تولید و تخلیص آنتی‌بادی پلی‌کلونال بر علیه هورمون ملاتونین

کوروش فولادساز، مربی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
دکتر محمدجواد رسائی، دانشیار دانشگاه تربیت مدرس
دکتر محمد انصاری، استادیار دانشگاه علوم پزشکی

Production and Purfirication of Polyclonal Antibody Against Melatonin Hormone

ABSTRACT

Nowadays immunochemical techniques have played a very important and valuable role in quantitative and qualitative assays of liquid compounds of the body.

Producing antibody against immunogenes is the first step to make immunochemical kits. In this study production and purification of polyclonal antibody against melatonin has been considered.

This hormone which has several important functions in physiological conditions such as migraine, cirrhosis, mammary gland cancer and other diseases, is the most important pineal gland secretion.

This gland is a circumventricular organ of brain and according to histological and anatomical studies, it is a high secretory organ, that secretes active biological substances like melatonin, oxytocin, serotonin and etc.

In this study, melatonin has been considered as hapten and has become an immunogen by being linked to the bovine serum Albumin. Then, by the immunization of three white New Zeland rabbits that had the booster injections in regular intervals, the antibody titer was detected to be 1/2000, by using checkboard curves, and with the use of melatonin linked to penicillinase as a labelled antigen, the titer was detected 1/200.

Finally an antibody with high purification rate has been obtained, which can be used in immunochemical assays like RIA, ELISA, and EIA.

Key Words: Pineal gland; Melatonin; Checkerboard; Penicillinase; EIA

چکیده

در حال حاضر تکنیک‌های ایمونوشیمی نقش بسیار مهم و ارزنده‌ای در سنجش‌های کیفی و کمی ترکیبات مایعات بدن ایفا نموده و تهیه آنتی‌بادی علیه ایمونوژن‌ها، اولین گام در تهیه کیتهای ایمونوشیمی می‌باشد. در این مطالعه تولید و تخلیص آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه هورمون ملاتونین بررسی شده است. این هورمون وظایف متعدد و مهمی در حالت‌های فیزیولوژیک و پاتولوژیک از جمله در بیماری میگرن، سیروز و سرطان سینه و غیره دارا بوده و از مهمترین ترشحات غدهٔ پینه‌آل می‌باشد. این غده، ارگانی دور بطنی مغز بوده و طبق مطالعات هیستولوژیک و آناتومیک، ارگانی ترشحی می‌باشد و مواد فعال بیولوژیکی مانند ملاتونین، اکسی‌توسین، سروتونین و غیره را ترشح می‌کند. در این مطالعه هورمون ملاتونین به عنوان هاپتن در نظر گرفته شده و با اتصال آن به آلبومین سرم گاوی به صورت ایمونوژن درآمده سپس با ایمونویزاسیون سه خرگوش سفید نیوزلندی و تزریقات بوستر در فواصل منظم تیتر آنتی‌بادی با استفاده از منحنی‌های چکربورد (Checkerboard) مشخص گردید که تیتر آنتی‌بادی $\frac{1}{2000}$ می‌باشد. با استفاده از ملاتونین متصل به آنزیم پنی‌سیلیناز به عنوان آنتی‌ژن نشان‌دار، تیتر آنتی‌ژن نشاندار $\frac{1}{200}$ بدست آمد. در نهایت آنتی‌بادی با درجه خلوص بسیار زیاد به دست آمد که در سنجش‌های ایمونوشیمیایی مانند ELISA, RIA و EIA می‌تواند

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-28]

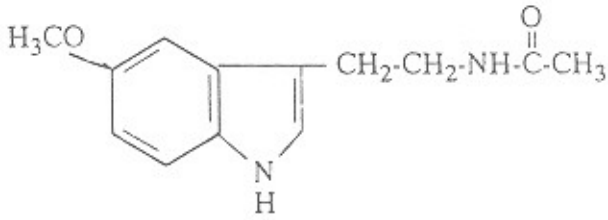
مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی : غدهٔ پینه‌آل؛ ملاتونین؛ پنی‌سیلیناز؛ چکربورد؛ EIA

مقدمه

غدهٔ صنوبری (Pineal gland) ارگانی نوروآندوکرینی با وزن ۱۵۰ میلی‌گرم و طول یک سانتی‌متر از منشأ نورواکتودرم می‌باشد. این غده توسط اکسونهای سمپاتیک و نیز اکسونهایی که مستقیماً از مغز می‌آیند، عصب‌دهی می‌شود(۲،۱). محصولات ترشحی این غده تعدادی نوروترانسمیتر یا پپتید همچون سروتونین، TRH، نوروپپتید Y، سوماتواستاتین، وازوپرسین و غیره بوده و مهمترین محصول ترشحی آن، ملاتونین می‌باشد(۱-۴). ملاتونین طی چندین مرحله آنزیمی از اسید آمینهٔ تریپتوفان سنتز شده و ساختمان شیمیایی این هورمون حدود ۴۰ سال پیش توسط Lerner et al شناخته شد(۵) (شکل ۱).

شکل ۱ـ ساختمان شیمیایی ملاتونین



این هورمون بعنوان پاک‌کنندهٔ (Scavenger) رادیکالهای آزاد سمی و هورمون جوانی (Anti-aging) و ضداسترس می‌باشد و دارای اثرات آنتی‌اکسیدانتی و تنظیم‌کنندهٔ سیستم ایمنی بدن عمل می‌نماید(۸-۶). ملاتونین اثرات مهمی روی سیستم خواب، بیداری و نیز روی فعالیت گونادهای جنسی دارد(۱۰-۹). هورمون بعنوان ساعت بیولوژیک دارای ریتم شبانه‌روزی بوده و در تعداد زیادی از بیماریها، همچون میگرن و سرطان پستان تغییرات مشخصی ایجاد نموده که در بررسی سیر این بیماریها بعنوان شاخص استفاده می‌شود(۱۲،۱۱).

تهیه و تخلیص آنتی‌بادی علیه این هورمون می‌تواند در طراحی روشهای سنجش ایمنوشیمیایی مانند RIA، ELISA و EIA مورد استفاده قرار گرفته و بدین وسیله روشی مناسب در بررسی سیر بیماران میگرنی و مبتلایان به سرطان سینه مورد استفاده باشد.

روش و مواد

موارد مورد استفاده : ملاتونین، سرم آلبومین گاوی (BSA)، دیوکسان، سدیم آزید، پلی‌اتیلن گلیکول (PEG-8000)، پنی‌سیلین V، نشاسته، ید، ژلاتین، Carbodiimide (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl سولفات آمونیوم ۴۰٪، سالین، آدجوانت فروند کامل، آدجوانت فروند ناکامل، DEAE-Cellulose ، پنی‌سیلیناز، فسفات منوسدیک، فسفات دی‌سدیک، سدیم کلراید، گزیلن، آنتی‌بادی ثانویه.

تهیه ایمنوژن (Immunogen) (روش کربودی‌ایمید)

هورمون ملاتونین به تنهایی بدلیل وزن مولکولی کم نمی‌تواند سیستم ایمنی را تحریک نموده و بایستی که به ملکول بزرگی مانند BSA متصل یا کونژوگه شود که برای این منظور روش زیر بکار گرفته شد.

روش کربودی‌ایمید (Carbodiimide method)(۱۳) :

الف) ده میلی‌گرم از ملاتونین در یک میلی‌لیتر حلال دیوکسان (حداقل حجم) حل شد.

ب) ده میلی‌گرم HSA را پس از توزین در ۰/۷ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار pH = ۷/۸ حل شد.

ج) سپس به مخلوط مرحله ب، بطور خیلی آرام و در زیر هود، مخلوط الف اضافه گردید.

د) به مخلوط مرحله ج، ۰/۵ میلی‌لیتر EDC (۶۷ میلی‌گرم در ۲/۵ میلی‌لیتر آب) که بایستی تازه تهیه شود، اضافه شد.

هـ) مخلوط حاصله، به مدت ۲۴ ساعت در حرارت $24^{\circ}C$ در جای تاریک قرار داده شد.

و) محلول حاصله به مدت ۳ روز متوالی در دمای $4^{\circ}C$ در کیسه دیالیز که بر روی همزن مگنت‌دار قرار داشت، توسط آب مقطر دیالیز شد و مضافاً اینکه آب مقطر داخل ظرف دیالیز هر ۶ ساعت تعویض شد.

ز) پس از خاتمه دیالیز، محلول داخل کیسهٔ دیالیز توسط Lyophilize خشک شد که پودر بدست آمده بعنوان ایمنوژن مورد استفاده قرار داده شد.

محاسبه تعداد ملاتونین متصل به BSA

با اندازه‌گیری جذب نوری در ۲۸۰ نانومتر و برطبق روش Grota و همکاران(۱۴) قابل محاسبه می‌باشد که بطریقه زیر است:

از هر کدام از مواد زیر محلول ۰/۵ میلی‌گرم (۵۰۰ میکروگرم) را تهیه نموده و به هر کدام ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات pH = ۷/۸، ۰/۵M اضافه و حل می‌نماییم.

الف ـ ملاتونین، ب ـ کونژوگه ملاتونین ـ BSA، ج ـ BSA.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-28]

در محدودهٔ طول موجهای ۲۲۰-۳۲۰ نانومتر (نانومتر ۲۸۰ = λmax) و نیز محدوده جذب نوری (OD) تا ۰/۸، منحنی‌های مربوطه را ترسیم نموده و از اختلاف جذب نوری ایمنوژن (ملاتونین ـ BSA) و BSA در ۲۸۰ نانومتر که مربوط به جذب نوری ملاتونین متصل به BSA است استفاده می‌کنیم.

روش ایمونیزاسیون

سه رأس خرگوش نیوزیلندی سفید نر سه ماهه توسط روش Vaitukaitis(۱۵) با ایمنوژن تهیه شده، ایمونیزه شدند. پس از کوتاه کردن موهای ناحیهٔ پشت خرگوشها، تزریق زیرپوستی (Subcutaneous) ایمنوژن در ۲۰ ناحیه پشت خرگوش انجام شد.

در این روش مقدار ۵۰۰ میکروگرم (۰/۵ میلی‌گرم) ایمنوژن را به ازاء هر خرگوش با حجم‌های مساوی سرم فیزیولوژی و آدجوانت فروند کامل (۱ ml) از هر کدام مخلوط نموده و مخلوط کردن را ادامه داده تا بصورت خمیری شکل در آید. یک ماه پس از تزریق اول، مقدار ۲۵۰ میکروگرم ایمنوژن امولسیفیه شده در حجم‌های مساوی سرم فیزیولوژی و آدجوانت فروند ناکامل را به عضلات ران (IM) هر دو پای خرگوش تزریق می‌کنیم (بوستر اول) و این تزریقات بوستر هر ۱۵ روز یک بار تکرار می‌شود.

خونگیری از خرگوشها و تهیه سرم

دو ماه و ۷ روز پس از اولین تزریق، از رگهای مارژینال (رگ کناری) گوش خرگوش خونگیری انجام شد. ابتدا توسط گزیلول پشت گوش را آغشته نموده (تحریک رگ) و پس از ضدعفونی نمودن با الکل ۷۰ درجه، توسط یک تیغ تیز آماده، برشی کوچک ایجاد می‌شود تا خون بدون ایجاد همولیز جاری شده و در داخل بشر کوچکی جمع‌آوری شود. پس از خونگیری، خون را به مدت ۲۴ ساعت در $4^{\circ}c$ قرار داده آنگاه توسط سانتریفوژ با دور ۴۰۰۰RPM سرم را جدا نموده و در شرایط فریز ($-20^{\circ}c$) نگهداری شد.

سنتز ملاتونین نشان‌دار شده با آنزیم پنی‌سیلیناز

در این روش کونژوگه نمودن ملاتونین به پنی‌سیلیناز به همان روش کربو دی‌ایمید (EDC) می‌باشد و با توجه به نسبت ملاتونین به آنزیم که می‌بایستی ۱۰ به ۱ باشد مقادیر مورد نیاز محاسبه شدند.

الف) ۱۰ میکروگرم ملاتونین پس از توزین دقیق در ۰/۵ میلی‌لیتر دیوکسان حل شد.

ب) ۲۰۰ میکروگرم آنزیم پنی‌سیلیناز (۵۰٪ پروتئین) را پس از توزین در یک میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ M ، pH = ۷/۸ حل شد.

ج) به مخلوط مرحله الف به آرامی (قطره‌قطره) محلول آنزیم افزوده شد.

د) ۱۰ میکروگرم EDC حل شده در ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر، به مخلوط قبلی افزوده و به مدت ۲۴ ساعت در $4^{\circ}c$ قرار داده شد.

هـ) سپس محصول واکنش به مدت ۲۴ ساعت با آب مقطر با چهار بار تعویض آب مقطر دیالیز شد.

و) به محلول دیالیز شده، مقدار کمی پودر BSA و مقدار کمی سدیم آزید اضافه شد و پس از تقسیم نمودن در حجم‌های کوچک ۳۰ میکرولیتری در شرایط $-70^{\circ}c$ نگهداری شد. برای اثبات وجود آنزیم در مرحلهٔ بعد از دیالیز، از معرف ید ـ نشاسته (کروموژن) و سوبسترای پنی‌سیلین V استفاده شد که بصورت زیر می‌باشد: ۲۵ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی را برداشته و به آن ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا (۲/۸ میلی‌گرم سوبسترا در ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات pH = ۷/۲) و ۱ میلی‌لیتر معرف ید ـ نشاسته افزوده شد که بی‌رنگ شدن معرف در مدت زمان یک دقیقه نشان‌دهنده وجود آنزیم در نمونه است.

سپس جهت اثبات کونژوگه شدن آنزیم به ملاتونین از منحنی چکربورد (Checkerboard) استفاده شد که توضیح داده خواهد شد.

تعیین تیتر آنتی‌بادی بدست آمده با روش EIA (با استفاده از منحنی‌های چکربورد)

تیتر آنتی‌بادی با انکوباسیون رقت‌های متوالی آنتی‌بادی با رقتهای متوالی آنتی‌ژن متصل به آنزیم پنی‌سیلیناز (آنتی‌ژن نشاندار) در حجم ثابت نهایی و مدت زمان مشخص و پس از جداسازی آنتی‌ژن آزاد از آنتی‌ژن نشاندار بدست می‌آید.

الف) رقت‌های سریالی کونژوگه آنزیم، ملاتونین در بافر PBS (pH = ۷/۴) تهیه شد تا اینکه رقتهای $\frac{1}{100}$ ، $\frac{1}{200}$ ، $\frac{1}{400}$ ، $\frac{1}{800}$ بدست آید. همچنین رقتهای $\frac{1}{250}$ ، $\frac{1}{500}$ ، $\frac{1}{1000}$ ، $\frac{1}{2000}$ ازآنتی‌بادی در بافر NRS دار ($\frac{1}{300}$) تهیه شد.

ب) ۳۲ لوله آزمایش کوچک و تمیز در جالوله‌ای آماده گردید و از هر رقت آنتی‌بادی بافر فسفات ـ سالی (PBS) و سرم طبیعی خرگوش (NRS) و آنزیم ـ ملاتونین (tracer) بصورت دوپلیکت (Duplicate) در داخل لوله‌ها بصورت شکل زیر ریخته شد.

لوله‌های پیوند غیرویژه (NSB) ← ۱۰۰ میکرولیتر سرم خرگوش نرمال (NRS) با رقت $\frac{1}{300}$ می‌باشد. و سپس طبق جدول زیر عمل گردید:

رقت‌های مختلف سرم حاوی آنتی‌ژن (۱۰۰ میکرولیتر)

لوله NSB	لوله ۱	لوله ۲	لوله ۳	لوله ۴
رقت $\frac{1}{250}$				
رقت $\frac{1}{500}$				
رقت $\frac{1}{1000}$				
رقت $\frac{1}{2000}$				
	رقت $\frac{1}{100}$	رقت $\frac{1}{200}$	رقت $\frac{1}{400}$	رقت $\frac{1}{800}$
	رقت‌های مختلف آنتی‌ژن نشاندار (۱۰۰ میکرولیتر)			

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-28]

ج) ۲۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی ثانویه (که با تزریق گاماگلوبولینهای خالص تهیه شده از خرگوش نرمال تزریق آنها به بز و سپس خونگیری از بز و جداکردن سرم آن تهیه می‌شود) که در بافر EIA که شامل ۴٪ پلی‌اتیلن گلیکول ۸۰۰۰ تهیه شده است به تمام لوله‌ها اضافه شده و آنها به مدت ۲۰ ساعت در دمای $4^{\circ}c$ قرار داده شد.

د) پس از مرحله انکوباسیون، به هر لوله ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات، سالین سرد افزوده و در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در $4^{\circ}c$ (سانتریفوژ یخچال‌دار استفاده شد) سانتریفوژ شده و محلول رویی را دور ریخته و روی رسوب باقیمانده، مجدداً ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات، سالین سرد افزوده و سانتریفوژ می‌شوند. این مرحله شستشو ۴-۳ مرتبه تکرار شده و در انتهای شستشو، دیوارهٔ داخلی لوله‌ها توسط کاغذ صافی کاملاً خشک شد.

هـ) ۲۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا بافر فسفات ۰/۲ مولار با (pH = ۷/۲) به تمام لوله‌ها اضافه شد. سپس همه لوله‌ها به مدت یک ساعت در انکوباتور $37^{\circ}c$ قرار داده می‌شوند تا واکنش آنزیمی کاملاً انجام گیرد.

و) به هر لوله ۱ میلی‌لیتر معرف ید، نشاسته (کروموژن) اضافه شد و در انکوباتور $37^{\circ}c$ قرار داده و بعد از ۱۵ دقیقه، جهت توقف واکنش آنزیمی، به هر لوله ۰/۵ میلی‌لیتر HCl (۵ نرمال) افزوده و در طول موج ۶۲۰ نانومتر جذب‌های نوری قرائت شد و منحنی‌های چکربورد رسم گردید.

تخلیص و جداسازی آنتی‌بادی علیه ملاتونین

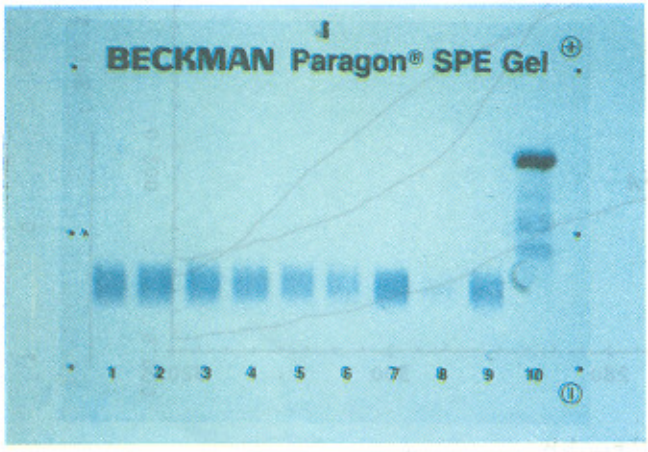
الف) رسوب گاماگلبولینها توسط سولفات آمونیوم (۳۸٪): ۲/۲۹ گرم سولفات آمونیوم به ازای ۱۰ میلی‌لیتر سرم خرگوش تهیه شد.

ب) سرم را داخل بشری کوچک ریخته و روی دستگاه همزن قرار دادیم، اطراف بشر می‌بایستی توسط خرده‌های یخ احاطه شود و سپس سولفات آمونیوم فوق را خیلی آرام روی سرم اضافه شد. پس از خاتمه افزودن سولفات آمونیوم، بشر را در روی همزن مگنت‌دار به مدت ۱/۵ ساعت در دمای $4^{\circ}c$ قرار دادیم.

ج) در این مرحله محلول در ۳۴۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب را از محلول بالایی جدا نموده و در حداقل حجم (۱/۵ میلی‌لیتر) بافر فسفات pH = ۶/۳، ۱۷ mM حل کرده و درکیسه دیالیز به مدت ۲۴ ساعت در دمای $4^{\circ}c$ با سه مرتبه تعویض با بافر فسفات فوق، عمل دیالیز انجام شد. سپس محلول درون کیسه دیالیز روی ستون کروماتوگرافی (۲ cm × ۲۰ cm) DEAE-cellulose (که قبلاً با بافر فسفات فوق به تعادل رسیده است) ریخته شد. تعداد ۴۰ فراکشن (حجم هر فراکشن ۱/۵ میلی‌لیتر) جمع‌آوری شد. نکته مهم اینکه پس از به تعادل رسیدن ستون، جذب نوری محلول خارج شونده در طول موج ۲۸۰ نانومتر بایستی صفر شود.

پس از جمع‌آوری فراکشنها، مقدار جذب نور در ۲۸۰ نانومتر قرائت شده و فراکشنهایی که جذب نوری آنها از یک بیشتر است (فراکشنهای ۱۳-۲۸) انتخاب می‌شوند و از هر یک از فراکشنهای فوق بطور جداگانه الکتروفورز استات سلولز انجام شد. اگر در این مرحله ناخالصی باقی مانده باشد مرحله کروماتوگرافی تعویض یونی مجدداً تکرار شود و گاماگلوبولین تهیه شده، لیوفیلیزه شده و به صورت پودر تهیه می‌شود. پس از توزین به ازای هر ۱۰ میلی‌لیتر سرم خرگوش، ۵۰ میلی‌گرم گاماگلبولین بدست آمد که در شرایط $4^{\circ}c$ قابل نگهداری است (شکل ۲).

شکل ۲ـ الکتروفورز استات سلولز



۱-۹ـ فراکشنهای مختلف گاماگلبولین تخلیص شده

۱۰ ـ سرم طبیعی خرگوش

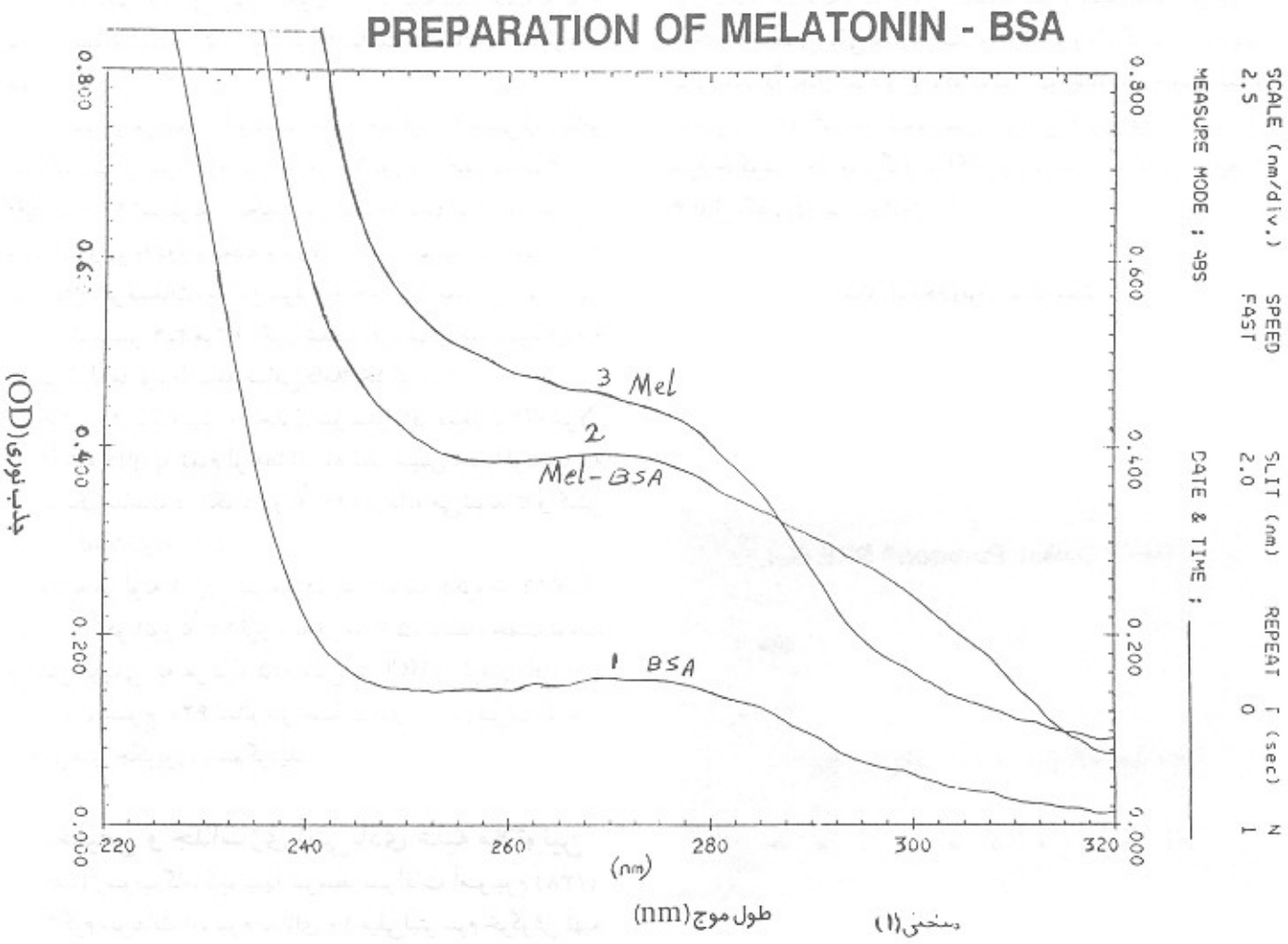
یافته‌ها

توانایی سیستم ایمنی برای پاسخ‌دهی به یک ایمنوژن (ملکول خارجی) به اندازه مولکول آنتی‌ژن بستگی زیادی دارد و موادی با وزن مولکولی کمتر از ۱۰۰۰۰ دالتون معمولاً آنتی‌ژن نیستند. ملاتونین با وزن مولکولی ۲۳۲ (کمتر از ۵۰۰) به تنهایی قادر به ایجاد پاسخ ایمنی و تولید آنتی‌بادی نبوده بایستی ملاتونین به مولکولهای بزرگ مانند آلبومین و تیروگلبولین متصل شده تا توانایی ایجاد پاسخ ایمنی و تولید آنتی‌بادی را داشته باشند(۱۶).

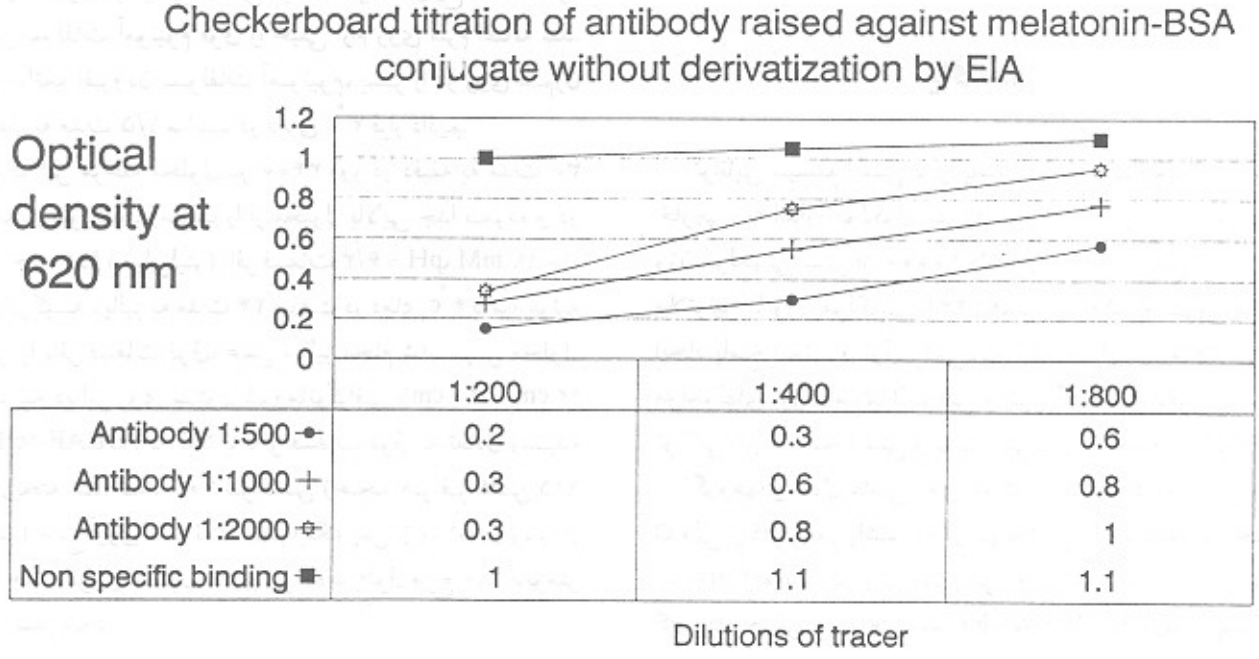
گروههای فعال عاملی روی ملاتونین شامل گروه ایمنی حلقه اندولی و کتونی می‌باشند که در تهیه آنتی‌بادی، پروتئین حامل (Carrier) و نسبت مولی ملاتونین به پروتئین حامل و نوع پل به کار رفته خیلی مهم هستند. Neswender و Midgleg پیشنهاد

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-28]

نمودار ۱ـ آماده‌سازی ملاتونین ـ BSA



نمودار ۲ـ تیتراسیون چکربورد آنتی‌بادی در مقابل ملاتونین BSA کنژوگه ۱۲ ساعت دو ستون



[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-28]

تمودند حداقل تعداد هاپتن که بصورت کووالان به حامل متصل می‌شود، باید ۲۰ عدد باشد. مطالعات بعدی با استفاده از n(DNP) و BSA نشان داد که با ۵ مولکول دی‌نیتروفنول (DNP) به ازای هر مولکول حمل نیز، به خوبی پاسخ ایمنی به وجود می‌آید و آنتی‌بادی تولید می‌شود. در این مطالعه تعداد ملاتونین متصله به هر مولکول BSA برابر با ۱۳/۵ مولکول می‌باشد که نتیجه خوبی بوده و تأیید کونژوگاسیون با توجه به منحنی مربوطه در طول موجهای ۲۲۰-۳۲۰ نانومتر و اندازه‌گیری جذبهای نوری BSA، ملاتونین و کونژوگه ملاتونین - BSA و با توجه به اختلاف جذبهای نوری ایمنوژن و BSA در غلظت مشخص و در طول موج ۲۸۰ نانومتر با استفاده از قانون بیر - لامبرت میزان کونژوگاسیون محاسبه شد(نمودار ۱).

با استفاده از کونژوگه آنزیمی ملاتونین متصل به پنی‌سیلیناز تیتر آنتی‌بادی $\frac{1}{2000}$ و تیتر کونژوگه آنزیمی $\frac{1}{200}$ می‌باشد (لازم به تذکر است که تیترهای به دست آمده بر اساس ماکزیمم اختلافهای جذب نوری بین رقت خاص آنتی‌بادی و آنزیم نشاندار نسبت به NSB می‌باشد) (نمودار ۲).

در مرحله تخلیص آنتی‌بادی با استفاده از کروماتوگرافی DEAE-Cellulose به ازای هر ۱۰ میلی‌لیتر سرم خرگوش، ۵۰ میلی‌گرم گاماگلبولین به دست آمد که در شرایط ۴ درجه سانتیگراد به مدت طولانی قابل نگهداری بوده که نتیجهٔ الکتروفورز استات سلولز گاماگلبولین خالص در شکل ۲ دیده می‌شود.

بحث

تهیه آنتی‌بادی علیه ملاتونین می‌تواند بعنوان ابزار مهمی در جهت طراحی کیتهای ایمنوشیمیایی EIA (ELISA و RIA) مورد استفاده قرار گرفته و از آنها در سنجش هورمون ملاتونین خون و مایعات بدن در موارد متعدد فیزیولوژیک و پاتولوژیک همچون میگرن و سرطانها استفاده می‌شود.

تا کنون در روشهای ایمنوشیمیایی بخصوص الایزا (ELISA) که نسبت به RIA بی‌خطر بوده، برای تهیه کونژوگه‌های آنزیمی از آنزیمهایی مانند پراکسیداز و آلکالن فسفاتاز استفاده شده است. در این مطالعه برای اولین بار از آنزیم پنی‌سیلیناز بعنوان نشان آنزیمی استفاده شده که کاری کاملاً جدید در سطح جهانی می‌باشد. آنزیم پنی‌سیلیناز دارای مزایای متعددی می‌باشد که عبارتند از :

آنزیم پنی‌سیلیناز دارای فعالیت ویژه بالایی است، عود (turnover) بالایی دارد، در حرارت آزمایشگاه پایدار است، در مایعات بیولوژیک وجود ندارد، در اثر کونژوگه شدن فعالیتش تغییر نمی‌کند، به فرم خالص موجود است.

معرف بد - نشاسته که در سیستم EIA بکار می‌رود به مدت ۱ سال پایدار بوده و به راحتی قابل تهیه است و بعلاوه چون که معرف، دارای رنگ آبی شدیدی است و این رنگ در ۶۲۰ نانومتر جذب ماکزیمم داشته که توسط آنزیم بی‌رنگ می‌شود، تعیین نقطهٔ پایانی توسط چشم بسیار راحت انجام می‌گیرد.

وزن مولکولی کمی دارد (۲۹۰۰۰ دالتون) که مقدار کمی از آن برای نشاندار کردن ملاتونین مورد نیاز است.

در تهیه ایمنوژن می‌توان از حاملین متعدد مانند آلبومین، تیروگلبولین و غیرو استفاده نمود ولی بعلت ارزانی و در دسترس بودن و محلول بودن از آلبومین سرم گاوی (BSA) بیشتر استفاده می‌شود.

روشهای ایمونیزاسیون متفاوت بوده و آنها در مقدار ایمنوژن، نوع آنتی‌ژن، زمان تزریق، نوع حیوانات، روش تزریق و محل تزریق با یکدیگر متفاوتند. به نظر می‌رسد راحت‌ترین و موفقترین روش، تزریق زیرجلدی است که در سال ۱۹۷۱ توسط Vaitukaitis و همکارانش معرفی شد(۱۵).

در مورد تیتر آنتی‌بادی ماه سوم پس از اولین تزریق، تیتر آنتی‌بادی افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته و به تیتر مناسب $\frac{1}{2000}$ رسید که با توجه به مقالات نتیجهٔ خوبی بدست آمد(۱۸،۱۷).

در مرحله تخلیص و جداسازی آنتی‌بادی با استفاده از الکتروفورز استات سلولز نشان داده شد که آنتی‌بادی، از خلوص بسیار زیادی برخوردار است.

از بحث فوق نتیجه‌گیری می‌شود، می‌توان از تیتر مناسب آنتی‌بادی تولید شده با خلوص خیلی زیاد در تهیه و طراحی کیتهای ایمنوشیمیایی که امروزه در سنجش بسیاری از هورمونها متداولند، استفاده نمود و تغییرات این هورمون کم شناخته شده را در بررسی سیر بیماری‌ها مطالعه نمود.

منابع

1- Arendt J Melatonin: Review. Clin Endocrinol (1988).29: 205-229.

2- Tapp E. The histology and pathology of the pineal glans. Prog.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-28]

Brain. Res. (1979). 52: 481-500.

3- Stephanie S, Erlich MD and Michael L. The pineal gland: anatomy, physiology, and clinical significance. J Neurogurg (1985). 63: 321-341.

4- Webb SM and Puig - Domingo M. Role of melatonin in health and disease. Clin Endocrinol. (1995): 42: 221-234.

5- Lerner AB, Case JD., Takaha Y, Lee TH and Mori N. Isolation of melatonin, pineal factor that lightens melanocytes. J. Am Chem Soc (1958). 80: 2587-2592.

6- Cagnoli CM, Atabay C, Kharlamova E, and Manev H. Melatonin Protects neurons from singlet oxygen- induced apoptosis. J. Pineal. Res. (1995) 18: 222-226.

7- Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R and Marcheselli F. Melatonin: a peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. Life. Sci. (1994). 55: 271-276.

8- Poeggeler B, Reiter RJ, Tan D-x and Manchester LC. Melatonin, hydroxyl radical - mediated oxidative damage, and aging. J. Pineal Res. (1993). 14: 151-168.

9- Cramer H, Rudolph J and Consburch V. On the effects of melatonin on sleep and behaviour in man, Advances in biochemical psychopharmacology. Vol 11. Raven press, New York: (1974) 187-191.

10- Joel R, Ehrenkranz L, Tamarkin L, Comite F, David E, Bybbe D and Gordon B. Daily rhythm of plasma melatonin in normal and precocios puberty. J Clin Endocrinol Metab (1982). 55(2): 307-310.

11- Tamarkin L, Danforth D, Lichter A, Michael C Lipman M. Decreased Nocturnal plasma melatonin peak in patients with estrogen receptor positive hbreast cancer. Science. (1982). 216: 1003-1005.

12- Claustrat B, Brun J. Zaidan R, Mallo C and Chazot G. Nocturnal plasma melatonin profile and melatonin kinetics during infusion in status migrainosus. Cephalagia. (1997). 17(4): 511-517.

13- Arendt J, Paunjer L, and Sizonenko PC. Melatonin radio immunoassay. J. Clin. Endocrionol. Metab. (1975). 40: 347-350.

14- Grota LJ and Brown GM. Antibodies to indolealkylamines: serotonin and melatonin. Can J. Biochem. (1974). 52: 196-202.

15- Vaitukaitis J, Robbins JB, Nieshlag E and Ross GT. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocrinol. Metab. (1971). 33: 988-991.

16- Chappey O, Sandouk P and Scherrman JM. Modulation of the specifity of anti-hapten antibodies. Clinical Immunoassay. (1992) 15: 51-56.

17- Yie SM, Johansson E and Brown GM. Competitive solid-phase enzymeimmunoassay for melatonin in human and rat serum Clin. Chem (1993). 39 (11): 2322-2325.

18- Wurzburger RJ, Kawashima K, Miller RL and Spector S. Determination of rat pineal gland melatonin content by a RIA Life. Science. (1976). 18: 867-878.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-28]