٤٥٨٠٤

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکدهٔ علوم پزشکی

پایان‌نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوشیمی پزشکی

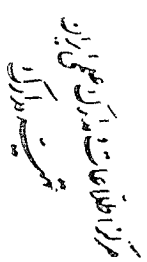
عنوان

تهیه و بهینه‌سازی کیت تشخیص سریع ایمنوکروماتوگرافی برای اندازه‌گیری مقادیر کم مورفین

نگارش

معصومه رجبی بذل

۱۳۸۲ /۱/ ۲۰



استاد راهنما

دکترمحمدجواد رسایی

۱۳۸۲ /۱/ ۲۰

استاد مشاور

دکتر محمد تقی‌الطریحی

تابستان ۱۳۸۱

٤٥٨٠٤

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم معصومه رجبی بذل

رشته: بیوشیمی گرایش:

تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

جناب آقای دکتر محمدجواد رسائی (استاد راهنما)

جناب آقای دکتر تقی‌الطریحی (استاد مشاور)

جناب آقای دکتر عباس صاحبقدم لطفی (نماینده تحصیلات تکمیلی)

جناب آقای دکتر سیدعلیرضا مصباح (استاد ناظر)

جناب آقای دکتر محمود جلالی (استاد ناظر)

تاریخ: .....
پیوست: .....

آیین‌نامهٔ چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به این که چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس مبین بخشی از فعالیت‌های علمی ـ پژوهشی دانشگاه است، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

مادهٔ ۱. در صورت اقدام چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به مرکز نشر دانشگاه اطلاع دهد.

مادهٔ ۲. در صفحه سوم (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کنید:

«کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد نگارنده در رشتهٔ **بیوشیمی پزشکی** است. که در سال **۱۳۸۱** در دانشکدهٔ **علوم پزشکی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر **محمدجواد رسایی** و مشاورهٔ جناب آقای دکتر **محمد تقی‌الطریحی** از آن دفاع شده است».

مادهٔ ۳. به منظور جبران بخشی از هزینه‌های نشریات دانشگاه تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادهٔ ٤. در صورت عدم رعایت مادهٔ ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

مادهٔ ۵. دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادهٔ ٤ را از محل توقیف کتاب‌های عرضه شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادهٔ ٦. اینجانب **معصومه رجبی بذل** دانشجوی رشته **بیوشیمی پزشکی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی
تاریخ و امضاء

تقدیم به آنان که دوستی‌شان مزد رسالت است و عشق به آنان امید نجات، به آنان که دوستشان می‌دارم و به موالاتشان دل بسته‌ام و به شفاعت ایشان امیدوارم. تقدیم به چهارده ستاره آسمان نبوت و ولایت خاصه حضرت زهرا سلام ا... علیها.

تقدیم به همهٔ اساتید و معلمان گرانمایه‌ای که با بذل دانش خویش افق‌های نوینی در برابر اندیشه‌ام گشودند و هنر خوب اندیشیدن را به من آموختند.

تقدیم به پدر دلسوز و مادر مهربانم که لطف و عنایت خداوند بر من به بهای دل پاک، راهنماییها، زحمات و دعای خیر ایشان است و متواضعانه گلبرگی از آموخته‌هایم را تقدیم‌شان می‌کنم.

تقدیم به خواهران و برادر عزیزم که در تمامی مراحل تحصیل و زندگی مشوق و یاریگرم می‌باشند.

تقدیم به کسانی که مضمون این آیه دربارهٔ ایشان است:

وَ اخْفِضْ لَهُما جَناحَ الذُّلِّ مِنَ الرَّحمَهِ

پر و بال تواضع و تکریم را با کمال مهربانی برایشان بگستران

سوره اسراء آیه ٢٤

تشکر و قدردانی

سپاس خدای را که هر چه داشته و دارم همه از اوست و هر قدمی که برمی‌دارم از عنایت و کرم اوست.

تشکر و سپاس می‌کنم خدای را که در محضر بزرگانی که هنر نیکو زیستن، زیبا اندیشیدن و خوب بودن را آموختند عنایت فرمود:

استاد ارجمندم جناب آقای دکتر رسایی که همواره از رهنمودهای علمی و اخلاقی ایشان بهره‌مند و با راهنمائیهای بی‌دریغ خویش، چراغ علم و معرفت را در وجودم برای همیشه روشن داشته‌اند.

استاد مشاور گرامی جناب آقای دکتر تقی الطریحی که از نظرات ارزنده ایشان برخوردار و زحمات بسیاری را طی انجام این پژوهش تقبل فرمودند.

از همه آنانی که از فیض وجودشان بهره‌ها یافتم و همه آنانی که سخاوتمندانه سرمایه علم و معرفت‌شان را در اختیارم گذاشته‌اند.

چکیده

امروزه بکارگیری وسایل ایمنواسی و طراحی روش‌های سریع برای تشخیص مورد توجه می‌باشد، لذا در سال‌های اخیر تست‌های سریع با دقت و حساسیت کافی طراحی و جایگزین سایر روش‌های پیچیده و پرهزینه ایمنواسی مثل رادیوایمنواسی، الایزا و ... شده‌اند.

آنتی‌بادی به عنوان یکی از مهمترین اجزاء سنجش‌های ایمنی در این نوع روش‌ها مورد عنایت و استفاده است. آنتی‌بادیهای پلی‌کلونال علیه مورفین تاکنون در حیوانات پستاندار گزارش شده‌اند، در این تحقیق برای اولین بار آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه مورفین (IgY-anti-morphine) با ایمن کردن مرغها توسط ایمنوژن ٦ – مورفین همی سوکسینات – آلبومین سرم گاو (6-MHS-BSA) و تخلیص آن با روش ساده و با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول ٦٠٠٠ صورت گرفت. در الایزای طراحی شده با استفاده از آنتی‌بادی فوق و با استفاده از نشان آنزیمی ٦ – مورفین همی سوکسینات پنی‌سیلیناز (6-MHS-penicillinase) مقدار ٢ نانوگرم در میلی‌لیتر مورفین قابل تشخیص بود. واکنش متقاطع آنتی‌بادی بدست آمده با کدئین در حدود ٤٠٠ درصد و با تبایین، افدرین، هروئین، تئوفیلین، کوکائین، آپومورفین، مورفین – ٣ – گلوکورونید برابر با صفر بود.

در تست‌های سریع از جمله ایمنوکروماتوگرافی آنتی‌بادی نشاندار شده با ذرات کلوئیدی طلا بر سایر نشان‌گرها به دلیل پایداری و نیز بررسی نتایج حاصل از آزمایش با چشم غیرمسلح ارجحیت دارد.

در تهیه کونژوگه ذرات طلا – آنتی‌بادی، غلظت آنتی‌بادی و pH کلوئید طلا از عوامل بسیار مهم برای اتصال ماکروملکولها به ذرات طلا می‌باشد. بدین ترتیب برای پوشانیدن ذرات طلا با آنتی‌بادی از مخازن مختلف باید غلظت و pH ایتیم برای هر یک تعیین گردد.

ذرات طلا از قطر ١٥ تا ٩٠ نانومتر تهیه و با روش میکروسکوب الکترونی عبوری مشاهده و اندازه‌گیری شدند.

ذرات طلای هم‌اندازه وگرد با قطر ١٥ تا ٣٠ نانومتر با غلظت‌های مناسبی از آنتی‌بادی و در pH مشخصی پوشانیده شده و با پلی‌اتیلن گلیکول ٢٠٠٠٠ و آلبومین سرم گاوی یک درصد پایدار گردیدند. برای اطمینان از پوشانیده شدن ذرات طلا واکنشهای آگلوتیناسیون تأییدی انجام شد. برای انجام واکنشهای آگلوتیناسیون، ملکولهایی از جنس پروتئین لازم می‌باشد. مشاهده آگلوتیناسیون ذرات طلا با آنتی‌بادیهایی که بر علیه هم تولید شده‌اند امکان‌پذیر می‌باشد. در طراحی واکنشهای آگلوتیناسیون یکی از آنتی‌بادیها بر سطح ذرات طلا قرار گرفته ودر مرحله بعد با اضافه کردن آنتی‌بادی ثانویه آن در اثر واکنشهای آگلوتیناسیون رنگ ذرات عوض می‌شود (قرمز به بنفش).

این نوع واکنش‌های آگلوتیناسیون برای جفت‌های goat-anti-rabbit-IgG, Normal rabbit-IgG و Normal –IgY و Rabbit-anti-IgY طراحی گردید و نتایج هم از طریق چشمی و هم از طریق اسپکتروفتومتری بررسی گردید و پس از اطمینان از پوشیده شدن ذرات طلا با آنتی‌بادی، مراحل طراحی کیت ایمنوکروماتوگرافی برای تشخیص مورفین انجام شد. به این منظور کونژوگه طلا – آنتی‌بادی تهیه شد، سپس کونژوگه آنتی‌ژن متصل به پروتئین مناسب برای قرارگیری در خط تست بااتصال ٦ – مورفین همی سوکسینات به آلبومین سرم گاو (6-MHS-BSA) در نسبت ٨ : ١ تهیه (غلظت ٢mg/ml) و مورد استفاده قرار گرفت.

همچنین به منظور تأیید و اطمینان از عملکرد کونژوگه طلا – آنتی‌بادی، خط کنترل حاوی آنتی‌بادی ثانویه بر علیه آنتی‌بادی موشی در منطقه موردنظر قرار گرفت.

شایان ذکر است که آنتی‌بادی مذکور در خط کنترل با غلظت ٥٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پوشانیده شد علاوه بر آن مقدار مناسب کلوئید طلا پوشیده شده با آنتی‌بادی (٢٥ µl/strip) با شدت جذب نوری مناسب (OD = ٥) در هر استریپ قرار داده و با استفاده از فریز درایر بر روی سطوح فیبرگلاس خشک گردید .

کلیه مراحل قراردادن خطوط تست وکنترل بر روی غشاء نیتروسلولز توسط دستگاه چاپگر استریپ انجام شد. در مرحله پایانی اجزاء کیت سرهم‌بندی شده و نمونه‌های ادرار و بزاق مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از سرهم‌بندی اجزای مذکور (کونژوگه طلا – آنتی‌بادی تهیه شده در این تحقیق و غشاء نیتروسلولز کیت تجاری) نشان داد که کیت تهیه شده قادر به شناسایی ١٦٦ نانوگرم در میلی‌لیتر مورفین در ادرار می‌باشد، اما زمانی که کونژوگه طلا– آنتی‌بادی تهیه شده با غشاء نیتروسلولز که تقریباً استریپ / ٥ µ g از کونژوگه مورفین – BSA در منطقه خط تست و ٢٠ µ g /strip از آنتی‌بادی ثانویه در خط کنترل قرار داده شده بود، استفاده شد حساسیتی معادل ٦٥ نانوگرم در میلی‌لیتر برای شناسایی مورفین حاصل گردید. بنابراین با توجه به افت مورفین در بزاق پس از ١٠ – ٨ ساعت به کمتر از ٦٠ نانوگرم بر میلی‌لیتر امکان استفاده از کیت مذکور برای اندازه‌گیری مورفین در بزاق فراهم خواهد بود.

کلمات کلیدی: تستهای تشخیص سریع ، ایمنوکروماتوگرافی ، کلوئید طلا ، مورفین ، ایمنوگلبولین Y

فهرست مطالب

فصل اول – مقدمه ۱

۱-۱. اعتیاد..... ۲

۱-۱-۱. درآمدهای غیرقانونی..... ۲

۱-۱-۲. تولید..... ۳

۱-۱-۳. مبارزه با مواد مخدر..... ۳

۱-۱-٤. وضعیت مواد مخدر در ایران..... ٤

۱-۱-٥. خسارت‌های اقتصادی ناشی از سوء مصرف و قاچاق مواد مخدر در ایران..... ٤

۱-۱-٦. بررسی میزان نوع مواد مخدر مصرفی، گردش پولی، درآمد ناشی از قاچاق مواد مخدر در ایران ٥

۱-۱-۷. وضعیت فعلی مواد مخدر ایران..... ٦

۱-۲. مورفین..... ۷

۱-۲-۱. منبع مورفین و تاریخچه آن..... ۷

۱-۲-۲. شیمی مورفین..... ۸

۱-۲-۳. داروشناسی مورفین..... ۹

۱-۲-٤. میزان اتصال مورفین به پروتئین‌های خون..... ۹

۱-۲-٥. توزیع مورفین در بدن..... ۱۰

۱-۲-٦. نیمه عمر و میزان پاکسازی مورفین در خون و پلاسما..... ۱۰

۱-۲-۷. متابولیسم مورفین..... ۱۰

۱-۲-۸. روش‌های تشخیصی..... ۱۲

۱-۳. آنتی‌بادی..... ۱٤

۱-۳-۱. ایزوتایپ‌های ایمنوگلبولین مرغ..... ۱۷

۱-۳-۲. چگونگی انتقال IgY از سرم مرغ به جنین (زرده)..... ۱۸

۱-۳-۳. محاسن IgY ۱۹
۱-۳-٤. معایب IgY ۱۹
۱-۳-٥. تولید آنتی‌بادی ۲۰
۱-۳-٦. روش‌های تخلیص ایمنوگلبولین Y ۲۱
۱-۳-٦-۱. روش‌های جداسازی ۲۱
۱-۳-٦-۲. روش‌های استاندارد خالص‌سازی IgY ۲۲
۱-۳-۷. پایداری ایمنوگلبولین Y، میل ترکیبی ۲٤
۱-۳-۸ ایمنوگلبولین Y و درمان ۲٤
۱-٤. میکروسکوپ الکترونی ۲٥
۱-٥. نشان‌دار کردن جهت میکروسکوپ الکترونی ۲۹
۱-٥-۱. تاریخچه نشان‌گرهای ایمنولوژیک میکروسکوپ الکترونی ۳۰
۱-٥-۲. انواع تکنیک‌های نشان‌دار کردن جهت میکروسکوپ الکترونی ۳۱
۱-٥-۲-۱. تکنیک ایمنوفریتین ۳۱
۱-٥-۲-۲. تکنیک ایمنوپراکسیداز ۳۲
۱-٥-۲-۳. تکنیک کلوئید طلا ۳۳
۱-٦. سنجش‌های اتصالی ۳٦
۱-٦-۱. سنجش‌های بیولوژیک ۳٦
۱-٦-۲. ایمونواسی ۳٦
۱-٦-۳. سنجش‌های ایمنی ایزوتوپی ۳۷
۱-٦-۳-۱. رقابتی ۳۷
۱-٦-۳-۲. غیررقابتی ۳۷
۱-٦-٤. سنجش‌های ایمنی غیرایزوتوپی ۳۸
۱-۷. کلوئید طلا ۳۹
۱-۷-۱. تاریخچه روش‌های تهیه کلوئید طلا ٤۰

۱-۷-۲. چگونگی تشکیل کلوئید طلا ٤٢
۱-۷-۳. ماهیت ذرات طلا ٤٤
۱-۷-٤. کونژوگه آنتی‌بادی ـ کلوئید طلا ٤٥
۱-۷-٥. مکانیسم جذب پروتئین به طلا و شرایط پایداری ٤٦
۱-۸. تست‌های سریع ٤٨
۱-۸-۱. تست‌های کمی و نیمه کمی ٤٨
۱-۸-۲. مزایای تست‌های سریع ٤٨
۱-۸-۳. کاربرد تست‌های سریع ٤٩
۱-۸-٤. روش‌های سنجش در تست‌های سریع ٥٠
۱-۸-٥. نشان‌گرها و تست‌های سریع ٥٣
۱-۸-٦. ایمنوکروماتوگرافی ٥٥
۱-۸-٦-۱. شمای تولید ٥٦
۱-۸-۷. کیت ایمنوکروماتوگرافی ٥٦
۱-۸-۸. آنالیت‌هایی که تا کنون کیت ایمنوکروماتوگرافی برای آنها طراحی گردیده است ٥٨
۱-۸-۹. اجزاء ایمنوکروماتوگرافی ٥٨
۱-۸-۱۰. اساس ایمنوکروماتوگرافی ٦١

فصل دوم: مروری بر مطالعات گذشته ٦٢
۲-۱. مشخصات آنتی‌بادی‌های تولید شده برعلیه مورفین ٦٣
۲-۲. تخلیص ٦٥
۲-۳. روش‌های اندازه‌گیری مورفین ٦٥
۲-۳-۱. کروماتوگرافی ٦٥
۲-۳-۱-۱. کروماتوگرافی لایه نازک TLC ٦٥
۲-۳-۱-۲. کروماتوگرافی گازی GC ٦٦

۲-۳-۱-۳. کروماتوگرافی مایع با فشار بالا ٦٧
۲-۳-۲. سنجش ایمنی ٦٧
۲-۳-۲-۱. سنجش RIA ٦٧
۲-۳-۲-۲. آگلوتیناسیون ٦٧
۲-۳-۲-۲-۱. هماگلوتیناسیون مهاری ٦٧
۲-۳-۲-۲-۲. لاتکس آگلوتیناسیون مهاری ٦٨
۲-۳-۲-۳. سنجش EIA ٦٨
۲-۳-۲-۳-۱. سنجش EIA همگن ٦٨
۲-۳-۲-۳-۲. سنجش EIA ناهمگن ٦٩
۲-۳-۲-٤. سنجش ایمنوکروماتوگرافی ٦٩

فصل سوم ـ مواد و روش‌ها، نتایج ۷۰
۳-۱. مواد ۷۱
۳-۲. روش‌ها ۷٤
۳-۲-۱. تهیه آنتی‌بادی پلی‌کلونال در مرغ علیه مورفین و تعیین خصوصیات آن ۷٤
۳-۲-۱-۱. تهیه ایمنوژن ۷٤
۳-۲-۱-۱-۱. مزدوج کردن ٦- مورفین همی‌سوکسینات به BSA به روش کربودی ایمید ۷٤
۳-۲-۱-۱-۲. مزدوج کردن ۳- مورفین همی‌سوکسینات به BSA به روش کربودی ایمید ۷۵
۳-۲-۱-۱-۳. محاسبه تعداد 6-MHS به BSA ۷۵
۳-۲-۱-۱-٤. محاسبه تعداد 3-MHS به BSA ۷٦
۳-۲-۱-۱-۵. روش ایمونیزاسیون مرغ‌ها، خونگیری از مرغ‌ها و جمع‌آوری تخم‌مرغ‌ها ۷۷
۳-۲-۱-۱-٦. تخلیص ایمنوگلبولین Y ۷۷
۳-۲-۱-۱-٦-۱. مواد لازم جهت تخلیص IgY از زرده تخم‌مرغ ۷۷
۳-۲-۱-۱-٦-۲. مراحل تخلیص ایمنوگلبولین Y ۷۸

۳-۲-۱-۱-۷. الایزای ایمنوگلبولین Y آنتی‌مورفین با استفاده از مزدوج آنزیمی ٦ـ مورفین همی‌سوکسینات ـ پنی‌سیلیناز ۸۰
۳-۲-۱-۱-۷-۱. محلول‌های مورد نیاز ۸۰
۳-۲-۱-۱-۷-۲. الایزای آنتی‌مورفین ایمنوگلبولین Y ۸۱
۳-۲-۱-۱-۷-۳. تعیین حساسیت با استفاده از رسم منحنی استاندارد ۸۳
۳-۲-۱-۱-۷-۳-۱. تهیه محلول استاندارد ذخیره و سایر محلول‌های استاندارد با غلظت‌های مختلف در باند EIA ۸۳
۳-۲-۱-۱-۷-۳-۲. مراحل تعیین حساسیت با استفاده از رسم منحنی استاندارد ۸۳
۳-۲-۱-۱-۷-٤. ویژگی ۸۵
۳-۲-۱-۱-۸. تهیه آنتی‌بادی ثانویه علیه ایمنوگلبولین Y ۸٦
۳-۲-۱-۱-۸-۱. روش ایمونیزاسیون خرگوش‌ها ۸٦
۳-۲-۱-۱-۸-۲. تیترآنتی‌بادی ثانویه ۸٦
۳-۲-۱-۱-۸-۳. روش اشترلونی برای آنتی‌بادی ثانویه ۸۷
۳-۲-۱-۱-۸-٤. تخلیص آنتی‌بادی ثانویه با پلی‌اتیلن گلیکول ٦۰۰۰ ..... ۸۸
۳-۲-۱-۱-۸-٤-۱. محلول‌های مورد نیاز جهت تخلیص آنتی‌بادی از سرم خرگوش ۸۸
۳-۲-۱-۱-۸-٤-۲. مراحل انجام کار تخلیص ۸۸
۳-۲-۱-۱-۸-۵. اتصال آنتی‌بادی ثانویه خرگوشی به آنزیم پراکسیداز ۸۹
۳-۲-۱-۱-۸-۵-۱. روش انجام کونژوگاسیون ۸۹
۳-۲-۱-۱-۸-۵-۲. تخلیص کونژوگه با استفاده از ستون Con-A ۹۰
۳-۲-۱-۱-۸-۵-۳. الایزا جهت به‌دست آوردن رقت آنزیمی کونژوگه Rabbit- anti-IgY-HRP ۹۱
۳-۲-۱-۱-۸-۵-٤. الایزا جهت کونژوگه‌ای که از ستون Con-A عبور داده نشده است ۹۳
۳-۲-۱-۱-۸-۵-۵. الایزای آنتی‌بادی ضد مورفین به‌دست آمده از زرده تخم‌مرغ با استفاده از Rabbit-anti-IgY ۹٤

۳-۲-۱-۱-۹. اتصال مشتق 6-MHS-MHS به آنریم پراکسیداز ۹٤
۳-۲-۲. تهیه ذرات کلوئیدی طلا ۹۵
۳-۲-۲-۱. مواد و وسایل مورد نیاز جهت تهیه کلوئید طلا ۹۵
۳-۲-۲-۱-۱. ظروف مورد نیاز ۹۵
۳-۲-۲-۱-۱-۱. محلول سولفوکروم ۹۵
۳-۲-۲-۱-۱-۲. طریقه اسید واش کردن ظروف ۹٦
۳-۲-۲-۲. تهیه گریدهای فورم‌وار شده جهت میکروسکوب الکترونی ۹٦
۳-۲-۲-۲-۱. مواد و محلول‌های مورد نیاز ۹٦
۳-۲-۲-۲-۲. طرز تهیه فورم‌وار کردن گرید ۹٦
۳-۲-۲-۳. روش تهیه ذرات کلوئیدی طلا در اندازه‌های مختلف ۹۷
۳-۲-۲-۳-۱. محلول‌های مورد نیاز جهت تهیه ذرات کلوئیدی طلا ۹۷
۳-۲-۲-۳-۲. روش تهیه ۹۷
۳-۲-۲-٤. مشاهده ذرات طلا با میکروسکوپ الکترونی ۹۸
۳-۲-۲-۵. چگونگی تعیین شکل ذرات طلا ۱۰۳
۳-۲-۲-٦. چگونگی تعیین شکل ذرات کلوئیدی طلا ۱۰۳
۳-۲-۳. مراحل طراحی ۱۰۳
۳-۲-۳-۱. تخلیص آنتی‌بادی ثانویه ۱۰٤
۳-۲-۳-۲. تخلیص آنتی‌بادی از سرم خرگوش ۱۰٦
۳-۲-۳-۳. پوشاندن ذرات طلا با آنتی‌بادی ۱۰۷
۳-۲-۳-۳-۱. مواد و محلول‌های مورد نیاز ۱۰۷
۳-۲-۳-۳-۲. به‌دست آوردن غلظت اُپتیمم ۱۰۷
۳-۲-۳-۳-۳. به‌دست آوردن pH مناسب ۱۰۸
۳-۲-۳-۳-٤. مراحل پوشانیدن ذرات طلا با آنتی‌بادی ۱۰۹

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تهیه مدارک

۳-۲-۳-۳-۵. آگلوتیناسیون ذرات طلا پوشیده شده با آنتی‌بادی ثانویه توسط ایمنوگلبولین خرگوش نرمال ۱۱۰
۳-۲-۳-۳-۶. پایداری ذرات طلا پوشیده شده با آنتی‌بادی ۱۱۰
۳-۲-۳-۳-۷. پوشانیدن ذرات طلا ۲۰ نانومتری با آنتی‌بادی ۱۱۱
۳-۲-۳-۳-۸. رنگ‌آمیزی منفی ذرات کلوئیدی پوشیده شده با آنتی‌بادی ۱۱۱
۳-۲-۳-۳-۸-۱. مواد و محلول‌های مورد نیاز جهت رنگ‌آمیزی منفی ۱۱۱
۳-۲-۳-۳-۸-۲. مراحل انجام کار ۱۱۲
۳-۲-۳-۳-۹. آگلوتیناسیون ذرات پوشیده با ایمنوگلبولین Y توسط آنتی‌بادی ثانویه خرگوشی ۱۱۵
۳-۲-٤. ایمنوکروماتوگرافی ۱۱۸
۳-۲-٤-۱. طراحی ایمنوکروماتوگرافی با استفاده از ذرات طلا پوشیده شده با آنتی‌بادی ثانویه ۱۱۸
۳-۲-٤-۲. طراحی ایمنوکروماتوگرافی با استفاده از ذرات طلا پوشیده شده با ایمنوگلبولین Y نرمال ۱۲۰
۳-۲-٤-۳. طراحی ایمنوکروماتوگرافی با استفاده از ذرات طلا پوشیده شده با آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوشی علیه مورفین ۱۲۱
۳-۲-٤-٤. طراحی ایمنوکروماتوگرافی با استفاده از ذرات طلا پوشیده شده با ایمنوگلبولین Y- آنتی‌مورفین ۱۲۲
۳-۲-٤-۵. طراحی ایمنوکروماتوگرافی با استفاده از ذرات طلا پوشیده شده با ایمنوگلبولین با آنتی‌بادی منوکلونال علیه مورفین ۱۲۳

فصل چهارم: بحث ، نتیجه گیری و پیشنهادها ۱۲٦
٤-۱. بحث ۱۲۷
فهرست منابع ۱۳۹
چکیده انگلیسی ۱۵۳

فصل اول

مقدمه