استفاده شد. برای انجام تطابق از نرم افزار آنلاین موجود در Uniprot و NCBI قابل دسترسی در آدرس الکترونیکی (www.ncbi.nlm.nih.org /BLAST) استفاده شد.

سنتز پپتیدهای انتخاب شده

بعد از انجام مطالعات بیوانفورماتیک و نیز با توجه به مقالات مطالعه شده، 4 پپتید مورد انتخاب قرار گرفتند.سپس این پپتیدها با سفارش به شرکت chinaPeptide با اتصال به سرم آلبومین گاوی(BSA) سنتز گردیده و مورد استفاده در تولید آنتی بادی پلی کلونال و نیز بررسی آنتی بادی مونوکلونال تولید شده با انتی ژن نوترکیب تروپونین I قلبی قرار گرفتند.

2-5- بیان پروتئین نوترکیب تروپونین I قلبی

2-5-1- سنتز ژن

توالی ژن طراحی شده جهت سنتز شدن به شرکت Shinegene سفارش داده شد. ویژگی‌ها و پیشبینی‌های لازم برای قرار گرفتن ژن مورد نظر در داخل وکتور بیانی pEt32a در نظر گرفته شده بود. بنابراین ژن مورد نظر برای سنتز در داخل وکتور pEt32a با استفاده از جایگاه‌های برش BamH1 و EcoRI سفارش شد.

2-5-2- تهیه باکتری مستعد شده برای واکنش شیمیایی

1- یک تک کلون از باکتری BL21 در 10 میلی‌لیتر محیط LB به مدت 12 ساعت در 37^{o} C به همراه شیک کردن کشت داده شد.
2- مقدار 0/5ml از کشت شبانه فوق به 50 ml محیط مایع LB اضافه شده و به مدت 3 الی 4 ساعت (تا زمانی که شدت جذب در 600نانومتر OD به 0/5 برسد) در شیکر انکوباتور ^{o} 37C کشت داده شد.
3- کشت باکتری به یک فالکون 50 میلی‌لیتری منتقل شد و در دمای4^{o} C و دور 3500rpm به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شد.
4- رسوب حاصل در 50 میلی‌لیتر محلول سرد CaCl2(50 mM) حل شده و 10 دقیقه روی یخ قرار داده شد.
5- سانتریفیوژ مانند مرحله قبل انجام شد.
6- رسوب حاصل در 25 میلی‌لیتر محلول سرد $CaCl_2$(50 mM) حل شده و 10 دقیقه روی یخ قرار داده شد.
7- سانتریفیوژ مانند مرحله قبل انجام شد.

8- به رسوب حاصل 12 میلی‌لیتر محلول سرد CaCl2(50 mM) اضافه شده و سانتریفیوژ انجام شد.

9- رسوب حاصل در 600 میلی‌لیتر محلول سرد CaCl2(50 mM) حل شده و در حجم‌های 100 میکرو لیتری تقسیم شده و از یکی از آنها در همان روز استفاده شد.

به مابقی گلیسرول اضافه و در فریزر 70- ذخیره شدند. برای اطمینان از عدم آلودگی میکروبی باکتری پذیرای (مستعد) تهیه شده 50 µl از آن را روی پلیت‌های جامد بدون آنتی‌بیوتیک و دارای آنتی بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، کانامایسین و تتراسایکلین کشت داده و یک شب در انکوباتور ۳۷°C به طور ساکن قرار دادیم. باکـتریBL21 تنها باید روی پلیت بدون آنتی بیوتیک رشد کند چون ژن مقاومت به هیچ یک از آنتی بیوتیک‌ها را ندارد. با مشاهده هرگونه آلودگی در پلیت‌های فوق، باید میکروتیوب‌های حاوی سلول‌های پذیرا دور ریخته و معدوم شوند.

2-5-3- ترانس‌فورماسیون باکتری BL21 (DE3)

1- ابتدا باکتری مستعد روی یخ قرار داده شد تا کاملاً ذوب گردد.

2- 5ul از محلول حاوی پلاسمید به باکتری اضافه شد و با تکانهای آرام مخلوط شد.

3- باکتری‌ها به مدت 30 دقیقه روی یخ قرار داده شدند.

4- به باکتری‌ها به مدت 45 ثانیه شوک حرارتی داده شد و بلافاصله به یخ منتقل شدند.

5- پس از دو دقیقه 900 میلی‌لیتر محیط مایع LB به آنها اضافه شده و به مدت یک ساعت در 37°C به همراه شیک کردن کشت داده شد.

6- سپس 200 میکرولیتر از محیط حاوی باکتری‌ها را روی محیط LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک (آمپی سیلین) به مدت 14 ساعت کشت داده می‌شوند. پس از گذشت این زمان باکتری‌های دریافت کننده پلاسمید (حاوی ژن) روی محیط تشکیل کلونی خواهند داد.

2-5-4- القای بیان پروتئین

برای بررسی بیان پروتئین از روش زیر استفاده گردید.

1- یک کلنی از کلنی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب در 5 ml از محیط LB حاوی آمپی‌سیلین به مدت 12 ساعت در دمای 37 درجه همراه با شیک در دور 240 rpm کشت داده شد. در شرایط مشابه باکتری بدون وکتور نیز کشت شد.

2- از هر یک کشت‌های شبانه 2 ml برداشته شده و به محیط کشت جدید که حجم نهایی آن 10 ml بود منتقل گردید.

3- هر دو کشت تا رسیدن به OD حدود 0/6در دمای 37 درجه انکوبه شدند.

4- از کشت باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب 1 ml به عنوان کنترل قبل از القاء برداشته شد. نمونه گرفته شده به یک میکروتیوپ1/5 ml منتقل شده و در دور 5000 rpm به مدت5دقیقه سانتریفیوژ گردید. محیط رویی دور ریخته شد و رسوب برای آنالیز بیشتر توسط SDS-PAGE در دمای 20- نگهداری شد.

5- به کشت باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب IPTG با غلظت نهایی 1 mM افزوده شد.

6- هر دو کشت به مدت 4 ساعت در دمای 37 درجه انکوبه شدند.

7- از کشت‌های بدون پلاسمید و نیز کشت القاء شده با IPTG از هر یک 1 ml برداشته شده و به یک میکروتیوپ1/5 ml منتقل شده و در دور 5000 rpm به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ گردید. محیط رویی دور ریخته شد و رسوب برای آنالیز بیشتر توسط SDS-PAGE در دمای 20- نگهداری شد. از این دو نمونه به عنوان کنترل بدون پلاسمید و نیز کنترل بعد از القاء استفاده گردید.

2-5-5-آماده‌سازی نمونه برای آنالیز بیان با SDS-PAGE

نمونه‌های باکتریایی طبق روش زیر برای آنالیز با SDS-PAGEآماده‌سازی شدند.

1- به هر یک از میکروتیوپ‌های حاوی رسوب 50 µl از بافر نمونه 5x افزوده شد.

2- میکروتیوپ‌ها به مدت 20دقیقه در آب جوشانده شدند.

3- میکروتیوپ‌ها به مدت 1دقیقه در دور 5000 rpm سانتریفیوژ شدند.

4- غلظت پروتئین در هر یک از مایعات رویی با برادفورد سنجیده شد.

2-5-6-تائید بیان با وسترن بلاتینگ

برای انجام وسترن بلات ابتدا طبق پروتکل SDS-PAGE انجام شد ولی این بار رنگ‌آمیزی صورت نگرفت تا در ادامه مراحل وسترن بلات انجام گردد.

1- پروتئین‌ها بر روی ژل SDS-PAGE تفکیک شدند.

2- پروتئین‌های تفکیک شده بر روی ژل در شدت جریان 0/5 آمپر به مدت 1/5 ساعت به کاغذ نیتروسلولز منتقل شد.

3- کاغذ نیتروسلولز در محلول بلاکر به مدت 16 ساعت قرار داده شد.

4- یک بار شست و شو با TBST انجام شد.

5- کاغذ در محلول آنتی‌بادی antiHis-tag در بافر EIA به مدت 1/5 ساعت همراه با تکان قرار داده شد.

6- دو بار شست و شو با TBST و یک بار با PBS انجام شد.

7- کاغذ در محلول سوبسترا قرار داده شد تا زمانی که باندها ظاهر شدند.

8- واکنش با اضافه کردن آب مقطر متوقف شد.

2-6- اپتیمم سازی بیان پروتئین

2-6-1- بهینه‌سازی غلظت IPTG

1- از استوک تهیه شده مقدار 10µl در محیط کشت 5 ml که حاوی آمپی‌سیلین 100 µg/ml بود انتقال داده شد و به مدت 10 ساعت در دمای 37 درجه انکوبه گردید.

2- از کشت فوق 2ml به محیط LB با حجم 25 ml انتقال داده شد و سپس به مدت 2 ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند.

3- از کشت باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب 1 ml به عنوان کنترل قبل از القاء برداشته شد. نمونه گرفته شده به یک میکروتیوپ1/5 ml منتقل شده و در دور 5000 rpm به مدت 5دقیقه سانتریفیوژ گردید. محیط رویی دور ریخته شد و رسوب برای آنالیز بیشتر توسط SDS-PAGE در دمای 20- نگهداری شد.

4- کشت 25 ml به 5 قسمت مساوی در لوله‌های فالکون 50 ml تقسیم شد.

5- هر فالکون با غلظت خاص (0/2، 0/4، 0/6، 0/8 و 1 mM) از IPTG القاء شدند.

6- فالکون‌های فوق به مدت 10 ساعت در دمای 28 درجه انکوبه شدند.

7- از هر یک از فالکون‌ها 1 ml به عنوان نمونه برداشته شد. نمونه‌های گرفته شده به میکروتیوپ های 1/5 ml منتقل شده و در دور 5000 rpm به مدت 5دقیقه سانتریفیوژ گردید. محیط رویی دور ریخته شد و رسوب برای آنالیز بیشتر توسط SDS-PAGE در دمای 20- نگهداری شد.

2-6-2- بهینه‌سازی مدت زمان القاء

1- از استوک تهیه شده مقدار 10µl در محیط کشت 5 ml که حاوی آمپی‌سیلین 100 µg/ml بود انتقال داده شد و به مدت 10 ساعت در دمای 37 درجه انکوبه گردید.

2- از کشت فوق 2ml به محیط LB با حجم 10 ml انتقال داده شد و سپس به مدت 2 ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند.

3- از کشت باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب 1 ml به عنوان کنترل قبل از القاء برداشته شد. نمونه گرفته شده به یک میکروتیوپ1/5 ml منتقل شده و در دور 5000 rpm به مدت 5دقیقه سانتریفیوژ گردید. محیط رویی دور ریخته شد و رسوب برای آنالیز بیشتر توسط SDS-PAGE در دمای 20- نگهداری شد.

4- فالکون حاوی کشت 10 ml با غلظت نهایی بهینه IPTG القاء گردید.

5- در فواصل زمانی 2، 4، 6، 8، 10 و 12 ساعت 1 ml از محیط کشت برداشته شد و به عنوان نمونه القاء شده مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های گرفته شده به یک میکروتیوپ1/5 ml منتقل شده و در دور 5000 rpm به مدت5دقیقهسانتریفیوژ گردید. محیط رویی دور ریخته شد و رسوب برای آنالیز بیشتر توسط SDS-PAGE در دمای 20- نگهداری شدند.

2-6-3- بهینه‌سازی دمای القاء

1- از استوک تهیه شده مقدار 10µl در محیط کشت 5 ml که حاوی آمپی‌سیلین 100 µg/ml بود انتقال داده شد و به مدت 10 ساعت در دمای 37 درجه انکوبه گردید.

2- از کشت فوق 2ml به محیط LB با حجم 25 ml انتقال داده شد و سپس به مدت 2 ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند.

3- از کشت باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب 1 ml به عنوان کنترل قبل از القاء برداشته شد. نمونه گرفته شده به یک میکروتیوپ1/5 ml منتقل شده و در دور 5000 rpm به مدت

5دقیقهسانتریفیوژ گردید. محیط رویی دور ریخته شد و رسوب برای آنالیز بیشتر توسط SDS-PAGE در دمای 20- نگهداری شد.

4- کشت 25 ml به 4 قسمت مساوی در لوله‌های فالکون 50 ml تقسیم شد.

5- فالکونها با دمای 18، 25، 30 و 37 درجه با غلظت بهینه از IPTG القاء شدند.

6- در بازه زمانی 8 ساعت از هر فالکون 1 از محیط کشت برداشته شد و به عنوان نمونه القاء شده مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های گرفته شده به یک میکروتیوپ1/5 ml منتقل شده و در دور 5000 rpm به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ گردید. محیط رویی دور ریخته شد و رسوب برای آنالیز بیشتر توسط SDS-PAGE در دمای 20- نگهداری شدند.

2-7- تعیین حلالیت پروتئین

1- یک کلنی از باکتری به در 5ml از محیط LB به مدت 10 ساعت کشت داده شد.

2- 3ml از کشت شبانه به یک محیط 50ml جدید از LB انتقال داده شد.

3- کشت جدید به مدت حدود 2 ساعت در دمای 37 درجه انکوبه گردید تا OD_{600} به 0/4 برسد.

4- 1 میلیلیتر از محیط کشت به عنوان کنترل منفی بدون القاء برداشته شد و به یک میکروتیوپ1/5 ml انتقال داده شد. این میکروتیوپ در دور 5000 g به مدت 3 دقیقه سانتریفیوژ گردید و در دمای 20- درجه تا زمان SDS-PAGE نگهداری شد.

5- سنتز پروتئین نوترکیب با افزودن IPTG با غلظت نهایی 1 mM به محیط کشت افزوده شد. سنتز پروتئین به مدت 8 ساعت در دمای 28 درجه القاء گردید.

6- 1 میلیلیتر از محیط کشت به عنوان کنترل بعد از القاء برداشته شد و به یک میکروتیوپ 1/5 ml انتقال داده شد. این میکروتیوپ در دور 5000 g به مدت 3دقیقه سانتریفیوژ گردید و در دمای 20- درجه تا زمان انجام الکترو فرز(SDS-PAGE) نگهداری شد.

7- مابقی باکتری‌ها در دور 5000 g به مدت 5 دقیقه رسوب داده شدند. رسوب حاصل به مدت 20 ساعت در دمای 20- درجه انکوبه گردید.

8- رسوب فریز شده به مدت 0/5 ساعت در دمای اتاق از حالت فریز خارج شد.

9- آنزیم لیزوزیم به مقدار 1mg/ml به رسوب افزوده شده و بمدت30 دقیقه روی یخ انکوبه گردید.

10- سونیکاسیون شش بار و هر بار به مدت 10 ثانیه با وقفه‌های 10 ثانیه‌ای انجام شد.

11- محلول حاصل در دور 10/000 g به مدت 30دقیقه سانتریفیوژ گردید.

12- فاز رویی به دقت جمع‌آوری گردید (فاز محلول).

13- رسوب در حجم مساوی با فاز رویی حل گردید (فاز غیرمحلول).

14- نمونه بدون القاء، نمونه بعد از القاء، فاز محلول و فازغیرمحلول با SDS-PAGEآنالیز شدند.

2-8- آماده سازی لیزات سلولی تحت شرایط طبیعی

1- سلول‌های باکتریایی از محیط کشت 50 ml با سانتریفیوژ در دوره 5000 rpm به مدت 5دقیقه جمع‌آوری شدند.

2- رسوب فوق در 8 ml از بافر اتصال برای شرایط طبیعی مجدداً حل گردید.

3- از آنزیم لیزوزیم 8 mg افزوده شد و مخلوط فوق به مدت 0/5 ساعت در روی یخ انکوبه گردید.

4- سونیکاسیون روی یخ انجام شد. از سیکل‌های 10 ثانیه و 10 ثانیه توقف استفاده گردید.

5- سپس مخلوط فوق در دور 3000 g به مدت 15دقیقه سانتریفیوژ شد.

6- 5 میکرولیتر از محلول فوق به منظور SDS-PAGE جمع‌آوری شد و مابقی در دمای 20- درجه نگهداری شد.

2-9- آماده‌سازی ستون نیکل برای شرایط طبیعی

1- ظرف حاوی آگارز Ni-NTA به آرامی تکان داده شود تا محتویات آن حل شوند.

2- حدود 1/5 ml از محتویات ظرف به یک ستون با ظرفیت جادهی برای 10 ml مایع انتقال داده شود.

3- اجازه داده شد تا محتویات ستون ته نشین شوند.

4- مایع رویی آسپیره نموده و خارج گردید.

5- حدود 6 ml آب مقطر به ستون اضافه نموده و مجدداً ستون هم زده شد.

6- اجازه داده شد تا محتویات ستون ته نشین شوند.

7- مایع رویی را آسپیره نموده و خارج گردید.

8- حدود 6 ml بافر اتصال در شرایط دناتوره کننده به ستون اضافه نموده و مجدداً ستون را هم زده شد.

9- اجازه داده شد تا محتویات ستون ته نشین شوند.

10-مایع رویی را آسپیره نموده و خارج گردید.

11-مراحل 10-8 مجددا تکرار گردید.

2-9-1- تخلیص پروتئین در شرایط طبیعی

1- حدود 8 ml از سوپرناتانت به ستون آماده شده انتقال داده شد.

2- اجازه داده شد تا ستون با حرکات آرام بر روی شیکر به مدت 60- 30 دقیقه به پروتئین‌ها اتصال یابد.

3- ستون ساکن قرار داده شد و اجازه داده شد تا ستون ته نشین شود.

4- مایع رویی آسپیره گردید و در دمای 4 درجه نگهداری شد تا بعداً از آن برای آنالیز-SDS PAGE استفاده شود.

5- به درون ستون 8 ml از مایع اتصال در شریط طبیعی افزوده شد و ستون هم زده شد.

6- اجازه دهید تا محتویات ستون ته نشین شود. مایع رویی آسپیره شدو برای آنالیزالکتروفرز در دمای 4 درجه نگهدارید.

7- مراحل 6-5 ، 3 بار تکرار شد.

8- از بافر خارج‌سازی پروتئین 8-12ml اضافه گردید.

9- فرکشن‌های خروجی با حجم 1ml جمع‌آوری شد.

10-جذب در طول موج 280 nm نانومتر را اندازه‌گیری و پیک‌های اصلی را با یکدیگر مخلوط گردید.

11-پروتئین ها جهت نگهداری در دمای 20- به آن گلیسرول اضافه گردید.

2-10- ایمونیزاسیون

یکی از اجزای لازم برای ایمونیزاسیون ادجوانت است، وجود آن باعث تحویل تدریجی ایمونوژن به سیستم لنفاوی می‌شود. ادجوانت حاوی ماده امولسیون کننده آرلاسل A و روغن معدنی سبک پارافین می‌باشد. آرلاسل A حاوی گروههای هیدروفوبیک و لیپوفیلیک به تعداد زیاد می‌باشد و باعث انتشار راحت و خوب فاز روغنی و فاز آبی (ایمنوژن) شده و منجر به ایمونیزاسیون پایدار می‌شود. ادجوانت کامل علاوه بر ترکیبات فوق دارای باکتری کشته شده مایکوباکتریوم بوده در حالیکه نوع ناقص فاقد باکتری است.

1-10-1- اثرات ادجوانتها :

1- اثرات سمی ایمنوژن را کاهش می دهد.

2 - ادجوانت تعداد لنفوسیتها را در محل تزریق افزایش داده، تماس بین آنتی ژن و سلولهای واکنش دهنده افزایش یافته بدین ترتیب بر تولید آنتی بادی اثر می گذارد.

3- از اثرات ناخواسته تولرانس یا عدم پاسخ جلوگیری می نماید (با تزریق زیاد آنتی ژن تولرانس و با تزریق کم آن عدم پاسخ به وجود می آید) .

4- در حضور ادجوانت ایمنوژن به آرامی و در طول زمان تحویل سیستم ایمنی داده شده و پاسخ بهتری ایجاد می‌شود.

در اولین تزریق از ادجوانت کامل فروند استفاده می‌شود که احتمالاً به علت تحریک پاسخ سلولی محیطی می‌باشد و نسبت آن با آنتی ژن یک به یک است. تزریق های بوستر بعدی با ادجوانت ناقص فروند صورت می گیرد. مسیر های تزریق مختلف بوده و می تواند داخل صفاقی، عضلانی و پوستی باشد. انتخاب مقدار آنتی ژن تزریقی به میزان خلوص و ایمنوژنیسیته آن بستگی دارد.

2-11- تهیه آنتی بادیهای پلی کولونال خرگوشی

2-11-1- تهیه آنتی بادی پلی کلونال با استفاده از تروپونینI قلبی تخلیص شده از بافت قلب

2-11-1-1- ایمونیزاسیون خرگوش

برای تهیه این آنتی بادیها از خرگوشهای ماده 6-4 ماهه سفید نیوزیلندی استفاده شد. در تزریق اول آنتی ژنها از ادجوانت کامل فروند و در تزریقهای بعدی از ادجوانت ناقص فروند استفاده شده است. فواصل بین تزریق های متعدد دو هفته بوده است.به هر یک از خرگوشها 5 بار تزریق آنتی ژن مورد نظر صورت گرفته تا موجب ایجاد پاسخ قوی آنتی بادی گردد. پس از تزریق‌ها خونگیری های متعدد از خرگوشها برای جمع آوری سرم صورت گرفته و میزان تیتر آنتی بادی اختصاصی در آنها از طریق آزمون الایزای غیر مستقیم سنجیده شد. بدین ترتیب که ابتدا مقادیر 0.5-10 µg/ml از آنتی ژنهای مورد نظر بصورت شبانه کوت شده و پس از بلاکینگ رقتهای مختلف از سرمهای خرگوش به عنوان لایه شناسایی کننده افزوده شده است. در پایان از کنژوگه Sheep-anti-Rabbit-HRP با رقت 1:1000 استفاده شده است. پس از انجام آزمون تیتراسیون سرمهای مورد نظر برای تخلیص آنتی بادی با ستون کروماتوگرافی پروتئینG (Streptococcal Protein G -SPG) مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول 2-1- ایمونیزاسیون خرگوش ها با استفاده از تروپونین I تخلیص شده از بافت قلب موش

تزریق ها	تزریق اول	بوستر اول	بوستر دوم	بوستر سوم	بوستر چهارم
غلظت ایمونوژن	200µg	100	100	100	100
نوع ادجوانت	کامل	ناقص	ناقص	ناقص	ناقص

2-11-2-تهیه آنتی بادی پلی کلونال با استفاده از تروپونینI قلبی نوترکیب

2-11-2-1- ایمونیزاسیون خرگوش

برای تهیه این آنتی بادیها از خرگوشهای ماده 6-4 ماهه سفید نیوزیلندی استفاده شد. در تزریق اول آنتی ژنها از ادجوانت کامل فروند و در تزریقهای بعدی از ادجوانت ناقص فروند استفاده شده است. فواصل بین تزریق های متعدد دو هفته بوده است.به هر یک از خرگوشها 5 بار تزریق آنتی ژن مورد نظر صورت گرفته تا موجب ایجاد پاسخ قوی آنتی بادی گردد.

پس از تزریقها خونگیری های متعدد از خرگوشها برای جمع آوری سرم صورت گرفته و میزان تیتر آنتی بادی اختصاصی در آنها از طریق آزمون الایزای غیر مستقیم سنجیده شد. بدین ترتیب که ابتدا مقادیر 6-10 µg/ml از آنتی ژنهای مورد نظر بصورت شبانه کوت شده و پس از بلاکینگ رقتهای مختلف از سرمهای خرگوش به عنوان لایه شناسایی کننده افزوده شده است. در پایان از کنژوگه Sheep-anti-Rabbit-HRP با رقت 1:1000 استفاده شده است. پس از انجام آزمون تیتراسیون سرمهای مورد نظر برای تخلیص آنتی بادی با ستون کروماتوگرافی پروتئینG (Streptococcal Protein G -SPG) مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول 2-2- غلظت پروتئین نوترکیب، نوع ادجوانت در تزریق های اول، بوستر و نهائی در خرگوشها

تزریق ها	تزریق اول	بوستر اول	بوستر دوم	بوستر سوم	بوستر چهارم
غلظت ایمونوژن	100µg	40	40	40	40
نوع ادجوانت	کامل	ناقص	ناقص	ناقص	ناقص

2-11-3- تهیه آنتی بادی پلی کلونال با استفاده ازپپتیدهای انتخاب شده

2-11-3-1- ایمونیزاسیون خرگوش

برای تهیه این آنتی بادیها از خرگوشهای ماده 6-4 ماهه سفید نیوزیلندی استفاده شد. در تزریق اول آنتی ژنها از ادجوانت کامل فروند و در تزریقهای بعدی از ادجوانت ناقص فروند استفاده شده است. فواصل بین تزریق های متعدد دو هفته بوده است.به هر یک از خرگوشها 5 بار تزریق آنتی ژن های پپتیدی مورد نظر صورت گرفته تا موجب ایجاد پاسخ قوی آنتی بادی گردد.

پس از تزریقها خونگیری های متعدد از خرگوشها برای جمع آوری سرم صورت گرفته و میزان تیتر آنتی بادی اختصاصی در آنها از طریق آزمون الایزای غیر مستقیم سنجیده شد. بدین ترتیب که ابتدا مقادیر µg/ml 10-6 از آنتی ژنهای مورد نظر بصورت شبانه کوت شده و پس از بلاکینگ رقتهای مختلف از سرمهای خرگوش به عنوان لایه شناسایی کننده افزوده شده است. در پایان از کنژوگه Sheep-anti-Rabbit-HRP با رقت 1/1000 استفاده شده است. پس از انجام آزمون تیتراسیون سرمهای مورد نظر برای تخلیص آنتی بادی با ستون کروماتوگرافی پروتئین جی (Streptococcal Protein G -SPG) مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول 2-3- غلظت پپتیدها، نوع ادجوانت در تزریق های اول، بوستر و نهائی در خرگوشها

تزریق ها	تزریق اول	بوستر اول	بوستر دوم	بوستر سوم	بوستر چهارم
غلظت ایمونوژن•	50µg	25	25	25	25
نوع ادجوانت	کامل	ناقص	ناقص	ناقص	ناقص

•ایمنوژنموردااستفادهدراینتزریقهاهمان 4 پپتیدسنتزشدههستند

2-12- تولید آنتی بادی مونوکلونال بر علیه تروپونین I قلبی نوترکیب

2-12-1- طرز تهیه ایمونوژن

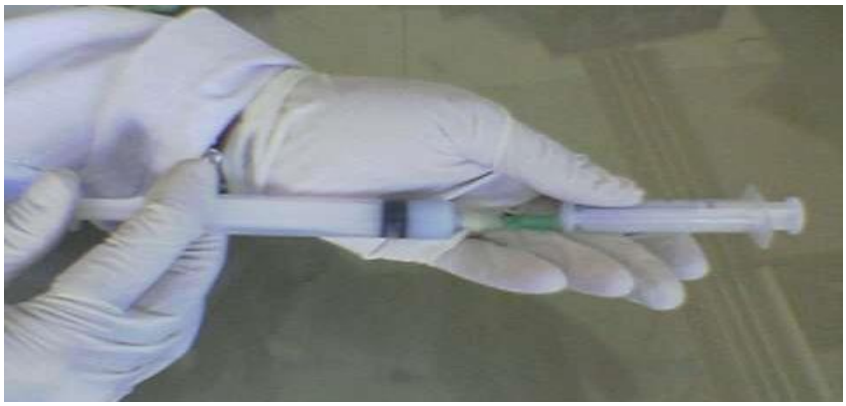
به ازای هر موش مقدار200 میکرولیتر ازمخلوط بافر فسفات سالین (PBS) حاوی 50 میکروگرم پروتئین نوترکیب تروپونین I قلبی تهیه گردید.

مجموعا برای تزریق به 2 موش BALB/c مقدار500 میکرولیتر ازمخلوط تهیه گردید. این محلول با هم حجم خود با ادجوانت کامل فروند (500 میکرولیتر) در داخل سرنگ امولسیوفر بطور کامل مخلوط شدند تا امولسیون شیری رنگ بوجود آید (شکل2-1).

2-12-2- تزریق ایمونوژن

در تزریق اول امولسیون مخلوط پروتئین نوترکیب در ادجوانت کامل و در تزریقات بعدی امولسیون مخلوط پروتئین نوترکیب در ادجوانت ناقص بطور داخل صفاقی تزریق گردید.

آخرین تزریق با20 میکروگرم از پروتئین نوترکیب،5-3 روز قبل از کشتن حیوان بصورت داخل وریدی بدون ادجوانت صورت گرفت.



شکل 2-1- نحوه تهیه سرنگ امولسیوفر و استفاده ازآن جهت تهیه امولسیون ادجوانت با ایمونوژن

به هر موش500 میکرولیتر از مخلوط پروتئین نوترکیب (حاوی 50 میکروگرم ایمونوژن) و ادجوانت کامل فروند از طریق داخل صفاقی تزریق شد. تزریق های یادآور (بوستر)بعدی با استفاده از ادجوانت

ناقص فروند و با نصف مقدار از مخلوط پروتئین نوترکیب (حاوی 25 میکروگرم ایمونوژن) هر دو هفته یکبار (مجموعاً 4 بار تزریق) از طریق داخل صفاقی انجام گرفت. آخرین تزریق 4 روز قبل از ادغام سلولی با مقدار 20 میکروگرم از ایمونوژن خالص عاری از ادجوانت درPBS استریل و از طریق تزریق وریدی از محل سیاهرگ دمی انجام گرفت (جدول 2-2) .

جدول 2-4- جدول غلظت تروپونین I نوترکیب، نوع ادجوانت در تزریق های اول، بوستر و نهائی در موش‌ها

تزریق ها	اول	بوستر اول	بوستر دوم	بوستر سوم	آخرین تزریق
غلظت ایمونوژن	50 میکروگرم	25 میکروگرم	25 میکروگرم	25 میکروگرم	20 میکروگرم
نوع ادجوانت	کامل	ناقص	ناقص	ناقص	PBS استریل

2-13- تهیه بافرها در الایزا

2-13-1- بافر پوشش دهی[1]

بافر الایزا یا بافر کوت همان بافر فسفات سالین 10 میلی مولار، pH۷/۲ است. برای تهیه آن ابتدا با توجه به وزن مولکولی و تعداد مولکول آب بکار رفته، استوک 100 میلی مولار Na2HPO4 و NaH2PO4 به طور جداگانه در دو بالن ژوژه 500 میلی لیتری تهیه گردید. در مرحله بعد نسبت های مشخصی از هر دو استوک (به ترتیب حدود 40 به 60) با هم ادغام و توسط آب مقطر 10 برابر رقیق گردید. به ازای هر لیتر بافر تهیه شده 8 گرم Nacl و ۰/۱ گرم تیمروسال به عنوان نگه دارنده افزوده و در نهایت pH محلول فوق توسط استوک های رقیق شده تنظیم شد.

[1] Coating Buffer

2-13-2- محلول بلاکه کننده[1]

محلول 0/5گرم درصد BSA در بافر فسفات سالین 10 میلی مولار،7/2 pHبه عنوان محلول بلاک کننده استفاده شد. به منظور جلوگیری از آلودگی و ماندگاری بافر، 0/1 ٪ سدیم آزاید به آن افزوده شد.

2-13-3- بافر سنجش[2]

بافر فسفات سالین 10 میلی مولار،7/2 pHحاوی 0/1 گرم درصد سرم آلبومین گاوی(BSA) است. برای تهیه تمام رقت های سرمی و رقت های مختلف کونژوگه آنزیمی از بافر EIA استفاده شد. از آنجاکه سدیم آزاید مهار کننده آنزیم پراکسیداز است، بنابراین باید توجه شود درهنگام رقیق کردن کونژوگه آنزیمی پراکسیداز بافر سنجش فاقد سدیم آزاید باشد.

2-13-4- سوبسترای TMB

سوبسترا از ترکیب دو محلول به نسبت مساوی ایجاد می‌شود که در موقع استفاده باهم مخلوط می‌شوند. برای تهیه محلول اول ابتدا محلول 0/1 مولار سیترات سدیم (2/9 گرم سیترات سدیم در 100 سی سی آب مقطر) تهیه و سپس 300 میکرولیتر از محلول 33 ٪ پراکسیداز هیدروژن (H_2O_2) به آن افزوده شد. این محلول در ظرف تیره و در یخچال نگه داری گردید. برای تهیه محلول دوم ابتدا محلول 0/1 مولار اسید سیتریک (1/9 گرم اسید سیتریک در 100 سی سی آب مقطر حل شد) تهیه و سپس 20 میلی گرم تترامتیل بنزیدین (TMB) حل شده در 3 میلی لیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO) به آن اضافه شد.

[1] Blocking Buffer
[2] Assay Buffer

2-13-5- معرف متوقف کننده[1]

از اسید کلریدریک 2 نرمال به عنوان معرف متوقف کننده استفاده شد. برای تهیه آن 12 میلی لیتر اسید کلریدریک 12 نرمال با آب مقطر به حجم ۶۰ میلی لیتر رسانیده شد.

2-14- تیتراسیون سرم موش در آزمون الایزای غیر مستقیم

به رقتی از سوپرناتانت که 50٪ اتصال[2] را ایجاد نماید تیتر آنتی بادی گفته می‌شود و نشان دهنده میزان غلظت و میل ترکیبی آنتی بادی است. جهت بررسی میزان آنتی بادی اختصاصی بر علیه تروپونین I قلبی در سرم موش ایمونیزه شده، پس از خونگیری ها، خون موش سانتریفوژ می شد تا سرم آن جدا گردد. سرمها تا روز آزمون در دمای 20- نگهداری گردید. آزمونی که در آن سرم موش بررسی گردید، یک الایزای غیر مستقیم بود که بر روی تروپونین I قلبی انجام گرفت. تمام مراحل این الایزا در حجم 100 میکرولیتر انجام یافت.

1. برای کوت کردن آنتی ژن، 5µg/ml از تروپونین I قلبی(نوترکیب،پپتید ها،تخلیص شده) در بافر PBS تهیه شده و در هر حفره پلیت 96 تایی الایزا ریخته شد.
2. پلیت بصورت شبانه در دمای $4C^{o}$ انکوبه گردید.
3. حفرات پس از خالی کردن محلول آنتی ژن ، 3 بار و به مدت 3 دقیقه با بافر شستشو، شسته شدند.
4. بافر بلاکینگ(Skim milk) 5٪ به تمام حفرات اضافه گردید.
5. پلیت به مدت 1 ساعت در دمای $37C^{o}$ انکوبه گردید.
6. مرحله شستشو تکرار شد.
7. رقتهای مختلف سرم موش(1:3200 – 1:5000) به حفرات اضافه گردید.

[1] Stop Buffer
[2] PercentBinding

8. پلیت به مدت 1/5 ساعت در دمای 37C° انکوبه شد.
9. مرحله شستشو تکرار گردید.
10. کونژوگه HRP متصل به آنتی بادی ضد آنتی بادی موشی با رقت مناسب در بافر بلاکینگ به تمام حفرات اضافه شد.
11. پلیت به مدت 1/5 ساعت در دمای 37C° انکوبه شد.
12. مرحله شستشو تکرار گردید.
13. محلول سوبسترا-کروموژن TMB به حفرات اضافه شده و پلیت حدود 15-10 دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه گردید.
14. واکنش در تمام حفرات با افزودن محلول متوقف کننده خاتمه یافته و جذب نوری (OD) در طول موج 450 نانومتر قرائت گردید.

2-15- تولید سلولهای هیبریدوما

برای بدست آوردن سلولهای هیبریدومای تولید کننده آنتی بادی های منوکلونال (MAb) موشی اختصاصی علیه تروپونین I قلبی ، باید سلولهای طحالی موش دارای بالاترین تیتر آنتی بادی با سلولهای میلومای موشی SP2/0 فیوژن داده شوند. کلیه مراحل کارهای مقدماتی و اصلی در ادامه توضیح داده می‌شود:

2-15-1- کشت سلول

2-15-1-1-تهیه محیط کشت RPMI-1640

- ۱۰/٤گرم پودر محیط کشت RPMI توزین و در یک ظرف تمیز در پیچ دار ۵۰۰ میلی لیتری ریخته شد.

- ۲ گرم سدیم بی کربنات به محتوای فوق افزوده شد.

- ۰/۱۱ گرم سدیم پیروات و ۰/٦ گرم پودر گلوتامین به ظرف فوق افزوده شد.

- آب دوبار تقطیر و دیونیزه (به منظور جلوگیری از دخالت یون ها و فاکتورهای دیگر در کشت سلول) به ظرف فوق افزوده و حجم آن به ۹۰۰ میلی لیتر رسانیده شد. پس از مخلوط کردن ترکیب فوق با استفاده از کاغذ صافی معمولی فیلتر شد .

- pH محیط تهیه شده فوق با استفاده از اسید کلریدریک بین ۷/٤ – ۷/۲ تنظیم شد.

- محیط کشت تهیه شده در ظرف های ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی لیتری الیکوت و در 8-2 سانتی گراد نگهداری شد.

2-15-1-2- تهیه محیط کشت نهایی

به هر یک از ظروف حاوی محیط کشت اولیه سرم جنین گوساله (FCS)[1](10- 5 ٪) و آنتی بیوتیک پنی سیلین – استرپتومایسین (از محلول x ۱۰۰ به میزان لازم) و در صورت نیاز آنتی مایکو پلاسما(پلاسموسین) طبق دستور شرکت سازنده افزوده می‌شود. به این ترتیب محیط کشت کامل 5٪ و یا 10 ٪FCS به دست می آید.

FCS یا FBS[2] حاوی فاکتورها و عوامل رشد سلول بوده و در تهیه محیط کشت مورد استفاده قرار می گیرد. بسته به نوع محیط کشت استفاده شده، درصدهای مختلفی از آن با محیط کشت مخلوط می‌شود.

[1]Fetal Calf Serum
[2] Fetal Bovine Serum

اکثریت سلول ها در محیط های حاوی 5 تا 10٪ سرم به خوبی رشد می‌کنند. معمولا از FCS دکمپلمان شده استفاده می‌گردد (نیم ساعت قرار دادن در حمام ٥٦ درجه سانتیگراد) که عوامل سمی غیر فعال شوند.

2-15-2- تهیه آنتی بیوتیک

برای تهیه آنتی بیوتیک، 200 میلی گرم پودر استرپتومایسین و 122 میلی گرم پودر پنی سیلین V در 20 میلی لیتر آب مقطر حل شد و پس از فیلتر کردن، در میکروتیوپ های یک میلی لیتری استریل الیکوت و در فریزر 20- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. آنتی بیوتیک تهیه شده فوق 100X بوده و یک ویال از آن به 100 میلی لیتر محیط کشت افزوده و مورد استفاده قرار می‌گیرد.

2-15-3- تهیه محیط انجماد[1]

برای تهیه 10 میلی لیتر از این محیط ابتدا به یک فالکون استریل 10 میلی لیتری که درون یک بشر حاوی یخ قرار گرفته است، 7 میلی لیتر محیط RPMI [2]، ۲ میلی لیتر FCS و 1 میلی لیتر محلول DMSO[3] استریل افزوده شده و سپس مخلوط گردید. برای رشد سلول های هیبریدوما می‌توان از محیط حاوی FCS٪90 و DMSO٪10 نیز استفاده کرد. این محیط قبل از شروع انجماد سلولی ساخته شده و برای ذخیره می‌تواند در دمای 20- درجه سانتی گراد نگهداری شود.

2-15-3-1- کشت سلول های منجمد شده میلومای موشی SP2/0

1. ابتدا محیط کشت RPMI حاوی 10 درصد FBS و RPMI بدون سرم به بیرون از یخچال منتقل شدند تا به دمای محیط برسند.

[1] Freezing Media
[2] Roswell Park Memorial Institute Medium
[3] Dimethyl Sulfoxide

2. کرایوتیوب حاوی سلول مورد نظر از تانک ازت خارج و در داخل حمام آب گرم 37 C^{o} ذوب شد.
3. پس از ذوب شدن محتویات کرایوتیوب، سلول ها بلافاصله به فالکون 15 میلی لیتری حاوی 3-4 میلی لیتر محیط کشتسرم دار منتقل و بخشی از سلولها برای شمارش و تعیین در صد سلوهای زنده برداشته شد. سلولها به مدت 7 دقیقه در 350 g سانتریفوژ شدند.
4. مایع رویی خالی شده و پس از افزودن RPMI حاوی 20٪ FBS ، سلول ها بسته به تعداد، در پلیت های 24 تایی و یا فلاسک 25 cm^2 کشت داده شدند.
5. وضعیت سلول‌ها در روزهای بعد به طور مداوم بررسی شده و پس از رسیدن سلولها به تراکم[1] حدود 70٪ ، سلول‌ها به فلاسک های بزرگتر منتقل شدند. سلول‌های مازاد مجدداً فریز گردیدند.

2-15-4- تهیه سوپ کشت سلول های ماکروفاژ

1. برای تهیه سلول های مغذی[2]، 48-24 ساعت قبل از انجام فیوژن، ماکروفاژهای صفاقی یک موش ایمونیزه نشده کشت داده شد.
2. پس از نخاعی کردن موش و ضدعفونی کردن ناحیه شکمی، پوست شکم در شرایط استریل توسط قیچی باز شد و 5 میلی لیتر محیط کشت بدون سرم گرم به حفره صفاقی حیوان تزریق شد.
3. مایع تزریق شده توسط پیپت پاستور جمع آوری و در لوله فالکون 15 میلی لیتری ریخته شد.

[1]Confluency
[2]Feeder Cells

4. سلول های صفاقی دو بار با RPMI بدون سرم شستشو شدند (سانتریفوژ به مدت 10 دقیقه ، 22 درجه سانتیگراد، 380 g).
5. پس از سانتریفوژ نهایی، مایع رویی خارج و سلول های ته لوله در 15 میلی لیتر RPMI حاوی 20FBS٪ به حالت سوسپانسیون درآمدند.
6. سلول ها به فلاسک 50 میلی لیتری منتقل و پس از 48-24 ساعت کشت در انکوباتور CO_2 دار، محیط رویی سلول ها جمع آوری به داخل لوله منتقل گردید.
7. پس از سانتریفوژ به مدت10 دقیقه در دمای 22 درجه سانتیگراد و دور 350 g، محیط رویی جمع آوری گردید.

2-15-4-1- جداسازی سلول های طحال از موش های ایمونیزه شده

1. پس از انتخاب موش مناسب از طریق تعیین تیتر آنتی بادی اختصاصی به روش الایزا و نخاعی کردن حیوان، طحال در شرایط استریل و زیر هود لامینار خارج شد.
2. موش از پهلوی راست بر روی تخته تشریح فیکس شد و پس از ضدعفونی کردن پوست با الکل و باز کردن پوست پهلوی چپ توسط قیچی جراحی، طحال به دقت و در شرایط استریل خارج شد.
3. طحال در پلیت حاوی محیط کشت قرار داده شده و سلول های طحالی از طریق پرفیوژن طحال با سرنگ حاوی محیط کشت خارج شدند. سلول های بدست آمده، با محیط کشت 2 بار شستشو و شمارش شدند.

2-15-5- تعیین درصد زنده ماندن سلول های Sp2/0

ابتدا رنگ تریپان بلو (0/4 گرم درصد میلی لیتر محلول 0/15 مولار نمک کلرید سدیم) تهیه شد و 25 میکرولیتر از سوسپانسیون کاملا مخلوط شده سلولی با 25 میکرولیتر رنگ تریپان بلو در یک میکروتیوپ مخلوط شده سپس یک قطره از آن بر روی لام نئوبار شمارش شد. از دیواره سلولهای مرده رنگ به داخل سلول نفوذ می‌کند. پس سلولهای مرده رنگی وسلولهای زنده فاقد رنگ هستند. بعد از شمارش سلولهای زنده و مرده درصد سلولهای زنده محاسبه شد. عمل شمارش باید سریعاً انجام گردد زیرا در غیر این صورت سلولهای زنده نیز رنگ پذیر شده و باعث اشتباه در شمارش خواهد شد. با توجه به معادله زیر می‌توان درصد زنده بودن سلولها را محاسبه نمود .همچنین شمارش تعداد سلول های SP2/0 به طریق زیر است:

درصد زنده بودن =(تعداد سلول زنده /تعداد کل سلول) ×100

$N = nR \times 10^4 V$

N=تعداد کل سلول ها

V=حجم کل محیط حاوی سلول ها بر حسب میلی لیتر

n=تعداد سلولهای شمارش شده در 16 خانه ای هموسایتومتر

R=ضریب رقت

2-15-6- پروتکل فیوژن

1. سلول های SP2/0 و سلول های به دست آمده از طحال موش های ایمونیزه شده به طور جداگانه 2 بار با محیط RPMI بدون سرم شستشو شدند (سانتریفوژ به مدت 5 دقیقه در دمای 22 درجه سانتیگراد و g 370).
2. تعداد دقیق سلول ها و درصد زنده ماندن آنها توسط لام هموسیتومتر شمارش شد.
3. در یک لوله فالکون 50 میلی لیتری استریل، سلول های SP2/0 به نسبت 3:1 با سلول های طحالی مخلوط شده و سوسپانسیون سلولی به مدت 5 دقیقه در دمای 22 درجه سانتیگراد با g 300 سانتریفوژ شد.
4. پس از خارج کردن مایع رویی، رسوب سلولی 2 بار با محیط RPMI گرم بدون سرم شستشو شد.
5. پس از خالی کردن مایع رویی، قطرات آخر با پیپت پاستور به دقت برداشته شد.
6. به رسوب سلولی، 1000 میکرولیتر پلی اتیلن گلیکول 1500 (PEG) گرم (37 درجه سانتیگراد) به آرامی و در مدت زمان یک دقیقه در حالیکه فالکون حاوی سلول ها تکان داده می شد، اضافه گردید.

   نکته: قبل از انجام فیوژن، PEG در یک سرنگ انسولین استریل کشیده شده و در انکوباتور 37 درجه سانتیگراد قرار داده شد.

7. بلافاصله پس از اضافه کردن PEG حدود 20 میلی لیتر محیط RPMI گرم بدون سرم به سوسپانسیون سلولی به تدریج و آهسته اضافه شد(طی زمان حدود 6 دقیقه، دقیقه اول بدون حرکت).

8. سلول ها 2 بار با محیط RPMI گرم بدون سرم شستشو شدند (سانتریفوژ به مدت 5 دقیقه در دمای 22 درجه سانتیگراد، 300 g).
9. بر روی رسوب سلولی محیط کشت پایه فیوژن (RPMI حاوی 20٪FBS)روی سلولهای فیدر اضافه شد.
10. سلول های حاصل از فیوژن به میزان 150-100 هزار سلول به ازاء هر حفره، درون حفره های های پلیت 96 حفره تقسیم شدند.
11. سه ستون اول از پلیت کشت 96 حفره به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. در ستون اول، سلول های SP2/0 بدون محیط انتخابی HAT ، در ستون دوم، سلول های SP2/0 به همراه محیط انتخابی HAT و در ستون سوم، سلول های هیبریدومابدون محیط انتخابی HAT کشت داده شدند.
12. پلیت های کشت سلول در انکوباتور CO_2 قرار داده شدند.
13. پس از 24 ساعت، 100 میکرولیتر از HAT (2x) به چاهک های پلیت 96 حفره اضافه شد.
14. 3-2 روز پس از انجام فیوژن، 50 میکرولیتر از مایع رویی چاهک ها خارج و 50 میکرولیتر محیط پایه فیوژن اضافه گردید.
15. پلیت های فیوژن، بعد از این مرحله، هر روز در زیر میکروسکوپ اینورت از نظر رشد هیبریدوما ها و عدم آلودگی بررسی شدند.

2-15-7- غربالگری سلول های هیبریدوما

بعد ازگذشت 14-10 روز از فیوژن، محلول رویی هیبریدوماهایی که به اندازه کافی رشد کرده‌اند از لحاظ وجود آنتی بادی اختصاصی بر علیه آنتی ژن مورد نظر با استفاده از آزمون الایزای غیر مستقیم مورد بررسی قرار گرفتند.

2-15-8- کلون کردن[1] با روش رقت سازی کاهشی[2]

از آنجائیکه حفرات مثبت از نظر تولید آنتی‌بادی ممکن است حاوی انواعی از هیبریدوما، اعم از هیبریدومای مولد، غیر مولد یا بیش از یک هیبریدوما مولد باشند، بنابراین بایستی به طریقی این سلول‌ها را در حفرات پلیت 96 حفره تقسیم نمود که در هر حفره حداقل یک سلول قرار گیرد. جهت اطمینان از تک کلون بودن سلول‌ها از یک طرف و پایداری تولید آنتی‌بادی در سلول‌ها، عمل رقت سازی کاهشی را بایستی 4 مرتبه تکرار و نیز چاهک‌ها را از نظر وجود یک سلول در آنها بطور دقیق با میکروسکوپ بررسی کرد.

در عمل رقت سازی کاهشی ، تک کلون‌ها بایستی توسط محیط مغذی که حاوی انواع فاکتورهای رشد است حمایت شوند. برای این منظور از سوپرناتانت ماکروفاژهای صفاقی موش که در محیط RPMI حاوی ٪20 FBS کشت داده شده‌اند استفاده می‌شود.

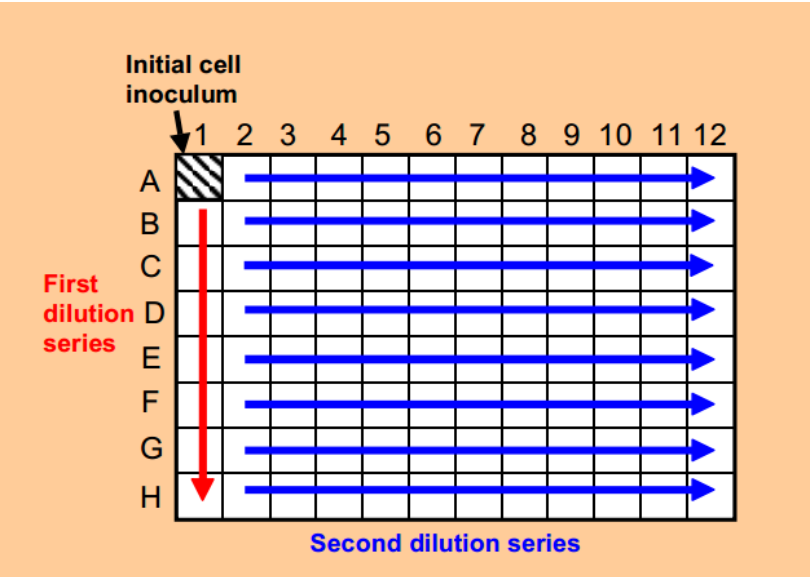
2-15-8-1- روش اول:

1. یک پلیت 96 خانه ای حاوی لایه مغذی تهیه شد و به مدت 48 ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد حاوی ٪5CO_2قرار داده شد.
2. سلول‌های هیبریدومای موجود در داخل حفره‌های پلیت 96 حفره توسط سمپلر 100 میکرولیتر بخوبی مخلوط و سپس شمارش شدند.
3. مطابق شکل 2-2مقدار 100 میکرولیتر از محیط حاوی لایه مغذی که روز قبل ریخته شده است وجود دارد(باستثنای A1)
4. تعداد 4000 سلول(2×10^4 سلول/ میلی لیتر) در حفره A1 ریخته شد.سپس مطابق شکل2-2 با یک سمپلر 100 میکرولیتر از A1 به H1 انتقال داده شد.در این انتقال بایستی در هر چاهک سلولها خوب مخلوط گردد.

[1]Cloning
[2] Limiting Dilution

5. سپس با سمپلر 8 کاناله از سمت چاهک شماره 1 به سمت چاهک 12 مقدار 100 میکرولیتر همزمان با مخلوط[1] نمودن،انتقال داده شدند.
6. در انتقال سلول ها از چاهک A1 به H1 و نیز سپس از 1 به 12 در هر بار انتقال سلول ها 1:2 رقت داده شدند.
7. پس از رقت سازی مقدار 100 میکرولیتر به تمام چاهک ها محیط کامل اضافه گردید.
8. سپس پلیت 96 خانه در داخل انکوباتور 37 درجه قرار داده شد.
9. حدود یک هفته تا 10 روز بعد، که رشد هیبریدوماها به حد نصاب رسید، مایع رویی آنها از نظر تولید آنتی‌بادی منوکلونال در آزمون الایزای غیر مستقیم بررسی شدند. حفراتی که تک کلون بود و با تعداد سلول کم، جذب نوری (OD) بالایی را در آزمون الایزا نشان دادند، برای کلونینگ مجدد انتخاب شدند.
10. برای انجام کلونینگ مجدد مراحل فوق دقیقاً تکرار شد. هرچند ممکن است در غربالگری دوم تمام حفرات حاوی کلون‌های سلولی باشند که از نظر تولید آنتی‌بادی مثبت باشند اما برای اطمینان بیشتر عمل کلونینگ 4 بار تکرار گردید.

[1] Pipetting



شکل 2-2- تک کلون سازی با روش رقت سازی محدود

11.در کلونینگ نهایی، بهترین کلون انتخاب گردید. این کلون به حفرات پلیت 24 تایی منتقل، تکثیر و وارد فلاسک شد. هیبریدوماها تکثیر شده و از آنها ذخیره تهیه شد. بخشی از سلولها نیز به حفره صفاقی موش جهت تولید آسیت تزریق گردید. همه کلون ها با روش الایزای غیر مستقیم غربالگری شدند.

2-15-8-2- روش دوم:

مراحل انجام تک کلون سازی به قرار ذیل می‌باشد:

- یک پلیت 96 خانه ای حاوی لایه مغذی تهیه شد و به مدت یک شب در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد حاوی CO_2٪5 قرار داده شد.

- 25 میکرولیتراز سوسپانسیون سلولی به 25 میکرولیتراز محلول رنگ تریپان بلو افزوده شد و بلافاصله سلول ها شمارش گردید.

- پس از شمارش 30 میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی را به 270میکرولیتر محیط کامل(RPMI حاوی FCS ۱۰٪)افزوده و به طور کامل مخلوط گردید (میکروتیوپ شماره 1).

- مجددا 30 میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی موجود در میکروتیوپ شماره 1 را به 270میکرولیتر محیط کامل افزوده و به طور کامل آن را مخلوط گردید. بنابراین با انجام مراحل 3 و 4 در مجموع سوسپانسیون سلولی اولیه 100 بار رقیق شد (میکروتیوپ شماره 2).

پس ازشمارش سلول ها در مرحله 2 تعداد سلول به این ترتیب محاسبه شد. مثلا اگر مجموع تعداد سلول های شمارش شده در ٤خانه مربوط به WBC لام نئوبار 160 سلول باشد:

$$N= n\times R\times 10^4 /ml$$

$n=160:4=40$

$R= 2$ (فاکتور رقت)

$$N= 40\times 2\times 10^4 \text{ cell/ml}=8\times 10^5 \text{ cell/ml}$$

در نهایت بعد از 100 بار رقیق کردن تعداد سلول ها در میکروتیوپ شماره 2، 8000 سلول در هر میلی لیتر از محیط کشت خواهد بود.

- به 50 میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی میکروتیوپ شماره 2، 350 میکرولیتر محیط کامل افزوده شد. در این حالت سوسپانسیون سلولی به نسبت 1 به 8 رقیق شده و هر میلی لیتر محیط کشت حاوی

1000 سلول و یا به عبارت دیگر هر یک میکرولیتر آن حاوی یک سلول خواهد بود (میکروتیوپ شماره3)

- 100میکرولیتر از میکروتیوپ شماره 3 که حاوی 100 عدد سلول بود را با محیط کامل FCS٪20 در لوله فالکون به حجم 10میلی لیتر رسانده شد. در این حالت هر 100میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی این لوله حاوی 1 عدد سلول خواهد بود.

- 100میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی فالکون بالا به هر چاهک 96 خانه ای که حاوی لایه مغذی بود افزوده شد و پلیت به انکوباتور 37 درجه سانتی گراد حاوی CO_2٪5منتقل شد.

- بعد از 7 تا 10 روز چاهک های دارای تنها یک کلون علامت گذاری شدند و زمانی که جمعیت سلولی آنها بیش از 75٪ کف پلیت را پر نمود مایع رویی آنها برای بررسی وجود آنتی بادی اختصاصی علیه تروپونین I به روش مشابه تعیین تیتر آنتی بادی مورد بررسی قرار گرفت. تک کلون های مترشحه،تکثیر شده و سلول های پایدار به عنوان ذخیره در دسترس فریز شده، هم در 70- درجه و هم در تانک ازت ذخیره شدند.

2-15-9- تولید آسیت برای تهیه مقادیر انبوه آنتی بادی های منوکلونال موشی

بدلیل توانایی رشد زیاد سلولهای هیبریدوما در حفره صفاقی موش های BALB/c که منجر به ترشح زیاد آنتی بادی در مایع صفاقی (آسیت) می‌شود، از کلونهای نهایی شده آسیت تهیه گردید.

1. 0/5 میلی لیتر پریستان[1]با سرنگ انسولین به داخل صفاق موش BALB/c تزریق شد.
2. یک هفته پس از تزریق پریستان، 5 میلیون سلول هیبریدوما که در فاز رشد لگاریتمی بودند، 2 بار با بافر PBS شستشو شدند تا تمام FBS از آن خارج شود.

[1]Pristane

3. سلول های هیبریدوما در 0/5 میلی لیتر بافر PBS به حالت سوسپانسیون درآمد و به صورت داخل صفاقی به موش تزریق گردید.
4. در عرض یک هفته تا 10 روز که شکم موش به اندازه کافی بزرگ شد، موش نخاعی گردیده و پس از باز کردن پوست شکم، مایع صفاقی با استفاده از پیپت پاستور تخلیه و به یک فالکون 15 میلی لیتری منتقل شد.
5. مایع صفاقی به مدت 5 دقیقه با دور 3000 g سانتریفوژ گردید. در صورت وجود لایه روغنی در بالای مایع صفاقی، این لایه جدا شده و سانتریفوژ مجدداً انجام شد. سپس مایع جدا و در 20- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

2-16- تخلیص و تعیین خصوصیات آنتی بادی های منوکلونال موشی

2-16-1- تعیین کلاس (ایزوتیپ) منوکلونال آنتی بادیبا استفاده از کیت Isostrip

1. 100-50 میکرولیتر از سوپ هیبریدومای اختصاصی تروپونین I قلبی به لوله مخصوص موجود در داخل کیت اضافه کرده و تا حل شدن پودر آبی رنگ موجود در لوله منتظر ماندیم.
2. استریپ موجود در کیت را درون لوله حاوی سوپ هیبریدوماها قرار داده شد. پس از مدت 5-1 دقیقه باندهای آبی رنگ مقابلکلاس زنجیره های سبک و سنگین بر روی استریپ ظاهر گردید.
3. باند های رنگی هم نشان دهنده ایزوتیپ زنجیره سبک (کاپا و یا لامبدا) و هم ایزوتیپ زنجیره سنگین (IgM ویا زیرکلاسهای IgG موشی) می باشند. بر اساس باندهای رنگی، نتایج تفسیر گردید.

2-16-2- تخلیص آنتی‌بادی

2-16-2-1- تخلیص آنتی بادی پلی کلونال خرگوشی با استفاده از ستون DEAE[1]

2-16-2-1-1- آماده‌سازی رزین مبادله‌کننده آنیون دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز

1 گرم از DEAE سلولز را در یک بشر 250 میلی‌لیتری ریخته و حدود 100 میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده شد.آن را به آرامی هم زده و سپس مدتی بی‌حرکتقرارداده شد، تا اینکه ذرات درشت‌تر ته‌نشین شده، ولی ذرات ریز به صورت معلق باقی ماندند.این ذرات را با دکانته کردن همراه با آب مقطر خارج گردید.این کار آن قدر تکرار شد تا اینکه محلول رویی صاف و شفاف ماند و سپس حدود سه برابر حجم ژل به آن 0/5 HCl نرمال افزوده و برای نیم ساعت آن را به آرامی به هم زدیم و به دنبال آن، آن را بر روی کاغذ صافی معمولی ریخته و آن قدر با آب مقطر شستشو دادیم تا pH محلول زیر صافی کاملاً خنثی شد.

در مرحله‌ی بعد، ژل را از روی کاغذ صافی به بشر انتقال داده و حدود سه برابر حجم ژل به آن محلول 0/5 NaOH نرمال افزوده و مثل مراحل HCl عمل شد.ژل روی صافی را در بافر فسفات 17/5 میلی‌مولار و 6/3 pHغوطه‌ور نموده و پس از هم زدن ملایم به مدت نیم ساعت، آن را بی‌حرکت قراردادخ تا ژل ته‌نشین شود.سپس بافر رویی را تعویض کرده و این عمل تکرار گردید تا جایی که pH محلول رویی برابر 6/3 شود.در این حالت ژل آماده استفاده است.

2-16-2-1-2 - مراحل تخلیص

2-16-2-1-2-1- جداسازی پروتئین‌ها از سرم

برای این منظور از نمک سولفات آمونیوم 33٪ استفاده شد.به ازای هر میلی‌لیتر سرم 33٪ گرم سولفات آمونیوم وزن کرده و به صورت پودر بسیار نرم در آورده شد.سپس آن را آرام‌آرام به سرم مورد

[1] Diethylaminoethyl

نظر که بر روی همزن مغناطیسی در حال به هم خوردن بود، افزوده شد.بعد از آن، به منظور کامل شدن عمل رسوب‌گذاریپروتئین‌ها، هم زدن ملایم نمونه را به مدت نیم ساعت ادامه یافت.

برای جدا کردن رسوب از محلول رویی آن را در دمای 25درجه سانتی‌گراد و سرعت 3000 دور در دقیقه به مدت 30 دقیقه سانتریفوژ گردید؛ محلول رویی را بیرون ریخته و رسوب را در حداقل مقدار بافر فسفات مذکور حل گردید؛ سپس این محلول را به کیسه‌ی دیالیز با اندازه‌ی منافذ 12 کیلودالتون انتقال داده و در برابر همین بافر فسفات به مدت 24 ساعت با سه بار تعویض دیالیز گردید.

2-16-2-1-2-2- جداسازی گاماگلوبولین‌ها از سایر پروتئین‌ها با استفاده از رزین مبادله‌کننده‌ی یونی:

ابتدا میزان پروتئین محلول دیالیز شده به روش براد فورد اندازه‌گیری شدو با توجه به اینکه به ازای هر 75 میلی‌گرم پروتئین 2 میلی‌لیتر ژل لازم بود، میزان مورد نیاز ژل را در یک فالکون 15 میلی‌لیتری قرار داده و کروماتوگرافی به صورت Batch در آن انجام شد. بدین ترتیب که پروتئین دیالیز شده را بر روی ژل قرار داده و چندین مرتبه فالکون را تکان داده و نیم ساعتبی‌حرکت گذاشته شد. پس از ته‌نشین شدن ژل فاز بالایی را که حاوی گاماگلوبولین ها بود را جدا گردید.

پس از تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد، نمونه‌ی تخلیص شده بر روی ژل SDS-PAGEآنالیز شد.

2-16-2-2-تخلیص آنتی بادی های منوکلونال ضد تروپونینI قلبی با ستون افینیتی G

برای تخلیص آنتی بادی های نهایی شده ضد تروپونین I قلبی از خاصیت اتصالی پروتئین Gبه[1] بخش Fcآنتی بادیIgG موشی استفاده شد. SPG بصورت متصل به رزین سفاروز در ستون افینیتی از پیش آماده شده، وجود دارد.

[1]Streptococcal Protein G(SPG)

1. ابتدا مایع آسیت بدست آمده از هیبریدومای تولید کننده آنتی بادی ضد تروپونین I قلبی به مدت 10 دقیقه و در 3000 g سانتریفوژ شده و با PBS به نسبت 1به 3 مخلوط گردید. سپس با فیلتر 0/45 میکرون فیلتر شد تا تمام ذرات نامحلول آن گرفته شود.
2. طی این مدت، از ستون SPG با حجم 5 میلی لیتر سفاروز، بافر PBS به اندازه 1/5 برابر void volume ستون با سرعت 25 میلی لیتر در ساعت عبور داده شد تا ستون شسته شود.
3. نمونه آسیت با سرعت 15 میلی لیتر در ساعت از ستون عبور داده شد تا تمام آنتی بادی های موجود در آن به SPG متصل گردند. مایع خروجی به عنوان محلول متصل نشده، جمع آوری گردید.
4. در مرحله بعد، ستون با بافر PBS شسته شده و تمام محلول خروجی بصورت الیکوتهایی جمع آوری و ODآنها در طول موج 280 نانومتر خوانده شد.
5. وقتی OD بافر خروجی به صفر رسید، بافر Glycin-HCl 0/1 مولار با pH 2.5 از ستون عبور داده شد تا آنتی بادی های متصل به ستون شسته[1] شوند.
6. الیکوتهای جمع آوری شده از بافر خروجی در طول موج 280 نانومتر تعیین OD شده و الیکوتهای دارای ODمناسب در یک لوله جمع آوری گردید.
7. محلول جمع آوری شده بصورت شبانه در دمای $4^{\circ}C$ در مقابل بافر PBS دیالیز شده و مجدداً تعیین OD و غلظت گردید.

2-17- روش برادفورد

روش برادفورد که برای تعیین غلظت پروتئین در بسیاری از آزمایشگاه ها استفاده می‌شود، یک روش سریع و نسبتا دقیق برای تعیین غلظت پروتئین در حد میکروگرم می‌باشد. این روش نسبت

[1]Elute

به روش لوری ساده تر، سریعتر و حساس تر بوده و کمتر با اجزاء غیرپروتئینی نمونه ها تداخل می کند.

اتصال رنگ آبی کوماسی بلو G250 به پروتئین و تشکیل کمپلکس رنگی اساس روش برادفورد است. میزان پروتئین را می‌توان بوسیله تعیین میزان رنگ در شکل آنیونی آن تخمین زد، بنابراین جذب نوری محلول در 595 نانومتر قابل اندازه گیری است. رنگ کوماسی بلو به باقی مانده آرژنین و لیزین پروتئین ها متصل می‌شود. این اختصاصیت باعث ایجاد تنوع در اندازه گیری پروتئین های مختلف می‌شود و مهم ترین عیب این روش است. اما این عیب بوسیله عدم واکنش با ترکیبات پروتئینی دیگر متعادل می‌شود. روش اندازه گیری که در اینجا توضیح داده می‌شود سنجش ماکرو می‌باشد که برای اندازه گیری بین 10 تا 100 میکروگرم پروتئینمی‌باشد. در صورت بالا بودن غلظت پروتئین مورد نظر ابتدا آن را رقیق نموده و سپس غلظت اولیه در ضریب رقت ضرب شده و غلظت نهایی محاسبه گردد.

2-17-1- تهیه معرف برادفورد

100 میلی گرم پودر رنگ کماسی بلو G250 را در 50 میلی لیتر اتانول 95٪ مخلوط کرده و سپس 100 میلی لیتر اسید فسفریک 85 ٪ به آن افزوده شد. حجم محلول را توسط آب مقطر به یک لیتر رسانده و محلول حاصل توسط کاغذ واتمن شماره 1 فیلتر گردید. این معرف در دمای آزمایشگاه و در بطری تیره رنگ نگه داری شده و تا چند هفته پایدار است. در صورت رسوب معرف، باید آن را دوباره فیلتر نمود.

2-17-2- تهیه استانداردهای پروتئینی

در ابتدا آلبومین سرم گاوی (BSA) با غلظت 1میلی گرم در میلی لیتر در آب مقطر حل و به عنوان محلول استوک در نظر گرفته شد. سپس از این استوک غلظت های مختلف استاندارد تهیه و با افزودن سدیم آزید یا تیومرسال (0/01 گرم درصد) در 4- درجه سانتی گراد نگهداری شد. روش تهیه استانداردهای پروتئینی با غلظت های مختلف BSA در جدول 5-2 نشان داده شده است. به دلیل

اتصال رنگ به کووت کوارتز (سیلیکا)، این کووت ها برای سنجش غلظت پروتئین قابل استفاده نمی‌باشد. ظروف پلاستیکی و شیشه ای مورد استفاده نیز باید تمیز بوده و در ابتدا با متانول و سپس آب مقطر شستشو داده شود (۱۳۸-۱۳۷).

جدول2-5- روش تهیه استانداردهای پروتئینی با غلظت های مختلف

شماره لوله	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷
حجم استاندارد (µl)	٥۰۰	۲٥۰	۱۰۰	٥۰	۲٥	٥	۰
حجم آب مقطر (µl)	۰	۲٥۰	٤۰۰	٤٥۰	٤۷٥	٤۹٥	٥۰۰
غلظت نهایی (µg/ml)	۱۰۰۰	٥۰۰	۲۰۰	۱۰۰	٥۰	۱۰	۰

2-17-3- روش کار

ابتدا در چند لوله شیشه ای 50 میکرولیتر محلول استانداردهای مختلف تهیه شده و 50 میکرولیتر از محلول پروتئینی مجهول (محلول حاوی آنتی بادی به عنوان لوله تست) ریخته و 2/5 میلی لیتر از معرف برادفورد به تمام لوله ها افزوده و پس از 2 تا 3 دقیقه جذب نوری لوله ها در طول موج 595 نانومتر اندازه گیری شد. در ضمن، قبل از خواندن جذب لوله ها، ابتدا دستگاه اسپکتروفتومتر با لوله بلانک که حاوی فقط 2/5 میلی لیتر معرف برادفورد بود صفر گردید. با رسم منحنی جذب نوری در مقابل استانداردها غلظت نمونه های مجهول محاسبه گردید .

2-18- الکتروفورز روی ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE)

الکتروفورز روی ژل پلی آکریل آمید حاوی SDSیک روش متداول در مطالعه پروتئین می‌باشد. این روش برای بررسی مراحل خالص سازی، محاسبه مقدار نسبی و تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها و پپتیدها به کار می‌رود. در ضمن با انجام روش بلاتینگ بعد از آن، امکان بررسی آنتی‌ژنیسیته یا تعیین توالی پروتئین‌ها و پپتیدها فراهم می‌شود.

قابلیت تفکیک کنندگی بسیار بالای SDS-PAGE عمدتا ناشی از وجود سدیم دو دسیل سولفات و ویژگی ژل پلی آکریل آمید در غربال پروتئین‌های مختلف است. SDS با اتصال به پروتئین‌ها بار طبیعی آن را می‌پوشاند و بار منفی با تراکم تقریبا مشابهی در مولکول بوجود می‌آورد. جداسازی پروتئین‌ها در این شرایط وابسته به اندازه مولکولی است و با توجه به اندازه منافذ ژل، حرکت پروتئین‌های کوچکتر با مزاحمت کمتر و حرکت پروتئین‌های بزرگتر با مزاحمت بیشتری همراه است. فاصله طی شده توسط پروتئین‌ها با وزن مولکولی آنها متناسب است و این موضوع اساس تعیین وزن مولکولی را در روش SDS-PAGE تشکیل می‌دهد.

مواد و وسایل مورد نیاز :

1- محلول آکریل آمید 30٪ (برای 100 میلی‌لیتر)

آکریل آمید	29/2 گرم
بیس آکریل آمید	0/8 گرم

در آب دیونیزه حل شده، پس از رسیدن به حجم با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شده و در ظرف تیره نگهداری می‌شود.

2- SDS 10٪ (برای 100 میلی‌لیتر)

SDS	10 گرم

در 100ml آب دیونیزه حل شده و در دمای محیط نگهداری می‌شود.

3- آمونیوم پرسولفات (APS) 10٪ (برای 10 میلی‌لیتر)

APS 1 گرم

در 10 میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شده و در 20°C- نگهداری می‌شود.

4- بافر ژل پایین (جداکننده): تریس1/5M، pH 8/8 (برای 100 میلی‌لیتر)

Tris-base 18 گرم

18 گرم تریس در 80 میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شده و پس از تنظیم pH به حجم رسانده و در دمای اتاق نگهداری می‌شود.

* این بافر 4x است، بنابراین در هنگام تهیه ژل یک حجم از آن با سه حجم از بقیه اجزای سازنده ژل مخلوط می‌شود.

5- بافر ژل بالا (متراکم کننده): تریس 0/5 M، pH 6/8 (برای 100 میلی‌لیتر)

Tris-base 6 گرم

6 گرم تریس در 80 میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شده و پس از تنظیم pH به حجم رسانده و در دمای اتاق نگهداری می‌شود.

* این بافر نیز 4x است. بنابراین در هنگام تهیه ژل یک حجم از آن با سه حجم از بقیه اجزای سازنده ژل مخلوط می‌شود.

6- بافر نمونه 4x (برای 10 میلی‌لیتر)

Tris-HCl1مولار، pH 6/8 2 میلی‌لیتر

گلیسرول 4 میلی‌لیتر

SDS	0/8 گرم
برموفنل بلو	8 میلی‌گرم
بتا–مرکاپتواتانل 14/7 مولار	0/4 میلی‌لیتر
EDTA 0/5 مولار	1 میلی‌لیتر
آب دیونیزه	2/6 میلی‌لیتر

7- بافر تانک الکتروفورز 1x (برای 1 لیتر)

Tris-base	3/03 گرم
Glycine	14/4 گرم
SDS	1 گرم

* pH بافر حدود 8/3 می‌باشد و نیازی به تنظیم ندارد.

8- TEMED

9- شاخص وزن مولکولی (Ladder) Fermentas

2-18-1- روش کار :

1-به نمونه بافتی هوموژن شده، لیزات سلولی ویا پروتئین مربوطه، بافر نمونه 4x اضافه شد و با ورتکس و پیپتینگ به خوبی مخلوط گردید. سپس به مدت 10 دقیقه جوشانده شد.

2- شیشه‌های مخصوص تهیه ژل با الکل 70٪ تمیز شد و پس از خشک شدن در کنار هم در جایگاه مخصوص آنها در دستگاه Biorad و به کمک گیره ثابت شد.

3- ژل SDS-PAGE دارای دو قسمت جداکننده و متراکم کننده است. ژل جداکننده طبق جدول 9-2 و10-2 تهیه شد.

اجزاء تشکیل دهنده ژل جداکننده (10٪).

نوع ماده اضافه شده	مقدار (ml)
آب دیونیزه	2/09
آکریل آمید 30٪	1/67
بافر ژل جداکننده	1/25
SDS (10٪)	0/1
APS (10٪)	0/05
TEMED	0/01
حجم نهایی	5

اجزاء تشکیل دهنده ژل متراکم کننده (5٪).

نوع ماده اضافه شده	مقدار (ml)
آب دیونیزه	2/7
آکریل آمید 30٪	0/8
بافر ژل متراکم کننده	1/67
SDS (10٪)	0/03
APS (10٪)	0/025
TEMED	0/001
حجم نهایی	5

4- بلافاصله پس از افزودن TEMED که باعث شروع واکنش رادیکالی و بسته شدن ژل می‌گردد، مواد فوق مخلوط شد و به آرامی در فاصله دو شیشه تا ارتفاع 3/4 شیشه‌ها ریخته شد. سپس روی آن با ایزوپروپانل پر شد.

5- پس از بسته شدن ژل جداکننده، ایزوپروپانل روی ژل را خالی کرده و فضای بین دو شیشه با کاغذ خشک شد. سپس ژل متراکم کننده که طبق جدول 10-2 تهیه می‌شود، در فاصله بین دو شیشه ریخته شد و بلافاصله شانه گذاری انجام شد.

6- پس از بستن ژل، قالب شیشه‌ای در تانک الکتروفورز قرار گرفت و بافر تانک 1x اضافه شد. سپس شانه به آرامی از فضای بین دو شیشه جدا گردید.

7- از نمونه‌های مورد نظر به مقدار 20µl و از شاخص وزن مولکولی به مقدار 5µl در چاهک‌ها ریخته و جریان الکتریکی با ولتاژ 100V برقرار شد.

8- پس از رسیدن رنگ به انتهای ژل، جریان را قطع کرده، قالب‌ها خارج و ژل از قالب‌ها جدا شد.

* در اینجا از ژل 10٪ برای جدا کردن پروتئین‌ها استفاده گردید.

* ژل پس از جدا شدن از قالب برای رنگ آمیزی با کوماسی بلو و یا بلاتینگ استفاده می‌شود.

2-18-2- ر نگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید با کوماسی بلو[1] R-250

کوماسی بلو پر استفاده‌ترین رنگی است که برای رنگ آمیزی پروتئین‌ها در الکتروفورز به کار می‌رود.

مواد و وسایل مورد نیاز :

1- محلول رنگ کننده کوماسی بلو (برای 1 لیتر)

کوماسی بلو R-250	1 گرم
متانول	450 میلی‌لیتر
اسید استیک گلاسیال	100 میلی‌لیتر

با آب دیونیزه به حجم می‌رسد.

[1] Comassie Blue

2- محلول رنگ زدا[1] (برای 1 لیتر)

متانول	400 میلی‌لیتر
اسید استیک گلاسیال	70 میلی‌لیتر

با آب دیونیزه به حجم می‌رسد.

3- شیکر

روش کار :

1- ژل برای مدت یک ساعت در محلول کوماسی بلو غوطه ور شد و به آرامی شیک گردید.

2- سپس رنگ تخلیه شد و ژل برای تمام مدت شب در محلول رنگ زدا قرار گرفت تا باندها بطور کامل ظاهر شوند. در این فاصله چندین بار محلول رنگ بر تجدید می‌شود. در این حال نیز ظرف محتوی ژل شیک می‌شود.

* اسید استیک باعث ثبات باندهای رنگ گرفته بر روی ژل می‌شود، به این ترتیب پس از رنگ زدایی ژل باندهای پروتئینی بی‌رنگ نمی‌شوند.

2-19- وسترن بلاتینگ[2]

وسترن بلاتینگ روشی قدرتمند جهت تایید حضور و صحت خصوصیات آنتی‌ژنیک پروتئین می‌باشد که بر اساس اتصال آنتی‌ژن و آنتی‌بادی عمل می‌نماید.

علاوه بر این، یک روش بسیار سودمند برای تعیین هویت و همچنین تعیین مقدار یک پروتئین خاص در یک مخلوط پروتئینی می‌باشد. در این روش نمونه حل شده توسط دترجنت‌ها، بوسیله الکتروفورز روی ژل پلی آکریل آمید حاوی SDS تفکیک شده، سپس به یک غشاء که معمولا از جنس نیتروسلولز

[1] Destaining
[2] Western Blotting

یا PVDF[1]می‌باشد، منتقل می‌گردد. غشاء نیتروسلولز نسبت به PVDF حساسیت بیشتری دارد. در روش وسترن بلات، غشاء در معرض آنتی‌بادی‌های اختصاصی برای پروتئین هدف قرار می‌گیرد. آنتی بادی اتصال یافته توسط آنتی‌بادی ثانویه‌ای که می‌تواند با یک رادیوایزوتوپ مثل I^{125} یا حامل آنزیمی مانند آلکالن فسفاتاز یا پراکسیداز نشاندار شده باشد از طریق رادیوگرافی یا تولید آنزیماتیک یک محصول رنگی تشخیص داده می‌شود. همچنین می‌توان از سوبسترای کمی‌لومینسانس بعد از افزودن آنتی‌بادی ثانویه استفاده کرد. بدین منظور بعد از انکوبه کردن غشاء با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه شده با پراکسیداز، از سوبسترایی استفاده می‌شود که در حضور پراکسیداز تبدیل به یک ماده نورزا می‌شود.

مواد و وسایل مورد نیاز :

1- محلول‌ها و ملزومات برای تهیه ژل پلی آکریل آمید

2- بافر انتقال یا بافر تانک وسترن (برای 600 میلی‌لیتر)

Tris-base	1/5 گرم
Glycine	7/2 گرم
متانول	100 میلی‌لیتر

* این محلول معمولا نیازی به تنظیم pH ندارد.

3- بافر TBS10x، pH 7/4 (برای 100 میلی‌لیتر)

Tris-HCl	12 گرم
NaCl	8/75 گرم

در آب دیونیزه حل شده و پس از تنظیم pH به حجم رسانده می‌شود.

4- بافر شستشو (برای 500 میلی‌لیتر)

[1] Polyvinylidene Difluoride

بافر TBS10x (pH 7/4) 50 میلی‌لیتر

Tween20 (0/1 V/V٪) 500 میکرولیتر

در آب دیونیزه حل شده به حجم رسانده می‌شود.

* pH این محلول نیز باید 7/4 باشد و چنانچه تنظیم نبود قبل از رساندن به حجم باید تنظیم گردد.

5- بافر بلاک کننده (برای 100 میلی‌لیتر)

بافر TBS10x (pH 7/4) 10 میلی‌لیتر

Tween20 100 میکرولیتر

Skim milk 3 گرم

در آب دیونیزه حل شده به حجم رسانده می‌شود.

* pH این محلول نیز باید 7/4 باشد و چنانچه تنظیم نبود قبل از رساندن به حجم باید تنظیم گردد.

6- آنتی بادی اولیه

برای این منظور 100µl از آنتی‌بادی منوکلونال تولید شده و تخلیص شده، در 10ml بافر شستشو حل شد.

7- Goat anti-mouse IgG HRP (1/1000)

برای این منظور 10µl از آنتی‌بادی در 10ml بافر شستشو حل شد.

8- محلول DAB[1] (برای 15 میلی‌لیتر)

آب دیونیزه 15 میلی‌لیتر

DAB 7/5 میلی‌گرم

[1] Diamino Benzidin

ایمیدازول 15میلی گرم

H_2O_2 30میکرولیتر

* این محلول سوبسترای آنزیم پراکسیداز است که در مرحله پایانی وسترن بلات به غشاء افزوده می‌گردد.

* یونهای فلزی باعث فعال شدن DABمی‌شود لذا باید از تماس پنس فلزی با آن اجتناب نمود.

9- غشاء نیتروسلولز

10- شاخص وزن مولکولی (Ladder)

11- تانک الکتروفورز مخصوص بلات

12- قالب‌ها، کاغذ صافی و غشاهای تراوا

13- منبع تغدیه الکتریکی

14- شیکر

2-20-1- روش کار :

وسترن بلات شامل چند مرحله است :

الف) الکتروفورز و انتقال :

1- ژل SDS-PAGE مطابق روش ذکر شده در مرحله تهیه شد.

2- اندکی پیش از پایان گرفتن الکتروفورز غشاهای تراوای مخصوص بلات در ظرف حاوی بافر انتقال قرار گرفتند و کاغذ نیتروسلولز به اندازه متناسب با ژل بریده شد و به مدت 10 دقیقه در ظرف حاوی آب مقطر قرار گرفت. (در صورت استفاده از غشای PVDF ، در ابتدا باید این غشا به مدت سی ثانیه در متانول و ده دقیقه در بافر انتقال وسترن قرار گیرد).

3- پس از پایان الکتروفورز، ژل از قالب خارج شد و ساندویچ ترانسفر (به ترتیب از قطب منفی به مثبت شامل: پد اسفنجی، کاغذ صافی فشرده، ژل، کاغذ نیتروسلولز، کاغذ صافی فشرده و پد اسفنجی) تهیه شد. در هنگام تهیه ساندویچ ترانسفر، حباب هوای بین لایه‌ها توسط غلطک خارج گردید.

4- ساندویچ فوق در قالب بلات قرار گرفت و به تانک الکتروفورز مخصوص بلات منتقل شد، آنگاه قالب یخ مخصوص در تانک قرار داده شد.

5- تانک با بافر انتقال پر شد و جریان الکتریکی با ولتاژ 100V به مدت 1 ساعت اعمال گردید.

ب) بلاکینگ غشاء :

6- پس از گذشت 1 ساعت، کاغذ نیتروسلولز با پنس خارج شد و به مدت 2 ساعت و در دمای $37^{\circ}C$ در بافر بلاک کننده قرار گرفت. ظرف محتوی کاغذ و بافر بلاک کننده بر روی شیکر-انکوباتور قرار داده شد.

ج) بلاتینگ :

7- بافر بلاک کننده تخلیه گردید و بخشی از غشاء بریده شد و در مجاورت آنتی بادی اولیه رقیق شده با بافر شستشو (به نسبت 1/100) قرار گرفت و برای تمام مدت شب در دمای $4^{\circ}C$ انکوبه گردید.

8- سپس آنتی‌بادی اولیه تخلیه شد و غشاء 3 بار، هر بار به مدت 5 دقیقه و با بافر شستشو شسته شد.

9- غشاء نیتروسلولزکه در مجاورت آنتی بادی اولیه رقیق شده با بافر شستشو قرار گرفته بود، با آنتیبادی ثانویه Goat anti-mouse HRPرقیق شده با بافر شستشو (به نسبت 1/1000) به مدت 1/5 ساعت در دمای $37^{\circ}C$ مجاور گردید.

10- غشاء 3 بار، هر بار به مدت 5 دقیقه با بافر شستشو شسته شد.

11- غشاء نیتروسلولز در سوبسترای DAB تازه تهیه شده تا ظهور باندها غوطه ور شد.

12- پس از ظهور باندها واکنش آنزیمی با آب مقطر متوقف گردید، آنگاه غشاء خشک و اسکن شد.

2-20- تعیین افینیتی (Affinity) آنتی بادی

از دید ترمودینامیک افینیتی یک آنتی بادی به یک آنتی ژن عبارت از مجموع نیروهای جاذبه و دافعه بین پاراتوپ واپی توپ مربوط به آن می باشد و به صورت K_a نشان داده می شود. واکنش آنتی بادی و آنتی ژن یک واکنش برگشت پذیر بوده و در شرایط تعادل به شکل زیر قابل توضیح است:

$$Ag+Ab \rightleftharpoons Ag\text{-}Ab$$

$$Ka=\frac{K_1}{K_2}=\frac{[Ab-Ag]}{[Ag][Ab]}$$

غلظت آنتی ژن آزاد :[Ag]

غلظت آنتی بادیآزاد:[Ab]

غلظت کمپلکس آنتی ژن و آنتی بادی: [Ag:Ab]

ثابت اتصال ویا افینیتی: K_a

در حقیقت K_a نشان دهنده حجمی است که یک مول از آنتی بادی در آن می‌تواند 50٪ آنتی ژنها را به خود متصل کند. واضح است که هرچه K_a یک آنتی بادی بیشتر باشد افینیتی آن نیز بیشتر بوده، در نتیجه آنتی بادی پیوند محکمتری با شاخص آنتی ژنیک برقرار می‌کند و تمایل کمتری برای جدا شدن آنتی ژن و آنتی بادی وجود دارد. و هر چه K_a یک آنتی بادی کمتر باشد یا به عبارت دیگر هر چه افینیتی آنتی بادی به آنتی ژن کمتر باشد، در این حالت تعداد آنتی ژن تمایل بیشتری به جدا شدن از آنتی بادیدارد.برای محاسبه افینیتی آنتی بادی از روش Beathy استفاده گردید(118).

در این روش غلظتهای مختلف از آنتی ژن تروپونین I نوترکیب در پلیتهای الایزا کوت شد به طوری که نسبت دو غلظت متناوب یک عدد صحیح (n) باشد. ابتدا غلظتهای متفاوت از آنتی بادی تخلیص شده و سپس آنتی بادی ضد موشی متصل به HRP افزوده شد و با افزودن سوبسترا جذب نوری آنها تعیین شد.جذب نوری چاهکها برحسب درصد محاسبه شد، سپس منحنی درصد اتصال (محور y) در مقابل

غلظت آنتی بادی مونوکلونال (محور X) برای هر غلظت از آنتی ژن رسم گردید. از روی منحنی، 50 ٪ اتصال برای هر غلظت آنتی ژن محاسبه ، سپس افینیتی آنتی بادی از فرمول زیر(فرمول محاسبه افینیتی) محاسبه گردید.

$$\mathrm{Ka} = \frac{[n-1]}{2(n[Ab_2]_t - [Ab_1]_t)}$$

واحد افینیتی بر مولار یا مول بر لیتر(M^{-1}) است .

غلظت رقت اول آنتی بادی برحسب نانومولار =$[Ab_1]$

غلظت رقت دوم آنتی بادی برحسب نانومولار=$[Ab_2]$

$n=Ag_2/Ag_1$ نسبت دو غلظت متوالی آنتی ژن که باید عددی صحیح باشد.

2-20-1- محاسبه افینیتی آنتی بادی های مو نوکلونال

1-ابتدا سوپرناتانت کلونها از طریق کشت در محیط RPMI با حداقل غلظت FCS تهیه شد. کاهش غلظت FCS به این دلیل است که آنتی بادی در مرحله تخلیص تداخل کمتری نماید و آنتی بادی خالص تری حاصل شود.

2- سپس مراحل تخلیص بر روی سوپرناتانت کلونP1D2E3 انجام شد ودر نهایت آنتی بادیمربوط به آن تخلیص گردید.

3- غلظت های مختلف از آنتی ژن نوترکیب تروپونین I(غلظت های 0/1 ، 0/05 ، 0/025 ، 0/0125 میکرو گرم در یک میلی لیتر PBS) تهیه شد و جداگانه به صورت دوتائی در ردیفهای چاهکهایا الایزا کوت گردید.

5- بلاک چاهکها با Skim milk 5گرم در صد میلی لیتر PBS به مدت 45 دقیقه ساعت در37°C انجام شد.

6- رقتهای 1/20 ، 1/100 ،1/500 ، 1/1000 آنتی بادی تخلیص شده کلون P1D2E3در بافر EIA تهیه گردید و به صورت دوتایی به چاهکهای الایزا افزوده شد.

7 – بعد از سه بار شستشو 100µl ایمونوگلوبولین ضد موشی متصل به آنزیم پراکسیداز(آنتی بادی ثانویه) با رقت 1/1000 ریخته شد و به مدت 1 ساعت در دمای37°Cانکوبه گردید.

8 – پس از 5 بار شستشو 100 µl از سوبسترا به چاهک ها افزوده شد و به مدت 10 دقیقه با 50 µl از اسید کلریدریک 2 نرمال واکنش متوقف گردید.جذب نوری چاهک ها درطول موج 450 nm در دستگاه الایزا ریدر قرائت گردید.

9- بالاترین OD حاصله به عنوان 100٪ جذب نوری در نظر گرفته شد. بقیهOD ها نیز بر اساس در صد از بالاترینOD یعنی 100٪ محا سبه شدند.

2-21- تعیین میزان تداخلات ماتریکس سرمی با آنتی بادی مونوکلونال

یکی از مسائلی که در تهیه آنتی بادی های مونوکلونال و نیز کیت های تشخیص بسیار مورد توجه قرار می‌گیرد موضوع میزان تداخلات سرمی است.به این معنا که ویژگی های سرم بیمار تا چه حدی می‌تواند روی نتایج تست تاثیر بگذارد.عمده ترین فاکتورهایی که در این گونه موارد مورد توجه قرار می‌گیرد همولیز بودن سرم و نیز ایکتریک بودن سرم می‌باشد.برای همین موضوع از هموگلوبین برای بررسی میزان تداخل در تست استفاده شد. همچنین به دلیل میزان بالای آلبومین در سرم هم میزان تداخل آن نیز در این الایزا بررسی گردید.همچنین با توجه به اینکه در ساختار پروتئین نوترکیب نیز تیوردوکسین و hisTag به کار رفته بود این دو نیز برای بررسی میزان اختصاصیت آنتی بادی های مونوکلونال در این الایزا مورد بررسی قرار گرفت.

برای بررسی واکنش متقاطع آنتی بادی ها به ترتیب زیر الایزای غیر مستقیم انجام شد:

برای این منظور ابتدا بهترین غلظت آنتی ژن یعنی پروتئین نوترکیب برای پوشش دهی پلیت ها استفاده شد بدین ترتیب که

1- ابتدا حجم 100 µl ازغلظت ها به صورت زیردر بافر الایزا تهیه شد و در یک پلیت الایزا کوت شد وبه صورت شبانه (Over night)در دمای 37°C کوت گردید.

غلظت 6µg/ml :پروتئین نوترکیب تروپونین Iقلبی

غلظت 1µg/ml:هموگلوبین و میوگلوبین

غلظت10µg/ml : پپتیدهای تیوردوکسین و hisTag

غلظت 3 µg/ml : پروتئینBSA

2- بلاک نمودن چاهکها با skim milk 5 درصد به مدت 45 دقیقه در 37°C انجام شد.

3- ابتدا 100 میکرولیتر سوپرناتانت 5 کلون نهایی و همچنین سوپرناتانت سلولهای SP2/0 به صورت دوتائی هر کدام جداگانه به دو استریپ اضافه و به مدت 1 ساعتدر دمای 37˚C انکوبه شد.

4-بعد از سه بار شستشو با استفاده از آب مقطر، 100µl ایمونوگلوبولین ضد موشی متصل به آنزیم پراکسیداز (آنتی بادی ثانویه) با رقت 1/1000 ریخته شد و به مدت 1 ساعت در دمای37˚C انکوبه گردید. لازم به توجه است که تمام رقتها مربوط به سرم ایمن و IgG ضد موشی متصل به پراکسیداز در بافر سنجش تهیه گردید.

5- بعد از پایان زمان موردنظر پلیت بطور کامل سه بار با آب مقطر شستشو داده شد. سپس 100 µl از سوبسترا تهیه شده به چاهک ها افزوده شد و به مدت 10 دقیقه در محل تاریک انکوبه گردید، و در نهایت با 50 µl از اسید کلریدریک 2 نرمال واکنش متوقف گردید و جذب نوری چاهک ها درطول موج 450 nm در دستگاه پلیت ریدر قرائت گردید.

2-22-تهیه کلوئید طلا

کلوئید طلا با روش فرنس تولید شد (١٤١). محلول 0/01 ٪ اسید کلرواوریک (وزن/حجم) و محلول سیترات سدیم 1٪ (وزن/حجم) تهیه شد. 400 میلی لیتر از محلول اسید کلرواوریک حرارت داده شد تا به جوش برسد و 12 میلی لیتر سیترات سدیم 1٪ قطره قطره به محلول در حال بهم خوردن اضافه شد . رنگ محلول از زرد به قرمز ارغوانی تبدیل شد.

علاوه بر این،آزمایش فوق با استفاده از ٢ و ٤ میلی لیتر از سیترات سدیم ١٪ در ازای هر ١٠٠ میلی لیتر اسید کلراوریک نیز انجام شد،که به ترتیب بنفش و نارنجی رنگ شدند.

در عین حال دانسیته اپتیکال محلول کلوئید طلا در طول موج های 380 تا 700 نانومتر مورد بررسی قرار گرفت.

2-22-1- تعیین غلظت اپتیمم طلا- آنتی بادی

غلظت اپتیمم آنتی بادی-طلا بوسیله روش اسلات بدست آمد (۱۴۲). غلظت های 0، 1، 2، 3، 4 و 5 میکروگرم آنتی بادی مونوکلونال علیه تروپونین Iتهیه و 40 میکرولیتر از هریک درون 6 لوله ریخته شد و سپس 500 میکرولیتر از کلوئید طلای ساخته شده در مرحله قبل درون هر لوله ریخته شد و به مدت 5 دقیقه در حرارت اتاق انکوبه شد. در این مرحله 200 میکرولیتر محلول کلرورسدیم 10٪ به همه لوله ها اضافه شد. لوله ای که در آن تغییر رنگ آبی صورت نگرفت دارای کمترین مقدار آنتی بادی است که طلا را پایدار کند .

2-22-2- نشان دار کردن آنتی بادی با کلوئید طلا

برای کونژوگه نمودن ذرات طلا به آنتی بادی علیه تروپونین I روش زیر به کار رفت. pH کلوئید طلای ساخته شده با سود 1 مولار روی 8/5 تنظیم شد و 3/2 میکروگرم در میلی لیتر از آنتی بادی مونوکلونال تروپونین I قلبی در حالیکه محلول روی هم زن مغناطیسی قرار داشت به آن اضافه شد. این مخلوط طی شب در 4 درجه سانتی گراد و روی هم زن قرار داده شد. سپس در ازای هر ۲۰ میلی لیتر از کلوییید طلا ۵۰۰ میکرولیتر از BSA 10٪ به آن اضافه شد تا جایگاه های خالی نانوذرات طلا را بپوشاند و سپس مدت 30 دقیقه مخلوط و به مدت 45 دقیقه در 15000 دور و در 4 درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید. سپس چهارپنجممایع روئی خارج و بعد تا همان حجم بافر فسفات (10 میلی مولار،pH 7/2 حاوی BSA٪1) به آن اضافه و به آرامی تکان داده شد. سپس مجددا به مدت 45 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی گراد و 15000g سانتریفوژ شد. سپس چهارپنجم مایع روئی خارج و به همان میزان از بافر فوق اضافه و مجددا به مدت 30 دقیقه در همان شرایط سانتریفوژ شد. رسوب در 20 میلی لیتر از بافر فوق، حاوی 0/1٪ سدیم آزید حل شد. در این مرحله دانسیته اپتیکال آن با محلول بافر رقیق کننده و در 520 نانومتر روی 4 تنظیم شد. این آنتی بادی علیه تروپونین I که نانوذرات طلا روی آن پوشانیده

شده بود در4 درجه سانتی گراد ذخیره گردید.در عین حال نمونه دیگری از کلوئید طلا ساخته شد که pH آن روی ۸/۵ تنظیم شد و مراحل فوق تکرار گردید.

2-23- مونتاژ استریپ ایمونوکروماتوگرافی

در این فورمت از غشاء نیتروسلولز S&S استفاده شد. که پس از اتصال غشائ در مرکز یک غشائ پلی استیرن و قرار دادن پد جاذب بر روی غشائ نیترو سلولز و چسباندن پد کونژوگه در پایین این غشاء و بالاخره قرارگیری پد نمونه در پایین پد کونژوگه و برش این مجموعه به شکل استریپ بر روی غشاء نیتروسلولز از آنتی بادی ضد موش- بزی با غلظت های ۱ و ۲ میلی گرم/ میلی لیتربه عنوان خط کنترل قرارداده شدند و از آنتی بادی پلی کلونال و نیز مونوکلونال با غلظت های 20، 40، 80 ،160، 320 میکرو گرم/ میلی لیتر بر روی خط تست قرار داده شدند و مورد بررسی قرار گرفتند همچنین از کونژوگه طلا-آنتی بادی مونوکلونال به میزان ۱۰ ، ۱۵ و ۲۰ میکرولیتراز هر دو pH ۸/۵ و ۸/۸ بر روی پد کونژوگه قرار گرفتند و مورد آزمایش قرار گرفتند.

پد نمونه (سلولز) با ترکیبها و غلظت های مختلف BSA از جمله ۰/۱ ،۰/۲۰ ، ۰/۲۵ ، ۰/۳۷۵ ، ۰/۵ ، ۱ ، و ۲ درصد و ژلاتین ۰/۵درصد،کازیین۰/۵ درصد، PVP ۰/۵ درصد PEG ۱ تا ۸ درصد و Tween 20 ۰/۲ ، ۰/۲۵ ، ۰/ ۵ و ۰/٦۵ درصددر بافر PB با مولاریته های۱۰، ۲۰ ، ۳۰ و ۵۰ و با pH های ۷/۲ و ۷/٤ تیمار شده به این ترتیب که BSA یا ژلاتین یا کازیین یا PVP به همراه , Tween 20 و سدیم آزید در بافر PB حل شده و سپس با محلول PB به تنهایی شسته شده و در محلول با غلظت مناسب PEG قرار گرفته و در دمای آزمایشگاه خشک شدند.

بر روی پد جاذب (سلولز) هیچ گونه تیماری صورت نگرفت. پد کونژوگه (غشاء فیبرشیشه) با غلظت های ۱ ، ۳، و ۵ درصدگلوکز و سوکروز در PBS ۱۰ میلی مولار غوطه ور شده وسپس در درجه حرارت اتاق خشک گردیده و بین ۱ تا ۱۰ میلی لیتر از کونژوگه روی آن قرار داده شد و مورد بررسی قرار گرفت . غشای نیتروسلولز (HF-75 و HF-180) در غلظتهای ۰/۱ ،۰/۰۰۵ BSA در بافر PB

۲۰ میلی مولارودر pH های ۷/۲ و ۷/٤ قرار گرفت و سپس با محلول PB شسته شده و در درجه حرارت اتاق خشک گردید. این چهار قسمت روی یک غشاء پلی استیرن که سطح آن چسبناک بود قرار گرفتند. به این نحو که غشاء نیتروسلولز به عنوان محدوده تست[1] که واکنش در آنجا صورت می گیرد در مرکز این غشاء پلی استیرن قرار گرفت. پد کونژوگه (فایبرگلاس) در پایین غشاء نیتروسلولز قرار گرفت و پد نمونه (سلولز) هم در پایین پد کونژوگه قرار گرفت.

غشاء پلی استیرن به ابعاد 60 میلی متر و 5 میلی متر برش خورد تا استریپ بدست آید.سپس از آنتی بادی ضد موش روی غشاء نیتروسلولز قرار گرفتند که به عنوان خط کنترل و خط تست محسوب می‌شوند. کونژوگه طلا- آنتی بادی هم روی پد کونژوگه قرار گرفت و در دمای اتاق خشک شد.

2-24- جمع آوری نمونه

نمونه ها از بیمارانی که با دردقفسه سینه به بخش اورژانس بیمارستان مراجعه کرده بودند و درخواست نمونه سرم جهت بررسی تروپونین I شده بود و بعد از انجام تست تروپونین آنها مثبت شده بود جمع آوری گردید.ابتدا این نمونه ها بادستگاه الکسیس e411[2] ساخت کمپانی roche تعیین مقدار گردید.سپس حدود 50 نمونه برای مطالعات تهیه گردید.

2-25- ارزیابی حد تشخیص[3]

با استفاده از غلظت های مختلف آنتی بادی مونوکلونال و پلی کلونال در خط تست و مقادیر مختلف کونژوگه طلا- آنتی بادی در پد کونژوگه، حد تشخیص استریپ روی 1 نانوگرم درمیلی لیتر تنظیم شد.

[1] Zone Test
[2] Elecsys e411
[3] Detection Limit

2-26- کنترل کیفی

برای تعیین اختصاصیت و حساسیت تست طراحی شده، از 50 نمونه سرم با مقدار 1 نانوگرم برمیلی لیترکه توسط دستگاه الکسیس e411 به روش الکتروکمی لومینسانس تعیین مقدار شده بود و نیز 50 نمونه سالم که میزان تروپونین در آنها منفی بود استفاده گردید. در مرحله بعدی با استفاده از فرمول‌های ارائه شده در قسمت زیرین حساسیت و اختصاصیت تست مورد نظر مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین از این نمونه ها برای بررسی صحت و دقت این تست نیز استفاده گردید.

2-26-1- اختصاصیت:

برای تعیین اختصاصیت که در واقع توانایی یک تست در تشخیص درست افرادی است که فاقد بیماری هستند و بعبارتی تشخیص درست منفی های واقعی است از فرمول زیر استفاده گردید.

$$\text{specificity} = \frac{\text{number of true negatives}}{\text{number of true negatives} + \text{number of false positives}}$$

2-26-2- صحت

صحت در واقع توانایی یک تست در گزارش صحیح نتایج است و قابلیت یک تست را در همخوانی با مقدار واقعی یک تست است.

$$\text{accuracy} = \frac{\text{number of true positives} + \text{number of true negatives}}{\text{number of true positives} + \text{false positives} + \text{false negatives} + \text{true negatives}}$$

2-26-3- حساسیت

حساسیت عبارت است از حداقل آنتی ژن قابل تشخیص در روش سنجش (۱٤٤).در این تست با توجه به اینکه Cutoff مورد نیاز بر اساس استاندارد های جهانی 0/5نانوگرمبر میلی لیتر است به همین خاطر از نمونه هایی که با دستگاه دستگاهالکسیس e411بهروشالکتروکمیلومینسانس مقدارشان تعیین شده بود استفاده گردید.

$$\text{sensitivity} = \frac{\text{number of true positives}}{\text{number of true positives} + \text{number of false negatives}}$$

2-26-4- دقت

دقت به مفهوم توافق بین نتایج متوالی یک آزمایش تحت شرایط خاص می‌باشد. در بررسی دقت موارد زیر مورد ارزیابی واقع می‌شود.

الف) درون سنجش[1] : قابلیت تکرار یا دقت درون سنجش که به مفهوم بدست آوردن توافق بین نتایج متوالی یک آزمایش تحت شرایط خاص می‌باشد.

ب) بین سنجش[2]: قابلیت بازیافت یا دقت بین سنجش که عبارت است از بدست آوردن توافق بین نتایج متوالی یک آزمایش اگر شرایط زمانی و شخص آزمایش کننده تغییر کند (۱٤٥).

$$\text{precision} = \frac{\text{number of true positives}}{\text{number of true positives} + \text{false positives}}$$

2-26-4-1- روش انجام آزمایش دقت

در این آزمایش 5 روز متوالی، آزمایش ها بر روی نمونه های سرمی حاوی مقادیر مختلف از تروپونین I انجام شد. در روز ششم 5 استریپ درون هر نمونه قرار گرفت.در واقع هر نمونه 5 بار تکرار شد. لازم به ذکر است که در هر روز از سری استریپ های جدید ساخته شده استفاده شد.

[1]Intra Assay
[2]Inter Assay

2-27- بررسی واکنش آنتی بادی های مونوکلونال با اپی توپ های انتخاب شده با استفاده از الایزای غیر مستقیم

برای بررسی میزان شباهت پپتیدهای انتخاب شده با روش بیوانفورماتیک با آنتی بادی های مونوکلونال انتخاب شده از الایزای غیر مستقیم استفاده گردید.در این روش هر یک از پپتیدهای سنتز شده در چاهک های الایزا کوت گردید.سپس از سوپ آنتی بادی های مونوکلونال روی آنها ریخته شد.میزان افینیتی این آنتی بادی ها با ODآنها رابطه مستقیم دارد.در این الایزا پروتئین نوترکیب تروپونین I قلبی نیز برای مقایسه با این پپتیدها کوت گردید.

1. برای کوت کردن پپتیدهای 1،2،3،4 5µg/ml واز تروپونین I قلبی3µg/ml در بافر PBS تهیه شده و در هر حفره پلیت 96 تایی الایزا ریخته شد.
2. پلیت بصورت شبانه در دمای 4C° انکوبه گردید.
3. حفرات پس از خالی کردن محلول آنتی ژن ، 3 بار و به مدت 3 دقیقه با بافر شستشو، شسته شدند.
4. بافر بلاکینگ Skim milk5٪ به تمام حفرات اضافه گردید.
5. پلیت به مدت 1 ساعت در دمای 37C° انکوبه گردید.
6. مرحله شستشو تکرار شد.
7. رقت سرم موش (1:500) به حفرات اضافه گردید.
8. پلیت به مدت 1/5 ساعت در دمای 37C° انکوبه شد.
9. مرحله شستشو تکرار گردید.
10. کونژوگه HRP متصل به آنتی بادی ضد آنتی بادی موشی با رقت مناسب در بافر بلاکینگ به تمام حفرات اضافه شد.
11. پلیت به مدت 1/5 ساعت در دمای 37C° انکوبه شد.

12.مرحله شستشو تکرار گردید.

13.محلول سوبسترا-کروموژن TMB به حفرات اضافه شده و پلیت حدود 15-10 دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه گردید.

14.واکنش در تمام حفرات با افزودن محلول متوقف کننده خاتمه یافته و جذب نوری (OD) در طول موج 450 نانومتر قرائت گردید.

فصل سوم

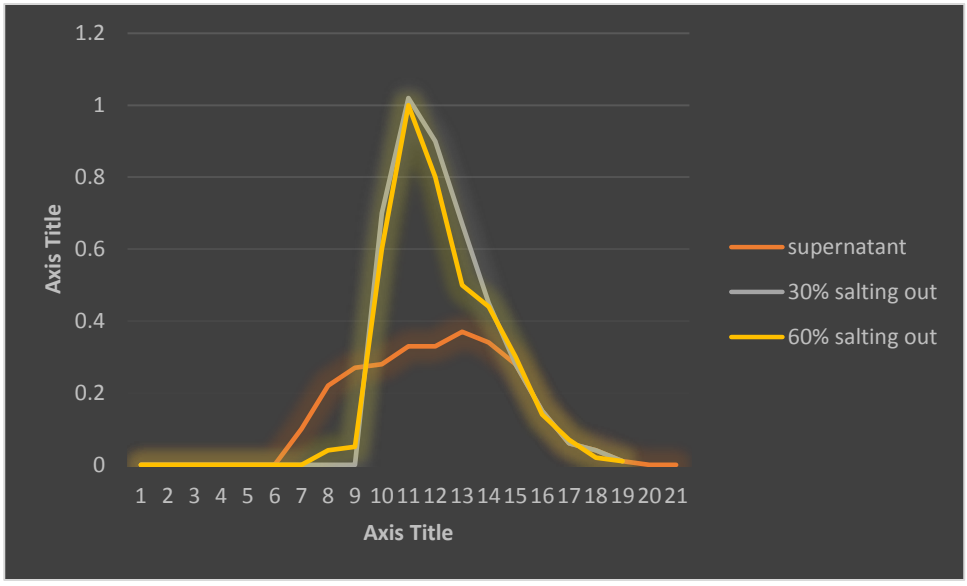
نتـــایـــجو یافـــــته ها

3-1- تخلیص پروتئین تروپونین I قلبی از بافت قلب موشی و انسان:

بعد از جداسازی بافت قلبی موش وانسان و هوموژنایز نمودن آنها با استفاده از روش آمونیوم سولفات پروتئین بافتی پروتئین های آنها جداسازی گردید.سپس با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض یونی پروتئین تروپونین I قلبی استخراج گردید.برای بررسی میزان غلظت پروتئین های استخراج شده از بافت فرکشن های مختلف جمع آوری و سپس با استفاده از نانودراپ تعیین مقدار گردید.

3-1-1-اندازه گیری ODفرکشنهای جمع آوری شده از کروماتوگرافی

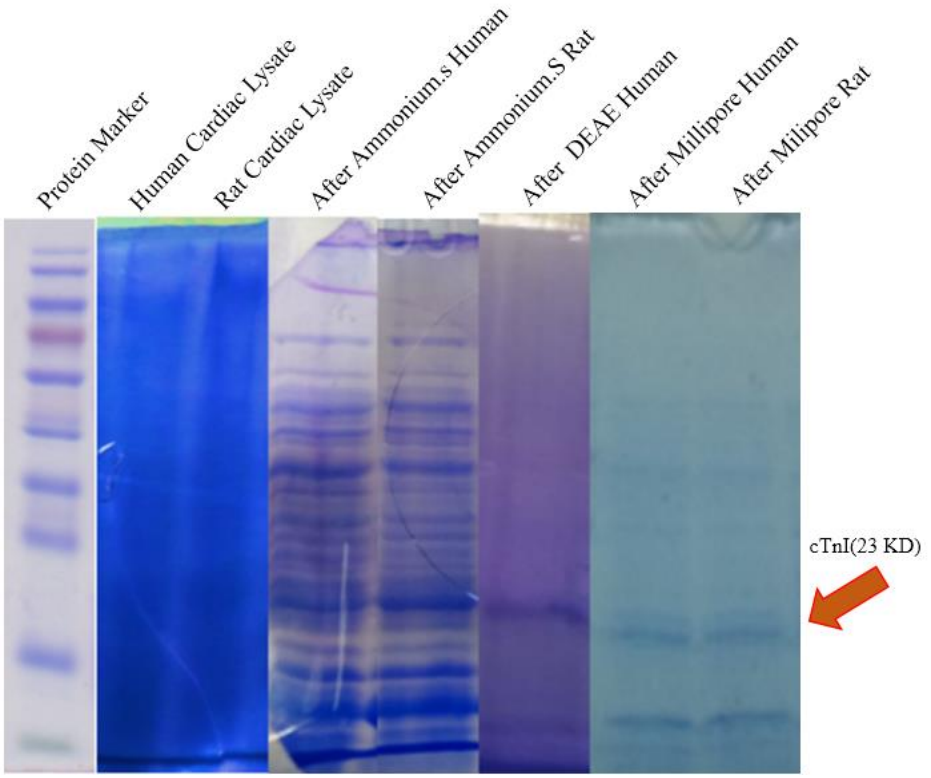
برای هر یک از فرکشنهای جمع آوری شده از کروماتوگرافی محلول رویی ،60 و30 درصد با استفاده از اسپکتروفتومتر و در طول موج 280 نانومتر میزان جذب پروتئین مربوطه ثبت گردیدکه اطلاعات مربوط به این جذب در شکل زیر امده است.



شکل۳-۱: نمودار جذب مربوط به پروتئینهای جدا شده موشی با استفاده از کروماتوگرافی تعویضیون. نمودار مربوط به دو مرحله تخلیص براساس ۳۰ و ٦۰ درصد امونیوم سولفات است.

3-1-2- بررسی میزان خلوص تائید پروتئین با استفاده از SDS PAGE :

نتایج حاصل از تخلیص پروتئین با روش آمونیوم سولفات و سپس کروماتوگرافی تعویض یون برای بررسی میزان خلوص و مشاهده باند تخلیصی با استفاده از SDS PAGE مورد بررسی قرار گرفت.نتایج در شکل 3-2 قابل مشاهده هستند.در این شکل روند تخلیص تروپونین I از قلب موش نشان داده شده است.همچنین در جدول 3-1 و 3-2 مشخصات این تخلیص ذکرگردیده است.همانطوریکه مشاهده می‌گردد میزان خلوص فرکشن های مختلف خیلی بالا نیست. در واقع با توجه به تکنیک های بکار گرفته شده خلوص بالایی دیده نشد.با این وجود به دلیل اینکه این پروتئین برای ایمونیزاسیون حیوان مورد استفاده قرار میگیرند نیازی به خلوص بالای آن نیست.



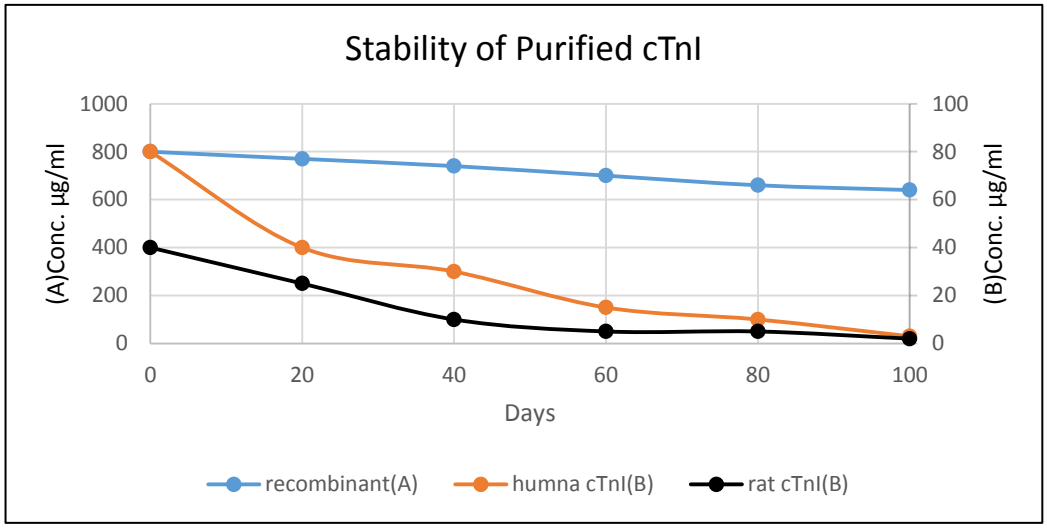
شکل۳-۲:الکتروفورز پروتئین های تخلیص شده از بافت قلب موش و انسان

جدول 3-1: تخلیص پروتئین تروپونین I قلبی از قلب موش(Rat)

	Volume(ml)	Total protein(mg)	Total activity(ng/ml)	Specific immunogical (activity(ng/mg	Fold purification	% yield
Homogenate	20	10	160	16	1	100
Ammonium sulfate	8	4	210	52.5	1.31	40
Ion exchange chromatography	5	1	500	500	3.12	10
Millipore ultra-centrifuge	5	0.75	2000	2666	12.5	7.5

جدول 3-2: تخلیص پروتئین تروپونین I قلبی از قلب انسان

	Volume(ml)	Total protein(mg)	Immunological activity(ng/ml)	Specific immunogical activity(ng/mg)	Fold purification	% yield
Homogenate	40	100	800	80	1	100
Ammonium sulfate	23	76	1090	14.3	1.78	76
Ion exchange chromatography	15	30	1960	65	2.72	30
Millipore ultra-centrifuge	4	13	10560	812	15.12	13



شکل ۳-۳- بررسی میزان پایداری تروپونین تخلیص شده از بافت قلب موش، انسان و تروپونین I نوترکیب

در این نمودار تغییرات غلظتی مربوط به تروپونین نوترکیب نشان میدهد که ناپایداری کمتری نسبته به دو نمونه تخلیص شده از بافت قلب موش و انسان دارد.در این مطالعه تغییرات غلظتی مربوط به تروپونین تخلیص شده و نوترکیب در مدت زمان100 روز بررسی گردیده است.

3-2- ایمونیزاسیون خرگوش با استفاده از پروتئین تروپونین I تخلیص شده از بافت قلب موش

3-2-1- تعیین تیتر آنتی بادی درسرم خرگوش ایمن شده

نتایج حاصل از ایمونیزاسیون خرگوشها با استفاده از پروتئین تروپونین I تخلیص شده از بافت قلب موش نشان داد خرگوشهای مورد نظر بطور کامل ایمن نشده اند و از آنهانمی‌توان به منظور تهیه آنتی بادیپلی کلونال استفاده نمود.برای انجام الایزا جهت تیتراسیون، 100 میکرولیتر محلول پروتئیننوترکیب تروپونین I قلبی باغلظت 6 میکرو گرم در میلی لیتر برای پوشش دهی چاهک ها در روش الایزا کافی

ومناسب است.درواقع همانگونه که در جدول3-3 مشاهدهمی‌گردد بعلت خلوص کم انتی ژن تخلیص شده از بافت قلب موش ایمنی زایی خوبی صورت نگرفته است.

جدول 3-3- تیتراسیون سرم خرگوش های ایمن شده با تروپونین I قلبی موش با استفاده از روش الایزای غیر مستقیم

شماره خرگوش	NRS	1:500	1:1000	1:2000	1:4000
1	0.22	1.01	0.72	0.46	0.3
2	0.22	0.87	0.54	0.32	0.3

NRS: normal rabbit serum

3-3-انتخاب اپی توپهای ایمونودومینانت:

برای بررسی و انتخاب اپی توپ غالب ایمنی جهت انتخاب کلون مناسب که بیشترین افینیتی را با پروتئین تروپونین I داشته باشد از نرم افزارهای موجود برای بررسی پروتئین استفاده شد.در ابتدا با استفاده از ترادف امینو اسیدی ساختار طبیعی[1] تروپونین I قلبی برگرفته از سایت uniprot و pubmed ترادف امینو اسیدی آن مشخص گردید. همانطور که در شکل مشخص شده است در ساختار این پروتئین که شامل 210 امینو اسید می‌باشد تعداد 4 ساختار دوم از نوع هلیکس مشاهده می‌گردد.طبق این ساختار که از سایت uniprot اقتباس شده است این ترادف های هلیکس به صورت ذیل هستند:

جدول شماره 3-4- ساختار دوم تروپونین I قلبی

ساختار دوم تروپونین I قلبی از نظر تعداد هلیکس	
ساختار دوم	شماره ترادف
Helix 1	43-79
Helix 2	85-87
Helix 3	90-136
Helix 4	163-188

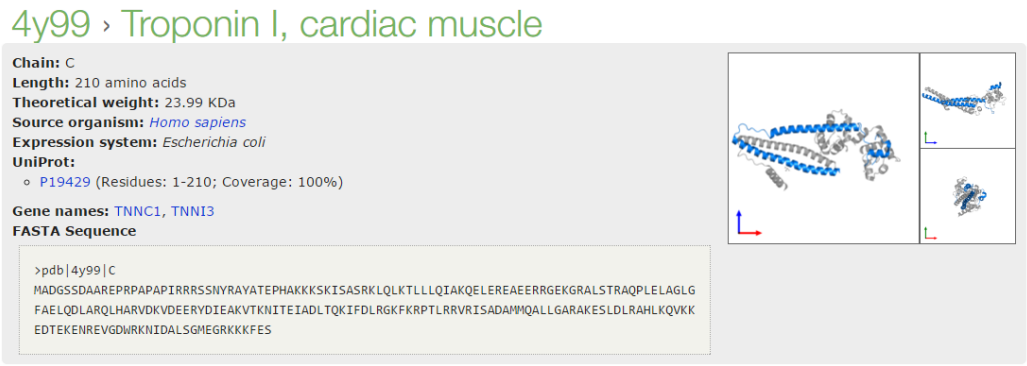
[1] Native Structure

بعد از بدست آمدن این اطلاعات برای بررسی ساختار اپی توپی تروپونین I و نیز انتخاب بهترین اپی توپها برای سنتز و سپس انتخاب کلون ها بر اساس این اپی توپ ها، از نرم افزارهای بررسی آنتی ژنیسیته از جمله IEDB استفاده گردید.با بهره گیری از این سایت بهترین ساختار های انتی ژنیک از نظر انتی ژنیسیتی، هیدروفوبیسیته،انعطاف پذیری،سطحی بودن،داشتن ساختار بتا بررسی و در نهایت بهترین اپی توپ ها نسبت به سایر توالی پروتئین تعیین و با عدد مشخص می‌شوند.با بررسی این پروتئین همانطور که در شکل مشاهده می‌شود بررسی میزان دسترس پذیر بودن ساختار انتی ژنی در بررسی با نرم افزارEmini نشان می‌دهد بیشترین ساختارهای انتی ژنیک در دسترس قبل از ترادف ابتدایی N ترمینال می‌باشد.با استفاده از الگوریتم کارپلوس[1] نیز میزان انعطاف پذیری ساختار های انتی ژنیک بررسی گردید.همانطور که در شکل نیز مشاهده می‌گرددبیشترین انعطاف پذیری در ناحیه N ترمینال از اسیدامینه 49-1 و نیز 85-55 ؛114-148-134؛210-170 می‌باشد.برای بررسی میزان انتی ژنیسیتی پروتئین از الگوریتم کلاسکار[2] استفاده شد که همانگونه که در شکل و نیز جدول مشخص گردیده است 6 ناحیه انتی ژنیک با قدرت انتی ژنیک بالاتر نسبت به سایر نقاط پیش بینی شده است.همچنین با توجه به اینکه تروپونین در حالت مایی در سرم ساختار خاص خود را داراست میزان هیدروفوبیسیتی آن نیز برای انتخاب بهترین انتی ژنها بررسی شود. برای این منظور از الگوریتم پارکر[3]استفاده شد. برمبنای این الگوریتم همانگونه که در شکل مشخص است 7 ناحیه مشخص شده با رنگ زرد نسبت به سایر نقاط نمره بهتری را از نظر هیدروفوبیسیتی دارا هستند.

با بهره گیری از همه این نتایج و آنالیزها و نیز بررسی سایر منابع از جمله کیت های تجاری موجود و معتبر در بازار از جمله شرکت های Abbott؛ Siemens ؛ Beckman؛ Allere؛ Roche که برای این مارکر تست تشخیصی طراحی و تولید نموده اند(جدول شماره) توانستیم چهار پپتید را به عنوان پپتید های غالب ایمنی مطابق با جدول شماره برای بررسی وانتخاب کلون های هیبریدوما انتخاب و سپس سفارش سنتز دهیم.

[1] Karplus
[2] Kolaskar
[3]Parker

شکل 3-4- ساختار دوم تروپونین I قلبی برگرفته از سایت uniprot.مناطق هلیکس با رنگ آبی نشان داده شده است.

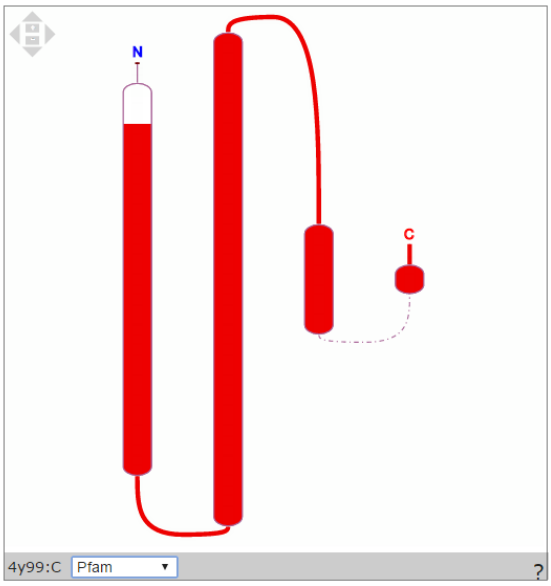


شکل 3-5- تعداد اسید آمینه،وزن ملکولی و ساختار سه بعدی تروپوینن قلبی I پس از بیان در Ecoli

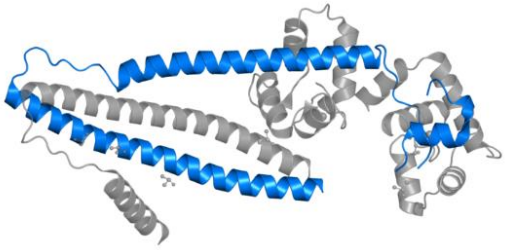
جدول 3-5- ترادف آمینو اسیدی پروتئین طبیعی تروپونین I قلبی(P19429-1) در فرمت BLAST

```
        10         20         30         40         50
MADGSSDAAR EPRPAPAPIR RRSSNYRAYA TEPHAKKKSK ISASRKLQLK
        60         70         80         90        100
TLLLQIAKQE LEREAEERRG EKGRALSTRC QPLELAGLGF AELQDLCRQL
       110        120        130        140        150
HARVDKVDEE RYDIEAKVTK NITEIADLTQ KIFDLRGKFK RPTLRRVRIS
       160        170        180        190        200
ADAMMQALLG ARAKESLDLR AHLKQVKKED TEKENREVGD WRKNIDALSG
       210
MEGRKKKFES
```

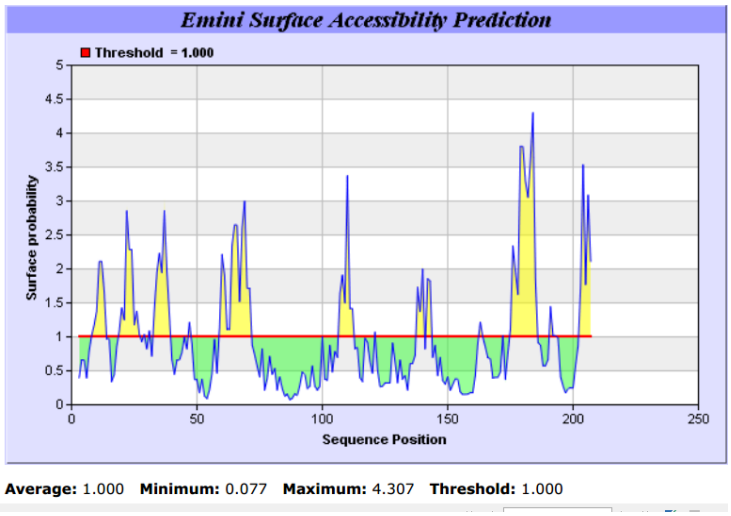
پروتئین تروپونین I قلبی دارای 210 آمینو اسید می باشد



شکل 3-6- ساختار Pfam از تروپونین I قلبی.مناطق هلیکس با رنگ قرمز نشان داده شده است.پروتئین تروپونین I قلبی دارای 210 آمینو اسید می باشد



شکل3-7- ساختار سه بعدی تروپونین I قلبی.هلیکس ها بصورت رنگ آبی هستند



شکل3-8- نمودار آنالیز تروپونین I قلبی با استفاده از نرم افزارEmini.

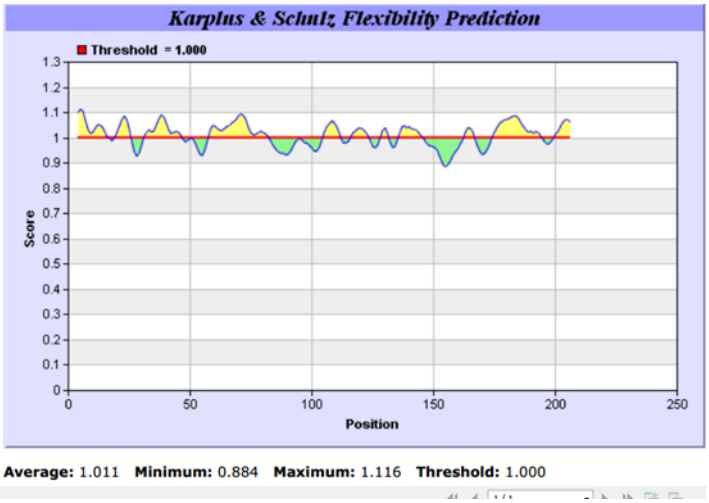
مناطق زرد رنگ بالای خط آستانه نشان دهنده مناطقی است که در این توالی نسبت به سایر مناطق میزان دسترسی آنتی ژنیک بهتر است.

جدول شماره 3-6- پپتید های غالب ایمنی پیشگویی شده توسط نرم افزارEmini

توسط این آنالیز تعداد 6 ناحیه انتی ژنیک تعیین توالی و پیشگویی شده اند.طول این توالی بین 6 تا 13 امینو اسید است که بیشتر در ناحیه N ترمینال قرار دارند.

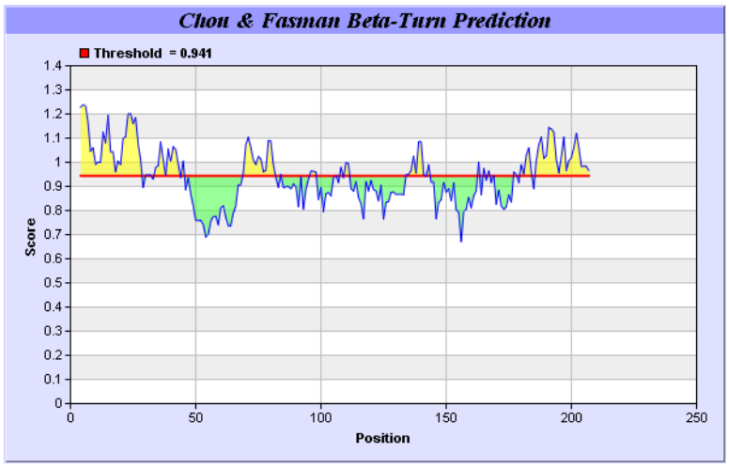
Predicted peptides:

No.	Start Position	End Position	Peptide	Peptide Length
1	8	13	AAREPR	6
2	19	27	IRRRSSNYR	9
3	33	39	PHAKKKS	7
4	59	71	QELEREAEERRGE	13
5	107	112	VDEERY	6
6	175	185	QVKKEDTEKEN	11

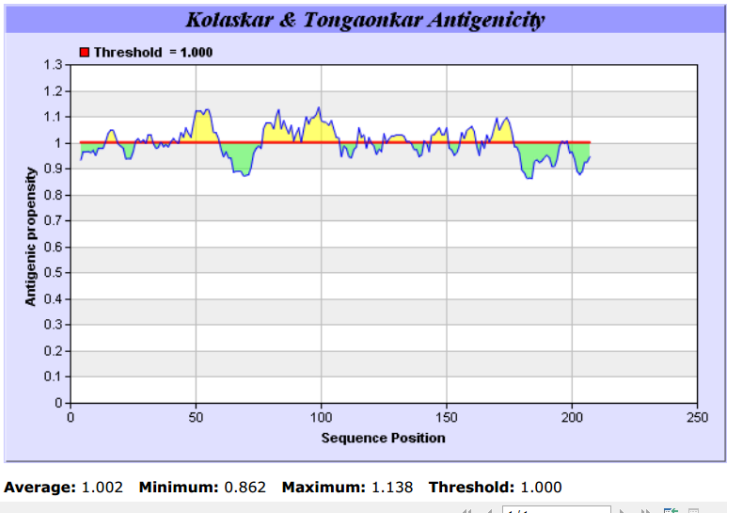


شکل 3-9- نمودار آنالیز تروپونین I قلبی با استفاده از نرم افزارkarplus .

در این نمودار مناطق زرد رنگ بالای خط آستانه نشانگر مناطق پپتیدی است که نسبت به سایر توالی انعطاف پذیری بیشتری دارند

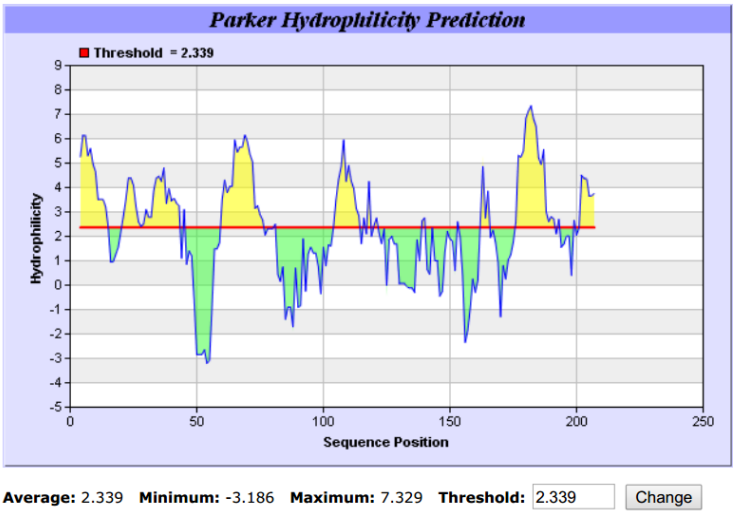


شکل3-10- نمودار آنالیز تروپونین I قلبی با استفاده از نرم افزارchou& fasman .در این نمودار مناطق بالای سطح آستانه که با زرد نشان داده شده اند به عنوان مناطق با ساختار بتا پیشگویی شده است.



شکل3-11- نمودار آنالیز تروپونین I قلبی با استفاده از نرم افزارkolaskar .

این نمودار میزان آنتی ژنیسیته و مناطق آن را در ساختار تروپونین با مناطق زرد رنگ پیشگویی کرده است.طبق این انالیز بیشترین میزان آنتی ژنیسیتی در ناحیه اسید امینه 130-50 قرار دارند.



شکل3-12- نمودار آنالیز تروپونین I قلبی با استفاده از نرم افزارparker .این نمودار با مناطق زرد رنگ در بالای خط آستانه نشانگر مناطق هیدروفوبیسیتی ساختار تروپونین I است.

جدول شماره 3-7- پپتید های غالب ایمنی پیشگویی شده توسط نرم افزارkolaskar

طبق یافته های جدول کولاسکار 6 ناحیه پپتیدی دارای بیشترین میزان انتی ژنیسیتی هستند.

Predicted peptides:

No.	Start Position	End Position	Peptide	Peptide Length
1	44	59	SRKLQLKTLLLQIAKQ	16
2	77	107	STRCQPLELAGLGFAELQDLCRQLHARVDKV	31
3	125	135	IADLTQKIFDL	11
4	144	150	LRRVRIS	7
5	156	161	QALLGA	6
6	166	176	SLDLRAHLKQV	11

جدول شماره 3-8: ترادف امینو اسیدی اپی توپ های شناخته شده توسط آنتی بادی ها در کیت های تجاری

Table 1. Analytical characteristics of contemporary sensitive and point-of-care cardiac troponin assays.

Company/platform/assay	Cardiac troponin concentration at: LoD,[a] μg/L	99th Percentile, μg/L (CV)[b]	10% CV concentration, μg/L	Amino acid residues of epitopes recognized by capture (C) and detection (D) MAbs
Abbott AxSYM ADV	0.02	0.04 (14%)	0.16	C: 87–91, 41–49; D: 24–40
Abbott ARCHITECT	0.009	0.028 (14%)	0.032	C: 87–91, 24–40; D: 41–49
Abbott i-STAT	0.02	0.08 (16.5%)	0.10	C: 41–49, 88–91; D: 28–39, 62–78
Alere Triage	0.05	<0.05 (NA)	NA	C: NA; D: 27–40
Alere Triage Cardio3[c]	0.01	0.02 (17%)	NA	C: 27–39; D: 83–93, 190–196
Beckman Access AccuTnI	0.01	0.04 (14%)	0.06	C: 41–49; D: 24–40
bioMérieux Vidas Ultra	0.01	0.01 (27.7%)	0.11	C: 41–49, 22–29; D: 87–91, MAb 7B9
Mitsubishi Pathfast	0.008	0.029 (5.0%)	0.014	C: 41–49; D: 71–116, 163–209
Ortho Vitros ECi ES	0.012	0.034 (10%)	0.034	C: 24–40, 41–49; D: 87–91
Radiometer AQT90 cTnI	0.009	0.023 (17.7%)	0.039	C: 41–49, 190–196; D: 137–149
Radiometer AQT90 cTnT	0.008	0.017 (15.2%)	0.026	C: 125–131; D: 136–147
Response RAMP	0.03	<0.01 (18.5% at 0.05)	0.21	C: 85–92; D: 26–38
Roche cobas h232 Cardiac T[c,d]	0.05	NA	NA	C: 125–131; D: 136–147
Roche Elecsys TnT Gen 4	0.01	<0.01	0.030	C: 136–147; D: 125–131
Roche Elecsys TnI	0.16	0.16 (10%)	0.30	C: 87–91, 190–196; D: 23–29, 27–43
Roche Cardiac Reader cTnT[e]	0.03	NA	NA	C: 125–131; D: 136–147
Siemens Centaur Ultra	0.006	0.04 (8.8%)	0.03	C: 41–49, 87–91; D: 27–40
Siemens Dimension RxL	0.04	0.07 (20%)	0.14	C: 27–32; D: 41–56
Siemens Immulite 2500	0.1	0.2 (NA)	0.42	C: 87–91; D: 27–40
Siemens Stratus CS	0.03	0.07 (10%)	0.06	C: 27–32; D: 41–56
Siemens Vista	0.015	0.045 (10%)	0.04	C: 27–32; D: 41–56
Tosoh AIA	0.06	<0.06 (NA)	0.09	C: 41–49; D: 87–91

[a] LoD, limit of detection; NA, not available; Gen 4, fourth-generation assay.
[b] CV at 99th percentile.
[c] Not cleared by the US Food and Drug Administration.
[d] Standardized against hs-cTnT assay.
[e] Standardized against Gen 4 cTnT assay.

جدول شماره 3-9- ترادف امینو اسیدی پپتیدهای انتخاب شده به عنوان پپتید غالب ایمنی

شماره پپتید	شماره ردیف	تعداد اسید امینه	سکانس اسید امینه
Peptide 1	40-54	15	KISASRKLQLKTLLL
Peptide 2	31-39	9	TEPHAKKKS
Peptide 3	87-91	5	GLGFA
Peptide 4	27-36	10	RAYATEPHAK

3-4- ایمونیزاسیون خرگوش با استفاده از پپتیدهایکونژوکه شده با سرم آلبومین گاوی

3-4-1- تعیین تیتر آنتی بادی درسرم خرگوش ایمن شده

نتایج حاصل از ایمونیزاسیون خرگوشها با استفاده از پپتیدهای سنتز شده (4 پپتید) تخلیص شده از بافت قلب موش نشان داد خرگوشهای مورد نظر بطور کامل ایمن نشده اند و از آنهانمی‌توان به منظور تهیه آنتی بادیپلی کلونال استفاده نمود.برای انجام الایزا جهت تیتراسیون، 100 میکرولیتر محلول پپتید ها(4 پپتید سنتز شده) باغلظت 6 میکرو گرم در میلی لیتر برای پوشش دهی چاهک ها در روش الایزا کافی ومناسب است.درواقع همانگونه که در جدول3-8 مشاهد می‌گرددپپتیدهای انتخاب شده و سنتز شده ایمنی زایی خوبی در خرگوش ها ایجاد نکرده اند.

جدول3-10: تیتراسیون سرم خرگوشهای ایمن شده با استفاده از پپتیدهای انتخاب شده

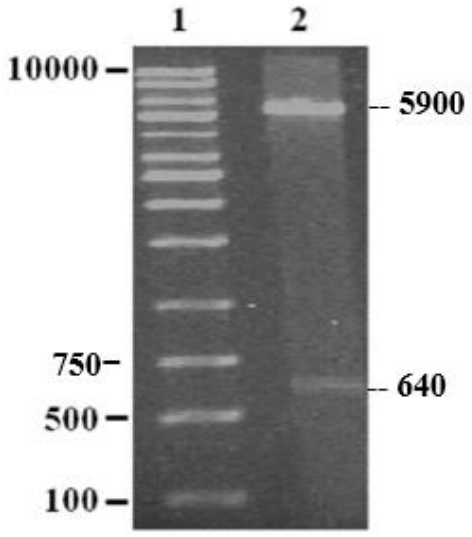
شماره خرگوش	NRS*	1:500	1:1000	1:2000	1:4000
پپتید شماره 1	0.2	1.0	0.52	0.44	0.3
پپتید شماره 2	0.2	0.82	0.54	0.32	0.3
پپتید شماره 3	0.2	0.97	0.59	0.4	0.3
پپتید شماره 4	0.2	0.76	0.46	0.33	0.25

NRS*:normal rabbit serum

3-5-کلونینگ پروتئین تروپونین I قلبی:

3-5-1- نتیجه واکنش هضم آنزیمی به منظور تایید کلونینگ

به منظور تایید قطعی کلونینگ ژن و بررسی صحت فریم در وکتور بیانی، از یکی از کلون های مثبت تخلیص پلاسمید انجام شد و روی آن با شرایط قبلی با استفاده از آنزیم های BamHI و EcoRIبرای تائید ترانس‌فورماسیون از هضم دو گانه استفاده گردید. مشاهده قطعه حدود 590 جفت بازی روی ژل نشانگر ساب کلون شدن صحیح ژن تروپونین I در وکتور pET32aمی‌باشد. از این کلنی استوک تهیه شد. سپس از باقیمانده محیط کشت برای تعیین حضور پلاسمید استفاده گردید. تخلیص پلاسمید از این باکتری‌ها و انجام هضم دو گانه نشان داد که قطعه‌ای مربوط به ژن در ناحیه بین باندهای 750-500 باز از آن خارج شد.

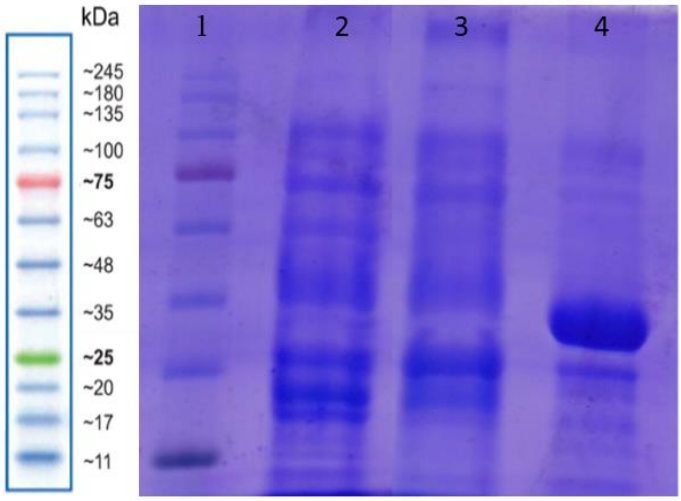


شکل 3-13- تائید ترانس‌فورماسیون با هضم دوگانه.

لاین 1: مارکر DNA ، لاین 2: وکتور هضم شده با BamHI/EcoRI ، قطعه DNA سنتز شده به طول تقریبی bp640 در اثر هضم از وکتور خارج شده است.

3-6- بیان پروتئین

برای بررسی بیان با روش SDS-PAGE ، از باکتری‌های بدون پلاسمید و بدون القاء به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. هم چنین باکتری انتخاب شده نیز در حضور القاء کننده IPTG به عنوان کنترل بعد از القاء مورد استفاده قرار گرفت. باتوجه به وزن ملکولی تخمین زده شده از پروتئین نوترکیب انتظار می‌رود که وزن ملکولی حدود 37-34 کیلودالتون داشته باشیم.زیرا وزن ملکولی 23 کیلودالتونی خود تروپونین قلبی I و ساختار مربوط بهTag His و تیوردوکسین(حدود 12 کیلودالتون) مجموعا حدود 37-34 کیلودالتون را خواهیم داشت. آنالیز با SDS-PAGE موید این نتیجه بود.

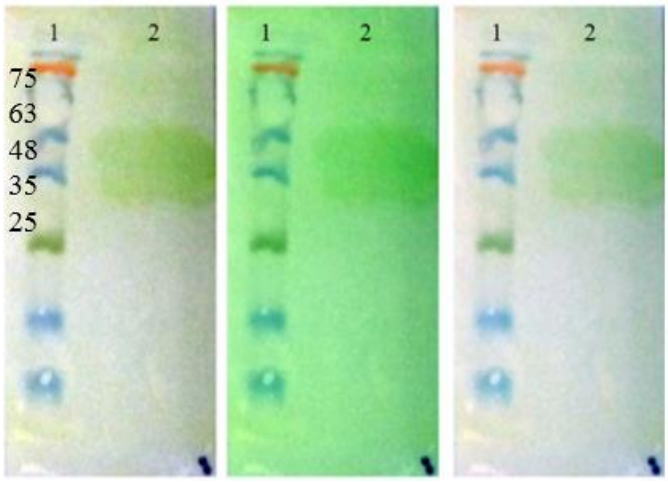


شکل 3-14- بررسی بیان پروتئین با SDS-PAGE روی ژل 12٪.

لاین 1: مارکر وزن مولکولی ، لاین 2: باکتری بدون پلاسمید، لاین 3: باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب که القاء نشده است،لاین 4: باکتری نوترکیب حاوی پلاسمید که با IPTG القاء شده است.وزن ملکولی پروتئین تخلیص شده با توجه به داشتن تیوردوکسین و Histag حدود 37-34 است.

3-6-1- تائید بیان پروتئین با وسترن بلاتینگ

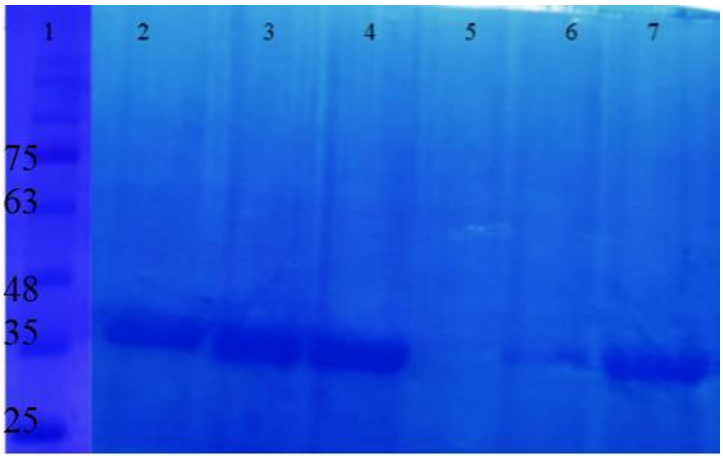
برای تائید بیان پروتئین از روش وسترن بلاتینگ استفاده شد. ابتدا پروتئین‌ها روی ژل SDS-PAGE از هم جدا شده و به غشای نیتروسلولزی انتقال یافتند. انکوباسیون غشای نیتروسلولزی با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال anti-His tag موشی و افزودن TMB موجب ظهور باند در ناحیه حدود37 کیلودالتونی شد که با پیشگویی‌های انجام شده برای وزن مولکولی و نیز بررسی صورت گرفته برای بیان با روش SDS-PAGE مطابقت داشت.



شکل 3-15- تائید بیان پروتئین با واکنش وسترن بلاتینگ. لاین 1: مارکر وزن مولکولی، لاین 2: باند مربوط به پروتئین نوترکیب تروپونین Iدارای His-tag که بعد از انکوباسیون با آنتی‌بادی ضد -His tag پلی‌کلونال موشی و افزودن TMB ظاهر شده است.وزن ملکولی پروتئین تخلیص شده با توجه به داشتن تیوردوکسین و Histag حدود 37-34 است.

3-7- انتخاب کلنی با ظرفیت بیان بالا

برای این که یک کلنی با ظرفیت بیانی بالا بدست آید، 6 کلنی مختلف از درون پلیت ترانس‌فورماسیون انتخاب گردید. تمامی این کلنی‌ها در حضور IPTG با غلظت نهایی 1mM به مدت 8 ساعت در دمای 25 درجه القاء شدند. نتایج حاصل از SDS-PAGE نشان می‌داد که 4 کلنی دارای ظرفیت بیانی بالایی هستند. از این رو این کلنی‌ها انتخاب شده و از آنها برای آنالیزهای بعدی استفاده گردید.



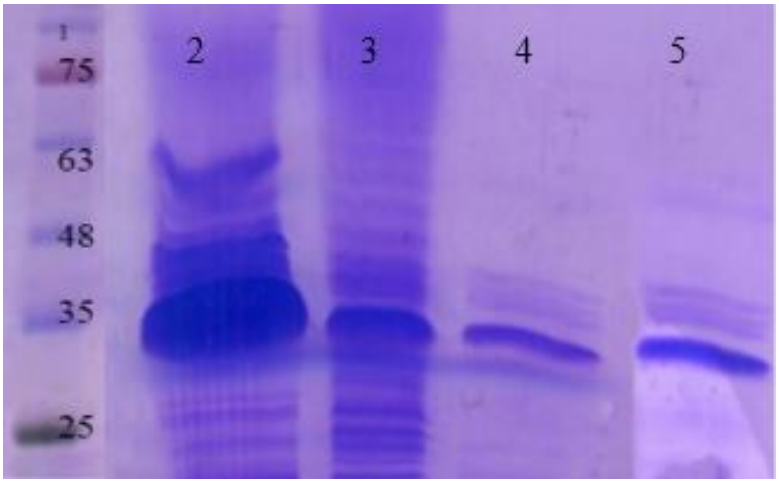
شکل 3-16- انتخاب کلنی با ظرفیت بیانی بالا(ژل 12٪)

لاین 1: باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب که با IPTG القاء نشده است، لاین1: مارکر وزن مولکولی پروتئین، لاین 2، 3، 4،5، 6، 7: کلنی‌های مختلف که از سطح پلیت ترانس‌فرماسیون انتخاب شده و با IPTG القاء شده‌اند. وزن ملکولی پروتئین تخلیص شده با توجه به داشتن تیوردوکسین و Histag حدود 37-34 است.

3-8- اپتیمم سازی بیان پروتئین

3-8-1- بهینه‌سازی غلظت IPTG

برای بهینه‌سازی غلظت IPTG ، با غلظت‌های مختلف از IPTG باکتری مورد نظر القاء گردید. بعد از کشت باکتری و رسیدن OD_{600} محیط به 0/6، باکتری با غلظت نهایی 0/1، 0/25، 0/5 و 1mM از IPTG در دمای 25 درجه القاء گردید. نتایج حاصل از آنالیز بعد از 12 ساعت نشان داد که تغییر غلظت IPTGدر سه غلظت 0/1، 0/25، 0/5 تاثیر چندای بر روی بیان پروتئین حاصل ندارد.اما در غلظت 1 mM بیان به خوبی افزایش نشان داد. از این رو در القای باکتری از غلظت 1mM از IPTG به عنوان القاء کننده استفاده گردید.

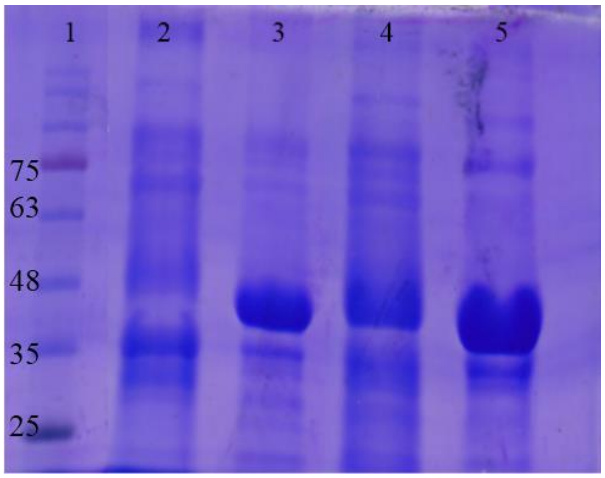


شکل 3-17- بهینه‌سازی غلظت IPTG برای بیان تروپونین I نوترکیب.

لاین 1: مارکر وزن مولکولی، لاین 2: غلظت 1 mM، لاین 3: القاء به غلظت 0/5، لاین 4: القاء با غلظت 0/25، لاین 5: القاء با غلظت 0/1. وزن ملکولی پروتئین تخلیص شده با توجه به داشتن تیوردوکسین و Histag حدود 37-34 است.

3-8-2- انتخاب مدت زمان انکوباسیون

نتایج حاصل از بررسی بیان پروتئین نشان می‌داد که پروتئین در 15 ساعت به خوبی بیان می‌شود. برای بهینه‌سازی مدت زمان انکوباسیون، بعد از القاء در دمای 25 درجه در مدت زمآنهای معین با فواصل 4 ساعت (4، ، 8، 12 و 16 ساعت) از محیط کشت باکتری نمونه گرفته شد. این نمونه‌ها برای آنالیز مقدار بیان در روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این بررسی نشان می داد که پروتئین در زمان 15 ساعت به خوبی بیان می‌شود.



شکل 3-18: بهینه‌سازی مدت زمان القاء برای بیان پروتئین

لاین 1: مارکر وزن مولکولی، لاین 2: القاء در 4 ساعت، لاین 3: القاء در 8 ساعت، لاین 4: القاء در 12 ساعت، لاین 5: القاء در 16 ساعت. وزن ملکولی پروتئین تخلیص شده با توجه به داشتن تیوردوکسین و Histag حدود 37-34 است.

3-9- بررسی تاثیر بیان پروتئین بر رشد باکتری

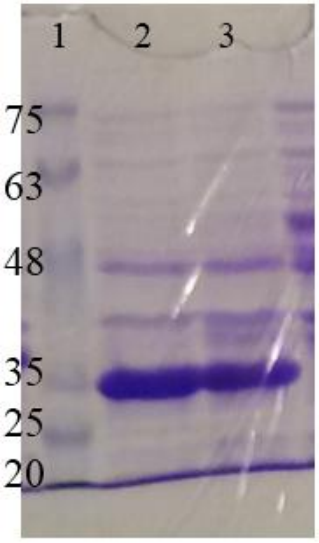
برخی از پروتئین‌ها دارای اثرات سمی بر رشد یا فرایندهای متابولیک باکتری‌ها هستند. برای بررسی اثرات سمی بیان پروتئین بر باکتری، مقدار جذب در طول موج 600 نانومتر در باکتری القاء شده در دمای 25 درجه و نیز باکتری القاء نشده فاقد پلاسمید نوترکیب اندازه‌گیری شد. نتایج این بررسی نشان داد که هیچ گونه تفاوتی در رشد این دو باکتری وجود ندارد. این مطلب احتمالاً موید عدم اثرات مضر پروتئین روی باکتری است.

3-10-تعیین حلالیت

برای تعیین این که پروتئین مورد نظر به چه میزان بین فازهای محلول و جامد باکتری توزیع می‌شود، از تست تعیین حلالیت استفاده گردید. بدین منظور باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب در دمای 25 درجه به مدت 16 ساعت توسط IPTG باغلظت نهایی 1 میلی‌مولار القاء شدند. بعد از این مدت باکتری‌ها با استفاده از سانتریفیوژ جمع‌آوری شده و بعد از سونیکاسیون فاز جامد و مایع هر دو روی ژل SDS-PAGE تفکیک شدند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که این پروتئین بیشتر در قسمت محلول قرار دارد. در واقع قرارگیری tagتیوردوکسین توانسته بود پروتئین را به شکل محلول بیان نماید. البته مقدار کمی از پروتئین در فاز نامحلول قرار داشت. اما در مقایسه با مقدار تام پروتئین این میزان بسیار کمتر بود.

3-11- تخلیص پروتئین

با توجه به اینکه اکثریت پروتئین در فاز محلول بیان شده بود به همین خاطر تخلیص فقط در فاز محلول صورت پذیرفت و از پروتئین موجود در فاز غیر محلول صرف نظر شد.. برای تخلیص پروتئین از ستون نیکل استفاده شد. نتایج حاصل از تخلیص در شکل 3-55 نشان داده شده است. همان گونه که در شکل 3-52 نیز نشان داده شده است، مقدار پروتئینی که در فاز محلول وجود داشت بسیار کمتر از پروتئینی بود که در فاز جامد حضور داشت. همان گونه که در شکل 3-18 نیز پیداست، با استفاده از ستون نیکل خلوص پروتئین به بیش از 90 درصد رسید که برای تزریق جهت ایمونیزاسیون مطلوب است.



شکل 3-19: تخلیص پروتئین با استفاده از ستون نیکل

لاین 1: مارکر وزن مولکولی، لاین 2: پروتئین تخلیص شده از فاز محلول، لاین 3: پروتئین تخلیص شده از فاز نامحلول.لاین . فاز محلول باند قوی تری نسبت به فاز نامحلول دارد که بخاطر داشتن تیوردوکسین است.بیشترین مقدار پروتئین در این فاز قرار داشت.

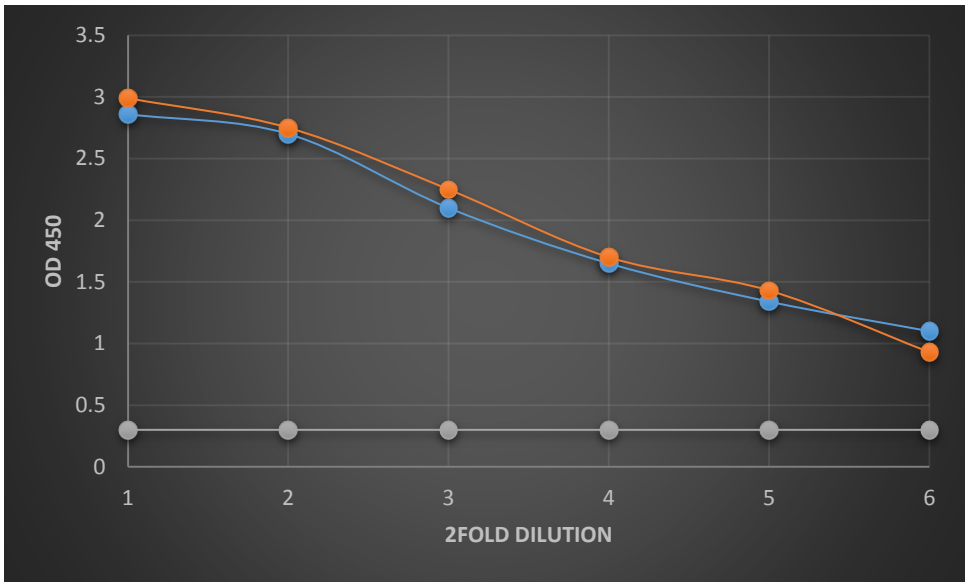
3-12- تعیین تیتر آنتی بادی درسرم خرگوش ایمن شده با تروپونین I نوترکیب

نتایج حاصل از ایمونیزاسیون خرگوشها نشان داد خرگوشهای مورد نظر بطور کامل ایمن شده است و از آنهامی‌توان به منظور تهیه آنتی بادیپلی کلونال استفاده نمود.برای انجام الایزا جهت تیتراسیون، 100 میکرولیتر محلول پروتئیننوترکیب تروپونین I قلبی باغلظت 6 میکرو گرم در میلی لیتر برای پوشش دهی چاهک ها در روش الایزا کافی ومناسب است.

جدول 3-11- تیتراسیون سرم خرگوش های ایمن شده با آنتی ژن نوترکیب تروپونین I قلبی با استفاده از روش الایزای غیر مستقیم

شماره خرگوش	NRS	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
1	0.3	2.86	2.7	2.10	1.65	1.34	1.10
2	0.3	2.99	2.75	2.25	1.70	1.43	0.93

(NRS:normal rabbit serum)



شکل 3-20- تیتراسیون خرگوشهای ایمن شده با استفاده از آنتی ژن نوترکیب تروپونین I قلبی

(طوسی :قبل از تزریق؛ قرمز/آبی:موشهای ایمن شده).هردوخرگوش با اختلاف زیادی نسبت به سرم قبل از از تزریق ایمن شده بودند.رقت های 1:500 تا 1:32000 بودند.

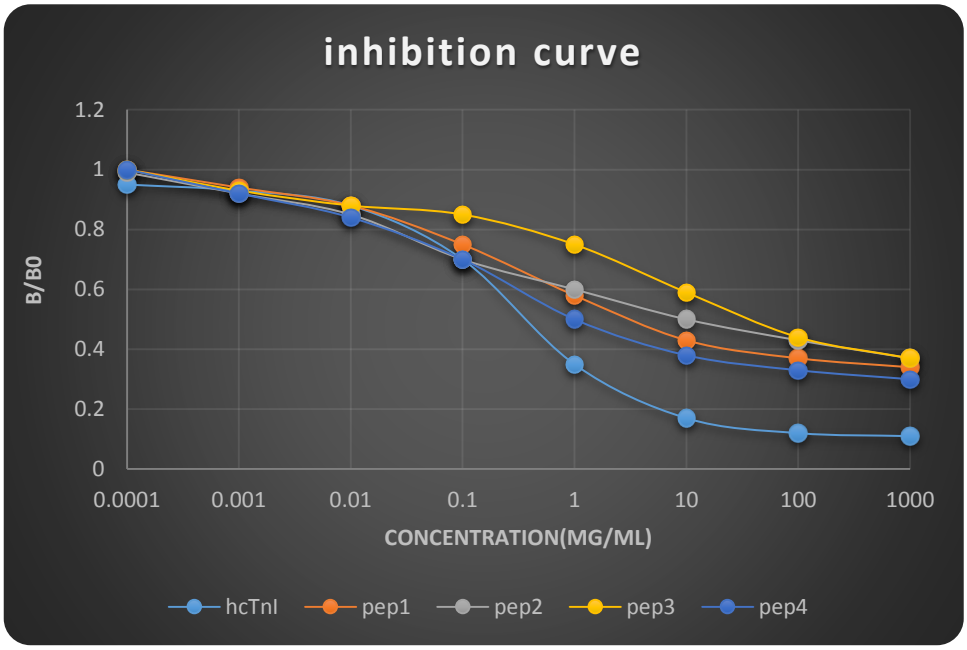
3-13- الایزای رقابتی غیر مستقیم برای تعیین میزان مهارتروپونین توسط اپی توپ های انتخاب شده

حساسیت تست ایمنواسی الایزا و توانایی اپی توپ های پپتیدی برای مهار واکنش آنتی ژن –آنتی بادی مطابق با روشی محاسبه IC50 انجام گردید.برای بررسی این حساسیت از روش محاسباتی IC50 برای بررسی میزان مهار اپی توپ های مختلف استفاده گردید(جدول3-10).نمودار مهاری اپی توپ های چهارگانه در شکل 3-22آمده است.همانگونه که در جدول مشخص شده است میزان IC50 برای تروپونین نوترکیب 0.490 µg/ml ومیزان حد تشخیص (LOD) حدود 0.037 µg/ml بود.این مقدار برای سایر پپتید ها نیز در جدول امده است.نتایج نشان می‌دهد میزان مهار اپیتوپ های پپتیدی برای پپتید شماره 2و4 ازسایر پپتیدها کمتر بوده است.

جدول 3-12- بررسی میزان مهار اپی توپ های پپتیدی انتخاب شده با پروتئین تروپونین نوترکیب

Competitor	sequence	LOD(µg/ml)	IC50(µg/ml)	Minimum OD	Maximum OD
hcTnI	1-210	0.037	0.490	0.094	0.964
Peptide 1	40-54	0.050	0.306	0.317	1.007
Peptide 2	31-39	0.066	0.141	0.310	1.087
Peptide 3	87-91	0.078	0.960	0.231	0.988
Peptide 4	27-36	0.047	0.155	0.282	1.014

LOD :حداقل میزان تشخیص تست؛IC50 :نصف ماکزیمم غلظت مهاری مهارکننده



شکل 3-21- نمودار مهاری الایزای رقابتی برای اپی توپ های پپتیدی انتخاب شده برای تروپونین I قلبی.B/B0 در وذقع بیانگر نسبت مهار توسط پپتیدهاست که B بیانگرجذب چاهک های حاوی ماده رقابتی و B0 بیانگر میزان جذب چاهک های بدون ماده رقابتی است.

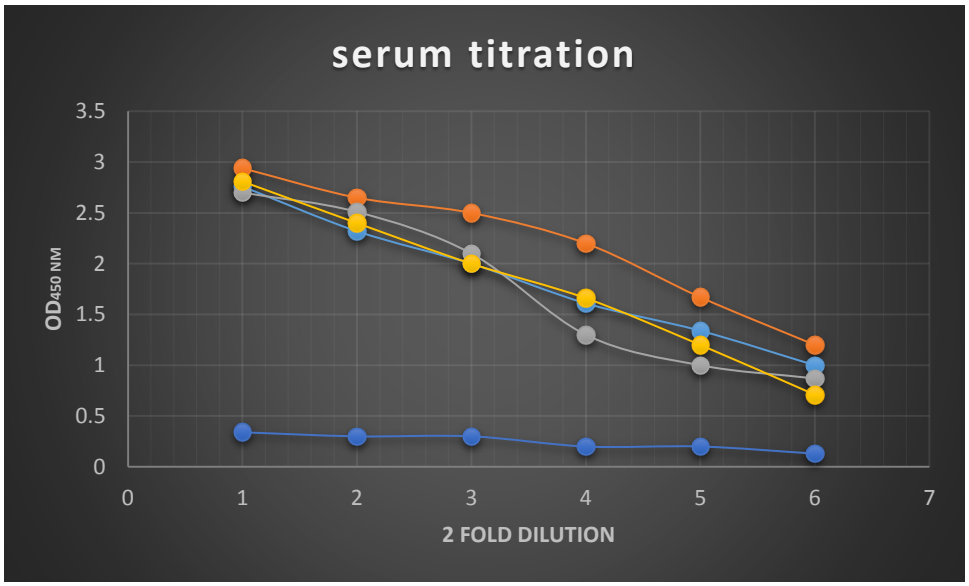
3-14- تعیین تیتر آنتی بادی درسرم موش ایمن شده با استفاده از پروتئین نوترکیب تروپونین I قلبی

نتایج حاصل از ایمونیزاسیون موشها نشان داد موش های مورد نظر بطور کامل ایمن شده است و از آنهامی‌توان به منظور تهیه آنتی بادی مونوکلونال استفاده نمود.برای انجام الایزا جهت تیتراسیون، 100 میکرولیتر محلول پروتئیننوترکیب تروپونین I قلبی باغلظت 6 میکرو گرم در میلی لیتر برای پوشش دهی چاهک ها در روش الایزا کافی ومناسب است.

جدول 3-13- تیتراسیون سرم موش ایمن شده با آنتی ژن نوترکیب تروپونین I قلبی با استفاده از روش الایزای غیر مستقیم

شماره موش	NMS	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
1	0.3	2.76	2.52	2.00	1.61	1.34	1.00
2	0.3	2.94	2.65	2.21	1.70	1.45	0.91
3	0.3	2.70	2.51	2.10	1.56	1.39	0.87
4	0.3	2.81	2.56	2.19	1.45	1.21	0.71

NMS:normal mouse serum



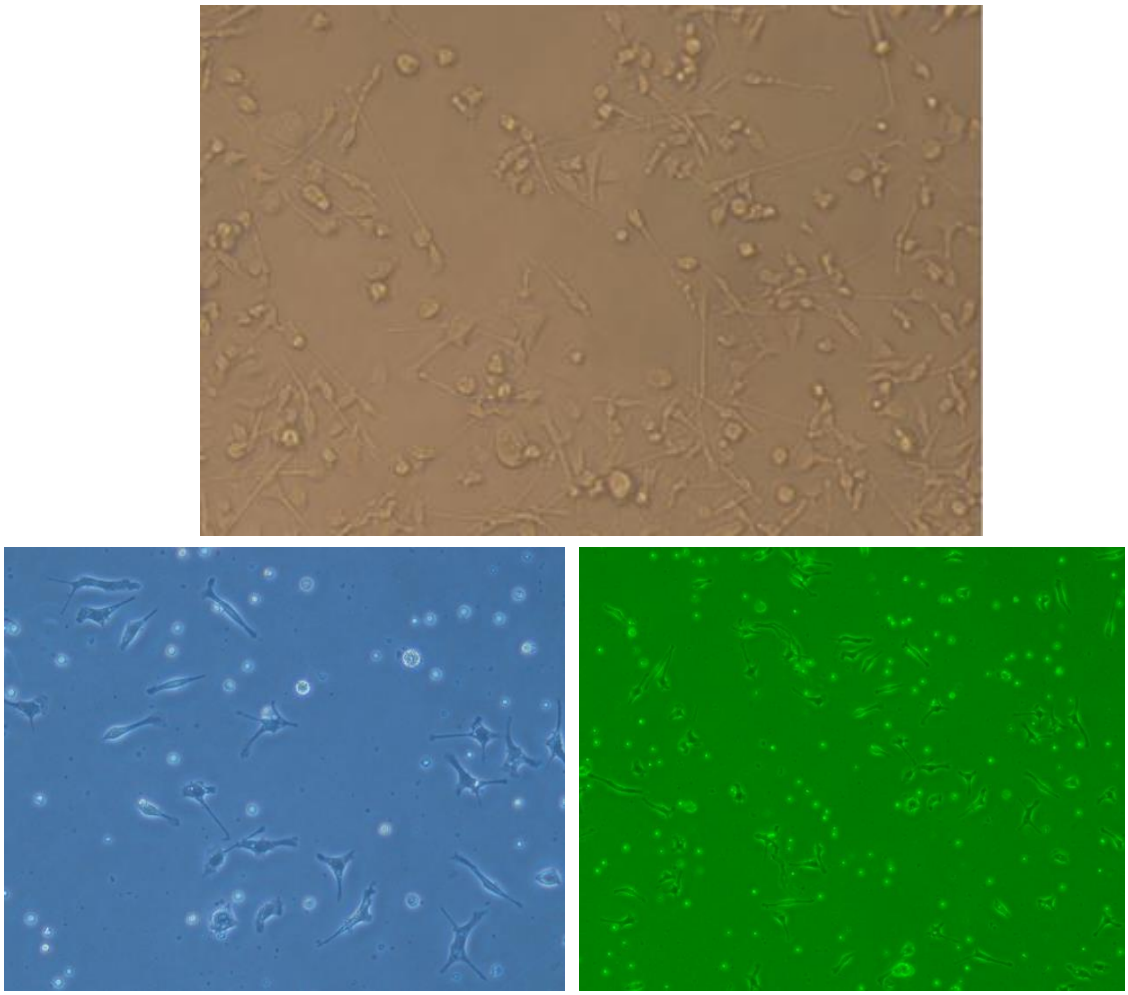
شکل 3-22- تیتراسیون موش های ایمن شده با استفاده از انتی ژن نوترکیب تروپونین I قلبی(آبی:قبل از تزریق؛ سایر رنگها:موشهای ایمن شده)

3-15- فیوژن سلولهای طحالی موش ایمونیزه شده و سلولهای میلومای موشی

برای تولید MAb های اختصاصی علیه تروپونین I قلبی، سلولهای طحالی موش دارای بالاترین تیتر آنتی بادی سرمی انتخاب شده و با سلولهای میلومای موشی SP2/0 فیوژن داده شدند. سپس سلولها در حفرات پلیتهای 96 تایی تقسیم شده و با افزودن محیط انتخابی HAT سلول های هیبریدوما گزینش شدند. در مرحله بعد، سلولهای هیبرید بدست آمده از نظر واکنشدهی با پروتئین هدف مورد غربالگری قرار گرفتند.

3-15-1- تهیه لایه مغذی

روز قبل از فیوژن یک سر موش بعد از حدود یک شب ناشتایی توسط دی اکسید کربن کشته شدو سپس با پاساژ توسط سه ظرف الکل استریل گردید.در زیر هود با تزریق محیط RPMI مارکروفازهای ان جدا و سپس در پلیت های 96 تایی تقسیم گردید.روز فیوژن نیز از نظر آلودگی این پلیت ها بررسی و اطمینان از نظر نداشتن هیچگونه آلودگی حاصل گردید(شکل3-23)



شکل ۳-۲۳- سلولهای مغذی تهیه شده برای فیوژن

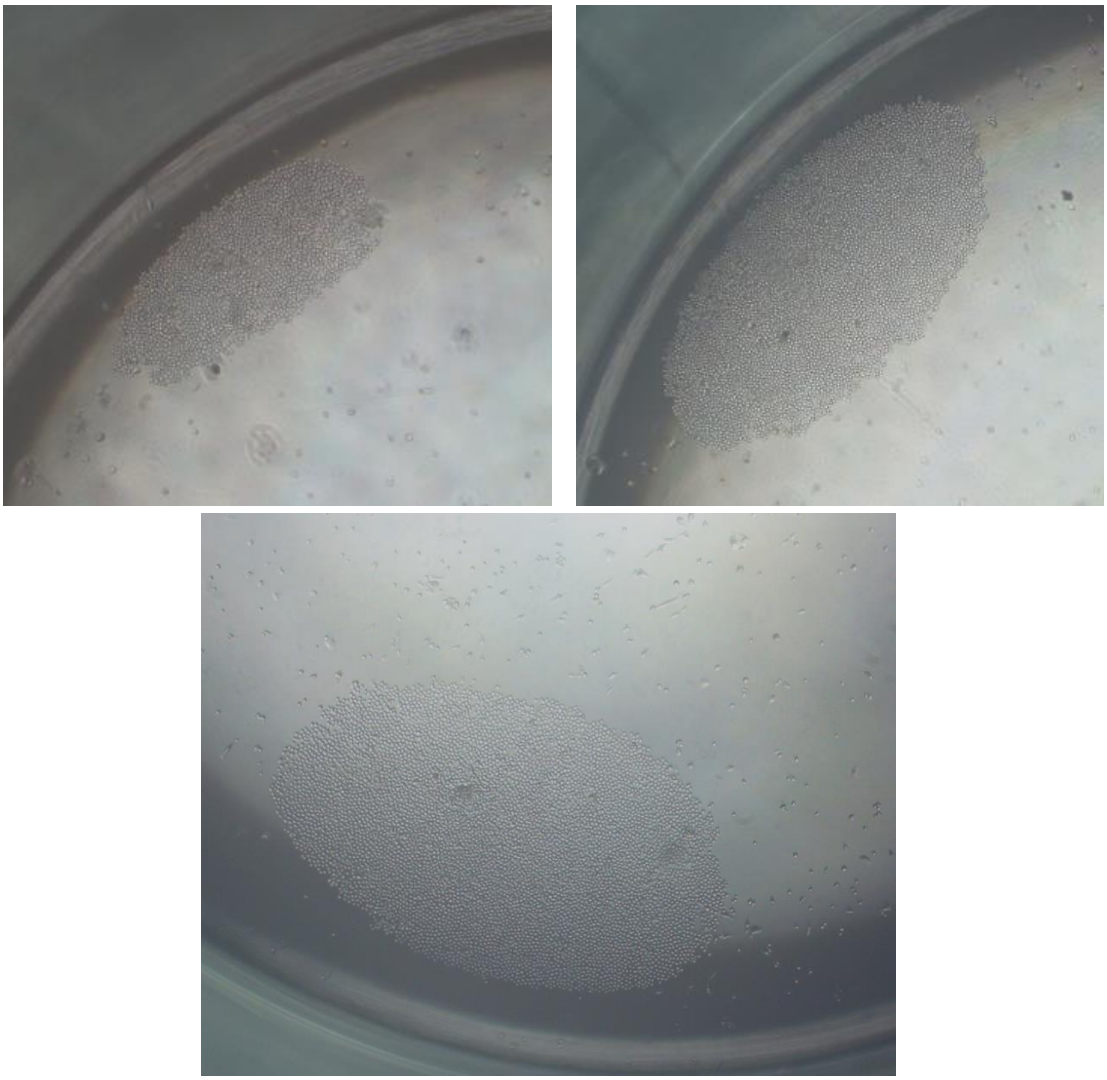
3-15-2- غربالگری سلول های هیبریدوم تولید کننده آنتی بادی ضد تروپونین I قلبی

حدود 7-5 روز پس از انجام فیوژن و اضافه کردن محیط انتخابی HAT در پلیت های کشت سلول، کلون های هیبریدوما شروع به تکثیر کردند. در شکل 3-16 مراحل ابتدایی رشد یک هیبریدوم در یکی از حفرات پلیت کشت 96 تایی (A)، رشد همان کلون پس از 4 روز (B) و رشد کلون هیبریدوم پس از یک هفته (C) نشان داده شده است.

حدود سه هفته پس از انجام فیوژن سلول های هیبریدوم 30 تا 40 درصد از چاهکها را پر کرده بودند. در این مرحله تمام چاهک ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس بررسی و چاهک های مناسب انتخاب شدند. تیتر آنتی‌بادی اختصاصی در محیط کشت چاهک های مذکور به روش الایزای غیر مستقیم مورد بررسی قرار گرفت. چاهک های دارای تعداد ناکافی از سلول های هیبریدوم تغذیه شده و در روزهای بعد پس از تکثیر کافی به روش مشابه از نظر تولید آنتی بادی بررسی شدند. در مجموع از چهار فیوژن و تعداد 1920 چاهک ابتداییکه بررسی شدند، 680 چاهک مولد آنتی بادی اختصاصی ضد تروپونین I قلبیبودند. از این 680 هیبریدوما تعداد 32 عدد چهار بار کلون شدند که در نهایت 5 کلون نهایی به دست آمد.

3-15-3- انتخاب کلون های نهایی مولد آنتی بادی منوکلونال ضد تروپونین I قلبی

پس از غربالگری اولیه، از بین چاهک های مثبت در حال رشد، تعداد 32 چاهک دارای جذب نوری بالاتر انتخاب و چهار بار کلون شدند در جدول 3-4 جذب نوری کلون های مادر 5 کلون نهایی آورده شده است. غربالگری ساب کلونها با همان الایزای غیر مستقیم صورت گرفت. در جدول 3-14، نتایج الایزایغربالگری پس از فیوژن نشان داده شده است.



شکل 3-24: هیبریدوماهای در حال رشد در روزهای مختلف پس از فیوژن

جدول 3-14: نتایج الایزای غیرمستقیم بعد از فیوژن در چاهک های با کلون مثبت

پلیت شماره 1:کلون زرد کلون انتخاب شده برای رقت سازی محدود است. اعداد مربوط به OD چاهگ های کلونهای مختلف هستند.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.688	3.084	3.099	2.993	3.164	3.134	2.977	2.964	2.806	2.959	3.059	3.108
B	3.043	2.777	3.047	3.074	3.059	3.254	3.157	3.061	3.059	3.204	3.047	3.248
C	3.195	3.126	3.1	3.226	3.166	3.111	3.173	3.165	3.086	2.997	3.205	2.806
D	3.128	3.009	2.969	2.999	2.921	3.018	3.098	2.908	3.126	3.138	3.01	3.137
E	3.276	3.023	3.297	3.041	2.972	2.643	2.796	2.92	3.106	2.994	3.08	3.171
F	3.2	3.112	3.054	2.778	2.845	3.076	2.919	2.633	2.703	2.865	2.763	2.791
G	3.252	3.1	3.248	3.16	2.886	2.969	3.029	3.007	3.067	3.008	2.85	2.946
H	3.183	3.015	2.917	3.101	2.904	3.16	2.821	2.885	2.793	2.864	2.782	2.947

پلیت شماره 2:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.91	2.38	2.647	2.568	2.748	2.696	2.648	2.631	2.472	2.595	2.728	2.994
B	2.526	2.561	2.471	2.591	2.724	2.618	2.508	2.562	2.905	2.873	2.535	2.861
C	2.903	2.664	2.345	2.539	2.63	2.594	2.543	2.264	2.752	2.686	2.752	2.846
D	2.651	2.763	2.618	2.565	2.242	2.644	2.636	2.551	2.486	2.572	2.541	2.544
E	2.659	2.928	2.37	2.627	2.76	2.928	2.745	2.759	2.433	2.823	2.851	2.686
F	2.665	2.664	2.664	2.624	2.457	2.602	2.647	2.673	2.578	2.63	2.748	2.622
G	2.875	2.897	2.398	2.626	2.447	2.816	2.596	2.642	2.604	2.627	2.628	2.084
H	3.004	2.86	2.784	2.784	2.678	2.648	2.801	2.868	2.513	2.552	3.003	2.821

پلیت شماره 3:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.858	2.613	2.75	2.224	2.789	2.662	2.608	2.446	2.691	2.417	2.539	2.756
B	2.908	2.72	2.734	2.676	2.376	2.75	2.704	2.594	2.662	2.61	2.795	2.833
C	2.87	2.824	2.706	2.665	2.76	2.501	2.625	2.609	2.783	2.654	2.714	2.863
D	2.473	2.766	2.66	2.575	2.182	2.39	2.473	2.487	2.562	2.569	2.814	2.531
E	2.809	2.675	2.425	2.465	2.56	2.519	2.655	2.396	2.46	2.345	2.562	2.746
F	2.726	2.737	2.64	2.262	2.335	2.58	2.62	2.553	2.491	2.405	2.571	2.303
G	2.755	2.876	2.751	2.568	2.618	2.603	2.665	2.578	2.605	2.571	2.739	2.549
H	2.751	2.756	2.944	2.983	2.629	2.554	2.784	2.98	2.659	2.704	2.663	2.801

پلیت شماره 4:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.203	2.678	2.675	2.588	2.643	2.631	2.747	2.511	2.659	2.664	2.686	2.903
B	2.542	2.305	2.483	2.349	2.491	2.6	2.293	2.283	2.488	2.576	2.515	2.764
C	2.524	2.549	2.389	2.506	2.362	2.567	2.653	2.644	2.607	2.697	2.568	2.706
D	2.691	2.645	2.45	2.659	2.412	2.18	2.402	2.254	1.973	2.089	2.068	2.597
E	2.705	2.648	2.476	2.722	2.839	2.757	2.704	2.315	2.16	2.536	2.334	2.41
F	2.597	2.473	2.667	2.507	2.648	2.588	2.5	2.426	2.503	2.445	2.489	2.652
G	2.922	2.73	2.694	2.513	2.567	2.567	2.605	2.261	2.781	2.497	2.689	2.754
H	2.805	2.583	2.726	2.765	2.689	2.607	2.715	2.536	2.63	2.334	2.508	2.341

پلیت شماره 5:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.723	2.374	2.533	2.458	1.158	1.475	1.239	1.497	1.123	1.037	1.122	1.426
B	1.91	2.415	2.201	2.426	1.938	1.035	1.325	1.227	1.178	1.339	1.411	1.017
C	2.584	2.38	2.344	2.425	1.512	1.322	1.533	1.131	1.297	1.541	1.389	1.48
D	2.507	2.456	2.444	2.184	1.206	1.209	1.162	2.104	1.22	0.957	1.118	1.374
E	2.777	2.706	2.624	1.546	1.398	1.087	1.415	1.163	1.169	2.37	0.987	1.326
F	2.49	2.745	2.496	1.525	1.23	1.439	1.214	1.206	1.14	1.299	1.243	1.208
G	2.305	2.875	2.466	1.693	1.508	1.236	2.448	0.981	1.286	1.242	1.412	2.147
H	2.447	2.706	2.508	2.276	1.513	1.248	1.275	1.405	1.372	1.08	1.268	1.111

پلیت شماره 6:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.008	1.257	1.397	1.728	1.08	1.156	1.647	1.15	1.325	1.117	1.172	1.917
B	1.245	1.506	1.032	0.999	1.067	1.231	1.266	1.282	1.253	1.089	1.122	0.799
C	1.433	1.288	1.097	1.241	1.379	1.205	1.246	1.133	1.031	1.177	0.98	1.162
D	1.218	1.24	1.159	1.105	1.121	2.05	0.942	0.949	0.868	1.29	1.06	1.496
E	2.183	1.33	1.243	1.826	1.863	1.166	1.749	1.834	2.431	0.806	1.098	1.258
F	1.3	1.185	1.143	1.262	1.14	1.256	1.017	1.162	1.13	0.997	1.81	1.045
G	1.41	1.39	1.408	1.274	1.51	1.232	1.139	1.246	1.183	2.149	1.026	1.001
H	1.674	1.579	1.282	1.284	1.293	1.345	1.3	1.02	1.232	1.006	1.298	1.34

پلیت شماره 7:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.868	0.947	1.039	1.21	1.362	0.935	1.057	1.788	1.155	1.382	0.996	1.289
B	1.098	0.95	1.19	1.042	1.173	1.116	1.167	1.113	1.048	1.144	1.106	0.857
C	1.207	1.063	2.31	0.87	1.132	0.976	1.018	1.167	1.101	1.431	1.089	1.116
D	1.127	1.116	1.143	0.991	0.818	0.903	1.127	1.151	0.999	0.986	1.143	1.417
E	0.875	1.14	1.016	1.266	1.084	0.905	1.086	1.111	1.162	1.18	1.114	1.11
F	1.216	1.015	1.064	0.979	1.217	1.044	1.053	1.117	0.916	1.21	0.819	1.118
G	1.133	0.943	1.09	1.093	1.059	1.105	0.757	0.879	1.2	0.823	0.964	0.866
H	1.372	0.999	1.164	0.996	0.971	1.099	0.828	0.677	1.149	1.151	1.034	0.944

پلیت شماره 8: چاهک های زرد کنترل منفی با سوپ SP2/0

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.151	1.123	0.9	1.187	1.292	2.412	1.12	0.987	1.324	0.9	1.301	1.256
B	1.077	1.132	1.042	1.281	1.311	1.256	1.171	1.036	1.24	1.214	0.956	1.18
C	1.199	1.462	1.077	1.191	1.815	2.357	1.398	1.176	1.054	1.282	0.957	1.267
D	1.159	1.115	1.182	0.994	1.233	1.157	1.049	1.074	1.324	0.86	1.061	1.171
E	1.341	0.715	1.093	1.264	1.277	1.377	1.119	1.179	1.179	1.063	1.101	1.88
F	1.325	2.058	0.672	1.764	1.062	1.267	1.159	1.191	1.631	1.102	1.232	1.043
G	1.045	0.681	1.194	1.136	2.005	1.122	1.115	1.082	1.415	1.771	1.133	0.312
H	1.161	2.042	1.222	1.85	1.344	1.42	1.206	1.201	1.315	1.074	1.286	0.294

3-16- تعیین ایزوتایپ آنتی بادی های منوکلونال ضد تروپونین I قلبی

جهت مشخص کردن نوع کلاس (ایزوتیپ) زنجیره های سبک و سنگین ابتدا از سوپ رویی کلون های اختصاصی تروپونینIقلبی و کیت IsoStrip مخصوص آنتی بادی موشی استفاده گردید. پس از اضافه کردن سوپ رویی این کلون ها و حل شدن دانه های آبی رنگ درون لوله های مخصوص تعیین ایزوتایپ، نوار مربوطه به درون لوله انتقال داده شد و نتیجه آزمون پس از حدود 10-5 دقیقه بصورت باند آبی رنگ بر روی نوار ظاهر گردید که نمونه ای از آن در شکل 3-25 با فلش نشان داده شده است. فلش ها نشانگر باندهایی هستند که به عنوان نتیجه مثبت تلقی می‌شوند.

شکل3-25: تعیین ایزوتیپ آنتی بادی های منوکلونال موشی با روش IsoStrip

آزمون ایزو استریپ بر روی سوپ رویی 1 کلون انجام شد و انجام این آزمون بر روی بقیه کلون ها بدلیل عدم دسترسی به کیت مربوطه میسر نگردید. نتایج تعیین ایزوتایپ با کیت ایزواستریپ نشان داد که مونوکلونال آنتی بادی کلونP1D2E3 دارای زنجیره سبک از نوع کاپا(κ) بوده ولی دارای کلاس های مختلف IgG2aمی‌باشد.

3-17- نتایج رقیق سازی اولیه (Limiting Dilution)

با انجام مرحله اول رقیق سازی با توجه به میزان جذب کلون ها ، کلون شماره 21(رنگ زرد در پلیت شماره 1 ؛جدول 3-12) انتخاب و مرحله رقیق سازی حد ثانویه روی آن انجام گرفت.بعد از رقت سازی تعداد 20 کلون با ترشح آنتی بادی و با OD بالا انتخاب گردیدند.ضمنا اتصال غیر اختصاصی برای تمام این تست ها با استفاده از BSA سنجش گردید.

جدول3-15: نتایج رقیق سازی حد اولیه کلون شماره 21

شماره کلون	OD	شماره کلون	OD	شماره کلون	OD	شماره کلون	OD
1	3/3	6	2/8	11	3/0	16	2/8
2	2/8	7	3/0	12	2/9	17	2/6
3	3/1	8	3/1	13	3/1	18	3/0
4	2/9	9	3/3	14	3/0	19	3/1
5	3/1	10	2/9	15	2/7	20	3/0

$BSA_{OD}=0.19$

3-18- نتایج رقیق سازی حد ثانویه (Limiting Dilution) کلون 21

کلون های با ترشح بالا انتخاب و از آنها مجموع مادر کلون درست شد و همچنین کلونی که دارای بیشترین جذب بود در پلیتهای 25 تایی و متعاقبا در فلاسک های 25 میلی لیتری و 75 میلی لیتری کشت انبوه داده شد. نتایج رقیق سازی حد ثانویه در جدول 3-14 نشان داده شده است.

جدول3-16- نتایج رقیق سازی حد ثانویه (کلون 21)

شماره کلون	OD	شماره کلون	OD	شماره کلون	OD
1	3/26	6	3/21	11	3/0
2	3/22	7	3/3	12	2/91
3	3/29	8	3/22	13	3/01
4	3/03	9	3/31	14	2/99
5	3/3	10	3/3	15	3/12

$BSA_{OD} = 0.21$

3-19- انتخاب کلون های مترشحه مونوکلونال آنتی بادی

بعد از دومین رقت سازی محدود کننده و بر اساس نتایج جدوول شماره 3-15 تعداد 5 کلون انتخاب و برای تزریق به موش جهت تولید آسیت به موش تزریق گردید.

3-19-1- نامگذاری کلونهای تولید کننده مونوکلونال آنتی بادی

کلون های انتخاب شده تولید کننده آنتی بادی مونوکلونال با نامهای ذیل نامگذاری شدند.

جدول 3-17- نامگذاری کلونهای نهایی

کلون شماره 1	کلون شماره 2	کلون شماره 3	کلون شماره 4	کلون شماره 5
P1D2E3	P1H1D7	P1B5D7	P2E4D3	P3A2F4

3-20-تولید آسیت در موش با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال 5 کلون نهایی

برای تولید آنتی بادی مونوکلونال با استفاده از 5 کلون نهایی تعداد 5 سر موش با این کلون ها بصورت تزریق داخل صفاقی آسیتی شدند ونهایتا هر 5 موش نیز آسیت خوب و مناسب باحجم بالا تولید کردند.شکل3-22 موش دارای آسیت را در نقایسه با موش قبل از تولید آسیت نشان می‌دهد.

شکل 3-26: موش آسیتی شده در مقایسه با موش نرمال

3-15- تخلیص جذبی آنتی بادی های منوکلونال IgG ضد تروپونین I قلبی با استفاده از پروتئین G

برای بررسی بیشتر و تعیین هویت دقیق تر آنتی بادی های نهایی شده ضدتروپونینIقلبی ، بایستی از آنتی بادی ها بصورت تخلیص شده و با غلظت مشخص استفاده گردد. بدین منظور، 5 کلون نهایی شامل کلون های(P2E4D3 ؛ P1B5D7؛ P3A2F4؛ P1H1D7؛ P1D2E3) بصورت درون صفاقی به موشهای BALB/c تزریق شده و از آنها مایع آسیت بدست آمد. آسیت مربوط به آنتی بادیهای IgG پس از سانتریفوژ دور بالا و فیلتر کردن، از ستون G عبور داده شد. آنتی بادی هایی که به ستون ها متصل شده بودند، با شستشوی ستون با بافر PBS نیز هنوز متصل باقی می ماندند ولی با استفاده از بافر اسیدی Glycin-HCl از

ستون شسته[1]می شدند. محلول خروجی از ستون بصورت الیکوتهای 1 میلی لیتری در لوله های مجزا جمع آوری و ODآنها در طول موج 280 نانومتر تعیین گردید.فراکشن های با OD بالا با هم مخلوط شده وسپس به کیسه دیالیز منتقل شده و در مقابل بافر PBS بصورت شبانه در دمای یخچال دیالیز گردیدند. پس از دیالیز، آنتی بادی ها مجدداً تعیین غلظت شده و در دمای $20^{\circ}C$- نگهداری شدند. بدین ترتیب از 5 کلون IgG که آنتی بادی های موشی ضد تروپونین I قلبی تولید می کردند IgG خالص، در غلظت مناسب برای آزمون های بعدی بدست آمد. میزان IgG تصفیه شده از آسیت 5 کلون انتخابی در جدول3-16ارائه شده است.

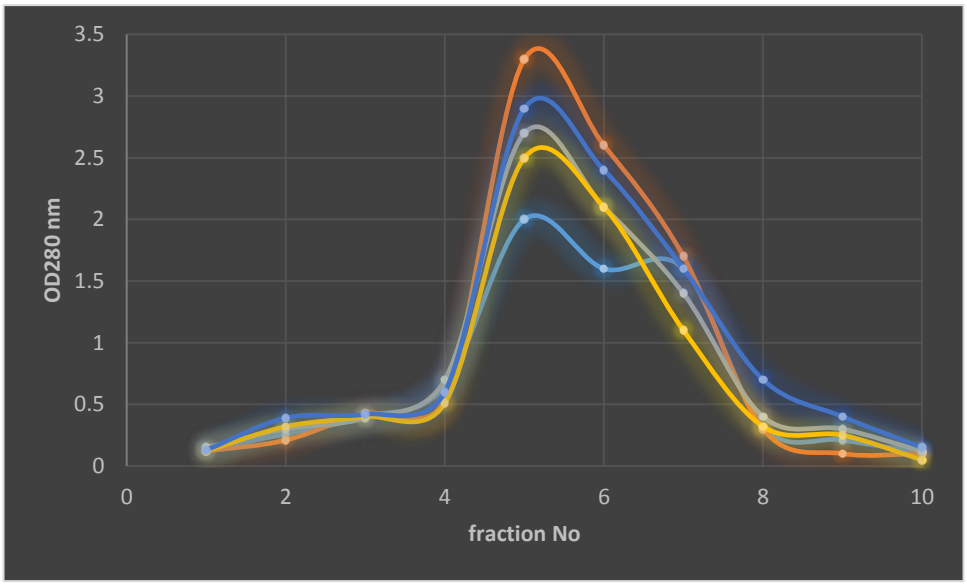
جدول 3-18 : نتایج تخلیص آنتی بادی از اسیت موش های آسیتی شده

ردیف	نام کلون	حجم آسیت (ml)	غلظت پروتئین بعد از سولفات آمونیوم(mg)	غلظت آنتی بادی بعد از ستون G (mgr)
1	P1D2E3	10 ml	14.5	3.75
2	P2E4D3	5 ml	5.59	2.08
3	P1H1D7	4 ml	8.49	1.86
4	P3A2F4	5 ml	9.86	2.58
5	P1B5D7	5 ml	8.79	2.28

3-15-1-نتایج مربوط به تهیه آنتی بادی خالص پس از عبور از ستون افینیتی کروماتوگرافی پروتئین ها

نمونه حاصل از مرحله رسوب دهی با سولفات آمونیوم اشباع پس از دیالیز و ۲ شبانه روز قرار گرفتن در سوسپانسیون ژل حاوی پروتئین G در ستون ریخته شد و در نهایت جذب اپتیکال فراکشن های مختلف اندازه گیری شد (شکل 3-28)

[1]Elute

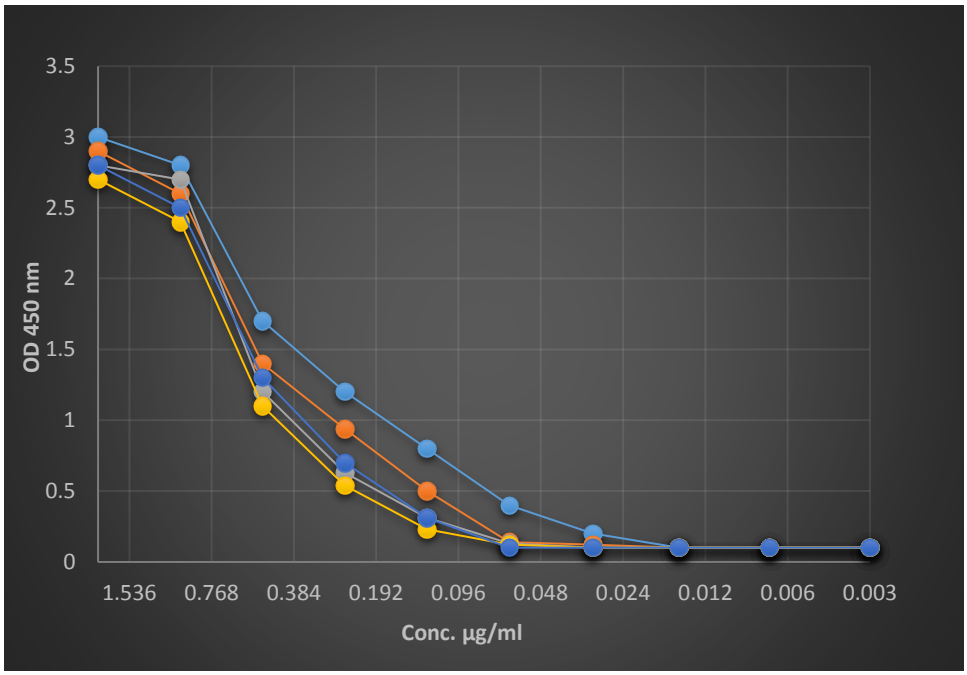


شکل 3-27- جذب نوری فراکشن های حاصل از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی مربوط به 5 کلون نهایی.در فرکشن های 6-4 بیشترین میزان تخلیص آنتی بادی دیده می‌شود

3-21- واکنشدهی آنتی بادی های تخلیص شده ضد تروپونینIقلبی در الایزای غیر مستقیم

برای بررسی واکنش‌دهی مونوکلونال آنتی بادی های موشی ضد تروپونین I قلبی پس از فرایند تخلیص، از تست الایزای غیر مستقیم استفاده شد. تمام آنتی بادی ها بصورت رقتهای متوالی از غلظت 2µg/mlبر روی غلظت ثابت 6µg/ml از پروتئین نوترکیب تروپونین I قلبی تیتراسیون شدند.

در شکل 3-28 بصورت نمونه تیتراسیون 5آنتی بادی منوکلونال (P2E4D3 ؛ P1B5D7 ؛ P3A2F4؛ P1H1D7؛P1D2E3) نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود، واکنش آنتی بادی ها حتی در غلظت های پائین نیز OD های بالا بدست داده و با کم شدن غلظت آنتی بادی، OD ها بصورت روند کاهشی خطی کمتر شدند که OD های بدست آمده در مقایسه با کنترل منفی، سیگنال بالائی داده و نشان از واکنش اختصاصی آنتی بادی ها با آنتی ژن مربوطه داشتند.



شکل 3-28- تیتراسیون آنتی بادی های مونوکلونال تولید شده در آسیت موش

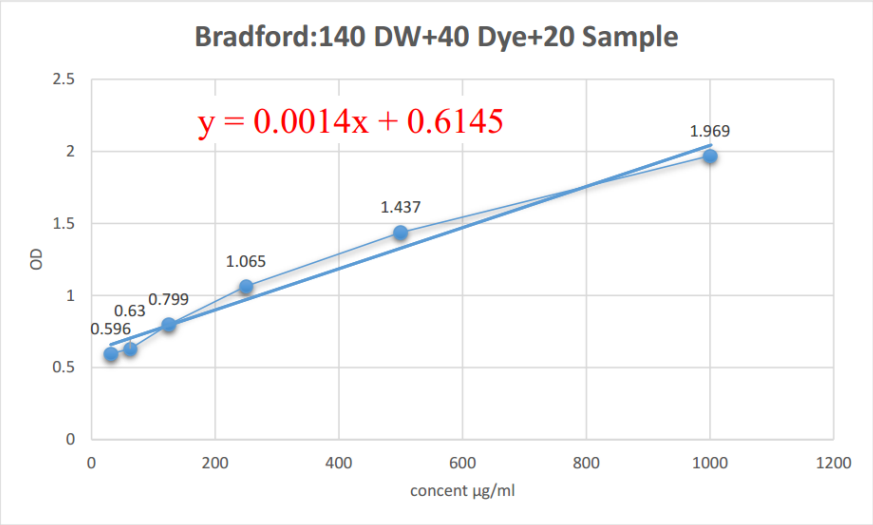
واکنش آنتی بادی ها حتی در غلظت های پائین نیز OD های بالا بدست داده و با کم شدن غلظت آنتی بادی، OD ها بصورت روند کاهشی خطی کمتر شدند که OD های بدست آمده در مقایسه با کنترل منفی، سیگنال بالائی داده و نشان از واکنش اختصاصی آنتی بادی ها با آنتی ژن مربوطه داشتند.

نتایج این آزمون نشان داد که عمل تخلیص آنتی بادی ها با ستون پروتئین Gکاملا موفقیت آمیز بوده و تمامی مونوکلونال آنتی بادی ها واکنشدهی مناسبی با تروپونین I قلبی نوترکیب داشته اند. این نشان می دهد در تمام طول مراحل کشت هیبریدوماها، تزریق این سلول ها به موش های BALB/c، تشکیل مایع آسیت و تخلیص، از کار افتادن کلون ها و یا تخریب ساختاری مونوکلونال آنتی بادیها اتفاق نیفتاده است.

3-22- رسم منحنی استاندارد برادفورد

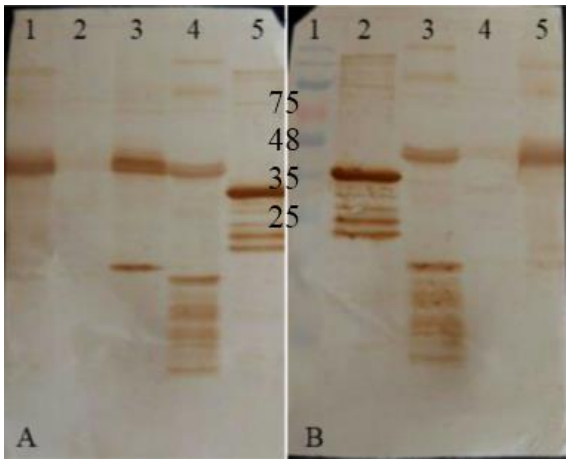
جدول 3-19- غلظتهای مختلف استاندارد BSA جذب های مختلفی دارند.

شماره لوله	1	2	3	4	5	6
OD 595 nm	0/596	0/63	0/799	1/065	1/437	1/969
غلظت استاندارد(µg/ml)	31/25	62/5	125	250	500	1000



شکل3-29- منحنی استاندارد حاصل از غلظتهای مختلف پروتئین BSA با معرف برادفورد.

3-23- تائید آنتی بادی های مونوکلونال تخلیص شده باوسترن بلاتینگ



شکل 3-30- وسترن بلاتینگ آنتی بادی تخلیص شده کلون A (P1D2E3) و کلون B (P2E4D3)

A:لاین 1:بافت قلب موش ؛لاین 2: بافت کبد موش(کنترل منفی)؛لاین 3:بافت قلب انسان؛لاین 4:بافت قلب رت؛لاین 5:پروتئین نوترکیب تروپونین I قلبی

B: لاین 1: مارکر پروتئینی؛لاین 2: پروتئین نوترکیب تروپونین I قلبی؛لاین 3: بافت قلب موش ؛لاین 4: بافت عضله موش(کنترل منفی)؛لاین 5: بافت قلب انسان

برای تعیین اختصاصیت آنتی بادی های مونوکلونال تولید شده از SDS PAGE انتی ژن نوترکیب تروپونین I قلبی و نیز هموژنات بافت قلبی انسان و موش استفاده گردید.همچنین از بافت هموژنات بافت کبدی بعنوان کنترل منفی و بافت عضله موش به عنوان بررسی واکنش متقاطع استفاده گردید.

نتایج وسترن بلاتینگ دو آنتی بادی تخلیص شده با ستون G نشان می‌دهد که اختصاصیت بالایی در اتصال آنتی بادی های تخلیص شده و نیز انتی ژنهای نوترکیب و هموژنات قلب انسان و موش وجود دارد.این اتصال در ناحیه حدودا 38-35 کیلودالتون قابل مشاهده است.

3-24- تعیین افینیتی[1] آنتی بادی

غلظت آنتی بادی تخلیص شده، با روش برادفورد محاسبه شد که برابر با 300 µg/ml ویا 333 نانو مولار بود و بر اساس آن غلظت مربوط به رقت های مختلف آنتی بادی بدست آمد (جدول 3-20) :

جدول 3-20- غلظت های مختلف آنتی بادی

رقت های آنتی بادی تخلیص شده	1/20	1/100	1/500	1/1000
غلظت مربوط به رقتهای مختلف (nM)	16/65	3/33	0/666	0/333

جدول 3-21- جذب مربوط به غلظتهای مختلف تروپونین I قلبی نوترکیب کوت شده ، در حضور غلظتهای مختلف آنتی بادی

غلظت آنتی بادی تخلیص شده از کلون P1D2E3 (nM)	غلظت های کوت شده از آنتی ژن نوترکیب (µg/ml)			
	10	5	2.5	1.25
	OD			
16/65	3/0	1/85	1/65	1/0
3/33	1/2	1/0	0/55	0/3
0/666	0/85	0/5	0/3	0/12
0/333	0/47	0/25	0/2	0/1

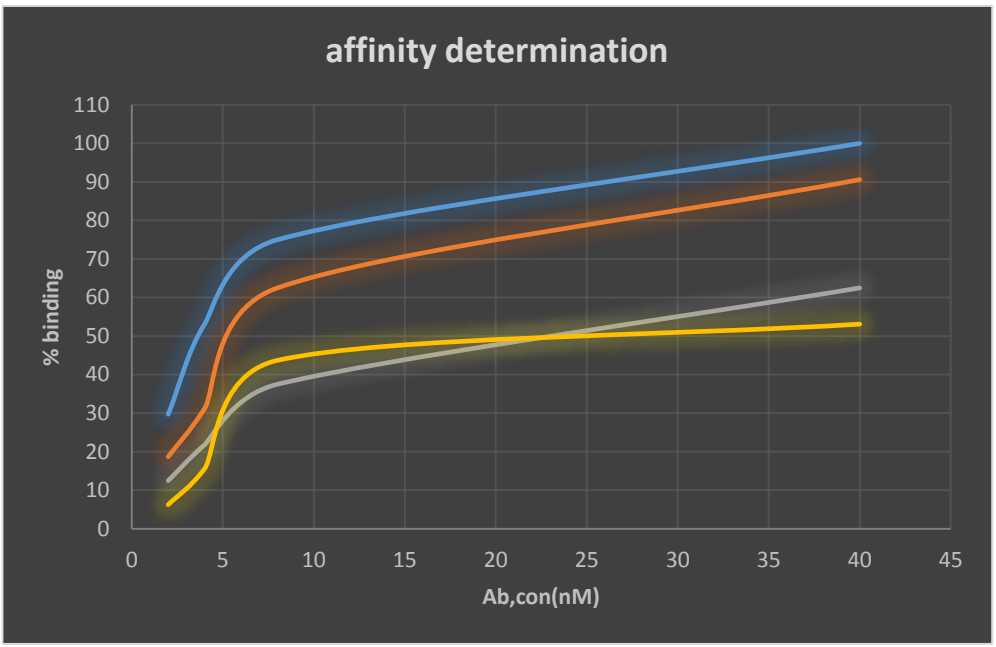
[1]Affinity

بیشترین جذب بدست آمده یعنی جذب حاصل از غلظت 10µg/ml آنتی ژن کوت شده و غلظت 16/65 نانومولار آنتی بادی تخلیص شده به عنوان درصد اتصال ماکزیمم (100٪) در نظر گرفته شد و درصدهای بقیه نسبت به آن محاسبه گردید.

جدول 3-22- درصدهای اتصال مربوط به غلظتهای مختلف آنتی ژن و آنتی بادی

غلظت آنتی بادی تخلیص شده از کلون P1D2E3 (nM)	غلظت های کوت شده از آنتی ژن نوترکیب تروپونین I (µg/ml)			
	10	5	2.5	1.25
	درصد اتصال			
40	100	90.6	62.5	53.1
8	75	62.5	37.5	43.7
4	53.1	31.2	21.8	15.6
2	29.7	18.7	12.5	6.25

بر اساس داده های بدست آمده از جدول فوق شکل 3-31 رسم شد و در نهایت افینیتی مربوط به کلونP1D2E3با استفاده از فرمول Beathy محاسبه گردید که میزان آن $4\times10^{7}\ M^{-1}$بدست آمد.



شکل 3-31- درصد اتصال آنتی ژن-آنتی بادی در غلظت های مختلف. این شکل بر اساس نتایج جدول 3-22 رسم گردیده است.

3-25- تعیین ویژگی آنتی بادی با بررسی واکنش متقاطع

جدول 3-23- تعیین میزان اختصاصیت آنتی بادی های تخلیص شده

انتی ژن کوت شده / نام‌کلون(سوپ سلول)	cTnI	Myo	Hb	BSA
P3A2F4	3/2	0/28	0/3	0/3
P1B5D7	3/3	0/41	0/35	0/23
P1H1D7	3	0/27	0/28	0/23
P1D2E3	2/9	0/21	0/31	0/15
P2E4D3	3/3	0/24	0/17	0/32
SP2/0	0/4	0/3	0/24	0/31

با توجه به جدول 3-23آنتی بادی مونوکلونال تولید شده اختصاصی بوده و با پروتئین های دیگر هیچگونه واکنش متقاطعی نداشت. همچنین سوپرناتانت گرفته شده از سلولهای SP2/0 به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و همانطور که مشاهده می‌گردد جذب مربوط به آن نیز در حد جذب زمینه (جذب مربوط به BSA کوت شده) بود.

3-26- خصوصیات کلوئید طلای ساخته شده

اسید کلراوریک توسط سیترات سدیم احیا شده و به اتم طلا تبدیل می‌شود و در اتم های طلا تجمع و هسته دار شدن رخ می دهد که منجر به تشکیل نانو ذرات طلا می‌گردد.

در این مطالعه محلول کلوئید طلا ساخته شده با ۲ میلی لیتر از محلول سیترات سدیم دارای بهترین نتیجه بودو اندازه ذرات کلوئید طلا که به رنگ قرمز ارغوانی بود توسط میکروسکوپ الکترونی اندازه گیری شد که میانگین قطر این نانو ذرات ۲۰ نانومتر ارزیابی گردید.

بررسی جذب نوری(OD) محلول کلوئید طلا در طول موج های بین ۳۸۰ تا ۷۰۰ نانومتر نشان داد که تنها یک طول موج ماکزیمم و آن هم در ۵۲۱ نانومتر وجود دارد.

3-26-1- تعیین غلظت اپتیمم آنتی بادی

غلظت اپتیمم آنتی بادی بوسیله روش اسلات بدست امد. در این مطالعه،حداقل غلظتی از آنتی بادی که کلوئید طلا را پایدار کند معادل 2/7 میکروگرم در لیتر تعیین شد و کونژوگه دارای pH 8/5 نتیجه بهتری داشت (شکل 3-20).

شکل 3-32 :تشکیل نانوذرات طلا با محلول سیترات سدیم

3-27- ساخت استریپ تشخیصی تست ایمنوکروماتوگرافی

در این روش از غشاء نیتروسلولز S&S استفاده شد. که پس از اتصال پدهای نمونه و کونژوگه و جاذب و غشاء نیتروسلولز و برش این مجموعه به شکل استریپ بر روی غشاء نیتروسلولز ترکیب و غلظت زیر مناسب ترین شناخته شد. یک میکرو لیتر از آنتی بادی ضد موش- بزی با غلظت ۱ میلیگرم/میلی لیتر به عنوان خط کنترل قرارداده شد و یک میکرو لیتر از آنتی بادی های مونوکلونال با غلظت ۱ میلیگرم/ میلی لیتر قرار داده شد. همچنین 20 میکرو لیتر از کونژوگه طلا-آنتی بادی بر روی پد کونژوگه قرار گرفت (شکل ٤-٦).یاداوری می‌شود برای کوت نمودن آنتی بادی روی غشای سلولزی از مجموع آنتی بادی های مونوکلونال(5 آنتی بادی) استفاده شد.این روند در تست های تجاری نیز دیده می‌شود.

3-27-1-آماده سازی اجزای تست ایمنوکروماتوگرافی

3-22-1-1-پد نمونه[1]

پد نمونه (سلولز) به مدت 30 دقیقه در بافر فسفات (pH7/2, 20میلی مولار) حاوی BSA 5٪ (وزنی- حجمی) ، Tween 20٪0/5 و 0/05٪ سدیم آزید (وزنی- حجمی) غوطه ور شده بعد از شستشو با بافر فسفات (pH7/2 و 20میلی مولار) به مدت 5 دقیقه در محلول پلی اتیلن گلیکول (7/6٪ در PB) غوطه ور شده در دمای اتاق خشک شد.

3-27-1-2-پد جاذب[2]

بر روی پد جاذب (سلولز) هیچ گونه تیماری صورت نگرفت. پد کونژوگه (غشاء فیبرشیشه) به محلول گلوکز 5٪ در PBS (pH7/2 و 10میلی مولار) آغشته شد و در درجه حرارت اتاق خشک گردید. غشاء نیتروسلولز (HF-75) به مدت 10 دقیقه درون محلول BSA 0/05٪ در PB (pH7/2 و 20میلی مولار) قرار گرفته سپس با محلول PB (pH7/2 و 20میلی مولار) شسته شده و در درجه حرارت اتاق خشک گردید. این چهار قسمت روی یک غشاء پلی استیرن که سطح آن چسبناک بود قرار گرفتند. به این نحو که غشاء نیتروسلولز به عنوان محدوده تست[3] که واکنش در آنجا صورت می گیرد در مرکز این غشاء پلی استیرن قرار گرفت. پد کونژوگه (فایبرگلاس) در پایین غشاء نیتروسلولز قرار گرفت و پد نمونه (سلولز) هم در پایین پد کونژوگه قرار گرفت (شکل ٤-٧).

[1] Sample Pad
[2] Absorbent Pad
[2] Zone Test

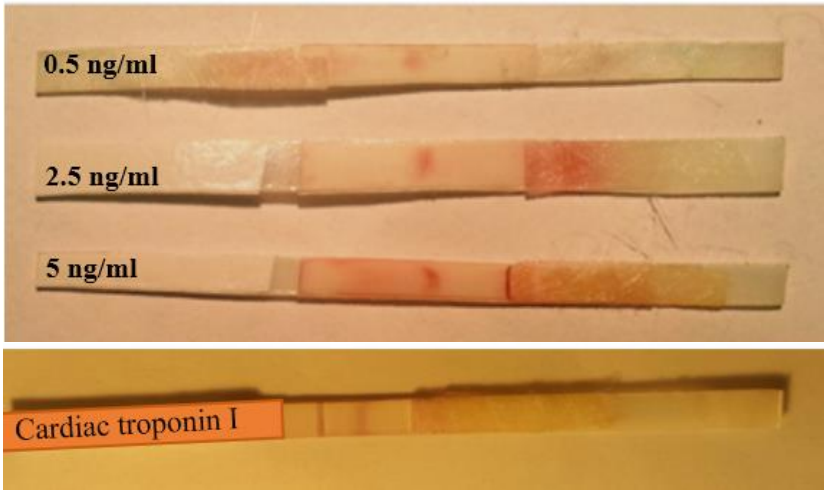
3-27-1-3- غشاء نیتروسلولز[1]

غشاء پلی استیرن به ابعاد 60 میلی متر و 4 میلی متر برش خورد تا استریپ بدست آید. یک میکرولیتر از آنتی بادی ضد موش و یک میکرولیتر آنتی بادی مونوکلونال تروپونین I (100 نانوگرم درمیلی لیتر) در PBS (pH7/2 و10 میلی مولار) روی غشاء نیتروسلولز قرار گرفتند که به عنوان خط کنترل و خط تست محسوب می‌شوند. 20 میکرولیتر از کونژوگه طلا- آنتی بادی هم روی پد کونژوگه قرار گرفت و در دمای اتاق خشک شد.

3-28- تعیین حد تشخیص[2] بالاتر از 0/5 نانوگرم بر میلی لیتر

با توجه به اینکه بر اساس استاندارد های جهانی و بین المللی مقدار بیش از 0/5 نانوگرم بر میلی لیتر

تروپونین I قلبی به عنوان مارکر تشخیصی برای انفارکتوس میوکارد محسوب می‌گردد به همین خاطر تلاش شد تا طراحی تست به گونه ای باشد تا بتوانیم به این حد تشخیصی برسیم.خوشبختانه نتایج اپتیمایز کردن نشان داد که این مقدار توسط آنتی بادی های تخلیص شده قابل شناسایی است.شکل 3-33.



شکل 3-33- تصویر تست استریپ تهیه شده با 1cutoff value نانو گرم درمیلی لیتر

[1] Nitrocellulose Membrane
[2] Cutoff

3-29- کنترل کیفی نتایج

در مقایسه 50 نمونه که در آزمایش با روش الکتروکمی لومینسانس دستگاه الکسیس e411 بصورت کمی تعیین مقدار شده بودند بودند.به جهت بررسی و تعیین cutoff مقادیر سرمی 0/5 نانوگرم بر میلی لیتر انتخاب شده بودند.نتایج بصورت جدول معروف 2×2 در زیر آمده است:

جدول 3- 24- بررسی حساسیت و اختصاصیت 2 ×2 :

نتایج تست طرح شده	نتایج تست الکسیس		
	مثبت	منفی	جمع کل
مثبت	(TP)48	(FP)2	50
منفی	(FN)0	(TN)50	50
جمع کل	48	52	100

3-29-1- تعیین حساسیت

با استفاده از فرمول تعیین حساسیت میزان حساسیت تست با استفاده از نتایج جدول بالا تعیین گردید.این حساسیت حدود 100 درصد می‌باشد.

$$\text{sensitivity} = \frac{\text{number of true positives}}{\text{number of true positives} + \text{number of false negatives}}$$

3-29-2- تعیین اختصاصیت

با استفاده از فرمول تعیین اختصاصیت میزان اختصاصیت تست با استفاده از نتایج جدول بالا تعیین گردید.این مقدار حدود 96/1 درصد می‌باشد.

$$\text{specificity} = \frac{\text{number of true negatives}}{\text{number of true negatives} + \text{number of false positives}}$$

3-29-3- تعیین صحت:

برای تعیین صحت تست طراحی شده با استفاده از فرمول زیر ونتایج حاصل از جدول بالا محاسبه گردید.این میزان حدود98 درصدمحاسبه گردید.

$$\text{accuracy} = \frac{\text{number of true positives} + \text{number of true negatives}}{\text{number of true positives} + \text{false positives} + \text{false negatives} + \text{true negatives}}$$

3-29-4- تعیین دقت

در ۵ روز متوالی بر روی نمونه ها ی سرم حاوی 0؛ 0/5 ؛ 1؛ 2/5 نانوگرم در میلی لیتر تروپونین I قلبی ازمایش انجام شد که نتایج در جدول 3-23امده است.

جدول3-25- نتایج درون سنجش و بین سنجش

روز6	روز5	روز4	روز3	روز2	روز1	تعدادتکرار در روزهای		غلظت تروپونینI
						روز6	روز5-1	نانوگرم/میلیلیتر
نتایج								
5(-)	-	-	-	-	-	5	1	0
5(+)	+	+	+	+	+	5	1	0/5
5(+)	+	+	+	+	+	5	1	1
5(+)	+	+	+	+	+	5	1	2/5
5(+)	+	+	+	+	+	5	1	5

3-30- بررسی واکنش متقاطع

برای بررسی واکنش متقاطع از بافت قلب موش و قلب انسان استفاده گردید.از این طریق با وسترن بلاتینگ با استفاده از هموژنات بافتی قلب انسان و موش و آنتی بادی های مونوکلونال تولید شده استفاده گردید.از طرفی از بافت کبدی موش بعنوان کنترل منفی هم استفاده گردید.به این طریق هم اختصاصیت آنتی بادی مونوکلونال مورد ارزیابی قرار گرفت و هم اینکه با توجه به اینکه بیشترین واکنش متقاطع آنتی بادی مونوکلونال بر علیه تروپونین Iمی‌تواند با تروپونین T باشد و با توجه به اینکه امکان تهیه تروپونین T نبود به همین خاطر از بافت ماهیچه ای که حاوی تروپونین T بود استفاده گردید.

3-31- بررسی واکنشآنتی بادی های مونوکلونال با اپی توپ های انتخاب شده با استفاده از الایزای غیر مستقیم

نتایج الایزای غیر مستقیم با استفاده از پپتیدهای انتخاب شده با نرم افزارهای بیوانفورماتیک برای شناسایی میزان شباهت این اپی توپ ها با منطقه پاراتوپ آنتی بادی های مونوکلونال انتخاب شده در جدول 3-22 آورده شده است.همانگونه که مشاهده می‌شود افینیتی بالایی میان این پپتیدها و انتی باید های مونوکلونال انتخاب شده وجود ندارد.فقط در مورد پپتید 2 و 4 تا حدودی افینیتی بیشتر بوده است. هر چند این اختلاف ODآنقدر بالا نیست که بتوان گفت آنتی بادی مونوکلونال انتخاب شده دارای افینیتی بالا نسبت به این پپتید هاست.

جدول 3-26- الایزای رقابتی برای بررسی اپی توپ های غالب ایمنی

		P1D2E3	P3A2F4	P1B5D7	P1H1D7	P2E4D3
پپتید های سنتتیک	پپتد1	0.22	0.29	0.23	0.2	0.23
	پپتید 2	0.8	0.79	0.94	0.85	0.93
	پپتید3	0.25	0.22	0.32	0.25	0.34
	پپتید 4	0.95	0.86	1	0.98	0.97
	تروپونین I	3.2	2.98	3.1	3.2	3.0

دراین جدول اختلاف میانگین OD با کنترل مربوطه نتایج اورده شده است.

فصل چهارم

بحث و نتیجه گیری

4-1- تخلیص پروتئین تروپونین I از بافت قلب موش وانسان

با توجه به نیاز تروپونین I قلبی جهت ایمونیزاسیون موش، با استفاده از پروتکل های موجود برای تخلیص تروپونین I قلبی با استفاده از بافت قلب موش و انسان تلاش گردید تا تروپونین I قلبی از بافت جداسازی و تخلیص گردد.به دلیل هزینه های بسیار بالای تهیه و خرید پروتئین تروپونین I قلبی، خرید این پروتئین مقرون به صرفه برای کارهای ایمونیزاسیون موش نبود.لذا برای کاهش هزینه ها و به دلیل میزان مصرف بالای این پروتئین تصمیم بر جداسازی و تخلیص این پروتئین از بافت قلبی موش و انسان گردید.همانگونه که نتایج حاصل از الکتروفورز تخلیص پروتئین از بافت قلبی موش و انسان نشان می‌دهد میزان پروتئین تخلیص شده زیادنیست.از طرفی این تخلیص دارای خلوص بالا هم نبود.هرچند که نتایج انجام واکنش های انجام شده با کیت های تشخیص سریع نشان دادند که تروپونین بافتی تخلیش شده است اما با توجه به نیاز مقادیر بالا برای تزریق این مقدار تخلیص کفایت نمیکرد.

نتایج بررسی پایداری پروتئین های تخلیص شده از بافت قلبی موش و انسان نشان داده است که این پایداری در طول زمان بشدت کاهش می‌یابد.از طرفی پایداری تروپونین قلبی I انسانی موجود در سرم انسانی نیز پائین است. این مسئله مشکلات زیادی را در سنجش های تروپونین مربوط به بررسی سرم افراد مشکوک به آنفارکتوس میوکارد در بخش های مختلف اورژانس ایجاد نموده است.نتایج مربوط به بررسی پایداری تروپونین موشی و انسانی تخلیص شده از بافت قلبی نیز موید این ناپایداری بود که بنظر می‌رسد این ناپایداری بیشتر مربوط به ساختار تروپونین I قلبی و نیز وجود پروتئازهای موجود در بافت هموژن شده باشد.همین امر نیز با توجه به کاهش میزان تروپونین بعد از فریز نمودن و دفریز نمودن سبب تاخیر در ایمن سازی موش و خرگوش گردید.

در عین حال از این پروتئین های خالص شده برای ایمونیزاسیون خرگوش استفاده گردید.با توجه به وجود ناخالصی موجود در جداسازی میزان پروتئین بیشتری جهت ایجاد ایمنی مناسب در خرگوش استفاده گردید.با این وجود نتایج تیتراسیون سرم خرگوشها نشان داد که بعد از 4 بار تزریق همچنان تیتر سرمی آنتی بادی برعلیه تروپونین I قلبی پائین است.همین مسئله نشان می‌دهد که خرگوشهای مورد مطالعه به اندازه کافی و مناسب برعلیه تروپونین تخلیص شده ایمن نشده اند.لذا با بررسی های متعدد و مقالات مختلف مشخص شد که

پروتئین تروپونین بسیار ناپایدار است و بشدت تحت تاثیر پروتئولیز می‌باشد(59، 119).حتی در چندین مقاله مربوط به ثبت کلون آنتی بادی بر علیه تروپونین I قلبی نیز به این مسئله اشاره گردیده است.این مسئله نیز در ایمونیزاسیون خرگوشها با استفاده با پروتئین تخلیص شده از بافت قلبی موش و انسان نیز توسط ما تائید گردید.با توجه به اینکه امکان ایمونیزاسیون مطلوب در خرگوشها با استفاده از پروتئین تخلیص شده وجود نداشت(119، 120).

لذا تصمیم گرفته شد که با استفاده از پروتئین نوترکیب تروپونین در باکتری بیان کار ایمونیزاسیون را ادامه دهیم.همچنین با توجه به انتخاب 4 پپتید ایمنودومیننت متصل به BSA بر ان شدیم تا از این پپتیدها نیز بعنوان انتی ژن جهت ایمن نمودن خرگوش ها استفاده کنیم.

ایمونیزاسیون خرگوشها با استفاده از پپتیدهای سنتز شده نیز همانگونه که در نتایج اورده شده است نشان داد که میزان ایمونیزاسیون مطلوب نبوده است. در واقع این پپتیدها نتوانسته اند سیستم ایمنی خرگوشهای مورد نظر را بخوبی تحریک نمایند.فلذا تنها راه ممکن برای رسیدن به حیوانات ایمن شده با تروپونین I قلبی استفاده از انتی ژن نوترکیب بیان شده در باکتری بود.این موضوع از چند جهت اهمیت داشت. اول اینکه بیان این پروتئین در باکتری هزینه بالایی ندارد و مقدار بسیار زیادی از این پروتئین قابل حصول بود. از طرفی مطالعات نشان داند که این پروتئین نوترکیب خالص شده از درجه خلوص بسیار بالایی برخوردار است(95٪<).همچنین پایداری این پروتئین همچنان بعد از چندین ماه در 20 - نیز حفظ شده بود. تخلیص پروتئین نوترکیب با توجه به وجود Histag در ساختار پروتئین نوترکیب تروپونین I قلبی با ستون تجاری نیکل انجام گردید.میزان پروتئین و نیز خلوص پروتئین تخلیص شده از میزان بسیار بالا و قابل قبول برای ایمونیزاسیون موش و خرگوش برخوردار بود.

4-2- انتخاب پپتید های ایمونودومیننت

.تروپونین I قلبی یک پروتئین تک زنجیره ای با 210 اسید امینه می‌باشد.این پروتئین 23 کیلودالتون وزن دارد.در ساختار ان 5 هلیکس وجود دارد که این ساختار دوم این پروتئین را تشکیل می‌دهد(121، 122).

وجود چنین ساختار دومی سبب می‌شود تا برای استفاده از این پروتئین برای ایمونیزاسیون جهت استفاده از آن در تولید آنتی بادی پلی کلونال و نیز مونوکلونال با استفاده از نرم افزارهای انلاین و نیز بررسی های مقالات گذشته و نیز کیت های تجاری موجود بتوانیم با سرعت بیشتر و نیز با شناخت بیشتری بتوانیم در تولید این کیت گام برداریم.

بررسی ساختار پروتئینی تروپونین I قلبی با استفاده از نرم افزارهای انلاین نشان می‌دهد که ناحیه N ترمینال(30-110) در ساختار دوم این پروتئین نقش انی ژنیک بیشتری دارد.در این نرم افزارها میزان هیدروفوبیسیتی، انتی ژنیسیتی، خطی بودن ،ساختار بتا مشخص گردید این ناحیه می‌تواند ساختار انتی ژنیک بیشتری داشته باشد.این در حالیست که با بررسی کیت های تجاری موجود در بازار که از حساسیت های بالا جهت تشخیص این مارکر در سرم برخورداد هستند مشخص می‌شود که نواحی مختلفی از این پروتئین می‌توانند به عنوان اپی توپ تشخیصی برای تولید آنتی بادی مونوکلونال به کار روند(116، 120).

بررسی ساختار تروپونین I قلبی با استفاده از نرم افزارهای انلاین (BepiPred Linear Epitope Prediction server)نشان داد که میزان انتی ژنیسیتی در ناحیه 1-42بیشتر از سایر نقاط است.با استفاده از آنالیزchou-fasman برای بررسی ساختار بتا مشخص شد که بیشترین خاصیت در ناحیه N ترمینال داراست.بیشترین میزان هیدروفوبیسیتی نیز در ناحیه امینو اسیدی 42-1 می‌باشد.

ساختار تروپونین I قلبی از 6 بخش عملکردی تشکیل شده است.این بخش ها شامل بخش های زیر هستند:

1- بخش N ترمینال اختصاصی قلب است که از امینو اسید 30-1 را شامل می‌شود.

2- بخش N ترمینال از اسید امینه 79-42 است که با دومن C از تروپونین C واکنش می‌دهد.

3-منطقه اتصال تروپونین T از اسید امینه 136-80 را شامل می‌شود.

4-ناحیه پپتید مهاریکه از اسید امینه 147-128 است که با اکتین و میوزین و نیز تروپونین C واکنش می‌دهد.

5- منطقه سوئیچ ویا تحریک از اسید امینه 163-148 را شامل می‌شود.که به ناحیه N دومن تروپونین C متصل می‌گردد.

6- منطقه C ترمینال تروپونین کهاز اسید امینه210-164است وبه اکتین و میوزین متصل می‌شود.این منطقه در واقع بیشترین حفاظت امینواسیدی[1] را داراست.

بایستی این مسئله نیز عنوان شود که ساختار تروپونین I قلبی معرض آنزیم های پروتئولیتیک به شدت حساس می‌باشد(123).همین موضوع سبب شده است که دو نکته اهمیت بیشتری پیدا کند.یک مسئله اینکه استفاده از این پروتئین برای ایمونیزاسیون موش و خرگوش و دیگری سنجش این پروتئین در خون و یا سرم .در مورد ایمونیزاسیون موش ویا خرگوش برای تولید آنتی بادی به خاطر اینکه این پروتئین بسیار حساس به پروتئولیز انزیمی است ایمونیزاسیون به شدت با تاخیر و به سختی انجام می‌شود.همین امر سبب می‌شود که خاصیت انتی ژنیکی این پروتئین به سبب تخریب زیاد این پروتئین به کندی انجام شود(124).همین مسئله یکی از چالشهای تولید آنتی بادی مونوکلونال برای کارهای تشخیصی برای این مارکر مهم است.همانگونه که در بسیاری از مقالات و بویژه ثبت کلون هایی که انتی باید مونوکلونال برای این مارکر تولید نموده اند این مسئله بسیارچالش برانگیز بوده است.اپی توپ های انتخاب شده مربوط به نواحی N ترمینال و نواحی جانبی محل اتصال تروپونین C بودند.این مناطق که عمدتا مربوط به محل های فسفریلاسیون هستند نقش کلیدی در عملکرد تروپونین I دارد(120).این بخش ها بدلیل انکه در ارتباط با تروپونین C هستند دور از دسترس سیستم ایمنی هستند فلذا خاصیت انتی زنیک بیشتری نیز دارند.این نتایج توسط آنالیزchou-fasman نیز تائید می‌شوند.از انجائیکه این مناطق از دسترس سیستم ایمنی دور هستند در زمانیکه به عنوان انتی ژن برای تحریک ایمونیزاسیون به کار میروند سبب تحریک بیشتر سیستم ایمنی خواهند گردید.با توجه به دلایل ذکر شدهانتخاب اپی توپ های ما منطقی بنظر می‌رسد.با وجود همه این مسائل مطالعات ساختاری بدون انجام مطالعات عملی و آزمایشگاهی و تائید نتایج فقط نیمی از راه خواهد بود.

[1]Conservancy

برای همین مسئله ما مطالعات بیو انفورماتیکی را به همراه مطالعات آزمایشگاهی انجام دادیم.برای این کار پپتید های انتخاب شده را ابتدائا سنتز نموده و سپس بعد از ایمونیزاسیون موش ها و خرگوش ها با پروتئین تروپونین I قلبی نوترکیب با استفاده از طراحی یک الایزای رقابتی میزان اختصاصی بودن و در نتیجه انتی ژنیک بودن این پپتید ها را بررسی نمودیم.این نتایج کمک زیادی برای بررسی و فهم تعامل[1]انتی ژن –آنتی بادی برای تولید آنتی بادی مونوکلونال در اختیار ما قرار داد.زیرا درک این مطلب که نتایج مطالعات بیو انفورماتیکی چقدر در پیشگویی و خلق یک آنتی بادی مونوکلونال اهمیت دارد بسیار کمک کننده بود.این مسئله سبب شد که بتوانیم میزان واکنش دهی این پپتید ها را با آنتی بادی مونوکلونال بررسی نمائیم و میزان تائیر این اپی توپ ها را بعنوان ایمنودومیننت درک کنیم.

4-3- بیان پروتئین نوترکیب تروپونین I قلبی

در این مطالعه ژن تروپونین I قلبی در وکتور بیانی pET32a کلون گردید.پارامترهای مختلفی برای اپتیمایز نمودن میزان بیان در این باکتری بررسی شد تا بهترین شرایط برای بیان این پروتئین بدست اید.نتایج نشان داد که بهترین بیان در حضور 1 mM از IPTG در شرایط دمایی 18 درجه برای مدت 15 ساعت بدست میاید.این نتایج نشان داد که اکثریت پروتئین بیان شده در فاز محلول قرار دارد. شباهت بسیار بالای تروپونین Iانسانی و موشی به یکدیگر که حدودا بالای 93 درصد بود سبب شد که ایمنیزاسیون به کندی پیش رود.برای رفع این مسئله حضور تیوردوکسین در قطعه نوترکیب سبب گردید تا ایمنیزاسیون خرگوش و موش به خوبی پیش رود.

4-4- الایزای رقابتی

بعد از ایمونیزاسیون خرگوش و تولید آنتی بادی پلی کلونال در خوگوش و تخلیص آن برای بررسی اپی توپ های انتخاب شده با آنالیز انلاین با طراحی الایزای رقابتی، میزان تمایل آنتی بادی پلی کلونال تولید شده توسط

[1] Interaction

تروپونین I قلبی نوترکیب را با سایر پپتیدها بررسی نمودیم. همانطور که در نتایج در فصل پیش ذکر شد بین چهار پپتید انتخاب شده پپتید 2 و 4 تمایل بالاتری را از خود نشان دادن و سبب مهار بیشتری در این الایزا شدند.در واقع برای بیان میزان حساسیت این پپتیدها تحت شرایط اپتیمم شده الایزای مهاری رقابتی از اندکس IC50 استفاده گردید.میزان IC50 برای پپتید های 2 و 4 از سایر پپتیدها کمتر بود. این بدان معناست که این پپتید ها در غلظت های کمتری نسبت به سایر پپتیدها می‌توانند به نصف مقدار ماکزیمم برسند،در واقع همان معنای IC50 .همچنین مقدار LOD یا کمترین مقدار برای شناسایی یک انتی ژن توسط یک تست برای این دو پپتید کمتر از سایر پپتیدهابود.هرچقدر میزان LOD کمتر باشد در واقع حساسیت یک تست نیز بیشتر خواهد بود زیرا مقادیر کمتری از انتی ژن را قادر به شناسایی خواهد بود.این میزان برای این دوپپتید نزدیک به پروتئین نوترکیب تروپونین I قلبی بود(0.037).افزایش حساسیت در مورد پپتید های 2 و 4 می‌تواند احتمالا به دلیل ارتباط ساختاری این پپتیدها با تروپونین C باشد ونیز قرار داشتن در ناحیه N ترمینال تروپونین I قلبی. این امر سبب شده است که کمتر در دسترس سیستم ایمنی قرار بگیرند به همین خاطر خاصیت انتی ژنی بیشتری هم داشته باشند.

با توجه به مطالعات انفورماتیکی انجام شده و نیز مطالعاتی که براساس منابع سازنده کیت های تجاری در دسترس قرار دارد می‌توان گفت هرچند که مناطق مختلف در ساختار پروتئین تروپونین I قلبی می‌توانند از لحاظ انتی ژنیک متفاوت باشند اما بیشترین اپی توپ هایی که این شرکتها از ان به عنوان اپی توپ ایمنو دومیننت استفاده کرده اند و از ان برای تولید انتی باید مونوکلونال بهر گرفته اند همان مناطق N ترمینال است.بخصوص دو ناحیه اول N ترمینال که اختصاصیت بیشتری دارد و غالبا شرکتها از این ناحیه برای ساخت آنتی بادی بهره برده اند.این نواحی تا حدود امینو اسید 90 را شامل می‌شوند(120).

4-5- هیبریدوما و تولید آنتی بادی مونوکلونال

پس از تائید ایمونیزاسیون موشها با انتی ژن نوترکیب تروپونین I قلبی، طحال موشی که بیشترین ایمونیزاسیون را داشت برای فیوژن استفاده شد و سلولهای هیبریدومای حاصل شده در 8 پلیت پخش شدند و با اضافه کردن محیط انتخابی HAT، تقریبا در اکثر پلیت ها کلون ها قابلیت نامیرایی را بدست آورده بودند که این کلون ها

با پروتئین نوترکیب و همچنین ردیف پپتیدی مورد نظر وعلاوه بر آن BSA به عنوان کنترل منفی از نظر ترشح آنتی بادی بررسی شدند.تعداد بسیار زیادی از این کلونها دارای ترشح آنتی بادی بالا بودند.برای اطمینان از نتایج حاصل شده مجددا پس از زرد شدن چاهک ها الایزا تکرار شد و نتایج مجددا تکرار و تائید شد. به همین خاطر فقط یک کلون انتخاب گردید و برای انجام رقت سازی محدود انتخاب گردید.سایر کلونها هر چند چاهک با هم مخلوط شدند و بصورت مادر کلون فریز شدند.

درنهایت پس از 3 بار رقت سازی کلون ها تعداد 5 کلون انتخاب و در نهایت در پلیت های 24 تایی و نیز فلاسک T25 کشت داده شدند تا از آنها برای غربالگری و نیز تزریق برای گرفتن اسیت استفاده شوند.5 آنتی بادی مونوکلونال تولید شده از نظر اختصاصیت بررسی و از نظر واکنش متقاطع با تروپونین T ،هموگلوبین و آلبومین انسانی مورد بررسی قرار گرفتند و خوشبختانه واکنش متقاطع با این سه پروتئین که بیشترین احتمال واکنش متقاطع را بنظر می رسید داشته باشند نداشتند.

4-6- تروپونین ، ارزش تشخیصی و روشهای تشخیصی آن

تروپونین I قلبی بعنوان مارکر طلایی امروزه در تشخیص زودهنگام انفارکتوس میوکاردیال مطرح است(14).روشهای متعددی برای تشخیص تروپونین I قلبی وجود دارد. از جمله این روشها الایزا ،کمی لومینسانس ،الکتروکمی لومینسانس و تست های تشخیصی سریع است. حساسیت هریک از این تست ها متفاوت است در واقع تست های کمی لومینسانس حساسیت 1000 برابری نسبت به الایزا دارند و بعنوان روش مرجع برای تشخیص این مارکر به حساب می ایند.اکثر کیت هایی که بر اساس الکتروکمی لومینسانس طراحی شده اند حساسیتی در حدود 0/1 نانوگرم بر میلی لیتراست دارند که بسیار خوب است.این مقدار در مقایسه با الایزا بسیار حساسیت بالاتری را داراست(116).در واقع تحول در تولید تست تروپونین I قلبی را می‌توان به سه دوره تقسیم نمود.دوره اول تا سال 1995 که حد تشخیصی تست های تشخیصی تروپونی 1/5< نانوگرم/ میلی لیتر بود.این تست ها حساسیت خوبی نداشتند و تا قبل از 8 ساعت پس از شروع درد قفسه سینه قابل شناشایی نبودند.دوره دوم تا سال 2003 که حد تشخیصی حدود 0/1 نانوگرم/میلی لیتر بودند. این تست

ها بسیار حساستر از کیت های قبلی بودند و تا 4 ساعت بعد از شروع درد قفسه سینه قادر به تشخیص انفارکتوس میوکاردیال بودند.دوره سوم مربوط به کیت هایی بودند که سال 2007 به بازار امدند و توانایی تشخیصی آنهاحتی تا 0/004 نانوگرم بر میلی لیتر بود.این کیت ها بسیار حساس هستند و حتی 2 ساعت بعد از شروع درد قفسه سینه قادر به تشخیص خواهند بود(116).

این روش هرچند که دارای حساسیت بسیار بالایی برای تشخیص مقادیر بسیار ناچیز تروپونین I قلبی در سرم است ولی ایراد بزرگ آن نیاز به دستگاه خوانشگر این تست ها است که بسیار گران قیمت است.این دستگاه بدلیل گران بودن آن امکان استقرار در هر آزمایشگاهی را ندارد و از لحاظ اقتصادی نیز به صرفه نیست. در واقع این مسئله خود به عنوان یک نقطه ضعف در تشخیص است زیرا یکی از فاکتورهایی که امروزه برای تعیین تست و یا کیت تشخیصیعلاوه بر حساسیت بالا و سرعت جوابدهی بالا و...لحاظ می‌گردد قیمت مناسب تست است که با توجه به نیاز به دستگاه گران قیمت و اپراتوری افراد با تخصص بالا امکان بهره گیری از آن را محدود می سازد.

مسئله دیگری که امروزه بسیار در تشخیص اهمیت پیدا کرده است مسئله تست های تخصصی در محدوده خارج از ازمایشگاه است که تحت عنوان POCT[1] شناخته می‌شوند.اهمیت این تست ها زمانی مشخص می‌گردد که هزینه های سنگین تشخیصی بدلیل نیاز به وسیله های آزمایشگاهی و نیز صرف زمان و نیروی متخصص و...در نظر گرفته شوند(125، 126).

از طرفی باید گفت که تست های POCT بدلیل اینکه در خارج از آزمایشگاه نیز امکان انجام را دارند مزیت بسیار بزرگی را فراهم می‌کنند زیرا امکان غربالگری فرد را توسط خودش فراهم میسازد.این مسئله این امکان را فراهم می‌کند که فرد بتواند در صورتی که احساس درد مثلا در قفسه سینه را داشت با انجام تست سریع تروپونین بتواند از وضعیت خود اگاهی پیدا نموده و احیانا برای اقدامات بیشتر به بیمارستان مراجعه نماید.

[1]Point-of-care testing

ویژگی بعدی تستهای سریع تشخیصی این است که نیاز به افراد متخصص ندارند.این مسئله هم بسیار اساسی است زیرا تستهایی که از حساسیت لازم برخوردار هستند در صورتی که نیاز به افراد متخصص و کار ازموده برای انجامشان وجود داشته باشد خود عامل محدود کننده است(126).

در سال های اخیر، اشتیاق روزافزونی برای ارائه تکنیک های ارزان و سریع برای تشخیص آنالیت ها بوجود آمده است. ایمونواسی حرکت جانبی[1] ابزار تشخیصی معروفی است که در آن نیاز به کارکنان آموزش دیده و تجهیزات گران قیمت وجود ندارد. این تکنیک بر پایه ایمونوکروماتوگرافی استوار است که در آن آنتی ژن-آنتی بادی به نحوی به کار رفته که تشخیص سریع آنالیت را میسر می سازد. در این مطالعه، تست استریپ ایمونوکروماتوگرافی با حرکت جانبی برای تشخیص تروپونین I قلبی در سرم و با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال و کلوئید طلا به عنوان نشان، ساخته شد. این تست یک مرحله ای بر اساس واکنش ایمونوشیمی بین تروپونین I قلبی موجود در نمونه سرم و آنتی بادی کونژوگه با طلا و نیز آنتی بادی کوت شده بر روی غشاء استوار است.

در این تحقیق از تری سدیم سیترات به عنوان احیاء کننده در تهیه کلوئید طلا استفاده شد و ذرات کلوئیدی طلا با اندازه های متفاوت ساخته شد که مناسب ترین اندازه ۲۰ نانومتر تشخیص داده شد. ذرات کوچکتر از ۱۵ نانومتر بیش از اندازه کوچک هستند که بتوانند رنگ قوی تولید کنند و ذرات بزرگتر از۷۰-۶۰ نانومتر پس از چند روز ماندن در ٤ درجه سانتی گراد دچار تجمع خودبخودی[2]می‌شوند.(110)

کونژوگاسیون کلوئید طلا و آنتی بادی بدون نیاز به عوامل شیمیایی انجام می‌شود و از جمله نقاط قوت آن می‌توان پایداری آن نسبت به کونژوگه های آنزیمی و عدم نیاز به سوبسترا را نام برد. دیگر اینکه، به دلیل رنگی بودن این مارکرها به راحتی و بدون نیاز به دستگاه های قرائت گر نتایج قابل بررسی می‌باشد. کونژوگاسیون ایمونوگلوبولین به طور مستقیم و به واسطه نیروهای لاندن واندروالس[3] و میانکنش های هیدروفوبیک صورت می گیرد و آنتی بادی جذب سطح ذرات می‌شود(110).

[2] Lateral Flow Immunoassay
[2] Self- Aggregate
[3] London- Van der Waals

کلوئید طلا در محلول به واسطه توازن بین دامنه الکترواستاتیک و جاذبه لاندن واندروالس بین ذرات تشکیل می‌شود. بنابراین با اضافه کردن یک ماده یونی مثل کلرورسدیم نیروی جاذبه بزرگتر شده و منجر به تجمع همراه با تغییر رنگ از قرمز (حداکثر جذب در ۵۲۰ نانومتر) به آبی (حداکثر جذب در ۵۸۰ نانومتر) می‌شود. از این ناپایداری می‌توان با پوشاندن سطح کلوئیدها با مولکول های پروتئین همانند ایمونوگلوبولین جلوگیری کرد. در تست تعیین غلظت اپتیمم طلا- آنتی بادی لوله ای که تغییر رنگ به آبی در آن مشاهده نشود دارای غلظتی از آنتی بادی است که طلا را پایدار می کند.

خصوصیات تریسر[1](ردیاب) بستگی به ویژگی های شیمیایی سطح ذرات طلا و افینیتی آنتی بادی آشکارساز دارد. وجود ذرات طلا که سطوح آنها با آنتی بادی پوشیده نشده موجب واکنش بین ذرات و ماتریکس جامد و بین خود ذرات کلوئیدی می‌شوند. این سطوح را می‌توان با یک ماده خنثی پوشاند. این مواد، محیط های شیمیایی متنوعی همانند توزیع بار در سطح را ایجاد می کند که ممکن است واکنش های غیر اختصاصی کلوئیدهای طلا را موجب شوند. آلبومین گاوی محیط بدون بار خالص ایجاد می‌کنند، در حالیکه ژلاتین یون های مثبت ایجاد می کند. با بهینه کردن محیط های شیمیایی مثل اسیدیته و قدرت یونی,می‌توان واکنش اتصال بین آنتی ژن و آنتی بادی را افزایش داد. این فاکتورهای شیمیایی باعث توازن بار مولکول های پروتئینی شده و از این طریق میزان واکنش بین واکنش کننده ها را افزایش می‌دهند.

در سنجش های کروماتوگرافیک، فاکتورهای تنظیمی، هم چنین می‌توانند سرعت انتقال ترکیبات در حال حرکت را از سوراخ های غشاء و سطحی که معمولا با یک پروتئین خنثی مثل آلبومین سرم گاوی یا کازئین پوشانده شده، تسریع کنند تا اتصالات غیر اختصاصی ناخواسته را به حداقل برساند.

5 کلون آنتی بادی مونوکلونال بصورت آسیت به موش تزریق شده و سپس با روش افینیتی کروماتوگرافی آنتی بادی آن تخلیص گردید.از طرفی بادی پلی کلونال خرگوشی نیز با روش کروماتوگرافی تعویض یون تخلیص شد.برای طراحی تست روشهای مختلفی با استفاده از آنتی بادی های ذکر شده بررسی گردید.در ابتدا مونوکلونال آنتی بادی ها بصورت آنتی بادیزیرین[2] متصل به غشا نیتروسلولز استفاده و یکی از این آنتی بادیها

[1] Tracer
[2]Capture Ab

برای آنتی بادی شناسایی[1]استفاده شدند.از طرفی در بهترین حالت آنتی بادی پلی کلونال بصورت آنتی بادی زیرپناستفاده و از یک آنتی بادی مونوکلونال برای شناسایی استفاده گردید.نتایج این روش برای کار ازمایی بالینی استفاده گردید.

میزان حد تشخیص در این تست روی 0/5 نانوگرم درمیلی لیتر تنظیم شد.انچه که در کیت های تجاری هم مورد استفاده قرار می‌گیرد معمولا اینگونه است که برای افزایش حساسیت تست ایمنوکروماتوگرافی بجای یک آنتی بادی مونوکلونال از چند آنتی بادی مونوکلونال و یا یک پلی کلونال در یک بخش تست مثلا عمدتا در آنتی بادی زیرین استفاده می‌شود.این بدان خاطر است که بدلیل نبود انکوباسیون در تست های سریع(rapid) بایستی افینیتی آنتی بادی بسیار بالا باشد تا امکان سریع اتصال با حساسیت بالا برقرا رگردد.در غیر اینصورت ممکن است نتیجه منفی کاذب را نشان دهند.

وقتی که استریپ درون نمونه سرم قرار می گیرد، جریان مایع در ابتدا به پد کونژوگه می رسد. مخلوط سپس به خط تست بر روی غشاء نیتروسلولز می رسد که اگر غلظت تروپونین I قلبی در نمونه سرمی بیش از 0/5 نانوگرم در میلی لیتر باشد، واکنش بین آنتی ژن(تروپونین I) و آنتی بادی نشان دار صورت می گیرد.سپس همزمان آنتی بادی کونژوگه شده با طلا نیز به انتی ژن(تروپونین I) می چسبد و خط قرمز تست تشکیل می‌شود.تشکیل خط قرمز در ناحیه تست نشان دهنده مثبت بودن تست خواهد بود.

اگر فقط باند کنترل مشاهده شود این نشانه آن است که تروپونین I قلبی موجود در نمونه سرمی کمتر از 0/5 نانوگرم در میلی لیتر می‌باشد. اگر خط کنترل مشاهده نشود، آزمایش اعتبار نداشته و باید تکرار گردد.

جهت به دست آوردن جریان موئینه یکنواخت، پلی وینیل پرولیدون و پلی اتیلن گلیکول جهت تیمار پد نمونه مورد آزمایش قرار گرفتند که از بین این دو پلی اتیلن گلیکول انتخاب شد. بعلاوه، استفاده از پلی اتیلن گلیکول شدت رنگ را در خط تست افزایش داد. بالعکس، افزایش غلظت BSA در تیمار غشاء نیتروسلولز به عنوان یک عامل بلوکه کننده جهت ممانعت از واکنش های غیر اختصاصی موجب کاهش رنگ در خط تست شد.

[1] Detection Ab

هنگامی که یک پروتئین آب خود را از دست بدهد، مولکول های آب که در ساختار پروتئین شرکت دارند جدا می‌شوند و باعث ناپایداری ساختمان پروتئین می‌گردند. این مشکل را تا حدودی می‌توان با استفاده از مولکول های قند همانند تره هالوز، ساکارز و گلوکز مرتفع نمود. وقتی مولکول های آب به وسیله پیوند هیدروژنی به ساختمان پروتئین متصل می‌شوند که ، این جایگاه ها به وسیله قند جایگزین شده تا مولکول ساختمان فعال خود را حفظ کند. در این تحقیق هر سه قند فوق در غلظت های مختلف مورد استفاده قرار گرفتند که تفاوتی مشاهده نگردید, لذا از ساکارز استفاده گردید.

در این مطالعه با استفاده از غشاء نیتروسلولز HF-75 شرکت میلی پور تست استریپ جهت تشخیص تروپونین قلبی در سرم طراحی گردید. چرا که در این غشاء سرعت جریان بیشتر از دو برابر غشاء HF-180 بوده و این خود زمان انجام تست را کاهش می داد و در عین حال موجب کاهش غلظت موثر آنالیت در نمونه شد که متاقبا کاهش نویز را بدنبال داشت.

در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از بیش از یک آنتی بادی های مونوکلونال(5 آنتی بادی) در غشای نیترو سلولز به جای یک آنتی بادی سبب افزایش حساسیت تست تشخیصی می‌گردد.در عین حال برای تشخیص اختصاصی تر فقط از یک آنتی بادی مونوکلونال در کونژوگاسیون با نانوذره طلا استفاده گردید.

پیشنهادات:

با توجه به اینکه منابع تروپونین قلبی که از بافت قلبی انسان و نیز موشی تهیه گردید بایستی مسئله حضورپروتئازها که سبب کاهش میزان تروپونین قلبی گردید مورد توجه قرار گیرد.این مسئله سبب تاخیر و سردرگمی در ایمنیزاسیون خرگوش و موش گردید.حضور انتی پروتئازها میتواند در افزایش پایداری تروپونین تخلیص شده از بافت کمک شایانی نماید.

درصورتیکه از پروتئین نوترکیب برای ایمنیزاسیون استفاده می‌شود بایستی به دلیل شباهت ساختاری بیش از 90 درصدی تروپونین I قلبی انسان و موش از یک کریر مثل KLH و یا BSA استفاده شود تا سبب افزایش آنتی ژنیسیته گردد.

پپتیدهای ایمنودومینانت به تنهایی نتوانستند سبب ایجاد ایمنی زایی قوی در موش ها شود.به همین خاطر پیشنهاد می شود که برای تولید هیبریدوما بهترین گزینه همان تروپونین I قلبی کامل است که نهایتا پس از انتخاب کلونها با افینیتی بالا را با پپتید های ایمنودومیننت مقایسه نمود.

برای طراحی تست تروپونین به دلیل اینکه پروتئین تروپونین یک ملکول بشدت ناپایدار است بهتر است به جای استفاده از دو انتی بادی مونوکلونال از یک انتی بادی پلی کلونال و یک مونوکلونال استفاده شود.این مسئله سبب افزایش حساسیت تست خواهد شد.از طرفی سبب خواهد شد که عامل ناپایداری تروپونین در تست تا حدودی مرتفع گردد.

منابع

1. Nagurney JT, Brown DF, Chae C, Chang Y, Chung WG, Cranmer H, et al. The sensitivity of cardiac markers stratified by symptom duration. The Journal of emergency medicine 2005; 29(4): 409-15.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology: Elsevier Health Sciences; 2014.
3. Pope JH, Aufderheide TP, Ruthazer R, Woolard RH, Feldman JA, Beshansky JR, et al. Missed diagnoses of acute cardiac ischemia in the emergency department. New England Journal of Medicine 2000; 342(16): 1163-70.
4. Hedges JR, Young GP, Henkel GF, Gibler WB, Green TR, Swanson JR. Serial ECGs are less accurate than serial CK-MB results for emergency department diagnosis of myocardial infarction. Annals of emergency medicine 1992; 21(12): 1445-50.
5. Young GP, Hedges JR, Gibler WB, Green TR, Swanson R. Do CK-MB results affect chest pain decision making in the emergency department? Annals of emergency medicine 1991; 20(11): 1220-8.
6. Saadat S, Yousefifard M, Asady H, Jafari AM, Fayaz M, Hosseini M. The most important causes of death in Iranian population; a Retrospective Cohort Study. Emergency 2015; 3(1): 16.
7. Committee NYHAC, Association NYH. Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels: Little, Brown Medical Division; 1979.
8. Group WW. The establishment of ischaemic heart disease registers (report of fifth working group). Copenhagen: World Health Organization. WHO Reg Publ Eur Ser 1972; 821.
9. Amsterdam EA, Wenger NK, Brindis RG, Casey DE, Ganiats TG, Holmes DR, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with non–ST-elevation acute coronary syndromes: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. Journal of the American College of Cardiology 2014; 64(24): e139-e228.
10. Ghaemmaghami CA, Burt DR. Acute reperfusion therapy in acute myocardial infarction. Emergency medicine clinics of North America 2005; 23(4): 1043-63.
11. Christian TF, Clements IP, Behrenbeck T, Huber KC, Chesebro JH, Gersh BJ, et al. Limitations of the electrocardiogram in estimating infarction size after acute reperfusion therapy for myocardial infarction. Annals of internal medicine 1991; 114(4): 264-70.
12. Levine GN, Bates ER, Bittl JA, Brindis RG, Fihn SD, Fleisher LA, et al. 2016 ACC/AHA Guideline Focused Update on Duration of Dual Antiplatelet Therapy in Patients With Coronary Artery Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines An Update of the 2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention, 2011 ACCF/AHA Guideline for Coronary Artery Bypass Graft Surgery, 2012 ACC/AHA/ACP/AATS/PCNA/SCAI/STS Guideline for the Diagnosis and Management of Patients With Stable Ischemic Heart Disease, 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of ST-Elevation Myocardial Infarction, 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Non–ST-Elevation Acute Coronary Syndromes, and 2014 ACC/AHA Guideline on Perioperative Cardiovascular Evaluation and Management of Patients Undergoing Noncardiac Surgery. Circulation 2016: CIR. 0000000000000404.
13. Lee TH, Juarez G, Cook EF, Weisberg MC, Rouan GW, Brand DA, et al. Ruling out acute myocardial infarction: a prospective multicenter validation of a 12-hour strategy for patients at low risk. New England Journal of Medicine 1991; 324(18): 1239-46.

14. Jneid H, Anderson JL, Wright RS, Adams CD, Bridges CR, Casey DE, et al. 2012 ACCF/AHA focused update of the guideline for the management of patients with unstable angina/non–ST-elevation myocardial infarction (updating the 2007 guideline and replacing the 2011 focused update): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. Journal of the American College of Cardiology 2012; 60(7): 645-81.
15. Braunwald E, Morrow DA. Unstable angina is it time for a requiem? Circulation 2013; 127(24): 2452-7.
16. Gibler WB, Young GP, Hedges JR, Lewis LM, Smith MS, Carleton SC, et al. Acute myocardial infarction in chest pain patients with nondiagnostic ECGs: serial CK-MB sampling in the emergency department. Annals of emergency medicine 1992; 21(5): 504-12.
17. Kumar A, Cannon CP, editors. Acute coronary syndromes: diagnosis and management, part I. Mayo Clinic Proceedings; 2009: Elsevier.
18. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. Circulation 2002; 105(9): 1135-43.
19. Adams HP, Brott TG, Furlan AJ, Gomez CR, Grotta J, Helgason CM, et al. Guidelines for thrombolytic therapy for acute stroke: a supplement to the guidelines for the management of patients with acute ischemic stroke a statement for healthcare professionals from a special writing group of the stroke council, American heart association. Circulation 1996; 94(5): 1167-74.
20. Mann DL, Zipes DP, Libby P, Bonow RO. Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine: Elsevier Health Sciences; 2014.
21. Lott JA, Stang JM. Serum enzymes and isoenzymes in the diagnosis and differential diagnosis of myocardial ischemia and necrosis. Clinical chemistry 1980; 26(9): 1241-50.
22. Zaacks SM, Liebson PR, Calvin JE, Parrillo JE, Klein LW. Unstable angina and non-Q wave myocardial infarction: does the clinical diagnosis have therapeutic implications? Journal of the American College of Cardiology 1999; 33(1): 107-18.
23. McCullough PA, Ayad O, O'Neill WW, Goldstein JA. Costs and outcomes of patients admitted with chest pain and essentially normal electrocardiograms. Clinical cardiology 1998; 21(1): 22-6.
24. Eggers KM, Oldgren J, Nordenskjöld A, Lindahl B. Diagnostic value of serial measurement of cardiac markers in patients with chest pain: limited value of adding myoglobin to troponin I for exclusion of myocardial infarction. American heart journal 2004; 148(4): 574-81.
25. Adams III JE, Miracle VA. Cardiac biomarkers: past, present, and future. American Journal of Critical Care 1998; 7(6): 418.
26. Tidy C. Cardiac Enzymes and Markers for Myocardial Infarction. 2014.
27. Al-Hadi HA, Fox KA. Cardiac markers in the early diagnosis and management of patients with acute coronary syndrome. Sultan Qaboos University medical journal 2009; 9(3): 231.
28. Adams III JE. Clinical application of markers of cardiac injury: basic concepts and new considerations. Clinica chimica acta 1999; 284(2): 127-34.
29. Miller WL, Jaffe AS. Biomarkers in heart failure: the importance of inconvenient details. ESC Heart Failure 2016; 3(1): 3-10.
30. Rosenblat J, Zhang A, Fear T. Biomarkers of myocardial infarction: Past, present and future. UWOMJ 2012; 81(1): 23-5.
31. Janota T. Biochemical markers in the diagnosis of myocardial infarction. Cor et Vasa 2014; 56(4): e304-e10.

32. Wolf RE, Graeber GM, Burge JR, DeShong JL, MacDonald JL, Zajtchuk R. Evaluation of serum creatine kinase and lactate dehydrogenase in experimental myocardial infarction, atriotomies, and thoracotomies. The Annals of thoracic surgery 1986; 41(4): 378-86.
33. Chon H, Lee S, Yoon S-Y, Lee EK, Chang S-I, Choo J. SERS-based competitive immunoassay of troponin I and CK-MB markers for early diagnosis of acute myocardial infarction. Chemical Communications 2014; 50(9): 1058-60.
34. Wu AH. Creatine kinase, isoenzymes, and variants. Cardiac Markers: Springer; 1998. p. 113-25.
35. Cummins B, Auckland ML, Cummins P. Cardiac-specific troponin-l radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. American heart journal 1987; 113(6): 1333-44.
36. Mair J, Thome-Kromer B, Wagner I, Lechleitner P, Dienstl F, Puschendorf B, et al. Concentration time courses of troponin and myosin subunits after acute myocardial infarction. Coronary artery disease 1994; 5(10): 865.
37. Katus HA, Remppis A, Looser S, Hallermeier K, Scheffold T, Kubler W. Enzyme linked immuno assay of cardiac troponin T for the detection of acute myocardial infarction in patients. Journal of molecular and cellular cardiology 1989; 21(12): 1349-53.
38. Murthy VV, Karmen A. Troponin-T as a serum marker for myocardial infarction. Journal of clinical laboratory analysis 1997; 11(3): 125-8.
39. Sarko J, Pollack CV. Cardiac troponins. The Journal of emergency medicine 2002; 23(1): 57-65.
40. Carroll C, Al Khalaf M, Stevens JW, Leaviss J, Goodacre S, Collinson PO, et al. Heart-type fatty acid binding protein as an early marker for myocardial infarction: systematic review and meta-analysis. Emergency Medicine Journal 2012: emermed-2012-201174.
41. Mythili S, Malathi N. Diagnostic markers of acute myocardial infarction (Review). Biomedical reports 2015; 3(6): 743-8.
42. Lili C, Xiaomei G, Fei Y. Role of heart-type fatty acid binding protein in early detection of acute myocardial infarction in comparison with cTnI, CK-MB and myoglobin. Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences] 2004; 24(5): 449-51.
43. Voors AA, von Haehling S, Anker SD, Hillege HL, Struck J, Hartmann O, et al. C-terminal provasopressin (copeptin) is a strong prognostic marker in patients with heart failure after an acute myocardial infarction: results from the OPTIMAAL study. European heart journal 2009; 30(10): 1187-94.
44. Inanc M, Cerit N, Elcik D, Kalay N, Kaya M. Copeptin, Troponin-I, Pro-BNP and hs-CRP levels in Diagnosing Acute Coronary Syndromes. Angiol 2016; 4(169): 2.
45. Kassem M, Andric T, Rohla M, Arfvidsson J, Ahlin F, Eisenburger P, et al. COPEPTIN LEVELS IN PATIENTS WITH CHEST PAIN WITH TYPE-1 AND TYPE-2 MYOCARDIAL INFARCTION. Journal of the American College of Cardiology 2016; 67(13_S): 521-.
46. Kelly D, Squire IB, Khan SQ, Quinn P, Struck J, Morgenthaler NG, et al. C-terminal provasopressin (copeptin) is associated with left ventricular dysfunction, remodeling, and clinical heart failure in survivors of myocardial infarction. Journal of cardiac failure 2008; 14(9): 739-45.
47. Rashidinejad H, Hosseini S, Moazenzadeh M, Azimzadeh B, Mirzaeipour F, Fakhreddini K, et al. Relationship between serum level of high-sensitive C-reactive protein and extension of myocardial involvement in patients with acute myocardial infarction. Rom J Intern Med 2012; 50(3): 211-5.

48. Marković M, Ignjatović S, Dajak M, Majkić-Singh N. Placental growth factor as short-term predicting biomarker in acute coronary syndrome patients with non-ST elevation myocardial infarction. Southern medical journal 2010; 103(10): 982-7.
49. Rassaf T, Weber C, Bernhagen J. Macrophage migration inhibitory factor in myocardial ischaemia/reperfusion injury. Cardiovascular research 2014; 102(2): 321-8.
50. Khan SQ, Ng K, Dhillon O, Kelly D, Quinn P, Squire IB, et al. Growth differentiation factor-15 as a prognostic marker in patients with acute myocardial infarction. European heart journal 2009.
51. Danne O, Möckel M. Choline in acute coronary syndrome: an emerging biomarker with implications for the integrated assessment of plaque vulnerability. Expert review of molecular diagnostics 2010; 10(2): 159-71.
52. Love SA, Sandoval Y, Smith SW, Nicholson J, Cao J, Ler R, et al. Incidence of Undetectable, Measurable, and Increased Cardiac Troponin I Concentrations Above the 99th Percentile Using a High-Sensitivity vs a Contemporary Assay in Patients Presenting to the Emergency Department. Clinical Chemistry 2016: clinchem. 2016.256305.
53. Ohman EM, Armstrong PW, Christenson RH, Granger CB, Katus HA, Hamm CW, et al. Cardiac troponin T levels for risk stratification in acute myocardial ischemia. New England Journal of Medicine 1996; 335(18): 1333-42.
54. Sandoval Y, Apple FS, Smith SW. High-sensitivity cardiac troponin assays and unstable angina. European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care 2016: 2048872616658591.
55. Tripet B, De Crescenzo G, Grothe S, O'Connor-McCourt M, Hodges RS. Kinetic analysis of the interactions between Troponin C (TnC) and Troponin I (TnI) binding peptides: evidence for separate binding sites for the ‘structural’N-terminus and the ‘regulatory’C-terminus of TnI on TnC. Journal of Molecular Recognition 2003; 16(1): 37-53.
56. Panteghini M, Bonora R, Pagani F, Buffoli F, Cuccia C. Rapid, highly sensitive immunoassay for determination of cardiac troponin I in patients with myocardial cell damage. Clinical chemistry 1997; 43(8): 1464-5.
57. Daubert MA, Jeremias A. The utility of troponin measurement to detect myocardial infarction: review of the current findings. Vascular health and risk management 2010; 6(1): 691-9.
58. Vaidya H, Maynard Y, Dietzler D, Ladenson J. Direct measurement of creatine kinase-MB activity in serum after extraction with a monoclonal antibody specific to the MB isoenzyme. Clinical chemistry 1986; 32(4): 657-63.
59. Katrukha AG, Bereznikova AV, Filatov VL, Esakova TV, Kolosova OV, Pettersson K, et al. Degradation of cardiac troponin I: implication for reliable immunodetection. Clinical chemistry 1998; 44(12): 2433-40.
60. Biosciences A. Protein purification handbook. Edition AC 2001; 98.
61. Scopes RK. Protein purification: principles and practice: Springer Science & Business Media; 2013.
62. Williams A, Frasca V. Ion-exchange chromatography. Current protocols in protein science 2001: 8.2. 1-8.2. 30.
63. Larsen JEP, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. Immunome research 2006; 2(1): 1.
64. Petrovsky N, Schönbach C, Brusic V. Bioinformatic strategies for better understanding of immune function. In silico biology 2003; 3(4): 411-6.

65. De Groot AS. Immunomics: discovering new targets for vaccines and therapeutics. Drug discovery today 2006; 11(5): 203-9.
66. Tong JC, Ren EC. Immunoinformatics: current trends and future directions. Drug discovery today 2009; 14(13): 684-9.
67. Reineke U, Schutkowski M. Epitope mapping protocols: Springer; 2009.
68. Yasser E-M, Honavar V. Recent advances in B-cell epitope prediction methods. Immunome research 2010; 6(Suppl 2): S2.
69. Saha S, Raghava G. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 2006; 65(1): 40-8.
70. Wang Y, Wu W, Negre NN, White KP, Li C, Shah PK. Determinants of antigenicity and specificity in immune response for protein sequences. BMC bioinformatics 2011; 12(1): 1.
71. Davydov YI, Tonevitsky A. Prediction of linear B-cell epitopes. Molecular Biology 2009; 43(1): 150-8.
72. Assenberg R, Wan PT, Geisse S, Mayr LM. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. Current opinion in structural biology 2013; 23(3): 393-402.
73. Berger I, Mayr LM. Protein production for structural biology: new solutions to new challenges. Curr Opin Struct Biol 2013; 23(3): 317-8.
74. Chen R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond. Biotechnology advances 2012; 30(5): 1102-7.
75. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. Recombinant protein expression in microbial systems 2014: 7.
76. Block H, Maertens B, Spriestersbach A, Brinker N, Kubicek J, Fabis R, et al. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. Methods in enzymology 2009; 463: 439-73.
77. Hengen PN. Purification of His-Tag fusion proteins from Escherichia coli. Trends in biochemical sciences 1995; 20(7): 285-6.
78. Searle S, Pedersen J, Henry A, Webster D, Rees A. Antibody structure and function. Antibody engineering 1995; 2: 3-51.
79. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. nature 1975; 256: 495-7.
80. Zola H. Monoclonal antibodies: a manual of techniques: CRC press; 1987.
81. Buchwalow IB, Böcker W. Immunohistochemistry. Basics and methods/I Buchwalow, W Bocker–2010–150 p 2010.
82. Wolfensohn S, Lloyd M. Handbook of laboratory animal management and welfare: John Wiley & Sons; 2008.
83. Wilson-Welder JH, Torres MP, Kipper MJ, Mallapragada SK, Wannemuehler MJ, Narasimhan B. Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. Journal of pharmaceutical sciences 2009; 98(4): 1278-316.
84. Mbow ML, De Gregorio E, Valiante NM, Rappuoli R. New adjuvants for human vaccines. Current opinion in immunology 2010; 22(3): 411-6.
85. Akiyama M, Oishi K, Tao M, Matsumoto K, Pollack M. Antibacterial Properties of Pseudomonas aeruginosa Immunotype 1 Lipopolysaccharide-Specific Monoclonal Antibody (MAb) in a Murine Thigh Infection Model: Combined Effects of MAb and Ceftazidime. Microbiology and immunology 2000; 44(8): 629-35.
86. Saylor C, Dadachova E, Casadevall A. Monoclonal antibody-based therapies for microbial diseases. Vaccine 2009; 27: G38-G46.

87. Devi SJ. Preclinical efficacy of a glucuronoxylomannan-tetanus toxoid conjugate vaccine of Cryptococcus neoformans in a murine model. Vaccine 1996; 14(9): 841-4.
88. Han Y, Ulrich MA, Cutler JE. Candida albicans mannan extract—protein conjugates induce a protective immune response against experimental candidiasis. Journal of Infectious Diseases 1999; 179(6): 1477-84.
89. Chin J, Sohn Y, Lee SH, Park YI, Choi MJ. Production of neutralizing human monoclonal antibody directed to tetanus toxin in CHO cell. Biologicals 2003; 31(1): 45-53.
90. Voller A, Bidwell D, Bartlett A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine: theory and practice. Bulletin of the World Health Organization 1976; 53(1): 55.
91. Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays: Elsevier; 1985.
92. Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. Obesity research 1996; 4(6): 583-600.
93. Chard T. Introduction to radioimmunoassay and related techniques. 1978.
94. Wild D. The immunoassay handbook: Gulf Professional Publishing; 2005.
95. Ching KH. Lateral Flow Immunoassay. ELISA: Methods and Protocols 2015: 127-37.
96. Paulie S, Perlmann H. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. eLS 2003.
97. Gribnau T, Leuvering J, Van Hell H. Particle-labelled immunoassays: a review. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 1986; 376: 175-89.
98. Molina-Bolívar J, Galisteo-González F. Latex immunoagglutination assays. Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews 2005; 45(1): 59-98.
99. Olsen DA, Bernstein D. Colloidal gold particle concentration immunoassay. Google Patents; 1989.
100. Zhou Y, Pan F-G, Li Y-S, Zhang Y-Y, Zhang J-H, Lu S-Y, et al. Colloidal gold probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of brevetoxins in fishery product samples. Biosensors and Bioelectronics 2009; 24(8): 2744-7.
101. Molinelli A, Grossalber K, Krska R. A rapid lateral flow test for the determination of total type B fumonisins in maize. Analytical and bioanalytical chemistry 2009; 395(5): 1309-16.
102. Wang S, Quan Y, Lee N, Kennedy IR. Rapid determination of fumonisin B1 in food samples by enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay. Journal of agricultural and food chemistry 2006; 54(7): 2491-5.
103. Jiang T, Liang Z, Ren W, Chen J, Zhi X, Qi G, et al. Development and validation of a lateral flow immunoassay using colloidal gold for the identification of serotype-specific foot-and-mouth disease virus O, A and Asia 1. Journal of virological methods 2011; 171(1): 74-80.
104. Guo Y-R, Liu S-Y, Gui W-J, Zhu G-N. Gold immunochromatographic assay for simultaneous detection of carbofuran and triazophos in water samples. Analytical biochemistry 2009; 389(1): 32-9.
105. Hua X, Qian G, Yang J, Hu B, Fan J, Qin N, et al. Development of an immunochromatographic assay for the rapid detection of chlorpyrifos-methyl in water samples. Biosensors and Bioelectronics 2010; 26(1): 189-94.
106. Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. Analytical and bioanalytical chemistry 2009; 393(2): 569-82.
107. Mak WC, Beni V, Turner AP. Lateral-flow technology: From visual to instrumental. TrAC Trends in Analytical Chemistry 2016; 79: 297-305.
108. Tang C, Sosa CL, Pagels RF, Priestley RD, Prud'homme RK. Efficient preparation of size tunable PEGylated gold nanoparticles. Journal of Materials Chemistry B 2016; 4(28): 4813-7.

109. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. Discussions of the Faraday Society 1951; 11: 55-75.
110. Rossi M, Della Pina C, Falletta E. Gold nanomaterials: From preparation to pharmaceutical design and application. Current pharmaceutical design 2016; 22(11): 1485-93.
111. Geoghegan WD, Ambegaonkar S, Calvanico NJ. Passive gold agglutination. An alternative to passive hemagglutination. Journal of immunological methods 1980; 34(1): 11-21.
112. Nagata M, Tanaka T. Detection of fecal blood by colloidal gold agglutination using an anti-human hemoglobin monoclonal antibody. Journal of immunological methods 1992; 153(1): 185-92.
113. Leuvering JH, Thal PJ, White DD, Schuurs AH. A homogeneous sol particle immunoassay for total oestrogens in urine and serum samples. Journal of immunological methods 1983; 62(2): 163-74.
114. Horisberger M, Rosset J. Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 1977; 25(4): 295-305.
115. Leuvering JH, Thal PJ, Van der Waart M, Schuurs AH. A sol particle agglutination assay for human chorionic gonadotrophin. Journal of immunological methods 1981; 45(2): 183-94.
116. Mahajan VS, Jarolim P. How to interpret elevated cardiac troponin levels. Circulation 2011; 124(21): 2350-4.
117. Singer JM, Plotz CM. The latex fixation test: I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. The American journal of medicine 1956; 21(6): 888-92.
118. Beatty JD, Beatty BG, Vlahos WG. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. Journal of immunological methods 1987; 100(1): 173-9.
119. LI R, ZHU N-s. Development of Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Detection of Cardiac Troponin IC Complex in the Diagnosis of Cardiac Damage [J]. Journal of Fudan University 2005; 4.
120. Apple FS, Collinson PO, Biomarkers ITFoCAoC. Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays. Clinical chemistry 2012; 58(1): 54-61.
121. Adams Jr, Bodor GS, Davila-Roman VG, Delmez J, Apple F, Ladenson J, et al. Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. Circulation 1993; 88(1): 101-6.
122. Filatov V, Katrukha A, Bulargina T, Gusev N. Troponin: structure, properties, and mechanism of functioning. BIOCHEMISTRY C/C OF BIOKHIMIIA 1999; 64: 969-85.
123. Shi Q, Ling M, Zhang X, Zhang M, Kadijevic L, Liu S, et al. Degradation of cardiac troponin I in serum complicates comparisons of cardiac troponin I assays. Clinical chemistry 1999; 45(7): 1018-25.
124. Lippi G, Cervellin G, editors. Degradation of troponin I in serum or plasma: mechanisms, and analytical and clinical implications. Seminars in thrombosis and hemostasis; 2012: Thieme Medical Publishers.
125. Stürenburg E, Junker R. The Advantages and Disadvantages of Immunochromatographic Test Strips. 2009.
126. Luppa PB, Müller C, Schlichtiger A, Schlebusch H. Point-of-care testing (POCT): Current techniques and future perspectives. TrAC Trends in Analytical Chemistry 2011; 30(6): 887-98.

Abstract

Introduction: Unlike the past medical practices, clinical decisions are not made exclusively based on clinical signs. This is in part due to the complicated disease conditions and their way harder differential diagnosis. In this regard, using highly sensitive and specific clinical tests could play an important role in correct detection of diseases. Since the early detection in the course of a disease is an important factor, developing new rapid detection tests garnered a lot of attention. Nowadays, cardiac disease and particularly myocardial infarction is one of the main mortality causes. It is the second cause of deaths which accentuates its importance. There are various methods of troponin I detection methods with their specific limitations. The immuno-chromatography method is one of these methods that is a fast, accurate and sensitive which does not need complicated devices and technicians. Rapid troponin I detection kits for early infarction detection are among the high priority kits to be developed which in turn could prevent extensive necrosis and death.

Material and methods: Balb/C mice were used for monoclonal antibody production. The recombinant protein which was expressed within the E. coli host and purified with Nickel affinity chromatography column was used for immunization. Following the immunization, the spleen cells of the mice were fused to the Sp2/0 cells by poly ethylene glycol method. Then, the primary screening and two limiting dilutions were performed to achieve a high affinity clone. Thereafter, the produced antibodies were confirmed by western blotting and characterized by isotyping. Obtained polyclonal and monoclonal antibodies were harvested to design immuno-chromatography test with gold nanoparticles. The serum samples of patients suffering from myocardial infarction with determined amounts of troponin I were used to examine the designed test quality and 1 ng/ml was set to be the cutoff for the positive results.

Results: The mice which were successfully immunized were selected for the cell fusion. There were 800 clones which their supernatants showed positive results in the ELISA with the recombinant protein. Amongst, one clone with stable and high titer antibody secretion was selected and proved to be a single clone by limiting dilution. Ultimately, 5 clones with highest affinity against troponin I were chose and then injected into mice and antibodies were purified (with protein G column) from mice ascites. The antibodies were determined to be of IgG2a isotype with kappa chain as their light chain. Using raised polyclonal and monoclonal antibodies an immuno-chromatography test was successfully designed with gold nanoparticles and the cutoff of 1 ng/ml. using 50 clinical samples the designed test was assessed for its sensitivity (100%), specificity (96.1), accuracy (98%) and precision (100%).

Discussion: The obtained results indicates that the produced antibodies are capable of serum troponin I detection and could be used for diagnosis of myocardial infarction.

Keywords: cardiac troponin I, monoclonal antibody, gold nanoparicles, immune chromatography test

T.M.U.

Thesis

PhD in Clinical Biochemistry

Production of Monoclonal Antibodies Against Cardiac Troponin I Marker (cTnI) And Development of Immunostrip Assay Based Gold Nanoparticle For Clinical Diagnosis In Human Serum

Presented by

Majid Asiabanha Rezaee

Suppervised by

Prof. Mohammad Javad Rasaee

Advisers

Dr.Javad Mohammad Nejad

Dr.malihe Paknejad

2016