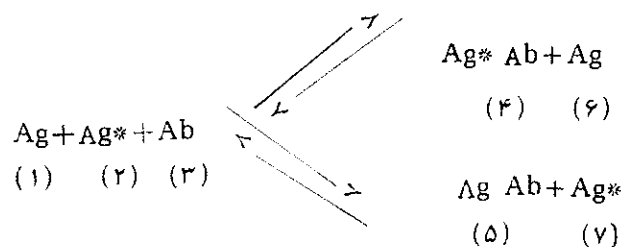


اندازه گیری شیمیائی بوسیله رادیوایمونولوژی

دکتر اکبر ملک پور *

بین Ag^* و Ag یک رقابت فیزیکی و شیمیائی برای متصل شدن به محل آنتیو آنتی بادی بوجود آمده که این رقابت تا رسیدن واکنش بحالت تعادل شیمیائی ادامه دارد. سپس کمپلکس های $AgAb$ و Ag^*Ab را از Ag^* آزاد جدانموده و مقدار رادیو آنتیویتی Ag^*Ab آزاد و یا Ag^*Ab را اندازه میگیرند. فرمول زیرین و شکل زیر خلاصه این اعمال را نشان می دهد.



۱ - Ag - هورمون، ویتامین، داروی مخدر، محلولهای

استاندارد و غیره

۲ - Ag^* - هورمون، ویتامین، داروی مخدر،

محلولهای استاندارد و غیره رادیو آکتیو دار (نشاندار)

۳ - Ab - آنتی بادی Ag و Ag^*

۴ - Ag^*Ab - کمپلکس آنتی بادی و آنتی ژن نشاندار

۵ - $AgAb$ - کمپلکس آنتی بادی و آنتی ژن

۶ - Ag - آنتی ژن آزاد

۷ - Ag^* - آنتی ژن نشاندار آزاد.

Radioimmunoassay (RIA) جدیدترین و ضمناً

دقیقترین تکنیکی است که در آزمایشگاههای بیوشیمی برای اندازه گیری موادی که تعداد آنها در حدود 10^{-9} (nogram) و 10^{-12} (picogram) گرم در مایعات بدن می باشد بکار میرود. مزایای این تکنیک در اینست که خصوصیات روشهای ایمنولوژی و حساسیت متدهای Radiochemistry را یکجا دارا می باشد.

تکنیک RIA، برای اولین بار در سال ۱۹۶۰ توسط Berson و Yallow برای اندازه گیری انسولین پلازما مورد استفاده قرار گرفت [۲۰]. در ظرف ۱۳ سال گذشته این تکنیک چنان پیشرفتی نصیب شده که امروز در بیشتر آزمایشگاههای تحقیقی و بیمارستانهای امریکا برای اندازه گیری موادی نظیر ACTH که تعداد معمولی آن در حدود ۲۰ پیکوگرام در یک cc می باشد از آن استفاده می کنند.

اساس این متد یک واکنش بین آنتی ژن (Ag) و آنتی بادی (Ab) است. این آنتی ژن ممکن است هورمون، ویتامین، داروی مخدر و یا جسم دیگری باشد (جدول ۱). مثلاً برای تعیین مقدار هورمون انسولین (Ag) آنرا با مقدار معینی از انسولین نشاندار (Ag^*) مخلوط می کنند. سپس آنتی بادی مخصوصی که با این آنتی ژن میل ترکیبی داشته و می تواند با آن باند شود اضافه می نمایند. محلول را بمدت معین و در حرارت ثابتی کمون (Incubate) نموده تا واکنش بحالت تعادل شیمیائی برسد.

RIA را Radiostereoassay, Competitive Radioassay و Immune Radiometric Analysis

نیز می خوانند.

* از دانشگاه میشیگان آمریکا

جدول ۱ - نام هورمون‌ها و ویتامین‌ها و سایر موادی که می‌توان با تکنیک RIA مقدار آنها را در سرم پلاسما و عصاره بافتها اندازه‌گیری نمود

شماره	آنتی ژن	ایزوتوپ	نمونه (۱)	روش جدا کردن (۲)	شماره	آنتی ژن	ایزوتوپ	نمونه (۱)	روش جدا کردن (۲)
A	هورمون				B	داروهای مخدر و غیره			
۱	ACTH	I ^{۱۲۵}	P,S	DCC, DA	۲۶	مرفین	H ^۳	P,S,U	سولفات آمونیوم
۲	آلدوسترون	H ^۳	P,U	سولفات آمونیوم	۲۷	LSD	I ^{۱۲۵}	P,S,U	DA
۳	آندوسترون	H ^۳	P,S	زلاتین	۲۸	اوبالین	H ^۳	P,S	DCC
۴	رنین (Renin)	I ^{۱۲۵}	P,S	DCC	۲۹	Digoxin	H ^۳ I ^{۱۲۵}	P,S	DCC
۵	Angiotensin I	I ^{۱۲۵}	P	زغال	۳۰	Digitoxin	H ^۳ I ^{۱۲۵}	P,S	DCC
۶	Angiotensin II	I ^{۱۲۵}	P	DCC	C	ویتامین‌ها و غیره			
۷	کورتیزول	I ^{۱۲۵}	P,S	DCC	۳۱	B _{۱۲}			
۸	کورتیزون	I ^{۱۲۵}	P,S	DCC	۳۲	AMP حلقوی	I ^{۱۲۵}	P,S,U	DA
۹	Deoxycorticosterone	I ^{۱۲۵}	P,U,S	DA	۳۳	HAA	I ^{۱۲۵}	S	SP_Ab (tube)
۱۰	استریول	H ^۳	P,S	سولفات آمونیوم	۳۴	HCG	I ^{۱۲۵}	S,U	DA
۱۱	استرادیول	H ^۳	P,S	سولفات آمونیوم	۳۵	IgE	I ^{۱۲۵}	S	PS-Ag
۱۲	استرون	H ^۳	P,S	سولفات آمونیوم	۳۶	ایمینو گلوبولین (IgG, IgA, IgM)	I ^{۱۲۵}	S	Sp-Ag
۱۳	گاسترین	I ^{۱۲۵}	P,S	DCC		IgD, IgE			
۱۴	HCG	I ^{۱۲۵}	S,U	DA		Bence-Jonse)			
۱۵	HFSH	I ^{۱۲۵}	P,S,U	DA	۳۷	پروستا گلاندین			
۱۶	HGH	I ^{۱۲۵}	P,S,U	DA		E	H ^۳	S,E	DCC
۱۷	HLH	I ^{۱۲۵}	P,S,U	DA		E _{۱α}	H ^۳	S,E	DCC
۱۸	HPL	I ^{۱۲۵}	P,S	DA		E _{۲α}	H ^۳	S,E	DCC
۱۹	HTSH	I ^{۱۲۵}	P,S	DA, DCC	۳۸	فو لیک اسید			
۲۰	انسولین	I ^{۱۲۵}	P,S,U	DA, DCC	۳۹	α-Fitopro Tein			
۲۱	پروژسترون	H ^۳	P,S	DCC	۴۰	ماری وانا			
۲۲	تستوسترون	H ^۳	P,S	DCC	۴۱	آدرنالین			
۲۳	T ₄	I ^{۱۲۵}	P,S,U	DA	۴۲	RNA			
۲۴	T ₃	I ^{۱۲۵}	P,S,U	DA	۴۳	Vit D _۳			
۲۵	TF تیروکسین آزاد	I ^{۱۲۵}	P,S	DA	۴۴	پاراتیروئید هورمون و باربیتول ها کلسترول، و غیره موادی هستند که بطریقه RIA آنها را اندازه‌گیری می‌نمایند			

۱ - p پلاسما، S - سرم، U ادرار، E - عصاره بافتها

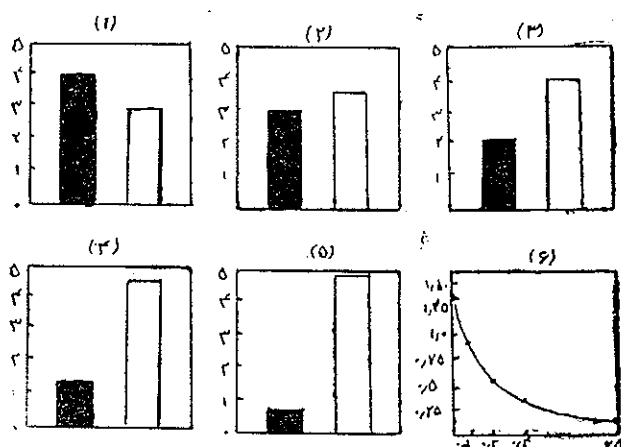
۲ - DCC - Dextran-Coated - Charcoal - DA - Solid-phase Antigen-SP-Ag Double-Antibody

Solid-phase Antibody-SP-Ag

شکل ۱ - اساس اندازه گیری انسولین بامتداد RIA

شکل ۲ - طرز محاسبه نسبت $\frac{B}{F}$ و ترسیم منحنی استاندارد

۱: ۱۰۰۰۰ رقت آنتی بادی
 ۰/۱ ng غلظت Ag*
 ۰ - ۰/۸ ng/ml (Ag) غلظت محلولهای استاندارد (Ag)
 غلظت هورمون * ng/ml



$$Ag = 0 \text{ ng/ml}$$

(۱)

$$\frac{B}{F} = \frac{4}{3} = 1.33$$

$$Ag = 0.1 \text{ ng/ml}$$

(۲)

$$\frac{B}{F} = \frac{3}{3.5} = 0.86$$

$$Ag = 0.2 \text{ ng/ml}$$

(۳)

$$\frac{B}{F} = \frac{2}{4} = 0.5$$

$$Ag = 0.4 \text{ ng/ml}$$

(۴)

$$\frac{B}{F} = \frac{1.5}{4.5} = 0.33$$

$$Ag = 0.8 \text{ ng/ml}$$

(۵)

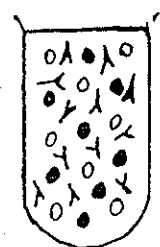
$$\frac{B}{F} = \frac{0.5}{4.5} = 0.11$$

(۶) نمودار نسبت $\frac{B}{F}$ در غلظتهای

مختلف هورمون (Ag)

● آنتی ژن بانده شده (B)

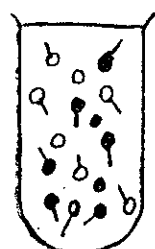
□ آنتی ژن آزاد (F)



۱ - سرم و یا محلول

استاندارد یا انسولین نشاندار

و آنتی بادی مخلوط میگردند

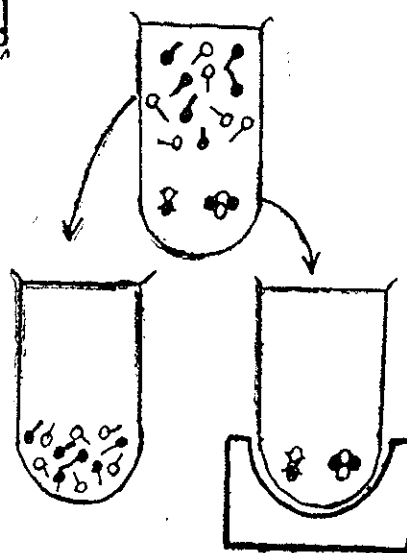


۲ - مدت ۴ روز در

۴ درجه سانتیگراد نگهداری

می شود تا واکنش به حالت تعادل

شیمیائی برسد.



۳ - ماده رسوب کننده

را به محلول اضافه نموده تا

Ag و Ag آزاد نه نشین نمایند

۴ - پس از سانتریفوژ

کردن، دو قسمت را جدا نموده

شمارش می کنند، سپس نسبت

 $\frac{B}{F}$ را محاسبه می نمایند.

O سرم برای اندازه گیری انسولین و یا محلول استاندارد

انسولین

● انسولین نشاندار (Insulin - I¹²⁵)

A - آنتی بادی انسولین

X - ماده رسوب دهنده (Dextran-Coated Charcol)

 $\frac{B}{F}$ نسبت بین انسولین نشاندار یا ند شده با انسولین نشاندار

آزاد

Nonogram = ng/ml در يك سانتیمتر مکعب .

$$\frac{B}{F} = \frac{[Ag Ab]}{[Ag]} \quad (2)$$

بنابراین K_{eq} برای $Ag \cdot Ag^*$ (هورمون، ویتامین، داروی مخدر، محلولهای استاندارد و غیره) مساوی هستند ولی مدت کمون (Incubation) ممکن است تغییراتی در این اعداد بوجود آورده و Ab تبعیض بین Ag و Ag^* بگذارد [۶] در مورد RIA مقدار $[Ag]$ و $[Ab]$ را در حالت تعادل شیمیایی می توان با فرمولهای زیرین محاسبه نمود.

$$[Ag] = [Ag \text{ اولیه} - Ag Ab] \quad (3)$$

$$[Ab] = [Ab \text{ اولیه} - Ag Ab] \quad (4)$$

با قرار دادن مقادیر $[Ag]$ و $[Ab]$ در معادله (۲) معادله زیرین حاصل می شود.

$$\frac{B}{F} = \frac{[Ag Ab]}{[Ag]} = \frac{[Ag Ab]}{[Ag \text{ اولیه} - Ag Ab]}$$

با تغییرات مختصری معادله بالا بصورت زیر مرتب میگردد.

$$\frac{B}{F} [Ag \text{ اولیه} - Ag Ab] = [Ag Ab]$$

$$\frac{B}{F} [Ag \text{ اولیه}] - \frac{B}{F} [Ag Ab] - [Ag Ab] = 0$$

$$[Ag Ab] \left(\frac{B}{F} + 1 \right) = \frac{B}{F} [Ag \text{ اولیه}]$$

$$[Ag Ab] = \frac{\frac{B}{F}}{\frac{B}{F} + 1} [Ag \text{ اولیه}] \quad (5)$$

حال اگر فرمولهای (۱)، (۲)، (۳)، (۴) و ۵ باهم

در نظر گرفته شوند فرمول زیرین نتیجه می دهد:

$$K \left([Ag \text{ اولیه}] - \frac{\frac{B}{F}}{\frac{B}{F} + 1} [Ag \text{ اولیه}] \right) \left([Ab \text{ اولیه}] - \frac{\frac{B}{F}}{\frac{B}{F} + 1} [Ag \text{ اولیه}] \right) = \frac{B}{F} / \frac{B}{F} + 1 [Ag \text{ اولیه}]$$

پس از حل این معادله جبری، معادله کلی زیر بدست می آید.

$$\left(\frac{B}{F} \right)^2 + \frac{B}{F} [1 + K_{Ag} - K_{Ab}] - K_{Ab} = 0$$

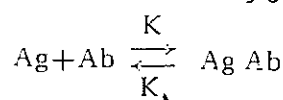
برای تعیین مقدار آنسولین (Ag) از منحنی استاندارد کمک میگیرند. جهت رسم این منحنی محلولهای استاندارد را که دارای غلظتهای مناسب می باشند آزمایش می نمایند. (۲) شکل. برای تبدیل منحنی استاندارد بخط مستقیم از فرمول Midgley و همکارانش می شود استفاده نمود

$$\log ity = (a+b) \log ex$$

که در آن y جوابهای متغیر در مقابل x (غلظتهای مختلف محلول استاندارد - dose) میباشد. b نماینده ضریب زاویه و a محل تقاطع خط با محور y می باشد. امروزه با وجود کمپیوتر که بدستگاههای γ - Counter و β - Counter وصل میباشد، میتوان نتیجه را مستقیماً از ماشین دریافت داشت [۴]

روش RIA:

هنوز رمز اصلی واکنشی که بین Ab و Ag صورت میگیرد دقیقاً روشن نشده است. ولی محقق است که این واکنش سرانجام بحالت تعادل شیمیایی میرسد [۵] واکنش بین Ab و Ag را می توان به صورت زیر نوشت:



K عدد ثابت واکنش رفت و K_1 عدد ثابت واکنش برگشت

می باشد.

در حالت تعادل شیمیایی بر حسب قانون The Law of Mass Action مقدار K_{eq} (عدد ثابت تعادل واکنش) بقرار زیر است.

$$K_{eq} = \frac{K}{K_1} = \frac{[Ag Ab]}{[Ag][Ab]} \quad (1)$$

در این موقع نسبت آنتی ژن غیر آزاد (B) (آنتی ژن باند شده با آنتی بادی) به آنتی ژن آزاد (F) چنین است.

جهت معلوم نمودن میزان دقت، ضریب دقت (λ) را که آنرا Precision Coefficient یا Index of Precision نیز مینامند، محاسبه می نمایند. ضریب دقت بستگی بدو عامل دارد:

الف: انحراف معیار (Standard Deviation) مقادیر Logit y.

ب: ضریب زاویه خطی که بین معدل مقادیر مختلف Logit y و عدم متناسب آن از Log x کشیده می شود [۷].

دقت مستقل از Keq بوده ولی با تغییرات $\frac{B}{F}$ بستگی دارد (۸).

۲- حساسیت (Sensitivity) حساسیت در RIA بستگی به کمترین مقدار Ag سرم دارد که بتوان آنرا اندازه گیری نمود. عبارت دیگر تکنیک مورد آزمایش قادر باشد بین سرمی که Ag آن برابر صفر است با سرم دیگری که کمترین مقدار ممکن Ag را دارد تفاوت گذاشته و آنرا اندازه گیری نماید [۹]. در RIA حساسیت سنجش در حدود $10^{-12} \times 1$ (Picogram) گرم Ag می باشد. حساسیت مستقیماً به دقت (Titer) و K آنتی بادی مربوط است. بنابراین هر آنتی بادی که با انرژی بیشتر و در دقت مناسبتری بتواند با Ag باند شود حساسیت بیشتری به تست خواهد داد [۱۰].

۳- خصوصیت (Specificity): اختصاصی بودن Ab برای Ag تحت تاثیر دو عامل مهم می باشد یکی Heterogeneity و دیگری Cross-Reaction.

تاکنون آنتی ژنی که بتواند فقط یک آنتی بادی خاص بوجود آورد (Homologous آنتی بادی) گزارش نشده است. معمولاً در بدن چندین Ab وجود می آورد که آنرا آنتی بادهای Heterogenous می نامند. بنابراین Ag با یک آنتی بادی چند تایی (Multiple Antibodies) بر حسب میل ترکیبی و عوامل دیگر موجود بین آنها بایکدیگر باند خواهند شد. رسیدن این واکنش به حد تعادل شیمیائی نیز بستگی بمقدار Keq دارد.

نوع دیگر Heterogeneity نیز وجود دارد و آن عبارت از باند شدن Ag در محلهای مختلف Ab و به نسبتهای متفاوت است. تکنیکهای جدا و خاص کردن آنتی بادهای کمکی زیادی برای دست یافتن به یک آنتی بادی خالص و از بین بردن مشکلات ناشی از Heterogeneity می نماید. پی بردن بوجود آنتی بادهای چند تایی، باعث پیدایش انواع هورمونهای چند تایی نظیر انسولین

این معادله یک معادله درجه دوم یک مجهولی بوده و منحنی آن بشکل (۳) خواهد بود. با توجه به منحنی فوق معلوم می شود

که هر چه غلظت Ag بیشتر شود مقدار $\frac{B}{F} = \frac{Ag* - Ab}{Ag*}$

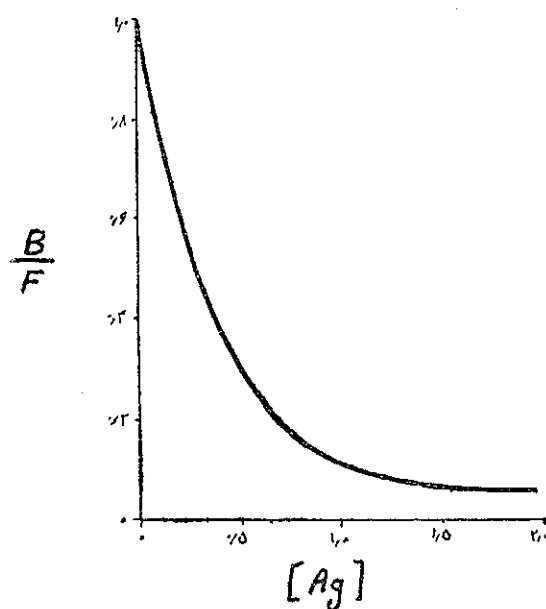
کمتر خواهد شد. بنابراین تغییرات $\frac{B}{F}$ در حالیکه غلظت Ag

نسبت به Ab خیلی کم باشد بسیار زیاد می شود: در حالتیکه غلظت

Ag صفر باشد نسبت $\frac{B}{F} = Keq[Ab]$ عبارتست از [اولیه]

لذا Keq که بستگی به Ab دارد در تمامی در حساسیت تستهای

RIA خواهد داشت.



شکل ۳- منحنی نسبت بین غلظت Ag و $\frac{B}{F}$

ارزیابی متد RIA:

برای ارزیابی متد RIA و تعیین اعتبار این تکنیک فاکتورهای زیرین مورد مطالعه قرار می گیرند:

۱- دقت (Precision): در متد RIA دقت به میزان دوری و نزدیکی مقادیر بدست آمده از یک سری آزمایشات (که از یک نمونه بعمل آمده) بمقدار معدل حاصله از همان سری بستگی دارد. باین معنی که اگر نتایج حاصله بمعدل مقادیر سری خود نزدیک باشد دقت آزمایش خوب و الا نتیجه قابل قبول نخواهد بود. [۳]

معمولا این مواد از طریق شکم تزریق میشوند تا دیرتر توسط آنزیمها تجزیه شده و خاصیت خود را از دست دهند .

آنتی ژنهای دسته دوم که آنها را (Hapten) نیز مینامند دارای وزن مولکولی کمتر بوده و همراه (Conjugate) با پلی پپتیدها و یا پروتئینها میباشند. این آنتی ژنها را با ماده دیگری که Freund's Complete Adjuvant مینامند مخلوط نموده و سپس تزریق مینمایند . متصل کردن این مواد با پروتئینها و مخلوط نمودن آنها با ماده فوق ، خاصیت آنتی ژنی بیشتری به آنها میدهد .

بطور کلی تهیه آنتی ژن خالص و اختصاصی که بتواند با آسانی ماده رادیو آکتیو را قبول نموده و خاصیت Immunoreactivity خود را از دست ندهد بسیار مهم است [۷]. بعضی از مواد مثل استروئیدها با آسانی و بخوبی با H^3 و C^{14} نشاندار (Tagged) میشوند. هورمونهای دیگر که از زمره پلی پپتیدها هستند آسانتر I^{125} و یا I^{125} را قبول می نمایند . [۱۷]

رویه مر فته ید رادیو آکتیو را بیشتر برای نشان دار کردن آنتی ژنها بکار میبرند. بین I^{125} و I^{125} ، دومی را ترجیح میدهند بدلیل اینکه I^{125} نیمه عمرش کوتاه ، نگهداریش مشکل و استقامت (Stability) آن کم است . جدول (۲)

استفاده از ید رادیو آکتیو را اندازه گیری هورمونهای پلی پپتید از این نظر شیوع پیدا کرده است که ید میل ترکیبی زیادی با اسید آمین دار تیروزین دارد. از آنجا که پلی پپتیدها دارای تیروزین هستند لذا نشاندار کردن آنها باید رادیو آکتیو آسانتر و استقامت آنها بیشتر است . فاکتورهای دیگری که در انتخاب عناصر رادیو آکتیو مؤثرند برآورد میگردند [۱۸] :

الف: قابلیت شمارش کردن (Counting Capability) .
 I^{125} اشعه گاما منتشر می کند و چون اشعه γ قدرت نفوذش در اجسام زیاد است لذا برای شمارش کردن Scintillation آن از ظروف ضخیمی استفاده می نمایند . ولی H^3 که اشعه β منتشر می کند ، (عبور این اشعه حتی بوسیله یک ورق کاغذ جلوگیری میشود) برای شمارش کردن آن احتیاج به Liquid Scintillation دارد .
 شکل (۴) امروزه بیشتر از عناصری که اشعه γ منتشر میسازند استفاده می شود .

ب : هزینه . برای اندازه گیری اشعه β احتیاج به کوکتل (Cocktail) می باشد بنابراین هزینه آزمایشاتی که با H^3 و نظایر آن انجام میشود ، بالنسبه گرانتر از I^{125} است .

[۱۱] و پارا تیروئید [۱۲] و گاسترین [۱۳] شده است . ممکن است بین دو نوع مختلف آنتی ژن ولی از یک جنس و خانواده ، واکنش متقابل (Cross reaction) اتفاق افتد . مثلا بین گلیکوپروتئینهای FSH و LH و TSH این واکنش متقابل ، بطور ناقص و یا کامل بوجود می آید . واکنش متقابل بین هورمونهای چند تائی ، مواد سازنده آنها Precursors و مشتقات آنها دیده می شود .

برای بدست آوردن یک نتیجه ایده آل از RIA باید آنتی-ژنها، یکمورد استفاده قرار می گیرند از یک نوع باشند . عبارت دیگر $Ag \text{ و } Ag^*$ استاندارد باید مثل هم باشند [۱۴] .

در اینجا ذکر این نکته ضروری است که واکنش متقابل بین داروهای مختلف و هورمونها نیز وجود دارد . بعنوان مثال میتوان از واکنش بین تیروکسین و Diazepam نامبرد [۱۵] .

۴- درستی (Accuracy) : هر قدر که جواب یک آزمایش بمقدار واقعی آن نزدیکتر باشد ، آن تست درست تر است . عبارت دیگر هر تیری که نزدیکتر به هدف اصابت کند ، مهارت تیر انداز را نشان می دهد .

در تکنیک RIA درستی آزمایشات را با نتایج بدست آمده از طریق Bioassay مقایسه میکنند . Bioassay بعنوان تست شاهد (Reference Method) بکار میرود ولی باید در نظر داشت که همیشه نمیتوان متد Bioassay را بعنوان شاهد بکاربرد ، زیرا شرایطی که بتوان تکنیک RIA را برای تستهای مختلف عینا شبیه Bioassay فراهم نمود عملا امکان ندارد . راه دیگری که درستی متد RIA را تحقیق می کنند افزودن مقدار معین از Ag بسرم بلانک و مقایسه نتیجه بدست آمده با مقدار واقعی Ag میباشد . با این متد سریعتر و آسانتر میتوان درستی یک آزمایش را محک زد [۱۶] .

اساس روش RIA

۱- (آنتی ژن Ag): هر ماده ای که پس از ورود بخون حیوان ایجاد آنتی بادی نماید . آنرا آنتی ژن مینامند. آنتی ژنها بدو دسته تقسیم میشوند کامل (Complete) و یا ناقص (Uncomplete) . دسته اول از پروتئینها ، پلی ساکاریدها و یا لیپوپروتئینها بوده که وزن مولکولی شان از ۱۰۰/۰۰۰ بیشتر میباشد. این گروه باید جسم خارجی (Foreign body) نسبت به میزبان بوده و ضمناً محلتهائی برای اتصال با مواد دیگر در مولکول خود داشته باشند .

جدول ۲ - نیمه عمر و اشعه منتشره از

ایزوتوپهای مختلف

ایزوتوپ	نیمه عمر	اشعه منتشره
^{131}I	۸ روز	γ (۰.۸۱۳)
P^{32}	۱۴ روز	β
C^{51}	۲۸ روز	γ
Fe^{59}	۴۵ روز	γ
I^{125}	۵۷ روز	γ
Co^{57}	۲۷۰ روز	γ
H^3	۱۲ سال	β
C^{14}	۵۶۰۰ سال	β

عامل دیگری که در بالا بردن ارزش تکنیک RIA اثر مهمی دارد تهیه یک آنتی بادی خالص و مؤثر است. آنتی بادیها گروهی از پروتئین های سرم هستند که آنها را ایمنو گلوبولین نیز می خوانند. بیشتر ایمنو گلوبولین ها از کلاس IgG هستند. سایر دسته های ایمنو گلوبولین (Immunoglobulin) را IgA, IgM, IgD, IgE نام نهاده اند. این گلوبولین ها نه تنها دارای Antibody Reaction Sites هستند بلکه دارای Antigenic determinant Sites بوده و می توانند رل آنتی ژن را هم بازی نمایند. وقتی که این مواد به حیوانی تزریق شوند

Antigenic - binding Site روی زنجیرهای سنگین (H) و سبک (L) ایمنو گلوبولین IgG اقامت می گیرند (۱۰).

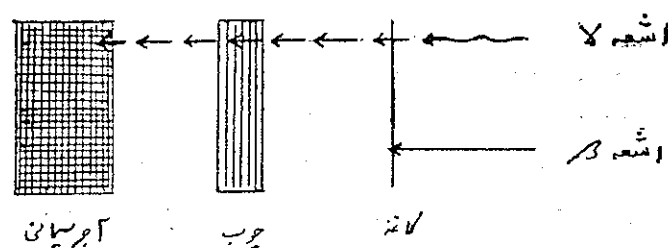
جهت تهیه آنتی بادی، آنتی ژن خالص را با Freund's Adjuvant (مخلوطی از روغن معدنی، واکس ها و باسیلهای کشته شده است که قدرت آنتی ژنی آنتی ژن را افزایش می دهد) [۱۹ و ۲۰] مخلوط نموده، به یک یا چند حیوان تزریق می نمایند. تعداد و نوع حیوان، (موش، خوکچه هندی، گوسفند بز و میمون) بستگی بمقدار آنتی بادی مورد نیاز دارد. این عمل را چندین بار تکرار نموده و هر بار مقدار آنتی ژن تزریقی را کم می کنند. پس از بوجود آمدن آنتی بادی، از قلب و یا شریان گوش حیوان خون می گیرند. سرم را بعد از لخته شدن خون، جدا نموده و آنتی بادی حاصله را از نظر تیتر (Titer)، اختصاصی بودن و میزان میل ترکیبی آن با آنتی ژن آزمایش می نمایند.

معمولاً تیتر آنتی بادی را طوری تنظیم مینمایند که مقدار $\frac{B}{F}$ مساوی واحد گردد، باین معنی که فقط مقدار ۵۰ درصد آنتی ژن نشاندار (Ag^*) بتواند با آنتی بادی باند شود (شکل ۳) [۲۱]. همانطوریکه قبلاً گفته شد اینگونه آنتی بادیها هتروژن (Heterogenous) بوده و باید با کمک تکنیکهای مناسب، آنتی - بادی خالصتری بدست آورد که میل ترکیبی آن با آنتی ژن زیاد باشد.

۳ - جدا کردن آنتی ژنهای آزاد از آنتی ژنهای

باند شده :

جدا کردن آنتی ژنهای آزاد (Ag^* و Ag) از کمپلکسهای Ag^*Ab و AgAb عمل مهم دیگری در تکنیک RIA می باشد.



شکل ۴ قدرت نفوذ کنندگی اشعه γ و β

ج - استقامت، نیمه عمر و میزان خطر کار کردن با انواع مختلف رادیو آکتیو عوامل دیگری هستند که در انتخاب آنتی ژنها برای نشاندار کردن دخال دارند. بعد از نشاندار کردن آنتی ژن، برای جدا نمودن و خالص کردن آن تکنیکهای مختلفی بکار میبرند. از جمله روش Adsorption Column Chromatography است که از پودر سلولز استفاده می نمایند. پس از عبور محلول از ستون کرو- ماتوگرافی، نمکهای معدنی و (Ag) آزاد در ستون باقیمانده ولی آنتی ژن نشاندار (Ag^*) از ستون خارج میشود که میتوان آنرا بدست آورد. برای خلوص بیشتر وسایل حساستری نظیر Starch-gel و polyacrylamid gel الکتروفورز بکار میبرند. سرانجام باید درجه خلوص و میزان رادیو آکتیویته آنتی ژن نشاندار شده را اندازه گیری نموده و ثبت نمود.

روشهاییکه برای این منظور بکار میروند بستگی بنوع آنتی ژن و آنتی بادی مورد مصرف داشته و عبارتند از [۲۲] (جدول ۱):

الف: رسوب دادن کمپلکسهای $Ag \cdot Ab$ و $Ag \cdot Ab$:
برای رسوب دادن این کمپلکسها معمولا محلول ۵۰ درصد سولفات آمونیوم بکار میبرند. با این روش کمپلکسها رسوب نموده و Ag و $Ag \cdot Ab$ آزاد در محلول باقی میماند. در اندازه گیری استروئیدها، پروستاگلاندین ها و AMP حلقوی از این محلول استفاده میکنند [۲۳]
ب - Double antibody Technic: کمپلکسهای فوق را بکمک آنتی بادی مخصوص دیگری که فقط با آنها باندمی شود رسوب می دهند. از این متد در اندازه گیری هورمونهای پلی پپتید استفاده می شود [۲۴].

ج - Solid-Phase Adsorption of Free Ag
موادی نظیر Dextran Albumin Coated with Charcol, Sephadex, QUSO, Florisil, تاك, میتوانند Ag آزاد را بخود جذب نموده و آنرا از محلول جدا سازند. برای اندازه گیری استروئیدها بیشتر زغال و Florisil بکار میبرند [۲۵].

د - Solid Phase Antibodies: یکی از روشهای جدید جدا کردن کمپلکسها از آنتی ژنهای آزاد اینست که کمپلکسها بوسیله مواد دیگری که غیر محلول هستند جذب شوند. با سائتریفوژ کردن و ته نشین دادن مواد غیر محلول، کمپلکسها از آنتی-ژنها جدا می شوند [۲۶].

ه - کرومواالکتروفوراز (Chromoelectrophoresis):
با استفاده از روشهای کروماتوگرافی والکتروفوراز نیز می توان کمپلکسها را از Ag جدا نمود [۲۷].

۴ - حرارت و زمان کمون (Incubation): حرارت و زمانی که لازم است تا واکنش بحالت تعادل شیمیایی خود برسد عوامل مهمی در تکنیک AIR می باشد. زمان لازم برای رسیدن به این تعادل بستگی بطرز تهیه های مختلف داشته و ممکن است بین نیم ساعت تا چند روز باشد. همچنین درجه حرارت لازم برای این واکنشها متفاوت بوده و بنوع تست مربوط است. معمولا بیشتر آزمایشات در درجه حرارت چهار درجه سانتی گراد انجام میشود. آزمایشات دیگری هستند که در حرارت معمولی آزمایشگاه بحالت تعادل شیمیایی میرسند [۲۲].

اصطلاحات (Terminology) = جهت آشنائی با سایر تکنیکهایی که: شبیه RIA بوده ولی با نامهای دیگری خوانده می شوند و تکنیکهای دیگری که با RIA تفاوت کلی دارند، لازم

است توضیحاتی داده شود. لذا این مختصر بمقاله افزوده شده است.

۱ - Saturation Displacement Analysis [۲۸] یا Analysis (۲۹): در تعیین مقدار انسولین و یا T4 مقدار محدود و معینی از آنتی بادی (Ab) را با مقدار زیادی از Ag و $Ag \cdot Ab$ مخلوط می نمایند. این دو آنتی ژن رقابت برای متصل شدن با آنتی-بادی نموده تا واکنش بحالت تعادل شیمیایی برسد. لذا این دو تکنیک که کاملا نظیر RIA می باشند در بعضی کتابها ومقالات بنام های فوق، خوانده می شوند.

۲ - Radio-Ligand Binding Analysis [۳۰]
در این متد Ag و $Ag \cdot Ab$ را اولین مولکول یا Ligand و Ab را دومین مولکول و یا Specific Reactor می خوانند. مولکول دوم ممکن است پروتئین و یا غیر پروتئین باشد ولی مولکول کوچکتر باید شامل ماده نشاندار (Ag^*) باشد.

۳ - Radioenzymatic [۳۱، ۳۲] اگر مولکول دوم از آنزیمها باشد مثل اسید فوسفاتاز Reductase یا Folic Acid این متد را Radioenzymatic می گویند.

۴ - Competitive Protein Binding Analysis [۳۳]
در متد CPBA مولکول دوم پروتئین بوده و مولکول اول ($Ligand$) بطور اختصاصی بان متصل می شود. پروتئین هائیکه بعنوان مولکول دوم در این سری از تجزیه ها بکار میروند آلبومین و گلوبولین های پلاسما، خون و یا پروتئین های Tissue Receptors میباشند. بعضی اوقات از گلوبولین های خاصی که دارای خاصیت ایمنی نمیباشند (non-Immunologic globulin) بجای پروتئین های فوق الذکر استفاده می نمایند که عبارتند:

الف - Corticosteroid-Binding Globulin (CBG)
که از پلاسما، انسان و یا سگ بدست آمده و برای اندازه گیری کورتیکوئیکوئید و پروژستین بکار میرود [۳۴ و ۳۵].

ب - Thyroxin - Binding Globulin (TBG)
که برای اندازه گیری هورمون تیروکسین مصرف می شود. [۳۶ و ۳۷]

ج - Progesteron Binding Protein [۳۸]
از پلاسما، خوکچه هندی بدست آمده و برای اندازه گیری پروژسترون بکار میرود.

د - Testosterone-Binding Protein [۳۹]
که در اندازه گیری تستوسترون استفاده می شود.
همچنین از متد CPBA برای تعیین مقدار آلدوسترون، AMP حلقوی، انواع ویتامین های D و B_{12} و

وقت هزینه آزمایشات بسیار کمتر از CPBA خواهد بود .

۵ - Immunoradiometric Assay [۴۰]

در این متد Ab بجای Ag حامل ماده رادیوآکتیوینه می باشد . فواید این متد عبارتند از : اولاً Ab که دارای مولکولهای بزرگتر و یکنواخت تری از مولکولهای کوچک Ag هستند با سانی قابل رادیو آکتیو شدن (Tagged) میباشند . ثانیاً آنتی ژنهای غیر نشاندار بیشتر و بهتر می توانند درواکنش شرکت کنند . ثالثاً Ab بهتر از Ag قابل نگهداری است . از این تکنیک برای اندازه گیری انسولین ، هورمون رشد و کالسی تونین و غیره استفاده میشود .

Antithydroglobulin Antibodies نیز استفاده می نمایند .

در این متد چون پروتئین بعنوان مولکول دوم مورد استفاده قرار نمیگیرد ، لذا باید پروتئینهای غیر لازم سرم را که احتمال باند شدن با آنتی ژن را دارند ، بوسیله الکل یا محلول آلی دیگری از سرم جدا نمود . این عمل میزان میل ترکیبی پروتئین مورد نظر را با آنتی ژن کاهش می دهد . در حالیکه در RIA مولکول دوم Ab بوده و لازم نیست که پروتئینهای غیر لازم را از پروتئین مورد نظر جدا نمود . البته دست یافتن به Ab خالص و اختصاصی ماهها وقت میگیرد ولی پس از یافتن آن ، دقت عمل ، مقدار صرف

References

- 1- Yalow, R. S. and Berson, S. A., Nature, 184, 1648, 1959.
- 2- Berson, S. A. and Yalow, R. S., J. Clin. Invest. 36, 873, 1957
- 3- Midgley, A. R., et. al., Acta. Endocrinol. 63, Suppl. 142, 163, 1966
- 4- Brown, G. M. Boshans, R. L. and Schalch, D. S. Computer Calculation of Radioimmuno assays. Comput. Biomed. Res. 3, 212, 1970
- 5- Potts, J. T., Jr., Advan. Intern. med. 13, 183, 1967
- 6- Ekins, R. P., Hormonal non - Specificity Cross Reacting Biologically distinguished Hormones. In Proceedings International Symposium on Proteins and Polypeptide Hormones. M. Margoulies Ed. Excerpta Medica, Amsterdam P. 575, 1969
- 7- Midgley, A. R. Jr. et. al, Recent. Progr. Horm. Res. 27, 235, 1971
- 8- Yalow, R. S. and Berson S. A. Introduction and General Considerations. In Principles of Competitive Protein-Binding Assays. W. D. Odell. and W. H. Daughaday, Eds. J. B. Lippincot Co., Philadelphia, P 1971, P. 1.
- 9- Ekins, R., and Newman, B., Acta Endocrinol 64, Suppl. 174, 11, 1970
- 10- Berson, S. A. and Yalow, R. S., Immunoassay of Protein Hormones. In the Hormones G. Pincus, K. V. Thiaman, and E. B. Astwood, Eds. Academic Press, N. Y. 1964, P. 557.
- 11- Rubinstein, A. H., Lancet I, 1353, 1968
- 12- Berson, S. A. and Yalow, R. S., J. Clin. Endocrinol. 28, 1037, 1968
- 13- Berson, S. A. and Yalow, R. S. Gastrology, 60, 215, 1971
- 14- Glick, S. M., Roth, J., Yalow, R. S., Natur. 199, 784, 1963
- 15- Schussler, G. C., J. Pharmacol. Exp. Ther. 178, 204, 1971
- 16- Galskov, A., Radioimmunochemical Corticotropin Determination Acta Endocrinol 69 Suppl. 162, 5, 1972
- 17- Aubert, M. L., Critical Study of the Radioimmunoassay for the Dosage of the Polypeptide Hormones in Plasma., J. Nucl. Biol. Med. 14, 1, 1970
- 18- Seidner, A. Radioimmunoassay. Cadence. 12, 7, 1972
- 19- Freund, J. Some Aspect of Active Immunization., Annu. Rev. Microbiol. 1, 291, 1947
- 20- Freund, J., Amer. J. Clin. Pathol. 21, 645, 1951
- 21- Raud, H. R., and Odell, W. D., Brit. J. Hosp. Med. 2, 1366, 1969

- 22_ Daughaday, W. H. and Jacobs, L. S., In W. D. Odell and W. H. Daughaday (eds.) Principles of Competitive Protein-Binding Assay Lippincott 1970, Chap II
- 23_ Wide, L., Acta Endocrinol. 63, Suppl. 142, 207, 1969
- 24_ Hales, C. N., and Randle, P. J., Biochem. J. 88, 137, 1963
- 25_ Wide, L., and Poroth, J., Biochem. Biophys. Acta. 130, 257, 1966
- 26_ Catt, K. J., Acta Endocrinol. 63, Suppl. 142, 222, 1969
- 27_ Berson, S. A. and Yalow, R. S., Advan. Biol. Med. Phys. 6, 349, 1959
- 28_ Berson, S. A. and Yalow, R. S., Immunoassay of Plasma Insulin., Ciba. Found. Collog Endocrinol. 14, 182, 1962
- 29_ Berson, S. A. and Yalow, R. S., J. Clin. Endocrinol 62, 107, 1966 - 67
- 30_ Kovenman, S. G., J. Clin. Endocrinol. Metab. 28, 127, 1968
- 31_ Rothenburg, S. P., Nature, 206, 1154, 1965
- 32_ Rothenburg, S. P., J. Lab. Clin. Med. 66, 294, 1965
- 33_ Morphy, B. P., Nature. 201, 679, 1964
- 34_ Murphy, B. P., J. Clin. Endocrinol. Metab. 27, 973 1967
- 35_ Beitins, I. Z., J. Clin. Endocrinol 15, 765, 1970
- 36_ Ekins, R. P., Clin. Chim. Acta 5, 453, 1960
- 37_ Day, E. D' Advanced Immunochemistry, The Williams and Wilkins Co. Baltimore, Md 1972
- 38_ Burton, R. M., Harding, G. B., Rust, N., and., Westphal, U., Steroid - Protein Interaction XXIII. Nonidentity of Cortisol-Binding Globulin and Progesterone - Binding Globulin in Guinea Pig Serum. Stroides 17, 1, 1971
- 39_ Frick, J., and Kincl, F. A., J. Nucl. Biol. Med. 13, 495, 1969
- 40_ Miles, L. E. M., and Hales, C. N., J. Nucl. Biol. Med. 13, 10, 1969.