MICROS

فصلنامه علمی فرهنگی میکروس
شماره ۶ – پاییز و زمستان ۱۳۹۸ – قیمت ۱۰۰۰تومان

سیستم های میکروسیالی

تشخیص سلول های توموری در خون

پاتوتیپ های اسهال E.coli

آنتی بادی های کاتالیتیک

سخن سردبیر	۴
سیستم های میکروسیالی، ابزاری نوین در آنالیزهای سلولی-مولکولی	۵
آنتی بادی های کاتالیتیک (ابزایم ها) و کاربرد آن ها	۱۱
بررسی پاتوتیپ های اسهال E.coli	۱۵
خبرهای علمی	۱۶

فصلنامه علمی فرهنگی میکروس
دانشگاه الزهراء (س)
سال سوم / شماره ششم / پاییز و زمستان ۹۵
صاحب امتیاز: انجمن میکروبیولوژی دانشگاه الزهراء(س)
*مدیر مسئول و سردبیر : فاطمه بردبار
هیئت تحریریه :دکتر پریسا محمدی، دکتر محمد رضا صعودی، فاطمه بردبار، مرضیه موسی زاده، المیرا نقدی، فاطمه مشتاقی
اساتید مشاور :دکتر پریسا محمدی، دکتر محمد رضا صعودی
صفحه آرا و طراح جلد : غلام رضا قدرتی
چاپخانه : دامون
با تشکر از معاون محترم فرهنگی اجتماعی سرکارخانم دکتر کریمی و کارشناس محترم نشریات سرکار خانم زهرا وزیری.
مسئولیت صحت مطالب برعهده نویسندگان است.
آدرس :میدان ونک ، خیابان ده ونک ، دانشگاه الزهراء (س) ، ساختمان معاونت فرهنگی اجتماعی
*پست الکترونیک :Microsalzahrauniversity@gmail.com

سخن سردبیر

ما انسانها برای زنده ماندن و داشتن احساس زنده بودن و سرزندگی، نیازمند تقلا و دست وپنجه نرم کردن با مشکلات هستیم که در ورای آن به ظاهر ترس از رنجی تنش زا پنهان شده باشد. ما شبیه جنگجویی هستیم که فقط با جنگیدن و مبارزه می تواند استعدادها و تواناییهای پنهان وجودش را آشکار کند، شبیه کوهنوردی هستیم که فقط با بالارفتن و صعود به قله آرامش می گیرد و نیز شبیه رودخانه هایی هستیم که اگر بایستد و به سمت دریا نرود، تبدیل به مرداب و باتلاق می شود. در واقع مشکلات به معنای درگیرشدن با دیواری است که برای رسیدن به آن سمت، چاره ای جز عبور از این دیوار نیست.

خوب که دقت کنیم، می بینیم در زندگی هرجاییکه با مانعی روبه رو شده ایم و با آن دست وپنجه نرم کرده ایم، نتیجه اش مقاومت و مداومت و دگرگونی بوده است. درواقع مشکلات، موانع و دیوار بین ما و چیزهای بهتری هستند که آرزو داریم.

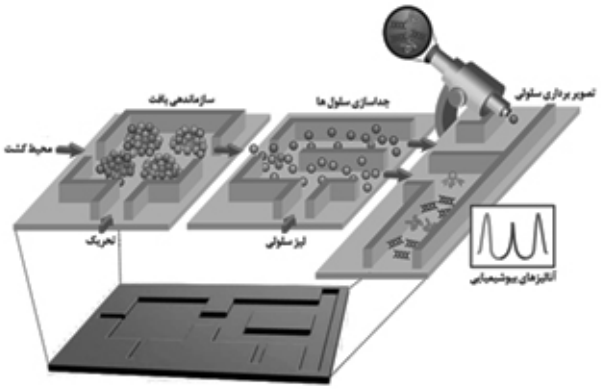
زندگی صنعتی انسان امروزی، او را مجاب نموده تا برای بقای بهتر بتواند در علوم پیشرفت نموده و خصوصا با علوم مرتبط بازیست شناسی در حفظ محیط زیست خود برای زندگی بهتر برنامه ریزی نماید.

امیدوارم این گروه با همت و پشتکار همه گوهر دوستان امسال با جدیت و دلگرمی دو چندان درانجام رسالت خویش کوشا باشد.

در اینجا برخود واجب می دانم تا از زحمات تمام اساتید و دانشجویان بزرگوار که تاکنون با این نشریه همکاری داشته به خصوص **سرکارخانم دکتر قشقایی** که تاکنون مسئولیت مدیر مسئول و سردبیر نشریه را برعهده داشته اند کمال تشکر و قدردانی خود را اعلام می نمایم امید است با یاری پروردگار و به کمک سایر پژوهشگران اهل قلم در این حوزه ، تمام توان خود را جهت پیشرفت و ارتقاء جایگاه علم زیست شناسی بکار برده و به نحو احسن انجام وظیفه نمایم و گام های بلندی برداشته شود.

پیشنهادات شما اساتید و دانشجویان گرامی در ارتقاء علمی مجله موجب کمال تشکر و امتنان خواهد بود.

فاطمه بردبار



سیستم های میکروسیالی، ابزاری نوین در آنالیزهای سلولی–مولکولی

مرضیه موسی زاده۱ ، نسیم قربانمهر۲
۱. دانشجوی کارشناسی بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه الزهراء(س) m.mosazadeh۷۴@yahoo.com
۲. استادیار گروه بیوتکنولوژی دانشگاه الزهراء (س)

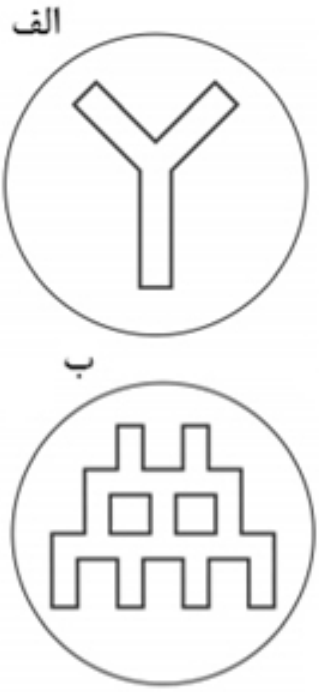
چکیده
سیستم های میکروسیالی ریزتراشه هایی هستند که در آن سیالات با مقادیر بسیار اندک تحت واکنش ها و فرایندهای زیستی و شیمیایی خاص و از پیش تعیین شده ای قرار می گیرند. طبق مطالعات انجام شده، محققان از سال ۱۹۹۰ به دنبال گسترش و بهینه سازی این تکنولوژی می باشند. افزایش نسبت سطح به حجم، عدم دخالت نیروی انسانی، دقیق بودن سیستم، کم بودن هزینه ها، ایجاد فضای سه بعدی مشابه بدن، کاهش آلودگی و ... از جمله مواردی هستند که موجب اهمیت بیشتر این تکنولوژی می شوند. آزمایشگاه روی یک تراشه، نمونه ای از سیستم های میکروسیالی است که از آن برای کشت و تکثیر انواع سلول ها، بررسی اثرات دارو و سایر فرایندهای زیستی مبتنی بر مولکول های آلی و سلول های زنده استفاده می گردد. با توجه به اینکه کشت سلول درون آزمایشگاه با مشکلات فراوانی از جمله عدم مشابهت کامل با محیط سه بعدی درون بدن همراه است، با استفاده از سیستم های میکروسیالی می توان آزمایشگاه روی تراشه هایی را طراحی کرد که بیشتر از فلاسک های معمول کشت سلول به محیط و شرایط فیزیولوژیک درون بدن شبیه باشند و حتی از این طریق می توان کشت اتوماتیک سلول ها بدون نیاز به دخالت نیروی انسانی را هم تأمین کرد. بنابراین بهره وری از این ریزتراشه ها امکان مطالعات دقیق تر سلولی و مولکولی را برای محققین فراهم خواهد نمود.

کلمات کلیدی:آزمایشگاه روی یک تراشه، میکروسیالات دیجیتالی، کشت اتوماتیک سلول ها، آنالیزهای سلولی - مولکولی.

۱. معرفی سیستم های میکروسیالی، آزمایشگاه روی یک تراشه و اجزای اصلی سازنده ی آن

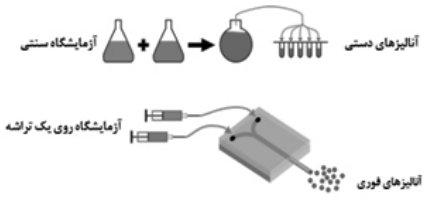
کار کردن در مقیاس آزمایشگاهی و بزرگ اگرچه برای تولید مقادیر بالای مواد ضرورت دارد، اما محدودیت هایی را ایجاد می کند که توسط تکنیک آزمایشگاه روی یک تراشه یا سیستم های ریزتحلیلی کامل (μTAS) قابل حل شدن است. این تکنیک در اواخر دهه ۱۹۹۰ مطرح گردید. آزمایشگاه روی یک تراشه در حوزه های تشخیصی، شیمی و زیست وارد گردیده و علیرغم کاربردهای فراوان هنوز گسترش قابل توجهی پیدا نکرده است[۲۰]. تکنیک آزمایشگاه روی یک تراشه بر پایه ی فناوری NEMS & MEMS ایجاد شده است. فناوری bio MEMS شامل ابزاری است که در ابعاد میکرو و نانو به منظور کاربردهای پردازش، رسانش، دستکاری، آنالیز و ساخت مواد بیولوژیک و شیمیایی تولید می شوند[۲۴]. آزمایشگاه روی یک تراشه گوشه ای از کاربردهای وسیع سیستم های میکروسیالی است که در آن سیالات با مقادیر بسیار اندک در مقیاس های میکرو و نانو مخلوط شده و با هم واکنش می دهند[۳۳]. استفاده از سیستم های میکروسیالی به منظور تولیدات شیمیایی و بیوشیمیایی اولین بار در سال ۱۹۹۵ در کارگاهی در Mainz صورت گرفت[۱۴]. میکروپدها (μPADs) یا دستگاه های آنالیزی مدرن میکروسیالی بر پایه ی کاغذ برای اولین بار در سال ۲۰۰۷ توسط گروهی از white sides ارائه گردید[۲۷]. از این میکروپدها در تکنیک آزمایشگاه روی یک تراشه استفاده می شود. این میکروپدها کانال هایی را ایجاد می کنند که توسط تکنیک هایی مثل فیتولیتوگرافی، چاپ روی صفحه نمایش، برش لیزری، درمان پلاسما، چاپ جوهرافشان و چاپ موم ساخته می شوند]۲۰[. لیتوگرافی فرایندی است که در آن با استفاده از منابع انرژی مثل پرتوهای الکترونی، نور فرابنفش، لیزر و اشعه X روی سطوحی چون شیشه وسیلیکون ویژگی هایی را ایجاد می کنند. به منظور طراحی ویژگی های ظریف تر و کوچکتر باید از امواج با طول موج کمتر استفاده شود[۳۲]. آزمایشگاه روی یک تراشه از چهار بخش اصلی ساخته می شود: کانال، دریچه، مخلوط کننده و پمپ.

کانال ها لوله های باریک و موئینی هستند که مواد مختلف از درون آن عبور می کند. در کانال های بزرگ جریان مواد و سیالات به صورت مخلوطی و همرفتی است اما در لوله های موئین که ابعادی در حد میکرو و نانو دارند، جریان مواد به صورت خطی می باشد. بنابراین در آزمایشگاه روی یک تراشه نیازی به کنترل جریان نیست. از طرف دیگر به دلیل وجود جریان خطی موادی که پشت سر هم وارد کانال ها می گردند با هم مخلوط نمی شوند و پشت سر هم حرکت می کنند.(شکل۱) دریچه ها مکانی هستند که دو یا چند کانال به هم مربوط می شوند و وظیفه هدایت سیالات درون کانال را بر عهده دارد. دو نوع دریچه وجود دارد: دریچه های مکانیکی و غیرمکانیکی. دریچه های مکانیکی در عرض کانال باز و بسته می شوند و دریچه های غیرمکانیکی مکان هایی هستند که با توجه به خاصیت الکترواسمزی و یا آب دوست و آب گریز بودن جریان مواد را کنترل می کنند[۱۸،۲۶،۲۹]. مخلوط کننده ها که به صورت فعال و غیرفعال هستند به منظور سرعت بخشیدن به مخلوط شدن مواد وسیالات استفاده می شوند[۱۱, ۱۶]. پمپ ها نیز در گروهی از تراشه ها به منظور ورود فعال مواد کاربرد دارند که شامل پمپ های مکانیکی و غیرمکانیکی هستند[۶].



شکل۱:
الف) طرح کانال Y
ب) طرح کانال گرادیانی[۲۰]

اولین نمونه های آزمایشگاه روی یک تراشه از جنس سیلیکون و شیشه ساخته می شدند اما گران بودن و غیرشفاف بودن آن ها تولیدکنندگان را به سمت استفاده از پلیمرهایی مثل PDMS از جنس سیلوکسان سوق داد. این پلیمرها علاوه بر شفاف بودن، نسبت به گازهای مورد نیاز در کشت سلول، که یکی از کاربردهای آزمایشگاه روی یک تراشه است، مثل O۲'CO۲' N۲ نفوذپذیر هستند. علاوه بر این غیر سمی و قابل اتوکلاو می باشند و می توان ویژگی های سطحی آن ها را تغییر داد[۱۸, ۲۸]. ترموپلاستیک ها و الاستومرها با توجه به پایداری فیزیکی و شیمیایی و خواص نوری و نیز هزینه ی اندکی که دارند، گزینه های مناسب دیگری برای ساخت میکروتراشه ها هستند[۲۲]. باید این نکته را مدنظر داشت که مواد و ابزارهایی که در ساخت تراشه ها به کار می روند زیست تخریب پذیر بوده و از نظر شیمیایی به محیط آسیب وارد نکنند و قابل بازیافت باشند[۱]. به منظور مشاهده و بررسی روند تغییرات و واکنش در تراشه ها با توجه به شفاف بودن جنس آن می توان از میکروسکوپ استفاده نمود. همچنین روش هایی مثل فلوئورسانس، لومینوسانس شیمیایی، سنجش الکتروشیمیایی و به خصوص سنجش های رنگی مرکب با تصاویر حاصله از اسکنرها، مناسب ترین و رایج ترین شیوه ها برای بررسی تراشه و سیستم های میکروسیالی هستند[۱۸, ۲۰]. تکنیک آزمایشگاه روی یک تراشه ابزار قدرتمندی است که هر جزء آن مانند بخشی از یک آزمایشگاه بزرگ فعالیت می کند[۱۸]. بنابراین با تعبیه کردن بخش های کوچک درون یک تراشه می توان چندین تجهیزات بزرگ آزمایشگاهی مثل انواع حسگرها، الکتروفورز، PCR ، الکتروکروماتوگرافی، اسپکتروسکوپی و ... را درون یک ریزتراشه جای داد[۱]. البته باید توجه داشت که تبدیل ابزارها با مقیاس بزرگ به ابزارها و تراشه ها در مقیاس های میکرو و نانو، تنها به معنای کوچک سازی آن ابزار نیست؛ بلکه باید با قوائد و قوانینی که در مقیاس های کوچک برقرار است نیز آشنا بود[۲۲]. با توجه به حجم کوچک این تراشه ها به موادی با مقادیر اندک نیاز است که این موضوع زمان و هزینه ها را کاهش می دهد. علاوه بر این عدم دخالت نیروی انسانی نیز دقت و صحت آزمایش را بالا می برد. ابعاد میکرو و نانو این تکنولوژی موجب سرعت بالا و حساسیت زیاد سیستم می گردد[۱۸،۲۰،۲۲،۳۳]. (شکل۲)



شکل۲:
مقایسه ی آزمایشگاه روی یک تراشه با آزمایشگاه های سنتی[۱۸]

۲. کاربرد آزمایشگاه روی یک تراشه در مطالعات داروسازی و تشخیص پروتئومیکس نمونه ها

میکروتراشه های آزمایشگاهی در حوزه های مختلف داروسازی از جمله طراحی دارو و آزادسازی آن نقش دارند. همچنین می توان از این ابزار برای تشخیص عوامل بیماری زا درون مواد غذایی و نیز تعیین پروتئومیکس نمونه های متنوع استفاده کرد. از روش های مبتنی بر سلول نیز در آزمایشگاه روی یک تراشه استفاده می شود. این روش ها اولین بار در اوایل دهه ی ۱۹۸۰ مورد توجه قرار گرفتند که گسترده ترین کاربرد آن در حوزه ی کشف و طراحی دارو است[۲۲]. به منظور طراحی دارو، موادشیمیایی مختلف شناسایی شده را که توانایی برهمکنش با عامل بیماری زا دارند و آن را درمان می کنند، توسط ابزارهای آزمایشگاه روی یک تراشه بهینه کرده و سپس دوره های ارزیابی بالینی را با کمک همین میکروتراشه ها می گذرانند[۲۴]. به عنوان مثال گیرنده های همراه G-protein را با بررسی یون های کلسیم خارج سلولی می توان مورد آنالیز قرار داد. انواع مختلفی از جذب، توزیع، سمیت، ترشح و متابولیسم های سلولی برای بررسی ویژگی های دارویی باید مورد توجه قرار بگیرند. ترکیبات شیمیایی سنتز شده به عنوان دارو را می توان با هزینه های کمتر و حجم های پایین تر توسط اینگونه سیستم های مینیاتوری آنالیز کرد. با طراحی تراشه های کوچک حاوی میکروکانال ها و اتاقک های کوچک و نیز منطقه ای که سیگنال های فلوئورسانس را شناسایی می کند، می

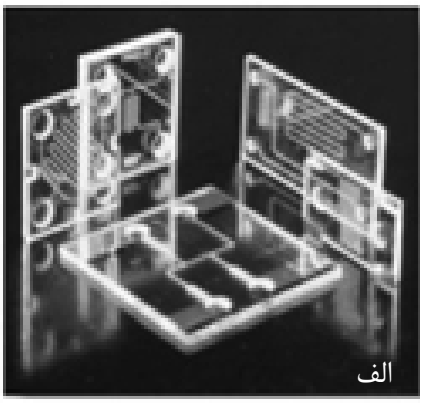
توان سیستمی را طراحی کرد که بازدهی بسیار بالایی در شناسایی و تشخیص داروها و اثرگذری آن ها دارد[۱۰].

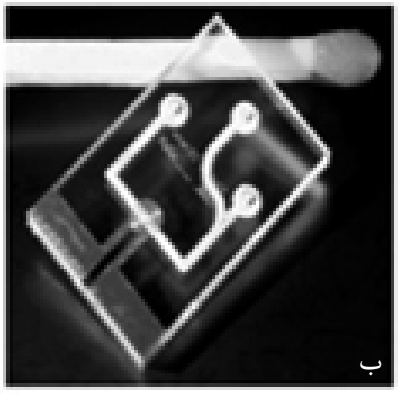
کانال های یونی موجود در غشای سلول یکی از مهم ترین اهداف داروها هستند. می توان تراشه ای طراحی کرد که تعدادی چاهک نمونه داشته باشد که از طریق کانال هایی به یک حجم باز وارد می شود و سیال با فشار به درون کانال ها پمپ می گردد. ادغام مواد گوناگون شرایط مورد نظر را برای سلول فراهم می آورد و به این ترتیب می توان اثر مواد را روی کانال های یونی سلول در این گونه تراشه ها بررسی کرد. این تراشه زیر میکروسکوپ invert که متصل به کامپیوتر است بررسی می شود و توسط آن می توان فعالیت گیرنده های گوناگون را در برابر داروها مورد مطالعه قرار داد[۸, ۱۷].

بررسی کموتاکسی در مقیاس های بزرگ به دلیل وجود گرادیان های غیرخطی شرایطی غیر قابل کنترل را ایجاد می کند اما سیستم های میکروسیالی با کنترل دما و ایجاد جریان های خطی محیطی پایدار را فراهم می کنند. برای اینگونه تحقیقات می توان تراشه هایی را طراحی کرد که شبکه بندی شده اند و در طول این شبکه مواد درون کانال های مختلف به هم می پیوندند و در آخرین کانال شیب گرادیانی از ماده ایجاد می شود که قابل کنترل بوده و کموتاکسی سلول ها را می توان توسط آن بررسی کرد[۱۵, ۲۲].

در بعضی از بررسی ها میکروکانال ها را به عنوان مویرگ های خونی مدل سازی کرده و سپس گلبول های قرمز سالم و گلبول های قرمز آلوده شده با پلاسمودیوم فالسیپاروم (عامل بیماری مالاریا) را از طول آن عبور داده و بررسی کرده اند[۴, ۲۲].

گروهی از سیستم های میکروسیالی قادرند تا بر اساس تحریکات الکتریکی دارو را در زمان مناسب و دوز مشخص در بدن بیمار آزاد کنند و به این ترتیب غلظت دارو را در بدن در حد ثابتی نگه دارند[۱۸, ۲۳] که میکروسوزن ها و منابع ذخیره ی میکرو نمونه ای از این موارد هستند]۲۴[. علاوه بر موارد گفته شده از سیستم های میکروسیالی می توان در بررسی پاتوژن ها، توکسین ها، پریون ها، پروتئومیکس مواد غذایی مختلف[۱] و نیز پروتئومیکس سرم خونی[۹] بهره برد. کنترل پروتئومیکس مواد غذایی امکان بررسی گونه های میکروبی مفید و مضر را در تولید محصولات فراهم می کند و با توجه به حجم کوچک آن ها هزینه ها و زمان را کاهش می دهد [۲۲].





شکل۳:
الف) دستگاه های میکروسیالی تولید شده در مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی هلندMESA+
ب) ریزتراشه ی NMR[۲۵]

۳. کاربرد آزمایشگاه روی یک تراشه در مطالعات سلولی و سلول های بنیادی

سیستم های میکروسیالی و آزمایشگاه روی یک تراشه در کشت و بررسی انواع سلول ها وارد شده اند. این سیستم ها طوری طراحی شده اند که با توجه به ابعاد کوچک و قابل کنترل خود به شرایط موجودات زنده بیشتر از شرایط آزمایشگاهی شبیه هستند. سلول ها درون این میکروسیستم ها طوری قرار می گیرند که ویژگی های سه بعدی محیط واقعی سلول و بافت را فراهم کنند، چراکه محیط های معمول آزمایشگاهی اغلب ویژگی های محیط دو بعدی را ایجاد می کند. فرایندهای لیتوگرافی که برای طراحی میکروتراشه ها به کار می رود، می تواند میکروکانال و اتاقک های کوچک را متناسب با ابعاد مویرگ ها طراحی کند. این سیستم ها علاوه بر ایجاد محیط های مناسب برای کشت و رشد سلول ها، زمان انجام و تحلیل واکنش و تولید محصولات زائد و جانبی را کاهش می دهند[۳۲]. وجود جریان های خطی درون میکروکانال ها و نیز کم بودن عدد رینولد عواملی هستند که امکان ایجاد این ویژگی ها را در میکروتراشه ها فراهم می کنند[۹]. عدد رینولد کمیتی بدون یکا است که نسبت نیروی لختی به نیروی گرانروی را مشخص می کند. از این عدد در تعیین آرام یا آشفته بودن جریان شاره ها استفاده می کنند[۳۵]. (شکل۴)

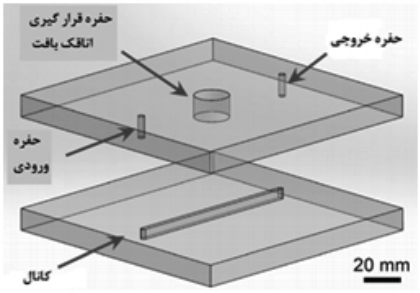
شکل۴:
آشفتگی جریان سیال در اطراف یک سیلندر معرف عدد رینولد[۳۵]

در تکنیک آزمایشگاه روی یک تراشه شبکه ای از کانال ها را تعبیه می کنند که فاکتورهای رشد و مواد غذایی مثل گلوکز و اکسیژن را به سلول ها می رساند. سلول ها را می توان درون این گونه ابزار کشت داد و بعد به بخش های جدیدی روی همان تراشه منتقل کرد. الکترودهایی که روی میکروسیالات دیجیتالی وجود دارند بر روی انجام واکنش های شیمیایی درون تراشه اثر می گذارند و می توانند قطراتی که به عنوان محیط کشت درون تراشه قرار دارند را جابجا کنند. این قطرات درون پدهای چسبندگی که متشکل از الکترودهای الگودهی شده هستند، قرار دارند. بعد از رشد سلول درون قطرات با استفاده از آنزیم تریپسین می توان سلول ها را به پدهای چسبندگی جدید منتقل کرد و سلول ها را به صورت متناوب و بدون دخالت انسان کشت داد[۹, ۳۴].

۳-۱-سلول های سرطانی

از کشت سلول درون ابزارهای آزمایشگاه روی یک تراشه می توان به منظور شناسایی نشانگرهای سرطانی بهره برد و از این طریق تشخیص بیماری سرطان را سرعت بخشید[۲۴]. علاوه بر آن می توان سلول های سرطانی که از یک بافت توموری جدا شده اند را درون اتاقک داخل تراشه قرار داد و داروهای ضد سرطان را از طریق کانال ها

به سمت اتاقک پمپ کرد و تأثیر آن دارو بر سلول های سرطانی را مورد بررسی قرار داد. (شکل۵)

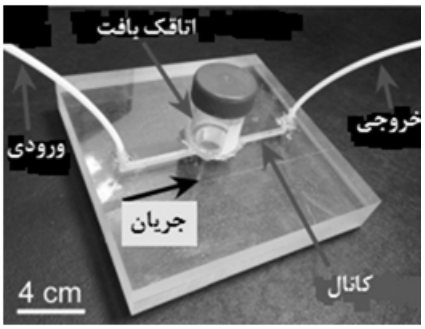


شکل۵:
طرح و ساختار کلی یک میکروتراشه جهت کشت بافت[۲۰]

همچنین می توان خروجی های تراشه ی حاوی سلول های سرطانی را مورد مطالعه قرار داد تا اگر مواد شیمیایی خاصی توسط سلول های توموری آزاد می شود، آن ها را آنالیز نمود[۲۰].

۳-۲-سلول های بنیادی

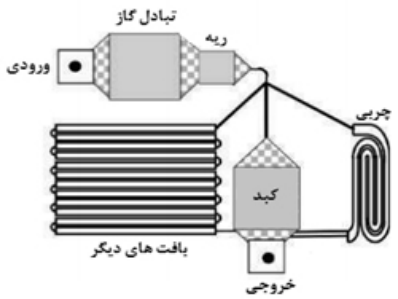
سلول های بنیادی، سلول هایی هستند که توانایی تمایز و تبدیل شدن به سلول های دیگر را دارند. سلول های بنیادی به سه دسته تقسیم می شوند: جنینی، بزرگسال و بندناف. بیان و خاموش شدن ژن های خاص در روند تمایز، عاملی است که باعث تبدیل سلول های بنیادی به سایر سلول ها می شود. گاهی اوقات سیگنال ها و علائمی که از سلول های همسایه به یک سلول می رسد، مسیر تمایزی آن را معین می کند. علاوه براین موارد، سرنوشت سلول های بنیادی به محیط اطراف آن ها که شامل ماتریکس برون سلولی، فاکتورهای بیوشیمیایی، فاکتورهایی مثل دما، pH، غلظت O_2و CO_2و نیز تراکم سلول هاست، وابسته می باشد. سیستم های آزمایشگاه روی یک تراشه با کنترل شدید و دقیق ریزمحیط اطراف سلول های بنیادی از طریق خروج مواد زائد و ورود اکسیژن و گلوکز برای مصرف سلولی می توانند مسیرهای تمایزی سلول های بنیادی را با کیفیت زیادی تحت کنترل قرار دهند. اگرچه ورودی سیستم های میکروسیالی خیلی کوچک است ولی نتایج بسیار با اهمیت و مهمی را می توان از آن ها بدست آورد. علاوه بر کنترل مسیر تمایزی سلول های بنیادی توسط میکروتراشه ها می توان اثر موادی مانند سیتوکینین و عوامل رشد را بر روی این سلول ها بررسی کرد. نکته ی قابل توجه دیگر این است که از طریق اندازه گیری فاکتورهای پروتوئینی که توسط سلول ها تولید می شود، می توان میزان بیان سلول را نیز مورد ارزیابی و اندازه گیری قرار داد[۳۲]. بررسی تمایز و عوامل مؤثر بر تکثیر سلول های بنیادی به دلیل اهمیت بالای آن در سلول درمانی و مهندسی بافت می باشد[۹]. (شکل۶)



شکل۶:
تراشه ی بزرگ کشت بافت[۲۰]

۳-۳-سلول های کبدی

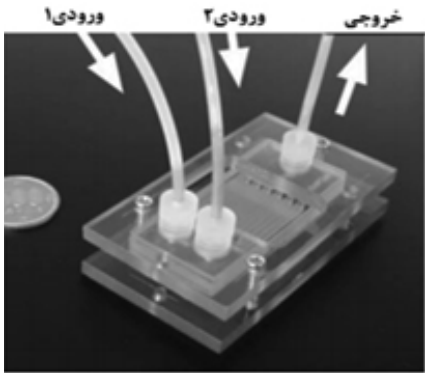
کشت سلول های کبدی یکی دیگر از موارد مهمی است که توسط آزمایشگاه روی یک تراشه انجام می گیرد چراکه اغلب داروهایی که تولید می شوند باید بر روی سلول های کبدی بررسی شوند تا برای کبد سمیت نداشته باشند و در مسیر متابولیسمی آن اختلال ایجاد نکنند[۵]. (شکل۷)



شکل۷:
کشت سلول های چهار بافت مختلف در یک میکروساختار[۱۲]

۳-۴-کشت میکروارگانیسم ها

از تکنیک آزمایشگاه روی یک تراشه می توان به عنوان میکروراکتورهایی جهت کشت و تکثیر سلول های باکتریایی و مخمرها استفاده کرد. (شکل۸)

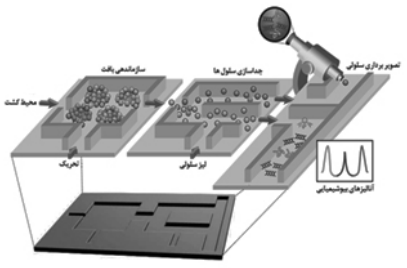


شکل۸:
تصویری از یک میکروراکتور[۲۵]

به عبارت دیگر می توان قبل از پایلوت سازی و صنعتی سازی سویه های مختلف، شرایط دقیق تکثیر آن ها را درون این میکروراکتورها ارزیابی و کنترل کرد و نیز بیان ژن های آن را تحت بررسی قرار داد[۳،۱۳،۲۱].

۳-۵-جداسازی سلول ها

با کمک تکنیک های میکروسیالی می توان یک یا تعدادی سلول خاص را از مجموعه ای از سلول های مختلف جداسازی کرد. این فرایند از طریق دو عامل می تواند انجام بگیرد: یکی از طریق خصوصیات شیمیایی و فیزیکی که سلول ها دارند؛ مثل خواص فلوئورسانت[۳۱] و دیگری از طریق برهمکنش بین پروتئین ها و مولکول های سطحی سلول ها با خواص از پیش تعیین شده ی دیواره کانال ها[۷] که حتی از این روش می توان حرکت سلول ها درون میکروکانال ها را کنترل کرد. جداسازی سلول های سرطانی از مجموعه ای از سلول های سالم و بیمار نیز به این روش قابل انجام است[۹]. (شکل۹)



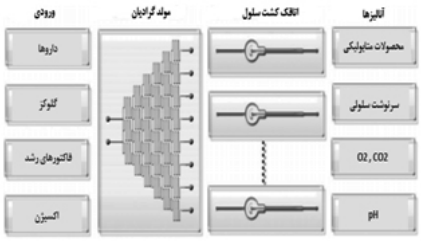
شکل۹:
کشت و آنالیز سلول و بافت در میکروسیستمها[۹]

۳-۶-جداسازی اندامک ها

با توجه به حساسیت و دقت بالای آزمایشگاه روی یک تراشه محققان توانسته اند تا میتوکندری را از سلول های هلا که در حال آپوپتوز بوده اند جداسازی و تخلیص کنند[۲].

۳-۷-بیوسنسورها

با قرار دادن سلول هایی معین درون تراشه ها و سپس عبور مواد از کانال ها می توان با مشاهده و آنالیز بازخوردهای سلولی، بیوسنسورهای حساسی را طراحی کرد. این بیوسنسورها می توانند نسبت به اکسیژن، گلوکز، کربن دی اکسید، عوامل رشد، داروها و ویژگی های نوری حساس باشند. البته از آن جایی که فعالیت های سلولی به تراکم سلول ها و ارتباط بین سلولی نیز وابسته است، ممکن است که اختلالی در نتایج حاصل از این ابزار دیده شود[۹]. (شکل۱۰)

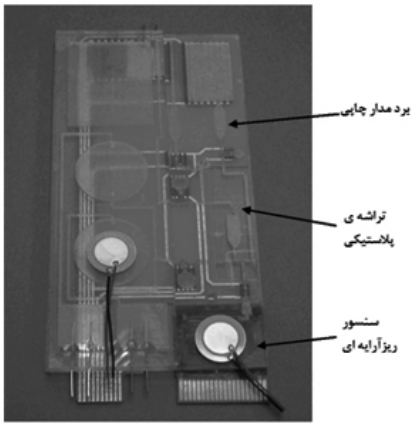


شکل۱۰:
کاربردهای سیستم های میکروسیالی و عوامل مؤثر بر کشت سلول[۳۲]

۴. کاربرد آزمایشگاه روی یک تراشه در مطالعات تک مولکولی و آنالیز اسیدهای نوکلئیک

آزمایشگاه روی یک تراشه برای بررسی و جداسازی تک مولکول ها شامل نوکلئیک اسید، پروتئین، چربی و قند می باشد. در آزمایشات معمول زیستی میانگین ویژگی های رفتاری مجموعه ای از مولکول ها بررسی می شود، در حالیکه در مطالعات تک مولکولی تنها رفتار یک مولکول منفرد مورد آنالیز قرار می گیرد[۱۹]. باید توجه داشت که آنالیز پروتئین از نوکلئیک اسید دشوارتر می باشد چرا که تنوع خانواده ی پروتئین ها خیلی از اسیدهای نوکلئیک بیشتر است. البته این مشکل را به دو روش می توان کمرنگ کرد: یکی از طریق ارتباط دادن بین غلظت و آماده سازی نمونه و دیگری از طریق انتخاب دقیق در سیستم های تحلیلی[۹]. ساخت تراشه هایی که فرایندهای استخراج DNA از نمونه، هیبرید کردن و PCRرا انجام می دهند، از کاربردهای آزمایشگاه روی یک تراشه است که در ادامه به بررسی انجام فرایند PCR در میکروتراشه های زیستی می پردازیم.

PCR امولسیون آب در روغن (ePCR)
یکی از روش های آنالیزی در تحلیل توالی است. انجام این فرایند روی میکروتراشه ها دارای بهره وری ۹۵درصد است[۱۹]. به منظور انجام PCRدر میکروتراشه باید قبل از شروع فرایند، آماده سازی خون را به عنوان نمونه ی دستگاه انجام داد. این آماده سازی ها شامل: به دام انداختن سلول ها، پیش تغلیظ و تخلیص آن ها و نیز لیز شدن سلولی می باشد. تمامی این فرایندها در خود میکروتراشه انجام می گیرد. میکروتراشه ای که به این منظور طراحی می شود از بخش های زیر تشکیل شده است: تراشه ی پلاستیکی، برد مدار چاپی و سنسور ریزآرایه ای. تراشه ی پلاستیکی برای هر کدام از فرایندها (به دام انداختن سلول، پیش تغلیظ و تخلیص اولیه سلولی و PCR) دارای اتاقک است. با استفاده از یک اتاقک به چندین منظور می توان پیچیدگی طرح میکروتراشه ها را کاهش داد. برای شروع واکنش، نمونه ی خون به همراه محلول دانه های مغناطیس ایمنی درون یک اتاقک ذخیره ای بارگذاری می شوند. بافر شست و شو، واکنشگر PCR و بافر هیبرید کننده هر کدام در یک اتاقک وارد می شوند. آنگاه الکتریسیته، چرخه ی گرمایی PCR، سیگنال های الکتروشیمیایی DNAو عناصر مغناطیسی که سلول ها را به دام می اندازند از طریق یک دستگاه برای میکروتراشه مهیا می شوند. در اولین مرحله، بعد از یک فرایند ادغام و انکوباسیون در اتاقک اول، سلول های هدف از خون جداسازی می شوند. در دومین مرحله، سلول ها به اتاقک PCRوارد می گردند و در آن جا تغلیظ می شوند. در سومین مرحله، بافر شست و شو وارد اتاقک دوم می شود تا سلول ها را شست و شو داده و تخلیص کند. در مرحله ی چهارم با ورود واکنشگرPCRبه اتاقک گفته شده همه ی ورودی ها بسته می شود و لیز گرمایشی سلول و به دنبال آن فرایند PCRصورت می گیرد. در مرحله ی پنجم بعد از پایان یافتن PCRورودی ها گشوده می شوند و بافر هیبرید کننده و محصول PCRوارد اتاقک شناسایی شده و به دنبال آن هیبریداسیون DNAصورت می گیرد. در آخرین مرحله به دنبال واکنش محصول با DNAی هدف نشانه گذاری شده، از طریق ابزار مخصوص می توان نتیجه ی واکنش را مورد ارزیابی قرار داد. آخرین اتاقکی که محصول PCRوارد آن می شود، دارای سنسور ریزآرایه ای است. (شکل۱۱)



شکل۱۱:
ساختار تراشه ی طراحی شده جهت انجام PCR[۳۰]

یکی از فوائد این میکروتراشه ی طراحی شده این است که بر خلاف اکثر ریزتراشه ها که حباب های هوا در کانال ها به دام می افتند و جریان خطی را مختل می کنند، این سیستم طوری است که حباب های ایجاد شده درون کانال ها را بدون نیاز به ابزار خاصی خارج می کند. به این صورت که با توجه به اینکه حباب در قسمت بالا و سیال در پایین کانال حرکت می کند، با وارد شدن مواد به وسط اتاقک ها و به دنبال آن جابجایی سیال و گاز، حباب ها اتاقک PCRرا ترک می کنند و سیستم عاری از هوا می شود[۳۰].

۵. بحث و نتیجه گیری

از زمان ظهور میکروسیالات دیجیتالی و ورود آن ها به زیست شناسی و طراحی آزمایشگاه روی یک تراشه مدت زیادی نمی گذرد. اگرچه در این مدت این تکنیک پیشرفت خوب و کارآمدی داشته است اما شاهد گسترش قابل ملاحظه ای از آن نبوده ایم. با توجه به دقت زیاد، هزینه ی کم، مصرف پایین مواد، تولید مواد زائد با حجم کم و عدم دخالت نیروی انسانی استفاده از این

تکنیک ها در بسیاری از فرایندهای دارویی، پزشکی، سلولی- مولکولی و تشخیصی می تواند به ما کمک کند. لذا این امر مستلزم تمرکز بیشتر روی میکروتکنولوژی و طراحی و تولید ریزتراشه هاست.

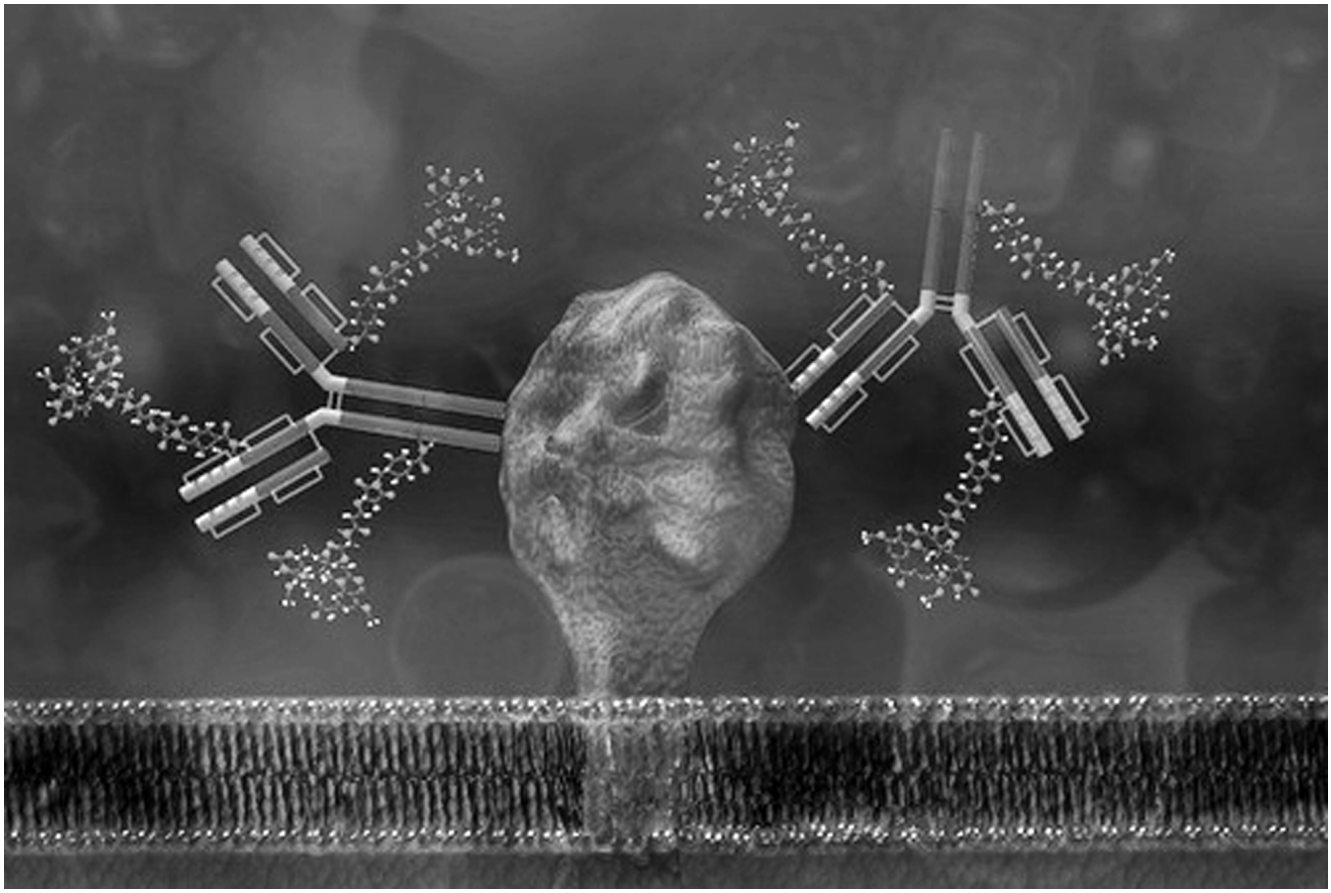
تشکر و قدردانی

بدینوسیله از کمک ها و راهنمایی های صمیمانه ی سرکار خانم دکتر قربان مهر که مشوق اصلی من در نوشتن این مقاله بودند، کمال تشکر را دارم.

1- Lab-on-a-chip
2- Micro-total-analysis-system
3- Nano electro mechanical systems & micro electro mechanical systems
4- lithography
5- Poly dimethyl siloxane
6- siloxane
7- Cell-based-assay
8- Plasmodium falciparum
9- Water-in-oil-emulsion-PCR
10- Immunomagnetic capture beads

References:

1. Ravaghi, M. and I. Ravaghi, Applications of lab-on-a-chip in studing proteomics of food samples. national congress of food scienceand technology, 2012
2.H, L., et al., A microfabricateddevice for subcellular organelle sorting. Anal Chem, 2004. 76
3. A, G., et al., A microfluidic chemostat for experiments with bacterial and yeast cells. Nat Methods, 2005
4. Shelby, J.P., et al., A microfluidic model for single-cell capillary obstruction by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(25): p. 14618-22
5. A, S., et al., A microscale in vitro physiological model of the liver: predictive screens for drug metabolism and enzyme induction. Curr Drug Metab, 2005. 6: p. 569-591
6. Laser, D.J. and J.G. Santiago, A review of micropumps. Micromechanics and Microengineering, 2004.
7. WC, C., L. LP, and L. D, Biomimetic technique for adhesion-based collection and separation of cells in a microfluidic channel. Lab Chip, 2005
8. JE, G., et al., Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets. Drug Discov Today, 1999
9. El-Ali, J., P.K. Sorger, and K.F. Jensen, Cells on chips. Nature, 2006. 442(7101): p. 403-11
10. PA, J. and J. PA, Cellular platforms for HTS: three case studies. Drug Discov Today, 2002
11. J, A. and deMello, Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. nature, 2006
12. K, V., S. A, and S. ML, Development of a microscale cell culture analog to probe naphthalene toxicity. Biotechnol Prog, 2004
13. Szita, N., et al., Development of a multiplexed microbioreactor system for high-throughput bioprocessing. Lab Chip, 2005. 5(8): p. 819-26
14.Richter, T., et al., Fabrication of Microreactor Components by Electro Discharge Machining. Microreaction Technology, 1995
15. Jeon, N.L., et al., Generation of Solution and Surface Gradients Using Microfluidic Systems. Langmuir, 2000
16. Ottino, J.M. and S. Wiggins, Introduction: mixing in microfluidics. Philos Trans A Math Phys Eng Sci, 2004. 362(1818): p. 923-35
17. J, X., et al., Ion-channel assay technologies: quo vadis? Drug Discov Today, 2001
18. Jazayeri, F.S., lab-on-a-chip. nanotechnology, 2009: p. 19-25
19. Zhao, Y., et al., Lab-on-a-chip technologies for single-molecule studies. Lab Chip, 2013. 13(12): p. 2183-98
20.Esfahani, M.M.N., et al., lab-on-a-chip workshop for secondary school students. biomicrofluidics, 2016
21. FK, B., et al., Long-term monitoring of bacteria undergoing programmed population control in a microchemostat. science, 2005
22. Pihel, J., et al., microfluidics for cell-based asays. materials today, 2005
23. Groisman, A., M. Enzelberger, and S.R. Quake, Microfluidic memory and control devices. Science, 2003. 300(5621): p. 955-8
Forotan, M.B., et al., Microsystems in Biomedical Engineering. tapesh, 2011: p. 13-19.24
25. Brivio, M., W. Verboom, and D.N. Reinhoudt, Miniaturized continuous flow reaction vessels: influence on chemical reactions. Lab Chip, 2006. 6(3): p. 329-44
26. MA, U., et al., Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. Science, 2000
27.Martinez, A.W., et al., Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. Angew Chem Int Ed Engl, 2007. 46(8): p. 1318-20
28. SL, P., et al., Poly(dimethylsiloxane) thin films as biocompatible coatings for microfluidic devices: cell culture and flow studies with glialcells. Biomed Materi Res Part A, 2005
29.Duffy, D.C., et al., Rapid prototyping of microfluidic switches in poly(dimethyl siloxane) and their actuation by electro-osmotic flow. Micromechanics and Microengineering, 1999.
30. Liu, R.H., et al., self-contained; fully integrated biochip for sample preparation; polymerase chain reaction amplification; and DNA microarray detection analytical chemistry, 2004. 76: p. 1824-1831
31. .BF, B.-S. and J. EA, Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications. Microbiol Mol Biol Rev, 2004
32.Van Noort, D., et al., Stem cells in microfluidics. Biotechnol Prog, 2009. 25(1): p. 52-60
33.Whitesides, G.M., The origins and the future of microfluidics. Nature, 2006. 442(7101): p. 368-73
34.www.nano.ir
35.www.wikipedia.com



آنتی بادی های کاتالیتیک (ابزایم ها) و کاربرد آن ها

المیرا نقدی
دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه الزهراء(س)
e.naghdi@alzahra.ac.ir

مقدمه

در سال ۱۹۴۸، لینوسپائولینگ بیان کرد که آنزیم ها، به دلیل مکمل بودن برای حالت گذار واکنشی که در حال کاتالیست است، فعالیت کاتالیزوری انجام می دهند.موضوع پایه ای این است که سرعت واکنش، به تفاوت در انرژی آزاد گیبس بین حالت پایه ای واکنش دهنده ها و حالت گذار واکنش دهنده ها مرتبط است، برای اینکه کاتالیزوربازنمود پیدا کند یا باید انرژی حالت گذار کاهش یابد (پایدار کردن حالت گذار) و یا باید انرژی سوبسترا افزایش یابد (ناپایدار کردن سوبسترا).

پائولینگ این مفهوم را درباره ی کاتالیزور آنزیمی به کار برد. با بیان اینکه یک آنزیم ترجیحاً متصل شده و متعاقباً حالت گذار را نسبت به حالت پایه ای سوبسترا(ها)پایدارتر می کند.

این تئوری تبدیل به یک تئوری کلاسیک در آنزیم شناسی شده است و به طور گسترده برای توضیح راهی که کاتالیزورهای زیستی می توانند سرعت شتاب یک واکنش خاص را تا ۱۰۱۷ بار نسبت به قبل افزایش دهند، به کار می رود.

بیل جنکس در فعالیت هایش در سال ۱۹۶۹ روی کاتالیزورها برای گرد هم آوردن فرصت سنتز یک آنزیم با استفاده از آنتی بادی هایی که با دست کاری سیستم ایمنی مهندسی شده اند، تلاش کرد.

دست آورد کاربردی این هدف ۱۸ سال طول کشید که علت آن در درجه اول مشکلات ناشی از جداسازی و خالص سازی یک گونه منفرد پروتئین از یک مجموعه بود. در این مدت تلاش های زیادی برای نشان دادن کاتالیز به وسیله ی مخلوط غیر هموژن آنتی بادی ها انجام شد و شکست خورد. این مشکل در سال ۱۹۷۹ توسط کوهلر و میلستئین با توسعه ی تکنولوژی هیبریدوما حل شد. در این روش امکان غربالگری سریع مجموعه ی کامل ایمنی و تولید نسبتاً بالای یک آنتی بادی مونوکلونال خاص در آزمایشگاه، ایجاد شد.

گرچه وضعیت های گذار در خصوص انرژی آزادشان مورد بحث قرار گرفته بودند، تلاش های نسبتاً کمی برای شرح ساختمان اتمی آنها در بیشتر واکنش های کاتالیز شده، انجام گردید.

وضعیت های گذار، گونه هایی با انرژی بالا هستند که اغلب شامل پیوندهای ناکامل می باشند که این مسئله تشخیص آنها را بسیار دشوار

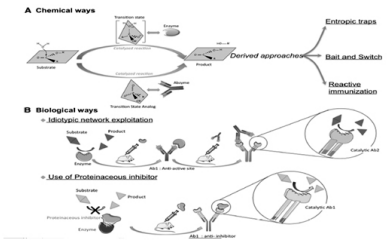
می کند. در مواردی این گونه های گذار، با استفاده از لیزر فمتو شیمی مورد مطالعه قرار گرفته اند و پیش گویی هندسه ی بعضی از آنها با استفاده از محاسبات اوربیتالمولکولی انجام شده است. حد واسط ها در طول واکنش اغلب طول عمر کوتاهی دارند. گرچه ساختمان بعضی از آنها تحت شرایط پایدار مورد مطالعه قرار گرفته است حال آنکه وجود آن ها و طبیعت عمومی آن ها اغلب از طریق استفاده از تکنیک های اسپکتروسکوپی و یا آزمایشات به دام اندازی تعیین می شود. اصل هاموند پیش بینی می کند که اگر حد واسط با انرژی بالا در طول واکنش رخ دهد، شبیه به حالت گذار به ویژه از لحاظ انرژی خواهد بود. در مقابل اگر گذار، توسط دو حد واسط این چنینی مورد حمله قرار گیرد، یکی از آن ها که انرژی بالاتری دارد، یک تقریب نزدیک به ساختار حالت گذار را فراهم می کند. این فرضیه پایه های قوی برای استفاده از تقلید کننده های حد واسط های ناپایدار به عنوان آنالوگ های حالت گذار، را فراهم کرد.
اتصال آنتیبادی به آنتیژن از بسیاری جهات مشابه اتصال آنزیم به سوسبترا میباشد. در هر دو مورد، اتصال شامل پیوندهای ضعیف و غیرکووالان بوده و ویژگی بالا و اغلب میل پیوندی بالایی را نشان میدهند. چیزی که برهمکنش آنتی ژن-آنتی بادی را از آنزیم – سوسبترا متمایز میکند این است کهآنتیبادی، پیوندهای کووالان مولکول آنتیژن را تغییر نمیدهد درحالی که آنزیم، تغییر شیمیایی در سوسبترای خویش را کاتالیز میکند. با وجود این، همانند آنزیم، آنتیبادی ها میتواند حالت گذار یک سوسبترا را پایدار نموده و در نتیجه انرژی فعالسازی جهت تغییر شیمیایی سوسبترا را کاهش دهد.با توجه به شباهت میان برهمکنش آنتی ژن-آنتیبادی و آنزیم - سوسبترا این سئوال مطرح میگردد که آیا برخی آنتیبادیها میتوانند رفتاری شبیه آنزیم داشته با شند و واکنشهای شیمیایی را کاتالیز کنند؟
در سال ۱۹۸۶ ریچارد لرنر و پیتر اسکولتز به طور مستقل آنتی بادی های کاتالیز کننده ی هیدرولیز به ترتیب اریلاستر و کربونات ها را گزارش کردند.

روش های تولید آنتی بادی های کاتالیتیک

آنتی بادی های کاتالیتیک یا اَبزایم، ایمونوگلوبینهایی هستند که به آنها فعالیت آنزیمی بخشیده شده است. استراتژی های مختلفی برای تولید چنین آنتی بادی هایی توسعه داده شده است که بر پایه ی رویکردهای شیمیایی یا زیستی هستند (شکل۱) توسعه ی فن آوری فاژدیسپلی نیز راه را به انتخاب اَبزایم ها بازکرده و استراتژی سریع تر، آسان تر و ارزان تر در مقایسه با روش های سنتی ایمونولوژی، فراهم کرده است.

روش شیمیایی و بهینه سازی مشتقات

روش شیمیایی بر فرضیه جنکس استوار است. وی بیان می دارد : آنالوگهایی که حالت گذار یک واکنش شیمیایی را تقلید می کنند باید هاپتن های مناسبی جهت تولید اَبزایم باشند (جنکز، ۱۹۶۹)
در دنباله ی این اصل و با استفاده از پیشرفت تکنولوژی هایی مانند تکنولوژی هیبریدوما (کوهلر و میلستن، ۱۹۷۵) و پیشرفت در طراحی و ادراک مولکول های شیمیایی اولین اَبزایم به طور همزمان توسط دو گروه تولید شد. بعد از آن چندین استراتژی مشتق شده پیشنهاد شد از جمله «دام آنتروپی» (هیلورت و همکاران ۱۹۸۸)، «طعمه و سوئیچ» (جاندا و همکارانش ۱۹۹۰) و ایمن سازی انفعالی (ویرچینگ و همکاران ۱۹۹۵) (شکل۱-a).
همه ی این استراتژی ها بر پایه ی بهینه سازی طراحی هاپتن شیمیایی استوار است و هدف آنها تولید کارامدترکاتالیزورها با هندسه و عملکرد مناسب می باشد.



شکل ۱- تولید ابزایم با روش های شیمیایی و زیستی

روش زیستی

یک روش جایگزین برای روش های شیمیایی، بیان اَبزایمبااستفاده از یک پروتئین به عنوان نقطه ی شروع است. این پروتئین می تواند یک آنزیم یا یک مهار کننده ی پروتئینی باشد. (شکل۱- b)
استفاده از آنزیم نیازمند به کارگیری شبکه ی ایدیوتیپیک است. این روش بر پایه ی مفهوم «تصویر داخلی» مرتبط با تئوری شبکه ی ایدیوتیپیک استوار است. اصول آن در (شکل۱-b) نشان داده شده است. گروه Lefe'vre در بهره برداری از شبکه ی ایدیوتیپیک برای تولید abzyme پیشگام بود (Izadyar و همکاران ۱۹۹۳ ,Avallc و همکاران ۱۹۹۸ ,Pillet و همکاران ۲۰۰۲) این رویکرد تاکنون توسط گروه های دیگر مورد بهره برداری قرار گرفته است. (Hu و همکاران ۱۹۹۸؛ Li و همکاران ۲۰۱۲)
در روش عمومی هیچ همولوژی توالی بین آنزیم و اَبزایم مرتبط با آن وجود ندارد. گرچه شباهت ساختاری بین باقی مانده ها در موقعیت کاتالیزوری وجود دارد. (padiollecu-Lefe'vre و همکاران ۲۰۰۶ Ponomorenko, و همکاران ۲۰۰۷) از این رو ابزایم های به دست آمده از طریق مسیر ایدیوتیپیک، با تقلید ساختمان جایگاه فعال آنزیم مربوطه، فعالیت کاتالیتیک بدست آوردند. گزینه ی دیگر استفاده از یک پروتئین است که آنزیم را در روشی رقابتی مهار می کند. این پروتئین به عنوان یک ایمونوژن به کار برده می شود. این استراتژی برای تولید آنتی بادی پلی کلونال علیه Tendamistat، مهارکننده ی رقابتی a- آمیلاز پانکراس خوک، به بهره برداری رسید. (Alves و همکاران ۲۰۰۲) این محققان نشان دادند که اَبزایم تولید شده، فعالیت a- آمیلازی نشان می دهد.
این مطالعه امکان سیستم ایمنی برای تولید اَبزایم طبیعی را نشان می دهد و ممکن است وقوع اَبزایم در بیماری های پاتولوژیک، از جمله التهاب، خود ایمنی، اختلالات سوخت و ساز، عفونی، نئوپلاستیک و دگر ایمنی را توضیح دهد.

تکنولوژی فاژدیسپلی برای انتخاب اَبزایم

روش های شیمیایی و بیولوژیکی هر دو منجر به تولید موفق اَبزایم شده اند. بااین وجود، این روش ها به دلیل پیچیدگی طراحی هاپتن و یا مشکلات غربالگری آنتی بادی

مهارکننده، وقت گیر و پیچیده هستند. علاوه بر این، استخراج اَبزایممونوکلونال از طریق این روش ها، تنها از منشاء موشی خواهد بود. بنابراین، این اَبزایم ها اگر برای موارد درمانی و یا تشخیصی استفاده می شود باید، انسانی شود. مهم ترین مزایای تکنولوژی فاژدیسپلی آن است که:

۱- وقت کمتری نیاز دارد (در حدود ۵ – ۴ چرخه ی انتخاب)

۲- فرآیند انتخاب زحمت کمتری نسبت به روش غربالگری دارد.

۳- این امکان وجود دارد که از کتاب خانه های قطعات آنتی بادی نو ترکیب مناسب برای انسان استفاده کنیم.

علاوه بر این روش فاژدیسپلی هم در زمینه ی انتخاب اَبزایم وهم در تکامل خواص کاتالیزوری مفید است. به عنوان مثال، گروه نیشی یک اَبزایم بنام ۶D۹ با استفاده از تکنیک آنالوگ حالت گذار تولید کرده است. ۶D۹ مورد جهش زایی تصادفی قرار گرفت. کتابخانه ای از واریته ها روی فاژ نمایش داده شد. روند انتخاب، امکان انتخاب چندین واریته که Kcat آنها ۲۰-۶ برابر بیشتر از اَبزایم اصلی بود، را ایجاد کرد. (Takahashi و همکاران ۲۰۰۱ ، Takahashi-Ando و همکاران ۲۰۰۴)

در نهایت گروه لی روش ایدیوتیپیک و روش فاژدیسپلی را برای تولید ابزایم به هم مرتبط ساختند و نشان دادند که امکان تولید این پروتئین ها، با ترکیب چندین روش وجود دارد (لی و همکاران ۲۰۱۲)

مثال هایی از پتانسیل کاربرد کلینیکی ابزایم ها

ابزایم ها در ابتدا برای کاربرد در تغییر شکل های شیمیایی تولید شدند. اما بازده کاتالیتیک پایین آن ها، مطالعات را به سمت کاربردهای درمانی جهت داد. مثال های متعددی از توان بالقوه ی ابزایم ها برای کاربرد های کلینیکی شرح داده شده است. به دلیل ایمونوژنیسیته ی پایین آن ها، زمان طولانی گردش در سیستم خون، ویژگی های افکتور، اختصاصیت، تمایل، ظرفیت شیمیایی و همینطور به دلیل امکان استفاده از تکنولوژی مهندسی ژنتیک، ابزایم ها مطابق با نیازهای کلینیکی هستند.

ابزایم ها برای سمیت زدایی ترکیبات فسفات دار آلی

ترکیبات فسفات دار آلی که در ابتدا به عنوان حشره کش ها استفاده می شد، بعدها به عنوان عوامل جنگی شیمیایی توسط ارتش ها بکار گرفته شد.

مکانیسم عملکرد توکسین های ارگانوفسفره (opt) بر اساس اتصال برگشت ناپذیر توکسین ها به استیل کولین استراز است که منجر به انباشتگی استیل کولین در سیستم اعصاب مرکزی می گردد. که این امر منجر به مرگ موجود بر اساس اختلال در سیستم تنفسی می شود.

یک پادزهر که یک ابزایم با توانایی متابولیزه کردن سوبسترا های ارگانوفسفره بود، بررسی شد. scfv و A۱۷ توسط رویکرد فاژ دیسپلی انتخاب شد. (Reshetnyale و همکاران، ۲۰۰۷)

یک آنتی بادی کامل مشتق شده از A۱۷ کلون شد. مطالعات ساختاری نشان داد که A۱۷ جایگاه اتصال آنتی ژن عمیقی دارد که در انتهای آن باقیمانده TyrL۳۷ کاتالیتیک قرار داشت چنین جایگاه فعال عمیقی در ابزایم ها غیر معمول است اما مشخصه ی آنزیم هایی مانند بوتیل کولین استراز است (Smirnor و همکاران، ۲۰۱۱). بطور کمی، فعالیت نسبتا ضعیف ابزایم ها با دیگر مزایای آن ها مانند ایمونوژنیسیته ی پایین و انعطاف پذیری خنثی می شود. این امر مسیری را برای بهبود بوسیله ی تکنولوژی های مهندسی باز می کند. به این دلایل تولید واکسن های کاتالیتیک با توانایی خنثی سازی opt به عنوان یک فعالیت خیلی مهم باقی ماند

ابزایم ها به عنوان ابزاری علیه کوکائین

کوکائین یک ماده نامشروع قدرتمند است که استفاده نامناسب از آن عوارض پزشکی جدی (سمیت قلبی و عروقی، گرفتاری در اعضای حرکتی، آسیب به مغز و مرگ) را در پی دارد. دو استراتژی وابسته به واکسن برای درمان استفاده نامناسب از کوکائین کشف شده است: استفاده از آنتی بادی های متصل شونده و یا استفاده از ابزایم.

در یک استراتژی یک هاپتن GNC طراحی شد. ایمن سازی با این هاپتن منجربه استخراج کردن موفقیت آمیز دو آنتی بادی شد: mAbGNC ۹۲h۲ موشی و mAbGNCgzk انسانی که هر دو تمایل شدید و اختصاصیت برای کوکائین دارند (treweek&Janda، ۲۰۱۲) این آنتی بادی ها با اتصال به کوکائین در حال گردش، دارو را متوقف کرده و مانع ازعبور آن از سد خونی- مغزی و رسیدن به دستگاه اعصاب مرکزی، جایی که اثرات اعتیاد آورش را اعمال می کند، می شود.

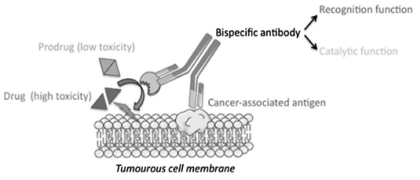
در استراتژی دوم ابزایم های ضد کوکابین گزارش شده اند (Deng و همکاران ۲۰۰۲، mekeniz همکاران ۲۰۰۷، gorelick، ۲۰۱۲). نه تنها ابزایم ها قادر به اتصال به کوکائین بودند، بلکه قادر به هیدرولیز آن به محصولات غیر روانگردان نیز هستند. به علاوه، بر خلاف آنتی بادی های اتصالی یک ویژگی مهم ابزایم ها زمان بازگشت آن هاست. ایمن سازی با استفاده از هاپتن های کاتالیتیک و غیر کاتالیتیک به منظور مقایسه ی عملکرد واکسیناسیون با آن ها نتایج متفاوتی نشان داد (cai و همکاران ۲۰۱۳). هاپتن های غیر کاتالیتیک منجر به تولید آنتی بادی های اتصالی می گردد که بطور مشخص قادر به متوقف کردن کوکائین هستند و یک حفاظت قابل توجه در برابر کوکائین را اعطا می کند. نتایج هاپتن های کاتالیتیک بسیار متنوع بود.

اگر چه واکسیناسیون فعال در آغاز منجربه سرکوب اثرات دارو می شود، اما با تکرار تزریق کوکائین به آرامی اثرات محافظتی اش را از دست می دهد. داده های اولیه پیشنهاد کرد که مولفه های ابزایم در موجود زنده توسط کوکائین تغییر کرده، شاید به دلیل اتصال برگشت ناپذیر کوکائین به ابزایم (Cai و همکاران،۲۰۱۳) تا به امروز تنها یک واکسن ضد کوکائین، بر اساس توقیف کردن ساده ی دارو که TA-CDنامیده می شود، به مرحله آزمایشات کلینیکی فاز III دست یافته است.(Janda&Treweek، ۲۰۱۲).

با این اوصاف، محققین در اندیشه ی ترکیب آنتی بادی های متوقف کننده و واکسیناسیون فعال با ابزایم هستند که ممکن است رویکرد یک واکسن دو گانه قوی را فراهم کند. (cai و همکاران، ۲۰۱۳)

درمان با پیش دارو ابزایمی

رویکرد آنتی بادی جهت دار برای درمان با آنزیم- پیش دارو[1] (ADEPT) بر اساس استفاده از آنتی بادی های مزدوج با آنزیم



شکل ۶- تصویری از مفهوم ADAPT

ها، به منظور ترکیب شناسایی و نقش کاتالیتیکی با هم بنا نهاده شد. در حقیقت اصول آن بر پایه هدف گیری اختصاصی آنتی ژن در ارتباط با سرطان، توسط آنتی بادی و فعال شدن پیش دارو توسط آنزیم می باشد. که این مانع از سمیت سیستماتیک دارو می شود و واکنش را در نزدیکی سلول های تومور نگه می دارد. متاسفانه استفاده از آنزیم های غیر انسانی در درمان انسان ها خطر ایمونوژنیسیته را افزایش داد. که این مسئله پروتئین های درمانی را محدود می کند.
پس یک ابزایم می تواند جایگزین آنزیم شود. امکان انسانی کردن آنتی بادی ها با مهندسی ژنتیک شرایط رفع معضل ایمونوژنیسیته را فراهم می کند.
شناخته شده ترین ابزایم برای درمان پیش دارو ۳۸C۲است، آنتی بادی فعالیت آلدولازی را بر عهده دارد و توسط ایمن سازی فعال تولید می شود. ۳۸C۲ شکل پیش دارویی، داروهای ضد سرطان دوکسوربیسین[2] و کمپتوتسین[3] را فعال می کند. (shamis و همکاران ۲۰۰۴، shinhaو همکاران ۲۰۰۴) اخیرا یک سری از آنتی بادی های ۳۸C۲ برنامه ریزی شده به روش شیمیایی مورد ارزیابی قرار گفتند برخی از واریته های بدست آمده در جاندار رشد تومورهای اولیه و متاستاتیک را مهار می کند، که شامل تومور بدخیم بافت پیوندی انسانی، ملانوما و سرطان سینه می باشد. سه آنتی بادی بر اساس ۳۸C۲ انسانی شده وارد فاز آزمایشات کلینکی شده اند. (Goswam و همکاران ۲۰۰۹)
توجه به این مسئله که این ابزایم ها برای سلول های توموری جهت دار گردیده اند بسیار حائز اهمیت است. در این روش از ابزاری شامل یک مولکول کوچک سنتزی که آنتی ژن را مورد هدف قرار می دهد و به روش شیمیایی متصل گردیده و یا امتزاج نو ترکیب بهره می برند.
آنتی بادی هدف دار شده برای درمان پیش دارو-ابزایم، که یک واریته از رویکرد ADEPT است، بخوبی این مطلب را می سازند که جایگزینی ابزایم به جای آنزیم ها اختصاصیت دو گانه ایجاد می کند (شکل۲) تا به امروز ابزایم هایی با اختصاصیت دو گانه هنوز وارد مرحله آزمایشات کلینیکی نشده اند.

نتیجه

ابزایم ها در آغاز به شکل مصنوعی برای کاربرد در فرآیندهای ترانسفورماسیون شیمیایی ساخته شدند آن ها بدلیل فعالیت پایین به عنوان کاتالیزورهای صنعتی جدید مورد پذیرش قرار نگرفتند. با این وجود بدلیل پتانسیل درمانی ابزایم ها، آن ها در یک زمینه جدید پدیدار شدند. از آنجایی که آنتی بادی ها بزرگ ترین کلاس از مولکول های درمان زیستی موجود در بازار را تشکیل می دهند، به نظر می رسد که ابزایم ها از طریق ترکیب کردن اختصاصیت بالا، زمان بازگشت، نیمه عمر ارزیابی شده و بهره وری کاتالتیکی متوسط کاربردهایی در آینده ی درمانی بیماری های گوناگون خواهند داشت.
تکنولوژی های توسعه یافته برای تولید ابزایم های کارآمد همراه با بهبود سیستم های بیانی و تکنولوژی های مهندسی ممکن است امکان بهره برداری از پتانسیل ابزایم ها به عنوان ابزارهای درمانی جدید را فراهم آورند.

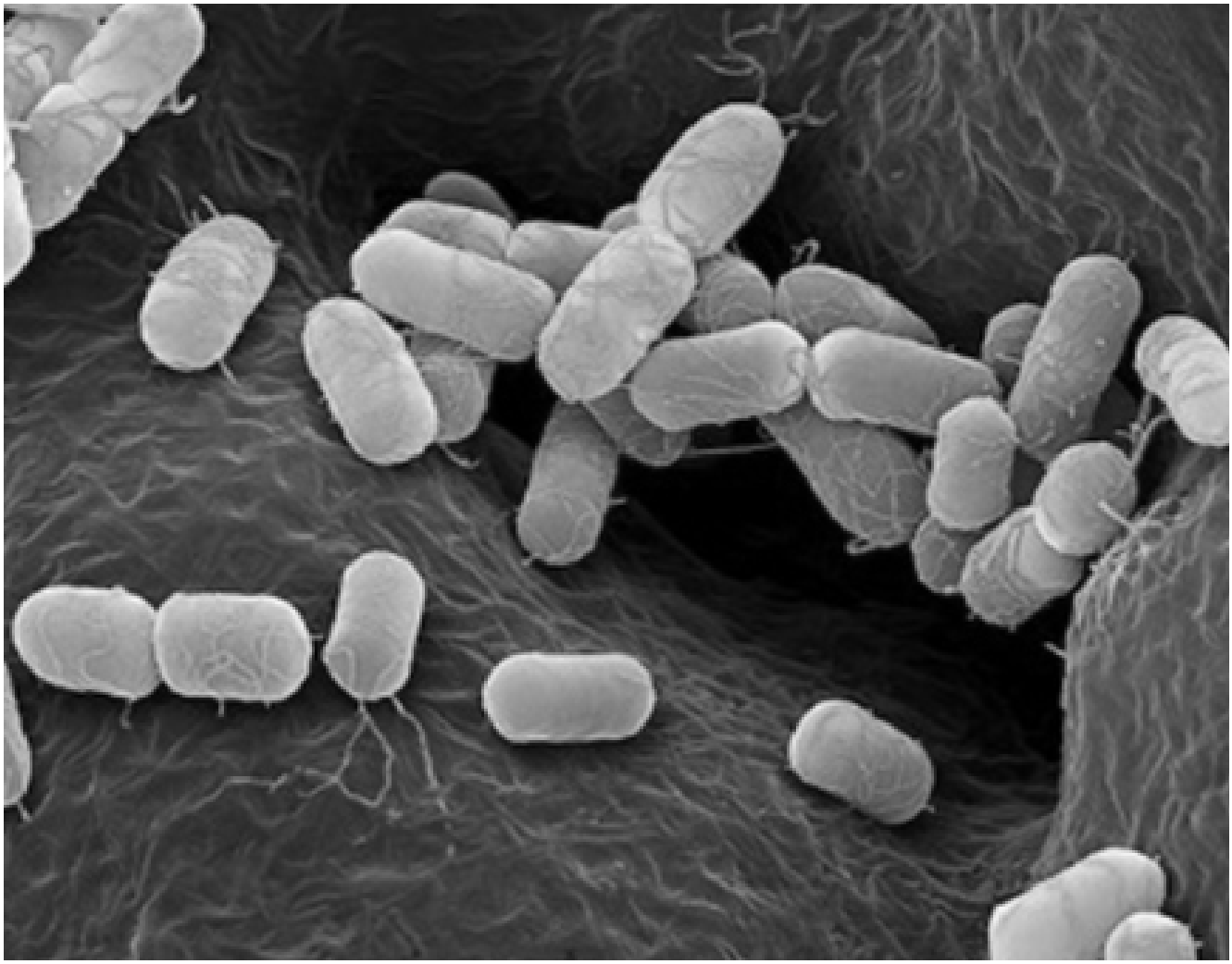
1- The antibody directed enzyme prodrug therapy
2- Doxorubicin
3- Camptothecin

منابع

Se´verinePadiolleau-Lefe`vre,Raouia Ben Naya,Melody A.Shahsavarian,Alain Friboulet,Be´range`reAvalle (2013).Catalytic antibodies and their applications in biotechnology:state of the art Biotechnol Lett.10529-014-1503-8

Deng SX, de Prada P, Landry DW (2002) Anticocaine catalytic antibodies. J Immunol Methods 269:299–310

Pillet D, Paon M, Vorobiev II, Gabibov AG, Thomas D, Friboulet A (2002) Idiotypic network mimicry and antibody catalysis : lessons for the elicitation of efficient anti-idiotypic protease antibodies. J Immunol Methods 269:5–12



بررسی پاتوتیپ های اسهال E.coli

فاطمه مشتاقی۱
۱.کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی

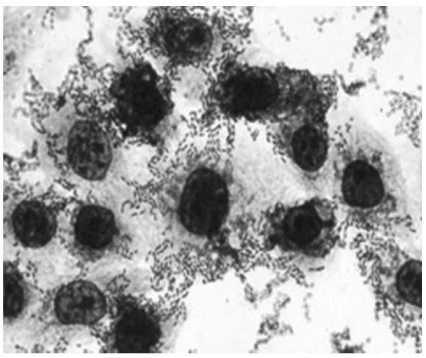
مقدمه:

اشرشیاکلای که به طور خلاصه E.coli نیز نامیده می شود نوعی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که به طور شایع در بخش تحتانی روده جانوران خونگرم یافت می شود . اغلب گونه های Ecoli بی ضرر هستند ، اما برخی از انواع آن باعث مسمومیت وخیم غذایی در انسانها می شوند . گونه بی ضرر این باکتری به طور طبیعی در روده انسان وجود دارد و ممکن است با تولید نوعی از ویتامین K و با پیشگیری از استقرار باکتری آسیب رسان درون روده به میزبان سود برسانند .
Ecoli یک جزء عمده در مدفوع است . بیشتر سویه های اشرشیاکلای بی آزار هستند اما برخی از سروتیپ ها مانند H۷-O۱۵۷ نام اکولای انتروهموراژیک (EHEC) به خاطر ایجاد عوارض وخیم و حتی مرگبار مانند (سندروم همولیتیک اورمیک)موجب مسمومیت غذایی و اسهال شود (۱).
این باکتری از طریق مسیر مدفوعی - دهانی از یک فرد به فرد دیگر منتقل می شود . Ecoli بروی محیط آگارمک کانکی (Macconky agar) کلنی های ارغوانی ایجاد می کند . زیرا باکتری از نوع لاکتوز مثبت است و قند را تخمیر کرده و اسید تولید می کند . اسید موجب کاهش PH در محیط آگار مک کانکی شده و در نتیجه تولید رنگ ارغوانی میکند . برای بررسی وجود توکسین می توان از کشت سلولی یا PCR استفاده کرد . (۲)
Ecoli یکی از متنوع ترین گونه های باکتریایی است. به طوری که ۲۰ درصد از ژنوم بین سویه های مختلف، مشترک است (۳).

از دیدگاه تکاملی شیگلا را نوعی Ecoli به حساب می آورند(۴).
Ecoli انتروتوکسیژنیک (ETEC) با تولید سم LT و ST موجب مسمومیت غذایی در مسافران می شود .Ecoli انتروپاتوژن (EHEC) با ترشح توکسین شیگا (STX toxin) موجب اسهال خونی می شود . Ecoliاینترواینویسیو(EIEC) همانند شیگلا بطور مستقیم با تهاجم بافتی به سلول های روده آسیب می رساند . Ecoli اوروپاتوژنیک (EPEC) در عفونت مجرای ادراری به ویژه سیستیت نقش دارد.(۵)

شناسایی اسهال Ecoli (DEC)

برای تشخیص اسهال Ecoli در گذشته از PCR استفاده می کردند . چند کشور آمریکای لاتین از جمله آرژانتین ، برزیل و شیلی و ... با استفاده از این روش آن را گزارش دادند . اما اکثر این مشاهدات در آزمایشگاه بیولوژیکی صورت می گیرد . امروزه با استفاده از روش Multiplex PCR به طور همزمان ۶ پاتوتیپ Ecoli را بررسی میکنند (۶) . با بررسی پاتوتیپ های Ecoli در کشور های در حال توسعه EPEC فرکانس بیشتری داشته است (۷و۸) ژن eae و escv برای EPEC مسئول اتصال و تاثیر بروی ضایعات چسبنده باکتری به سلول ایتیپیال روده است .(۹)
EPEC به دو گروه تقسیم میشود : معمولی و غیر معمولی
تفاوت اساسی بین معمولی و غیر معمولی حدود ۹۰-Kb در فاکتور ادهرین پلاسمیدی EPEC است . (PEAF) که کد کننده تیپ (IV) شبیه فرم پلی است در حالی که حالت غیر معمول فاقد این فاکتور چسبنده است (۱۰) .VTEPEC تولید ادهرین لوکانیزه در سلول لوکانیزه اپیتیال به محیط و تشکیل کلنی در سطح سلول می کند (۱۱و۱۲) . در بالغین EPES بارزترین عامل عفونت است (۱۳و۱۴).
اما برخی از سویه های AEPEC با شیوع اسهال باعث ایجاد نگرانی در این باب که شاید AEPEC از نوع پاتوژنیک باشد ،شدند (۱۵)
روش های سنتی برای تشخیص اسهال حاصل از Ecoli بسیار دشوار و پر زحمت بود اما امروزه به روش های مولکولی تشخیص تمام باکتر های Ecoli شرح داده شده است . چندین روش PCR برای تشخیص ژن کد کننده عفونت مختلف DEC گزارش شده است.(۱۶و۱۷)
طی بررسی های تامیکینز در سال ۱۹۹۹و ویلسون در سال ۲۰۰۲ در انگلستان ، اشرشیاکلای انترواگرسیو (EAEC) را بیشترین پاتوژن جدا شده ازسلول بیماران مبتلا به اسهال اعلام کردند ، EAEC توانایی خود را توسط فاکتورهای ادهرین (چسبنده) به سلول Hep-۲ بدست می آورد . با این حال ادهرین سلول Hep-۲ روش نامناسبی برای تشخیص اگرسیو است .نتایج Pcr می تواند به توانایی تشخیص بیماری حاصل از EAEC کمک کند .(۱۸و۱۹)



عکس شماره ۱ :
فاکتور های چسبنده Hep-۲ که روشی برای شناسایی اگرگیتیو است

حالا ETEC علت عمده اسهال مسافرتی و بیشترین پاتوژن شایع در میان ۶ اسهال دیگر از خانواده Ecoli است (۲۰و۲۱و۲۲)
انتروتوکسین حساس به حرارت (LT) و مقاوم (ST) است . دو کلاس از STA- STS و STB و دو گونه مختلف از STA- STP (در ابتدا از انسان جدا شد) مورد بررسی قرار گرفت (۲۳و۲۴و۲۵) . دامنه O شامل دومین خارجی مولکول پلی ساکاریدی است و به هسته الیگوساکاریدی باکتری G-منتقل شده (۲۶) . آنتی ژن O درمیان اکثر ترکیبات سلولی متفاوت و باعث ویژگی های آنتی ژنیک می شود . ترکیب زنجیره O در هر فشاری متفاوت است . بیشتر از ۱۸۰ ساختار O آنتی ژنی در Ecoli ساخته می شود .(۲۷)
تشخیص ETEC شناسایی انتروتوکسین LT یا ST بصورت فیزیولوژیکال و ایمنولوژیکال و سریوتایپ وابسته به استفاده از Osergroup با آنتی سرم اختصاصی است . (۲۸و۲۹)
روش های معمول تشخیص پاتوژن های روده به وسیله بررسی میکروسکوپی,محیط کشت و آنزیم ایمونو اسی تکیه دارد(۳۰) .با این حال با این روش های پر زحمت نمیتوان حساسیت و اختصاصیت این گونه ها را به درستی بررسی کرد.به کمک روش های مولکولی از جمله واکنش زنجیره ای پلیمراز (pcr)و معکوس رونویسی (RT_pcr) میتوان گونه پاتوژن روده ای را به دقت بررسی نمود(۳۱و۳۲).
در زمان های گذشته توسط روش multiplex pcr موفق به شناسایی پاتوژن های مختلف به طور همزمان شدند (۳۳و۳۴و۳۵) . اگر چه این روش ها یا توان پایین دارند ویا گران قیمت اند که اجازه غربالگری سریع تعداد زیاد نمونه های مدفوعی را نمیدهد اما تمام گزارشات از روش multiplex pcr استفاده شده که قادر به تشخیص پاتوژن ویروسی (۳۶و۳۷) و پاتوژن باکتری میباشد (۳۸).

روش درمان اسهال:

سازمان کشاورزی (,(FAOسازمان بهداشت جهانی (WHO) از خواص سالم و مغذی محصولات پروبیوتیک از جمله شیر با باکتری لاکتیک اسید زنده یاد میکنند و بر این باورند که زمانی که به میزان کافی در بدن میزبان در یافت شود باعث سلامتی فرد میشود(۳۹)

MIROS

References:

1."Escherichia coli". CDC National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. Retrieved (2012).10-02.

2.Paton JC, Paton AW ."Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections".Clin.Microbiol. (1 July 1998). Rev. 11 (3): 450–79. PMC 88891.PMID 9665978.

3.Lukjancenko O, Wassenaar TM, Ussery DW ."Comparison of 61 sequenced Escherichia coli genomes". Microb. Ecol.(November 2010). 60 (4): 708–20. doi:10.1007/s00248-010-9717-3. PMC 2974192.PMID 20623278.

4.Lan R, Reeves PR "Escherichia coli in disguise: molecular origins of Shigella". Microbes Infect. (September 2002). 4 (11): 1125–32. doi:10.1016/S1286-4579(02)01637-4. PMID 12361912.

5.Todar, K.."Pathogenic E. coli".Online Textbook of Bacteriology.University of Wisconsin–Madison Department of Bacteriology. Retrieved (2007).11-30.

6.Aranda KRS, Fagundes-Neto U, Scaletsky ICA. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic Escherichia coli and Shigella spp. J. Clin. Microbiol.(2004). 42:5849 –5853.

7.Brandal, L.T., Lindstedt, B.A., Aas, L., Stavnes, T.L., Lassen, J., Kapperud, G.,. Octaplex PCR and fluorescence-based capillary electrophoresis for identification of human diarrheagenic Escherichia coli and Shigella spp. Journal of Microbiological Methods.(2007).68, 331–341.

8.Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1996. Outbreak of Escherichia coli O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice—British Columbia, California, Colorado, and Washington,.MMWR. Morbidity and Mortality Weekly (October 1996)Report 45, 975.

9.Celli J, Deng W, Finlay BB. Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. Cell Microbiol (2000). 2(1):1-9.

10.Tobe T, Hayashi T, Han CG et al. Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic Escherichia coli adherence factor plasmid. Infect Immun (1999).67(10):5455-62.

11.Cleary J, Lai LC, Shaw RK et al. Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. Microbiology (2004). 150(Pt 3):527-38.

12.Tobe T, Sasakawa C. Role of bundle-forming pilus of enteropathogenic Escherichia coli in host cell adherence and in microcolony development. Cell Microbiol (2001). 3(9):579-85.

13.Bieber D, Ramer SW, Wu CY et al. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic Escherichia coli. Science (1998). 280(5372):2114-8.

14.Antikainen J, Tarkka E, Haukka K et al. New 16-plex PCR method for rapid detection of diarrheagenic Escherichia coli directly from stool samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2009).28(8):899-908.

15.Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. Typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli. Emerg Infect Dis (2002). 8(5):508-13.

16.Aranda KR, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic Escherichia coli and Shigella spp. J Clin Microbiol (2004). 42(12):5849-53.

17.Hardegen C, Messler S, Henrich B et al. A set of novel multiplex Taqman real-time PCRs for the detection of diarrhoeagenic Escherichia coli and its use in determining the prevalence of EPEC and EAEC in a university hospital. Ann Clin Microbiol Antimicrob (2010). 9:5-7.

18.Adachi, J. A., Jiang, Z. D., Mathewson, J. J., Verenkar, M. P., Thompson, S., Martinez-Sandoval, F., Steffen, R., Ericsson, C. D. & DuPont, H. L. Enteroaggregative Escherichia coli as a major etiological agent in traveller's diarrhoea in three regions of the world.Clin Infect. (2001). Dis 32, 1706–1709.

19.Nataro, J. P., Kaper, J. B., Robins-Browne, R., Prado, V., Vial, P. & Levine, M. M. Patterns of adherence of diarrhoeagenic Escherichia coli to HEp-2 cells. Pediatr Infect.(1987). Dis J 6, 829–831.

20.Black, R. E. Epidemiology of travelers' diarrhea and relative importance of various pathogens. Rev. Infect. (1990) Dis. 12(Suppl. 1):S73–S79.

21.Ericsson, C. D. Travellers' diarrhoea. Int. J. Antimicrob. Agents(2003) 21: 116–124.

22.Gorbach, S. L., B. H. Kean, D. G. Evans, D. J. Evans, Jr., and D. Bessudo. Travelers' diarrhea and toxigenic Escherichia coli. N. Engl. J. Med.(1975) 292:933–936.

23.Dallas, W. S. The heat-stable toxin I gene from Escherichia coli 18D. J. Bacteriol.(1990) 172:5490–5493.

24.Huilan, S., L. G. Zhen, M. M. Mathan, M. M. Mathew, J. Olarte, R. Espejo, U. Khin Maung, M. A. Ghafoor, M. A. Khan, Z. Sami, et al. Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicenter study in five countries. Bull. World Health Organ.(1991) 69:549–555.

25.Urban, R. G., E. M. Pipper, L. A. Dreyfus, and S. C. Whipp. High-level production of Escherichia coli STb heat-stable enterotoxin and quantification by a direct enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol.(1990) 28:2383– 2388.

26.Reeves, P. R., and L. Wang. Genomic organization of LPS-specific loci.Curr.Top.Microbiol. Immunol.(2002) 264:109–135.

27.Stenutz, R., A. Weintraub, and G. Widmalm. The structures of Escherichia coli O-polysaccharide antigens.FEMS Microbiol.(2006) Rev. 30:382–403.

28.Kosek, M., C. Bern, and R. L. Guerrant.. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. Bull. World Health Organ.(2003)81:197–204.

29.Lang, A. L., Y. L. Tsai, C. L. Mayer, K. C. Patton, and C. J. Palmer. Multiplex PCR for detection of the heat-labile toxin gene and Shiga-like toxin I and II genes in Escherichia coli isolated from natural waters. Appl. Environ. Microbiol.(1994) 60:3145–3149.

30.L. J. Coupland, I. McElarney, E. Meader et al., "Simultaneous detection of viral and bacterial enteric pathogens using the Seeplex(R) Diarrhea ACE detection system," Epidemiology and Infection,(2013) vol. 141, no. 10, pp. 2111–2121.

31.C. F. Amar, C. L. East, J. Gray, M. Iturriza-Gomara, E. A. Maclure, and J.McLauchlin, "Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4,627 faecal samples: re-examination of the English case-control Infectious Intestinal Disease Study," European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases,(1993–1996) vol. 26, no. 5, pp.311–323, 2007.

32.R. F. de Boer, A. Ott, B. Keszty¨us, and A. M. D. Kooistra-Smid, "Improved detection of five major gastrointestinal pathogens by use of a molecular screening approach," Journal of ClinicalMicrobiology,(2010) vol. 48, no. 11, pp. 4140–4146.

33.N. M. van Maarseveen, E. Wessels, C. S. de Brouwer, A. C. T. M. Vossen, and E. C. J. Claas, "Diagnosis of viral gastroenteritis by simultaneous detection of Adenovirus group F, Astrovirus, Rotavirus group A, Norovirus genogroups I and II,and Sapovirus in two internally controlled multiplex real-time PCR assays," Journal of Clinical Virology,(2010) vol. 49, no. 3, pp. 205– 210.

34.D. M. Deer and K. A. Lampel, "Development of a multiplex real-time PCR assay with internal amplification control for the detection of Shigella species and enteroinvasive Escherichia coli," Journal of Food Protection,(2010) vol. 73, no. 9, pp. 1618–1625.

35.J. T.Nazeer,K. El SayedKhalifa, H. von Thien et al., "Use ofmultiplex real-time PCR for detection of common diarrhea causing protozoan parasites in Egypt," Parasitology Research,(2013) vol. 112, no. 2, pp. 595–601.

36.H. Yan, F. Yagyu, S. Okitsu, O. Nishio, and H. Ushijima, "Detection of norovirus (GI, GII), Sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR," Journal of Virological Methods,(2003) vol. 114, no. 1, pp. 37–44.

37.P. Khamrin, M. Okame, A. Thongprachum et al., "A single-tube multiplex PCR for rapid detection in feces of 10 viruses causing diarrhea," Journal of Virological Methods,(2011) vol. 173, no. 2,pp. 390– 393.

38.O. G. G´omez-Duarte, J. Bai, and E. Newell, "Detection of Escherichia coli, Salmonella spp., Shigella spp., Yersinia enterocolitica, Vibrio cholerae, and Campylobacter spp. Enteropathogens by 3-reaction multiplex polymerase chain reaction," Diagnostic Microbiology and Infectious Disease,(2009) vol. 63, no. 1, pp. 1–9.

39.Food and Agriculture Organization (FAO). World Health Orga-nization (WHO).Report of a joint FAO/WHO expert consul-tation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lac-tic acid bacteria. 1-4 October 2001, Córdoba, Argentina.[cited 18 Aug 2014].

خبرهای علمی

گردآوری: خانم مرضیه موسی زاده

ابداع روشی تازه برای تشخیص سلول‌های توموری در خون

تراشه نانوالکترونیکی برای تشخیص سلول‌های توموری گردشی در خون با نام NELMEC توسط محققان آزمایشگاه ادوات نانوبیوالکترونیکی در دانشکده مهندسی برق دانشگاه تهران ساخته شد.
محققان آزمایشگاه ادوات نانوبیوالکترونیکی دانشکده مهندسی برق دانشگاه تهران، یک تراشه نانوالکترونیکی ساختند که برای اولین‌بار در جهان، بدون نیاز به هیچ‌گونه شناساگر بیولوژیک، توانایی تشخیص و تفکیک سلول‌های توموری گردشی در خون را (Circulating tumor cells) دارد.
این تراشه که دکتر محمد عبدالاحد، مجری طرح، آن را تراشه (Nanoelectromechanical chip NELMEC) نام نهاده است، ابزاری جدید برای تشخیص سرطان از طریق آزمایش خون است. این تراشه نمونه‌ای از نسل جدید فن‌آوری‌های «آزمایشگاه بر روی تراشه» است که با استفاده از تکنیک‌های نانوفناوری ساخته شده است.
«آزمایشگاه بر روی تراشه» در واقع آزمایشگاه‌هایی بسیار کوچک در ابعاد میکرون و نانو هستند که بر روی مواد مختلفی ساخته می‌شوند و قادرند همانند یک آزمایشگاه کامل زیست‌شناسی، به تجزیه و ترکیب مواد مختلف بپردازند.
تراشه‌یNELMEC به تجزیه و تحلیل نمونه خون گرفته شده از افراد می‌پردازد و تعداد سلول‌های سرطانی در حال گردش در خون افراد (که به اختصار CTC نامیده می‌شود) را می‌شمارد.
گفتنی است نتایج این کار به تازگی در ژورنال (DOI:۱۰,۱۰۰۲/smll.۲۰۱۵۰۲۸۰۸ Small) به چاپ رسیده و تحت حمایت معاونت علمی ریاست جمهوری، مراحل تجاری‌سازی آن با همکاری مرکز تحقیقات سرطان سینه دانشگاه علوم پزشکی تهران در حال پیشرفت است. مراحل ثبت USA Patent این کار نیز با حمایت ستاد توسعه فناوری نانو انجام گرفته است.
این طرح با همکاری مهندس سیدعلی حسینی و مهندس سمیه زنگنه، دانشجویان دکتری و ارشد مهندسی برق دانشگاه تهران و با کمک دکتر مهاجرزاده، استاد دانشکده برق دانشگاه تهران، به اتمام رسیده است

میکرو راکتور تصفیه آب‌های آلوده ساخته شد

به گزارش روابط‌عمومی دانشگاه تهران، حامد اسکندرلو، دانشجوی رشته شیمی کاربردی دانشگاه تهران، موفق به ساخت میکرو راکتوری شد که می‌تواند آب‌های آلوده را تصفیه کرده و آلاینده‌های پایدار را از آب حذف کند.
ساخت این دستگاه در قالب پایان‌نامه دکتری و با عنوان «سنتز و بررسی فعالیت فوتوکاتالیزوری نانو مواد بر پایه TiO_2 در میکرو و ماکرو فوتو راکتورها برای حذف آلاینده‌های آلی پایدار» و به راهنمایی دکتر علیرضا بدیعی انجام و آبان‌ماه سال‌جاری دفاع شده است.
این دستگاه در مقایسه با مشابه خارجی آن از قابلیت‌های زیادی برخوردار است که از جمله آن‌ها، می‌توان به ساخت آسان، سریع و کم هزینه، اندازه کوچک و قابل حمل و هم‌چنین مصرف پایین انرژی اشاره کرد که قابلیت توسعه و صنعتی‌سازی آن را بسیار افزایش می‌دهد.
این میکرو راکتور ثبت اختراع ملی نیز شده است و دانش طراحی و ساخت آن نیز در دو مقاله ISI در ژورنال‌های Chemical Engineering Journal و Environmental Technology به چاپ رسیده است.

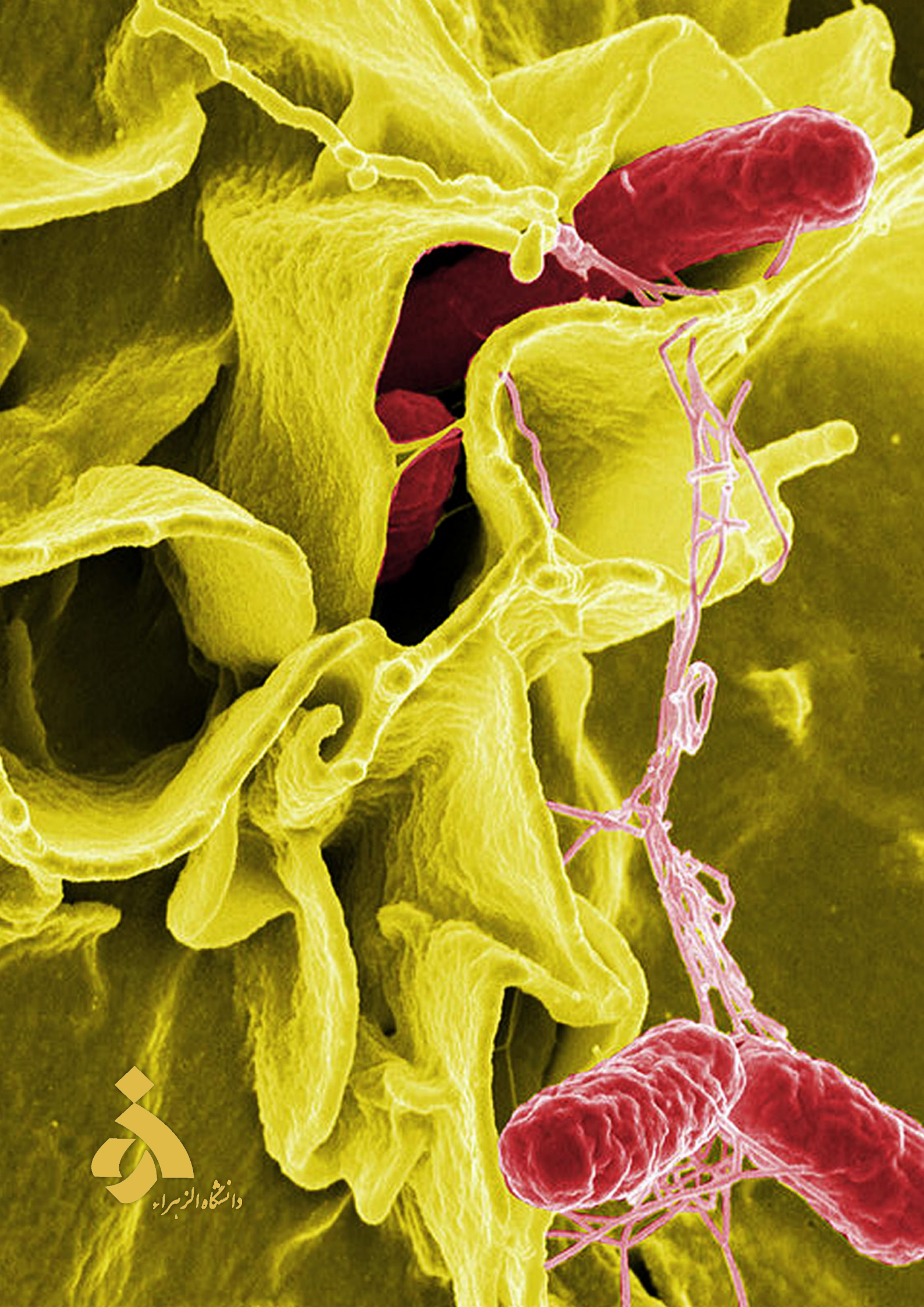
ترکیب سلول های بنیادی انسان با DNA خوک

به گزارش خبرنگارحوزه فن آوریهای نوین گروه علمی پزشکی باشگاه خبرنگاران جوان، محققان دانشگاه کالیفرنیا با ترکیب سلول‌های بنیادی انسان با DNA خوک توانستند جنین‌هایی را در بدن خوک‌های ماده تولید کنند.
جنین‌های انسانی به مدت ۲۸ روز در بدن خوک‌ها رشد یافتند تا این‌که بر اساس قوانین حاکم اقدامات نابودسازی آن‌ها انجام شد. این تکنیک در حال حاضر از سوی دانشمندان آمریکایی با هدف بررسی ژن‌های تولیدکننده پانکراس در مراحل آزمایشی به سر می‌برد.
این اقدام با واکنش‌های تندی از سوی منتقدان همراه بوده است. آن‌ها می‌گویند: «کاشت اندام‌های ترکیبی انسان-خوک توهینی است به شان و منزلت انسان»
از طرفی، طرفداران کاشت اعضای ترکیبی می‌گویند هر سال حدود هزار نفر در انگلیس به علت کمبود اعضای اهدایی جان خود را از دست می‌دهند.
گفته می‌شود هدف از تولید جنین‌های ترکیبی (هایبرید) مقابله با کمبود اعضای پیوندی بوده است.
مزیت این روش مهندسی ژنتیک در آن است که منجر به تولید رویان هایی می شود که سلول های انسان را در خود دارند. بنابراین می‌توان از اندام‌های آن‌ها که تقریباً هم‌اندازه اندام‌های انسان هستند، به منظور رفع نیاز بیماران استفاده کرد.

رشد بافت مغز انسان در سیستم کشت سه بعدی

با استفاده از روش های جدید ، دانشمندان قادر به رشد بافت مغز انسان در سیستم کشت سه بعدی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی مولکولی در اتریش (IMBA) شدند. در این روش سلول های های بنیادی پرتوان (iPS) به ارگانویدهای مغزی (یا مینی مغز) که شامل مناطق مختلف مغز می باشد، توسعه یابد.
با استفاده از مینی مغز دانشمندان قادر به مدل کردن اختلالات عصبی انسان و شناسایی منشاء آن نیز هستند. توسعه مغز انسان یکی از بزرگترین اسرار در زیست شناسی می باشد.
دکتر نوبلیک توضیح می دهد در این روش جدید "
قطعاتی از این بافت در کشت ۳Dو در قطرات ژل خاص که داربستی برای رشد بافت پیچیده می باشد جاسازی و نگهداری شده است. به منظور افزایش جذب مواد غذایی ، ما بعد قطرات ژل را به یک بیوراکتور در حال در چرخش منتقل کردیم. در مدت ۳ تا ۴ هفته مناطق مختلف مغز از جمله قشر مغز، شبکیه چشم، مننژ، همچنین شبکه کورویید ، توسع یافته اند. "
پس از دوماه مغز کوچک به حداکثر سایز خود می رسد که در حال حاضر با توجه به عدم دسترسی به یک سیستم شبیه گردش خون، که نتیجه آن کمبود مواد غذایی و اکسیژن رسانی به مرکز مغز می شود، می توان این مغز را تا ۱۰ ماه در بیوراکتور زنده نگه داشت.

MIROS


دانشگاه الزهراء