J. of Nuclear Sci. and Tech.
No. 36, pp.7-12, 2006
Archive of SID
مجله علوم و فنون هسته‌ای
شماره ۳۶، صفحات ۱۲-۷، ۱۳۸۵

ارائه کیت جدید برون تنی برای تعیین غلظت پادگن ویژه پروستات در سرم انسانی به روش سنجش ایمونورادیومتریک

محمدحسین بابائی*، پیام بهرادکیا، محمد شفیعی، مسعود مولا، هاله فروتن، رضا نجفی
مرکز تحقیقات هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی، صندوق پستی: ۳۴۸۶-۱۱۳۶۵ تهران- ایران

چکیده: روش‌های تعیین غلظت پادگن ویژه پروستات (PSA) در خون که شاخصی انتخابی برای تشخیص سرطان پروستات و پیگیری درمان آنند، اغلب بر اساس سنجش ایمن‌شناختی خاص پایه‌گذاری شده‌اند؛ در این روش‌ها از ایجاد کمپلکس پادگن- پادتن برای تعیین مقدار PSA استفاده می‌شود. با انجام دادن این تحقیق، پادگن PSA به مقدار کافی بصورت نیمه‌خالص و خالص تهیه شد که ماده‌ای ارزشمند در تهیه استاندارد برای کیت‌های تشخیصی PSA می‌باشد؛ سپس با استفاده از این پادگن، هشت نوع پادتن تک‌تاکی (مونوکلونال) علیه PSA بدست آمد که شامل ۴ نوع پادتن تک‌تاکی زوج هستند و می‌توان از هر زوج برای تهیه یک کیت IRMA (کیت ساندویچی) استفاده کرد. با انجام دادن آزمایش تعیین میزان تمایل (affinity) پادتن به پادگن، از میان این چهار زوج، یک زوج با تمایل زیاد برای تهیه کیت IRMA بکار برده شد. این کیت از نمودار استاندارد مطلوبی برخوردار بوده و قادر است غلظت PSA در سرم را تا ۰/۱ نانوگرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری نماید.

واژه‌های کلیدی: پادگن ویژه پروستات (PSA)، ایمونورادیومتریک اسی (IRMA)، سرطان پروستات، بیماری‌یابی پروستات

Development of a New in Vivo Kit for Detection of Prostate Specific Antigen in Human Serum Using Immunoradiometric Assay Method

M.H Babaei*, P. Behradkia, M. Shafii, M. Movla, H. Forutan, R. Najafi
Nuclear Research Center, AEOI, P.O. Box: 11365 -3486, Tehran - Iran

Abstract: Prostate is a leading site for the cancer incidence, accounted for 31.0% of new cancer cases in men. Prostate-specific antigen (PSA) is widely used in the detection and monitoring of the prostate cancer. Currently, immunoassay is used to detect PSA in human serum. This technique is based on the interaction between antibody and antigen. The varied immunoassay formats and equipment to run the assays allow the users to measure the analytes rapidly, with the flexibility to run a small or a large number of samples. Among different immunoassay methods, immunoradiometric assay (IRMA) is a more sensitive and valuable detection approach. This study has been made in 4 parts: (1) purification of PSA from seminal fluid; (2) preparation of hybridoma cells which secrete monoclonal antibody (mAb) against PSA, (3) selection of pair monoclonal antibody among those antibodies, and finally (4) design of an IRMA kit and it's quality control . The results of this study were: (1) obtaing a huge amount of PSA as semi-purified and purified, that is a valuable material for preparation of standard kits; (2) preparation of 8 kinds of monoclonal antibodies; (3) finding 4 pairs of monoclonal antibodies which react with different epitopes on PSA molecule; and (4) preparation of IRMA kit for measuring PSA concentration in human serum.

Keywords: ***Prostate Specific Antigen (PSA), Immunoradiometric Assay (IRMA), Prostate Cancer, Screening test***

*email: sbabaei@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۸۴/۶/۲۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۵/۱/۱۴

www.SID.ir

Archive of SID

۱- مقدمه

پیشرفت‌های اخیر در علوم و تکنولوژی، سرطان را از یک عارضه لاعلاج و مرگ‌آور به یک بیماری مزمن تغییر داده است و دیگر بعنوان بیماری ترسناک و مرگ‌آور نیست. پژوهشگران سرطان را بعنوان یک مشکل بهداشتی قرن محسوب می‌کنند. سرطان در حقیقت یک بیماری سلولی است، زیرا بدخیمی از یک سلول یا از گروهی سلول نشأت می‌گیرد [۱].

با توجه به این اصل که «پیشگیری مقدم بر درمان است»، انسان می‌تواند با استفاده از پیشگیری، خود را در مقابل بسیاری از سرطان‌ها و عوارض آنها محافظت کند. غربالگری یا بیماریابی[۱] معمول‌ترین روش پیشگیری می‌باشد که عبارت است از مطالعه افراد سالم به منظور یافتن علامتهای اولیه بیماری در شرایطی که ظاهراً هیچ نشانه‌ای از آن در فرد وجود ندارد. در آزمایشهای غربالگری، یک آزمایش ساده موردنیاز است که از هر نظر برای افراد قابل قبول بوده (یعنی کم خرج و بدون درد) و حساسیت کافی برای تشخیص داشته باشد (نتیجه منفی کاذب ندهد) و دقّت لازم را، که پاسخ مثبت آن واقعاً درست و قابل اعتماد است داشته باشد. یکی از این آزمایشهای غربالگری تعیین غلظت شاخص‌های توموری[۲] در خون است. شاخص‌های توموری، موادی هستند که در خون بیماران مبتلا به بدخیمی موجود بوده و قابل اندازه‌گیری‌اند. این شاخص‌ها در افراد سالم موجود نیستند، یا به صورت مقادیر کم وجود دارند. برخی از مهمترین شاخص‌های توموری عبارتند از: AFP، CA-125، کلسیتونین، CEA، PSA، HCG، CA-19-9، CA-15-3، گیرنده‌های استروژنی و پروژسترونی [۲ و ۳].

پادگن ویژه پروستات (PSA)، گلیکوپروتئینی تک زنجیره‌ای با جرم مولکولی ۲۸/۴ کیلودالتون (KD) است که دارای ۲۳۷ اسیدآمینه، ۵ پیوند دی‌سولفیدی بوده و محتوی ۸ درصد کربوهیدرات می‌باشد که در مایع سمینال موجود است. PSA فقط در سلول‌های اپی‌تلیال‌پروستات ساخته می‌شود. مقدار ناچیزی از آن بداخل جریان خون نفوذ می‌کند که در آن قابل اندازه‌گیری است. در شرایط ویژه‌ای از پروستات، مثلاً در سرطان پروستات، غلظت PSA در خون افزایش می‌یابد. برای PSA به تنهائی فعالیّتی خارج از پروستات شناخته نشده است، حتی مقادیر زیاد PSA هم مستقیماً مضر نیستند. با وجود این، مقادیر زیاد PSA در خون، ممکن است نشانه‌ای از بیماری پروستات باشد [۴].

برای تعیین غلظت این شاخص توموری، ابتدا نمونه خونی گرفته می‌شود، سپس غلظت PSA در این نمونه با یک روش آزمایشگاهی معمول بنام ایمونواسی[۳] تعیین می‌گردد. نتیجه معمولاً بر اساس نانوگرم در میلی‌لیتر (ng/ml) گزارش می‌شود. اغلب پزشکان بر این باورند که محدوده طبیعی برای اکثر تست‌های رایج PSA بین ng/ml ۴-۰ می‌باشد. غلظت خونی PSA، اغلب در مردان مبتلا به سرطان پروستات بالاست. پس از تشخیص و درمان سرطان پروستات، کنترل غلظت PSA نقشی حیاتی در پیگیری درمان سرطان پروستات دارد [۵].

هدف از این مطالعه، تهیه کیت IRMA برای اندازه‌گیری غلظت PSA در خون می‌باشد. این کار مستلزم تهیه پادگن ویژه پروستات و تهیه پادتن‌های مونوکلونال علیه آن است. این مطالعه در چهار قسمت:

- خالص‌سازی PSA از مایع سمینال انسانی
- تهیه سلول‌های هیبریدوما تولید کننده پادتن مونوکلونال علیه PSA
- پیدا کردن زوج پادتن مونوکلونال از میان پادتن‌های بدست آمده
- طراحی کیت IRMA و انجام آزمایشهای کنترل کیفی بر روی آن صورت گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد

مایع سمینال انسانی از بیمارستان دی تهران بر روی یخ به سازمان انرژی اتمی ایران آورده شد. ستون کروماتوگرافی جذبی Cibacron Blue F3G-A immobilized on sepharose CL-6B از شرکت Fluka، ستون کروماتوگرافی غربالی Sephacryl S-200 HR، ستون مبادلهٔ آنیونی DEAE-Sepharose، دستگاه الکتروفورز Phastsystem و دستگاه Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) از شرکت Pharmacia و کیت سنجش PSA از شرکت Immunotech تهیه شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

۲-۲ جداسازی PSA از مایع سمینال انسانی

با استفاده از روشهای کروماتوگرافی جذبی (ستون Cibacron Blue F3G-A immobilized on sepharose CL-6B) و کروماتوگرافی غربالی (ستون Sephacryl S-200 HR)، PSA خالص از مایع سمینال انسانی بدست آمد که درجهٔ خلوص آن در هر مرحله با استفاده از SDS-PAGE[۴] و FPLC سنجیده شد. همچنین غلظت پروتئینی محلول PSA بدست آمده با روشهای لوری[۵] و IRMA (و استفاده از کیت PSA) تعیین گردید [۶ و ۷].

۲-۳ تهیه سلول‌های هیبریدوما تولید کنندهٔ پادتن مونوکلونال علیه PSA

با استفاده از روش استاندارد [۸]، از طریق مصون‌سازی موش‌های Balb/C با پادگن ویژه پروستات، سلول‌های هیبریدومای موش، تولید کننده پادتن مونوکلونال علیه این پادگن تهیه شدند.

۲-۴ فرموله کردن کیت IRMA و کنترل کیفی آن

پادتن حاصل از هر سوپرناتانت سلولی از طریق رسوب با سولفات‌آمونیوم اشباع شده و ستون مبادلهٔ آنیونی، DEAE-Sepharose خالص‌سازی شد. پس از تعیین میل‌ترکیبی و زوج بودن پادتن‌ها، از دو پادتن زوج با حداکثر میل‌ترکیبی برای تهیه کیت IRMA استفاده شد [۸ و ۹].

برای استفاده از فاز جامد جهت پوشش دادن پادتن از لوله‌های پلی‌استیرن ایرانی و خارجی بصورت معمولی و پرتو دیده (4 Mrad) استفاده شد. برای افزایش میزان پادتن پوشش داده شده، همچنین حفظ خاصیت اتصال آن به پادگن، برای پوشش اولیه از پادتن خرگوشی ضد ایمونوگلوبولین G موشی استفاده شد، سپس پادتن مونوکلونال روی آن پوشش داده شد. مراحل جزیی این پوشش دادن، به روش زیر انجام گرفت.

- محلولی از پادتن خرگوشی ضد ایمونوگلوبولین G موش در بافر بیکربنات (۵۰ mM با pH=۹/۶) با غلظت ۱۰-۵ µg/ml تهیه شد، و از این محلول، یک میلی‌لیتر به هر یک از ۱۵ لوله اضافه گردید، سپس به مدّت یک شب در ۴°C نگهداشته شد.
- همه لوله‌ها سه مرتبه با بافر شوینده (محلول تریس هیدروکلراید ۲۰ میلی‌مولار با pH=۷/۲ محتوی ۰/۱۵ مولار سدیوم کلراید و ۰/۰۱ درصد Triton X-100) شسته شدند.
- به هر لوله یک میلی‌لیتر از بافر بلاک (محلول تریس هیدروکلراید ۲۰ میلی‌مولار با pH=۷/۲ محتوی ۰/۱۵ مولار سدیوم کلراید و دو درصد سرم آلبومین گاوی) اضافه و به مدّت یک ساعت در دمای اتاق نگهداشته شد.
- در لوله‌های ۳ تایی یک میلی‌لیتر از پادتن تک‌تاکی با غلظت ۱۰ µg/ml اضافه و به مدّت دو ساعت در دمای اتاق نگهداشته شد.
- همه لوله‌ها سه مرتبه با بافر شوینده، شسته شدند.
- در لوله‌های ۳ تایی، ۱ میلی‌لیتر از هر یک از غلظت‌های پادگن PSA (۵ غلظت ۵۰، ۲۵، ۱۰، ۵ و صفر نانوگرم در میلی‌لیتر) اضافه و به مدّت دو ساعت در دمای اتاق نگهداشته شد.
- همه لوله‌ها سه مرتبه با بافر شوینده شسته شدند.
- به هر لوله ۱ میلی‌لیتر معادل ۶۰۰۰۰ cpm از پادتن نشاندار شده با یُد-۱۲۵ (زوج پادتن پوشش داده شده) ریخته شده و به مدّت دو ساعت در دمای اتاق نگهداشته شد [۱۰].
- همه لوله‌ها سه مرتبه با بافر شوینده شسته شدند.
- لوله‌ها در دستگاه شمارنده گاما شمارش شدند.
- منحنی استاندارد غلظت PSA در مقابل شمارش، برای هر یک از لوله‌ها رسم شد.
- برای کنترل کیت بدست آمده، این آزمایشها و منحنی‌های مربوطه در سه روز مختلف صورت گرفتند.
- برای بدست آوردن حداقل غلظت قابل اندازه‌گیری به وسیلهٔ این کیت، رقیق‌سازی‌های متوالی بر حسب نانوگرم در میلی‌لیتر از غلظت ۵ ng/ml به این ترتیب تهیه گردید: (۲/۵، ۱/۰، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۰، ۰/۰۵، ۰/۰۲۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۵) و این نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد حاصل از این کیت، تعیین مقدار شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

۳- نتایج

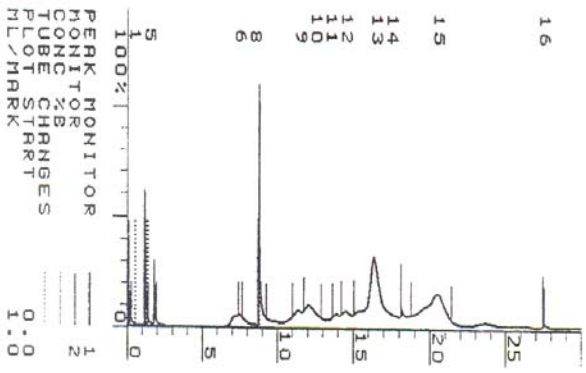
۳-۱ تهیه PSA

فراوانی این پادگن در مایع سمینال ۱/۷۶ درصد است (شکل ۱). در مرحله جداسازی با ستون Cibacron Blue حدود ۳۰٪ درصد PSA خالص بدست می‌آید (شکل ۲). در مرحله جداسازی با ستون Sephacryl S-200 HR حدود ۹۰٪ درصد PSA خالص بدست می‌آید (شکل۳). بین غلظت PSA بدست آمده با دو روش لوری و IRMA تفاوت معنی‌داری موجود است که به دو علت بوجود می‌آید:

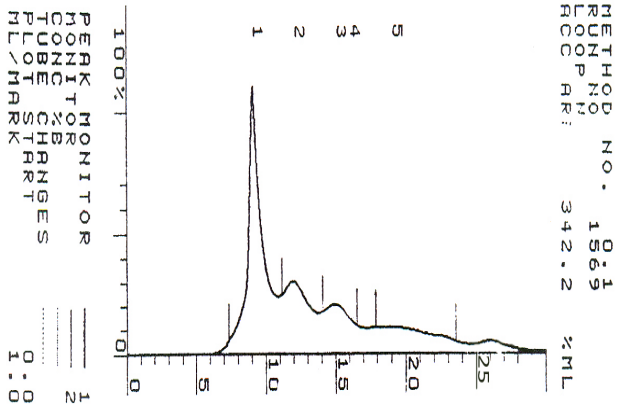
- وجود پروتئین‌های دیگر در محلول
- غیرفعّال شدن مقداری از PSA در حین عمل خالص‌سازی.

۳-۲ تهیه پادتن مونوکلونال

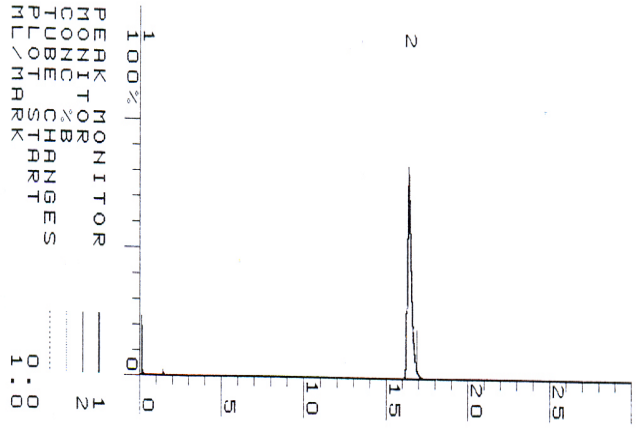
تعداد ۸ نوع سلول هیبریدوما بدست آمد که ۸ نوع پادتن مونوکلونال ترشح می‌کنند. ویژگیهای هر یک از این پادتن‌ها در جدول ۱ درج شده است.



شکل ۱- آنالیز مایع سمینال با ستون Sephacryl S-200 HR قبل از خالص‌سازی.



شکل ۲- آنالیز مایع سمینال جمع‌آوری شده از انتهای ستون Cibacron Blue با ستون Sephacryl S-200 HR.



شکل ۳- آنالیز مایع سمینال با ستون Sephacryl S-200 HR بعد از خالص‌سازی با ستون کروماتوگرافی غربالی.

جدول ۱- ویژگیهای پادتن‌های مونوکلونال بدست آمده علیه PSA.

نام پادتن	2A2	4H2	4A2	4C1	4C5	4D1	4D3	4D6
ثابت تمایل (M^{-1}) (* 10^9)	4.8	5.6	2.1	.087	0.095	0.83	0.32	2.8
زیر کلاس پادتن	IgG1	IgG1	IgG2a	IgG1	IgG2b	IgG1	IgG2b	IgG1

۳-۳ تعیین زوج پادتن مونوکلونال

از میان ۸ نوع پادتن مونوکلونال بدست آمده از انجام عمل ادغام، چهار دسته پادتن بدست آمدند که قادر به شناسائی ۴ شاخص‌آنتی‌ژنیک مختلف بر روی مولکول PSA بودند. این چهار گروه عبارتند از: (۱)2A2، 4D1 (۲)4A2، 4C1 (۳)4H2 ، 4C5 (۴)4D3، 4D6.

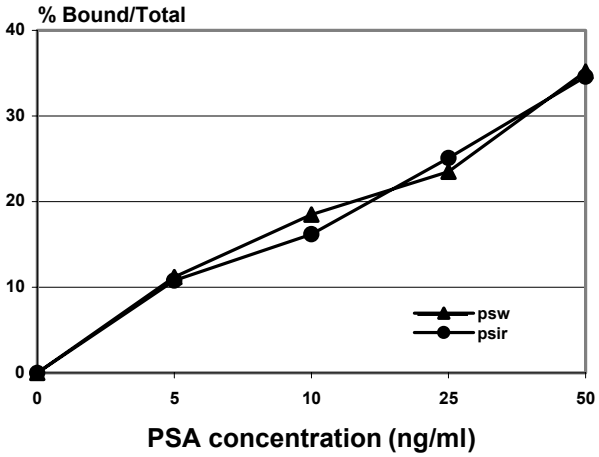
۳-۴ تهیه کیت IRMA

با توجه به ثابت میل‌ترکیبی بدست آمده برای هر یک از پادتن‌ها، همچنین با در نظر گرفتن زوج بودن پادتن‌ها، از دو پادتن مونوکلونال 2A2 و 4H2 برای تهیه کیت استفاده شد. چون میل‌ترکیبی پادتن 4H2 بیشتر از دیگری است، از آن بعنوان پادتن جذب‌کننده و از 2A2 بعنوان ردیاب استفاده شد.

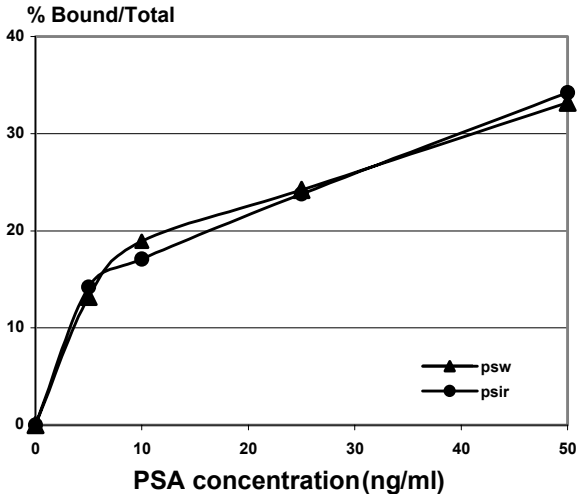
شکل‌های ۴ و ۵ نمودارهای حاصل از غلظت PSA را در قبال شمارش برای لوله‌های پیش‌گفته نشان می‌دهند. این نمودارها مشخّص می‌کنند که لوله‌های پلی‌استیرن داخلی و خارجی جواب‌های مشابهی دارند؛ به همین جهت برای طراحی یک کیت مناسب، از لوله‌های پلی‌استیرن معمولی داخلی برای ادامه کار استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- مقایسه نمودار کیت‌های IRMA تهیه شده از دو نوع لوله معمولی مختلف (psw: polystyrene western, psir: polystyrene iran).



شکل ۵- مقایسه نمودار کیت‌های IRMA تهیه شده از دو نوع لوله پرتو دیده مختلف (psw: polystyrene western, psir: polystyrene iran).

نمودارهای استاندارد بدست آمده در روزهای مختلف با یکدیگر مشابه بودند؛ این امر بیانگر تکرار پذیر بودن تهیه کیت در زمانهای مختلف است. با انجام آزمایشهای کنترل کیفی معین شد که با این کیت می‌توان حداقل تا ۰/۱ نانوگرم در میلی‌لیتر از غلظت PSA را اندازه‌گیری کرد.

۴- بحث

با توسعه «تکنیک هیبریدوما» در سال ۱۹۷۵ توسّط G. Kohler و C. Milstein به منظور تولید پادتن مونوکلونال، تحوّلی شگرف در اندازه‌گیری شاخص‌های توموری به وسیلهٔ سنجش‌های ایمونولوژیکی ایجاد شد. در واقع پادتن مونوکلونال میل‌ترکیبی بالائی فقط برای یک شاخص پادگن خاص مورد نظر دارا می‌باشد [۱۱].

با توجه به اینکه اغلب پادگن‌ها دارای چند شاخص آنتی ژنیک (شاخص پادگنی) بر روی خود می‌باشند، انتظار می‌رود چند نوع رده سلولی در آزمایشها بدست آیند؛ بنابراین لازم است آزمایشهای بیشتری انجام شود تا معین گردد کدام هیبریدوماها یکسان یا متفاوت هستند. دو پادتن مونوکلونال که بتوانند به دو شاخص پادگنی متفاوت بر روی یک پادگن متصل شوند، پادتن مونوکلونال زوج نامیده می‌شوند که در تهیه کیت‌های سنجش ایمونولوژیکی (immunoassay) بکار می‌روند.

روش RIA یک تکنیک اتصال پروتئینی رقابتی است که پادگن نشاندار شده با مواد رادیوآکتیو بعنوان ردیاب و پادتن تهیه شده علیه پادگن، بعنوان یک پایگاه اتصال بکار می‌رود. روش ایمونژرادیومتریک اسی (IRMA) شبیه RIA است که در آن نیز یک ماده نشاندار شده با مواد رادیوآکتیو در یک واکنش پادتن- پادگن بکار می‌رود، در این صورت ماده رادیوآکتیو بجای اتصال به شاخص توموری، به پادتن متصّل می‌شود. بنابراین، در حالیکه در RIA سنجش این شاخص با کاربرد کمترین مقدار پادتن انجام می‌شود، ولی در این سنجش مقادیر زیادی از پادتن مونوکلونال ویژه بکار می‌رود. در روش RIA، کلیه شاخص‌های پادگنی اتصال می‌یابند، بر خلاف IRMA که فقط از این شاخص‌ها متصل می‌شود، بنابراین تکنیک IRMA بسیار حساستر از RIA می‌باشد [۱۲].

۵- نتیجه‌گیری

با استفاده از (۱) لوله‌های پلی‌استیرن ایرانی (۲) پادتن خرگوشی ضد پادتن موش که در آزمایشگاه از طریق تزریق IgG موشی خالص به خرگوش بدست آمده بود (۳) پادتن مونوکلونال 4H2 بعنوان پادتن جذب‌کننده (۴) پادتن مونوکلونال 2A2 نشاندارشده با یُد-۱۲۵ بعنوان ردیاب (۵) PSA خالص‌شده از مایع سمینال انسانی، یک کیت IRMA برای تعیین غلظت PSA سرم بدست آمد. این کیت از نمودار استاندارد مطلوبی برخوردار است و با آن می‌توان تا ۰/۱ نانوگرم در میلی‌لیتر غلظت PSA در سرم را اندازه‌گیری کرد.

www.SID.ir

Archive of SID

تشکر و قدردانی

وظیفه خود می‌دانیم از آقایان محمد مزیدی و مصطفی ناصری‌پارسا بخاطر همکاری صمیمانه آنان در انجام این تحقیق تشکر نمائیم.

پی‌نوشت‌ها:

۱- Screening
۲- Tumor Markers
۳- Immunoassay
۴- SDS-PAGE: Sodium Dodesyl Sulfate Poly Acryl Amide Gel Electrophoresis
۵- Lowry

References:

1. S. Potamianos, A.D. Varvarigou, S.C. Archimandritis, "Radioimmunoscintigraphy and radioimmunotherapy in cancer: principles and application," Anticancer Research **20**, 925-948 (2000).

2. P.R. Srinivas, B.S. Kramer, S. Srivatava, "Trends in biomarker resaerch for cancer detection," Lancet Oncol, **2**, 698-704 (2001).

3. R. Leake, "Biological markers: Maintaining Standards," Br. J. Cancer, **82**, 1627-1628 (1997).

4. A.M. Ward, J.W.F. Catto, F.C. Hamdy, "Prostate specific antigen: biology, biochmistry and available commercial assays," Ann. Clin. Biochem., **38**, 633-651 (2001).

5. S. Jain, A.G. Bhojwani, J.K. Mellon, "Improving the utility of prostate apecific antigen in the diagnosis of prostate cancer: the use of PSA derivatives and novel markers," Postgard Med, **78**, 646-650 (2002).

6. D. Rusciano, A. Berardi, C. Caccarini, B. Terrana, "Concomitant purification of prostate carcinoma tumor markers from human seminal fluid under nondenaturing conditions," Clin. Chem., **34**, 2528-2832 (1988).

7. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, L. Farr, R.J. Randal, "Protein measurement with the folin phenol reagent," J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).

8. G.C. Howard, and D.R. Bethell, "Basic methods in antibody production and characterization," Florida, CRC Press 51-68 (2001).

9. M.H. Babaei, P. Behradkia, M. Shafii, H. Forutan, R. Najafi, "Screening for pair monoclonal antibody directly on culture supernatants in the early phase of monoclonal antibody production against PSA by a RIA method," (Submitted to J. Immunol. Methods).

10. W. Zhong, L. Chen, R. Wang, "Human prostate specific antigen (hPSA) purification and establishment of hPSA radioimmunoassay," J. Radioanal. Nucl. Chem., **206**, 227-231 (1996).

11. G. Kohler, and C. Milstein, "Cotinuous cultures of fused cells secreting antibod of predefined specificity," Nature, **256**, 495-497 (1975).

12. M.R.A. Pillai, and S.D. Bhandarkar, "Radioimmunoassay: Principles and Practice," Devi printers and binders, Thane, India (1998).

13. R. Junker, B. Brandt, C. Zechei, G. Assmann, "Comparison of PSA measured by four combonations of free PSA and total PSA assays," Clin. Chem., **43**, 1588-1594 (1997).

www.SID.ir