

اندازه‌گیری نیمه کمی میزان آلبومین با استفاده از روش بهینه شده ایمونوکروماتوگرافی و نانوذرات طلا

زینب شیروانی فارسانی^۱، فاطمه قلی‌زاده^۱، زهرا میرزایی‌زاده^۱، فاطمه سادات امجد زنجانی^۱، کبری امیدفر^{۱*}

چکیده

مقدمه: روش ایمونوکروماتوگرافی (ICG) بر اساس اتصال آنتی‌بادی اختصاصی علیه آلبومین سرم انسانی (HSA) به ذرات کلوئیدی طلا شکل گرفته و کاربرد آن برای تشخیص اولیه HSA در ادرار مشخص شده است. آنتی‌بادی مونوکلونال (mAb) اختصاصی علیه HAS، از سلول‌های کلون شده هیبریدوما به دست آمد و برای طراحی روش ICG استفاده گردید. **روش‌ها:** طلای نانوکلوئیدی با متوسط قطر ۲۰ نانومتر سنتز شد و به وسیله آن mAb به عنوان یک عامل تشخیصی نشان‌دار گشت. محلول نشان‌دار حاوی طلای کلوئیدی-آنتی‌بادی، روی پد کنژوگه بکار برده شد و آنتی‌ژن HSA بر روی کاغذ نیتروسولوزی به عنوان عامل به دام اندازنده ثابت گردید، بدین ترتیب نوارهای تست ICG آماده شد. **یافته‌ها:** مدت زمان لازم برای شناسایی نیمه کمی آلبومین ادرار به مدت ۱۰ دقیقه است. در این روش حساسیت به آلبومین ادرار، حدود ۲۰ µg/mL تعیین شد. کارایی روش تشخیصی طراحی شده به وسیله انجام تست ICG بر روی ۴۰ نمونه ادراری انجام و نتایج آن با نتایج حاصل از ایمونوتوربیدیمتری مقایسه گردید. **نتیجه‌گیری:** به طور خلاصه نتایج تحقیق نشان داد که روش ICG برای تشخیص سریع HSA در ادرار بسیار حساس و دقیق است.

واژگان کلیدی: آلبومین سرم انسان، نانوذرات طلا، سنجش ایمونوکروماتوگرافی، میکروآلبومینوری

نسخه انگلیسی این مقاله در مجله Hybridoma دوره ۳۰، شماره ۲ سال ۲۰۱۱ به چاپ رسیده است

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

* **نشانی:** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، کدپستی:

۱۴۱۱۴۱۳۱۳۷، تلفن: ۸-۰۲۱-۸۸۲۲۰۰۳۷، نمابر: ۰۲۱-۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک:omidfar@tums.ac.ir

مقدمه

آلبومین سرم انسان (HSA)، فراوان‌ترین پروتئین پلاسمایی با وزن مولکولی ۶۶ KD است که در کبد سنتز می‌شود. در یک فرد سالم، آلبومین مقدار کمی از کل پروتئینی که از طریق ادرار دفع می‌شود را در بر می‌گیرد. حد بالای نرمال دفع آلبومین که معمولاً از طریق روش‌های خاصی مانند کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و ایمونواسی اندازه‌گیری می‌شود، $30\text{mg}/24\text{h}$ یا $20\mu\text{g}/\text{min}$ است. میکروآلبومینوری (MAU)، دفع غیرطبیعی آلبومین درون ادرار است که مقدار آن بین $20\text{--}200\mu\text{g}/\text{min}$ ($30\text{--}300\text{mg}/\text{day}$) می‌باشد و احتمال زیاد آسیب کلیه را نشان می‌دهد و یکی از ابتدایی‌ترین شاخص‌های نفروپاتی دیابتی در $40\text{--}30\%$ بیماران دیابتی نوع ۱ و ۲ است. به علاوه MAU، کاربرد تشخیصی در بارداری به عنوان یک نشانگر پیشگویانه مسمومیت حاملگی داشته و در شناسایی خطرهای بالاتر عوارض بیماری‌های قلبی-عروقی حتی در بیماران غیر دیابتی نقش مهمی بر عهده دارد [۱،۲].

سطح آلبومین و قطعات آن در نمونه‌های بیولوژی می‌تواند توسط چندین روش مانند سنجش اتصال بر اساس رنگ، HPLC و روش‌های ایمونوشیمی اندازه‌گیری شود [۱۱-۳]. HPLC مقادیر دقیقی ارائه می‌دهد اما وقت‌گیر بوده و به ابزارهای گران قیمت نیاز دارد [۵،۶]. برای اندازه‌گیری MAU در مقایسه با HPLC؛ ایمونواسی ساده، حساس، اختصاصی و مؤثر در نمونه‌های کم حجم می‌باشد. ایمونوتوربیدیمتری (IT)، فلوروایمونواسی (FIA)، الایزا و رادیوایمونواسی (RIA) همه برای اندازه‌گیری کمی آلبومین ادرار پایه‌گذاری شده‌اند. با این وجود، این روش‌ها اغلب به زمان طولانی واکنش، وسایل و مواد خاص نیاز دارند و شامل چندین مرحله می‌باشند [۱۱-۷]. اخیراً Choi و همکارانش [۳] یک روش ایمونوکروماتوگرافی فلورسانس (ICG) برای اندازه‌گیری کمی آلبومین ادرار را معرفی نمودند. روش آنها بر اساس نوارهای تست برای سنجش ایمونوکروماتوگرافی فلورسانس (FICA) در یک کارتریج، یک نشانگر فلورسنت و یک قرائت‌گر فلورسانس لیزری بنا نهاده شده است. کاربرد این روش سنجش، به آزمایشگاه‌هایی محدود شده که با وسایل و لوازم آنالیز

مجهز شده‌اند. در سال‌های اخیر علاقمندی به ICG برای شناسایی سریع آنالیت‌ها زیاد شده است زیرا کاربرد آن آسان و نقطه پایانی قابل رؤیت است و هم در علوم بالینی و هم در علوم پایه فوایدی دارد و به عنوان یک ابزار تشخیصی در کلینیک برای تعیین مارکرهای توموری [۱۲]، هورمون‌ها [۱۳،۱۴]، ویروس‌ها [۱۷-۱۵]، باکتری‌ها، آنتی‌ژن‌های انگلی [۲۲-۱۸] و شناسایی داروها و سموم [۲۶-۲۳] به فراوانی استفاده می‌شود. انجام این تست سریع و آسان شده است. به علت جنبه‌های جدیدی از ICG که به انتقال یک واکنش‌دهنده به جفت اتصالی روی یک سطح غشایی وابسته است، این تکنیک اغلب استریپ اسی (Strip assay) یا سنجش جریان جانبی نامیده می‌شود. اساس این روش ایمونوکروماتوگرافی است که خصوصیات آنتی‌ژن - آنتی‌بادی را بکار برده و موجب شناسایی سریع یک آنالیت می‌گردد. این تکنیک چندین مزیت را باهم دارد از جمله راحتی کار با آن، زمان کوتاه سنجش، پایداری بلند مدت در محدوده وسیعی از شرایط و بهره‌وری بیشتر. این مشخصات، این روش را برای تشخیص در جا به وسیله افراد مبتدی ایده‌آل نموده است. پس ابداع یک روش تشخیصی راحت برای اندازه‌گیری سریع آلبومین ادرار، می‌تواند بسیار مطلوب باشد و در این زمان به نظر می‌رسد که روش بسیار جالبی است.

در مطالعه حاضر، mAb علیه HSA تولید و با نانوذرات کلونیدی طلا کنتزوگه شد تا یک روش استریپ ICG سریع و یک مرحله‌ای برای غربالگری و اندازه‌گیری کمی و نیمه کمی MAU در تشخیص اولیه نفروپاتی دیابتی و غیردیابتی بررسی گردد.

روش‌ها

کلرواوریک اسید (HAuCl₄)، RPMI1640، سرم جنین گوساله (FCS)، استرپتومايسين، پنی‌سیلین، آلبومین سرم گاو (BSA)، HSA، هموگلوبین، آنتی IgG موشی کنتزوگه با پراکسیداز (HRP)، ستون پروتئین G و سدیم سترات از شرکت سیگما (st.Louis,MO,USA) تهیه شدند. پلیت‌های الایزا (۹۶ خانه‌ای) و دیگر وسایل پلاستیکی از شرکت نانک (Nanc, MAX, ISORP, Roskilde, Denmark)

گردد، محلول نانو ذره طلا سرد شد تا به دمای آزمایشگاه برسد و pH آن توسط پتاسیم کربنات ۰/۰۱ مولار، ۸/۵ تنظیم گردید، سپس سدیم آزاید با غلظت نهایی ۰/۰۱٪ (W/V) اضافه و در دمای ۴°C در یک ظرف تیره رنگ تا زمان استفاده ذخیره شد. این محلول تا چندین ماه در دمای ۴°C قابل نگهداری است.

آماده‌سازی کنژوگه آنتی‌بادی-طلای کلئیدی

mAb با نانو ذرات کلئیدی طلا با روش زیر کنژوگه شد. قبل از کنژوگاسیون غلظت بهینه mAb برای اتصال به نانوذرات طلا به وسیله مراحل زیر تعیین گردید: محلول mAb با غلظت ۰/۰۵-۰/۰۱ mg/mL به یک سری از لوله‌های ۲ میلی‌لیتری حاوی ۱ mL محلول نانوذرات کلئیدی طلا با pH تنظیم شده اضافه شد. این لوله‌ها برای ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند و سپس ۵۰۰ میکرولیتر از NaCl ۱۰٪ به هر لوله اضافه و برای ۱ دقیقه دیگر هم زده شد. بعد از ۵ دقیقه میزان جذب در طول موج‌های ۵۲۰ و ۵۸۰ نانومتر (A580-A520) اندازه‌گیری گردید. حداقل مقدار mAb به وسیله تغییر رنگ از قرمز به آبی تخمین زده شد. غلظت بهینه mAb برای نشان‌دار کردن طلای کلئیدی، پایین‌ترین غلظت mAb که تغییر رنگ نداده است، می‌باشد. برای کنژوگاسیون ۶۰۰ میکروگرم از mAb (۳۰ μg/mL)، در فسفات بافر، pH ۷/۵) به ۲۰ mL از محلول طلای کلئیدی با pH تنظیم شده اضافه گردید. مخلوط به مدت ۳ ساعت به آرامی هم زده شد و ۴ mL از BSA ۱۰٪ اضافه شد تا سطح باقیمانده‌های نانوذرات کلئیدی طلا را بلوکه کند. سپس مخلوط ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. بعد از آن در rpm ۱۳۰۰۰ برای ۴۵ دقیقه در ۴°C سه بار سانتریفیوژ گردید. پس از آخرین سانتریفیوژ، رسوب طلا در ۲ mL بافر فسفات رقیق (بافر ۱۰ mM با pH ۷/۲، حاوی BSA ۱٪ و سدیم آزاید ۰/۰۵٪) حل شد و دانسیته نوری آن در ۵۲۰ nm توسط بافر رقیق‌کننده، ۸ تنظیم شد. این پروب طلای کلئیدی کوت شده با mAb علیه HSA تا زمان استفاده در ۴°C ذخیره گردید.

خریداری گردید. غشاهای نیتروسولوزی، فیبرهای شیشه‌ای و پدهای جاذب از شرکت Schleicher & Schell GmbH (Dassel, Germany) و شرکت Whatman (Fairfield, NJ, USA) تهیه شد.

تولید و تخلیص آنتی‌بادی منوکلونال

جزئیات تولید هیبریدوماهای ترشح کننده آنتی‌بادی منوکلونال علیه HSA در مقالات دیگر ذکر گردیده است [۲۷]. به طور خلاصه HSA خالص برای ایمونیزاسیون موش‌های BALB/c استفاده شد و هیبریدوماها به وسیله ادغام سلول‌های طحال با سلول‌های میلوما SP2/0 به دست آمدند. سوپرناتانت هیبریدوماها برای آزمایش واکنش‌پذیری با HSA استفاده شد که HSA به عنوان آنتی ژن اختصاصی و هموگلوبین به عنوان آنتی ژن غیر اختصاصی در روش الیزا بکار برده شدند. mAbs علیه HSA از طریق دو رقت متوالی انتخاب شدند. سلول‌های هیبریدوما در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی ۳٪ FCS کشت داده شدند و برای تخلیص آنتی‌بادی‌ها مایع رویی کشت سلولی از ستون کروماتوگرافی تمایلی دارای پروتئین G (HiTrap) Sigma (Aldrich, St. Louis, MO) عبور داده شد. آنتی‌بادی‌های جدا شده در مقابل بافر فسفات نمکی (PBS) دیالیز شدند. برای طراحی کیت ICG از کلون EMRC1 استفاده گردید.

سنز طلای کلئیدی

یک محلول آبی از کلرواوریک اسید (۰/۰۱٪ W/V H₂AuCl₄) و سیترات سدیم (۱٪ w/v) در آب دو بار تقطیر آماده شد. نانو ذرات کلئیدی طلا با متوسط قطر ۲۰ نانومتر مشابه روش Zhang و همکارانش اما با تغییرات جزئی، تهیه گردید [۲۸]. بدین منظور، محلول کلرواوریک اسید درون یک ارلن با یک مگنت (۱۰۰ mL) به وسیله گرم کننده الکتریکی حرارت داده شد تا به نقطه جوش برسد، سپس ۳ mL از محلول سدیم سیترات ۱٪ به محتوای ارلن با سرعت استیرینگ rpm ۱۰۰۰ اضافه شد. زمان واکنش ۲ دقیقه بود. در طول این مدت رنگ محلول از زرد روشن به قرمز شرابی تغییر می‌کند. بعد از این که جوشیدن ۶ دقیقه دیگر ادامه یافت تا احیای طلای کلئیدی کامل

تعیین خصوصیت کنژوگه‌ها

آنالیزهای اسپکتروسکوپی UV-vis

تشکیل نانوذرات کلئیدی طلا و طلای کلئیدی کوت شده با آنتی‌بادی به وسیله اسپکتروسکوپی UV-vis (۷۰۰nm-۲۰۰) و با استفاده از اسپکتروفوتومتر (Shimadzu-uv-3100) کنترل شد. محلول‌های طلا بلافاصله بعد از کنژوگاسیون و حل شدن کنژوگه‌ها در بافرهای مناسب و بعد از آگلوتیناسیون با آنتی‌بادی بزی علیه آنتی‌بادی موشی کنترل گردید.

بررسی پایداری حرارتی و فعالیت

حساسیت، فعالیت و پایداری حرارتی پروب کنژوگه و آنتی‌بادی آزاد، بعد از زمان‌های مختلف انکوباسیون (تا حدود ۱۰۰ ساعت) در دمای 37°C با استفاده از الیزای غیر رقابتی مستقیم و مطابق با روش شرح داده شده توسط امیدفر و همکاران [۳۰، ۲۹] تعیین گردید. بدین منظور، چاهک‌های پلیت الیزا با HSA $100\mu\text{L}$ ($1\mu\text{g}$) در هر چاهک (در فسفات بافر سالین به مدت یک شب در 37°C انکوبه شدند. به دنبال بلوکه کردن جایگاه‌های اتصال غیراختصاصی، به هر چاهک کنژوگه mAb علیه HSA با طلای کلئیدی و آنتی‌بادی آزاد با غلظت $1\mu\text{g}$ در هر چاهک اضافه و مانند شرایط قبل در 37°C انکوبه شدند. اتصالات باقیمانده توسط آنتی‌بادی کنژوگه با HRP شناسایی شدند و به صورت درصدی از مقدار دانسیته نوری بیان گردید. برای ارزیابی توانایی پروب کنژوگه و آنتی‌بادی آزاد نسبت تخریب گرمایی برگشت‌ناپذیر، $50\mu\text{g/mL}$ آنتی‌بادی رقیق شده در PBS به مدت ۴ ساعت در دماهای مختلف (40°C ، 40°C ، 50°C ، 60°C و 70°C) انکوبه شد، سپس به پلیت‌های الیزای پوشیده شده با $100\mu\text{L}/1\mu\text{g}$ آنتی‌ژن انتقال داده شدند. بقیه آزمایش‌ها به صورتی که در بالا شرح داده شد، انجام گردید. در قسمت‌های دیگر این مطالعه، پایداری حرارتی ایمونو استریپ‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف سوکروز (۳٪، ۵٪ و ۸٪) یک ماه بعد از ذخیره در 60°C و یک سال بعد از ذخیره در دمای آزمایشگاه تعیین و با محلول فاقد سوکروز مقایسه شد.

آماده‌سازی نوارهای تست ایمونوکروماتوگرافی

نوارهای تست طراحی شده از یک پد نمونه، یک پد کنژوگه با شناساگر و یک پد جاذب و یک کاغذ نیتروسولوزی با خطوط تست و کنترل تشکیل شده است. شکل ۱، دیاگرام شماتیکی از آماده‌سازی نوارهای تست ICG را نشان می‌دهد.

با استفاده از یک دستگاه پخش‌کننده، $1\mu\text{L}$ از غلظت‌های مختلف HSA رقیق شده در PBS (۱، ۳، ۵ و 10mg/mL) به عنوان یک عامل گیرنده برای اتصال mAb کنژوگه با ذرات کلئیدی طلا، روی کاغذ نیتروسولوزی ثابت گردید. آنتی‌بادی بزی علیه آنتی‌بادی موشی با غلظت 1mg/mL رقیق شده در PBS نیز روی کاغذ نیتروسولوزی ثابت گردید که به عنوان عامل گیرنده برای تأیید موفقیت آزمایش استفاده شد. این عوامل گیرنده به وسیله توزیع کننده Biojet Quanti 3000 روی یک کاغذ نیتروسولوزی به صورت دو ناحیه مجزا، یکی برای کنترل و دیگری برای تست، توزیع می‌شوند. سطح باقیمانده روی غشا توسط انکوباسیون با BSA 1% در PBS و سدیم آزاید 0.05% به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه بلوکه شد. نوارها یک بار با PBS شسته و خشک شدند. پروب آنتی‌بادی نشان‌دار شده با طلا ($4\mu\text{L}$) در هر نوار و بدون رقیق‌سازی) بر روی فیبر شیشه‌ای ریخته شده و در 45°C خشک گردید. ذرات طلا کلئیدی کوت شده با mAb علیه HSA در 15 میلی‌متری پایین فیبر شیشه‌ای قرار داده و سپس خشک شد و بدین ترتیب پد کنژوگه آماده گشت. کاغذ نیتروسولوزی، پد جاذب و پد کنژوگه به عنوان نوارهای آزمایش خشک و جمع‌آوری شدند. ورقه‌های لایه‌ای به پلیت‌های پلاستیکی چسبانده شدند و سپس به صورت نوارهای منفرد بریده شد (عرض نوارها $3/5$ میلی‌متر است). نوارها در یک بسته پلاستیکی همراه ژل خشک‌کننده بسته‌بندی و در 37°C ذخیره شد.

اساس نوارهای تست ایمونوکروماتوگرافی و

تعیین میکروآلبومینوری

این سنجش براساس تئوری واکنش رقابتی انجام شد (شکل ۱). $90\mu\text{L}$ از محلول استاندارد یا نمونه مورد نظر

فلاسک‌های ۵۰mL کشت داده شدند تا مقادیر زیادی از آنتی‌بادی‌های مورد نیاز تولید گردد. منحنی‌های استاندارد آنها در محدوده، ۱۰ng-۱۰pg رسم شدند.

تعیین خصوصیت ذرات کلوئیدی طلا

ذرات کلوئیدی طلا به وسیله فشرده‌سازی شیمیایی و با استفاده از احیای کلرواوریک اسید (HAuCl₄) سنتز شدند. کلرواوریک اسید توسط سدیم سیترات به اتم‌های طلا احیا شد و تعداد زیادی از این اتم‌ها به صورت نانو ذرات طلا جمع شدند. قطر ذرات کلوئیدی طلا به وسیله اندازه‌گیری UV-vis و میکروسکوپ الکترونی انتقالی ۲۰ نانومتر تخمین زده شد. شکل A۲ جذب نوری کنژوگه در غلظت‌های مختلف آنتی‌بادی را نشان می‌دهد. در مطالعه حاضر ۳۰µg از آنتی‌بادی به عنوان حداقل غلظت برای پایداری طلای کلوئیدی، تعیین گردید.

طیف‌های محلول طلای کلوئیدی قبل از کنژوگاسیون و کنژوگه آنتی‌بادی- ذرات کلوئیدی طلا به تنهایی و بعد از آگلوتیناسیون با آنتی‌بادی بزی ضد آنتی‌بادی موشی در شکل B۲ نشان داده شده است. آنالیز اسپکتروسکوپی UV-vis، ماکزیمم جذب را در ۵۲۰nm نشان داد و تصاویر میکروسکوپ الکترونی انتقالی، نشان داد که متوسط قطر ذرات کلوئیدی طلا ۲۰nm است. این نتایج نشان داد که ذرات کلوئیدی طلا، مبنای لازم برای تهیه پروب و تولید سیگنال در نوار تست، را تأمین نمودند.

فعالیت و پایداری حرارتی In vitro

برای بررسی وضعیت و پایداری حرارتی پروب کنژوگه و آنتی‌بادی آزاد مطابق روش امیدفر و همکاران [۳۰،۲۹] عمل شد. در این روش، فعالیت اتصال به آنتی‌ژن mAb آزاد و پروب کنژوگه بعد از زمان‌های مختلف (۱۰۰ ساعت) انکوباسیون در ۳۷°C تعیین گردید. آنتی‌بادی‌های آزاد، حدود ۴۰٪ از عملکرد خود را بعد از ۵۰ ساعت انکوباسیون در ۳۷°C از دست دادند درحالی که پروب کنژوگه ۷۰٪ از ماکزیمم ظرفیت اتصال به آنتی‌ژن خود را بعد از ۸۰ ساعت انکوباسیون حفظ نمود (شکل A۳). پایداری پروب کنژوگه و آنتی‌بادی آزاد تا حدود دنیچره

روی پد نوار آزمایش اضافه گشت. سپس نوارها به صورت خوابیده قرار گرفتند تا محلول به درون کاغذ نفوذ کند. واکنش بین mAb-طلای کلوئیدی و آنالیت بلافاصله اتفاق افتاد و همراه چسب ثابت‌کننده به درون کاغذ نیتروسولوزی حرکت نمود. آنالیت و HSA ثابت روی نوار تست برای اتصال به مقدار محدودی از mAb علیه HSA نشان‌دار شده با طلای کلوئیدی با هم رقابت می‌کنند. هرچه میزان بیشتری از HSA در نمونه وجود داشته باشد، خط تست ضعیف‌تر به نظر می‌رسد. مقدار اضافی mAb آنتی-HSA نشان‌دار، بیشتر مهاجرت کرده و توسط آنتی‌بادی‌های IgG بزی ضد آنتی‌بادی موشی در خط کنترل به دام افتادند. به محض این که همه محلول به بالای ایمونواستریپ (معمولاً کمتر از ۱۰ دقیقه) رسید، یک رنگ قابل رؤیت در خط کنترل و یا خط تست ظاهر می‌گردد. در نهایت، سنجش ایمونو توریدیمتری (Randox) انجام شد تا سطح آلبومین در ۴۰ نمونه مختلف ادرار اندازه‌گیری گردد، نتایج آنها با نتایج حاصل از ایمونواستریپ مقایسه شد.

یافته‌ها

تولید و تعیین خصوصیت آنتی‌بادی‌ها علیه HSA

طراحی یک کیت سنجش ICG برای غربالگری MAU تشخیص اولیه نفروپاتی دیابتی و غیر دیابتی مقادیر فراوانی از mAb نیاز دارد. برای دستیابی به این هدف، هیبریدوماهای تولیدکننده آنتی‌بادی علیه HSA به وسیله ادغام سلول‌های طحال از موش‌های ایمونیزه شده با رده سلولی میلوما موشی (SP2) حاصل شدند. پس از آزمایش‌های متعدد، ۳ کلون تولیدکننده آنتی‌بادی با نام‌های EMRC1-3 شناسایی گردیدند که با دیگر پروتئین‌ها واکنش متقاطع کمی داشتند. این کلون‌ها از کلاس IgG بودند و زنجیره سبک K داشتند. تعیین زیرکلاس این آنتی‌بادی‌ها نشان داد که هر ۳ نوع به صورت IgG1 ترشح می‌شدند. نتایج تخلیص تمایلی برای دو کلون EMRC1 و EMRC3، تمایل بالای آنها را به HSA نشان داد بدون این که هیچ واکنش متقاطع با دیگر پروتئین‌ها داشته باشند. هیبریدوماهای پایدار ترشح کننده mAb آنتی-HSA در

آلبومین بیشتر از $25-30 \mu\text{g/mL}$ در نظر گرفته شود. علاوه بر این، در غلظت $200 \mu\text{g/mL}$ یا بیشتر آلبومین هیچ بانندی در خط تست مشاهده نشد.

اختصاصیت ایمونواستریپ

برای بررسی اثر مواد مداخله کننده در آزمایش، اوره (1 mol/L)، کراتینین (10 gr/L)، هموگلوبین انسان (10 mg/L)، ایمونوگلوبولین انسان (10 mg/L)، گلوکز (20 gr/L)، تتراسایکلین (200 mg/L) و استامینوفن (200 mg/L) به ادرار فرد سالم (با افزایش میزان غلظت آلبومین در ادرار) اضافه شدند. نتایج نشان داد که هیچ یک از مواد بالا با نتایج حاصل از کیت نیمه کمی تست میکروآلبومینوری تداخل نداشتند.

استریپ‌های ICG طراحی شده برای آزمایش ۲۵ نمونه مثبت ادرار و ۱۵ کنترل منفی استفاده گردیدند. همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، برای ۲۳ بیمار با آلبومینوریا، جواب تست مثبت و برای ۲ بیمار با MAU در محدوده $20-25 \mu\text{g/mL}$ جواب منفی به دست آمد. برای نمونه‌های ادرار کنترل از افراد سالم، دو باند مشاهده گردید: باند پایینی (خط تست) رنگ شدیدتری نسبت به باند بالایی (خط کنترل) داشت.

مقایسه تست استریپ ایمونوکروماتوگرافی با

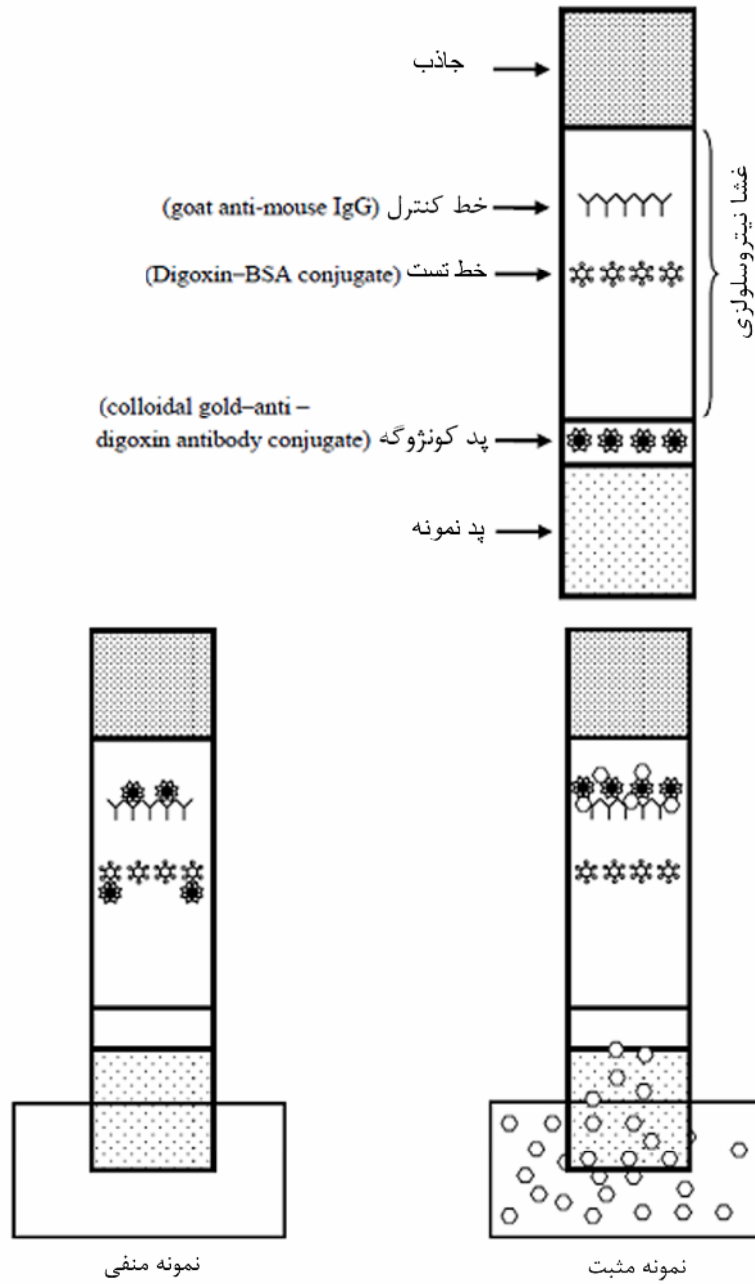
سنجش ایمونوتوریدیمتری

اعتبار روش طراحی شده به وسیله انجام تست ICG با ۴۰ نمونه ادرار و مقایسه نتایج آن با نتایج حاصل از IT بررسی گردید (جدول ۱). نتایج نشان داد که هر دو روش تطابق معنی‌داری در تشخیص دارند. نتایج همچنین نشان داد که ICG، حساسیت ۹۲ درصدی، اختصاصیت ۸۳٪، اعتبار پیش‌گویی مثبت ۱۰۰٪ و اعتبار پیش‌گویی منفی ۸۳٪ دارد.

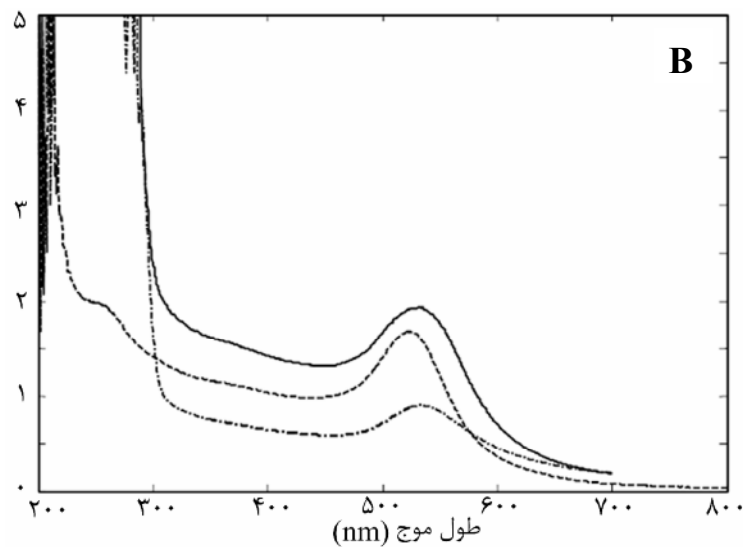
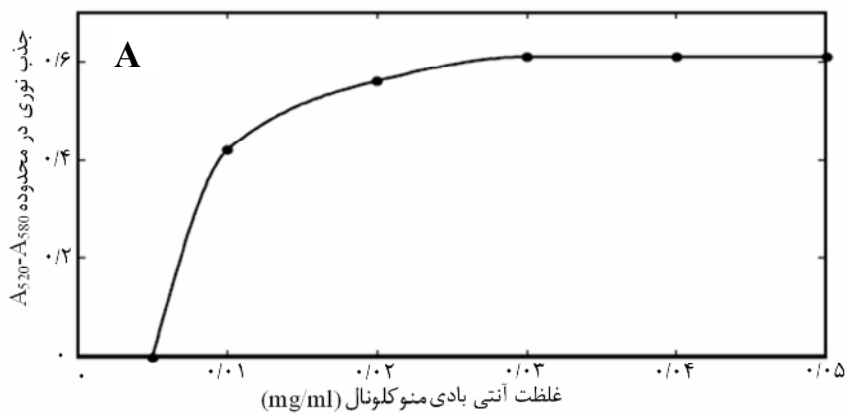
شدن گرمایی برگشت‌ناپذیر، به وسیله تعیین فعالیت اتصال به آنتی‌ژن به دنبال انکوباسیون در محدوده‌ای از دماها به مدت ۴ ساعت، آزمایش گردید. هم پروب کنژوگه و هم آنتی‌بادی آزاد، مقاومت قابل توجهی در برابر تخریب برگشت‌ناپذیر از خود نشان دادند. یعنی هرکدام از آنها به ترتیب ۸۸٪ و ۶۸٪ از فعالیت اتصال خود را به دنبال انکوباسیون در 60°C برای ۴ ساعت حفظ کردند. همچنین هر کدام از آنها بیشتر از ۷۰٪ عملکرد خود را بعد از ۴ ساعت در 70°C و 80°C از دست دادند (شکل B۳). نتایج نشان داد که ایمونواستریپ، توانایی شناساگری خود را در غلظت ۳٪ سوکروز در دمای 60°C برای حداقل یک ماه و در دمای آزمایشگاه برای یک سال حفظ می‌کند.

حساسیت روش ایمونواستریپ

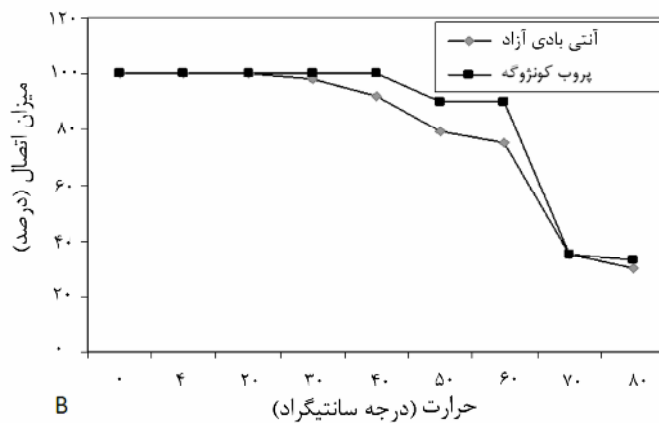
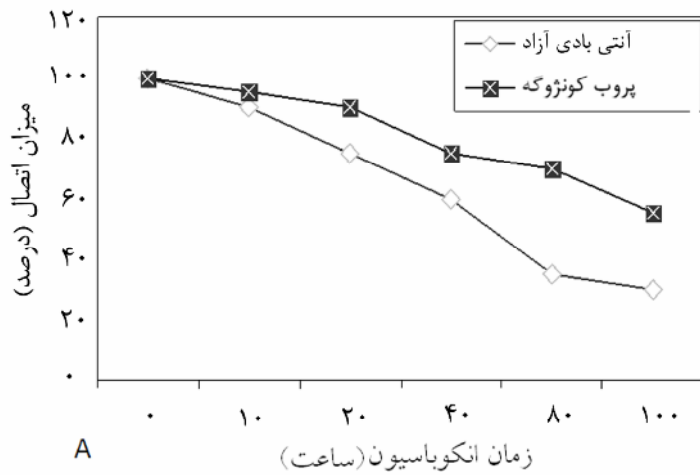
حساسیت ایمونواستریپ طراحی شده به وسیله آزمایش نمونه‌های استاندارد HSA تعیین گردید. محلول ذخیره آلبومین (1 mg/mL) با نمونه‌های نرمال ادرار، رقیق شده و غلظت‌های نهایی ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۶۵، ۸۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۰۰ $\mu\text{g/mL}$ به دست آمد، بدین ترتیب ترکیبات استاندارد آماده شدند. سپس این نمونه‌های استاندارد با چشم غیرمسلح بررسی شدند. پدیده پاسخ به دوز (شدت رنگ در خط تست) در روش ICG به وسیله نمونه‌های استاندارد تعیین گردید. شدت رنگ خط تست با افزایش غلظت HSA در نمونه‌های استاندارد کاهش یافت (شکل ۴). این تفاوت در شدت رنگ در پاسخ به غلظت HSA به عنوان نشانگری برای کمی کردن نتایج استفاده شد. در این تست، غلظت کوتینگ $5 \mu\text{g/mL}$ ، برای HSA بهینه بود. اگر شدت رنگ خط تست بیشتر از خط کنترل باشد، غلظت آلبومین $10 \mu\text{g/mL}$ ، اگر یک باند با شدت رنگ مشابه در خط کنترل و تست مشاهده گردد، غلظت $20-18 \mu\text{g/mL}$ و اگر شدت رنگ خط تست ضعیف‌تر از کنترل باشد، غلظت



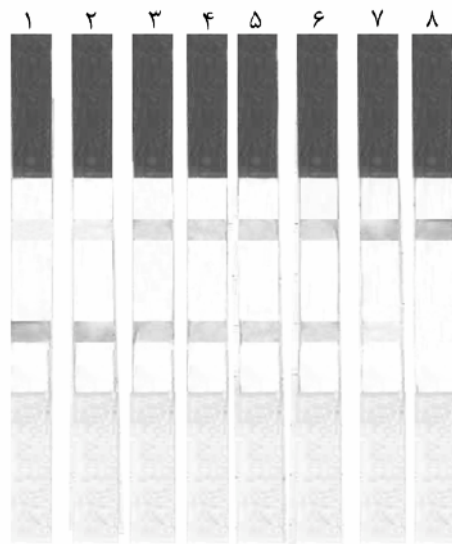
شکل ۱- طرح شماتیک از کیت ایمنونوکروماتوگرافی و اجزای تشکیل دهنده آن



شکل ۲- (A) جذب نوری کنژوگه در غلظت‌های مختلف آنتی‌بادی. (B) اسپکتروسکوپی UV-vis کلونید طلا، کنژوگه و کنژوگه طلا-آنتی‌بادی بعد از آگلوتینه شدن با آنتی‌بادی ثانویه. نقطه چین: کلونید طلا؛ خط ممتد: کنژوگه آنتی‌بادی- طلا؛ خط-نقطه: نمونه آگلوتینه شده.



شکل ۳- (A) فعالیت ایمنی آنتی‌بادی آزاد و پروب کنژوگه بعد از ۱۰۰ ساعت انکوباسیون در ۳۷°C. (B) بررسی پایداری آنتی‌بادی آزاد و پروب کنژوگه در برابر تخریب حرارتی برگشت ناپذیر. فعالیت اتصال آنتی‌بادی با توجه به یک کنترل بدون تیمار به دنبال انکوباسیون در یک محدوده دمایی برای ۴ ساعت تعیین گردید. همه سنجش‌ها به صورت دوتایی انجام شد.



شکل ۴- نتایج تست استانداردهای کار با غلظت‌های مختلف در ادرار با استفاده از نوارها [۱] ۱۰ μg/ml [۲] ۱۵ μg/ml [۳] ۲۰ μg/ml [۴] ۲۵ μg/ml [۵] ۳۰ μg/ml [۶] ۴۰ μg/ml [۷] ۵۰ μg/ml [۸] ۱۰۰ μg/ml غلظت پروتئین کروت کننده ۱ μL از ۱ و ۵ mg/ml به ترتیب برای خط کنترل و خط تست.

جدول ۱- تعیین آلبومین ادرار به وسیله ایمونوتوربیدیمتری و نوار ایمونوکروماتوگرافی
همه نتایج ۱۰ دقیقه بعد از آزمایش بررسی شده‌اند

نوع سنجش	تعداد کل	طبیعی	میکروآلبومینوری	ماکروآلبومینوری
ایمونوتوربیدیمتری	۴۰	۱۵	۲۴	۱
نوار ایمونوکروماتوگرافی	۴۰	۱۷	۲۲	۱

بحث

فشار ناشی از هزینه‌های پزشکی و تشخیصی و ضرورت اتوماسیون بیشتر، موجب گسترش سیستم‌های اطلاعاتی و به حداقل رساندن مراحل آزمایش در آزمایشگاه‌های تشخیصی شده است. در واقع یک راه برای کاهش هزینه‌های پزشکی، کاهش هزینه‌های آزمایشگاهی و تشخیصی است که از طریق بکارگیری وسایل ساده ایمونواسی و طراحی روش‌های سریع، دقیق و حساس برای تشخیص میسر می‌گردد [۳۰].

سنجش ICG، بر اساس روش ایمونوکروماتوگرافی بنا نهاده شده است که آنتی‌بادی-آنتی‌ژن را به صورت جدیدی بکار گرفته تا تشخیص سریع آنالیت فراهم گردد. ذرات کلونیدی طلا برای توسعه ایمونواستریپ یک مرحله‌ای بکار برده شده است. مولکول‌های آلی مثل آنتی‌بادی می‌توانند توسط پیوندهای غیرکوالان شامل نیروی واندروالس و برهمکنش‌های هیدروفوبیک، مستقیماً به نانو ذرات طلا متصل گردند. تعادل بین دافعه الکترواستاتیک و جاذبه واندروالس در بین ذرات، منجر به تشکیل محلول طلای کلونیدی می‌گردد. اندازه ذرات کلونیدی طلا به طور مستقیم به مقدار محلول سیترات به عنوان ذرات یونی بستگی دارد. شدت رنگ به اندازه و مقدار ذرات کلونیدی طلا مرتبط است [۳۰، ۳۱]. وقتی محلول یونی اضافه می‌شود نیروی جاذبه بزرگ‌تر از برهمکنش مواد شده که منجر به تجمع ذرات و تغییر رنگ از قرمز (۵۲۰nm, $\lambda_{max} \sim 520$) به آبی (۵۸۰nm, $\lambda_{max} \sim 580$) می‌گردد [۳۱]. می‌توان از این ناپایداری ذرات کلونیدی طلا توسط پوشاندن سطح کلونیدی با مولکول‌های پروتئینی مانند آنتی‌بادی جلوگیری کرد. می‌توان از تشکیل یک کنژوگه پایدار طلای کلونیدی و mAb به وسیله حداقل مقدار آنتی‌بادی ممانعت نمود. بنابراین،

آزمایش‌های اولیه رقت سریالی برای تعیین حداقل غلظتی از آنتی‌بادی انجام می‌شوند که برای داشتن یک جذب قوی بین کنژوگه طلا و آنتی‌بادی کافی می‌باشد. سطوح با مقیاس نانو، که توسط ذرات کلونیدی طلا فراهم شدند، می‌تواند واکنش آنتی‌بادی-آنتی‌ژن را به میزان کافی سرعت بخشیده و شدت سیگنال‌ها را برای ایمونواسی افزایش دهد [۳۱].

در مطالعه حاضر، یک روش ایمونوکروماتوگرافی برای تعیین آلبومین ادرار طراحی گردید. این سنجش یک مرحله‌ای براساس واکنش ایمونوشیمی رقابتی بین آلبومین در نمونه‌های ادرار و آلبومین ثابت شده روی کاغذ به جهت اتصال با شناساگر بنا شده است.

آلبومین حاضر در ادرار به ذرات کلونیدی طلا متصل شده و کمپلکس آنتی‌بادی-آنتی‌ژن به درون کاغذ نیتروسولوزی نفوذ می‌کند. این نوارهای تست از طریق شناسایی چشمی خط تست، یک تشخیص ساده و آسان آلبومین ادرار در مدت ۱۰ دقیقه را امکان‌پذیر می‌سازد که وجود یک خط کنترل اعتبار و عملکرد آزمایش را تأیید می‌کند. در مقادیر کم آلبومین در نمونه، این نانوذرات طلا به خط تست متصل شده و یک باند قرمز رنگ روی کاغذ ایجاد می‌کنند. همانطور که مقدار آلبومین در ادرار افزایش می‌یابد، نانوذرات کلونیدی بیشتری به درون باند اول (خط تست) نفوذ کرده و به باند دوم (خط کنترل) متصل می‌شود. بعد از ۱۰ دقیقه، تیرگی یا شدت دو باند قرمز روی کاغذ نیتروسولوزی با هم مقایسه می‌گردد. اگر شدت رنگ خط تست بیشتر یا برابر با خط کنترل باشد، تست منفی است و بالعکس.

تست‌های ایمونوکروماتوگرافی طراحی شده در این تحقیق با استفاده از mAb به نام EMRC1 کنژوگه با ذرات کلونیدی طلا ۲۰ نانومتری، حساسیت بالایی برای تشخیص MAU را نشان داد. دقت تشخیص نوارهای تست، تقریباً $20 \mu\text{g/ml}$ بود.

نواری ICG برای تشخیص آلبومین ادراری در محدوده MAU ساده، معتبر و اختصاصی است.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

قابلیت تولید بالا، حساسیت و اختصاصیت زیاد این تست سریع، ارزیابی شد و با استفاده از نمونه‌هایی از بیماران مختلف و افراد سالم به عنوان کنترل تأیید گردید (جدول ۱).
نوارهای تست هیچ واکنش متقاطع با دیگر پروتئین‌های انسان در محدوده‌های بیولوژیکی نشان نداد. علاوه بر این در حضور پروتئین‌های متنوع انسان و داروهای متداول و دیگر موادی که احتمالاً در ادرار وجود دارند، هیچ تداخلی در تشخیص آلبومین مشاهده نشد. این نتایج نشان داد که تست

مأخذ

- Redon J. Measurement of micro-albuminuria-What the nephrologists should know. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 573-576.
- 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.
- 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.
- Kessler MA, Meinitzer A, Petek W, Wolfbeis OS. Microalbuminuria and borderline increased albumin excretion determined with a centrifugal analyzer and the albumin blue 580 fluorescence assay. *Clin Chem* 1997; 43: 996-1002.
- Brinkman JW, Bakker SJ, Gansevoort RT, Hillege HL, Kema IP, Gans RO, de Jong PE, 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.
- Sviridov D, Meilinger B, Drake SK, Hoehn GT, Hortin GL. Coelution of other proteins with albumin during size-exclusion HPLC: Implications for analysis of urinary albumin. *Clin Chem* 2006; 52: 555-556.
- Song JF, Liu YQ, Guo W. Polarographic direct determination and homogenous immunoassay of anti human serum albumin (HSA) by parallel catalytic hydrogen wave of anti HAS. *Anal Biochem* 2003; 314: 212-216.
- Aybay C, Karakus R. Measurement of urine albumin levels with a monoclonal antibody based in-house ELISA. *Turk J Med Sci* 2003; 33: 1-5.
- Sviridov D, Drake SK, Hortin GL. Reactivity of urinary albumin (microalbumin) assays with fragmented or modified albumin. *Clin Chem* 2008; 54: 61-68.
- Comper WD, Jerums G, Osicka TM. Differences in urinary albumin detected by four immunoassays and high-performance liquid chromatography. *Clin Biochem* 2004; 37: 105-111.
- Choi S, Choi EY, Kim DJ, Kim JH, Kim TS, Oh SW. A rapid, simple measurement of human albumin in whole blood using a fluorescence immunoassay (I). *Clinica Chimica Acta* 2004; 339: 147-156.
- Nagatani N, Yuhi T, Chikae M, Kerman K, Endo T, Kobori Y, Takata M, Konaka H, Namiki M, Ushijima H, Takamura Y and Tamiya E. A sensitive immunochromatographic assay using gold nanoparticles for the semiquantitative detection of prostate-specific antigen in serum. *Nanobiotechnology* 2006; 2: 79-86.
- 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.
- Laitinen MPA, Vuento M. Immunochromatographic Assay for Quantification of Milk Progesterone. *Acta Chem Scand* 1996; 50: 141-145.
- Reina J, Ferrés F. Sensitivity evaluation of an immunochromatographic test for the rapid antigen detection of adenovirus. *J Clin Virol* 2008; 42: 291-292.
- Nishizono A, Khawplod P, Ahmed K, Goto K, Shiota S, Mifune K, Yasui T, Takayama K, Kobayashi Y, Mannen K, Tepsumethanon V, Mitmoonpitak C, Inoue S, Morimoto K. A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis. *Microbiol Immunol* 2008; 52: 243-249.
- Louie B, Wong E, Klausner JD, Liska S, Hecht F, Dowling, Obeso M, Phillips SS, Pandori MW. Assessment of rapid tests for detection of human immunodeficiency virus-specific antibodies in recently infected individuals. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1494-1497.
- Wu YS, Lei LM, Li M. Evaluation of a parasite lactate dehydrogenase-based colloid gold-immunochromatography assay for diagnosis of *Plasmodium falciparum*. *J First Mil Med Univ* 2005; 25: 761-765.
- Pastoor R, Hatta M, Abdoela TH, Smits HL. Simple, rapid, and affordable point-of-care test

- for the serodiagnosis of typhoid fever. *Diagn Mic Infec Dis* 2008; 61:129-134.
20. Zhang GP, Guo JQ, Wang XN, Yang JX, Yang YY, Li QM, Li XW, Deng RG, Xiao ZJ, Yang JF, Xing GX, Zhao D. Development and evaluation of an immunochromatographic strip for trichinellosis detection. *Vet Parasitol* 2006; 137: 286–293.
 21. Zhang R, Jiang Y, Chen GX, Yan WW. The evaluation of immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies in identification of Mycobacterium tuberculosis. *Chin J Lab Med* 2005; 28: 793–795.
 22. Smits HL, Abdoel TH, Solera J, Clavijo E, Diaz R. Immunochromatographic Brucella-specific immunoglobulin M and G lateral flow assays for rapid serodiagnosis of human brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10: 1141–1146.
 23. Gandhi S, Caplash N, Sharma P, Suri CR. Strip-based immunochromatographic assay using specific egg yolk antibodies for rapid detection of morphine in urine samples. *Biosensors and Bioelectronics* 2009; 25: 502–505.
 24. Marchei E, Colone P, Nastasi GG, Calabrò C, Pellegrini M, Pacifici R, Zuccaro P, Pichini S. On-site screening and GC-MS analysis of cocaine and heroin metabolites in body-Packers urine. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 48: 383-387.
 25. Tang D, Saucedo 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.
 26. Omidfar K, Kia S, Kashania 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: 843-55.
 27. Omidfar K, Kashanian S, Paknejad M, Kashanian S, Larijani B, Roshanfekar H. Production and characterization of monoclonal antibody against human serum Albumin. *Hybridoma* 2007; 26: 217-222.
 28. Zhang GP, Wang XN, Yang JF, Yang YY, Xing GX, Li QM, Zhao D, Chai SJ, Guo JQ. Development of an immunochromatographic lateral flow test strip for detection of β -adrenergic agonist Clenbuterol residues. *J Immunol Methods* 2006; 312: 27–33.
 29. Omidfar k, Rasae MJ, Zaraee AB, Amir MP, Rahbarizadeh F. Stabilization of penicillinase-hapten conjugate for enzyme immunoassay. *J Immunoassay Immunochemistry* 2002; 23: 385-398.
 30. Omidfar K, Rasae 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.
 31. Hermanson GT, Mallia AK, Smith PK. Immobilized Affinity Ligand Techniques. *Academic Press San Diego* 1992.