مجله دیابت و لیپید ایران. دو ماهنامه خرداد- تیر ۱۳۹۱؛ دوره ۱۱ (شماره ۵) ۴۲۸-۴۱۹

کاربرد مزوپورها و نانوذرات طلای کلوئیدی در طراحی یک روش جدید سنجش ایمونواستریپ

فاطمه قلی‌زاده[۱]، زهرا میرزایی‌زاده[۱]، فاطمه سادات امجد زنجانی[۱]، ارغوان گلبازحق[۱]، کبری امیدفر[۱*]

چکیده

مقدمه: در این مطالعه یک روش جدید ایمونواستریپ رقابتی جهت تشخیص آلبومین سرم انسان (HSA) در نمونه ادرار با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال کونژوگه با نانوذرات طلا (mAb-AuNPs) و مواد کریستالی سیال بیوکونژوگه (MCM)-41-HSA طراحی گردید.

روش‌ها: جهت تهیه ایمونواستریپ، ابتدا نانو ذرات طلا کلوئیدی با قطر متوسط ۲۰ نانومتر ساخته و بعد از اتصال به آنتی‌بادی بر روی پد کونژوگه ثابت گشته و به عنوان عامل تشخیص مورد استفاده قرار گرفتند. پس از آن، HSA به نانوذرات مزوپور MCM-41 متصل و به عنوان خط تست بر روی غشای نیتروسلولزی تثبیت شد.

یافته‌ها: در شرایط بهینه، ایمونواستریپ می‌تواند HSA را در یک طیف خطی طویل (از ۱ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و دقت تشخیص (ng/ml) شناسایی نماید. قابل اطمینان بودن روش آزمایش توسط انجام تست ایمونواستریپ با ۳۰ نمونه ادراری آزمون شد و نتایج حاصل با نتایج به دست آمده از طریق ایمونوتوربیدیمتری، مقایسه گردید. ایمونواستریپ طراحی شده بسیار حساس و برای تشخیص سریع HSA در ادرار مناسب بود.

نتیجه‌گیری: این روش جدید می‌تواند به عنوان ایمونواستریپ رقابتی مورد استفاده قرار گرفته و برای آنتی‌ژن‌ها طراحی گردد.

واژگان کلیدی: سنجش ایمونواستریپ، نانوذرات طلا، نانوذرات مزوپور، آلبومین سرم انسان، میکروآلبومینوریا.

۱- مرکز تحقیقات غدد/ پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

نشانی: تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، تلفن: ۸-۸۸۲۲۰۰۳۷-۰۲۱، نمابر: ۸۸۲۲۰۰۵۲-۰۲۱، پست الکترونیک: omidfar@tums.ac.ir

تاریخ دریافت:۹۰/۱۱/۲۶ **تاریخ درخواست اصلاح: ۹۱/۰۱/۲۶** **تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۲/۲۸**

مقدمه

در سال‌های اخیر، کاربرد زیست حسگرها در امر بهداشت جامعه ثابت گردیده است. اندازه‌گیری منظم آنالیت‌ها در نمونه‌های زیستی برای نشان دادن شرایط متابولیکی بیماران به خصوص آنهایی که در بیمارستان بستری هستند و مهمتر از آن برای بیمارانی که در بخش مراقبت‌های ویژه می‌باشند، مورد نیاز است. ارزیابی بسیاری از آنالیت‌ها بر روی ادرار انجام می‌گیرد و نمونه‌های خون برای آنالیز به آزمایشگاه پزشکی برده می‌شود که در بسیاری مواقع پس از ساعت‌ها و حتی روزها به پایان نمی‌رسد. در موارد اورژانسی، حسگرهای زیستی می‌توانند جایگزین مناسبی نسبت به روش‌های معمول آزمایشگاه باشند. حسگرهای زیستی به ابزار دقیق نیاز ندارند و همچنین یک روش سریع، حساس، اختصاصی، ارزان و آسان هستند. در این روش‌ها می‌توان نتایج را در کمتر از چند دقیقه ارزیابی کرد [۳-۱].

آلبومین سرم انسان (HSA) فراوان‌ترین پروتئین پلاسمایی است که با جرم مولکولی ۶۶ کیلو دالتون منحصراً در کبد ساخته می‌شود. در یک فرد سالم، تنها مقدار کمی از کل پروتئین دفع شده از طریق ادرار، آلبومین می‌باشد. بالاترین حد نرمال دفع آلبومین در حالت عادی، ۳۰ میلی‌گرم بر ۲۴ ساعت (۳۰mg /۲۴h) یا ۲۰ میکروگرم بر دقیقه (۲۰µg/min) است. آلبومین ادرار معمولاً از طریق روش‌های خاص مانند کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و ایمونواسی اندازه‌گیری می‌شود.

آلبومینوریا یکی از نشانه‌های بیماری کلیه است و زمانی که دفع آلبومین به درون ادرار افزایش می‌یابد رخ می‌دهد. اما توسط روش‌های متداول آزمایشگاهی مانند نوارهای تست ادرار تشخیص داده نمی‌شود. درجه آلبومینوریا در تشخیص شدت و پیش‌بینی بیماری کلیه در بیماران دیابتی و غیردیابتی و نیز در جمعیت عمومی بسیار مهم است [۴،۵].

غلظت آلبومین و قطعات آن در نمونه‌های زیستی می‌تواند با استفاده از روش‌های مختلفی مانند کروماتوگرافی و روش‌های ایمونوشیمی اندازه‌گیری شود.

HPLC، روشی است که از حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار است. با این حال، این روش وقت‌گیر بوده و برای استفاده از آن به ابزار گران و همچنین کادری مجرب نیاز است [۷-۶]. در مقایسه با HPLC، ایمونواسی روشی ساده، اختصاصی، حساس و مقرون به صرفه برای اندازه‌گیری MAU می‌باشد. روش‌های الایزا (Enzyme linked immunosorbet assay) و ایمونوتوربیدیمتری (Immunoturbidimetry) از معمول‌ترین روش‌های ایمونواسی هستند که جهت اندازه‌گیری آلبومین در نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱۰-۸].

هرچند در این روش‌ها، میزان حساسیت و اختصاصیت برای آنالیزها در حجم‌های کم بهبود یافته، با این وجود این روش‌ها به زمان طولانی برای واکنش نیاز دارند و شامل چندین مرحله هستند. همچنین روش‌های ایمونواسی به آزمایشگاه‌های مجهز با ابزار و وسایل مناسب جهت آنالیز نیاز دارد. در سال‌های اخیر، علاقه به روش‌های ایمونواستریپ جهت شناسایی سریع آنالیت‌ها به دلیل کاربرد آسان و نقطه پایانی قابل رویت افزایش یافته است. استفاده از روش ایمونواستریپ یک ابزار تشخیصی برای دسترسی آسان به حسگرهای زیستی است که در هر دو علوم بالینی و پایه مزایای کاربردی دارد [۱۳-۱۱].

از آنجایی که حساسیت سنجش ایمونواستریپ به طور قابل توجهی از الایزا کمتر است، تلاش‌هایی در جهت افزایش حساسیت این تست مانند استفاده از نانوذرات طلای کلوئیدی (AuNPs) و لیپوزوم‌ها صورت گرفته است [۱،۲،۱۲،۱۴]. در اینجا، به منظور توسعه یک روش تشخیص مناسب بر اساس این سنجش برای اندازه‌گیری سریع آنالیت‌ها در نمونه‌های زیستی، از نانوذرات طلای کلوئیدی و نانوذرات سیلیس مزوپور (MSN) استفاده شده است.

مزوپورها، دارای منافذی به اندازه ۲-۵۰ نانومتر، اندازه منافذ یکنواخت، مساحت سطح وسیع ($۱۰۰۰-۳۰۰ m^2g^{-1}$) و مقاومت مکانیکی و شیمیایی می‌باشند. در مقایسه با مواد رایج، نانوذرات مزوپور اثر بیشتری در تثبیت پروتئین دارند [۱۵،۱۶]. در این مطالعه، مواد کریستالی سیال MCM-41 که نوعی نانوذره سیلیکایی می‌باشد، جهت تثبیت آلبومین بر روی غشاء نیتروسلولزی مورد استفاده قرار گرفت. پروتئین تثبیت شده، پایداری، بهره‌وری و رنگ‌پذیری خوبی را نشان داد [۱۷،۱۸].

این فرایند توسط اتصال یک آنتی‌بادی مونوکلونال موش (mAb) بر ضد آلبومین سرم انسان (HSA) به نانوذرات طلا انجام شد. در نتیجه، نانوذرات طلا و ذرات مزوپور MCM-41 بر اساس سنجش ایمونواستریپ نه تنها توانستند حساسیت بیشتری را ایجاد کنند، بلکه همچنین توانستند غلظت آلبومین تثبیت شده بر روی غشاء نیتروسلولزی را کاهش داده و ابزاری جهت انجام تست بدون نیاز به جابجایی مواد مصرفی، سنجشی یک مرحله‌ای را ارائه می‌نماید.

روش‌ها

مواد

کلرواوریک اسید ($HauCl_4$)، RPMI 1640، سرم جنین گوساله (FCS)، استرپتومایسین، پنی‌سیلین، آلبومین سرم گاوی (BSA)، HSA، آنتی IgG موشی کنژوگه با پراکسیداز ترب کوهی (HRP)، ستون پروتئین G و سدیم سیترات که از شرکت سیگما (St.Louis, MO, USA) تهیه شدند. پلیت‌های الایزا (۹۶ خانه‌ای) و دیگر وسایل پلاستیکی از شرکت نانک (MAX-ISORP, Roskilde, Denmark) تهیه گردید. غشاءهای نیتروسلولزی، فیبرهای شیشه‌ای و پدهای جاذب از شرکت (Fairfield, Whatman NJ, USA) خریداری شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در مطالعه حاضر خالص و با کیفیت بالا بودند.

تولید و تخلیص آنتی‌بادی مونوکلونال

آلبومین mAb تولید شده توسط سلول هیبریدوما، که از ادغام سلول‌های لنفوسیت طحال موش با سلول‌های میلوما Sp2.0 به دست آمد، توسط امیدفر و همکاران توضیح داده شده است [۱۹].

هیبریدوماهای تولید شده در برابر HSA واکنش قوی نشان دادند (با استفاده از روش الایزا) و واکنش متقاطع با سایر مولکول‌های مرتبط نداشتند. در مرحله بعد آنتی‌بادی (mAb) در مقیاس وسیع تولید شد. جهت تخلیص آنتی‌بادی‌ها مایع رویی کشت سلولی از ستون کروماتوگرافی تمایلی دارای پروتئین HiTrap G (Sigma Aldrich, St. Louis MO) عبور داده شد. آنتی بادی‌های جدا شده در مقابل بافر فسفات نمکی (PBS) دیالیز شدند و توسط سانتریفیوژ، سانتریفیوژ گردیدند (Sigma,Germany).

سنتز طلای کلوئیدی

تهیه AuNPs با قطر متوسط ۲۰ نانومتر و همچنین طلای نانوکلوئیدی Ab-AuNPs بر طبق روش شرح داده شده در تحقیقات قبلی انجام شد [۱۳].

بدین منظور، ۱۰۰mL محلول تتراکلرواوریک اسید (w/v ۰/۰۱ $HAuCl_4$) حرارت داده شد تا به نقطه جوش برسد. سپس محلول سدیم سیترات ۱٪ به آن اضافه شد و بر روی استیرر قرار گرفت. رنگ محلول از زرد روشن به قرمز شرابی تغییر کرد. پس از ۸ دقیقه محلول سرد شد. pH آن توسط پتاسیم کربنات ۰/۰۱ بر روی ۸/۵ تنظیم گردید. سپس سدیم آزید ۰/۰۱٪ به آن اضافه شد و محلول حاصل در یک ظرف شیشه‌ای تیره رنگ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت چند ماه ذخیره شد. قطر نانوذرات طلا کلوئیدی (AuNPs) با میکروسکوپ الکترونی بررسی شد (JEOL1, JEM-2100).

آماده‌سازی کنژوگه آنتی‌بادی – طلای کلوئیدی

۶۰۰µg از mAb (۳۰µg/ml، در بافر فسفات، pH=۷/۲) به ۲۰ml محلول نانوذرات کلوئیدی طلا با pH تنظیم شده اضافه گردید. این مخلوط به مدت ۳ ساعت به آرامی به هم زده شد، و متعاقباً ۴ میلی‌لیتر محلول ۱۰٪ BSA به آن اضافه شد تا باقیمانده‌های نانوذرات کلوئیدی طلا بلوکه گردد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد، بعد از آن در ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۴۵ دقیقه در دمای 4^oC سه بار سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ آخر، رسوب طلا در ۲mL بافر فسفات (pH=۷/۲، ۰/۰۱M شامل ۱٪ BSA و آزید سدیم ۰/۰۵٪) حل شد، و چگالی نوری در ۵۲۰ نانومتر توسط بافر رقیق کننده بر روی ۸ تنظیم شد. این پروب طلای کلوئیدی پوشیده شده با mAb علیه HSA تا زمان استفاده در 4^oC ذخیره گردید [۱۳].

تهیه MCM-41-HSA کونژوگه

نانوذرات سیلیکا MCM-41 از آزمایشگاه الکتروشیمی دانشگاه تهران تهیه شد. MCM-41 از رشته‌های زیادی تشکیل شده است که این رشته‌ها باهم شبکه‌ای را تشکیل می‌دهند [۱۷]. ۲ میلی‌گرم از MCM-41 در ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۰۱M و pH=۷/۲) ریخته شد تا سوسپانسیونی از MCM-41 به دست آید. سپس ۲µL از ۵۰µg HSA به ۴۸µL از سوسپانسیون نانوذرات MCM-41 اضافه و یک شبانه روز در دمای ۴°C بر روی استیرر قرار داده شد تا مخلوط آنتی‌ژن /MCM-41 تشکیل شود. با استفاده از ۵۰µL از شیر خشک (skim milk) (WN)٪۳ اتصالات غیراختصاصی بلوکه شد. سرانجام محلول را در ۳۰۰۰rpm، به مدت ۲ دقیقه و در دمای ۴°C سانتریفیوژ کرده، مایع رویی را دور ریخته و رسوب سفید رنگ را در محلول بافر فسفات (pH=۷/۲، ۰/۰۱M حاوی ۰/۰۵٪ آزید سدیم) حل نموده و کونژوگه آنتی‌ژن MCM-41-HSA را در دمای ۴°C ذخیره گردید.

حساسیت روش ایمونواستریپ

نوارهای تست طراحی شده از یک پد نمونه، یک پد کونژوگه با شناساگر، یک پد جاذب و یک کاغذ نیتروسلولزی با خطوط تست و کنترل تشکیل شده است. شکل ۱، دیاگرام شماتیکی از آماده‌سازی نوارهای تست با روش ایمونواستریپ را نشان می‌دهد.

۱µL از غلظت‌های مختلف آنتی‌ژن متصل به MCM-41 (۰/۵، ۱، ۲ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و ۱mg/mL آنتی‌بادی بُزی علیه آنتی‌بادی موشی برای تولید خطوط تست و کنترل بر روی غشاء نیتروسلولزی مورد استفاده قرار گرفت. این عوامل به وسیله توزیع کننده BioJet Quanti 3000 بر روی غشاء نیتروسلولزی به صورت دو ناحیه مجزا، یکی برای کنترل و دیگری برای تست، توزیع شدند. سایر نواحی باقیمانده بر روی غشاء توسط ۱٪ BSA بلوکه شد. آنتی‌بادی تثبیت شده بر روی غشای نیتروسلولزی در دمای اتاق خشک گردید. نشانگر متصل به پد با افزودن Ab-AuNPs کلوئیدی در ۱۵ میلی‌متری پایین فیبر شیشه‌ای قرار داده و سپس در دمای ۴۵°C خشک شد. مجموعه‌ای از پد جاذب، پد کنژوگه و پد نمونه بلات شده با غشای نیتروسلولزی به عنوان نوار تست جمع‌آوری شدند. سپس نوارهایی با طول ۷۰ میلی‌متر و عرض ۵ میلی‌متر بریده شد. نوارها در یک بسته پلاستیکی همراه با ژل خشک کننده بسته‌بندی و در ۳۷°C ذخیره گردید.

ثبات آنتی‌ژن کونژوگه MCM-41-HSA و MCM-41-HSA تثبیت شده بر غشای نیتروسلولزی و آنتی‌بادی بُزی علیه آنتی‌بادی موش بعد از دو ماه در ۴۵°C و ۱ سال بعد از ذخیره کردن در دمای اتاق مورد بررسی قرار گرفت و با نمونه‌های فاقد MCM-41 مقایسه شد.

جمع‌آوری نمونه و آنالیز

نمونه‌های ادرار از ۳۰ بیمار که به مرکز غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران (EMRC) مراجعه کرده بودند، جمع‌آوری شدند. نمونه‌های ادرار در طی یک دوره ۲۴ ساعته جمع‌آوری و تا آماده شدن همه نمونه‌ها جهت بررسی در ۷۰°C- نگهداری شدند. پروتکل مورد مطالعه توسط کمیته اخلاق EMRC تصویب شد.

برای تجزیه و تحلیل، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول استاندارد یا نمونه مورد نظر بر روی پد نمونه اضافه شد. سپس شدت سیگنال توسط سیستم مستندسازی ژل (CA, Alpha Innotech Corporation, Alpha Image) اندازه‌گیری گردید و سپس اندازه‌گیری نیمه کمی آنالیت به دست آمد. سطح آلبومین در ۳۰ نمونه ادرار مختلف توسط سنجش ایمونوتوربیدیمتری اندازه‌گیری شد و نتایج با نتایج حاصل از ایمونواستریپ مقایسه گردید.

یافته‌ها و بحث

تولید و بررسی خصوصیات آنتی بادی‌ها علیه HSA

هیبریدوماهای پایدار ترشح کننده آنتی– HSA در فلاسک‌های ۵۰mL جهت تولید مقادیر زیادی از آنتی‌بادی‌های مورد نیاز کشت داده شدند. منحنی‌های استاندارد در محدوده ۱۰۰pg/ng رسم گردیدند. نتایج تخلیص تمایلی برای کلون $EMRC_1$، تمایل بالای آنتی‌بادی

را به HSA نشان داد بدون اینکه هیچ واکنش متقاطعی با دیگر پروتئین‌ها داشته باشد.

شرایط بهینه ذرات کلوئیدی طلا و MCM-41-HSA با استفاده از روش حساس ایمونواستریپ

ذرات کلوئیدی طلا توسط چگالش شیمیایی و با استفاده از احیای کلرواوریک اسید ($HAuCl_4$) سنتز شدند. کلرواوریک اسید توسط سدیم سیترات به اتم‌های طلا احیا شد و تعداد زیادی از اتم‌های طلا به صورت نانوذرات طلا انباشته شدند. شکل ۲ اندازه‌گیری قطر ذرات کلوئیدی طلا توسط UV-Vis و میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM) را نشان می‌دهد. تصاویر TEM نشان داد که ذرات کلوئیدی طلا، کیفیت لازم برای تهیه پروب را داشته و در نوار تست سیگنال قوی تولید می‌نماید.

برای اطمینان از سازگاری زیستی مطلوب سطح نیتروسلولز و کاهش جذب غیراختصاصی، MCM-41 برای تثبیت HSA بر روی غشاء انتخاب شد. MSN به عنوان نانوذره پایدار شیمیایی و حرارتی همراه با مورفولوژی و تخلخل کنترل شده معرفی گردید. یکی از معمول‌ترین انواع MSN، MCM-41 می‌باشد، که به دلیل مورفولوژی خاص آن، در تحقیقات بنیادی و کاربردی مانند تحویل دارو، عکس‌برداری و طراحی حسگرهای زیستی کاربردهای زیادی دارد. در حقیقت قطر منافذ داخلی MCM-41، ۳ نانومتر است که از رشته‌های زیادی ساخته شده است که به آن ظاهری شبکه مانند می‌دهد. پس از بسته‌بندی این رشته‌ها با همدیگر، منافذ توخالی با قطر ۵۰ نانومتر تشکیل شد که محل‌های بسیار مناسبی برای تثبیت پروتئین می‌باشند [۲۲-۲۰].

تصویر میکروسکوپ الکترونی (JEPL JSM-7000F نوع حرارتی (هیتاچی، توکیو، ژاپن)) ازMCM-41 در غیاب HSA در شکل ۳a نشان داده شده است. ساختار سختی پس از اتصال HSA ایجاد می‌شود که نشان دهنده تثبیت پروتئین می‌باشد (شکل ۳b).

مولکول‌های پروتئین می‌توانند مستقیماً توسط پیوندهای غیرکووالانسی شامل نیروی واندروالس و برهمکنش هیدروفوبیک به این سطح الصاق شوند.

با توجه به اندازه بزرگ منافذ، ساختار یکسان منافذ، سطوح بزرگ، ظرفیت بارگیری بالا و سازگاری زیستی خوب، استفاده از MCM-41 به عنوان تثبیت کننده می‌تواند تا حد زیادی اتصال مولکول‌های آنتی‌ژن را بر روی سطح افزایش دهد.

بنابراین ما MCM-41 را به عنوان یک لایه برای بهبود تثبیت مولکول‌های آنتی‌ژن عملکردی بر روی غشای نیتروسلولزی انتخاب نمودیم. به همین دلیل اولین هدف، انتخاب غلظت بهینه MCM-41 و HSA بود که بر روی سرعت و حساسیت تست ایمونواستریپ آلبومین مؤثر است. بنابراین اثر مقادیر مختلف MCM-41 (۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌گرم بر لیتر) و آلبومین تثبیت شده (۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر ماکرولیتر) بر روی آزمون ایمونواستریپ رقابتی مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه غلظت بهینه MSM و آلبومین مناسب به ترتیب ۲mg/mL و ۱μg/μL به دست آمد. در عدم حضور MCM-41 غلظت بهینه HSA در حدود ۵μg/μL بود [۲۳].

با بررسی حجم‌های مختلف Ab-AuNPs (۲μL/strip، ۳ و ۴) برای آماده‌سازی پد کونژوگه، مقدار ۴μL/strip به عنوان مقدار بهینه Ab-AuNPs کلوئیدی تعیین شد.

بر اساس پروتکل امیدفر و همکاران [۲۴،۲۵] پایداری MCM-41-HSA بر روی سطح غشاء نیتروسلولزی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که غشاء حاوی، MCM-41-HSA با غلظت ۲mg/mL MCM-41 در مقایسه با ایمونواستریپ بدون MCM-41 دو ماه در ۴۵°C و حداقل یک سال در دمای اتاق قابلیت شناسایی خود را حفظ می‌نماید.

علاوه بر این، پایداری MCM-41-HSA بیوکونژوگه نیز مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که مقاومت قابل توجهی نسبت به تخریب دارد. زیرا پس از یک ماه انکوباسیون در دمای ۴۵°C، فعالیت پروتئین تا ۹۵ درصد حفظ شد (اطلاعات نشان داده نشده است).

در تحقیق قبلی، مشاهده شد که ایمونواستریپ بدون MCM-41 دارای ۳ درصد سوکروز به مدت یک ماه در ۴۰°C و برای یک سال در دمای اتاق پایدار می‌ماند [۲۵]. علاوه براین، کارایی تثبیت آنتی ژن بر روی سطح غشاء در

حضور و غیاب MCM-41 به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مشخص کرد که کارایی تثبیت آنتی‌ژن در حدود ۲۰–۱۸ درصد بیشتر از غشاء برهنه بود. این دستاورد ثبات و کارایی بهتری را نسبت به مطالعات قبلی فراهم می‌کند. این یافته نشان می‌دهد که ماده MCM-41 بر روی سطح، نه تنها باعث بهبود در اتصال آنتی ژن می‌گردد، بلکه باعث افزایش بهره‌وری آنتی‌ژن تثبیت شده بر روی سطح شده و موجب می‌شود تا تعداد بیشتری اپی توپ کاربردی برای تشخیص Ab-AuNPs در دسترس قرار گیرد.

حساسیت، ویژگی و قابلیت اطمینان سنجش ایمونواستریپ

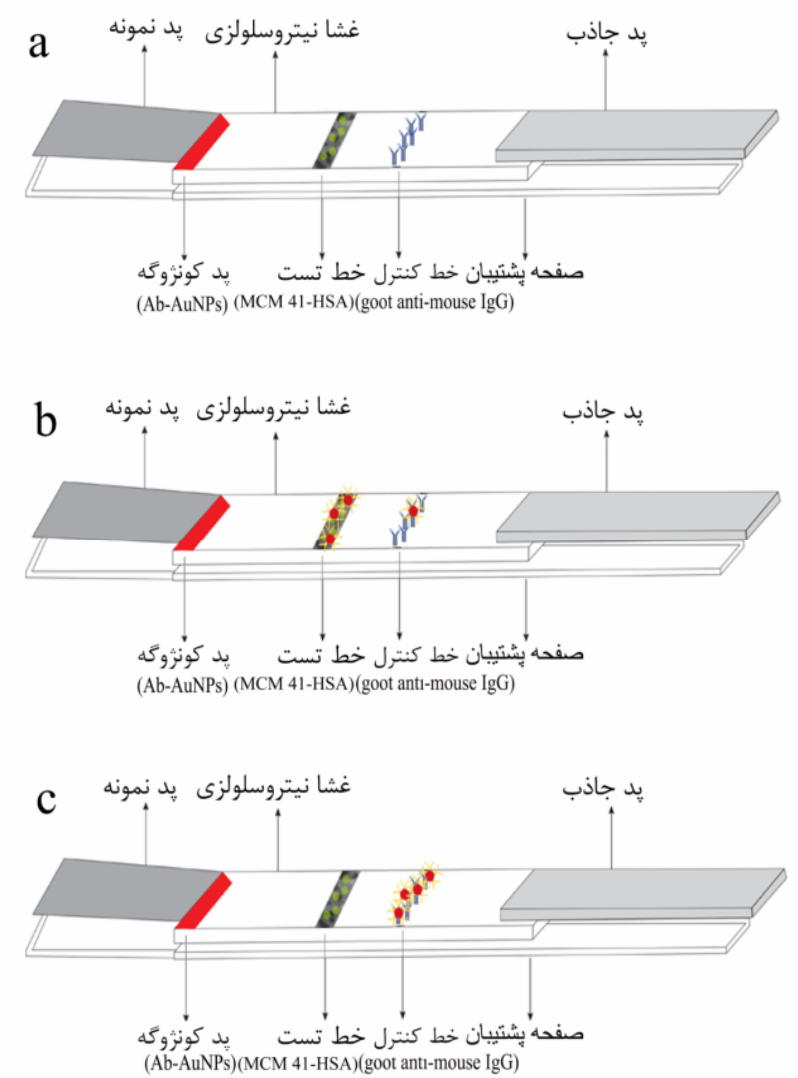
حساسیت نوار تست توسط تست نمونه‌های استاندارد HSA تعیین شده است. این استاندارد با رقیق‌سازی محلول ذخیره آلبومین (۱mg/mL) با نمونه ادرار طبیعی تهیه شد تا غلظت‌های نهایی ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۶۵، ۸۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۰۰ µg/mL) حاصل شود. سپس این نمونه‌های استاندارد برای تحلیل اندازه‌گیری نیمه کمی توسط دانسیتومتر مورد بررسی قرار گرفت.

اگر شدت رنگ خط تست تیره تر از خط کنترل بود، غلظت آلبومین کمتر از ۱۸µg/mL، اگر یک باند با شدت رنگ مشابه خط کنترل در خط تست وجود داشت، غلظت ۱۸–۲۰µg/mL و اگر شدت رنگ خط تست ضعیف‌تر از خط کنترل بود، غلظت آلبومین بیشتر از ۲۵–۳۰µg/mL در نظر گرفته می‌شود. علاوه بر این، در غلظت بیش از ۲۰۰µg/mL هیچ باندی در خط تست مشاهده نمی‌شود (شکل ۴).

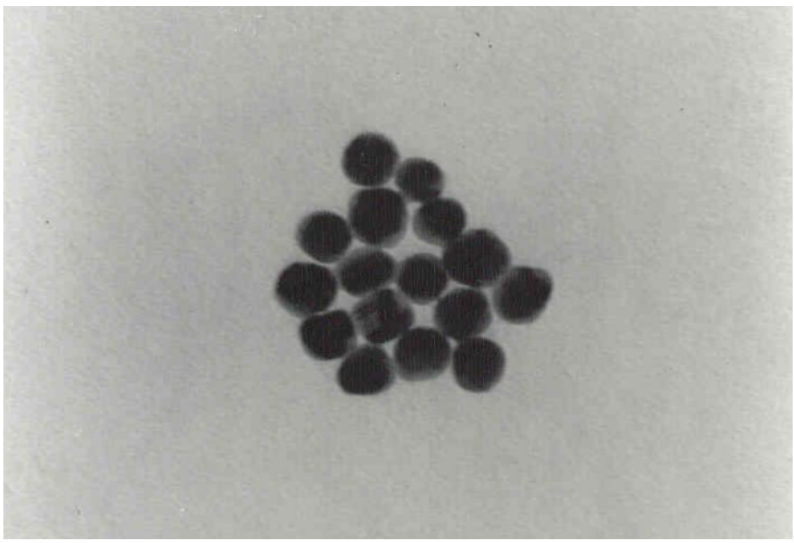
در تست ایمونواستریپ حاضر در مقایسه با ایمونواستریپ فاقد MCM-41 میزان حساسیت تا حد زیادی بیشتر بود. به طوری که در ایمونواستریپ مذکور حد تشخیص تست ۱۰۰ng/mL به دست آمد که در مقایسه با دیگر نوارهای تجاری و مطالعه گذشته [۱۳،۲۳] حساسیت بالاتری داشت. شدت تداخلات با داروهای رایج و انواع پروتئین‌های انسانی با استفاده از دو نمونه ادرار حاوی سطوح منفی و مثبت از میکروآلبومینوریا مورد ارزیابی قرار گرفت. اثر مواد مداخله کننده با افزودن ۲۰mg/dL استامینوفن، آمپی‌سیلین، تتراسیکلین، ۲g/dL D– گلوکز، ۱mg/dL هموگلوبین، ۰/۲mg/dL L–α– اسید گلیکوپروتئین، ۰/۲۲g/dL β– هیدروکسی بوتیریک اسید، ۰/۱g/dL اوریک اسید، ۱۰g/dL اوره، ۴۰۰۰U/L α– آمیلاز، ۰/۰۱۲g/dL L– α– آنتی‌تریپسین، ۱۰mg/dL، ۴۰۰mg/dL سیکلیک اسید و استیل سالسیلیک اسید به نمونه‌های ادرار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که هیچ یک از مواد بالا با نتایج حاصل از کیت نیمه کمی تست میکروآلبومینوریا تداخل نداشتند. قابلیت اطمینان نوار تست توسط انجام تست ایمونواستریپ حاضر با ۳۰ نمونه ادرار ناشناخته ارزیابی شد و نتایج حاصل با نتایج به دست آمده از روش‌های ایمونواستریپ بدون MCM-41 وسنجش ایمونوتوربیدیمتری مقایسه شد (جدول ۱).

ایمونواستریپ پیشنهادی در مقایسه با ایمونواستریپ بدون MCM-41 تطابق بیشتری با روش ایمونوتوربیدیمتری دارد.

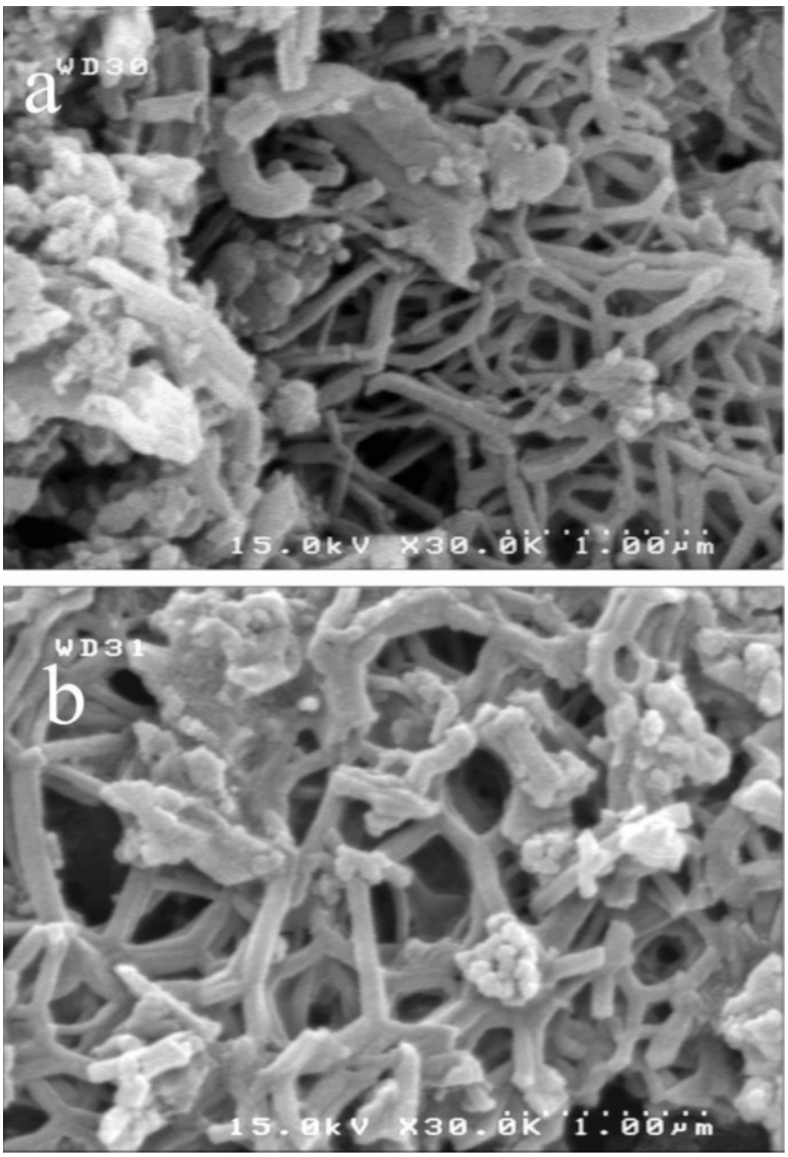
نوارهای تست هیچ واکنش متقاطعی با دیگر پروتئین‌های انسانی در طیف‌های زیستی نشان نداد. علاوه براین، درحضور پروتئین‌های متنوع انسانی و داروهای رایج و همچنین مواد دیگر که احتمالاً در ادرار وجود دارد، هیچ تداخلی در تشخیص آلبومین مشاهده نشد. این نتایج پیشنهاد می‌کند که سنجش ایمونواستریپ، ساده، قابل اطمینان و اختصاصی بودن بالا برای تشخیص آلبومین ادرار در طیف MAU است. همچنین با توجه به حساسیت و اختصاصی بودن بالای این سیستم ارائه شده می‌توان از آن در طراحی ایمونوسنسور جهت آنالیت‌های بیماری‌زا و غیر بیماری زا دیگر استفاده کرد.



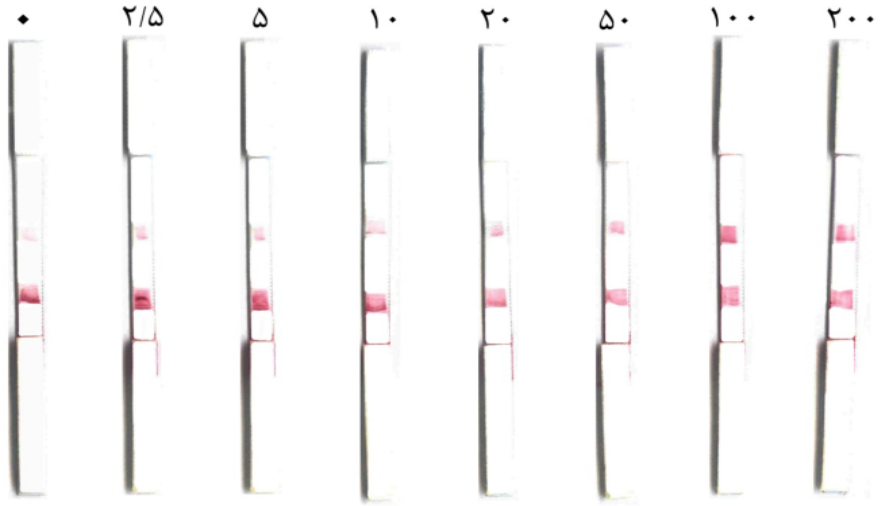
شکل ۱- طرح شماتیک عملکرد تست ایمونواستریپ رقابتی مستقیم برای تشخیص آلبومین ادرار (a) نوار تست شامل اجزا مختلف مانند پد نمونه، پد کونژوگه ردیاب، پد جاذب و یک غشاء نیتروسلولزی با خط های تست و کنترل، (b) آلبومین ادرار <۲۰ µg/mL- ۱۸، (c) آلبومین ادرار>۲۰۰ µg/mL.



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی (TEM) از طلای کلوئیدی. قطر ذرات ۲۰ نانومتر می‌باشد.



شکل ۳- تصاویر SEM از تست ایمونواستریپ a) MCM-41، b) MCM-41-HSA.



شکل ۴- نتایج استانداردها با غلظت‌های مختلف HSA در ادرار [(۱) ۰µg/mL؛ (۲) ۲/۵µg/mL؛ (۳) ۵µg/mL؛ (۴) ۱۰µg/mL؛ (۵) ۲۰µg/mL؛ (۶) ۵۰µg/mL؛ (۷) ۱۰۰µg/mL و ۲۰۰µg/mL]. غلظت پروتئین کوت کننده برای خط تست و خط کنترل ۱µg/µl می‌باشد.

جدول ۱- تعیین آلبومین ادرار به وسیله ایمونوتوربیدیمتری و تست ایمونواستریپ در حضور و غیاب MCM-41. همه نتایج بلافاصله ۱۰ دقیقه بعد از آزمون ثبت شد. داده ها دارای سه تکرار است.

نوع سنجش	تعداد کل	طبیعی	میکروآلبومینوریا (۲۰-۲۰۰mg/L)	ماکروآلبومینوریا (>۲۰۰mg/L)
ایمونوتوربیدیمتری	۳۰	۱۰	۱۸	۲
تست ایمونواستریپ بدون MCM-41	۳۰	۱۰	۱۶	۲
تست ایمونواستریپ همراه با MCM-41	۳۰	۱۰	۱۸	۲

غلظت آلبومین کمتر از ۲۰mg/L= طبیعی

غلظت آلبومین در محدوده ۲۰۰mg/L-۲۰= میکروآلبومینوریا

غلظت آلبومین بالاتر از ۲۰۰mg/L= ماکروآلبومینوریا یا آلبومینوریا بالینی

نمونه های ادرار با غلظت برابر یا بیشتر از ۱۸۰mg/L رقیق می‌گردند.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است. محققان از جناب آقای دکتر محمدرضا گنجعلی (آزمایشگاه الکتروشیمی دانشگاه تهران) که در انجام این پژوهش همکاری کردند، صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

مأخذ

1. Tanaka R, Yuhi,T,Nagatani N, Endo,T Kerman,K Takamura,Y Tamiya E. A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles. *Anal Bioanal Chem* 2006; 385: 1414-1420.
2. Nagatani N, Yuhi,T, chikaae M, Kerman K, Endo T, Kobori Y, Takata M, Konaka H, Namiki M, Ushijima H, Yazuru T, Tamiya E. A sensitive immnochromatography assay using gold Nanoparticles for semiquantitative detection of prostate specific antigen in serum. *Nanobiotechnology* 2006; 2: 79-86.
3. Yang M, Li H, Javadi A, Gong S. Multifunctional mesoporous silica nanoparticles as labels for the preparation of ultrasensitive electrochemical immunosensors. *Biomaterials* 2010; 31: 3281–3286
4. Matheson A, Willcox M.D.P, Flanagan J, Walsh B.J. Urinary biomarkers involved in type 2 diabetes:a review. *Diabetes Metab Res Rev* 2010; 26: 150-171.
5. Romundstad S, Holmen J, Hallan H, Kvenild K, Kruger Q, Midthjell K .Microalbuminuria, cardiovascular disease and risk factors in a nondiabetic nonhypertensive population. *J Intern Med* 2002; 252:164-172.
6. John H. Contois, Celia Hartigan, Lokinendi V. Rao, L. Michael Snyder, Michael J. Thompson. Analytical validation of an HPLC assay for urinary albumin. *Clinica Chimica Acta* 2006; 367: 150-155.
7. Hoffmann M.M., Bugert P, Seelhorst U, Wellnitz B, Winkelmann B.R., Boehm B.O., Ma¨rz W. A liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantification of urinary albumin using a novel 15N-isotopically labeled albumin internal standard. *Clinical Chemistry* 2007; 53: 540-542
8. Shaikh A, Seegmiller J.C, Borland T.M, Burns B.E, Ladwig P.M, Singh R.J, Kumar. R, Larson T.S, and Lieske J.C. Comparison between immunoturbidimetry, size-Exclusion chromato-graphy, and LC-MS to quantify urinary albumin. *Clinical Chemistry* 2008; 54:9 1504-1510.
9. Choi S, Choi EY, Kim HS, Oh SW. One-site quantification of human urinary albumin by a fluorescence immunoassay. *Clin Chem* 2004; 50: 1052–1055.
10. Brinkman JW, Bakker SJ, Gansevoort RT, Hillege HL, Kema IP, Gans RO, de Jong PE, and de Zeeuw D. Which method for quantifying urinary albumin excretion gives what outcome? A comparison of immunonephelometry with HPLC. *Kidney Int Suppl* 2004; 92: S69–75.
11. Gandhi S, Caplash. N, Sharma.P, Suri.C.R. Strip-based immunochromatographic assay using specific egg yolk antibodies for rapid detection of morphine in urine samples. *Biosensors and Bioelectronics* 2009; 25: 502– 505.
12. Tang D, Sauceda JC, Lin. Z, Ott.S, Basova.E, Goryacheva.II, Biselli.S, Lin.J, Niessner.R, Knopp. D. Magnetic nanogold microspheres-based lateral- Flow immunodipstick for rapid detection of aflatoxin B2 in food. *Biosensors and Bioelectronics* 2009; 25: 514–518
13. Omidfar.K, Kia.S, Kashanian S, Paknejad.M, Besharatie.A, Kashanian.S, Larijani.B. Colloidal nanogold-based immunochromatographic strip test for the detection of digoxin toxicity. *Appl Biochem Biotechnol* 2010; 160(3): 843-55.

14. Ho J.A, Zeng S.C, Tseng W.H, Lin Y.J, Chen C. Liposome-based immunostrip for the rapid detection of Salmonella. *Anal Bioanal Chem* 2008; 391:479-485
15. Itoh T, Ishii R, Matsuura S, Mizuguchi J, amakawa S, Hanaoka T, Tsunoda T, Mizukami F. Enhancement in thermal stability and resistance to denaturants of lipase encapsulated in mesoporous silica with alkyltrimethyla-mmonium (CTAB). Colloids and Surfaces B: *Biointerfaces* 2010; 75: 478–482
16. Lina Jiehua, Hea C, Zhanga SImmunoassay channels for α fetoprotein based on encapsulation of biorecognition molecules into SBA-15 mesopores. *Analytica Chimica Acta* 2009; 643: 90-94
17. Ganjali M.R, Asgari M, Faridbod F, Norouzi P, Badiei A, Gholami J. Thiomorpholine-functionalized nanoporous mesopore as a sensing material for Cd2+ carbon paste electrode. *J Solid State Electrochem* 2010; 14:1359-1366
18. Dong X, Wu R, Dong J, Wu M, Zhu Y, Zou H. A mesoporous silica nanoparticles immobilized open-tubular capillary column with a coating of cellulose tris (3,5- dimethylphenyl carbamate) forenantioseparation in CEC. *Electrophoresis* 2008; 29: 3933-3940
19. Omidfar K, Kashanian S, Paknejad M, Kashanian S, Larijani.B, Roshanfekr.H. Production and characterization of monoclonal antibody against human serum albumin. *Hybridoma* 2007; 26: 217-222.
20. Trewyn B.G, Giri S, Slowing I.I, Lin V.S.Y. (2007) Mesoporous silica nanoparticle based controlled release, drug delivery, and biosensor systems Chem. *Commun* 2007; 3236–3245
21. Li,Y, Zenga X, Liua X, Liub X, Weia W, Luoa S. Direct electrochemistry and electrocatalytic properties of hemoglobin immobilized on a carbon ionic liquid electrode modified with mesoporous molecular sieve MCM-41. Colloids and Surfaces B: *Biointerfaces* 2010; 79: 241-245.
22. Lin H.P, Cheng S, and Mou C.Y. Mesoporous molecular sieves MCM-41 with a hollow tubular morphology. *Chem Mater* 1998; 10; 581-589.
23. Omidfar.K, Kia S, Larijani B. Development of a colloidal gold-based. immunochromatographic test strip for the screening of microalbuminuria. *Hybridoma* 2011; in press.
24. Omidfar.K, Rasaee MJ, Zaraee AB, Amir MP, Rahbarizadeh F. Stabilization of penicillinase-hapten conjugate for enzyme immunoassay. *J Immunoassay Immunochemistry* 2002; 23: 385-398.
25. Omidfar K, Rasaee MJ, Kashanian S, Paknejad M, Bathaie Z. Studies of thermostability in Camelus bactrianus (Bactrian camel) single-domain antibody specific for the mutant epidermal-growth-factor receptor expressed by Pichia. *Biotechnol Appl Biochem* 2007;46: 41-49.