فصلنامه گیاه‌پزشکی
۱۳۸۹-۲ (۳) : ۱۷۵-۱۸۳

نخستین تجربه تولید پادتن علیه آفت‌کش کلروپایریفوس

مریم بصیریان*، سهراب ایمانی
دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه حشره‌شناسی، تهران، ایران
کامبیز لاریجانی
دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه شیمی، تهران، ایران

چکیده

امروزه مصرف زیاد آفت‌کش‌ها در کشاورزی بر هیچ‌کس پوشیده نیست و سالانه مطالعات زیادی در مورد اندازه‌گیری باقیمانده سموم در محصولات کشاورزی با روش‌های متداول یعنی کروماتوگرافی گازی و مایع انجام می‌شود، که روش‌هایی پرهزینه و وقت‌گیر هستند. تدوین روش‌های جدید نظیر روش سنجش ایمنی آنزیمی(ELISA) امروزه مورد توجه برخی محققین قرار گرفته است. در این مطالعه تلاش شد نسبت به تولید پادتن لازم برای سنجش آفت‌کش فسفره کلروپایریفوس اقدام شود. آفت‌کش ابتدا در شرایط تخریب قرار گرفته، سپس با استفاده از مولکول پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA)، مزدوج آن ساخته و جهت تحریک سیستم ایمنی به خرگوش تزریق شد. پس از طی مدت زمان‌های مختلف از خرگوش‌های مورد آزمون خون‌گیری به عمل آمد و تیتر پادتن به کمک روش الایزا بررسی شده و نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با نمونه شاهد بوده است. این روش نسبت به روش‌های کروماتوگرافی بسیار سریع‌تر، ارزان‌تر و دارای حد تشخیص بالاتری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی : کلروپایریفوس، باقیمانده آفت‌کش، الایزا، پادتن

مقدمه

مصرف بی‌رویه آفت‌کش‌ها در طبیعت باعث ایجاد پاره‌ای اختلالات در روند طبیعی زندگی موجودات می‌شود که به‌دنبال آن مشکلات عدیده‌ای از جمله مقاومت به آفت‌کش‌ها، از بین

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی : maryambasiryan@yahoo.com
تاریخ دریافت : ۹۰/۶/۳، تاریخ پذیرش : ۹۰/۱۲/۱۷

رفتن موجودات غیرهدف، پایداری و دوام مواد شیمیایی در غذا و محیط زیست و برگشت مجدد مواد غیرقابل تجزیه به زنجیره غذایی را به وجود آورده است (Imani, 2004). نگرانی جوامع انسانی از آفت‌کش‌های پایدار در محیط و راهیابی آنها به چرخه غذایی از موضوع‌های مهم بهداشت محیط زیست است. به همین علت شناخت و اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی در محیط زیست، موادغذایی و بدن موجود زنده الزامی است (Talebi Jahromi, 2006). امروزه متداول‌ترین روش برای اندازه‌گیری باقیمانده سموم کروماتوگرافی یا طیف‌سنجی جرمی می‌باشد. اما این روش‌ها بسیار پرهزینه و وقت‌گیر بوده و به افراد ماهر نیاز دارند. بنابراین استفاده از یک روش سریع‌تر و اقتصادی‌تر مورد توجه می‌باشد. سنجش‌ایمنی نسبت به روش‌های قدیمی مناسب‌تر است، چون هم خیلی سریع‌تر و کم‌هزینه بوده و هم به کمک این روش می‌توان مقادیر جزئی سموم و بقایای سموم را در کلیه محصولات کشاورزی که به مصرف انسان یا دام می‌رسد، اندازه‌گیری کرد (Van Emon Lopez, 1992).

سنجش ایمنی یکی از بهترین و مهم‌ترین روش‌های ایمنوشیمیایی است و یکی از روش‌های کاربردی در پزشکی می‌باشد.کاربرد سنجش ایمنی برای اندازه‌گیری باقیمانده آفت‌کش‌ها اولین بار در سال ۱۹۷۱ توسط Vision و Ercegovich شرح داده شده است. در سال ۱۹۸۰ Hammock و Mumma کاربرد الایزا[1] (ELISA) را در کشاورزی و محیط زیست شرح دادند (Itak *et al*., 1992).

سنجش ایمنی برای تعیین کیفیت پادتن‌ها و رابطه آنها به عنوان یک ابزار کاربرد دارد و قابل استفاده برای نمونه‌های زیادی می‌باشد. الایزا یک روش آزمایشگاهی بیوشیمی ساده با حساسیت بسیار بالا است که امکان آنالیز تعداد زیادی نمونه را به صورت همزمان فراهم می‌کند (Vanderlaan *et al*., 1988).

الایزا بر پایه اندازه‌گیری کمپلکس رنگی آنتی‌ژن و پادتن استوار است. به این ترتیب که نمونه مورد آزمایش با مقدار نامشخصی آنتی‌ژن روی فاز جامد (معمولاً پلیت پلی‌استیرن) ریخته می‌شود، سپس پادتن بازیابی اضافه می‌شود تا با آنتی‌ژن واکنش داده و ترکیبی ایجاد کند. پادتن بازیابی با آنزیم پیوند کوالانسی برقرار می‌کند. بین هر مرحله، پلیت با محلول پاک‌کننده ملایمی شسته می‌شود تا پروتئین یا پادتن باقیمانده شسته شود. پیش از آخرین مرحله شستشو، پلیت با اضافه کردن زیر لایه آنزیمی کشت داده می‌شود و ماده رنگی تولید می‌شود. طول موج رنگ به دست آمده توسط یک دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شده و ثبت می‌شود که این طول موج معرف حضور یک پادتن یا آنتی‌ژن و نیز غلظت آن است (Rowell, 2001).

[1] Enzyme – linked Immunosorbent Assay

استفاده از سنجش ایمنی احتیاج به تولید پادتن دارد. به علت اینکه آفت‌کش‌ها مولکول‌های کوچکی هستند که به آن هپتان گفته می‌شود، باید با پروتئین‌های ناقل جفت شوند، تا بتوانند سیستم ایمنی را تحریک کرده و منجر به تولید پادتن شوند (Piao *et al.*, 2009).

کلروپایریفوس با نام تجاری دورسبان، یک آفت‌کش فسفره است که برای کنترل آفات مختلفی به کار می‌رود. این آفت‌کش طیف تأثیر وسیعی بوده و اثر تماسی- گوارشی و تدخینی دارد. مصرف آن باعث می‌شود که فعالیت استیل‌کولین استراز متوقف شود (Khanjani&Khalghani, 2008).

در این تحقیق امکان تولید پادتن علیه آفت‌کش کلروپایریفوس با هدف سنجیدن آن به کمک روش الایزا و الایزا ریدر بررسی شده است. با روش الایزا که یک روش سنجش ایمنی آنزیمی است می‌توان بدون نیاز به دستگاه‌های کروماتوگرافی نسبت به سنجش آفت‌کش یا باقیمانده آن اقدام کرد. همچنین این روش قابلیت توسعه و تکمیل دارد و می‌تواند به تولید امکانات ساده‌تر شناسایی منجر شود. از جمله آن‌ها تولید سیستم‌های شناسایی سریع شبیه به تولید نوارهای تست اعتیاد است که می‌توان با عصاره‌گیری از گیاهان و قرار دادن بر روی نوارهای تست، سطح معینی از باقیمانده سموم را مشخص کرد.

مواد و روش‌ها

روش کار بر اساس مطالعه Hammock *et al.* (2002) با تغییراتی تدوین گردید و همه اصول اجرا شده در آن مورد بررسی قرار گرفت. این روش شامل ایجاد تغییر در ساختار سم و پس از آن تهیه مزدوج و تزریق آن به بدن حیواناتی نظیر گاو، گوسفند یا خرگوش برای تولید پادتن می‌باشد.

هیدرولیز سم کلروپایریفوس

صد میلی‌گرم سم کلروپایریفوس تکنیکال با خلوص ۹۷٪ ساخت شرکت Singenta، دریک سی‌سی متانول حل شده و به آن صد و هفتاد میکرولیتر اسیدهیدروکلریک ۳۷٪ اضافه گردیده و به مدت سی ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. سپس واکنش هیدرولیز سم با اضافه کردنده سی‌سی هگزان متوقف گردید. برای استخراج سم از محیط، حلال استفاده شده (هگزان) به کمک دستگاه روتاری تبخیر گردید و نمونه خشک شده از ماده بدست آمده برای مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفت. همچنین برای مشخص شدن تغییرات ایجاد شده، از نمونه‌ها طیف‌سنجی رزونانس مغناطیس هسته‌ای (NMR)[۲] گرفته شد.

[2] Nuclear magnetic resonance

سنتزمزدوج

ماده حاصل از هیدرولیز سم مجدداً در یک سی‌سی متانول حل گردید و به آن سه دهم گرم آلبومین سرم گاوی (BSA)[3] حل شده در یک سی‌سی متانول، اضافه گردید. برای خشک کردن نمونه و تبخیر حلال، ماده سنتز شده داخل دسی‌کاتور قرار داده شد. بعد از گذشت بیست و چهار ساعت نمونه‌ها خشک شدند. تغییرات ایجاد شده توسط طیف‌سنجی رزونانس مغناطیس هسته‌ای (NMR)[4] مشخص گردید.

ایمن سازی خرگوش

هشت سر خرگوش ماده شش هفته‌ای Albino، از انستیتو پاستور کرج خریداری شده و در شرایط معمولی آزمایشگاه نگهداری شدند. این خرگوش‌ها به وسیله گندم و جو فشرده شده همراه با پودر ویتامین‌های مورد نیاز بدن تغذیه می‌شدند، این ماده غذایی نیز از انستیتوپاستور کرج خریداری شده بود.

برای ایمن سازی خرگوش‌ها دو دهم گرم از ماده سنتز شده به سه نقطه از بدن خرگوش تزریق شد، که اولین تزریق زیر جلدی و تزریق‌های بعدی عضلانی، که به دو عضله پا و یک دست در خرگوش تزریق صورت گرفت. تزریق‌ها به فاصله هر دو هفته یک بار تکرار و هفت تزریق در مجموع انجام شد.

آماده سازی نمونه برای انجام الایزا

برای تهیه سرم خون، چهارده هفته بعد از اولین تزریق، خرگوش‌ها با استفاده ازکلروفرم در داخل دسیکاتور بیهوش شدند و بعد از باز کردن قفسه سینه خرگوش‌ها، خون‌گیری مستقیماً از قلب خرگوش‌ها انجام گرفت. خون خرگوش‌ها داخل لوله آزمایش ریخته شد و به مدت بیست دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سرم خون با دستگاه سانتریفیوژ با دور چهار هزار به مدت پنج دقیقه جدا گردید. سرم جدا شده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

آزمون الایزا

سرم جدا شده از خون خرگوش با بافر پوششی رقیق گردید، داخل هر چاهک صفحات میکروتیتر صد و بیست میکرولیتر سرم رقیق شده ریخته شد و به مدت بیست و چهار ساعت در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند.

بعد از گذشت بیست و چهار ساعت، چاهک‌ها با بافر شستشو (PBST) سه بار شسته شدند. سم کلروپایریفوس در بافر PBS رقیق شده و داخل هر چاهک صد و بیست میکرولیتر از سم رقیق شده ریخته شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. مجدداً با بافر PBST، چاهک‌ها شستشو داده شدند. سوبسترای آنزیمی HRP[5] در بافرPBS به نسبت یک به

[3] Bovin Serrum Albumin
[4] Nuclear magnetic resonance
[5] Horse radish peroxidise

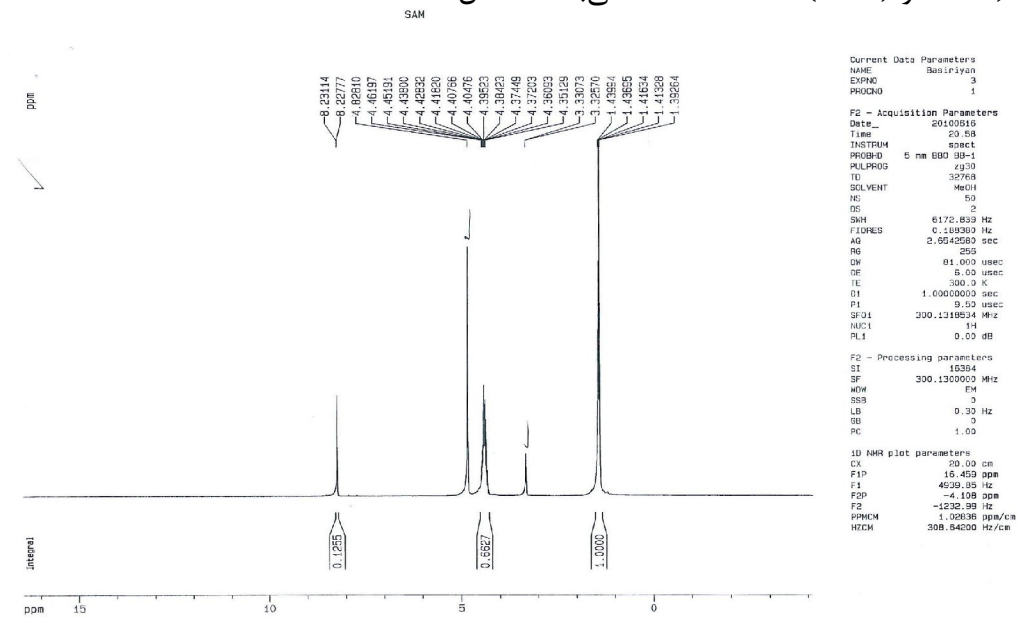
سه هزار رقیق گردید، داخل هر چاهک صد و بیست میکرولیتر از ماده زمینه رقیق شده، ریخته شد و مجدداً به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. چاهک‌ها سه مرتبه با بافرPBST شستشو داده شدند. دو و نیم گرم پارانیتروفنیل فسفات در بافر دی اتانول آمین حل گردید و داخل هر چاهک صد میکرولیتر از آن کوت شد و به مدت سی دقیقه در دمای سی و هفت درجه سلسیوس نگهداری شدند. نمونه‌ها توسط دستگاه الایزا ریدر[6] با طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شدند (Tate & Word, 2004).

نتایج و بحث

در مقایسه طیف NMR سم کلروپایریفوس (شکل۱) و ماده سنتز شده (شکل۲) مشخص شد، یک حلقه فنیل به ساختار سم اضافه شده است که نشان دهنده ساخته شدن مزدوج سم می‌باشد. این نتایج مشابه تحقیقا (Cho *et al.*, 2002) می‌باشد.

در مقایسه میانگین تیتر سرم خون خرگوش شاهد با تیمار (شکل۳)، تیتر خوانده شده توسط دستگاه الایزاریدر در نمونه تیمار بیشتر از شاهد می‌باشد که نشان دهنده تولید پادتن علیه آفت‌کش کلروپایریفوس می‌باشد.

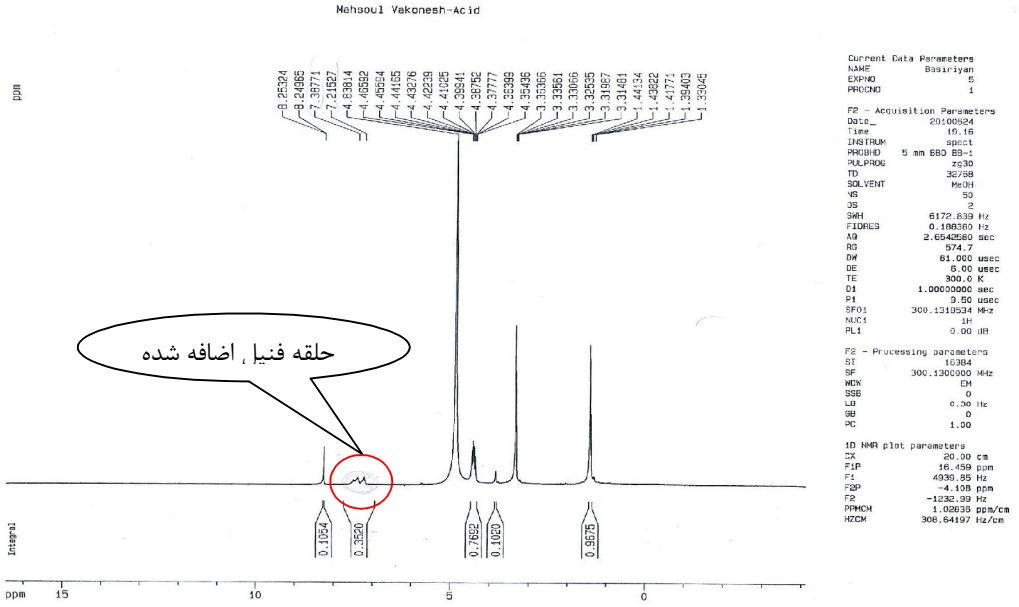
نتایج حاصل از ایمن‌سازی خرگوش نشان داد که با روش به کار گرفته شده تولید پادتن علیه آفت‌کش‌هایی نظیر کلروپایریفوس امکان‌پذیر می‌باشد ($P<0.05$). نمودار تیتر پادتن خوانده شده در این تحقیق توسط دستگاه الایزاریدر مشابه نمودار تحقیقات Cho *et al.* (2002) و Skerritt *et al.* (1992) می‌باشد (شکل۴).



شکل ۱- طیفNMR سم کلروپایریفوس

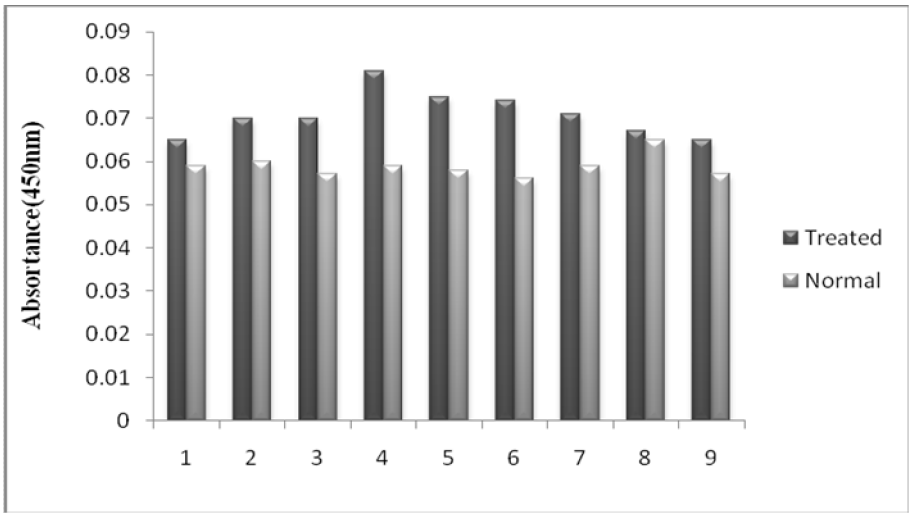
Figure 1. NMR of Chlorpyrifos Pesticide

[6] ELISA reader



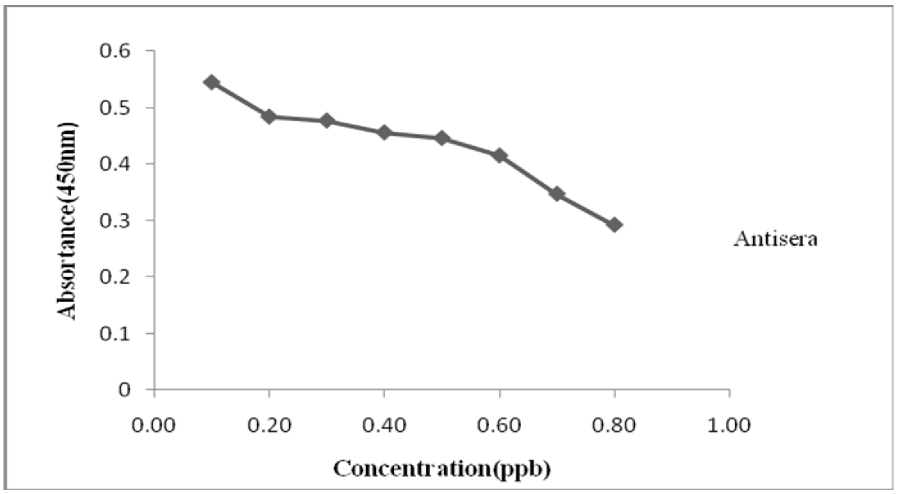
شکل۲ – طیف NMR ماده سنتز شده

Figure 2. NMR of Hepten Syntehesis



شکل۳ – مقایسه میانگین تیتر سرم خون شاهد با تیمار

Figure 3. Comparsion of the average of Treated Serum and Normal Serum



شکل۴ – تیتر پادتن خوانده شده توسط الایزاریدر بر علیه آفت‌کش کلروپایریفوس

Figure 4. The Titers of Antibody has been read with ELISA-Reader against Chlorpyrifos Pesticide

در تحقیق حاضر نتایج حاصل از سنتز مزدوج سم مشابه ماده سنتز شده در تحقیقات (Cho *et al.*, 2002) می‌باشد. همچنین تیتر پادتن خوانده شده در مطالعه حاضر مشابه تیتر خوانده شده در تحقیقات (Cho *et al.*, 2002) و Skerritt *et al.* (1992) می‌باشد. تفاوت مطالعه حاضر با تحقیقات (Skerritt *et al.*, 1992) این است که در آن مطالعه پادتن علیه مزدوج مورد آزمون قرار گرفته درحالی که در آزمایش اخیر علاوه بر مزدوج، آزمایش الایزا روی نمونه خالص (سم) نیز انجام شده است و در هر دو آزمایش تیتر پادتن در مقایسه با نمونه شاهد بالاتر بوده و اختلاف معنی‌داری داشته است. همچنین نتایج بدست آمده با مطالعات (Cho *et al.*, 2002) مشابهت بالایی نشان داد.

هدف از تولید پادتن اندازه‌گیری باقیمانده آفت‌کش در محصولات کشاورزی می‌باشد که علاوه بر سم ممکن است متابولیت‌های سمی نیز در آن موجود باشد، لذا سرم حیوانی که محتوی پادتن پلی‌کلونال می‌باشد مورد استفاده قرار گرفت. در آزمایش حاضر نیز سرم جدا شده حاوی پادتن بر علیه مزدوج ساخته شده و سم خالص، هر دو مورد آزمون قرار گرفته و نتایج آن نشان داده که در سرم خون خرگوش، پادتن لازم بر علیه سم ساخته شده است ولی برای جداسازی پادتن و کاربردهای بعدی آن مطالعات بیشتری لازم است انجام شود.

منابع

Cho, Y. A., Lee, H. S., Park, E. Y., Lee, Y. T. & Hammock, B. D. 2002. Development of an ELISA for the Organophosphorus Insecticide Chlorpyrifos. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 23(3): 481- 487.

Imani, S. 2004. *ASurvery on Pesticides Multi Residue and Multi Class Detection in Selected Vegetable*. Ph.D. Thesis, Tehran Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Itak, J. A., Selisker, M. Y., Herzog, D. P. 1992. Development and Evaluation of a magnetic particle based Enzyme Immunoassay for Aldicarb, Aldicarb Sulfone and Aldicarb Sulfoxide. *Chemosphere,* 24: 11 – 21.

Khanjani, M. & Khalghani, J. 2008. *Principel of Pest Control (Insects &Mits)*. Ministry of Jihad-e-Agriculture. Agricultural Extention, Education Research Organization (In Persian).

Piao,Y. Z., Kim, Y. J., Kim, Y. A., Lee, H. S., Hammock, B. D. & Lee, Y. T. 2009. Development of ELISA, for the class-specific determination of Organophosphorus Pesticides. *Journalof Agriculture and Food Chemistry*, 57: 10004 – 10013.

Rowell, V. 2001. *Nunc Guide to solid phase*. Nunc Als, Roskilde, Denmark.

Skerritt, J. H., Hill, S. A., Beasley, H. L., Edvard,S. L. & Mcadam, D. P. 1992. Enzyme – Linked Immunsorbent Assay for Quantitation of Organophosphate Pesticides:Fenitrotion, Chloropyrifos–methyl and Primiphos – methyl in Wheat Grain and Flour–Milling Fractions. *Journal of AOAC International*, 75(3): 519 – 528.

Talebi Jahromi, Kh. 2006. *Pesticides Toxicology*. University of Tehran Press, Tehran, Iran (In Persian).

Tate, J. & Word, G. 2004. Interferences in Immunoassay. *Clinical Biochemest Reviews*, 25: 105 – 120.

Van Emon, J. M., Lopez, V. 1992. Immunochemical methods for environmental analysis. *Analytical Chemistery*. 64(2): 79A-88A.

Vanderlaan M., Watkins, B. E., Stanker, L., 1988. Environmental monitoring by immunoassay. *Enviromental Science & Technology*, 22(3): 247-254.