

جاذب‌های تمایلی زیستی مبتنی بر بزرگ مولکول‌های طبیعی

مهنا چگنی^۱، زهرا طالب‌پور^{۲*}

۱. تهران، دانشگاه الزهرا (س)، دانشکده شیمی، گروه شیمی تجزیه، دانشجوی کارشناسی ارشد شیمی

تجزیه

۲. تهران، دانشگاه الزهرا (س)، دانشکده شیمی، گروه شیمی تجزیه، استاد شیمی تجزیه

چکیده ...

بزرگ مولکول‌های طبیعی از جمله لکترین‌ها، پروتئین A و پادتن‌ها، به‌عنوان دسته‌ای از جاذب‌های تمایلی با منشأ زیستی شناخته می‌شوند که توانایی برقراری برهم‌کنش‌های اختصاصی با آنالیت‌ها را دارند. سوانگاری مایع و استخراج فاز جامد تمایلی مبتنی بر این مواد، رویکردی قدرتمند برای جداسازی و پیش‌تغلیظ هدفمند آنالیت‌ها از بافت‌های پیچیده زیستی، زیست‌محیطی و غذایی است. این جاذب‌ها به‌دلیل گزینش‌پذیری بالا و توانایی شناسایی اختصاصی مولکول‌های هدف، در سال‌های اخیر توجه بسیاری از محققان را در حوزه شیمی تجزیه، علوم زیستی و فناوری‌های جداسازی جلب کرده‌اند. در این مقاله، اصول بنیادی حاکم بر جاذب‌های ذکر شده مورد بررسی قرار می‌گیرد و به چگونگی گسترش استفاده از این جاذب‌ها در فنون استخراج و ریز استخراج فاز جامد پرداخته می‌شود. کاربرد جاذب‌های تمایلی در شناسایی عوامل بیماری‌زا (پاتوژن‌ها)، تحلیل گلیکوپروتئین‌ها و تشخیص نشانگرهای زیستی تشریح می‌شود. همچنین مثال‌هایی عملی از ترکیب این جاذب‌ها با روش‌های شناسایی و جداسازی نظیر طیف‌سنجی جرمی و الکتروفورز موئینه ارائه می‌شود. علاوه بر این، مزایا و قابلیت‌های این جاذب‌های تمایلی در افزایش انتخاب‌پذیری، بهبود کارایی استخراج، کاهش اثرات بافت و توسعه روش‌های نوین آماده‌سازی نمونه مورد توجه قرار گرفته، جایگاه آن‌ها در کاربردهای زیست‌پزشکی، زیست‌محیطی و صنایع غذایی به‌صورت خلاصه مورد بررسی و ارزیابی قرار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی:

جاذب تمایلی طبیعی،
ریزاستخراج فاز جامد،
استخراج فاز جامد پخشی،
ریز استخراج فاز جامد
درون لوله،
ریز استخراج فاز جامد در
نوک پیت

*پست الکترونیکی مسئول مکاتبات:

ztalebpour@alzahra.ac.ir

۱ مقدمه

آماده‌سازی نمونه، گامی تعیین‌کننده در تحلیل ترکیبات در غلظت‌های بسیار پایین در بافت‌های پیچیده مانند پلاسمای خون، ادرار، شیر و عصاره‌های گیاهی است. اگرچه جاذب‌های مرسوم قابلیت استخراج طیف گسترده‌ای از ترکیبات آلی را دارند، اما انتخاب‌پذیری پایین آن‌ها موجب استخراج هم‌زمان مزاحمت‌های ناشی از بافت نمونه و کاهش صحت و دقت آزمون می‌شود.

راه‌حل اصلی رفع این مشکلات انجام جداسازی‌های هدفمند یا تمایلی است که طی آن آنالیت مشخص به کمک جاذبی انتخاب‌پذیر که ساختار و شیمی سطح آن به گونه‌ای طراحی شده تا تنها به مولکول هدف تمایل داشته باشد، از محیط پیچیده جدا می‌شود [۱]. برای اولین بار ایده این نوع از جاذب‌ها بر مبنای برهم‌کنش‌های خاص بین مولکول‌های زیستی، مانند پادتن و پادگن‌ها، شکل گرفت. با گذشت زمان و ارتقای فناوری‌های تجزیه‌ای این مفهوم به جاذب‌های ساختار یافته‌ای گسترش یافت که بسیاری از آن‌ها بر پایه بزرگ‌مولکول‌های طبیعی طراحی شدند. در این راستا ابتدا از این جاذب‌ها به عنوان فازهای ساکن تمایلی در فنون سوانگاری [۲] استفاده شد و در ادامه حضور این جاذب‌ها در فنون مختلف استخراج و ریز استخراج فاز جامد که توانایی اتصال مستقیم به فنون مختلف مانند طیف-سنجی جرمی (MS) [۳] را داشتند گسترش یافت. انواع متفاوتی از جاذب‌های تمایلی بر پایه بزرگ‌مولکول‌ها وجود دارند. بر اساس منشأ می‌توان آن‌ها را به دو بخش طبیعی که در سامانه‌های زیستی یافت می‌شوند و سنتزی که طی انجام فرایندهای آزمایشگاهی تهیه می‌شوند، تقسیم‌بندی کرد. کاربرد این دسته از مواد در حوزه‌های جداسازی و خالص‌سازی [۴] یا تحلیل [۵] داروها، پادتن‌ها، پروتئین‌ها و ویروس‌ها رشد چشم‌گیری داشته است. همچنین نقش استخراج تمایلی در حوزه تشخیص بیماری‌ها و نشانگرهای زیستی بسیار مؤثر بوده و به حل برخی مشکلات درمانی منجر شده است [۵].

این مقاله با هدف ترویج دانش فنی مربوط به جاذب‌های تمایلی مبتنی بر بزرگ‌مولکول‌های زیستی، ابتدا به بیان اصول بنیادین متداول‌ترین جاذب‌های تمایلی طبیعی (لکترین‌ها، پروتئین‌ها و پادتن‌ها) پرداخته، سپس با ارائه مثال‌های عینی از کاربردهای موفق آن‌ها در فنون استخراج و ریزاستخراج فاز جامد برای آزمون گلیکوپروتئین‌ها، پادتن‌ها، پروتئین‌ها، شناسایی پاتوژن‌ها و سایر اهداف زیستی تصویری جامع از توانمندی‌های این حوزه ارائه می‌دهد.

۲- معرفی متداول‌ترین ترکیبات طبیعی بزرگ‌مولکول به کاررفته به عنوان جاذب‌های تمایلی ۱-۲ لکترین‌ها

لکترین‌ها پروتئین‌هایی هستند که به‌طور اختصاصی با کربوهیدرات‌ها، گروه‌های قندی متصل به پروتئین‌ها (گلیکوپروتئین‌ها) یا گروه‌های قندی متصل به لیپیدها (گلیکولیپیدها) برهم‌کنش دارند. این پروتئین‌ها به‌طور معمول از دو یا چند زنجیره پلی‌پپتیدی که جایگاه‌های اتصال خاص برای کربوهیدرات‌ها دارند تشکیل شده‌اند. ثابت تفکیک (Kd) این اتصال به‌طور معمول در محدوده 10^{-2} تا 10^{-6} مولار است که نسبت به برهم‌کنش پادتن-پادتن (10^{-8} تا 10^{-12}) ضعیف‌تر است [۱].

لکترین‌ها به‌طور متداول از منابع طبیعی گیاهی، جانوری یا ریزموجوداتی مانند قارچ‌ها و باکتری‌ها استخراج می‌شوند [۶]. برای مثال می‌توان به کانکوالین A (Concanavalin A) که از دانه‌های گیاهی گرفته می‌شود و به‌طور اختصاصی به α -D-مانوز و α -D-گلوز متصل می‌شود، اشاره کرد. این لکترین به عنوان جاذبی برای جداسازی گلیکوپروتئین‌های دارای N-گلیکان (به‌ویژه از نوع با مانوز بالا) کاربرد گسترده دارد [۱]. این ترکیب به‌طور کووالانسی روی بستر جامد (دانه‌های آگارز یا سفارز فعال‌شده) تثبیت می‌شود. بستر باید متخلخل و از نظر شیمیایی پایدار باشد تا جریان نمونه از میان آن عبور کند. در مرحله بارگذاری نمونه، تنها مولکول‌هایی که قندهای مکمل جایگاه فعال لکترین را دارند، از طریق پیوندهای هیدروژنی، واندروالس و اثر آب‌گریزی به لکترین متصل می‌شوند. سایر پروتئین‌ها بدون اتصال از ستون خارج می‌شوند. کانکوالین A برای فعالیت اتصال خود به یون‌های منگنز و کلسیم نیاز دارد و بنابراین بافرهای مورد استفاده در مرحله شستشو باید حاوی این یون‌ها باشند. اتصال لکترین به مونوساکاریدها یا الیگوساکاریدها برگشت‌پذیر و رقابتی است و با افزودن قندهایی که در رقابت قوی‌تر باشند (به‌طور مثال مانوز برای لکترین کانکوالین A یا تغییر شرایط محیطی از جمله pH، می‌توان مولکول هدف را از لکترین جدا کرد [۷].

جاکالین (Jalalin) لکترین دیگری است که از درخت جاکالین تهیه می‌شود و به O-گلیکان‌های حاوی هسته GalNAc (آنتیژن Tn، آنتیژن T و آنتیژن T سیالین دار) تمایل نشان می‌دهد. همچنین این لکترین می‌تواند به N-گلیکان‌های با مانوز بالا نیز متصل شود [۸]. استفاده از این جاذب تمایلی همراه با اختصاصیت بالا است و به دلیل اعمال شرایط ملایم، پروتئین‌های حساس در طی این فرایند تخریب نمی‌شوند. کاربرد گسترده این دسته از ترکیبات

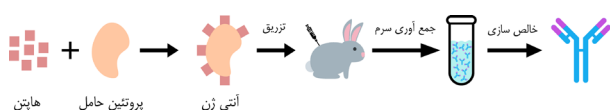
رایج‌ترین بسترها شامل آگارز، سیلیکای متخلخل و پلیمرهای آب‌دوست هستند. روش‌های تثبیت کووالانسی از طریق گروه‌های آمین (باقی‌مانده لایزین) یا گروه‌های کربوهیدرات ناحیه Fc (برای تثبیت جهت‌دار) متداول‌ترین رویکردها هستند [۱]. تثبیت جهت‌دار که طی آن ناحیه متغیر پادتن در دسترس باقی می‌ماند، کارایی جذب را به‌طور چشمگیری افزایش می‌دهد. اگرچه پادتن‌ها در حالت ایده‌آل اختصاصیت کامل نسبت به یک آنالیت دارند، اما واکنش‌پذیری متقاطع (Cross-Reactivity) با ترکیبات دارای ساختار مشابه امکان استخراج گروهی از آنالیت‌ها را فراهم می‌کند. این ویژگی برای آنالیت‌های کوچک (کمتر از ۱۰۰۰ دالتون) که به‌طور معمول تعداد اپیتوپ‌های محدودی دارند (بخشی از پادگن که پادتن آن را شناسایی می‌کند)، بسیار شایع است. به‌عنوان مثال، پادتن ضد علف‌کش پروپانیل قادر است مشتقات فنیل‌اوره مختلفی مانند دیورون و لینورون را با بازده بالا استخراج کند [۱]. همچنین پادتن‌های مونوکلونال نسبت به پلی‌کلونال انتخاب‌پذیری محدودتری دارند.

به‌منظور تولید این نوع از جاذب‌ها ابتدا هاپتن (بخشی از مولکول هدف که به تنهایی قادر به ایجاد پاسخ ایمنی نیست) از طریق اتصال به گروه عاملی مشخص، قابلیت تولید پاسخ ایمنی پیدا می‌کند (شکل ۱). سپس هاپتن ساخته‌شده به مولکول پروتئینی حامل، مانند آلبومین سرم گاوی متصل شده، پادگن کامل را تشکیل می‌دهد. ورود این پادگن به بدن جانور (میزبان)، منجر به القای پاسخ ایمنی و تولید اختصاصی پادتن علیه آن می‌شود. در نهایت، سرم خون میزبان جمع‌آوری شده و پادتن‌های موجود در آن به‌منظور تثبیت روی بسترهای مناسب، جداسازی و خالص می‌شوند [۱۰].

ویژگی‌ها و شرایط عملکرد متداول‌ترین بزرگ مولکول‌های زیستی استفاده شده به‌عنوان جاذب‌های تمایلی، در جدول (۱) مقایسه شده است.

۳ کاربرد جاذب‌های تمایلی بر پایه بزرگ مولکول‌های طبیعی

در سال‌های اخیر، توسعه روش‌های آماده‌سازی نمونه به سمت کاهش مصرف حلال، کاهش حجم نمونه و افزایش سرعت و کارایی استخراج سوق یافته است. در این راستا، فنون استخراج فاز جامد (Solid Phase Extraction; SPE) (شکل



شکل (۱) مراحل تولید و خالص‌سازی پادتن.

در تخلص گلیکوپروتئین‌ها و مطالعه تغییرات گلیکوزی کردن در سرطان است.

۲-۲ پروتئین A

پروتئین A یکی از مهم‌ترین لیگاندهای مورد استفاده در تخلص پادتن‌ها، به‌ویژه ایمونوگلوبولین G (IgG)، محسوب می‌شود. این پروتئین جزء دیواره سلولی باکتری (Staphylococcus Aureus) بوده و دارای چهار ناحیه اتصال با میل ترکیبی بالا برای ناحیه ثابت (Fc) پادتن‌های IgG است.

پروتئین A در محدوده وسیعی از pH پایداری مناسبی دارد. اتصال این پروتئین به IgG در pH خنثی یا نزدیک به خنثی بسیار قوی است؛ ازاین‌رو مرحله بارگذاری نمونه و اتصال پادتن به پروتئین A به‌طور معمول در این شرایط انجام می‌شود. برای جداسازی پادتن متصل‌شده، pH محیط به‌طور ناگهانی کاهش داده می‌شود که این تغییر موجب تضعیف برهم‌کنش پروتئین A با ناحیه Fc پادتن و در نتیجه آزاد شدن پادتن است. به‌طور معمول از بافرهای اسیدی برای مرحله شویش استفاده می‌شود و سپس برای جلوگیری از آسیب به ساختار پادتن، محلول خروجی بلافاصله با بافر قلیایی خنثی می‌شود.

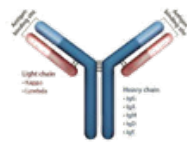
علاوه بر این، نسخه‌های مهندسی‌شده‌ای مانند پروتئین A/G توسعه یافته‌اند که با ترکیب دومین‌های اتصال‌دهنده پروتئین‌های A و G کارایی و گستره اتصال بالاتری برای خالص‌سازی پادتن‌ها ایجاد می‌کنند [۹،۵].

امروزه علاوه بر استخراج طبیعی، پروتئین مورد نظر به‌صورت نوترکیب نیز تولید می‌شود. در این روش، ژن کدکننده پروتئین در میزبان‌هایی نظیر Escherichia Coli کلون و بیان شده، امکان تولید انبوه با خلوص بالا فراهم می‌شود. پروتئین خالص‌شده به‌طور معمول به‌صورت کووالانسی روی بسترهای جامدی مانند آگارز یا سفارز تثبیت می‌شود تا رزین‌های تمایلی برای خالص‌سازی پادتن ایجاد شود.

۲-۳ پادتن‌ها

پادتن‌ها بزرگ مولکول‌هایی هستند که توسط سامانه ایمنی مهره‌داران تولید می‌شوند. هدف اتصال این ترکیبات می‌تواند آنزیم‌ها، پروتئین‌ها، ویروس‌ها، هورمون‌ها، پپتیدها و ... باشد [۱۰]. جاذب‌های مبتنی بر آنتی‌بادی با تثبیت پادتن‌های پلی‌کلونال یا مونوکلونال بر روی بستر جامد تهیه می‌شوند. به‌دلیل اندازه بزرگ پادتن‌ها (به‌طور مثال IgG با جرم ۱۵۰ کیلودالتون)، بستر باید دارای حفراتی با قطر حداقل ۳۰-۵۰ نانومتر باشد [۱].

جدول ۱ مقایسه ویژگی‌ها و شرایط عملکرد متداول‌ترین بزرگ مولکول‌های زیستی.

نام	نماد	منبع	هدف جاذب	نوع برهم‌کنش	سازوکار شویش	میل پیوندی	مزیت اصلی	محدودیت
لکترین		منابع گیاهی، جانوری و با ریز موجودات	گلیکوپروتئین‌ها بر اساس نوع قند	پیوندهای هیدروژنی و آب‌گریزی	افزودن قندهای رقابتی	مولار	گلیکوزیلاسیون‌ها زیستی تشخیص	فقط مناسب برای اهداف گلیکوزیله
پروتئین A		جزء از دیواره سلولی باکتریایی / نوترکیب	ناحیه FC پادتن‌های IgG	پیوندهای آب‌گریزی، هیدروژنی، الکتروستاتیکی	pH تغییر	مولار	تخلیص صنعتی IgG استاندارد	محدود به IgG
پادتن (ایمونوآفینیته)		سیستم ایمنی مهره‌داران	آنزیم‌ها، پروتئین‌ها، ویروس‌ها، هورمون‌ها، پپتیدها و ...	پادتنی-پادتن	pH تغییر	مولار	اختصاصیت بالا (خلق جاذب برای هر مولکول)	تولید پرهزینه و پایداری محدود

در فنون SPE و SPME، بزرگ مولکول‌های طبیعی به دلیل زیست‌سازگاری، تجدیدپذیری، هزینه پایین و امکان اصلاح شیمیایی، جایگاه ویژه‌ای پیدا کرده‌اند و توانسته‌اند عملکرد مناسبی در استخراج انتخابی طیف وسیعی از آلاینده‌ها، ترکیبات زیستی و مواد دارویی از خود نشان دهند. از این رو، بررسی کاربرد بزرگ مولکول‌های طبیعی در این فنون استخراجی به یکی از محورهای مهم پژوهش‌های اخیر تبدیل شده است. [۱۱]

۳-۱ روش‌های مبتنی بر SPE

روش‌های مبتنی بر فن پرکاربرد SPE بر پایه بزرگ مولکول‌های طبیعی به دلیل گزینش‌پذیری بالاتر نسبت به جاذب‌های مرسوم، کاهش مصرف حلال، سادگی، سرعت بالا، کاهش اثرات بافت نمونه، هزینه و آلودگی‌های محیط زیستی و از همه مهم‌تر سازگاری با سامانه‌های تجزیه‌ای به سرعت در حال

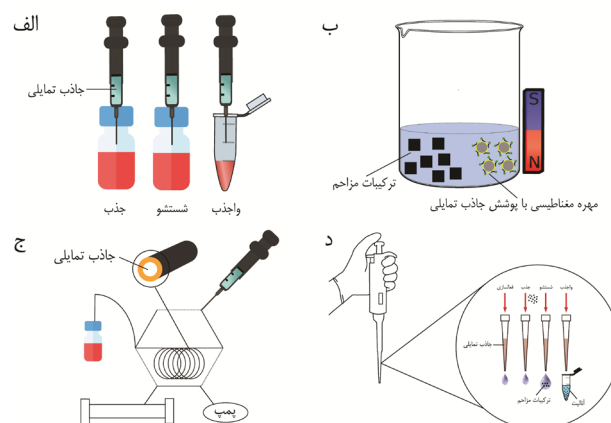
۲ الف) و ریزاستخراج فاز جامد (-Solid Phase Microextraction; SPME) به عنوان دو روش پرکاربرد در جداسازی و پیش‌تخلیظ آنالیت‌ها از نمونه‌های پیچیده مورد توجه قرار گرفته‌اند. از فنون SPE می‌توان به استخراج فاز جامد پخشی (Dispersive Solid Phase Extraction; D-SPE) (شکل ۲ ب) و از فنون SPME می‌توان به ریزاستخراج فاز جامد درون‌لوله‌ای (In-Tube Solid Phase Microextraction; IT-SPME) (شکل ۲ ج)، و استخراج فاز جامد نوک پپیت (Pipette Tip Solid Phase Micro Extraction; PT-SPE) (شکل ۲ د) اشاره کرد که به دلیل سهولت اجرا، مصرف کم جاذب و حلال و امکان ادغام با سامانه‌های تحلیلی، کاربرد گسترده‌ای یافته‌اند. کارایی این روش‌ها تا حد زیادی به نوع جاذب مورد استفاده وابسته است؛ از این رو پژوهش‌های گسترده‌ای برای توسعه جاذب‌های جدید انجام شده است. در میان انواع جاذب‌ها به عنوان فاز استخراجی

hCG β پس از بهینه‌سازی پروتکل استخراج به دست آمد. نتیجه این تحقیق می‌تواند در آینده در مطالعات مربوط به شناسایی نشانگرهای زیستی بیماری‌های بارداری، از جمله سندرم داون جنین، کاربرد داشته باشد.

۲-۳ فن استخراج فاز جامد پخشی (d-SPE)

در روش d-SPE از ذرات مغناطیسی با پوششی از جاذب‌های تمایلی بزرگ‌مولکول استفاده می‌شود که درون کل محلول پخش هستند. در این روش ابتدا ذرات مغناطیسی (مانند Fe_3O_4) تهیه و با استفاده از پوشش‌دهی مناسب (مانند سیلیکا)، از به هم چسبیدگی آن‌ها جلوگیری کرده، پایداری‌شان افزایش می‌یابد. در نهایت جاذب‌های تمایلی مثل لکترین، پروتئین A یا پادتن‌ها با اتصال‌دهنده‌های مناسب به سطح ذرات مغناطیسی متصل می‌شوند. این ذرات به دلیل نسبت سطح به حجم بالا، با نمونه، سطح تماس زیادی دارند و با آسان‌تر کردن فرایند جداسازی توسط آهنربای خارجی استخراج را کارآمدتر پیش می‌برند. به عنوان نمونه می‌توان به ویروس موزایک انجیری (Fig Mosaic Virus; FMV) اشاره کرد که در دنیای گیاهان منجر به آسیب درختان انجیر می‌شود. در تحقیقی که انجام شد، از جاذب تمایلی بر پایه پادتن نوترکیب تک‌زنجیره‌ای (Single-Chain Variable Fragment; scFv) برای استخراج این ویروس استفاده شد. ابتدا این پادتن بر سطح نانوذرات مغناطیسی تثبیت شد. این نانوذرات به محیط آلوده حاوی ویروس اضافه شدند و پادتن به‌طور اختصاصی به پروتئین‌های سطح ویروس متصل شد. سپس با کمک آهنربا، ذرات مغناطیسی از محیط خارج شده، پس از شستشو، پروتئین‌ها با حلال مناسب شویش داده شدند. محلول حاصل توسط سامانه MALDI-TOF MS بررسی شد. این روش ضمن جداسازی ویروس هدف از طریق اتصال تمایلی، منجر به تغلیظ آن با انتخاب‌پذیری و تکرارپذیری بالا در زمان کوتاه و هزینه کم شده است [۱۴].

از دیگر معضلات مطرح در حوزه پزشکی بیماری تب مالت ناشی از باکتری (Brucella) است. تشخیص صحیح و به موقع بیماری برای مدیریت آن و پیشگیری از شیوع، بسیار حائز اهمیت است. در روش ترکیبی، از پروتئین A مانند چسب دوطرفه استفاده شد. پروتئین A از یک سو به نانوذره مغناطیسی Fe_3O_4 و از سوی دیگر به پادتن اختصاصی باکتری بروسلا متصل شد. سپس این نانوذرات به نمونه حاوی باکتری اضافه شدند. پادتن به‌طور اختصاصی به پادگن‌های سطح باکتری متصل شد و در نهایت کمپلکس نانوذره-پروتئین A-پادتن-باکتری توسط آهنربا از محیط جداسازی شد. این روش قادر



شکل (۲) نمایشی از فنون الف (SPE، ب) d-SPE، ج) IT-SPME و د) PT-SPME

گسترش هستند.

فرایند مهم و حیاتی گلیکوزدار کردن یکی از شایع‌ترین تغییرات پس ترجمه‌ای است که طی آن گروه‌ها قندی به پروتئین‌ها یا لیپیدها متصل می‌شوند. تغییرات هرچند اندک موجود در آن می‌تواند علامت برای بیماری‌هایی مثل سرطان، نارسایی‌های کبدی و اختلالات عصبی باشد [۱۲ و ۱۳]. استفاده از روش SPE با جاذب کانکوالین A [۵] و جاکالین [۸] برای اولین بار در سال ۲۰۲۴ برای شناسایی شکل‌های قندی هورمون hCG (man Chorionic Gonadotropin; hCG) گزارش شده است. در SPE تمایلی تهیه شده بر پایه کانکوالین، از سفاروز به عنوان بستر استفاده شد. در مرحله فعال‌سازی کارتریج تهیه شده با ۵ میلی‌لیتر محلول (۱ مولار سدیم کلرید، ۵ میلی‌مولار منیزیم کلرید، ۵ میلی‌مولار منگنز کلرید و ۵ میلی‌مولار کلسیم کلرید) آماده شد تا با قرارگیری برخی یون‌ها مثل منگنز و کلسیم یا حذف برخی از یون‌ها از سطح جاذب، فعالیت لکترین مؤثرتر شود. پس از عبور نمونه از کارتریج و انجام مرحله شست‌شو برای حذف ترکیباتی که با برهم‌کنش‌های غیراختصاصی روی جاذب قرار گرفته‌اند، شویش شکل‌های قندی مختلف با استفاده از دو محلول حاوی قند رقابتی آلفا متیل مانوزاید که در محیط‌های متفاوت تهیه شده بودند انجام شد. به منظور افزایش غلظت نمونه، محلول‌های شویشی جمع‌آوری شده با استفاده از صافی‌های سانتریفوژی تغلیظ شدند. این صافی‌ها با حذف حلال و ترکیبات با جرم مولکولی پایین، امکان کاهش حجم نمونه و افزایش غلظت اجزای شسته‌شده را پیش از آزمون نهایی با نانو سوانگاری مایع-طیف‌سنجی جرمی (Nano Liquid Chromatography-Mass Spectrometry; nanoLC-MS) فراهم کردند. میانگین بازده استخراج حدود ۶۰ درصد برای هر دو گلیکوفرم hCG α و

در تحقیق دیگر، چالش شناسایی پروتئین ترانس تیرتین در سرم خون با استفاده از بخشی از پادتن (قطعه Fab) به عنوان جاذب تمایلی روی دیواره داخلی لوله های موین حل شد. این پروتئین در کبد تولید می شود و حمل هورمون تیروئید را بر عهده دارد. تجمع غیرطبیعی این پروتئین منجر به بیماری آمیلوئیدوز می شود. روش های سابق اندازه گیری و تحلیل این پروتئین به عنوان نشانگر، حساس و دقیق نبودند. استفاده از الکتروفورز موینه به همراه فن IT-SPME با جاذب قطعه Fab پادتن، حساسیت بسیار بالایی داشته، قادر است تغییرات جزئی این پروتئین را زود هنگام تشخیص داده، گام موثری در درمان بیماری های مرتبط با پروتئین ترانس تیرتین بردارد [۳].

۴-۲ فن ریز استخراج فاز جامد پیپت تیپ (PT-SPME)

فن ریزاستخراج فاز جامد در نوک نمونه گیر (PT-SPME) به عنوان روش مینیاتوری شده استخراج، امکان به کارگیری مقادیر اندک جاذب را در حجم های کم نمونه به خصوص نمونه های بیولوژیکی، سرم، بزاق و... فراهم می کند. استفاده از جاذب های تمایلی در این فن، انتخاب پذیری استخراج را از طریق برهم کنش های اختصاصی نظیر پادگن پادتن، لکتین قند یا سایر سازوکارهای شناسایی مولکولی افزایش می دهد. از این رو، فن PT-SPME به بستری مناسب برای استخراج و تغلیظ انتخابی ترکیبات هدف از بافت های پیچیده زیستی و محیطی تبدیل شده است.

فاکتور رشد شبه انسولینی-۱ (Insulin-Like Growth Factor 1; IGF-1) هورمون پپتیدی متشکل از ۷۰ اسید آمینه است که به طور عمده در کبد و تحت تأثیر هورمون رشد سنتز می شود و نقش مهمی در تنظیم رشد، تکثیر و تمایز سلولی، متابولیسم و توسعه بافت های عضلانی و استخوانی دارد. آنالوگ های سنتزی آن، از جمله IGF-1-LongR (۳) و Ides (1-3)-IGF-1، R(3)-IGF-1 به دلیل اثرات آنابولیک و قابلیت بالقوه در افزایش عملکرد ورزشی، در فهرست مواد ممنوعه آژانس جهانی مبارزه با دوپینگ (The World Anti-Doping Agency; WADA) قرار دارند. شناسایی این ترکیبات در نمونه های زیستی به دلیل غلظت پایین و پیچیدگی بافت های زیستی، نیازمند روش های استخراج انتخابی و با حساسیت بالا است. در این مطالعه از پیپت تیپ های تجاری (Mass Spectrometric Immunoassay; MSIA) استفاده شد که بر روی یک پیپت الکترونیکی چندمجرا نصب می شوند. این سامانه به صورت خودکار چرخه های متوالی مکش و تخلیه نمونه را انجام می دهد و بدین ترتیب، نمونه به دفعات از میان بستر موجود در نمونه عبور می کند. تکرار این فرایند

است باکتری بروسلا را در کمتر از یک ساعت تشخیص دهد، در حالی که روش های کشت سنتی چندین روز زمان می برند [۱۵].

از نمونه های جالب دیگر کاربرد این روش، می توان به تشخیص تک مرحله ای ویروس HPV16 (Human Pap-illoma Virus 16) با استفاده از لکتین کانکوالین A اشاره کرد. ویروس HPV16 یکی از عوامل اصلی ۹۵٪ از سرطان های دهانه رحم است. روش واکنش زنجیره ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction; PCR)، روش معمول و استاندارد تشخیص این ویروس است که نیازمند صرف زمان زیاد، تجهیزات و نیروی انسانی ماهر است. در روش جدید، از نانوذرات مغناطیسی پوشش داده شده با کانکوالین A استفاده شده است. لکتین متصل به سطح نانوذره، به گلیکوپروتئین های ویروس متصل شده، سپس با آهن ربا، ویروس از محیط جداسازی و تغلیظ می شود. در نهایت، با استفاده از آنزیم های مناسب، DNA ویروس تکثیر و تشخیص داده می شود. این فرایند تک مرحله ای، بدون آلودگی محیطی، سریع (۲۵ دقیقه) و ساده انجام می گیرد [۱۶]. همچنین امکان قرائت نتایج بر اساس علایم فلورسانس ایجاد شده در سامانه تشخیصی وجود دارد که این قابلیت، استفاده از روش را در کیت های تشخیص سریع برای عموم نیز فراهم می کند.

۳-۳ فن ریزاستخراج فاز جامد داخل لوله (IT-SPME)

فنون مختلف SPME به دلیل کاهش حلال مصرفی و نمونه مورد نیاز لقب روش دوست دار محیط را به خود اختصاص داده اند. در این فنون جاذب تمایلی در ابعاد میکرو روی لیف (Fiber SPME)، لایه نازک (TFME) یا داخل لوله (IT-SPME) تثبیت می شود. در متداول ترین فن IT-SPME جاذب تمایلی روی سطح داخلی لوله های موین با طول به طور مثال ۳۰ سانتی متر تعبیه می شوند که علاوه بر مزایای ذکر شده توانایی اتصال مستقیم به سامانه ها تشخیصی مانند انواع MS ها یا جداسازی مانند الکتروفورز موینه را دارد [۱۱].

به طور مثال پیپتدهای اندومورفین-۱ و اندومورفین-۲ که از پیپتدهای اپیوئیدی مرتبط با فرایند درد هستند، در محیط پلاسما مقدار بسیار پایینی دارند. این غلظت محدود روند بررسی آن را در محیط بدن با مشکل مواجه می کند. طبق گزارشی، از روش IT-SPME با جاذب تمایلی بر پایه پادتن برای استخراج و پیش تغلیظ این آنالیت استفاده شد. لوله موین حاوی جاذب به طور مستقیم به سامانه الکتروفورز موینه متصل شد و جداسازی بر اساس اندازه و بار انجام گرفت [۱۷].

(پس از مرحله آماده‌سازی نمونه) در تماس با ذرات مغناطیسی پوشش‌داده‌شده با پادتن قرار گرفت تا برهم‌کنش اختصاصی پادگن-پادتن میان کورتیزول و پادتن کورتیزول برقرار شود. در ادامه، محلول نمونه چندین بار از داخل نوک پیپت حاوی آهن‌برای نئودیومی عبور داده شد تا ذرات مغناطیسی در داخل نمونه به دام افتاده، اجزای بافت نمونه از سامانه خارج شوند. پس از دو مرحله شست‌وشو به‌منظور حذف ترکیبات غیرمتصل و برهم‌کنش‌های غیراختصاصی، مرحله واجذب با استفاده از ۱۰ میکرولیتر متانول و طی پنج چرخه مکش-تخلیه انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از PT-SPME مبتنی بر ذرات مغناطیسی و پادتن‌های اختصاصی، امکان استخراج انتخابی کورتیزول را از حجم بسیار کم نمونه فراهم می‌کند. علاوه بر این، کاهش مصرف نمونه و حلال، سهولت انجام عملیات استخراج، افزایش نسبت سطح به حجم و قابلیت به‌کارگیری در نمونه‌های با حجم محدود، این فن را به گزینه‌ای مناسب برای کاربردهای بالینی و زیست‌پزشکی، به‌ویژه در تحلیل نمونه‌های نوزادان و بیماران حساس، تبدیل کرده است. [۱۹]

جدول ۲ گزارشی از ردپای این جاذب‌های تمایلی در فنون مختلف ریزاستخراجی در به‌کارگیری انواع نمونه‌ها آورده شده است.

۴ نتیجه‌گیری

جاذب‌های تمایلی مبتنی بر بزرگ مولکول‌های طبیعی به‌دلیل انتخاب‌پذیری بی‌نظیر و توانایی تغلیظ آنالیت‌های با غلظت بسیار پایین، ابزاری ارزشمند در آزمون‌های زیست‌شناختی و بالینی هستند. ترکیب این جاذب‌ها با نانوذرات مغناطیسی، امکان جداسازی سریع و آسان با آهن‌ربا را فراهم کرده، نیاز به سانتریفیوژ و ستون‌های پرمصرف را کاهش می‌دهد. همچنین اتصال آنالین این جاذب‌ها با الکتروفورز موئینه و طیف‌سنجی جرمی خودکار کامل، کاهش حجم نمونه و افزایش حساسیت را به همراه دارد. چالش‌های موجود شامل پایداری محدود جاذب‌ها (به‌ویژه در شویش‌های اسیدی)، هزینه بالای تولید پادتن‌های مونوکلونال اختصاصی و نشت لیگاندهای تثبیت‌نشده (مانند لکترین‌ها) است. با این حال، توسعه پادتن‌های نوترکیب (scFv و Fab)، لکترین‌های نوترکیب و بسترهای تثبیت جدید (مانند مونولیت‌های آلی-سیلیکا) تا حد زیادی این محدودیت‌ها را برطرف کرده است. انتظار می‌رود در آینده، با کاهش هزینه تولید و افزایش پایداری، این جاذب‌ها به بخش جدایی‌ناپذیر کیت‌های تشخیص سریع تبدیل شوند.

موجب افزایش تماس آنالیت با پادتن‌های تثبیت‌شده، بهبود انتقال جرم و در نتیجه افزایش بازده جذب و تغلیظ ترکیبات هدف می‌شود.

در پیپت‌نوع تجاری MSIA بستر متخلخل مونولیتی به‌عنوان فاز جامد به کار گرفته شد. به‌منظور تثبیت جهت‌دار پادتن‌ها، پروتئین A بر روی سطح مونولیت قرار داده شد تا از طریق برهم‌کنش اختصاصی با ناحیه Fc پادتن، نواحی Fab در دسترس آنالیت باقی بمانند. این نوع تثبیت جهت‌دار موجب افزایش ظرفیت اتصال، کاهش ممانعت فضایی و بهبود بازده استخراج ترکیبات هدف می‌شود.

در مرحله آماده‌سازی، پادتن اختصاصی IGF-1 بر روی بستر حاوی پروتئین A تثبیت شد به این ترتیب که نمونه ۹۰۰ مرتبه مورد مکش و تخلیه محلول حاوی پادتن (PBS-NOG) قرار گرفت و سپس نمونه زیستی تغلیظ‌شده در تماس با سامانه ایمونوآفینیتی قرار می‌گیرد. به‌منظور افزایش احتمال برخورد و برهم‌کنش بین آنالیت و پادتن، محلول نمونه طی چرخه‌های متوالی مکش و تخلیه از میان بستر عبور داده شد؛ به‌طوری‌که ۹۰۰ چرخه مکش و تخلیه در دو مرحله متوالی انجام گرفت. پس از مرحله جذب، بستر با محلول شستشو (Phosphate Buffered Saline; PBS) و آب مورد تیمار قرار گرفت تا ترکیبات غیرمتصل و مزاحم مثل نمک‌ها، پروتئین‌های مزاحم و... حذف شوند. در ادامه، آنالیت‌های متصل‌شده از طریق مرحله واجذب با محلول استونیتریل و آب (۱:۲) و محلول ۴٪ تری‌فلوروآستیک اسیدکمپلکس پادتن‌پادگن آزاد شده، برای آزمون نهایی توسط سوانگاری مایع متصل به طیف‌سنجی جرمی (Liquid Chromatography – Quadrupole Time-of-Flight) (Mass Spectrometry; LC-QTOF-MS) جمع‌آوری شدند. این راهبرد امکان استخراج انتخابی، تغلیظ مؤثر و شناسایی حساس آنالوگ‌های IGF-1 را در نمونه‌های خون و ادرار که حجم کم آن‌ها مطرح است را فراهم می‌کند [۱۸].

در میان روش‌های استخراج و آماده‌سازی نمونه، فن PT-SPME به‌دلیل نیاز به حجم کم نمونه و مصرف اندک حلال، در کنار ادغام با روش مغناطیسی به‌عنوان روشی کارآمد مطرح شده است. در این راستا، گروهی تحقیقاتی به‌منظور اندازه‌گیری کورتیزول آزاد موجود در سرم و ادرار نوزادان نارس با وزن کم، از آهن‌برای نئودیومی کوچک تعبیه‌شده در نوک پیپت استفاده کردند تا حجم نمونه مورد نیاز را از مقیاس میلی‌لیتری به میکرولیتر کاهش دهند. برای این منظور، پادتن‌های ضد کورتیزول بر روی سطح ذرات مغناطیسی تثبیت شدند. سپس ۶۰ میکرولیتر از نمونه

جدول ۱ مقایسه ویژگی‌ها و شرایط عملکرد متداول‌ترین بزرگ مولکول‌های زیستی.

مرجع	آزمون	جاذب	روش	نمونه	آنالیت
[۲۰]	HPLC-UV ¹¹	پادتن	d-SPE	ادرار	اپی تستسترون ^۱
[۲۱]	LC-MS ¹²	پادتن	IT-SPME	سرم	فلوکسیتین ^۲
[۲۲]	Flu ¹³	پادتن	d-SPE	شیر سویا	پروتئین سویا ^۳
[۲۳]	Liquid Scintillation ¹⁴	پادتن	SPME	سرم	تئوفیلین ^۴
[۲۴]	LC-MS/MS ¹⁵	پروتئین A/G	PT-SPME	پلاسما	پپتیدهای درمانی ^۵
[۴]	SDS-PAGE ¹⁶	پروتئین A	d-SPE	محلول پادتن مونوکلونال	پادتن مونوکلونال ^۶
[۲۵]	SDS-PAGE	پروتئین A و G	d-SPE	پلاسما	ایمونوگلوبولین G انسانی ^۷
[۲۶]	LC-MS/MS	پروتئین G	d-SPE	پلاسما	داروی نو ترکیب آلفا- گلوکوزیداز انسانی ^۸
[۲۷]	Reversed-Phase Capillary HPLC	لکترین	PT-SPME	اسپایک به لیزات سلولی	پروتئین‌های دارای گالاکتوز ^۹
[۲۸]	MALDI-TOF-MS	لکترین مهندسی شده	d-SPE	سرم	N گلیکان‌ها و N گلیکو پپتایدها ^{۱۰}

1: Epitestosterone 2: Fluoxetine 3: Soy proteins 4: Theophylline 5: Therapeutic Peptides 6: Monoclonal antibodies. 7: Human IgG 8: Recombinant Human α -Glucosidase 9: Galactosylated Protein 10: N-glycan and N-glycopeptide 11: High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet Detector 12: Liquid Chromatography Mass Spectrometry 13: Fluorescence 14: Liquid Scintillation 15: Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry 16: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

مراجع

- Pichon V., Chapuis-Hugon F., Hennion M.-C., Bioaffinity Sorbents, Comprehensive Sampling and Sample Preparation, Academic Press, 1st edition, Oxford, 2012.
- Hage D. S., Anguizola J. A., Bi C., Li R., Matsuda R., Papastavros E., Pfaunmiller E., Vargas J., Zheng X., Pharmaceutical and Biomedical Applications of Affinity Chromatography : Recent Trends and Developments, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 69, 93–105, **2012**.
- Pont L., Benavente F., Barbosa J., Sanz-Nebot V., On-Line Immunoaffinity Solid-Phase Extraction Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry Using Fab Antibody Fragments for the Analysis of Serum Transthyretin, *Talanta*, 170, 224–232, **2017**.
- Kim S., Sung D., Highly Efficient Antibody Purification with Controlled Orientation of Protein A on Magnetic Nanoparticles, *MedChemComm*, 9, 108–112, **2018**.
- Goumenou A., Chendo C., Combès A., Fournier T., Pichon V., Delaunay N., Characterization of Concanavalin A- Based Lectin Sorbents for the Extraction of the Human Chorionic Gonadotropin Glycoforms Prior to Analysis by Nano Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 242, 116022, **2024**.
- Rehan S. F. M., Sambhaji U. A., A Review of Scalable and Efficient Techniques for the Purification of Lectins, *Anal. Bioanal. Chem. Res.*, 12, 259–268, **2025**.
- Yang Z., Hancock W. S., Monitoring Glycosylation Pattern Changes of Glycoproteins Using Multi-Lectin Affinity Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1070, 57–64, **2005**.
- Goumenou A., Chendo C., Combès A., Fournier T., V Pichon., Delaunay N., Evaluation of Jacalin Lectin Sorbents for the Extraction of the Human Chorionic Ggonadotropin Glycoforms Prior to Analysis by Nano Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 252, 116525, **2025**.
- Ma Z., Ramakrishna S., Electrospun Regenerated Cellulose Nanofiber Affinity Membrane Functionalized with Protein A / G for IgG Purification, *Journal of Membrane Science*, 319, 23–28, **2008**.
- Plotka-Wasyłka J., Szczepan N., Guardia M. D. L., Namies'nik J., Modern Trends in Solid Phase Extraction : New Sorbent Media, *Trends in Analytical Chemistry*, 77, 23–43, **2016**.
- Combès A., Combes A., Delaunay V., Immunosorbents in Microextraction, *Trends in Analytical Chemistry*, 113, 246–255, **2019**.
- Ongay S., Boichenko A., Govorukhina N., Bischoff R., Glycopeptide Enrichment and Separation for Protein Glycosylation Analysis, *J. Sep. Sci.*, 35, 2341–2372, **2012**.
- Loera-Rubalcava J., García-Maldonado E., Quintero-Martínez A., Rodríguez-Romero A., Macías-Rubalcava M. L., Cano-Sánchez P., Ramírez-Rodríguez M. A., Espinosa-Pérez G., Hernández-Santoyo A., Mytilactin from *Mytilus Californianus* : Study of Its Unique Galactoside Interactions Oligomerization Patterns and Antifungal Activity, *International Journal of Biological Macromolecules A*, 308, 142338, **2025**.
- Mashhadi I. S., Safarnejad M. R., Shahmirzaie M., Aliahmadi A., Ghassempour A., Conjugation of Single-Chain Variable Fragment Antibody to Magnetic Nanoparticles and Screening of Fig Mosaic Virus by MALDI TOF Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 92, 104460_10446, **2020**.
- Sharif A., Nejad R. B., Ghassempour A., Immunoassay Mass Spectrometry to Identify *Brucella Melitensis*, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 15, 1531018, **2025**.
- Nie Y., Li X., Yang W., Fei S., Wang Y., Li Y., Li Z., Zhang K., Kang J., Cheng Y., Wang H., Liu D., Concanavalin-A- Assisted Extraction-Free One-Pot RPA-CRISPR/Cas12a Assay for Rapid Detection of HPV16, *Microchim. Acta*, 192, 354, **2025**.
- Medina-Casanellas S., Benavente F., Barbosa J., Sanz-Nebot V., Preparation and Evaluation of an Immunoaffinity Sorbent for the Analysis of Opioid Peptides by On-Line Immunoaffinity Solid-Phase Extraction Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 717, 134–142, **2012**.
- Mazzarino M., Melis I., Quaresima E., Botrè F., Detection of Synthetic Analogues of Insulin Like Growth Factor 1 in Different Biological Fluids by Liquid Chromatography Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry : Comparison of Different Immunoaffinity Protocols, *Anal. Bioanal. Chem.*, 415, 6117–6131, **2023**.
- Grau J., Moreno-Guzmán M., Arruza L., López M. Á., Escarpa A., Chisvert A., Analysis of Microsamples by Miniaturized Magnetic-Based Pipette Tip Microextraction: Determination of Free Cortisol in Serum and Urine from Very Low Birth Weight Preterm Newborns, *Analyst*, 6, 1050–1057, **2023**.
- Qiu S., Xu L., Cui Y.-R., Deng Q.-P., Wang W., Chen H.-X.,

- Zhang X.-X., Immunoextraction of Epitestosterone from Human Urine Samples Based on Gold-Coated Magnetic Nanoparticles, *Talanta*, 81, 819–823, **2010**.
21. Queiroz M. E. C., Oliveira E. B., Breton F., Pawliszyn J., Queiroz, E. B. Oliveira, Immunoaffinity In-Tube Solid Phase Microextraction Coupled with Liquid Chromatography Mass Spectrometry for Analysis of Fluoxetine in Serum Samples, *Jornal of Chromatography A*, 1174, 72–77, **2007**.
22. Molina-Delgado M. Á., Aguilar-Caballos M. P., Gomez-Hens A., Determination of Soy Proteins in Food Samples by Dispersive Solid-phase Immunoextraction and Dynamic Long-Wavelength Fluorometry, *Microchim Acta*, 180, 1279_1286, **2013**.
23. Yuan H., Mullett W. M., Pawliszyn J., Biological Sample Analysis with Immunoaffinity Solid-Phase Microextraction, *Analyst*, 126, 1456_1461, **2001**.
24. Heinig K., Wirz T., Schick E., Guenzi A., Bioanalysis of Therapeutic Peptides : Differentiating Between Total and Anti-drug Antibody Bound Drug Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Quantitation, *Jornal of Chromatography A*, 1316, 69–77, **2013**.
25. Liu S., Haller E., Horak J., Brandstetter M., Heuser T., Lämmerhofer M., Protein A- and Protein G-Gold Nanoparticle Bioconjugates as Nano- Immunoaffinity Platform for Human IgG Depletion in Plasma and Antibody Extraction from Cell Culture Supernatant, *Talanta* , 194, 664–672, **2019**.
26. Bronsema K. J., Pijnappel W. W. M. P., Van Der Ploeg A. T., Absolute Quantification of the Total and Antidrug Antibody-Bound Concentrations of Recombinant Human α - Glucosidase in Human Plasma Using Protein G Extraction and LC-MS/MS, *Analytical Chemistry*, 87, 4394_4401, **2015**.
27. Alwael H., Connolly D., Clarke P., Thompson R., Twamley B., O'Conno B., Paull B., Pipette-Tip Selective Extraction of Glycoproteins with Lectin Modified Gold Nano-Particles on a Polymer Monolithic Phase, *Analyst*, 136, 2619–2628, **2011**.
28. Wang W., Zhang L., Li Y., Liu X., Liu X., Oriental Covalent Immobilization of N-Glycan Binding Protein via N-terminal Selective Modification, *Analytica Chimica Acta*, 1330, 343311, **2024**.