الفصل التاسـع عشـر

– تقدير مركب ايبروديون فى الاغذية باستخدام طريقة التحليل المناعى الانزيمى :

* المقدمـــــة
* الطـــــرق
* الجسم المناعى
* مضادات البلازما
* الحســـاسـية Plate sensitization
* تحضير العينة
* بروتوكول التحليل المناعى
– التحليل الكروماتوجرافى .
* تحضير العينة .
* العمود الكرماتوجرافى .
* GLC
* النتائج والمناقشة .

الفصل العشـــرون

– استخدام الأجسام المضادة وحيدة الاوجه للكشف عن اثار المواد الكيميائية :

* مقدمـــــة
* استجابة المناعة
* الأجسام المضادة

obeikandl.com

obeikandl.com

تقدير مركب ايبروديون فى الاغذية باستخدام طريقة التحليل المناعى الانزيمى

Determination of ipodione in foods by ELISA

لقد تم تطوير طريقة التحليل المناعى (ELISA) وهو اختصار يعنى استخدام الانزيم المرتبط بالجسم المناعى Enzyme-linked immunosorbent وهى طريقة وجد انها قادرة على تقدير المبيد الفطرى ايبروديون فى مستخلص الايثيل اسيتات للأغذية وذلك بدون اجراء عملية تنقية . وذلك عندما تم اختيار ٤ سلع كل منهم يحتوى على مركب الايبروديون فى حدود ٠,١ – ١ مللجم/كجم. ولقد لوحظ ان اقل نسبة استرجاع كانت ٨٦٪ كما انه لوحظ ان نسب الاسترجاع لها علاقة بطريقة التحليل باستخدام GLC التى تستخدم الكشاف من النوع N/P . ومن ناحية اخرى وجد ان نواتج التحلل المائى للايبروديون يعاد ترتيبها بحيث تكون تفاعلات هذه النواتج متشابهة مع المركب الاصلى (الايبروديون) . وبالنسبة للفاعلية فقد لوحظ ان المبيدات الفطرية مثل Vinclozolin و Procymidone والشبيهة بالايبروديون كانت اكثر نشاطا بحوالى ٣,٥ الى ١٠ مرات عن الايبروديون .

المقدمـــة Introduction :

ان مركب الايبروديون عبارة عن مبيد فطرى بالملامسة وقد تم تسجيله للاستخدام فى كندا على عدة محاصيل مختلفة . وقد تم نشر عدة طرق لتقدير متبقياته ، ومن هذه الطرق التقدير الكمى باستخدام GLC وذلك بعد اجراء التنقية على الفلوروسيل . وعند اتباع طريقة تحليل بديلة للطرق التقليدية فكان الاختيار على طريقة التحليل المناعى بسبب ما حدث بها من تطورات حيث انها طريقة تعتمد على التفاعلات الكيميائية الخاصـة بالاجسـام المناعيـة . وذلك لعـدد مـــن متبقيات المبيـــدات فى الاغـذية وذلك مثل مركـــب diflubenzauron فى اللبن ومركـب metalaxyl فى الفاكهة ومركب dichlofop-methyl فى البنجـــر وفول الصـويا .

ومند ان وجد ان هذه الطرق تشير الى امكانية التقدير المتخصص باستخدام اقل قدر من العينات ، فان هذ ا الاسلوب قد تم بحثه بغرض تقديمه وجعله فى صورة ميكانيكية لتحليل عدد كبير من العينات وبتكلفة قليلة .

الطـــــرق Methods :

* الجسم المناعى Immunogen :

لقد تم ادماج المركب 3 - (3, 5-Dichlorophenyl) - 2,4 - dioxo - 1 - imidazo- line propionic acid مع بروتين بلازما الانسان وذلك باستخدام مركب 1- [3- (dimethyl -

aninopropyl)] - 3 - ethyl carbodiimide hydrochloride وذلك عند درجة ٦,٦ فى منظم فوسفاتى 0.2 M .

* مضادات البلازما Antiserum :

لقد تم حقن ارانب بيضاء من النوع Newzealand بـ ٠,٥ مللجم جسم مناعى فى ٠,٥ مل مستحلب مكون من المادة الاضافية Freund مع الـ Saline بنسبة ١ : ١ .

* الحســاســية Plate sensitization :

لقد تم تحضير البروتين الحساس وذلك بتكثيف زلال البيض وذلك بخلطه بتفاعل لا مائى (Wie and Hammock) والمحلول المرتبط الناتج يؤخذ منه 4 mg/ml توضع مع 200 ML محلول منظم (بيكربونات) ذو درجة pH ٩,٥ . هذا الخليط يوضع على كل well من اللوح plate . ثم يتم تحضين اللوح على ٤° م لمدة ١٦ ساعة بعدها تغسل ٣ مرات بمحلول ٠,١ ٪ من مادة Tween ٢٠ ثم تغسل مرتين بالماء المقطر . وتخزن على حرارة اقل من الصفر المئوى .

* تحضير العينة Sample preparation :

يتم اخذ عينة (١٠ جم) ويتم إستخلاصها وذلك بهرسها باستخدام ٤٠ مل من الايثيل اسيتات . ثم يتم ترشيحها ونجعل الحجم النهائى ٥٠ مل . ويؤخذ من ذلك المحلول ويتم وضعهم فى انبوبة اختبار زجاجية (١٢ × ٧٥ م) ونجعل المحلول فى صورة جافة بعدها يذاب الجزء الجاف فى 25ul من DMSO .

بروتوكول التحليل المناعى Immunoassay Protocol :

يتم تخفيف بنسبة ١ : ٣٠٠٠ للمصل المضـــاد antiserum وذلك باستخدام جيلاتين ٠,١ ٪ ويؤخذ من هذا التخفيف ١ مل ويضاف للعينة . بعد ذلك تضاف فى انبوبة إختبار تركيزات متدرجة من مركب iprodione القياسى والمحضر فى 25ul من مذيب DMSO. هذه التركيزات تكون فى حدود ٢ر ، ٤ر ، ٨ر ، ١,٦ ، ٣,٢ ، ١٢,٨ نانوجرام ، ويتم تحضين الانابيب بعد ذلك على ٤° م لمدة ٣٠ دقيقة .

تؤخذ بعد ذلك 200UL وتضاف فى صورة ٣ مكررات وذلك الى wells الموجودة على الالواح السابقة التحضير ، وبعد التحضين على ٤° م لمدة ساعة . يتم الغسيل ٣ مرات بمحلول ١ر ٪ من مادة Tween20 . بعد ذلك يضاف 225 UL من المحلول المخفف بنسبة ١ : ١٠٠٠ من مادة Horseradis peroxidase والمعلم بـ anti-rabbit وبعد ٣٠ دقيقة على حرارة المعمل فان الالواح تغسل ثـم يضاف 225 UL من مـادة التفاعـل وهـى (O- phenylene - diamine/hydrogen) ويتم ايقاف التفاعل بعد ١٥ دقيقة من الاضافة الاخيرة لمادة التفاعل وذلك باضافة soul من حمض الكبريتيك OSM . ويتم اخذ قراءة الكثافة الضوئية O.D. من جهاز قياس الالوان .

التحليل الكروماتوجرافى GLC :

* تحضير العينة Sample preparation :

ان مستخلص العينة والمحضر فى الايثيل اسيتات والذى تم تحضيره للعمل بطريقة ELISA فانه يتم تبخيره الى درجة الجفاف ثم يتم توزيعة بين ٢٥ مل ماء ، ٢٥ مل دايكلورو ميثان . بعد ذلك يتم الاستخلاص من الطبقة المائية مرة اخرى بـ ٢٥ مل من الدايكلورو ميثان ويتم جمع المستخلصين الاول والثانى ثم يتم تجفيفهم .

* العمود الكروماتوجرافى Column Chromatography :

يتم اخذ المستخلص الجاف ب١ ٥ مل دايكلورو ميثان ويتم التحليل الكروماتوجرافى على عمود طوله ١٨٠ سم × ٦ م ومعبأ بـ ٩ جرام فلوروسيل مخلوط بالداى كلورو ميثان . مع ملاحظة انه اولا يتم عملية اراحة العمود بـ ٢٠ مل من الداى كلورو ميثان والناتج يتم الاستغناء عنه ثم تتم اضافة الـ ٥ مل من المستخلص السابق للعمود وتتم الازاحة بـ ٢٥ مل من الايثيل اسيتات ٢ ٪ فى الداى كلورو ميثان والناتج يؤخذ وتجرى له تجفيف والمتبقيات تذاب فى ٢ مل تولوين للتقدير بواسطة GLC .

GLC :

لقد تم استخدام جهاز Avarian والمتصل بكشاف من النواع N/P ذو درجة حرارة ٢٦٠° م وعمود الفصل كان بطول ٢٠ متر وقطر داخلى ٢٥ر م ومعبأ بمادة السليكا المغلفة بـ ٢٥ر وحدة من مادة DBS وتم حقن العينات بحجم IUL وكان معدل سريان الغازات كالآتى :

غاز الهيليوم ٣٣ سم /ثانية

الهـــــواء ١٧٥ مل/ دقيقة

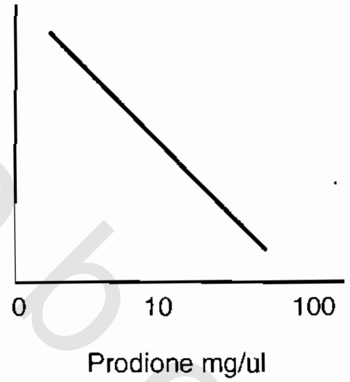
هيدروجين ٤,٥ مل / دقيقة

نتروجين ٣٠ مل / دقيقة

وتم حقن العينة على حرارة ١١٠ م وبعد ٤٥ ثانية تمت البرمجة للحقن على ٢٤٠ م ووجد ان وقت الحبس هو ٥,٣ دقيقة .

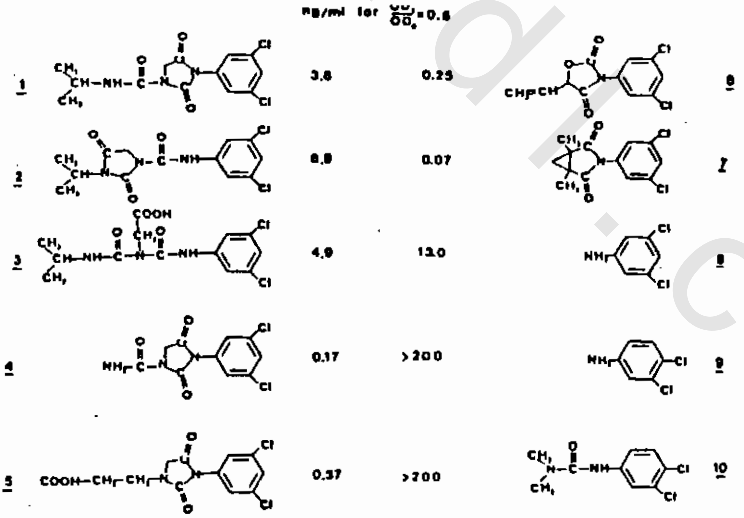
النتائج والمناقشة :

فى شكل (١) نجد المنحنى القياسى والذى يوضح العلاقة الخطية بين لوغاريتم التركيز للمركب الايبروديون وبين الكثافة الضوئية للـ wells بعد التفاعل الانزيمى . ووجـــد ان الميل يزداد من ١٧ر – ٢٠ر عندمـــا تم استخدام الجيلاتين بدلا من bovin serum albumin فى التخفيف مما يدل على حساسية التقييم . ووجد ان اقل حـــدود امكن الكشف عنهـــا كـــانت ٠٣ر مللجم/كجم وذلك بناءا على قيم الانحراف القيـاسى لنقط المنحنى القياسى .



شكل (١): المنحنى القيـــاس لمركب الايبروديون بطريقة التحليل المناعى

ونسب الاسترجاع لعدة سلع قد تم تقديرها باستخدام ELISA و GLC وتم ادراجها فى جدول . وفى كل الاحوال باستثناء التقدير بالـ GLC من الفراولة . فان نسب الاسترجاع قد تجاوزت ٨٥ ٪ . ومع تكرار التجارب فى حالة عينات الطماطم عندما كانت تحتوى على ٥ر مللجم / كجم فان قيمة معامل الاختلاف = ٧,٨ ٪ باستخدام ELISA مقارنة بقيمة ٣,٨ ٪ باستخدام GLC .



شكل (٢) يبين الاستجابات النسبية لعدة مركبات والشبيهة بالايبروديون .

obeikandi.com

وقد تم تقدير الاستجابة بتطبيق قيم الكثافة الضوئية المتحصل عليها من التركيزات المختلفة من المركب مقابل لوغاريتم التركيز . فنجد ان المركب رقم (٢) ناتج تمثيل والمركب (٣) عبارة عن ناتج تحلل مائى . وكل منها يعطى استجابات متشابهة للايبروديون . بينما مركب (٨) -3, 5 dichloro aniline هو الاقل تثبيطا للجسم المضاد ومركب (٩) شبيه بمركب (٨) بينما مركب (١٠) عبارة عن مبيد الحشائش diuron . ومركب (٦) هو مبيد vincllosolin ومركب (٧) هو مركب Procymidone . وهما لم يسجلا للاستخدام فى كندا ولا يتوقع استعمالهم على المحاصيل المحلية . ولكن عند استخدام هذه المركبات الفطرية فى البلاد الخارجية خاصة على محصول العنب فمن الممكن ان ينتج عن ذلك وجود متبقيات فى السلع المستوردة والتى تعطى قيم ذات خطأ كبير عن محتوى هذه السلع من مبيد الايبروديون والذى يقاس بطريقة ELISA . لذلك فلابد من اجراء عملية غربلة لهذه الطريقة من خلال معنويتها واهميتها فى تقييم المبيدات الفطرية الشبيهة التركيب .

استخدام الاجسام المضادة وحيدة الاوجه للكشف عن اثار المواد الكيميائية

Monoclonal antibodies for the detection of trace chemicals

ان المشاكل المصاحبة للتحليل الكيميائى باستخدام طرق الكروماتوجرافى التقليدية من الممكن ان تحدد الكشف عن اثار متبقيات المواد العضوية . فمن احدى هذه المشاكل مثلا نجد التكلفة والوقت المستهلك لتحليل كل عينة الامر الذى يعوق تحليل عدة عينات . الامر الذى يجب معه اجراء تطوير فى الاساليب المتبعة وتغييرها . ومن احدى الطرق الحديثة هى طريقة التحليل المناعى Immunoassay (ويقصد بها استخدام طريقة المناعة) وذلك كاحدى الوسائل التى تقلل التكلفة وتمكن من تحليل عدة عينات فى وقت واحد بطريقة اتوتوماتيكية . ولقد تم ذلك التطور فى العقد الماضى . وذلك باستخدام الاجسام المضادة من النوع Monoclonal والتى اقترحت كطريقة متخصصة ولها قدرة اختيارية عالية عن تلك الطريقة الاعتبارية والتى تعتمد على استخدام الامصال المضادة بالدم antisera .

وطريقة التحليل المناعى من الممكن تطويرها بحيث تكون سهلة الاستعمال وتكون فى صورة وسيلة حقلية متنقلة وتعطى نتائج سريعة ولها القدرة على الكشف عن المتبقيات فى حدود تصل الى اقل من واحد جزء فى البليون ، وهذا الموضوع يشمل الطرق المختلفة التى عملت على تطوير هذا الاسلوب وذلك من خلال الكشف عن جزيئات عضوية صغيرة وذلك باستخدام التحليل المناعى لمركب 2,3,7,8-TCOD(2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin) كمثال .

مقدمة Introduction :

لقد اتضح ان هناك عدد كبير من طرق التقييم المناعى للمبيدات هذه الطرق عبارة عن دراسات توضح ان الاجسام المضادة تستطيع ان تعمل على تكوين روابط مع مدى واسع من

الجزيئات العضوية الصغيرة . وهى طريقة غاية فى الحساسية وتكلفتها قليلة وسريعة الكشف عن الملوثات . وطريقة التحليل المناعى تعتبر واضحة ومناسبة لتقدير المتبقيات كميا ، وعندما يكون من الصعوبة استخدام طرق الكروماتوجرافى . كما فى حالة الباراكوات والسيبرمثرين أو عندما تكون المركبات المراد تحليلها معقدة وذات نواتج بيولوجية مشتقة مثل السموم الفطرية والافيرمكتين ، أو عندما يراد تقدير مشابه واحد فقط مثل dioxin و S-bioallethrin .

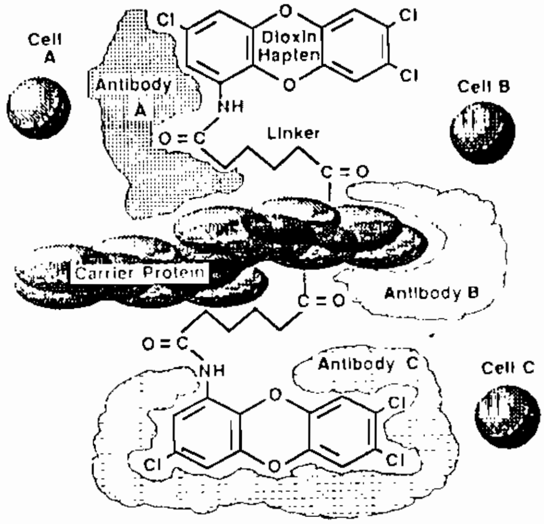
وهنا سيتم استخدام الاجسام المضادة لمركب dioxin كنموذج لتحليل متبقيات المبيدات . فمنذ عشرة سنوات شوهد تطور رهيب فى استخدام طريقة التقييم المناعى Map وذلك بسبب ما تتمتع به من اختلافات متميزة عن الطرق الاعتيادية . وهى طريقة تختلف عن تلك التى تسمى Polyclonal antisera حيث انها غير مكلفة بالاضافة الى انها تستخدم كطريقة قياسية .

ان اختبارات الاجسام المضادة تعتمد على إستغلال الجهاز المناعى الطبيعى وما يتولد منه من استجابات فى صورة تكوين antigens . وفى شكل (١) يتضح المميزات العديدة لاستجابة الجهاز المناعى ، وفى حالة الجزيئات الصغيرة مثل dioxins فانه لا يستجيب لهذا الجسم المضاد اذا حقن بمفرده حيث انه لا بد من ارتباطه بجزيئات حاملة له وعادة ما تكون هذه الحوامل عبارة عن بروتين . ويجب ملاحظة انه يجب تحديد واختيار اماكن الارتباط وطبيعتها الكيميائية حيث ان لذلك تأثير على طبيعة انتاج الاجسام المضادة .

استجابة المناعة Clonal nature of the immune response :

ان الصفة الرئيسية لاستجابة المناعة للجسم المضاد هى ظاهرة الإفراز للاجسام المضادة . فنجد انه فى كل الفقاريات فانها تحتوى على خلايا ليمفية من النوع بيتا B وهذه الخلايا تعتبر احدى انواع الخلايا المناعية التابعة لجلوبيولين الدم ، وتتميز بوجود مستقبلات خاصة موجودة على غلافها الخارجى . كما اننا نلاحظ ان عليها مستقبل واحد مميز لها فى عملية ارتباطها بالجسم الغريب . وبعد ان تتم عملية المناعية Immunization (ادخال اجسام غريبة وتكوين اجسام مضادة لها) فان هذه الخلايا التى من النوع بيتا B تكون قادرة على ان تتحد مع الاجسام الغريبة وعند تلك المرحلة فان هذه الخلايا تفرز اجسام مضادة عند نفس مكان وجود المستقبلات التى تتحد مع الجسم الغريب . وبالتالى فان تعدد الاجسام المضادة فى البلازما تعكس مدى تعدد الخلايا التى افرزت هذه الاجسام المضادة (بمعنى ان كل جسم مضاد يفرز من خلية واحدة) وعموما فانه يمكن توضيح ما سبق فى الشكل (١) .

obeikandl.com



شكل (١٠) رسم توضيحى للإستجابة المناعية لهابتين الأدلوكسين المرتبط مع البروتين الحامل

يتضح من الشكل ان هناك ٣ أنواع من الخلايا من النوع بيتا B وما تفرزه من اجسام مضادة مميزة لها وذلك فى صورة استجابة للجسم الغريب (hapten) وهذه العملية لهذه الانواع من الخلايا تكون موجودة فى الحيوان الذى تم تحصينه من هذه المادة (hapten) حيث تلاحظ ان بلازما هذا الحيوان الذى تم تحصينه تحتوى على جميع الاجسام المضادة الملائمة لهذا الجسم الغريب والذى بالتالى تسمى (مضادات البلازما متعددة الأوجه) .

ومن نفس الشكل نجد ان بعض الاجسام المضادة " C " تتفاعل مع hapten بمفرده بينما البعض الاخر B يتفاعل مع البروتين الحامل لهذا الـ hapten والانواع المتبقية من هذه الاجسام المضادة A تفاعل مع الـ hapten أو الرابطة التى تربط بين الـ hapten والبروتين الحامل له أو مع الاثنين معا (hapten + بروتين حامل) . ونجد ان الاجسام المضادة من النوع A فقط هى المرغوب فيها فى اجراء عمليات التحليل المناعى وذلك من حيث انها مفيدة من حيث تخصصها فى هذا النوع من التحليل ، ويجب ملاحظة ان طرق الفصل الكروماتوجرافى لهذه الاجسام المضادة يعمل على احداث طرد لها من حيث انها تسبب تغيير فى درجة تخصصها .

كما ان الاجسام المضادة من النوع A نجد ان لها اوجه ارتباط متعددة لترتبط بعدة انواع من الـ hapten بغض النظر عن عدد جزيئات الـ hapten ولكن بشرط ان يكون الوزن الجزيئى لهذا الـ hapten اقل من ٥٠٠ .

*** الأجسام المضادة وحيدة الأوجه**

بعكس ما يحدث فى نظام مضادات البلازما المتعددة الاوجه Polyclonal نجد ان تحضير الاجسام المضادة التى تم افرازها من خلايا متخصصة فى تفاعلها monoclonal فانها لا يمكن

obeikandi.com

فصلها فى صورة اجسام مضادة متخصصة عن غيرها من اجسام بروتينية موجودة فى البلازما . ولكن من الممكن فصل الخلايا المفرزة لهذة الاجسام المضادة الخاصة بها ، وذلك كما يلى : بعد عملية التحضين فان الخلايا من النوع B يتم ازالتها وفصلها من البلازما وتجعلها تنمو فى بيئة وذلك بادماجها فى خلايا خاصة بالأورام والتى قد تم عزلها وزراعتها مسبقا ويتم ذلك فى الخارج In Vitro معمليا .

هذه الخلايا المدمجة B تسمى بعد زراعتها باسم hybridomas وبالتالى تستطيع ان تنمو وتفرز الاجسام المضادة الخاصة بها . وهذه الخلايا نجد انها تكون مستعمرات تستطيع افراز الاجسام المضادة بصورة موحدة حيث ان كل مستعمرة تكون ناتجة من نمو خلية واحدة الامر الذى يتبعه إنتاج اجسام مضادة بصورة متشابهة وموحدة ومتخصصة لكل جسم غريب .

مما سبق نجد انه لابد من استخدام طريقة ELISA لكى نتعرف ونحدد خاصية الارتباط بين الجسم الغريب وبين الجسم المضاد لاستخدامها كوسيلة اساسية فى التحليل المناعى .

ونجد ان اساس التفاعل يعتمد على الفكرة التالية :

نجد ان الانزيم الموجود فى هذه الطريقة ELISA يتوزع ويعمل على ربط المركب الحر الموجود بالعينة والمراد تقديره وذلك بالجسم المضاد الذى تم تحضيره سابقا والذى قد تم ادمصاصه على جزيئات بلاستيكية رقيقة لها خاصة الادمصاص . وكمية الجسم المضاد الذى ارتبط بالجسم الغريب يتم تقديره وذلك بكشف النشاط الانزيمى الذى ارتبط بالجسم المضاد . وهى طريقة سريعة وسهلة علاوة على انها طريقة حساسة فى التقدير الكمى والتى يمكن استخدامها لمعرفة كمية الاجسام المضادة المتخصصة المرتبطة بالعينات الغير معروفة .