مجله علمی-پژوهشی «علوم و فناوری‌های پدافند غیرعامل»
سال سوم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱: ص ۷۹-۷۳

پردازش سطحی بسترهای سلولز و PVDF برای تثبیت آنتی‌بادی، به‌منظور استفاده از آنها در سیستم‌های تشخیصی

محمد هیئت[۱]، علی‌محمد لطیفی[۲]*، مرتضی میرزایی[۳]
۳،۱- کارشناس ارشد، ۲- استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)
(تاریخ دریافت:۱۳۹۰/۰۷/۱۷، تاریخ پذیرش:۱۳۹۱/۰۳/۲۰)

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

Surface Processing of Cellulose and PVDF Supports for Immobilization of Antibody for Diagnostic Application

M. Heiat, A. M. Latifi*, M. Mirzaei
Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences
(Received:10/09/2012, Accepted:06/09/2012)

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

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

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

۱. مقدمه

تثبیت که معادل کلمه لاتین"Immobilization" می‌باشد در لغت به معنای باز ایستادن و در اصطلاح عبارت است از ساکن نمودن بیوماکرومولکول‌ها، سلول‌ها (مانند انواع باکتری‌ها) و بافت‌ها با شیوه‌های متنوع بر روی سطوح مختلف. اما این تعریف به خودی خود گویای واقعیت‌های مهندسی تثبیت نیست. به واقع در این راستا می‌بایست تثبیت به نحوی صورت پذیرد که بازدهی و راندمان استفاده از ماده ثابت شده افزایش یابد یا حداقل کم نشود. تثبیت بیومولکول‌ها بر روی بستر یکی از مهم‌ترین مراحل در طراحی و ساخت حسگرهای زیستی (مانند استریپ‌های نواری) و سیستم‌های تشخیصی بالینی می‌باشد. از جمله جزء پرکاربردترین سیستم‌های تشخیصی در مباحث پزشکی و بهداشتی سیستم‌های تشخیص سریع نواری می‌باشند.

از مهم‌ترین فاکتورهای مؤثر و همچنین یکی از اصلی‌ترین اجزای تشکیل دهنده این گونه سیستم‌های تشخیصی که مبتنی بر ایمونوکروماتوگرافی می‌باشند، بستر و نحوه تثبیت آنتی بادی بر روی آن است. انتخاب بستر مناسب برای کسب بهترین پاسخ از اساسی‌ترین مباحث در مهندسی تثبیت است. تثبیت بیومولکول‌ها بر روی بستر یکی از پیش‌نیازهای مهم در طراحی و ساخت حسگرهای زیستی می‌باشد. برای رسیدن به بهترین حالت تثبیت بایستی اصول مهندسی تثبیت رعایت گردد. ما در این تحقیق به مطالعه دو بستر سلولز و PVDF[1] می‌پردازیم و چگونگی فعال‌سازی و تثبیت آنتی بادی بر روی آنها را مورد بررسی قرار می‌دهیم.

سلولز با فرمول شیمیایی $(C_6H_{10}O_5)_n$ در حقیقت یک پلی‌ساکارید مرکب از چند صد تا چند هزار مولکول D- گلوز می‌باشد که به صورت خطی با پیوند β(1→4) گلیکوزیدی به یکدیگر متصل شده‌اند[۱،۲]. سلولز ماده بدون طعم و بو و دارای خصوصیات هیدروفیلیک بوده [۳] و می‌توان آن را در اسید غلیظ و دمای بالا به مونومرهای گلوکز شکست [۴]. سلولز با دارا بودن گروه عاملی OH- می‌تواند ترکیبات متنوعی را تولید نماید. تلاش برای تثبیت آنتی‌بادی با استفاده از همین گروه یعنی (OH-) انجام می‌پذیرد. اما بستر می‌بایست ابتدا فعال گردد. از مهم‌ترین مواد فعال کننده می‌توان به موادی چون اتیلن کلروفرمات، کربو دی ایمیدازول و N - هیدروکسی سوکسینیمید[2] (NHS) اشاره نمود [۵،۶،۷].

قالب فعالیت همه مواد فعال‌کننده در یک محدوده می‌باشد و آن عبارت است از ایجاد یک گروه فوق‌العاده فعال که به‌طورمعمول بسیار ناپایدار بوده و آماده واکنش با بیوکاتالیست مورد نظر می‌باشد. یکی از معروف‌ترین مواد فعال‌کننده که در این تحقیق از آن استفاده گردید سیانوژن برماید (CNBr) می‌باشد.

مکانیسم عملکرد این ماده به این ترتیب است که با گروه هیدروکسیل واکنش داده و یک گروه واکنش‌گر ایجاد می‌نماید و این گروه به راحتی می‌تواند شکسته شود و با گروه آمین آنتی‌بادی وارد واکنش شود و یک پیوند کوالان تشکیل دهد[۸]. سیانوژن برماید با گروه OH- واکنش داده و یک ترکیب بسیار فعال به نام (Very active cyanatester) سیانات استر تشکیل می‌گردد که این ترکیب حد واسط می‌تواند در سه مسیر متفاوت عمل کند شکل(۱).

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

۲- مسیر دوم بدین ترتیب است که استر سیانات به یک ایزومر ناپایدار دیگر به نام سیکلیک ایمیدو کربونات تبدیل می‌گردد که مستعد واکنش با گروه آمین آنتی‌بادی می‌باشد و در نهایت نیز N- Substituted imidocarbonate تولید می‌نماید این فرآورده نیز می‌تواند با یک فرایند هیدرولیز تولید N-Substituted carbamate نماید.

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

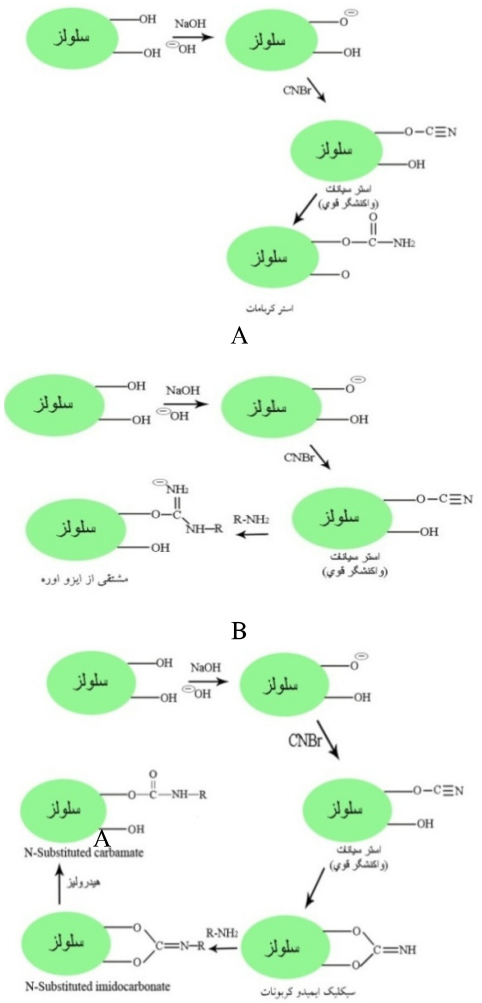
PVDF (پلی ونیلیدن فلوراید) یک پلیمر نیمه بلورین می‌باشد که شامل یک زنجیره خطی از توالی (CH2-CF2) است. ساختار مولکولی زیگ‌زاگ این پلیمر از لحاظ ترمودینامیکی پایدار می‌باشد.

اگر به ساختار PVDF توجه شود یک تقارن منظم در این مولکول مشاهده می‌گردد. PVDF یک غشاء مطلوب باشد که از آن به طور گسترده برای مقاصد مختلف استفاده می‌شود از جمله آن ساخت فیلترهای مختلف و بسترهای متنوع می‌باشد. بسترهای PVDF دارای مقاومت شیمیایی زیاد، پایداری گرمایی و قدرت مکانیکی خوب می‌باشند.

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

PVDF به طور معمول به عنوان بستر جامد برای سنجش‌های متنوع ایمونولوژیکی به کار برده می‌شود به خاطر قابلیت بالای اتصال PVDF به پروتئین یک غشاء ایده‌آل برای این قبیل فعالیت‌ها می‌باشد. از جمله این فرایندها ELISpot[3] و میکروآری[4] می‌باشد که در آنجا نیاز به غلظت بالای موضعی، از یک واکنش‌گر تثبیت شده مثل آنتی‌بادی و یا پروتئین می‌باشد.

[1] Polyvinylidene difluoride
[2] N-Hydroxysuccinimide
[3] Enzyme-linked Immunosorbent spot (ELISPOT)
[4] Microarray



شکل ۱. سه مسیر متفاوت حد واسط استر سیانات

A- تشکیل ترکیب پایدار خنثی به نام استر کربامات

B- تولید یک ایزومر ناپایدار به نام سیکلیک ایمیدو کربونات

C- تولید ایزو اوره به عنوان بهترین مدل تثبیت

بنابراین اگر قرار بر استفاده از بستر PVDF باشد برای دست‌یابی به این چنین خصوصیاتی (توانمندی اتصال فوق‌العاده به پروتئین و آنتی‌بادی) ابتدا نیاز است تا PVDF فعال گردد. از آنجا که PVDF به صورت ذاتی به خودی خود دارای خصوصیات شدید هیدروفوبیک بوده و از نظر قدرت اتصال بسیار ضعیف است می‌بایست در این خصوصیات تغییرات عمده ایجاد گردد [۱۳،۱۴]. فعال‌سازی به طور معمول از طریق تیمار غشاء با متانول و یا اتانول صورت می‌پذیرد این مواد در حقیقت بستر را تا حدودی هیدروفیل کرده و به محلول‌های آبی اجازه می‌دهد تا درون غشاء نفوذ کرده و مولکول‌ها بتوانند به بستر متصل شوند و از این طریق ظرفیت انتقال را افزایش می‌دهند.

۲. بخش تجربی

نوارهای سلولز و PVDF از شرکت میلی‌پور، سیانوژن برماید (CNBr)، سدیم هیدروکسید، دی‌متیل فرمامید (DMF)[1]، متانول، BSA (به عنوان بلاکر)، آنتی‌بادی‌های مورد نیاز (آنتی هیومن IgG بزی و آنتی-آنتی هیومن IgG موشی کانژوگه شده با آنزیم HRP[2]) و سوبسترای BM Blue از شرکت Roche خریداری شدند.

۲-۱. تثبیت آنتی بادی بر روی بستر سلولز

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

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

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

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

۲-۱-۲. تثبیت آنتی‌بادی بر روی بستر سلولز

نوارهای فعال سلولز در محلول آنتی‌بادی (آنتی‌هیومن IgG بزی) با غلظت 0.1 mg/ml در 1X PBS به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور گردیدند. سپس نوارها طی سه مرحله ۵ دقیقه‌ای با PBST 0.5X شستشو داده شدند. در ادامه جایگاه‌های فعال بستر به مدت ۵ ساعت با محلول 0.1mg/ml BSA[3] در 1X PBS بلوکه و مابین دو لایه شیشه‌ای خشک شدند. برای مقایسه بین حالت فعال و غیر فعال بستر، یک نوار خام سلولز، بدون فعال سازی با روش بیان شده در بند ۲-۱-۱ تنها با آنتی بادی مذکور با مدت مشابه مواجه گردید و جایگاه‌های فعال باقی مانده آن با مواد بلاک کننده مسدود گردید و در مرحله آزمون مورد ارزیابی قرار گرفت.

[1] Dimethylformamide
[2] Horseradish peroxidase
[3]- Bovine serum albumin

۲-۲. تثبیت آنتی بادی بر روی بستر PVDF

۲-۲-۱. فعال سازی بستر PVDF

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

۲-۲-۲. تثبیت آنتی‌بادی روی بستر PVDF

نوارهای فعال PVDF نیز همانند نوارهای فعال سلولزی در محلول آنتی‌بادی (آنتی هیومن IgG بزی) با غلظت 0.1 mg/ml در 1X PBS به مدت یک شب تا صبح در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور گردیدند و پس از شستشو با PBST 0.5X جایگاه‌های فعال بستر نیز همانند بسترهای سلولزی بلوکه و مابین دو لایه شیشه‌ای خشک شدند [16]. جهت مقایسه نمونه‌های تیمار شده با نمونه‌های فاقد هرگونه تیمار از یک بستر PVDF که هیچ گونه فرایند فعال سازی بر روی آن انجام نشده بود به عنوان کنترل منفی استفاده شد. بدین ترتیب که بستر خام PVDF با آنتی‌بادی مذکور با مدت مشابه مواجه گردید و جایگاه‌های فعال باقی مانده آن با مواد بلاک کننده مسدود گردید و در مرحله آزمون مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲-۳. آزمون نوارها

پس از تهیه یک محلول ۱:۵۰۰۰ از آنتی بادی (آنتی IgG Goat خرگوشی) کانژوگه شده با آنزیم HRP نوارهای کنترل و آزمون درون آن غوطه‌ور گردیدند و به مدت ۳ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در این حالت ماندند. در ادامه نوارها سه مرتبه با بافر PBST 0.5X به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند و سپس بین دو لام شیشه‌ای کاملاً خشک گردیدند.

۲۰µl از سوبسترای آنزیم (BM Blue) بر روی نوارها ریخته شد و زمان انجام واکنش از لحظه آغاز واکنش تا پدیدار شدن رنگ در منطقه مورد نظر، با کرنومتر اندازه‌گیری و در نهایت با یکدیگر مقایسه شدند. همچنین غلظت رنگ ایجاد شده از طریق اسپکتوفوتومتری با دستگاه نانودراپ اندازه گیری شد. بدین ترتیب که پس از خاتمه واکنش یک میکرولیتر از ماده رنگی ایجاد شده بر روی نوار به نانودراپ منتقل و میزان جذب آن در مقایسه با سوبسترای آنزیم محاسبه گردید.

۳. نتایج و بحث

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

افزایش میزان جذب نور توسط سوبسترای رنگی شده بر روی نوارها در فواصل زمانی مختلف مؤید افزایش غلظت رنگ در اثر عملکرد آنزیم متصل به آنتی‌بادی ثانویه می‌باشد. بهترین پاسخ در نوار آزمون مربوط پس از گذشت مدت زمانی معادل ۸ دقیقه به‌دست آمد. بدین ترتیب که سوبسترای رنگی با OD مساوی ۱/۲۱ حداکثر میزان واکنش آنزیمی را نشان داد. در سویی دیگر بهترین پاسخ برای نمونه کنترل پس از گذشت ۸ دقیقه گزارش گردید که با OD=۰/۴ بیانگر بیشترین میزان عملکرد آنزیمی بود.

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

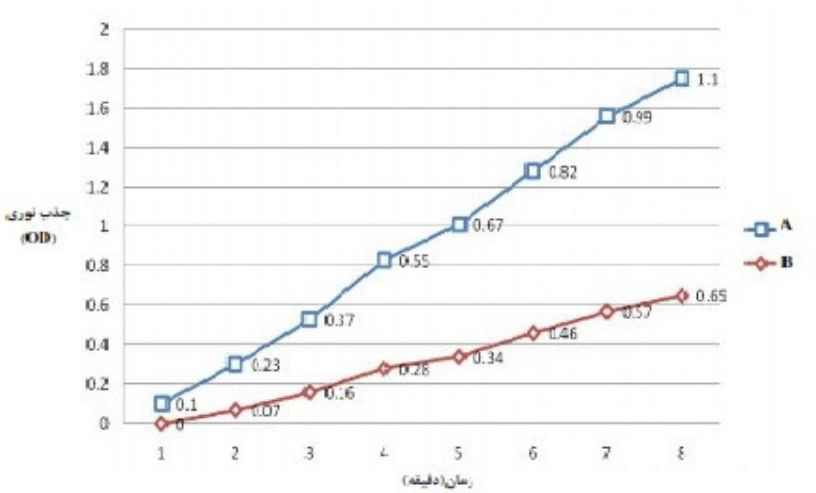
نوارهای آزمون و کنترل PVDF نیز به فواصل زمانی ۱ دقیقه از دقیقه ۱ تا دقیقه ۸ همانند روش سلولز مورد آزمایش قرار گرفتند شکل (۳).

با گذشت زمان به مرور غلظت رنگ ایجاد شده افزایش یافت و به تبع آن جذب‌های نوری رنگ‌های ایجاد شده بر روی هر یک از نوارها افزایش پیدا کردند. همانگونه که از داده‌های شکل (۳) برمی‌آید حداکثر واکنش آنزیمی در نوار آزمون در دقیقه ۸ و با جذب نوری ۱/۱ گزارش گردید. در سویی دیگر بیشترین جذب نوری در نوار کنترل در دقیقه

هشتم پس از آغاز واکنش آنزیمی با OD=۰/۶۵ گزارش گردید. در این مورد نیز کارامدی تثبیت آنتی بادی تنها در ناحیه‌ای از نوار که تحت فرایند فعال سازی قرار گرفته بود مشاهده شد و در قسمت‌ها دیگر چنین اتفاقی رخ نداد.

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

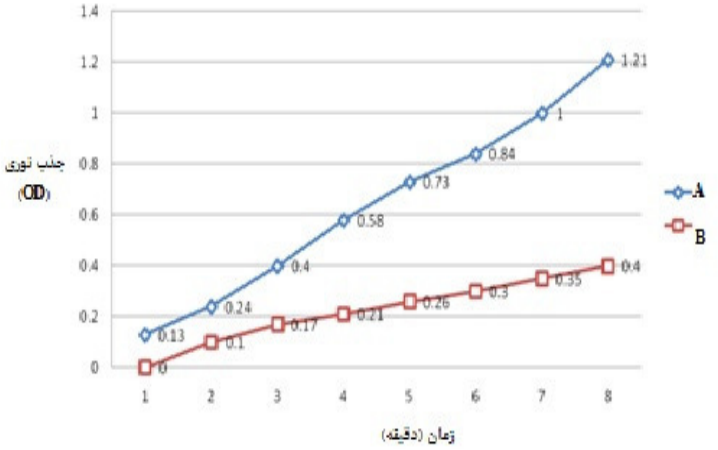
[1] Optical Density



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

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

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



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

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

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

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

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

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

حرکت جریان مایع بر روی نوار سلولزی بسیار سریع و به گونه‌ای مهار نشدنی می‌باشد که این خود می‌تواند در روش‌هایی که مبتنی بر کروماتوگرافی و حرکت فاز مایع بر روی بستر می‌باشد باعث ایجاد پاسخ‌های کاذب و یا خطاهایی از این قبیل گردد. بنابراین کار کردن با این چنین بسترهایی بسیار سخت می‌باشد چون در مراحل فرآوری استریپ ها که نیاز به دقت و اندازه گیری‌های دقیق دارد استفاده از چنین بسترهای مهار نشدنی مشکل می‌باشد.

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

۴. نتیجه‌گیری

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

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

۶. مراجع

[1] Glazer, A. N.; Nikaido, H."Microbial Biotechnology Fundamentals of Applied Microbiology."; Cambridge University Press: Cambridge UK, 2007

[2] Updegraff, D. M. "Semimicro Determination of Cellulose in Biological Materials."; Anal. Biochem. 1969, 32, 420–424.

[3] Charles, A. B. "Vacuum Deposition onto Webs, Films, and Foils."; William Andrew Press: Waltham MA, 2007

[4] Ófeigsdóttir, G. I. "Production and Utilization of Biomass with Microbes."; Ph.D. Thesis, Island university, Reykjavik, 2009.

[5] Matejtschuk, P. "Affinity Separations: A Practical Approach."; IRL Press: Oxford, 2002.

[6] Gustavsson, P. E.; Mosbach, K.; Nilsson, K. "Super Porous Agarose as an Affinity Chromatography Support."; J. Chromatogr. A. 1997, 776, 197–203.

[7] Comfort, A. R.; Mutton. C. J.; Langer, R.; "The Influence of Bond Chemistry on Immobilized Enzyme Systems for *exvivo* use.";Biotechnol. Bioeng. 2004, 32, 554–563.

[8] Bartling, G. J.; Brown, H.; Forrester, L. J.; Koes, M. T.; Mather, A. N.; Stasiw, R. O. "A study of the mechanism of cyanogens bromide activation of cellulose."; Biotechnol. Bioeng. 1972, 14, 1039–1044.

[9] Yang, R. T. H.; Wei, F.; Shuangfei, W. "Peroxidase Conjugate of Cellulose Nanocrystals for the Removal of Chlorinated Phenolic Compounds in Aqueous Solution."; Biotechnology 2008, 7, 233-241

[10] Laroche, G.; Marois, Y.; Guidoin, R.; King, M. W.; Martin, L.; How, T.; Douville, Y. "Polyvinylidene Fluoride (PVDF) as a Biomaterial: From Polymeric Raw Material to Monofilament Vascular Suture."; J. Biomed. Mater. Res. 1995, 29, 1525-36.

[11] Hester, J. F.; Banerjee, P.; Mayes, A. M. "Preparation of Protein-Resistant Surfaces on Poly(vinylidene fluoride) Membranes *via* Surface Segregation."; Macromolecules 1999, 32, 1643-1650.

[12] Li, P. Z.; Jing, Z. Y.; You, Y. X.; Zhen, Y. X.; Bao, K. Z. "Surface Modification of PVDF Porous Membranes *via* Poly(DOPA) Coating and Heparin Immobilization."; Biointerfaces 2009, 69, 152–155

[13] Klee, D.; Ademovic, Z.; Bosserhoff, A.; Hoecker, H.; Maziolis, G.; Erli, H. "Surface Modification of Poly(vinylidenefluoride) to Improve the Osteoblast Adhesion."; Biomaterials 2003, 24, 3663-3670.

[14] Qiu, G. M.; Zhu, L. P.; Zhu, B. K.; Xu, Y. Y.; Qiu, G. L."Grafting of Styrene/Maleic Anhydride Copolymer onto PVDF Membrane by Supercritical Carbon Dioxide: Preparation, Characterization and Biocompatibility Supercritical Fluids."; J. Supercrit. Fluids. 2008, 45, 374-383.

[15] Haider, T.; Husain, Q. "Immobilization of Galactosidase from Aspergillusoryzae *via* Immunoaffinity Support."; Biochem. Eng. J. 2009, 43, 307–314

[16] Tarlton, J. F.; Knight, P. J. "Clarification of Immunoblots on Polyvinylidenedifluoride (PVDF) Membranes for Transmission Densitometry."; J. Immunol. Methods 1996, 191, 65-69.