تحقیقی

دارای رتبه علمی – پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

مقایسه اندازه گیری پروتئین فعال سی توسط نانو بیدهای مغناطیسی با روش الیزا

هادی بهاری فر
دانشجوی دکترای نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فن آوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

نویسنده مسئول: هادی بهاری فر

پست الکترونیک: baharifar.h@gmail.com

تلفن:۰۲۱۶۶۵۶۱۳۰۳

آدرس: تهران، میدان نقلاب، خیابان ۱۶ آذر، ابتدای خیابان ایتالیا، دانشکده فن آوری های نوین پزشکی، گروه نانو فناوری پزشکی

دریافت:۹۱/۱۲/۲۰
ویرایش پایانی:۹۲/۵/٤
پذیرش:۹۲/۵/۹

چکیده

زمینه و هدف: *نانو بیدها دارای نسبت سطح به حجم بالا یی هستند که از این سطح به عنوان بستری برای اتصال آنتی‌بادی استفاده شده است. این کار باعث افزایش مقدار آنتی‌بادی موجود در سطح نسبت به الیزا خواهد شد. در این پژوهش توانایی اندازه‌گیری پروتئین فعال سی (CRP) توسط نانوبیدهای مغناطیسی به روش رنگ سنجی بررسی و نتایج حاصل با روش الیزا مقایسه شده است.*

روش بررسی: *این مطالعه یک پژوهش کاربردی است که در سال۱۳۹۱در دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است. نانو بیدها با آنتی‌بادی‌های اختصاصی CRP کونژوگه شده و از آنها برای اندازه‌گیری پروتئین مورد نظر در غلظت‌های ۱ تا ۱۰ نانوگرم (دامنه کاربرد روش الیزا) و ۰/۱ تا ۰/۰۱ نانوگرم استفاده شده است. پس از اندازه‌گیری مقدار آنتی‌ژن نتایج با استفاده از آزمون آماری Mann Whitney U با هم مقایسه شدند.*

یافته‌ها: *مقدار معنی‌داری آزمون در غلظت‌های ۱ تا ۱۰ نانوگرم برابر با ۰/۷۸ بود بنابراین این دو روش تفاوتی با هم ندارند. در غلظت‌های ۰/۱ تا ۰/۰۱ نانوگرم مقدار معنی‌داری آزمون برابر با ۰/۰۲ بود که نشان می‌دهد دو گروه تفاوت معنی‌داری با هم دارند.*

نتیجه‌گیری: *نانو بیدها در اندازه گیری غلظت‌های پایین آنتی‌ژن عملکرد بهتری نسبت به روش الیزا دارند. نتایج نشان می دهد قدرت تشخیص آنتی ژن در نانوبیدها نسبت به روش الیزا در حدود ۱۰۰ برابر بیشتر می باشد بنابراین برای تشخیص زود هنگام آنتی‌ژن‌ها بسیار مناسب است. این روش به دلیل استفاده از دستگاه‌های مرسوم در الیزا در مواقع لزوم براحتی قابلیت استفاده در آزمایشگاه‌های بالینی را دارد.*

واژه های کلیدی: *CRP، نانو بیدهای مغناطیسی، الیزا*

آدرس مقاله:
بهاری فر ه" مقایسه اندازه گیری پروتئین فعال سی توسط نانو بیدهای مغناطیسی با روش الیزا" مجله علوم آزمایشگاهی، زمستان ۱۳۹۲ دوره هفتم(شماره۴):۲۷-۳۳

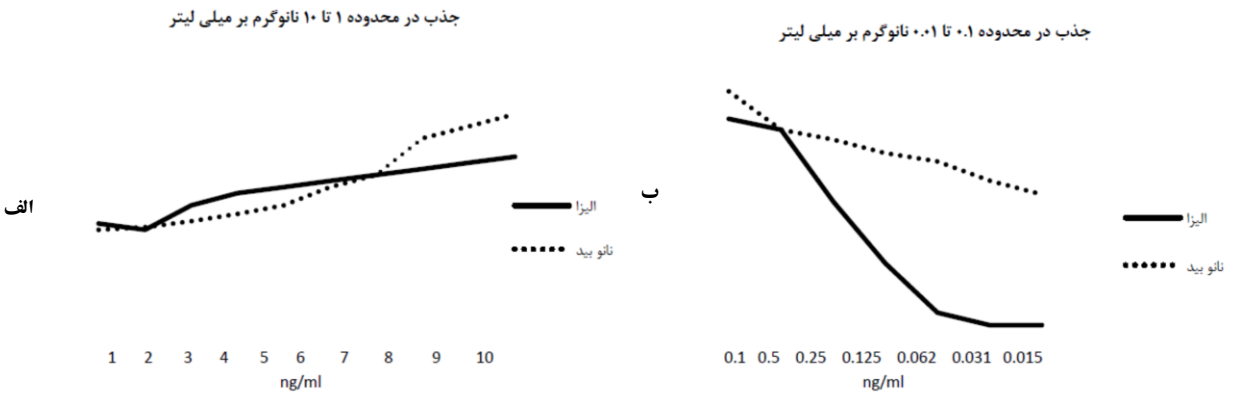
مقدمه

CRP یک پروتئین هومو پنتامر از خانواده پنتراکسین با وزن ملکولی ۱۱۵ کیلو دالتون است. این پروتئین از پروتئین های فاز حاد است که از هپاتوسیت ها ترشح می شود و در هنگام بیماری های عفونی در پاسخ به اینتر لوکین ۱ و ۶ و همچنین فاکتور نکروز دهنده توموری آلفای موجود در گردش خون مقدار آن بالا می رود(۱). اندازه گیری این پروتئین برای اثبات عفونت و عملکرد سیستم کمپلمان در بدن حائز اهمیت است. این اندازه گیری ها به روش های کیفی و کمی در آزمایشگاه های بالینی توسط روش های ایمنو اسی انجام می شود. این پروتئین شاید به تنهایی دارای ارزش بالینی زیادی نباشد ولی از آنجا که دارای ساختار ساده ای بوده و به راحتی در دسترس می باشد به عنوان الگویی برای جداسازی و اندازه گیری آنتی ژن توسط بیدهای مغناطیسی استفاده شده است(۲). در روش های ایمنواسی غلظت یا حضور ماکروملکول ها در محلول به کمک آنتی بادی ها اندازه گیری می شود. ماکروملکول های تشخیص داده شده به وسیله این روش تحت عنوان کلی آنالیت عنوان می شود که معمولا از جنس پروتئین هستند و بنابراین در اغلب موارد نام آنتی ژن به آنها اطلاق می شود. این روش ها در اساس همه از خصوصیت اختصاصی بودن آنتی بادی ها یا آنتی ژن ها برای تشخیص استفاده می کنند و با توجه به نوع ماده ای که برای نشاندار کردن آنتی بادی ها به کار می روند اسامی مختلفی دارند، مانند روش الیزا که در آن از آنزیم پراکسیداز ترب سفید یا(Horse Radish Peroxidase) HRP برای نشان دار کردن آنتی بادی استفاده می شود و یا روش رادیو ایمنو اسی که از رادیوایزوتوپ های نشر کننده پرتو β برای نشاندار کردن آنتی بادی استفاده می شود(۳). روش الیزا به صورت های مستقیم، غیر مستقیم، رقابتی و ساندویچ قابل انجام است. این روش ها در تشخیص نوع (آنتی ژن یا آنتی بادی)، دقت، صحت و تعداد مراحل انجام باهم تفاوت دارند (۴). استفاده از بیدهای مغناطیسی در سال های اخیر برای جداسازی ترکیبات زیستی مانند پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک توجه زیـادی را بـه خود جلب کرده است و احتمال می رود در آینده ای نزدیک جایگزین روش های دیگر جداسازی ملکول های زیستی شود(۵). این بید ها دارای اندازه ای در حدود ۹۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر بوده و دارای خاصیت مغناطیسی هستند.Hervas و همکاران از نانو بیدهای مغناطیسی برای جداسازی سم Zearalenone از غذای کودک استفاده کردند. در این جداسازی از نانو بیدها به عنوان سطحی برای اتصال آنتی بادی ها و از HRP برای نشان دار کردن استفاده شده است. این مطالعه نشان دادکه استفاده از نانو بیدها ابزار قدرتمندی برای جداسازی ماده مورد نظر از محیط می باشد(۶). Har-Noy و همکاران در یک مطالعه دیگری از نانو بیدهای پوشش داده شده با آنتی CD3/CD28 برای جداسازی سلول های دارای این مارکرها استفاده کردند و نشان دادند با استفاده از آهن ربا می تواند سلول های بیان کننده این مارکرها را از میان دیگر سلول ها جدا کرد(۷). از نانو بیدها برای جداسازی سلول های T کمک کننده نوع ۱ (۸) و سلول های +CD31 با روشی مشابه نیز استفاده شده است (۹). Sandhu و همکاران از بیدهای دارای استرپتوآویدین برای تشخیص هیبرید شدن قطعات الیگونوکلئوتیدی استفاد نمودند. (۱۰).Kergaravat و همکاران با استفاده از نانوبیدها، سنسوری ایمنولوژیکی برای اندازه گیری آنتی بادی ضد ترانس گلوتامیناز ۲ (TG-2) در بیماری سیلیاک طراحی کردند. (۱۱). نتایج به دست آمده از پژوهش ها نشان می دهد که نانوبیدهای مغناطیسی ابزاری مفید و قدرتمند برای جداسازی و اندازه گیری در سیستم های زیستی در اختیار ما قرار می دهد. این روش در اساس مانند الیزا است ولی تفاوت هایی نیز با آن دارد. در اندازه گیری در الیزا محدودیت فضایی وجود دارد و به مقدار آنتی بادی های پوشش داده شده در هر چاهک بر می گردد. در هر چاهک الیزا با ابعاد مشخص می توان مقدار معینی از آنتی بادی را پوشش داد. از طرفی هر چه مقدار آنتی بادی های موجود بیشتر باشد شانس واکنش با آنتی ژن های نمونه افزایش می یابد(۱۲). در روش الیزا آنتی بادی ها در چاهک ها پوشش داده شده و ثابت هستند و تنها عاملی که باعث واکنش آنتی بادی و آنتی ژن در الیزا می شود

حرکات نامنظم آنتی ژن است(۱۳). در این پژوهش از نانو بیدهای مغناطیسی برای اندازه گیری آنتی ژن استفاده شده است. یکی از مهمترین تغییراتی که در نانو مواد ایجاد می شود افزایش نسبت سطح به حجم است(۱۴). هرچه سطح بیشتری وجود داشته باشد مقدار آنتی بادی بیشتری به آن متصل می شود. از طرف دیگر این ذرات مغناطیسی هستند بنابراین به میدان مغناطیسی واکنش می دهند. از بیدهای مغناطیسی در عمل به عنوان یک بستر برای اتصال آنتی بادی استفاده می شود. و در مراحل شست شو به کمک آهن ربا از خروج بید ها از چاهک جلوگیری می شود. از آنجایی که آنتی بادی ها به جای اتصال با دیواره چاهک الیزا (که اندازه و سطح معینی دارد) به روی سطح نانو بیدها متصل می شوند و با کنترل مقدار نانوبیدها در چاهک مقدار متفاوتی از آنتی بادی را در چاهک ها داشته و محدوده قابل اندازه گیری را می توان افزایش داد(۱۵). آنتی بادی ها به روش های مختلفی بر سطح بیدها متصل می شوند. یکی از بهترین روش ها استفاده از اتصال دهنده هایی مانند استرپتوآویدین و بیوتین می باشد. بیوتین یک ویتامین است که به طور طبیعی دارای گرایش بالایی برای اتصال به استرپتوآویدین است (16) (Kd ~ 10 -15 M). استرپتوآویدین توسط پیوند کوالان به سطح نانو بید متصل می شود. بیوتین نیز به انتهای آنتی بادی متصل می شود. به این صورت با مجاورت آنتی بادی بیوتین دار شده و بید استرپتوآویدین دارشده، آنتی بادی به سطح بید متصل می شود. این طراحی باعث اتصال بیوتین به انتهای آنتی بادی های مختلف یک نوع نانو بید می شود یا آنتی بادی های مختلف را همزمان به یک نوع بید متصل می کند. این روش ابزاری برای ایجاد تنوع در اندازه گیری آنتی ژن های مختلف ایجاد می کند(۱۷و۱۸). در عمل مقدار استرپتوآویدین متصل شده بر روی نانو بیدها حداقل ۳۵۰۰ پیکو مولار بر میلی گرم است که توانایی اتصال با ۲۰ تا ۲۵ میکرو گرم آنتی بادی بیوتین دار به ازای هر میلی گرم دارد. در مقایسه با الیزا (۵۰ تا ۵۰۰ نانو گرم در هر چاهک) استفاده از غلظت ۵۰ میلی گرم از نانو بیدها توانایی اتصال آنتی بادی در محدوده ۱۰۰۰ تا ۱۲۵۰ نانو گرم در هر چاهک را دارد. با افزایش مقدار آنتی بادی در هر چاهک توانایی تشخیص آنتی ژن از محدوده موجود در الیزا بیشتر شود.

روش بررسی

بید های مغناطیسی در اندازه های ۱ تا ۵ میلی لیتر و در غلظت ۱ گرم بر میلی لیتر عرضه می شوند. در مرحله اول طبق دستورالعمل بید ها شست شو داده شد. شست شو در مجاوت آهن ربا به این صورت انجام شد که در هنگام تخلیه محلول مورد نظر حاوی نانو بید های مغناطیسی از یک آهن ربا برای اتصال بیدهای مغناطیسی به دیواره چاهک ها استفاده شود که مانع از خروج آنها می شود. پس از شست شو دو برابر غلظت اولیه بید به آن آنتی بادی بیوتینه اضافه شد. برای اتصال بیوتین و استرپتوآویدین و تشکیل بیدهای کونژوگه محلول مورد نظر را به مدت یک و نیم ساعت در دمای اتاق در حال چرخش ملایم قرار داده شد. در این مرحله استرپتوآویدین های روی بید با بیوتین انتهای آنتی بادی به هم متصل می شوند. در نتیجه بیدها توانایی اتصال به آنتی ژن را پیدا می کنند. باید دقت شود که در کلیه مراحلی که بید ها در محلول وجود دارند میدان های مغناطیسی قوی در اطراف آن وجود نداشته باشد. با توجه به اینکه ممکن است برخی از استرپتوآویدین های سطح نانو بید ها با آنتی بادی های بیوتینه واکنش نداده و به صورت آزاد در سطح بید وجود داشته باشند، بیدها را با محلول بیوتین اشباع کرده و استرپتاویدین های باقیمانده در سطح بید به این ترتیب با بیوتین واکنش داده و در مراحل بعد ایجاد اشکل نمی کنند. این کار به مدت نیم ساعت در دمای اتاق و چرخش ملایم صورت می گیرد. پس از این مرحله بیدها را سه بار شست شو داده و سپس در بافر PBS + BSA قرار داده شد. این بیدها در این شرایط به مدت ۲ ماه در دمای ۴ درجه پایدار هستند. در ادامه غلظت های مختلفی از آنتی ژن CRP را در محدوده قابل اندازه گیری توسط کیت الیزا (۱ تا ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر بر مبنای دستورالعمل کیت) تهیه کرده و منحنی جذب آنها به دست



شکل ۱- جذب های بدست آمده پس از رنگ سنجی در طول موج ٤٥٠ نانومتر. الف: جذب در محدوده ۱ تا ۱۰ نانو گرم بر میلی لیتر که بیدها مغناطیسی در این دامنه توانایی اندازه گیری خوبی دارند. ب: غلظت آنتی ژن کاهش یافته است تا توانایی بیدها و کیت الیزا در اندازه گیری غلظت های پایین آنتی ژن مشخص شود. بیدهای مغناطیسی قادرند غلظت های ۱۰۰ برابر کمتر آنتی ژن را نسبت به کیت الیزا اندازه گیری کنند.

آمد. ایـن کـار بـرای مقایسه نتایج حاصل از بیدها با روش استاندارد الیزا صورت گرفت . قرائت جذب در روش الیزا طبق روش کار کیت صورت گرفت برای قرائت جذب در روش استفاده از نانو بیدها از پلیت های الیزا (بدون پوشش آنتی بادی) استفاده گردید. مقدار ۵۰ میلی گرم از بیدهای کونژوگه شده به چاهک اضافه گردید و محلول مورد نظر را نیم ساعت در دمای اتاق قرار داده و در ادامه محلول مورد نظر را سـه بـار بـا کـمک آهـن ربا شست شو داده سپس آنتی بادی اختصاصی CRP متصل به HRP با غلظت ۱ نانومولار را به آن اضافه گردید. در ادامه نیم ساعت گرماگزاری و شست شو صورت گرفت. پس از این مرحـله سوبسترای آنـزیم HRP را به چاهـک ها اضـافه کرده و پـس از ۱۵ دقـیقـه با کمک اسـید سولـفـوریـک ۱/۸ مولار واکـنش آنـزیـمی را مـتوقف کـرده و جذب محلول را توسط دستگاه خوانشگر الیزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد. به دلیل طبیعی نبودن توزیع در جذب های بدست آمده در روش های الیزا و نانو بیـدها و همچـنین به دلیل مستقل بودن نتایج دو روش و کوچـک بـودن جـامعه آمـاری (کـمـتر از ۱۰ مـورد) بـرای مقـایسه ایـن دو گـروه از آزمـون آماری Mann-Whitney U اسـتفاده شد.

یافته ها

اندازه گیری آنتی ژن با این روش و مقایسه آن با روش الیزای معمول نشان داد که در غلظت های برابر آنتی ژن درمحدوده قابل اندازه گیری توسط کیت الیزا (غلظت های ۱ تا ۱۰ نانوگرم) این دو روش مانند هم هستند و تفاوت آشکاری باهم ندارند. با افزایش غلظت هر دو روش دارای جذب بالاتری هستند. البته به دلیل اختلاف روش ها باهم این مقادیر کاملا منطبق بر هم نیستند اما روند افزایشی مشابهی دارند. به عبارت دیگر با استفاده از یک منحنی استاندارد برای هر روش می توان میزان خطا ی حاصل از این تفاوت را در روش های بالینی از بین برد. در این محدوده غلظتی تفاوت معنی داری بین دو روش مشاهده شد($p=۰/۷۸$)با کاهش غلظت آنتی ژن به مقدار کمتر از ۰/۲ نانوگرم بر میلی لیتر کیت الیزا قابلیت اندازه گیری را از دست داد در صورتی که با استفاده از نانو ذرات تا غلظت ۰/۰۱آنتی ژن بـه صورت کمـی تشخیص داده شد. همچنین کیت الیزا در غلظت های پایین تر از ۰/۵ نانوگرم بر میلی لیتر در عمل دارای اندازه گیری متناسبی نسبت به نانو بیـد ها نبود. روند کاهش جذب در آن با کاهش غلظت تناسب نداشت. در غلظت های پایین تفاوت معنی دار در تـوانایی بخـش دو روش مشـاهده شـد($p=۰/۰۲$).

بحث

اندازه گیری آنتی ژن با روش نانو بید ها و مقایسه آن با روش الیزای معمول نشان داد که در غلظت برابر آنتی ژن قابل اندازه گیری توسط کیت الیزا (غلظت های ۱ تا ۱۰ نانو گرم) روش نانو بیدها و الیزا مانند هم هستند و تفاوت آشکاری باهم ندارند. با افزایش غلظت آنتی ژن هر دو روش دارای جذب بالاتری هستند. البته به دلیل اختلاف روش ها باهم این مقادیر کاملا سازگار بر هم نیستند اما روند افزایشی مشابهی دارند و تفاوت معنی داری بین این دو روش وجود دارد برای آزمایش قدرت هر دو روش در اندازه گیری مقدار آنتی ژن، غلظت آنتی ژن را تا ۱۰۰ برابر کاهش داده شد. با کاهش غلظت آنتی ژن به مقدار کمتر از ۰/۲ نانوگرم بر میلی لیتر کیت الیزا قابلیت اندازه گیری را از دست می دهد در صورتی که با استفاده از نانو ذرات تا غلظت ۰/۰۱ آنتی ژن را به صورت کمی تشخیص داد. همچنین کیت الیزا در غلظت های پایین تر از ۰/۵ نانو گرم بر میلی لیتر در عمل دارای اندازه گیری متناسبی نسیت به نانو بید ها نمی باشد. روند کاهش جذب در آن با کاهش غلظت تناسب نداشت. استفاده از بیدهای مغناطیسی به عنوان سطح اتصال آنتی بادی با توجه به کروی بودن بیدها و اندازه های نانومتری سطح وسیع تری را برای اتصال آنتی بادی، آنتی ژن و لیگاندهای مورد نظر قرار می دهد و این سطح کمک می کند که در یک حجم مشخص توانایی جداسازی بیشتر و بهتری داشته و مقادیر کمتری از ماده مورد نظر را شناسایی کند. به بیان دیگر استفاده از نانو بیدها باعث می شود تا به برخی از محدودیت های ذکر شده در الیزا غلبه کرد. یکی از این محدودیت مقدار ثابت آنتی بادی پوشش داده شده در هر چاهک می باشد. همانطور که گفته شد مقدار آنتی بادی در هر چاهک برابر ۵۰ تا ۵۰۰ نانو گرم می باشد. با استفاده از نانو بیدها این مقدار تا ۱۰۰۰ تا ۱۲۵۰ نانو گرم بر لیتر قابل افزایش است. بنابراین توانایی اتصال با استفاده از بیدهای مغناطیسی آنتی ژن در محدوده وسیع تری شناسایی می شود. البته تنها عامل افزایش بازه تشخیص در صورت استفاده از نانو بیدها افزایش مقدار آنتی بادی اولیه می باشد. عامل مهم دیگر قدرت حرکت آنتی بادی های متصل به نانو بیدها است. در روش الیزا آنتی بادی ها در دیواره چاهک ها ثابت هستند و در طول آزمایش این آنتی ژن ها هستند که با حرکات براونی خود به آنتی بادی ها نزدیک شده و با آنها اتصال برقرار می کنند. اما در صورت استفاده از نانو بیدها به دلیل اینکه آنتی بادی ها بر سطح کروی بیدها اتصال یافته اند و بیدها در محلول معلق هستند و همچنین در طول مجاورت با محلول حاوی آنتی ژن ها، محلول در حال چرخش می باشد عملا شانس اتصال آنتی بادی و آنتی ژن افزایش خواهد یافت. بنابراین می توان عنوان کرد که تحرک آنتی بادی ها نیز در این روش یکی از عواملی است که باعث افزایش شانس به دام اندازی آنتی ژن خواهد شد(۱۹-۲۰). در این پژوهش از پروتئین CRP به دلیل در دسترس بودن و سادگی ساختار به عنوان نمونه ای برای اندازه گیری استفاده شد. ولی این پژوهش نشان می دهد که استفاده از بیدهای مغناطیسی برای اندازه گیری غلظت های پایین آنتی ژن های دیگر در مقادیر کمتر از حد تشخیص روش های مرسوم می تواند مفید باشد. با استفاده از اتصال استرپتوآویدین- بیوتین در این روش به راحتی می توان آنتی بادی های مختلف علیه آنتی ژن های متفاوت بیوتینه کرده و به نانو بیدها متصل کرده و سپس اندازه گیری کرد. در واقع استفاده از اتصال استرپتوآویدین – بیوتین کمک می کند که ابزاری قابل انعطاف برای اندازه گیری آنتی ژن های مختلف به یک روش رنگ سنجی باشد (۲۱).

نتیجه گیری

با استفاده از بیدهای مغناطیسی و کونژوگه کردن آنها می توان انواع آنتی ژن ها را به روش رنگ سنجی اندازه گیری کرد. افزایش دامنه تشخیص آنتی ژن با استفاده از بیدهای مغناطیسی به مقدار ۱۰۰ برابر می تواند در تشخیص زودرس و مقدار کم بسیاری ازآنتی ژن های مهم کمک کننده باشد. روش اندازه گیری به وسیله بیدهای مغناطیسی با توجه به سادگی و عدم نیاز به تجهیزات قرائت جذب مجزا

و استفاده از دستگاه های خوانش گر الیزا مرسوم می تواند به سادگی در آزمایشگاه های بالینی به کار گرفته شود. این روش در محدوده قابل تشخیص کیت الیزا مانند روش الیزا عمل می کند اما در غلظت های پایین آنتی ژن می تواند بسیار مفید باشد. با استفاده از نانو بیدها دامنه قابل اندازه گیری آنتی ژن افزایش می یابد که می تواند در محدوده خارج از روش الیزا مرسوم، مکمل روش الیزا باشد.

تشکر و قدرانی

با تشکر از جناب آقای دکتر رضا فریدی مجیدی و جناب آقای دکتر غلامرضا طاووسی دانا که رهنمودهای ارزنده آنها در انجام این پژوهش بسیار مفید بود.

References

1.Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. *C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women*. New England Journal of Medicine. 2000; 342(12): 836-843.

2. Marnell L, Mold C, Du Clos TW. *C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation*. Clinical Immunology. 2005; 117(2): 104-111.

3. Arenkov P, Kukhtin A, Gemmell A, Voloshchuk S, Chupeeva V, Mirzabekov A. *Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions*. Analytical Biochemistry. 2000; 278(2): 123-131.

4. Pita M, Cui L, Gaikwad RM, Katz E, Sokolov I. *High sensitivity molecular detection with enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA)-type immunosensing*. Nanotechnology. 2008; 19(37): 375502.

5. Grützkau A, Radbruch A. *Small but mighty: How the MACS®-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years*. Cytometry A. 2010; 77(7): 643-647.

6. Hervás M, López MÁ, Escarpa A. *Electrochemical immunoassay using magnetic beads for the determination of zearalenone in baby food: An anticipated analytical tool for food safety*. Analytica chimica acta. 2009; 653(2): 167-172.

7. Har-Noy M, Zeira M, Weiss L, Fingerut E, Or R, Slavin S. *Allogeneic CD3/CD28 cross-linked Th1 memory cells provide potent adjuvant effects for active immunotherapy of leukemia/lymphoma*. Leukemia research. 2009; 33(4): 525-538.

8. Lausoontornsiri W. *Animal Model for Using Allogeneic CD3/CD28 Cross-Linked Th1 Memory Cells Showing a Potent Active Immunotherapy of Leukemia/Lymphoma*. Thai Cancer Journal. 2008; 28(3): 122-130.

9. Boulet N, Estève D, Bouloumié A, Galitzky J. *Cellular heterogeneity in superficial and deep subcutaneous adipose tissues in overweight patients*. Journal of physiology and biochemistry. 2013; 69(3): 575-63.

10. Sandhu A, Kumagai Y, Lapicki A, Sakamoto S, Abe M, Handa H. *High efficiency Hall effect micro-biosensor platform for detection of magnetically labeled biomolecules.* Biosensors and Bioelectronics. 2007; 22(9-10): 2115-2120.

11. Kergaravat SV, Beltamino L, Garnero N, Trotta L, Wagener M, Isabel Pividori M, et al. *Electrochemical magneto immunosensor for the detection of anti-TG2 antibody in celiac disease*. Biosensors and Bioelectronics. 2013; 48: 203–209.

12. Crowther JR. *The ELISA guidebook*. 2nd ed. New York.Human press. 2009; 112-150.

13. Miller EI, Torrance HJ, Oliver JS. *Validation of the Immunalysis® Microplate ELISA for the detection of buprenorphine and its metabolite norbuprenorphine in urine*. Journal of analytical toxicology. 2006; 30(2): 115-119.

14. Zhang H, Nakamura M, Comella K, Moore L, Zborowski M, Chalmers J. *Characterization/quantification of the factors involved in the imparting a magnetophoretic mobility on cells and particles*. European Cells and Materials. 2002; 3(2): 34-36.

15. Smith C. *Striving for purity: advances in protein purification*. Nature Methods. 2005; 2(1): 71-77.

16. Zhang DW, Xiang Y, Zhang JZ. *New advance in computational chemistry: Full quantum mechanical ab initio computation of streptavidin-biotin interaction energy*. The Journal of Physical Chemistry B. 2003; 107(44): 12039-12041.

17. Takahashi M, Yoshino T, Takeyama H, Matsunaga T. *Direct magnetic separation of immune cells from whole blood using bacterial magnetic particles displaying protein G*. Biotechnology progress. 2009; 25(1): 219-226.

18. Miyashiro I, Kuo C, Huynh K, Iida A, Morton D, Bilchik A, et al. *Molecular strategy for detecting metastatic cancers with use of multiple tumor-specific MAGE-A genes*. Clinical chemistry. 2001; 47(3): 505-512.

19. Bhalla N, Chung DWY, Chang YJ, Uy KJS, Ye YY, Chin TY, et al. *Microfluidic Platform for Enzyme-Linked and Magnetic Particle-Based Immunoassay*. Micromachines. 2013; 4(2): 257-271.

20. Zhuang J, Fu L, Xu M, Zhou Q, Chen G, Tang D. *DNAzyme-based magneto-controlled electronic switch for picomolar detection of lead (II) coupling with DNA-based hybridization chain reaction*. Biosensors and Bioelectronics. 2013; 45: 52–57.

21. Zhou CH, Long YM, Qi BP, Pang DW, Zhang ZL. *A magnetic bead-based bienzymatic electrochemical immunosensor for determination of H9N2 avian influenza virus*. Electrochemistry Communications. 2013; 31: 129–132.

The Measurement of C- Reactive Protein (CRP) using Magnetic Nanobeads Add ELISA

Baharifar, H. (MSc)
PhD Student of Medical Nanotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran

Corresponding Author: Baharifar, H.

Email: baharifar.h@gmail.com

Received: 10 Mar 2013
Revised: 25 Jul 2013
Accepted: 31 Jul 2013

Abstract

Background and Objective: Magnetic nanobeads have a large surface-area-to-volume ratio, which is used for immobilized antibody. Using nanoparticles could increase the amount of antibodies in surface in comparison to ELISA. We investigated the ability of magnetic nanobeads to evaluate CRP by colorimetric method and compared the results with ELISA.

Material and Methods: This study is an applicable research conducted in Tehran University of Medical Sciences, 2012. The Magnetic nanobeads conjugated by CRP antibodies were used to measure the protein in the concentration of 1-10 ng/ml (ELISA kit levels) and 0.1 – 0.01 ng/ml. After antigen measurement, the results were compared with Mann Whitney test.

Results: The results in concentration of 1-10 ng/ml are not significantly different ($p = 0.78$). But in concentrations of 0.1-0.01 ng/ml, the difference is significant ($p= 0.02$).

Conclusion: The ability of Magnetic nanobeads in measurement of low concentration of antigen is 100 times better than ELISA. Thus Magnetic nanobead method is useful for early measurement and can easily be used in clinical laboratory.

Keywords: CRP; Magnetic Nanobead; ELISA

This paper should be cited as: Baharifar H. [The Measurement of C- Reactive Protein (CRP) using Magnetic Nanobeads add ELISA]. MLJ. 2014; 7(4): 27-33.[Article in Persian]