جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤

International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

راه اندازي سنجش آفلاتوكسين B1 به روش كمي لومينسانس الايزا

زهرا اميني بيات[1] * سعيد بيان الحق[2] سامان حسينخاني[1]** نادري منش[1] امين باقي زاده[3]

۱- گروه بيوشيمي -دانشكده علوم پايه- دانشگاه تربيت مدرس - تلفن ۸۰۱۱۰۰۱ – داخلي ۴۴۰۷
zahra_aminibaiat @ yahoo.com
۲- گروه ايمونولوژي -دانشكده علوم پزشكي- دانشگاه تربيت مدرس
۳- پژوهشكده علوم محيطي -مركز بين المللي علوم و تكنولوژي پيشرفته كرمان

چكيده:
آفلاتوكسين ها مواد سمي هستند كه توسط برخي از قارچها توليد مي شوند و باعث آلودگي غذاي دامها و نيز غذاي انسان ها ميشوند. علاوه بر اين آلودگي در بدن دام ها پايدار شده و از طريق محصولات آنها به انسان منتقل مي شوند. شايان توجه است كه در ايران پسته بيش از غلات و مواد غذايي ديگر در معرض اين آلودگي قرار دارد. آفلاتوكسين ها انواع مختلفي دارند كه نوع B1 آن به عنوان يك مادة سرطانزاي قوي شناخته شده است از اين رو اندازه گيري آن داراي اهميت بسياري مي باشد. در اين پژوهش هدف ما اندازه گيري آفلاتوكسين B1 به روش كمي لومينسانس الايزا بوده است. براي اين سنجش ابتدا آفلاتوكسين B1 به آنزيم پراكسيداز متصل گرديده و سپس شرايط لازم براي سنجش مقادير آفلاتوكسين B1 نمونه هاي مختلف با استفاده از روش كمي لومينسانس الايزا بهينه سازي گرديد.

كلمات كليدي: آفلاتوكسين B1 ، كمي لومينسانس الايزا

Development of aflatoxin B1 measurement by Chemiluminescence enzyme immunoassay

Abstract:

Aflatoxins are toxic and carcinogenic compounds. They are metabolites of fungi *Aspergillus flavous* and *Aspergillus parasiticus*. They can contaminate with human and animals foods and due that can persist and stabilized. Aflatoxin B1 is the most component of aflatoxins and the most carcinogenic which can be found in cereals, corn, peanuts, cotton seed and nuts. In Iran, pistachio is one of the most contaminated nuts. Due to its economical effects, its screening and measurements is very important. Chemiluminescence Enzyme Immunoassay (CLEIA) is a highly sensitive method towards measurement and identification of metabolites, toxins, and different antigens. The aim of this research is development and standardization of a method for measuring of aflatoxin B1 by CLEIA. Conjugation of HRP with Aflatoxin B1 and also optimization of coated antibody up to an optimum level were achieved. Specificity and sensitivity of method will also be reported.

مقدمه:
آفلاتوكسين ها مواد سمي مي باشند كه توسط برخي از قارچ ها توليد مي شوند و غذاي اصلي انسانها از جمله غلات و حبوبات، شير، گوشت و نيز غذاي دام ها را آلوده مي سازند و متعاقب آن انسانهايي كه از اين دامها و محصولات آنها استفاده مي نمايند آلوده مي شوند. آفلاتوكسين نوع B1 كه نوع اصلي آفلاتوكسين آلوده كنندة مواد غذايي مي باشد از سال ۱۹۷۸ توسط مراجع رسمي به عنوان يك ماده سرطانزاي بسيار قوي شناخته شده است و استفاده از مواد غذايي آلوده به آن سبب مسموميت شديد مي گردد. [۱] بنابراين اندازه گيري ميزان آفلاتوكسين در مايعات بيولوژيك ضرورتي اجتناب ناپذير مي باشد. روش كمي لومينسانس كه يك روش جديد و بسيار حساس مي باشد قادر به اندازه گيري مقادير مواد مختلف در مايعات و محلولهاي مختلف تا حد 10^{-21} مول مي باشد بنابراين اندازه گيري ميزان آفلاتوكسين با استفاده از اين روش مزاياي بسيار متعددي نسبت به روش هاي ديگر دارد. [۲] در اين تحقيق سعي بر اين بوده است كه يك روش اندازه گيري ميزان مقادير مختلف افلاتوكسين در مايعات مختلف بيولوژيك براساس روش كمي لومينسانس الايزا طراحي و كارآمد شود. مبناي اصلي روش ما براساس رقابت مابين كونژوگه حاوي آنزيم پراكسيداز و افلاتوكسين B1 با نمونه هاي حاوي افلاتوكسين B1 احتمالي مي باشد كه اين رقابت در ميكروپليت هاي كمي لومينسانس پوشش داده شده با آنتي بادي انتي افلاتوكسين B1 انجام مي پذيرد.

مواد و روش ها:

مواد:
آنتي بادي آنتي آفلاتوكسين B1 (abcam)، آفلاتوكسين B1 (sigma)، كونژوگة آفلاتوكسين BSA-B1 (sigma)، پليت كمي لومينسانس(greiner)، سوبستراي كمي لومينسانس،آنزيمHorseradish peroxidase (sigma)، Sephadex G-25،Sephadex G-100، سديم پريدات، سديم سيانوبوروهيدريد.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مراحل انجام کار:

اتصال آنزيم HRP به افلاتوكسين B1 به دو طريق مستقيم و غيرمستقيم (رابط BSA) انجام شده است، در مزدوج سازي آنزيم HRP با افلاتوكسين B1 به روش spontaneous [3] محلول افلاتوكسين B1 در DMF با محلول HPR مخلوط مي شود اين مخلوط در دماي RT به مدت چندين ساعت بصورت يكنواخت تكان داده مي شود اين مخلوط در محلول سديم كلريد ۰/۲% دياليز شده و محلول نهايي با گليسرول ۲% دو برابر رقيق شده و سپس در دماي 4درجه نگهداري مي شود.
مزدوج سازي آنزيم HRP با افلاتوكسين B1 متصل به BSA به روش اكسيداسيون پريودات بصورت زير انجام شد. [۴]
آنزيم HRP در بافراستات حل شده و محلول پريودات به آن افزوده مي شود و سپس انكوباسيون مناسب انجام شده و توسط ستون G25 جداسازي نمك ها انجام مي شود. Fraction هاي جمع آوري شده به افلاتوكسين متصل به BSA افزوده مي شود سپس انكوباسيون در ۴درجه انجام مي شود در نهايت محلول سديم سيانوبوروهيدريد به آن افزوده شده و مجددا در ۴درجه انكوبه شده و PH محلول به زير ۷ رسانده شد و جداسازي بوسيلة ستون G-100 انجام شد. كونژوگة بدست آمده در پليتهاي تجاري پوشش داده شده با آنتي بادي انتي افلاتوكسين B1 واكنش داده شد، علاوه براين، اين كونژوگه را در ميكروپليت هاي كمي لومينسانس الايزا كه آنتي بادي آنتي آفلاتوكسين B1 را در رقت بسيار پايين (نسبت به الايزا) پوشش داده بوديم مورد بررسي قرار داديم.
جهت بررسي پوشش دهي آنتي بادي آنتي آفلاتوكسين B1 در پليت هاي الايزا وبررسي ظرفيت چاهك هاي پليت، ابتدا آنتي بادي آنتي آفلاتوكسين B1 بصورت رقت هاي serial درون پليت الايزا پوشش داده شد سپس آنزيم HRP بصورت مستقيم به چاهك هاي فوق افزوده شدو پس از گذشت زمان انكوباسيون و شستشو، سوبستراي TMB افزوده شدو O.Dآن ثبت شد. [۵] مراحل فوق در پليت كمي لومينسانس الايزا تكرار گرديد.

نتايج و بحث:

در روش مزدوج سازي spontaneous، RLU هاي بدست آمده نشان دهندة عدم يكنواختي قابل توجه و بازده پايين فرآيند كونژوگه سازي بود. بنابراين از روش پريودات با تغييرات اعمال شده براي مزدوج سازي كونژوگه aflatoxin-BSA به آنزيم HRP استفاده شد كه نتايج بدست آمده نشان دهنده بازده بالاي اين روش بود. اين كونژوگه در ارزيابي با آنتي بادي پوشش داده شده در ميكروپليت هاي الايزا كه بصورت تجاري موجود است داراي O.D بدست آمده بسيار مناسبي بود كه قابل مقايسه با كونژوگه تجاري تهيه شده بصورت افلاتوكسين B1 _ HRP بود. فعاليت كونژوگة فوق (برحسب RLU) با فعاليت كونژوگة تجاري متعاقب اتصال به آنتي بادي پوشش داده شده در پليت كمي لومينسانس الايزا مقايسه گرديد. نتايج حاصله معرف عدم دخالت حضور BSA در اين كونژوگه در واكنش با افلاتوكسين B1 مي باشد. نتايج مربوط به پايداري كونژوگه و حساسيت و ويژگي اين كونژوگه و نيز روش مورد استفاده در اندازه گيري و تشخيص افلاتوكسين استاندارد و سنجش نمونه هاي پسته آلوده به افلاتوكسين ارزيابي شد.

منابع:

[1] . waliyar, Farid. , Reddy, S.V.
Properties of aflatoxin and its producing fungi.
www. Aflatoxin . net. 2004

[2] . Akhavan – Trafti, Hashem., Xie, wenhua, desilva, Renuka., G. ripps, willian., Et al,
Robost new chemiluminescent proxidase substrates.,
IVD technology. , 2004 , www. Devicelink . com / ivdt

[3] . Burkin, A. A. , kononenko, G. P. , soboleva, N. A.
products of spontaneous conjugation of Aflatoxins with BSA; immunochemical properties.,
Applied Biochemistry and microbiology. 2003, 39, 202- 209.

[4] . Aslam, M., Dent, A.
Bioconjugation: protein coupling Techniques for the Biomedical sciences.
Macmillan Reference LTD . 1998

[5] . Steinitz, M., Baraz, L.
A rapid method for estimating the binding of ligands to ELISA microwells.
Journal of Immunological methods. 2000, 238, 143-150