مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
سال یازدهم ، شماره‌های ۱ و ۲ / ۲۳

روش جدید ایمونوفلوئورسانس در فاز مایع

دکتر ربابه رضائی پور*

مقدمه

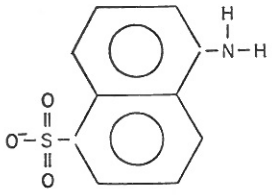
هدف این مقاله معرفی روش جدید ایمونوفلورسانس در فاز مایع است که قبلا" توسط نویسندهٔ این مقاله انجام یافته است (۶) . در این روش برای اندازه‌گیری و مطالعهٔ دقیق آنتی‌بادی‌های ضد نوکلئوتیدی، ابتدا نوکلئوتیدهای فلورسان سنتز شد . بدین منظور یک مادهٔ فلورسانس زا (آمینونفتالین سولفونیک اسید AmNS) به طریق کووالان (Covalant) به مشتقات مختلف نوکلئوتیدها در حضور کربودی‌آمید (Carbodiimide) متصل گردید . کوآنتوم نوری حاصل (Φ) از این نوکلئوتیدهای فلورسان در محیط مایع و در pH خنثی حدود ۲۵ درصد محاسبه شد . این در حالی بود که طول موج جذبی نور توسط این نوکلئوتیدهای فلورسان برابر ۳۲۰ نانومتر، و طول موج دفعی نور (فلورسانس‌زایی) برابر ۴۶۰ نانومتر بود . کوآنتوم نوری حاصل از این نوکلئوتیدها پس از افزودن آنتی‌بادی‌های همگن (هومولوگ) افزایش قابل توجهی نشان داد . این افزایش در قدرت فلورسانس‌زایی در حضور ایمونوگلوبولین‌های طبیعی و یا در حضور پروتئین‌های سرم از قبیل آلبومین حاصل نشد . که این امر اختصاصی بودن این روش را به اثبات می‌رساند . با توجه به اینکه برای مطالعهٔ ایمنی شناختی هاپتن‌ها استفاده از یک روش حساس و اختصاصی بسیار ضروری است و روشهایی که تاکنون ابداع شده‌اند علیرغم تنوع بسیار (۱، ۳ و ۵) از حساسیت، اختصاصی بودن و سادگی کافی برخوردار نیستند لذا روش ایمونوفلورسانس در فاز مایع با داشتن این توانایی‌ها در ایمنی شناسی عملی برای مطالعهٔ هاپتن‌ها و نیز در تشخیص بیماریهایی مانند لوپوس و بیماریهای روماتوئیدی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌شود .

سنتز نوکلئوتیدهای فلورسان

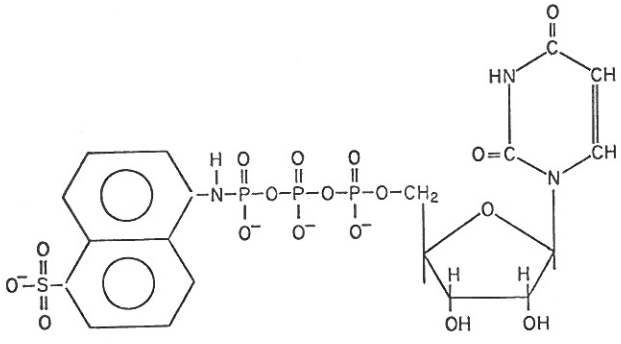
با توجه به مزایای یک روش فلورسان ، روش ایمونوفلورسانس در محیط مایع برای سنجش پادتن‌های ضد اسیدهای

* استادیار گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی .

نوکلئیک و نوکلئوتیدها تکوین یافت که می‌تواند با تغییراتی جهت بررسی بسیاری از واکنشهای ایمنی شناختی، بخصوص بررسی هاپتن‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرد. مکانیسم کلی در تکوین این روش جدید به‌کاربردن یک ماده‌ٔ فلورسان با ΦF مختصر در فاز مایع است که در حضور پادتن اختصاصی کوآنتوم نوری آزاد شده افزایش چشمگیری یابد. مشتقات نفتیل، از جمله مواد فلورسان هستند که ΦF کمی دارند، بنابراین، یکی از این مشتقات (AmNS) که ΦF معادل ۲۵ درصد در فاز مایع داشت انتخاب (۸) و به طریق کووالان به گروه فسفات انتهایی نوکلئوتیدها در حضور کربو-دی آمید متصل شد. این مزدوج سازی (کونژوگاسیون) با نوکلئوتیدهای منو، دی و تری فسفات نیز انجام گرفت.



AmNS



AmNS-UTP

شکل ۱

در شکل ۱، نحوه اتصال ماده فلورسان به یک نوکلئوتید نشان داده شده است. همان طور که در این شکل ملاحظه می‌شود گروه آمینه‌ٔ موجود در AmNS با فسفات انتهایی نوکلئوتید به طریق کووالان متصل می‌گردد و کونژوگه حاصل می‌شود. اتصال AmNS به نوکلئوتید الزاما" از گروه فسفات انتهایی نوکلئوتیدها صورت می‌گیرد، زیرا هنگامی که دی-نوکلئوتیدهای GPA و TPG به‌کار برده شد مزدوج سازی صورت نگرفت.

برای خالص نمودن کونژوگه‌های مختلف، روش TLC (Thin Layer Chromatography) با استفاده از صفحه های کروماتوگرام حامل سیلیکاژل مورد استفاده قرار گرفت. حلال مورد استفاده در این روش اتانول ۹۵ درصد و استات سدیم (یک مولار) به نسبت حجمی ۷۰ به ۳۰ بود. نتایج حاصل از خالص سازی کونژوگه های مختلف و ضرایب Rf مربوط به آنها در جدول ۱ خلاصه شده است.

محاسبه نسبت مولکولی AmNS و نوکلئوتید در یک کونژوگه (Stoichiometry)، جهت تعیین تعداد مولکول نوکلئوتید متصل شده به یک مولکول AmNS بر اثر مزدوج-سازی، کونژوگه های AmNS با نوکلئوتیدهای منو، دی و تری فسفات به وسیله‌ٔ آنزیم مخصوص سم مار (فسفودی استراز I) تجزیه گردید. این آنزیم یک اگزونوکلئاز است که 5' نوکلئوتیدها را از مشتقات مختلف مثل اسید ریبونوکلئیک‌ها و دزاکسی ریبونوکلئیک‌ها و غیره جدا می‌سازد (۲ و ۴). مواد حاصل از تجزیه آنزیمی به وسیله اسپکتروفتومتری و TLC مورد مطالعه قرار گرفت و مقدار منومرهای آزاد شده از هر کونژوگه از روی *OD نوکلئوتیدها در ۲۶۰ نانومتر و AmNS در ۳۳۰ نانومتر محاسبه شد. نتایج به دست آمده از تجزیه‌ٔ آنزیمی نشان داد که هر کونژوگه متشکل از یک مولکول نوکلئوتید و یک مولکول AmNS است (جدول ۲).

با توجه به نتایج حاصل از TLC و اسپکتروفتومتری این طور به نظر می‌رسد که AmNS-UMP بر اثر تجزیه‌ٔ آنزیمی به اجزای AmNS و UMP؛ AmNS-UDP به اجزای AmNS, UMP, Pi- و بالاخره AmNS-UTP به اجزای AmNS-PPI و UMP تجزیه می‌شوند (جدول ۲).

با انجام نشدن عمل مزدوج شدن یا عدم کونژوگاسیون نوکلئوزید یوریدین با AmNS و همچنین UTP با نفتیل‌سولفات (بدون گروه آمینی) مشخص می‌شود که پیوند کووالان بین AmNS و نوکلئوتیدها از طریق گروه آمینی AmNS و گروه

*Optical Density= تعداد جذب نور

جدول ـ ۱ . اختصاصات کونژوگه‌های مختلف ، AmNS و نوکلئوتیدها

مواد شیمیائی	ماکزیمم طول موج جذبی (نانومتر) λ max	ماکزیمم طول موج دفعی نور (نانومتر) Emission	ضریب Rf	
			سیلیکاژل	سلولز
AmNS UTP	۳۲۰	۴۶۰	۰/۳	۰/۰۶
AmNS UDP	۳۲۰	۴۶۰	۰/۵	۰/۱
AmNS UMP	۳۲۰	۴۶۰	۰/۷	۰/۲
AmNS TDP	۳۲۰	۴۶۰	۰/۶	۰/۱
AmNS GDP	۳۲۰	۴۶۰	۰/۴	۰/۰۷
AmNS CDP	۳۲۰	۴۶۰	۰/۵	۰/۰۹
AmNS ADP	۳۲۰	۴۶۰	۰/۵	۰/۰۷
AmNS	۳۳۰	۵۱۵	۰/۸	۰/۷
UTP	—	—	۰/۰۵*	۰/۰۶
UDP	—	—	۰/۰۸*	۰/۰۶
UMP	—	—	۰/۳*	۰/۲
TDP	—	—	۰/۱*	۰/۱
GDP	—	—	۰/۰۸*	۰/۰۷
CDP	—	—	۰/۰۸*	۰/۰۹
ADP	—	—	۰/۰۱*	۰/۰۷

* این ضرایب با استفاده از سیلیکاژل حاوی مواد فلورسان محاسبه شده است .

جدول ۲ . اختصاصات و نسبت مولکولی اجزای موجود در کونژوگه‌های مختلف بر اثر تجزیهٔ فسفودیامتراز I

کونژوگه	Rf		حداکثر طول موج جذبی		حداکثر طول موج جذبی		مولکول آزاد شده پس از تجزیهٔ آنزیمی	
	قبل از تجزیه	بعد از تجزیه	قبل از تجزیه	بعد از تجزیه	قبل از تجزیه	بعد از تجزیه	AmNS	نوکلئوتید
AmNS - UMP	۰/۷۵	۰/۸۴،۰/۲۲	۳۲۰	۲۶۰،۳۳۰	۴۶۰	۵۱۵	$۲/۱\times۱۰^{-۷}$	۲×۱۰^{-۷}
AmNS - UDP	۰/۴۷	۰/۸۳،۰/۲۳	۳۲۰	۲۶۰،۳۳۰	۴۶۰	۵۰۰	$۲/۳\times۱۰^{-۷}$	$۲/۳\times۱۰^{-۷}$
AmNS - UTP	۰/۳۰	۰/۸۰،۰/۲۰	۳۲۰	۲۶۰،۳۳۰	۴۶۰	۴۸۵	$۱/۶\times۱۰^{-۷}$	$۱/۷\times۱۰^{-۷}$

فسفات نوکلئوتیدها صورت می‌گیرد. عدم انجام کونژوگاسیون بین AmNS و TPG و GPA ثابت می‌کند که در هر عمل مزدوج شدن وجود گروه فسفات انتهایی لازم است . پس به طور کلی برای اینکه عمل مزدوج شدن صورت گیرد وجود گروه آمینی در AmNS و فسفات انتهایی در نوکلئوتیدها ضروری است .

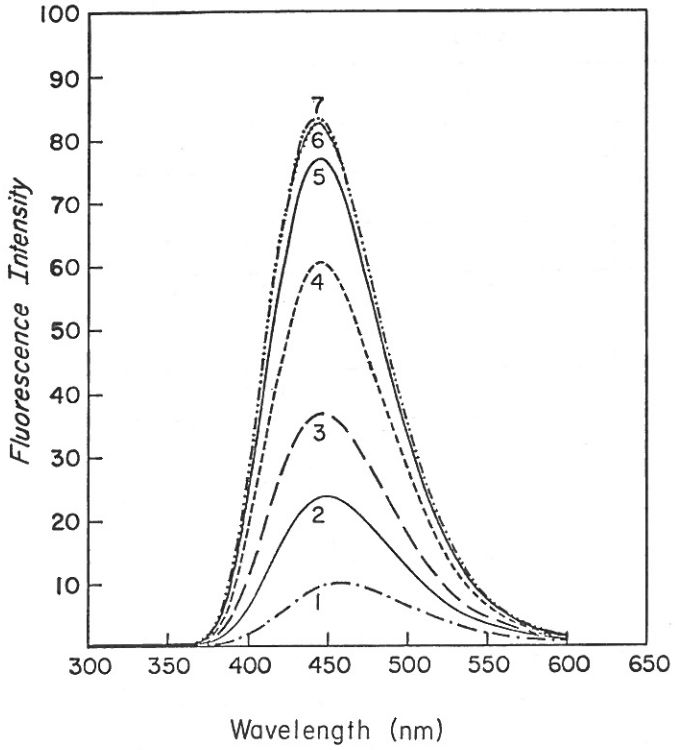
بررسی واکنش بین پادتن و نوکلئوتیدها با استفاده از روش ایمونوفلورسانس در فاز مایع

بر اثر اتصال کونژوگه نوکلئوتید AmNS با پادتن همگن (هومولوگ) و اختصاصی علیه قسمت نوکلئوتیدی یک کونژوگه، افزایش قابل ملاحظه ای در قدرت فلورسانس‌زایی

نوکلئوتیدهای فلورسان مشاهده شد که این افزایش نسبت مستقیم با غلظت پادتن اختصاصی داشت (شکل ۲). پادتن‌های مصرف شده در روش ایمونوفلورسانس یا به صورت گاماگلوبولین‌های تغلیظ شده و یا به شکل IgG خالص شده بود. افزایش در قدرت فلورسانس زایی یک واکنش کاملا" اختصاصی بود، زیرا گاماگلوبولین‌های طبیعی، IgG طبیعی، آلبومین خرگوش و گاو و IgG خرگوشهایی که با پادتن‌های دیگری غیر از نوکلئوتیدها ایمن (ایمیونیزه) شده بودند، هیچگونه اثری در افزایش فلورسانس‌زایی کونژوگه و یا AmNS به تنهایی نداشتند. از این افزایش در قدرت فلورسانس‌زایی که حاصل یک واکنش کاملا" اختصاصی بین پادتن و قسمت نوکلئوتیدی یک کونژوگه است در واکنشهای رقابتی با استفاده از نوکلئوتیدهای غیر فلورسان ممانعت به عمل آمد. به عنوان مثال و مطابق شکل ۳، واکنش بین پادتن ضد UMP و کونژوگه AmNs-UMP با استفاده از نوکلئوتیدهای مختلف در غلظت‌های فزاینده در واکنشهای رقابتی مورد مطالعه قرار داده شد و هنگامی که نوکلئوتید UMP به عنوان مادهٔ رقابت کننده به‌کاربرده شد افزایش قدرت فلورسانس‌زایی به حداقل رسید. نوکلئوتید TMP حداکثر واکنش تقاطعی cross reaction را با مولکول پادتن که علیه UMP تولید شده بود نشان داد (شکل ۳).

مقایسهٔ کونژوگه‌های حاصل از مشتقات مختلف یوریدین

به منظور بررسی نقش گروه فسفاته به عنوان ماده حد فاصل spacer effect بین AmNS و نوکلئوتید و نیز تغییر دادن این فاصله و بررسی این تغییرات در افزایش قدرت فلورسانس زایی در حضور پادتن اختصاصی نوکلئوتید، کونژوگه های مختلفی با AmNS و مشتقات منو، دی و تری فسفات یوریدین سنتز شد. در مطالعات اسپکتروفتومتری، هر سه کونژوگه حداکثر طول موج جذبی برابر ۳۲۰ نانومتر و دفعی حدود ۴۶۰ نانومتر را در غیاب پادتن ظاهر ساختند. حال آنکه در حضور پادتن اختصاصی، طول موج دفعی در کونژوگه های مختلف متفاوت بود (جدول ۴) ΦEF* نیز در مورد هر سه کونژوگه محاسبه شد (۶). به عنوان مثال ΦEF* برای AmNS-UDP و AmNS-UTP به ترتیب ۱۷ و ۱۲ متفاوت بود (جدول ۴).



شکل ۲. عیار AmNS-UMP با پادتن اختصاصی علیه UMP
منحنی ۱ طیف دفعی نور توسط 6×10^{-8} میلی مولار AmNS UMP را در یک میلی‌لیتر PBS*، pH= ۸ و در غیاب پادتن و پس از جذب نور در ۳۲۰ نانومتر نشان می‌دهد. منحنی‌های ۲ تا ۷ افزایش قدرت فلورسانس سازی ــ AmNS UMP را پس از افزایش مقادیر فزاینده‌ای از پادتن ضد UMP به ترتیب از ۰/۲۸ تا ۲/۸ میلی‌گرم، نشان می‌دهد.

Phosphate Buffer Saline

بحث

به منظور تکوین روش جدید ایمونوفلورسانس با حساسیت و دقت مناسب، نوکلئوتیدهای فلورسان با اتصال کووالانتی AmNS به نوکلئوتیدها در حضور کربودی‌آمید سنتز شد. تجزیهٔ کونژوگهٔ حاصل از چنین سنتزی با فسفودی استراز نشان داد که هر کونژوگه از یک مولکول AmNS و یک مولکول نوکلئوتید حاصل شده است. سعی در مزدوج سازی

* Quantum yield enhancement factor (Φ EF) یا حداکثر قدرت فلورسانس‌زایی (حداکثر کوانتوم نوری آزاد شده)

جدول ۴. مقایسهٔ کونژوگه‌های حاصل از مشتقات مختلف یوریدین با AmNS

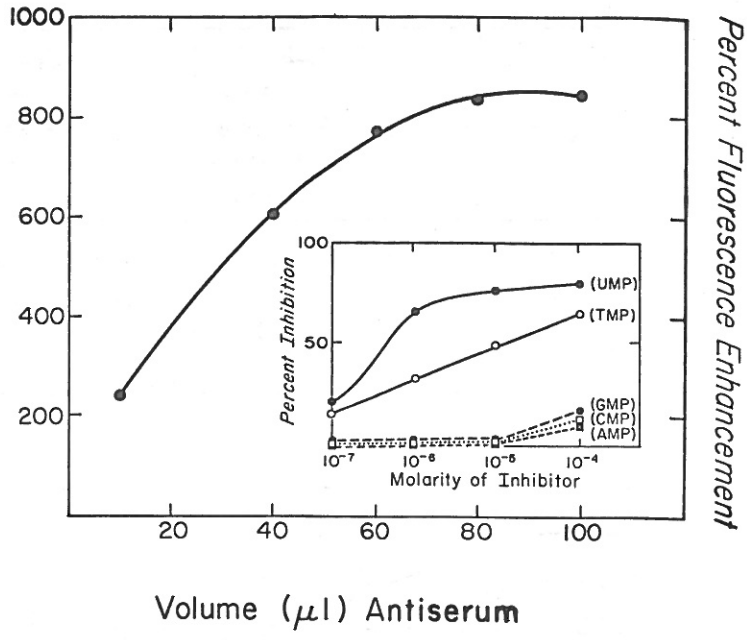
نوکلئوتیدهای فلورسانتی	Rf	حداکثر طول موج جذبی (λ max) (نانومتر)	حداکثر طول موج دفعی نور در کونژوگه (نانومتر)	Φ_F	حداکثر طول موج دفعی نور در کونژوگه درحضور پادتن (نانومتر)	Φ_{EF}	Φ_{B^*}
AmNS - UTP	۰/۳۱	۳۲۰	۴۶۰	۰/۰۲۵	۴۶۰	۱۲	۰/۳
AmNS - UDP	۰/۵۳	۳۲۰	۴۶۰	۰/۰۲۵	۴۵۵	۱۷	۰/۴۲
AmNS - UMP	۰/۷۵	۳۲۰	۴۶۰	۰/۰۲۵	۴۴۰	۳۵	۰/۸۷

* کوآنتوم نوری حاصل از کونژوگه در حضور پادتن همگن

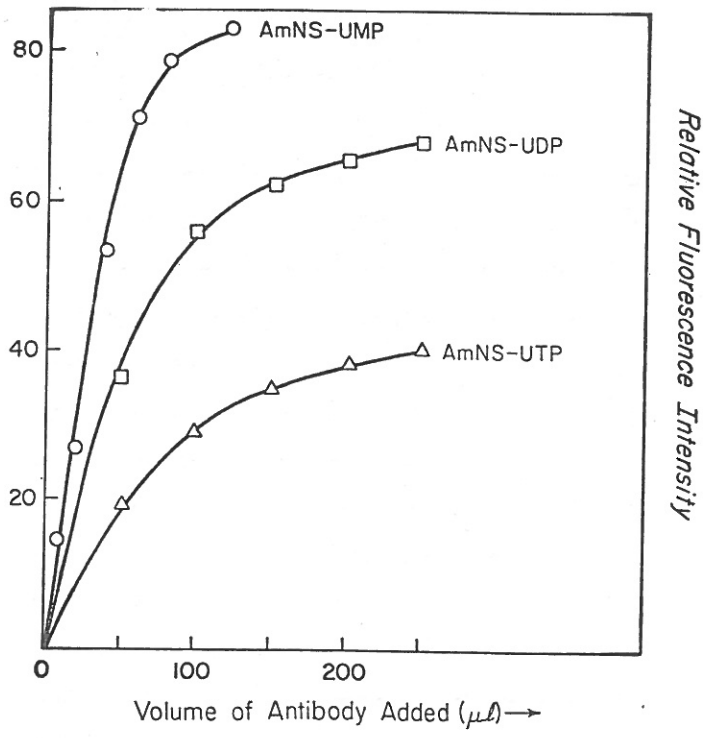
مشتقات مختلف نوکلئوتیدی و نفتالینی، اهمیت وجود گروه آمینه در ترکیبات نفتالینی و فسفات انتهایی در نوکلئوتیدها را در یک مزدوج سازی موفق ثابت نمود. پس از انکوباسیون نوکلئوتیدهای فلورسان با سرم خالص نشده در مدت زمانهای مختلف، ثابت شد که کونژوگهٔ حاصل در برابر آنزیم‌های موجود در سرم مقاوم است. پس از اتصال کونژوگهٔ نوکلئوتید AmNS به پادتن همگن و اختصاصی علیه قسمت نوکلئوتیدی موجود در کونژوگه، Φ_F افزایش قابل توجهی یافت (حدود ۲۰ تا ۵۰ برابر). سرم طبیعی خرگوش، مایع آسیتی (Ascites) موش، آلبومین سرم خرگوش و گاو هیچگونه اثری در افزایش قدرت فلورسانس‌زایی کونژوگه‌های مختلف و یا AmNS نداشت که این خود اختصاصی بودن این روش را ثابت می‌کند. برای اثبات اختصاصات ایمنی شناختی واکنش بین نوکلئوتیدهای فلورسان و پادتن‌های همگن واکنشهای رقابتی با استفاده از نوکلئوتیدهای غیرفلورسان انجام گرفت. به عنوان مثال واکنش بین پادتن ضد UMP با کونژوگه AmNS-UMP در حضور UMP کاملا" متوقف شد.

برای مطالعه حداقل فاصلهٔ بین نوکلئوتید و AmNS و تاءثیر آن بر واکنشهای ایمنی شناختی سه کونژوگهٔ مختلف با مشتقات یوریدین و AmNS سنتز گردید که عبارت بودند از AmNS-UMP، AmNS-UDP و AmNS-UTP که گروههای منو، دی و تری فسفات انتهایی به عنوان فاصله (Spacer) بین نوکلئوزید و AmNS در نظر گرفته شد. مقایسهٔ بین این کونژوگه‌ها (جدول ۴) نشان داد که قدرت فلورسانس‌زایی، Φ_B و Φ_{EF} این سه با یکدیگر متفاوت است. چنین مقایسه‌ای ثابت نمود هنگامی که AmNS به نوکلئوتید و در نتیجه به مولکول پادتن نزدیک‌تر شود، قدرت فلورسانس‌زایی کونژوگه افزایش می‌یابد. به عنوان مثال در مورد کونژوگه AmNS - UMP- بر اثر اتصال مولکول پادتن اختصاصی، چون AmNS از مولکول پادتن با فاصلهٔ بیشتری در مقایسه با کونژوگه‌های AmNS-UDP و AmNS-UMP قرار می‌گیرد (به علت وجود سه گروه فسفات) (شکل ۷)، بنابراین Φ_B کمتری در مقایسه با دو کونژوگهٔ فوق دارد. مکانیسمی که سبب افزایش قدرت فلورسانس زایی می‌شود احتمالا" انتقال انرژی حاصل از تریپتوفان موجود در مولکول پادتن است که با فاصلهٔ بین دو مولکول نسبت عکس دارد (۷). ماکزیمم طول موج دفعی نور توسط مولکول‌های تریپتوفان برابر ۳۵۰ نانومتر است که تقریبا" نزدیک به ماکزیمم طول موج جذبی نور توسط مولکول AmNS می‌باشد. در نتیجه انرژی نورانی حاصل از تریپتوفان توسط AmNS جذب می‌گردد و این انرژی کسب شده در طول موجهای بالاتر (۴۶۰ نانومتر) مجددا" به شکل نور به خارج پس داده می‌شود (عمل فلورسانس‌زایی).

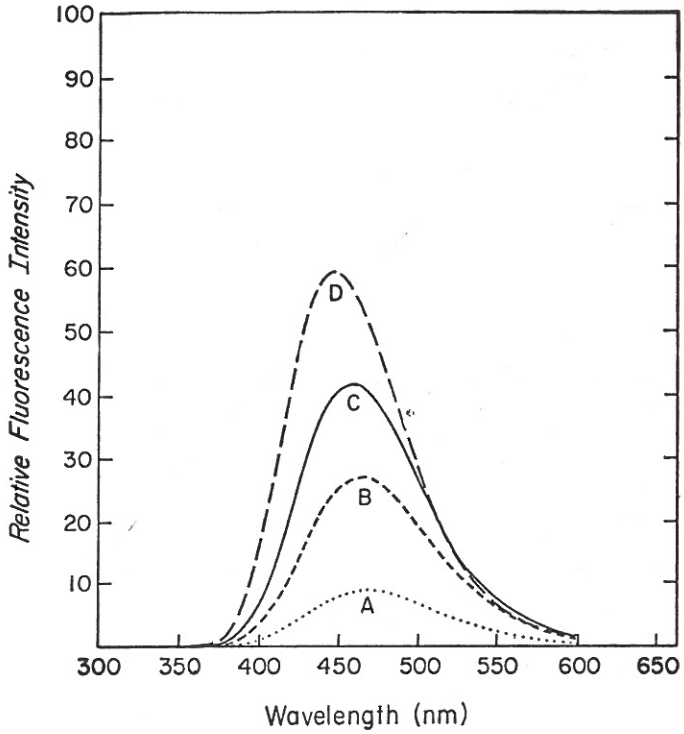
به طور خلاصه روش جدید ایمونوفلورسانس در فاز مایع با استفاده از نوکلئوتیدهای فلورسان ثابت نمود که یک روش حساس برای بررسی پادتن‌های ضد نوکلئوتیدی و یا مولکول‌های هاپتنی خواهد بود که به طریق شیمیایی به ماده فلورسان AmNS متصل شده باشند. نوکلئوتیدهای فلورسان در مطالعات ایمنی شناسی، بیوشیمیایی و ژنتیک نیز می‌تواند کاربرد فراوان داشته باشد (۹ و ۱۰).



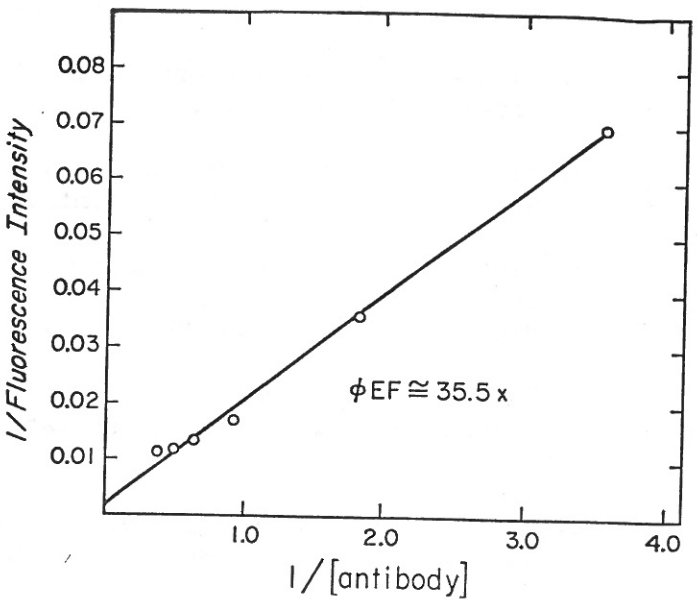
شکل ۳. عیار AmNS-UMP با پادتن اختصاصی علیه UMP ، ۷×۱۰^{-۶} میلی مولار AmNS-UMP به‌وسیله مقادیر فزاینده‌ای از نوکلئوتیدهای غیرفلورسان ($۱۰^{-۷}$ تا $۱۰^{-۴}$ مولار در واکنش رقابتی ممانعت گردید .



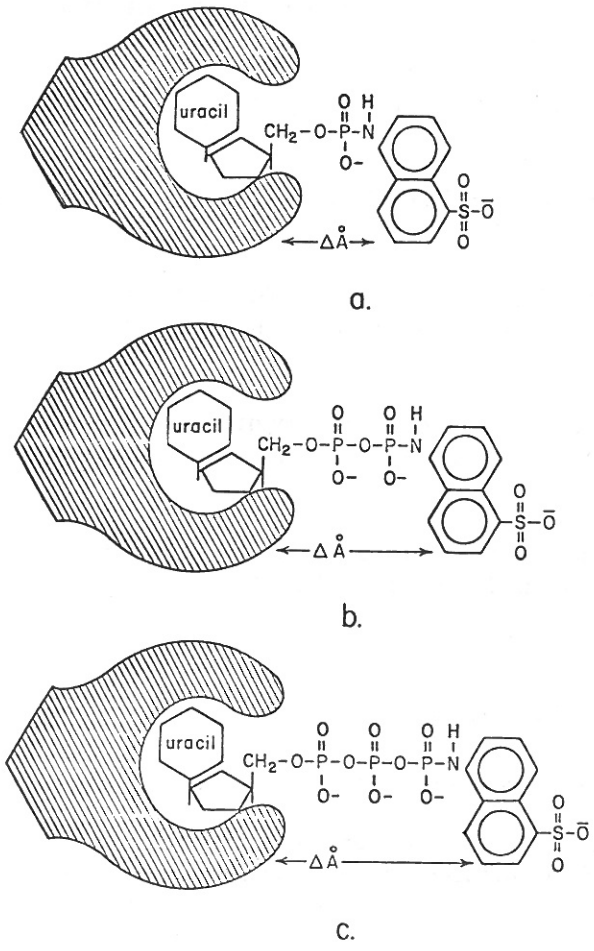
شکل ۵. عیار سه کونژوگهٔ حاصل از ترکیب AmNS با مشتقات مختلف یوریدین ۶×۱۰^{-۸} میلی مولار از هر یک از سه کونژوگه (AmNS-UDP, AmNS-UTP و AmNS-UMP) با مقدار فزاینده‌ای از IgG خالص شده که در خرگوش علیه UMP تولید شده بود عیار گردید .



شکل ۴. مقایسه بین کونژوگه‌های حاصل از مشتقات یوریدین، منحنی A قدرت فلورسانس زایی ۶×۱۰^{-۸} میلی مولار AmNS-UTP AmNS-UDP و AmNS-UMP را در حجم نهایی یک میلی لیتر با PBS ، PH= ۸ . منحنی B قدرت فلورسانس‌زایی ۶×۱۰^{-۸} میلی مولار AmNS-UMP را با ۱/۵ میلی گرم آنتی پادتن اختصاصی علیه UMP ، و منحنی D قدرت فلورسانس زایی ۶×۱۰^{-۸} میلی مولار AmNS-UMP را با ۱/۵ میلی‌گرم پادتن اختصاصی علیه UMP نشان می‌دهد .



شکل ۶. عکس شدت فلورسانس‌زایی نسبت به عکس غلظت پادتن. ۶×۱۰^{-۸} میلی مولار AmNS-UMP با مقادیر فزاینده‌ای (۰/۲۸ تا ۲/۸ میلی‌گرم) از IgG خالص شده علیه UMP و آنقدر ادامه داده شده تا به حداکثر برسد (نقطهٔ اشباع). سپس برای هر یک از مراحل عیار عکس شدت فلورسانس زایی روی محور عمودی و عکس غلظت آنتی پادتن بر روی محور X ها نمایش داده شد. عکس نقطهٔ قطع محور Y (Yintercept) نمایانگر ϕ است که برای AmNS-UMP برابر ۳۵/۵ محاسبه گردید. مشابه همین روش درمورد AmNS-UTP و AmNS-UDP نیز انجام گرفت و EF ۱۷ و ۱۲ به ترتیب برای هر یک محاسبه گردید.



شکل ۷. طرح مقایسه‌ای کونژوگه های حاصل از ترکیب بین مشتقات منو، دی و تری فسفات یوریدین با در حضور پادتن اختصاصی علیه UMP. این شکل اثر گروه فسفاته را به عنوان مادهٔ حد فاصل بین یوریدین و AmNS نشان می‌دهد. فاصله بین مادهٔ فلورسان (AmNS) و محل فعال activesite مولکول پادتن در این شکل با مشخص شده است.

شکل a، ترکیب AmNS-UMP را با پادتن ضد UMP نشان می‌دهد،

شکل b، ترکیب AmNS-UDP را با پادتن ضد UMP نشان می‌دهد،

شکل c، ترکیب AmNS-UTP را با پادتن ضد UMP نشان می‌دهد.

مـــراجـــع

1. Koffler D, Angello V, Thoburn R & Kunkel HG: Antibodies to polynucleotide in human sera. J. Exp Med 134: 294-312,1971

2. Laskowski M: Venom exonucleose in: Enzymes, 3th ed PD Beyer (ed),Academic press, N.Y. 1970, vol. 4

3. Manak RC, Voss EW Jr: Anti-sDNA Antibodies purified from sera of human patients with SLE. Immunochemistry 15: 623-661, 1978

4. Nihel T, Cantoni GL: Studies on soluble ribonucleic acid, The action of snake venom phosphodiesterase on soluble ribonucleic acid in yeast J Biol Chem 338: 3991-3998, 1963

5. Pincus T: Immunochemical conditions effecting the measurement of DNA antibodies using ammonium sulfate precipitation. Arth Rheum 14: 623-630, 1971

6. Rezaei Poor Kardost R, Voss E,W,Jr: Fluorescent Nuclotides. application in a fluorescence immune assay, Molec Immunol 19:159-170, 1982

7. Stryer La, Ann Rev Biochem 417:819, 1978

8. Weber G, Teale FWJ: Trans Faraday, Soc 53:646, 1957

9. Yarburough L.R:Biochem, Biophsy, Res,Comon 81:35, 1978

10. Yarbrough L R: Schlageek J G, Boughman M: Synthesis and properties of fluorescent nucleotide subustrate for DNA polymerases. J.Biol Chem 254: 12069-12073, 1979