# کاربرد نانوذرات در ایمونوحسگرها

الهه اسماعیلی[۱*]، منوچهر وثوقی،[۱و۲] مسعود سلیمانی،[۳] امیر شاملو[۴]

۱- پژوهشکده علوم و فناوری نانو، دانشگاه صنعتی شریف، تهران

۲- دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران

۳- دانشکده علوم پزشکی، هماتولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۴- دانشکده مهندسی مکانیک، دانشگاه صنعتی شریف، تهران

**چکیده**

شناسایی حساس و دقیق بیومولکول‌ها و پروتئین‌ها در حوزه‌های مختلف شامل آنالیز غذا، زهرشناسی، دارویی و بالینی کاربرد دارد. ایمنی‌سنجی روشی حساس، دقیق و سریع برای شناسایی مولکولی خاص بوده و براساس توانایی آنتی‌بادی برای اتصال به آنتی‌ژن و تشکیل کمپلکس آنتی‌ژن- آنتی‌بادی برای جداسازی و شناسایی آنالیت موردنظر می‌باشد. آنتی‌بادی‌ها پروتئین‌هایی هستند که در اثر تزریق یک مولکول خارجی آنتی‌ژن به بدن حیوان، در خون و سیالات بافتی حیوان تولید می‌شوند. ازآنجاییکه آنتی‌بادی‌ها دربرابر ساختار خاص سه‌بعدی آنتی‌ژن تولید می‌شوند، برای اتصال به آنتی‌ژن اختصاصی عمل می‌کنند و هنگامی که آنتی‌بادی مونوکلونال یا پلی‌کلونال از خون موجود زنده تخلیص می‌شود واکنشگری ایده‌ال برای شناسایی مولکول هدف با ویژه‌گزینی بالا به‌شمار می‌رود. بنابراین به‌دلیل مزایای بسیار روش‌های ایمنی‌سنجی و ایمونوحسگر از قبیل ویژه‌گزینی و حساسیت بالا، امروزه توجه زیادی به‌سوی این شاخه علم معطوف شده است. نانوساختارها به دلیل مزایایی مثل نسبت سطح به حجم بالا می‌تواند برای بهبود حدتشخیص و ساخت ابزارهای مینیاتوره مفید باشد. نانوساختارها می‌توانند به‌عنوان نشانگر برای شناسایی یا به‌عنوان بستری که واکنش ایمنی‌شیمیایی روی آن رخ می‌دهد به‌کاررروند.

مقاله حاضر به توصیف موارد قابل‌توجه در توسعه ایمنی‌سنجی، روش‌های تولید آنتی‌بادی و انواع روش‌های عملکرد و بهینه‌سازی سیستم‌های تشخیص آنالیت می‌پردازد.

***واژه‌های کلیدی:*** *ایمونوحسگر*، آنتی‌بادی، آنتی‌ژن، نانوذرات و نانوساختارها

ایمیل نویسنده مسئول : e_esmaeili@mehr.sharif.ir

## ۱-مقدمه

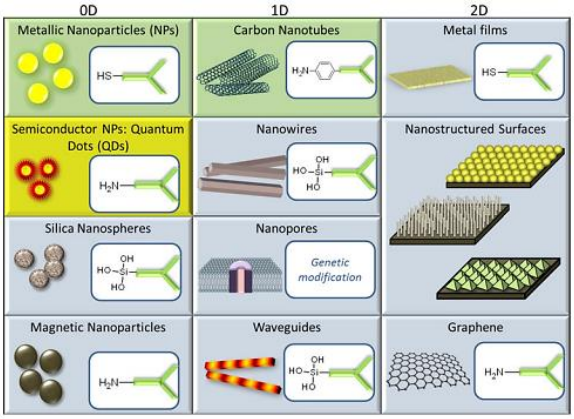
دردسترس‌بودن مجموعه داده‌های جامع از ژنوم بشر [۱] بررسی اساس مولکولی بیماری‌های مختلف را موردتوجه قرار داده است. به‌منظور این هدف مطالعه ژن‌های انسان مهم است. همچنین یافت شده است که تنها توالی ژنی تعیین‌کننده‌ی فرآیندهای بیولوژیکی در شخص نیست؛ بخش یکسانی از توالی ژنی بسته به اینکه چگونه pre-mRNA به‌هم متصل می‌شوند، می‌تواند برای رمزگذاری پروتئین‌های مختلف استفاده شود. علاوه‌براین اصلاحات بعد از رونویسی نیز تغییراتی را به دنبال دارد. بنابراین استفاده از پروتئین‌ها به‌عنوان نشانگرزیستی برای بیماری مهم می‌باشد [۲]. از سوی دیگر کشف و شناسایی عامل‌های بیماری‌زا مثل ویروس و باکتری نیز ضروری است، که این هدف نیازمند وسیله شناسایی بسیارحساس با کمترین پاسخ منفی اشتباه است. بنابراین تشخیص مولکولی in vitro نیازمند زیست‌حسگر با حساسیت و حدتشخیص بهبودیافته است. هم‌اکنون سنجش‌های نوکلئیک‌اسید عموماً براساس واکنش زنجیری پلیمراز (PCR) است. این تکنیک براساس تقویت هدف استوار بوده و حساسیت خوبی دارد ولی پیچیدگی، گران‌بودن، عدم‌قابلیت حمل و شناسایی چندین هدف در یک آزمایش، از مشکلات آن است. اگرچه روش PCR در آنالیز غلظت‌های بسیارکم DNA موفق بوده است ولی تکنیک مشابهی با چنین قابلیت تقویت‌سازی هدف برای پروتئین‌ها وجود ندارد. بنابراین تکنیک‌های آنالیزی به‌منظور شناسایی غلظت‌های کم پروتئین‌ها باید بسیارحساس باشند [۳].

اگرچه ایمنی‌شناسی به‌عنوان یك روش گزینش‌پذیر درنظرگرفته می‌شود ولی محدودیت‌هایی نیز دارد. مهمترین فاکتور محدودکننده‌ی گزینش‌پذیری این است که آنتی‌بادی کل مولکول آنتی‌ژن را شناسایی نمی‌کند، بلکه تنها ناحیه اتصال یعنی اپی-

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۲۸

توپ شناسایی می‌شود. مواد مختلف با اپی‌توپ‌های مشترک به‌وسیله آنتی‌بادی تمیز داده نمی‌شوند که منجربه مشکلات واکنش متقاطع می‌شود. همچنین معمول است که یك نوع سنجش که با یك مجموعه واکنشگرها عمل می‌کند، درمقایسه با سنجش دیگر، غلظت یکسانی را اندازه‌گیری نمی‌کند، زیرا سنجش‌ها از آنتی‌بادی‌های مختلف هدفمند به‌سوی اپی‌توپ‌های مختلف یك نوع آنالیت استفاده می‌کنند [۴].

علی‌رغم محدودیت‌های ایمنی‌شناسی ، تلاش‌هایی برای بهبود و گسترش رویکردهای موجود انجام شده که باعث بهبود گزینش‌پذیری و حدتشخیص، کاهش زمان سنجش، کم‌کردن مقدار نمونه و حجم واکنشگر و اندازه‌گیری همزمان چندین آنالیت می‌شود. نانوفناوری یکی از مهمترین رویکردها برای بهبود ایمنی‌شناسی است. نانوساختارها وابسته به خواص فیزیکی و شیمیایی‌شان به‌عنوان برچسب یا به‌عنوان بستر به‌کار می‌روند. برای استفاده به‌عنوان برچسب، ماده مورد نظر باید در سیال بیولوژیکی یا بافر پایدار بوده، در محیط مورد نیاز قابل‌تشخیص باشد و گروه‌های عاملی داشته باشد که بتواند برای اتصال به بیومولکول‌ها استفاده شود. شکل ۱ نانوساختارهای مهمی که در سنجش‌های تشخیصی به‌کار می‌رود را نشان می‌دهد.




**شکل ۱- نانوساختارهای مختلف استفاده‌شده در ایمنی‌سنجی (پس زمینه آبی: استفاده به عنوان بستر، پس‌زمینه زرد: استفاده به‌عنوان برچسب، پس‌زمینه سبز: استفاده به عنوان بستر و برچسب) [۲].**

### ۲-۱- عوامل مهم در بهبود روش‌های بیوتشخیصی

در بهبود زیست‌حسگرها باید فاکتورهایی مثل حساسیت، گزینش‌پذیری، تطبیق‌پذیری ، دوام، قیمت و قابلیت حمل آن مدنظر قرار گیرد.

حساسیت در تجهیزات اندازه‌گیری به حداقل اندازه دامنه ورودی اطلاق می‌شود که باعث ایجاد تغییر در خروجی سیستم گردد. تشخیص بیماری براساس وجود یا غلظت بیومولکول خاص نیازمند تشخیص هدف به‌طور حساس است. هدف‌ها معمولاً پروتئین‌ها یا نوکلئیك‌اسیدها هستند. محققان دو استراتژی کلی برای حصول حساسیت بالا پیشنهاد داده‌اند: تقویت هدف و تقویت سیگنال. در تقویت هدف، تعداد بیشتری از هدف یا جایگزین هدف توسط فرآیندهای کاتالیزوری تولید می‌شود. واکنش زنجیری پلیمراز (PCR) مثالی از تقویت هدف است و تکنیك‌های PCR مدرن می‌توانند حضور تنها چند کپی از توالی نوکلئیك‌اسیدی را شناسایی کنند [۵]. درمقایسه در تقویت سیگنال، فرآیند کاتالیزوری برای افزایش سیگنالی استفاده می‌شود که از یك اتصال ناشی می‌شود. مثال نوعی این روش، ELISA است که در آن پروتئین هدف به آنتی‌بادی متصل می‌شود، سپس با آنتی‌بادی دوم که حاوی کاتالیزور تولیدکننده سیگنال است ساندویچ می‌شود [۶]. تکنیك‌های خاصی که تقویت ندارند مثل تکنیك‌های طیف‌سنجی تك‌مولکولی، باید غلظت بیشتر از نانومولار از آنالیت وجود داشته باشد. بنابراین چنین تکنیك‌هایی به‌عنوان روش‌های با حساسیت بالا در تشخیص پزشکی درنظر گرفته نمی‌شوند.

نه‌تنها هدف باید در غلظت‌های کم قابل‌تشخیص باشد، بلکه باید از میان تعداد زیادی بیومولکول موجود در نمونه قابل‌شناسایی باشد، به‌عبارت‌دیگر ابزار بیوتشخیصی باید گزینش‌پذیر باشد. همچنین گسترش روش‌هایی که قابل‌کاربرد برای بیماری‌های مختلف باشد، اهمیت دارد. PCR روش گزینش‌پذیری است که از جفت‌بازهای واتسون-کریك برای گزینش‌پذیری موردنیاز استفاده می‌کند، ولی این روش تطبیق‌پذیری لازم را در تشخیص‌های پزشکی ندارد. واضح است که هدف‌های غیرژنتیکی مثل پروتئین‌ها، مولکول‌های کوچك و یون‌ها، نشانگرهای بیولوژیکی مهمی هستند که PCR قابلیت‌تشخیص آنها را ندارد. اخیراً روش‌های immuno-PCR [۷] و بیوبارکد گسترش داده شده‌اند که پروتئین‌ها را با حساسیت و گزینش‌پذیری بالا شناسایی می‌کند. در روش immuno-PCR، نوکلئیك‌اسید به آنتی‌بادی متصل می‌شود و تقویت PCR برچسب نوکلئیك‌اسیدی، حدتشخیص قابل قبولی را حاصل می‌کند. موضوع گزینش‌پذیری برای پروتئین‌ها چالش‌برانگیزتر از نوکلئیك‌اسیدهاست. علیرغم پیشرفت‌های اخیر، چالش زیادی برای شناسایی و ساخت آنتی‌بادی با خصوصیات مطلوب برای اتصال با هدف موردنظر وجود دارد. به‌علاوه این ساختارها، حساس‌تر از نوکلئیك‌اسیدها هستند که باید در هنگام ذخیره و استفاده‌کردن مدنظر قرار گرفته شود. این مشکلات هنگام سنجش‌های چندتایی تشدید می‌شود. هنگامیکه آنتی‌بادی‌ها روی سطح جذب می‌شوند و برای سنجش محیط کمپلکس استفاده می‌شوند ممکن است آنتی‌بادی به‌طور غیراختصاصی به پروتئین‌ها در نمونه وصل شود. بنابراین باید جایگزینی یافت که گزینش‌پذیری بیشتری داشته باشد. برای مثال الیگونوکلئوتیدهای کوچك به نام اپتامر، گزینش‌پذیری بیشتری برای شناسایی هدف‌هایی مثل مولکول‌های کوچك و پروتئین‌ها فراهم می‌کنند [۸].

درحال‌حاضر، صنعت تشخیص پزشکی متمرکز در آزمایشگاه‌هاست که با ابزارهای پیچیده و بزرگ تجهیز می‌شوند که نیاز به اشخاص ماهر برای اپراتوری آنهاست. بنابراین چالش بزرگ، گسترش سنجش‌های بادوام، قابل‌حمل و با قیمت کم است. میکروآرایه‌های با دانسیته بالا، اطلاعاتی در مورد تشخیص بیماری در زمانی کوتاه فراهم می‌کند؛ ولی قیمت بالا، عدم دوام و مشکلات در تفسیر اطلاعات حاصل از آن از محدودیت‌های

این روش‌ها با شمار می‌رود. تکنولوژی مورداستفاده نباید گران و از نظر فیزیکی حجیم باشد. به‌عنوان مثال گرانی و مشکلات امنیتی سنجش‌های براساس رادیو اکتیویته مانع پیشرفت آن و باعث روی‌آوردن به تکنیک‌های براساس فلورسانس شده است.

### ۲-۲- ایمونوواکنشگرها

آنتی‌بادی‌ها، ایمونوگلوبین‌هایی هستند که با قرارگرفتن درمعرض آنتی‌ژن (هر ماده‌ای که پاسخ ایمنی را تحریک می‌کند)، توسط لنفوسیت B تولید می‌شوند و به ۵ دسته IgG، IgM، IgA، IgE و IgD تقسیم می‌شوند. حدود ۹۰% ایمونوگلوبین‌ها در سرم را IgG تشکیل می‌دهد. این پروتئین‌ها به شکل Y هستند و اغلب در ایمنی‌شناسی استفاده می‌شوند. IgG گلیکوپروتئینی با وزن حدود ۱۵۰ kDa حاوی ۴ زنجیره‌ی پلی‌پتیدی است که حاوی ۲ زنجیره‌ی سنگین با وزن ۵۰ kDa و دو زنجیره‌ی سبک با وزن حدود ۲۵ kDa است که با پیوند دی‌سولفیدی به‌هم متصل شده‌اند. IgG شامل سه ناحیه کلیدی است: دو ناحیه‌ی Fab یکسان در بازوهای Y و روی ناحیه Fc که پایه Y را تشکیل می‌دهد. ناحیه Fab حاوی توالی‌های آمینواسیدی متغیری است که تعیین‌کننده‌ی ویژه‌گزینی آنتی‌بادی در برابر آنتی‌ژن موردنظر است.

خصوصیات آنتی‌بادی در توسعه‌ی ایمنی‌شناسی نقش کلیدی دارد، زیرا عملکرد آنالیزی روش به میل‌پیوندی و گزینش‌پذیری آنتی‌بادی وابسته است. آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال، مونوکلونال و نوترکیب به‌عنوان واکنشگر در ایمنی‌شناسی استفاده می‌شوند. آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال (PAbs) از سرم حیوان مصون‌شده با آنتی‌ژن خاص حاصل می‌شود که شامل مخلوطی از آنتی‌بادی‌ها با میل-پیوندی و گزینش‌پذیری متفاوت است.

آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (mAb) برخلاف آنتی‌بادی پلی‌کلونال، برای یک سایت خاص اختصاصی عمل می‌کنند و به یک اپی‌توپ خاص وصل می‌شوند. تکنیک هیبریدوما برای ساخت این نوع آنتی‌بادی استفاده می‌شود. درطی تولید آنتی‌بادی مونوکلونال، لنفوسیت‌های حاصل از موش مصون‌شده به تومور بدخیم سلول‌های مغز استخوان متصل‌شده و هیبریدوما تولید می‌شود. بخش توموری، تکثیر هیبریدوما در محیط کشت را امکان‌پذیر می‌سازد و بخش لنفوسیتی آنتی‌بادی تولید می‌کند. هیبریدومایی که آنتی‌بادی مطلوب را تولید می‌کند، توسط تکنیک‌های دسته‌بندی سلولی که سلول‌ها را براساس خصوصیاتشان از هم جدا می‌کند، انتخاب شده وسپس کشت داده می‌شود. هر آنتی‌بادی در محیط کشت انتخاب‌شده خواص اتصالی یکسانی دارد و برای اپی‌توپ خاصی روی آنتی‌ژن اختصاصی عمل می‌کند. بسیاری ازایمنی‌شناسی‌های تشخیصی استاندارد از mAbs استفاده می‌کنند ولی به دلیل اینکه تولید و نگهداری خط‌سلولی هیبریدوما هزینه‌بر است، تولید mAb محدودیت‌هایی دارد.

تکنولوژی DNA نوترکیب برای تولید بخش‌های آنتی‌بادی یا آنتی‌بادی نوترکیب (rAb) به‌کار می‌رود که به‌موجب آن، ژن آنتی‌بادی به روش PCR فزون‌سازی‌شده و در سیستم‌های میزبان مختلف بیان می‌شود [۹]. بنابراین حساسیت و تکثیرپذیری ایمنی‌شناسی بهبود می‌یابد. کشت‌های میکروبی و سلول‌های پستانداران برای تولید rAbs استفاده می‌شود، ولی گونه‌های گیاهی نیز اخیراً به‌عنوان بیوراکتورهای سبز و با مزایایی مثل هزینه، مقیاس‌پذیری و ایمنی، توجه زیادی را به‌خود جلب‌کرده‌اند. این نوع آنتی‌بادی‌ها پلانتی‌بادی نام‌گرفته‌اند [۱۰]. انتخاب بین pAbs، mAbs و rAbs برای ایمنی‌شناشی به فاکتورهایی مثل هزینه، حساسیت و گزینش‌پذیری نسبی آنتی‌بادی‌ها و ... وابسته است.

یک جنبه مهم ایمنی‌شناسی، تولید آنتی‌بادی با گزینش‌پذیری و میل‌ترکیبی مناسب است. آنالیت‌های با وزن‌مولکولی بالا مثل پروتئین‌ها، معمولاً آنتی‌ژن‌های ایمونوژنیک بوده و می‌توانند تولید آنتی‌بادی کنند. ولی مولکول‌های کوچک، غیرایمونوژنیک هستند، ولی هنگامی که به یک ماکرومولکول که به‌عنوان حامل عمل می‌کند متصل می‌شوند، پاسخ ایمنی را تحریک می‌کنند. اگر ترکیب هدف حاوی گروه‌عاملی مناسبی (مثل- $NH_2$، COOH-، CHO- یا -SH) باشد، اتصال مستقیم مولکول‌های کوچک با پروتئین‌های حامل امکان‌پذیر است، درغیراین‌صورت لازم است که مشتقی از مولکول هدف (به نام هاپتن) برای اتصال با حامل را فراهم کنیم. ایمونوژن حاصل باید تقریباً به‌طورکامل از نظر ساختار و خواص الکترونیکی و هیدروفوبی مشابه مولکول هدف باشد و حاوی بازوی اتصالی با ۳ تا ۶ اتم کربن با یک گروه‌عاملی مناسب برای اتصال به حامل باشد. طراحی هاپتن‌ها برای اتصال به پروتئین حامل، مهمترین جنبه تولید آنتی‌بادی گزینش‌پذیر است.

### ۲-۳- برهمکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی

روش‌های ایمنی‌شناسی براساس شناسایی اختصاصی آنتی‌ژن به‌وسیله آنتی‌بادی و تشکیل کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی عمل می‌کنند. اتصال آنتی‌ژن-آنتی‌بادی برحسب میل‌پیوندی و اویدیتی توصیف می‌شود. میل‌پیوندی استحکام اتصال بین یک جایگاه اتصال منفرد از یک مولکول (به‌عنوان مثال یک آنتی‌بادی) و یک لیگاند (به‌عنوان مثال یک آنتی‌ژن) نامیده می‌شود. قدرت اتصال به‌وسیله ثابت اتصال تعادلی (K) برای تشکیل کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی تعیین می‌شود. اتصال ازاصول ترمودینامیک پایه‌ی واکنش‌های برگشت‌پذیر بین دو مولکول پیروی می‌کند. این رابطه با واکنش شیمیایی زیر توصیف می‌شود که Ag نشان‌دهنده آنتی‌ژن، Ab نماینده آنتی‌بادی و Ag-Ab کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی و K ثابت‌تعادلی است.

$$Ag+Ab \rightleftharpoons AgAb \qquad K=([AgAb])/([Ag][Ab])$$

$$K=10^{7}\text{-}10^{9}\ mol^{-1}$$

این‌رابطه بدین‌معنی است که هرچه میل‌پیوندی قویتر و K بزرگتر باشد، مقدار بیشتری از آنتی‌ژن در زمان کمتری متصل می‌شود و کمپلکس تشکیل‌شده پایدارتر خواهد بود. K با دما، pH و ترکیب بافر تأثیر می‌پذیرد.

اویدیتی استحکام کلی واکنش متقابل بین دو مولکول مانند یک آنتی‌بادی و آنتی‌ژن است. اویدیتی به هر دو فاکتور میل‌پیوندی و ظرفیت واکنش بستگی دارد. بنابراین اویدیتی یک آنتی‌بادی

IgM پنتامریك با ۱۰ جایگاه اتصال آنتی‌ژن می‌تواند بسیار بیشتر از اویدیتی یك مولکول IgG دایمریك برای همان آنتی‌ژن باشد. بنابراین اویدیتی از ویژگی‌های آنتی‌بادی‌هاست.

### ۲-۴- ایمنی‌شناسی

روش‌های ایمنی‌شیمیایی از خواص کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی بهره برده و از آنتی‌بادی‌ها به‌عنوان واکنشگر برای شناسایی و کمی‌کرد مقدار آنتی‌ژن‌ها بهره می‌برد. مهمترین مزیت ایمنی-شناسی دربرابر دیگر تکنیك‌های کمی‌سازی این است که کمترین تخلیص آنتی‌ژنی موردنیاز است.

روش‌های ایمنی‌شناسی به دو نوع نشاندار و بدون‌نشان تقسیم می‌شود. در سنجش بدون‌نشان، تشکیل کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی-بادی مستقیماً از طریق تغییر در خصوصیات محیط واکنش ردیابی می‌شود. ولی در روش سنجش نشاندار به یك واکنشگر اضافی ردیاب یا شناساگر نیاز است که به آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی متصل شده و وابسته به نوع ایمنی‌شناسی یك خاصیت قابل-اندازه‌گیری سیستم (مثل رادیواکتیویته، فعالیت آنزیمی، فلورسانس و ...) به غلظت آنالیت ربط داده می‌شود.

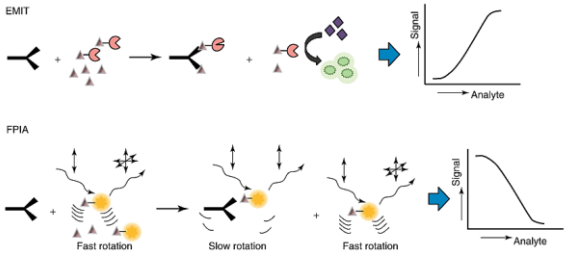
### ۲-۴-۱- سنجش بدون‌نشان

شناسایی بدون‌نشان برهمکنش آنتی‌ژن-آنتی‌بادی با آشکارسازهای بسیار حساسی مثل رزونانس پلاسمون سطحی (SPR) و میکروبالانس کریستال کوارتز (QCM) محقق شده است. سنجش‌های ایمونونفلومتری و ایمونوتربیدیمتری نیز براساس اندازه‌گیری‌های مستقیم و غیرمستقیم نور پراکنده‌شده با تشکیل کمپلکس ایمنی بین آنتی‌ژن ماکرومولکول و آنتی‌بادی مکمل آن، مثال‌های نوعی سنجش بدون‌نشان هستند [۱۱]. هنگامیکه باریکه نوری از میان یك نمونه کدر عبور می‌کند، شدت نور به‌وسیله‌ی پراکندگی کاهش می‌یابد که مقدار نور پراکنده‌شده به غلظت و توزیع اندازه ذرات وابسته است. در نفلومتری، شدت نور پراکنده‌شده اندازه‌گیری می‌شود، درحالیکه در تربیدیمتری، شدت نور عبوری از نمونه اندازه‌گیری می‌شود. هر دو تکنیک در آنالیز بالینی برای تعیین پروتئین‌ها به‌کاررفته‌اند.

### ۲-۴-۲- سنجش نشاندار

این سنجش‌ها براساس جنبه‌های مختلفی مثل تعداد فازها، روش کار، نشان و ردیاب دسته‌بندی می‌شوند. هنگامی که نیازی به جداکردن نشان آزاد از متصل نباشد، سنجش هموژن و تك‌فاز است. درغیراین‌صورت در سنجش دوفازی که نیاز به جداسازی نشان آزاد قبل از اندازه‌گیری دارد، سنجش هتروژن است. سنجش‌های هموژن ساده‌تر از نوع هتروژن هستند ولی حدتشخیص حاصل از آنها بالاتر است. این سنجش‌ها معمولاً برای شناسایی مولکول‌های کوچك به روش رقابتی به‌کاربرده می‌شوند که در آن ردیاب تشکیل‌شده از نشان متصل به آنالیت با آنالیت آزاد برای اتصال به آنتی‌بادی رقابت می‌کند. وقتی غلظت آنالیت افزایش می‌یابد، ردیاب بیشتری جایگزین می‌شود. بنابراین اگر آنتی‌ژن نشاندار آزاد گونه مشاهده‌شونده باشد، افزایش سیگنال و اگر کمپلکس آنتی‌ژن نشاندار متصل به آنتی-بادی شناسایی شود، کاهش سیگنال را خواهیم داشت.

اولین سنجش هموژن، روش ایمنی‌شناسی تقویت‌شده‌ی آنزیمی (EMIT) است که در آن آنتی‌ژن نشاندارشده با آنزیم به‌عنوان ردیاب به‌کار می‌رود [۱۱]. معمولاً ردیاب آزاد فعالیت آنزیمی نشان می‌دهد که با تشکیل کمپلکس آنتی‌بادی-ردیاب، فعالیت آنزیمی کاهش می‌یابد. عیب این روش آن است که آنتی‌بادی کاملاً فعالیت آنزیمی را از بین نمی‌برد، بلکه تنها آن را کم می-کند که منجر به فعالیت قابل‌توجهی برای نمونه شاهد می‌شود. نمونه دیگر سنجش هموژن، ایمنی‌شناسی پلاریزاسیون فلورسانس (FPIA) است [۱۲]. هنگامی که ردیاب که آنتی‌ژن نشاندارشده با فلوروفور کوچك است به آنتی‌بادی گزینش‌پذیر متصل می-شود، پلاریزاسیون فلورسانس ردیاب افزایش می‌یابد (شکل ۲).



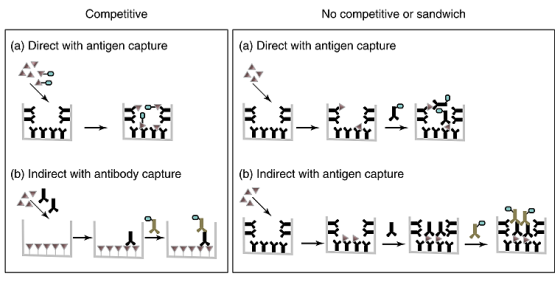

**شکل ۲- شماتیک سنجش‌های هموژن EMIT و FPIA [۵].**

سنجش‌های هتروژن از نوع هموژن کاربرد بیشتری داشته و گزینش‌پذیری و حساسیت بهتری را نشان می‌دهند، اگرچه به دلیل چندین مرحله نهفتگی و شستشو پیچیده‌تر می‌باشند. استفاده از آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی ثابت‌شده منجر به گستره‌ی وسیعی از سنجش‌ها شده است که در همه موارد، تثبیت جهت‌دار آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن برای جداسازی ردیاب آزاد از متصل لازم می‌شود. تعدادی روش برای تثبیت ایمونوواکنشگر ارائه شده است [۱۳] که اتصال کووالانسی ارجح است. اگرچه روش‌های دیگری مثل بیوتین-آویدین یا پروتئین A-آنتی‌بادی نیز به‌کار گرفته شده‌اند. پروتئین A به بخش Fc آنتی‌بادی متصل‌شده و ناحیه Fab به‌طور آزاد در برابر محلول قرار می-گیرد.

سنجش‌های رقابتی و غیررقابتی دو فرمت مهم روش‌های ایمنی-شناسی هتروژن هستند (شکل ۳). در ایمنی‌شناسی رقابتی، رقابت بین آنتی‌ژن نشان‌دار و بدون‌نشان برای تعداد محدود سایت اتصالی آنتی‌بادی وجود دارد و همه واکنشگرها به‌صورت همزمان یا ترتیبی باهم مخلوط می‌شوند. روش‌هایی مثل RIA از رویکرد ایمنی‌شناسی رقابتی استفاده می‌کند و به‌دلیل تعداد محدود سایت‌های اتصال آنتی‌بادی، رقابتی بین آنتی‌ژن بدون نشان و آنتی‌ژن نشاندار (با داروی رادیواکتیو) به وجود می‌آید. روش کار بدین‌صورت است که تعدادی چاهک که آنتی‌بادی به سطح تحتانی آن متصل است را آماده کرده و مقدار ثابتی از داروی نشاندار با ماده رادیواکتیو به هرچاهک اضافه می‌شود.

آنتی‌بادی‌ها برای دارو اختصاصی عمل کرده و به آن متصل می شوند. محلول‌های مرجع حاوی غلظت‌های معلومی از دارو به چاهک‌ها اضافه می‌شود که اینها به‌عنوان محلول‌های استاندارد برای رسم منحنی استاندارد به‌کار می‌روند. به لوله دیگری نمونه مجهول اضافه می‌شود. زمانیکه غلظت بالایی از دارو در محلول یا نمونه مرجع وجود دارد، مقدار زیادی از داروی نشاندار که به آنتی‌بادی متصل است با دارو جایگزین می‌شود ولی در نمونه های با غلظت داروی کم، تنها مقدار کمی از داروی نشاندار جایگزین می‌شود. بعد از مدت زمان کافی نهفتگی، محلول شناور هر لوله را خارج کرده و رادیواکتیویته موجود در هر لوله که نماینده داروی نشاندار متصل است، اندازه‌گیری می‌شود. سپس منحنی استاندارد به‌صورت غلظت داروی متصل دربرابر غلظت دارو در محلول مرجع کشیده می‌شود. غلظت داروی نمونه مجهول با مقایسه مقدار رادیواکتیویته داروی متصل روی محور y منحنی استاندارد و مقدار متناظر غلظت داروی اضافه شده روی محور x تعیین می‌شود.

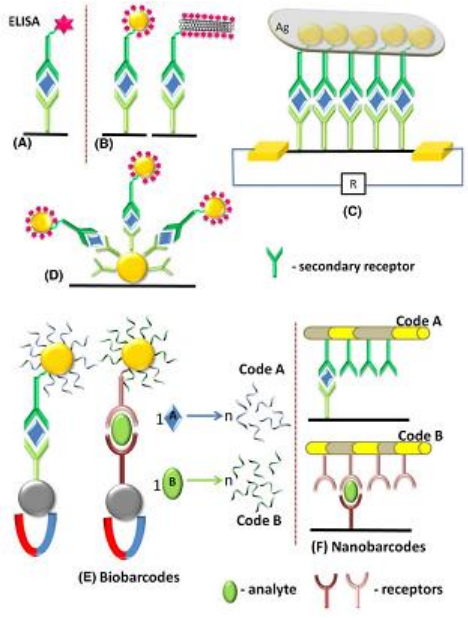
فرمت ساندویچی یا غیررقابتی شامل استفاده از دو آنتی‌بادی است. یك آنتی‌بادی اولیه تثبیت‌شده و یك آنتی‌بادی نشاندار ثانویه (ردیاب) که به دو سایت مختلف روی آنتی‌ژن متصل‌شده و تشکیل کمپلکس ایمنی می‌دهند. سیگنال حاصل مستقیماً متناسب با غلظت آنالیت است. روش غیرمستقیم نیز با جابجایی ردیاب به آنتی‌بادی ثانویه دیگر امکان‌پذیر است. این تکنیك بسیارحساس است ولی برای اندازه‌گیری آنتی‌ژن‌های کوچك مثل داروها مناسب نیست. برای این روش سنجش، آنتی‌ژن باید دارای حداقل دو سایت اتصال مجزا که به‌وسیله دو آنتی‌بادی متفاوت شناسایی می‌شود، باشد. این نوع سنجش به دو نوع سنجش همزمان و ترتیبی تقسیم می‌شود. سنجش همزمان شامل قراردادن همزمان آنتی‌بادی‌های نشاندار و بدون‌نشان با نمونه مجهول است. ولی سنجش ترتیبی شامل چندین مرحله نهفتگی و شستشو است که مراحل اضافه‌کردن واکنشگرها را جدا می‌کند و زمانبرتر است.




**شکل ۳- روش‌های ایمنی‌سنجی هتروژن رقابتی و غیررقابتی در شناسایی آنتی‌ژن [۴].**

در روش ایمنی‌سنجی آنزیمی (ELISA) که نوعی سنجش ساندویچی است، گیرنده آنتی‌بادی و برچسب یک آنزیم است. سنجش ساندویچی براساس نانوساختارها نیز بر این اصول استوار است و شامل موارد زیر می‌باشد (شکل ۴ b-f).

✓ نانوساختارهای متصل به گیرنده ثانویه: سطح زیاد باعث افزایش بارگیری گیرنده ثانویه با دانسیته بالایی از برچسب می‌شود (شکل ۴ b). از آنجاییکه هر مولکول آنالیت با تعداد زیادی مولکول برچسب روی گیرنده ثانویه متناظر است، افزایش قابل‌توجهی در سیگنال حاصل می‌شود. مثال نوعی این استراژی، نانوکره‌های سیلیکای با رنگدانه بارگیری‌شده [۱۴] یا استفاده از نانولوله به‌عنوان تکیه‌گاه مولکول‌های آنزیمی مثل فسفاتازقلیایی است [۱۵] که منجر به افزایش قابل‌توجه سیگنال می‌شود. نانوذرات متصل به گیرنده ثانویه خود می‌توانند به عنوان شناساگر استفاده شوند. شناسایی مستقیم نانوذرات بدون تقویت‌سازی از طریق پراکندگی نوری رزونانسی یا روش های الکتروشیمیایی انجام می‌شود [۱۶]. به‌منظور تقویت حضور نانوذرات، نشست الکترولس نقره روی نانوذرات انجام می‌شود [۱۶،۱۷](شکل ۴c). بدین‌منظور نمونه در محلول حاوی نمك نقره و عامل کاهنده مناسب قرار می‌گیرد. بعد از چند دقیقه نقره روی نانوذرات فلزی رسوب می‌کند. پویشگری برای تعیین مقدار نقره نشست‌داده‌شده استفاده می‌شود که متناسب با غلظت آنالیت است.




**شکل ۴- انواع سنجش‌های ساندویچی [۲].**

✓ نانوساختارهای متصل به گیرنده اولیه: به‌منظور آشکارسازی آسان در سنجش ساندویچی، لازم است که آنتی‌بادی اولیه روی بستر مناسب تثبیت شود. معمولاً گیرنده اولیه روی بستر شیشه‌ای تثبیت می‌شود که به‌منظور افزایش حساسیت، از بستر نانوساختار استفاده می‌شود (شکل ۴d). ازطریق این استراتژی تقویت‌سازی دوگانه، به‌طور همزمان بارگیری برچسب بالا و دانسیته بالایی از گیرنده اولیه روی تکیه‌گاه حاصل می شود.

✓ بارکد: دو نوع بارکد شامل بیوبارکد و نانوبارکد وجود دارد. در روش بیوبارکد، گیرنده ثانویه به نانوذره متصل می‌شود که حاوی تعداد زیادی از توالی نوکلئوتیدی خاصی است. هر گیرنده ثانویه با توالی نوکلئوتیدی خاصی همراه است که اتصال آنالیت خاصی رمزگذاری می‌شود [۱۸،۱۹]. در روش نانوبارکد، نانوساختار متصل به آنتی‌بادی ثانویه به‌عنوان رمز عمل می‌کند [۲۰،۲۱] ] برخلاف بیوبارکد، روش نانوبارکد مقدار آنالیت را تقویت نمی‌کند و نقطه قوت آن در شناسایی چندتایی آنالیت است (شکل ۴e,f).

در دسته‌بندی دیگر، روش‌های ایمنی‌شناسی براساس نوع نشان تقسیم‌بندی می‌شوند. اولین ایمنی‌سنجی با استفاده از نشان در دهه ۱۹۵۰ توسط Yalow و Berson برای اندازه‌گیری انسولین کشف شد. آنها از انسولین نشاندارشده با مواد رادیواکتیو استفاده کردند. روش کار بدین‌صورت بود که انسولین نشان دارشده با مواد رادیواکتیو با خون بیمار مخلوط شده، سپس انسولین‌های متصل و نامتصل جدا شده و تشعشع انسولین نشان‌دار شده متصل به ایمونوگلوبین بیمار اندازه‌گیری شد. ایزوتوپ‌های معمول استفاده‌شده در ایمنی‌شناسی شامل $H^{3}$، $I^{125}$ و $C^{14}$ می‌باشد. $H^{3}$ و $C^{14}$ نشرکننده‌ی بتا و $I^{125}$ نشرکننده‌ی گاماست.

اگرچه گونه‌های ایزوتوپ اولین برچسب‌های پیشنهادی برای سنجش نشاندار بودند ولی محدودیت این برچسب‌ها منجربه تحقیق برای یافتن برچسب جایگزین کاربرپسندتری شد. آنزیم‌ها اغلب در سنجش‌های هتروژن ساندویچی و رقابتی استفاده می شود که سنجش ELISA نامیده می‌شود. مرحله‌ی آخر این سنجش‌ها، اندازه‌گیری سیگنال درنتیجه تبدیل سوبسترا به محصول است که در فرمت رقابتی و ساندویچی، به‌ترتیب به‌طور معکوس و مستقیماً متناسب با غلظت آنالیت است. عیب روش ELISA، لزوم چندین مرحله نهفتگی و شستشو است که کاربرد آن در تعیین آنالیت به‌صورت کاملاً اتوماتیک، لحظه‌ای و سریع را محدود می‌کند. بنابراین رویکرد اصلی در تحقیقات ELISA، افزایش حساسیت و کاهش زمان واکنش است. برای مثال اگرچه صفحات میکروتیتر معمولترین فرمت برای ELISA می‌باشند ولی استفاده از میکروبیدهای مغناطیسی جایگزین ارزشمندی برای بهبود این روش می‌باشند. آنزیم‌های هرسردیش-پراکسیداز (HRP)، فسفاتاز قلیایی (ALP) و گلوکزاکسیداز (GOx). متداولترین آنزیم‌های مورداستفاده در این روش می-باشند. براساس خصوصیات محصول تشکیل‌شده در واکنش آنزیمی، سیستم آشکارسازی فتومتری، فلوریمتری، شیمی-لومینسانس (CL) و الکتروشیمیایی برای این نوع سنجش به کار می‌رود.

در آشکارسازی دیداری (فتومتری) آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن می‌تواند به میکروذرات رنگی وصل شود که به‌صورت بصری می‌تواند دیده شود. بسیاری از کیت‌های تشخیصی خانگی از این نوع نشان‌ها استفاده می‌کنند.

در آشکارسازی فلوریمتری سیگنال فلورسانس یا توسط نشان‌های فلورسانس یا سوبستراهای آنزیمی تولید می‌شود. در فلورسانس ابتدا مولکول با فوتونی با انرژی مناسب تهییج می‌شود. در برگشت مولکول به حالت پایه انرژی، فوتونی با طول‌موج بزرگتر نشر می‌شود. روش فلوریمتری بسیار حساس‌تر از روش شناسایی فتومتری است، ولی مواد موجود در نمونه‌های بیولوژیکی، ایجاد مزاحمت بیشتری می‌کنند. برای کم‌کردن ترکیبات مزاحم می‌توان از تکنیک‌هایی مثل رسوب‌کردن پروتئین‌ها و دیگر ترکیبات فلورسانس موجود و یا شستشو برای جداکردن عوامل مزاحم استفاده کرد. مرحله‌ی جداسازی آنتی‌ژن متصل از غیرمتصل نیز می‌تواند برای حذف ترکیبات فلورسانس مزاحم به کار رود. تکنیک‌های فلورسانس شامل موارد زیر است:

✓ فلوروایمنی‌سنجی تفکیک زمانی : در این روش از اختلاف زمان واپاشی بین پروب فلورسانس و مواد مزاحم استفاده می‌کند. اغلب مواد بیولوژیکی، فلورسانسی با طول عمر کمتر از ns ۰.۱ دارند. فلزات خاک‌های کمیاب مثل لانتانیدها (تربیوم و یوروپیوم) فلوروفوری با طول عمر زیاد در حدود ns۱۰۰۰-۱۰ هستند و می‌توانند به‌عنوان پروب فلورسانس استفاده شوند. با استفاده از فلوریمتر تفکیک زمانی، شخص می‌تواند فلوروفورهای با طول عمر زیاد را اندازه‌گیری کند و فلورسانس با طول عمر کم مورد اندازه‌گیری قرار نمی-گیرد.

✓ سنجش پلاریزاسیون فلورسانس (FPIA): هنگامیکه مولکول فلورسانس با نور پلاریزه‌شده تهییج شود، به‌شرطی‌که مولکول در طی حالت برانگیخته بی‌حرکت باشد، نور نشرشده در همان صفحه پلاریزه‌شده خواهد بود. اگر مولکول بچرخد و درطی حالت برانگیخته از این صفحه خارج شود، نور در صفحه متفاوتی از نور تهییجی نشر می‌شود. بنابراین مولکول‌های کوچک که درطی حالت برانگیخته سریعتر می‌چرخند، مقدار پلاریزاسیون کمتر و مولکول‌های بزرگ که درطی حالت برانگیخته چرخش کمتری دارند، مقدار پلاریزاسیون بیشتری دارند. آنتی‌ژن نشان‌دارشده متصل به آنتی‌بادی بسیار آهسته‌تر از آنتی ژن آزاد در محلول می‌چرخد. بنابراین زمانیکه نور پلاریزه‌شده، مولکول‌های کوچک با چرخش زیاد را تهییج می-کند، سیگنال فلورسانس بیشتر از مولکول‌های بزرگ کاهش می-یابد.

✓ ایمنی‌شناسی فلورسنت آنزیمی: در این روش سوبسترای غیرفلورسنت به محصول فلورسنت تبدیل می‌شود.

یك گروه مهم ایمنی‌شناسی نشاندار براساس اندازه‌گیری شیمی-لومینسانس است. این سنجش‌ها که اساساً با استفاده از میکروبیدهای مغناطیسی توسعه یافته‌اند به دو دسته تقسیم می‌شوند: سنجش‌هایی که حاوی آنزیم به‌عنوان برچسب است که آنزیم، یك سیستم CL را کاتالیز می‌کند و سنجش حاوی یك پیش‌ماده CL به‌عنوان برچسب. همچنین روش الکتروشیمی-لومینسانس که تبدیل انرژی الکتروشیمیایی به انرژی تابشی در سطح الکترود با اعمال پتانسیل است، نیز در روش‌های ایمنی-شناسی به‌کار می‌رود.

لیپوزوم‌ها به‌عنوان برچسب در روش‌های ایمنی‌شناسی به کار رفته‌اند؛ زیرا آنها به‌دلیل قابلیت‌حمل تعداد زیادی مولکول

فلورسانس، به‌عنوان سیستم‌های تقویتی عمل می‌کنند. بعد از اینکه واکنش ایمنی‌شیمیایی کامل می‌شود، با زوال لیپوزوم، تقویت پاسخ حاصل می‌شود.

اخیراً نانوذرات به‌عنوان برچسب به‌کاررفته‌اند. فلزات نجیب، نانوذرات پلی‌استایرن، سیلیکا، مغناطیسی، نقاط‌کوانتومی (QDs) و نانولوله‌های‌کربنی (CNTs) با شکل، سایز و ترکیبات مختلف، خواص کاتالیزوری، اپتیکی، الکترونیکی و ساختاری جدیدی را نشان می‌دهند که در نمونه توده‌ای یافت نمی‌شود. جدول ۱ نانوذرات و سیستم‌های آشکارسازی مورداستفاده در ایمنی‌شناسی را نشان می‌دهد.

**جدول ۱- سیستم‌های آشکارسازی مختلف در ایمنی‌شناسی به‌وسیله نانوذرات [۴].**

| Nanoparticles | Detection systems |
|---|---|
| Noble metals (Au, Ag, Pt) | Photometry, fluorimetry, Rayleigh and Raman scattering, surface plasmon resonance, potentiometry, amperometry, conductimetry, stripping voltammetry, quartz crystal microbalance |
| QDs | Photometry, fluorimetry, FRET[a], stripping voltammetry |
| Silica or polystyrene | |
| Dye-doped | Fluorimetry, phosphorimetry |
| Lanthanide chelate-doped | Fluorimetry, FRET |
| Ruthenium chelate-doped | Electrogenerated chemiluminescence |
| Carbon nanotubes | Electrochemical |
| Dendrimers | Fluorimetry |

## ۴. نتیجه‌گیری

ایمنی‌سنجی به مجموعه تست‌هایی گفته می‌شود که از کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی به‌منظور تشخیص حضور آنالیت خاص در نمونه استفاده می‌کنند. آنتی‌ژن‌ها مولکول‌های خارجی هستند که به حیوان تزریق شده و باعث تحریک پاسخ ایمنی در بدن حیوان می‌شوند و آنتی‌بادی‌ها را که پروتئین‌هایی هستند که به آنتی‌ژن متصل می‌شوند را در بدن حیوان توسط سیستم ایمنی تولید می‌کنند. به‌طور معمول آنتی‌بادی‌ها به سه نوع پلی‌کلونال، مونوکلونال و نوترکیب تقسیم می‌شوند. آنتی-بادی پلی‌کلونال چندین مکان روی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی مونوکلونال یک مکان روی آنتی‌ژن را شناسایی می‌کند. امروزه ایمنی‌سنجی نقش مهمی را در اندازه گیری بسیاری از آنالیت‌ها مثل پروتئین، هورمون و نوکلئیک‌اسیدها بازی می‌کند و به دو نوع کلی رقابتی و غیررقابتی تقسیم می‌شود.

پژوهشگران در تلاشند که سیستم‌هایی با حساسیت بیشتر برای آنالیت‌های جدید مثل آنالیت بیماری‌های سرطانی و همچنین تشخیص همزمان چند آنالیت طراحی کنند که استفاده از نانوذرات نقش مهمی را در توسعه این سیستم‌ها ایفا می‌کند.

## ۵. منابع


1. "The human genome project," http://www.ornl.gov/sci/techresources ./

2. T. Kurkina and K. Balasubramanian, "Towards in vitro molecular diagnostics using nanostructures," Cell. Mol. Life Sci., vol. 69, p. 373–388, 2012 .

3. D. A. Giljohann and C. A. Mirkin, "Drivers of biodiagnostic," Nature, vol. 462, p. 461–464, 2009 .

4. A. Gomez-Hens and M. P. Aguilar-Caballos, "Trends in Immunoassay Techniques," Encyclopedia of Analytical Chemistry, 2010 .

5. C. A. Heid, J. Stevens,, . K. J. Livak and P. . M. Williams , "Real time quantitative PCR," Genome Res., vol. 6, p. 986–994, 1996 .

6. E. Engvall and P. Perlmann, " Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay," Immunochemistry, vol. 8, p. 871–874, 1971 .

7. T. Sano, C. L. Smith and C. R. Cantor, " Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody–DNA conjugates," Science, vol. 258, p. 120–122, 1992 .

8. S. D. Jayasena, " Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in," Clin. Chem., vol. 45, p. 1628–1650, 1999 .

9. K. Yau, H. Lee and . J. Hall, "Emerging Trends in the Synthesis and Improvement of Hapten-specific Recombinant Antibodies," Biotechnol. Adv., vol. 21, p. 599–637, 2003 .

10. E. Stoger, M. Sack, L. Nicholson, R. Fischer and P. Christou, "Recent Progress in Plantibody Technology," Curr. Pharm. Des., vol. 11, p. 2439–2457, 2005 .

11. J. Durner, "Clinical Chemistry: Challenges for Analytical Chemistry and the Nanosciences from Medicine," Angew. Chem. Int. Ed., vol. 49, p. 1026–1051, 2010 .

12. D. S. Smith and S. A. Eremin, "Fluorescence Polarization Immunoassays and Related Methods for Simple, High- throughput Screening of Small Molecules," Anal. Bioanal. Chem., vol. 391, p. 1499–1507, 2008 .

13. M. A. Gonzalez-Martıınez, R. Puchades and A. Maquieira, "On-line Immunoanalysis for Environmental Pollutants: From Batch Assays to Automated Sensors," Trends Anal. Chem., vol. 18, p. 204–218, 1999 .

14. L. Wang, W. Zhao, B. O'Donoghue and W. Tan, "Fluorescent Nanoparticles for Multiplexed Bacteria Monitoring," Bioconjugate Chem., vol. 18, p. 297–301, 2007 .

15. X. Yu, B. Munge, V. Patel, G. Jensen, A. Bhirde, J. D. Gong, S. N. Kim, J. Gillespie, J. S. Gutkind, F. Papadimtrakopoulos and J. F. Rusling, "Carbon nanotube amplification strategies for highly sensitive immunodetection of cancer biomarkers," J. Am. Chem. Soc., vol. 128, p. 11199–11205, 2006 .

16. N. C. Tansil and Z. Gao, “ Nanoparticles in biomolecular detection,” Nano Today, vol. 1, p. 28–37, 2006 .
17. T. A. Taton, C. A. Mirkin and R. A. Letsinger, “Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes,” Science, vol. 289, p. 1756–1760, 2000 .
18. J. M. Nam, S. I. Stoeva and C. A. Mirkin, “ Bio-bar-code-based DNA detection with PCR-like sensitivity,” J. Am. Chem. Soc., vol. 126, p. 5932–5933, 2004 .
19. J. M. Nam, C. S. Thaxton and C. A. Mirkin, “Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins,” Science, vol. 301, p. 1884–1886, 2003 .
20. S. R. Nicewarner-Pena, R. G. Freeman, B. D. Reiss, L. He, D. J. Pena, I. D. Walton, R. Cromer, C. D. Keating and M. J. Natan, “Submicrometer metallic barcodes,” Science, vol. 294, p. 137–141, 2001 .
21. M. Han, X. Gao, J. Z. Su and S. Nie, “Quantum dot-tagged microbeads for tiplexed optical coding of biomolecules,” Nat. Biotechnol., vol. 19, p. 631–635, 2001.