مجله‌ی علوم و فنون هسته‌ای
۷۲، ۱۳۹۴، ۴۶-۵۳

J. of Nucl Sci. and Tech.
72, 2015, 46-53

مقایسه‌ی روش‌های مختلف رادیویددارسازی پادتن تک‌تاگی بر عملکرد کیت پرتو ایمن آزمونی پادژن ویژه‌ی پروستات

هاله فروتن*، مرضیه خدابخش، فریبا جوهری دها، لادن پورعبدی

پژوهشکده‌ی کاربرد پرتوها، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۳۴۸۶-۱۱۳۶۵، تهران ـ ایران

چکیده: به منظور تشخیص و ردیابی سرطان پروستات که یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در میان مردان است از اندازه‌گیری پادژن ویژه‌ی پروستات (PSA) در خون استفاده می‌شود. برای تعیین مقدار پادژن پروستات به عنوان یک تومور شاخص می‌توان از آزمون پرتوسنجشی ایمن استفاده نمود. در این مطالعه، روش تهیه و عامل‌های مؤثر بر کارآیی و پادژن تک‌تاگی ویژه‌ی پروستات نشان‌دار شده با ید-۱۲۵ به عنوان یک ردیاب در کیت آزمون پرتوسنجشی ایمن مورد بررسی قرار گرفت. پادتن نشان‌دار شده با دو روش کلروآمین-T و یدوژن پس از تهیه شدن و تخلیص به وسیله‌ی ستون سفادکس G۲۵ و پس از تعیین خلوص رادیوشیمیایی، در کیت آزمون پرتوسنجشی ایمن به کار گرفته شد. به منظور دست‌یابی به شرایط بهینه‌ی مؤثر بر کارآیی و پایداری پادتن نشان‌دار شده در روش کلروآمین-T، تأثیر نسبت پادتن به ید-۱۲۵ (۱۷٫۶ تا ۵۳ µg/mCi) کلروآمین-T به پادتن (۰٫۷۵ و ۱٫۵ µg/kg) و زمان نشان‌دارسازی (۱۵ تا ۶۰ ثانیه) مورد مطالعه قرار گرفت. پس از تعیین خلوص رادیوشیمیایی و استفاده در کیت آزمون پرتوسنجشی ایمن با توجه به منحنی مقیاس‌بندی و سنجش غلظت نمونه‌های کنترل، شرایط بهینه‌ی نشان‌دارسازی (نسبت کلروآمین-T به آنتی‌بادی ۱٫۵ و زمان نشان‌دارسازی ۵۰ ثانیه) به دست آمد. تغییر مقدار نسبت پادتن ید اثر قابل مشاهده‌ای بر بازده نشان‌دارسازی نداشت. پس از گذشت یک ماه مشخص شد که پادتن نشان‌دار شده از پایداری مناسبی برای استفاده شدن در کیت آزمون پرتوسنجشی ایمن برخوردار است. هم‌چنین، تأثیر غلظت یدوژن (۰٫۱ و ۰٫۲ $mg\ ml^{-1}$) و حجم دی‌کلرومتان (۵۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ µl) در روش نشان‌دارسازی با یدوژن بر بازده نشان‌دارسازی مورد بررسی قرارگرفت. غلظت یدوژن و حجم بهینه‌ی دی‌کلرومتان به کار رفته در نشان‌دارسازی، به ترتیب، ۰٫۱ $mg\ ml^{-1}$ و ۲۰۰ µl به دست آمد. ولی پس از گذشت دو هفته درصد بیشینه‌ی پیوند حدود ٪۳۸ کاهش و افت فاحشی در غلظت نمونه‌های کنترل مشاهده شد. با مقایسه‌ی خلوص رادیوشیمیایی، کارآیی و پایداری پادتن نشان‌دار تهیه شده با دو روش کلروآمین-T و یدوژن، پادتن نشان‌دار شده با روش کلروآمین-T از شرایط مناسب‌تری برای تهیه‌ی کیت داخلی و انجام آزمایش‌های کنترل کیفی برخوردار بود. برای کنترل کیفی کیت با استفاده از پادتن نشان‌دار انتخابی، ۳۰ نمونه‌ی سرم خون بیماران هم‌زمان به وسیله‌ی کیت داخلی و مرجع خارجی تجزیه و نتیجه‌ها با نمودار مقایسه‌ای رگرسیون خطی و آزمون مقایسه شد. معیار تصمیم‌گیری ضریب Sig (دو دامنه) براساس آزمون مربوط به هم‌ترازی دو کیت داخلی و مرجع خارجی برابر با ۰٫۹۹۳ به دست آمد.

کلیدواژه‌ها: ***پادژن ویژه‌ی پروستات، آزمون پرتوسنجشی ایمن، پادتن تک‌تاگی، رادیویددارسازی، کلروآمین-T، یدوژن، ستون سفادکس G۲۵، کیت پرتوسنجشی ایمن***

Archive of SID

تاریخ دریافت مقاله: ۹۳/۹/۱۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۴/۵/۲۱

*email: hforoutan@aeoi.org.ir

www.SID.ir

۱. مقدمه

در حال حاضر سرطان پروستات پس از سرطان ریه دومین سرطان شایع در مردان است. اطلاعات آماری و علایم بالینی، میزان رو به رشد مرگ و میر ناشی از سرطان پروستات را نشان می‌دهد [۱].

پادژن ویژه‌ی پروستات[۱] (PSA) یک گلیکوپروتیین تک‌زنجیره‌ای و آنزیم متعلق به گروه کالیکرین[۲] با وزن مولکولی ۳۳ کیلو دالتون عمده‌ترین پروتیین در مایع سمینال (مایع جنسی مردانه) محسوب می‌شود. پادژن ویژه‌ی پروستات تنها در سلول‌های اپی‌تلیال ساخته شده و مقدارهای ناچیزی از آن به داخل جریان خون نفوذ می‌کند [۲، ۳].

تومورهای سرطانی با توجه به این‌که پادژن‌های مشخصی را تولید می‌کنند، معمولاً از راه آزمایش خون تعیین می‌شوند. در سرطان پروستات مقدار این پادژن اختصاصی در خون افزایش یافته و نشان‌گر خوبی برای تشخیص آن است. البته در آزمایش خون فرد، تنها سطح پادژن پروستات نمایان‌گر ابتلا به سرطان پروستات نیست. در برخی از موارد، عفونت و یا بزرگی خوش‌خیم (افزایش حجم غده‌ی پروستات) نیز می‌تواند سبب افزایش میزان پادژن ویژه‌ی پروستات در خون شود؛ به همین جهت تعیین مقدار پادژن ویژه‌ی پروستات به عنوان یک تومور شاخص (شاخص زیست‌شناختی توموری) در کنار روش‌های تشخیصی دیگر می‌تواند در معالجه و یا ادامه‌ی درمان بیماری کمک مؤثری باشد [۴، ۵]. برای تعیین مقدار پادژن ویژه‌ی پروستات در خون از روش‌های مختلفی مانند روش‌های ایمن آزمونی آنزیمی[۳]، آزمون پرتوسنجشی ایمن[۴]، روش ایمن آزمونی لومینسانس[۵] استفاده می‌شود [۶].

به طور معمول تعیین غلظت کلی پادژن ویژه‌ی پروستات در سرم خون در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی با استفاده از روش پرتوسنجشی ایمن به انجام می‌رسد. یکی از اجزای مهم کیت‌های پرتوسنجشی ایمن، پادتن تک‌تاگی[۶] نشان‌دار شده با ید-۱۲۵ در واکنش با جفت پادتن تک‌تاگی پوشش داده شده بر روی سطح پلی‌مری است.

در نشان‌دارسازی پادتن‌ها با ید پرتوزا می‌توان از اکسیدان‌هایی چون کلروآمین-T (نمک سدیم n- کلرو- ۴- متیل بنزن سولفون آمید)، یدوژن، یدین مونوکلرید و لاکتوپراکسید استفاده نمود [۷، ۸، ۹، ۱۰]. یددار کردن با روش کلروآمین-T به طور معمول استفاده می‌شود [۱۱]. مزیت این روش به سایر روش‌ها بازده بیش‌تر واکنش و سرعت انجام مرحله‌های یددار شدن و سادگی آن است. محدودیت اصلی این روش توانایی مقاومت پروتیین یا پپتید در مقابل شرایط اکسایش قوی به وجود آمده است.

روش یددارکردن با یدوژن به عنوان اکسنده، روشی مؤثر بوده و در زمان طولانی‌تر با شرایط واکنش ملایم‌تری انجام می‌شود؛ در مواردی که پروتیین یا پپتید در شرایط واکنش اکسایش قوی تخریب می‌شود می‌توان از این روش استفاده نمود [۱۲]. سازوکار اکسایش در هر دو روش یکسان است و طی واکنش، یون‌های کلرونیم، یون یدید را به مولکول ید و سپس به یون یدینیم برای اتصال به مولکول پروتیین اکسید می‌کنند. در روش یدوژن به علت جدا شدن ترکیب یدوژن از محصول نشان‌دار شده، محصول‌های جانبی کم‌تری به دست می‌آید. با این حال، انتخاب روش مناسب بستگی به نوع پادتن، کیفیت پادتن نشان‌دار شده و نوع کاربرد آن دارد [۱۳].

در این پژوهش، چگونگی تهیه‌ی پادتن تک‌تاگی ضد پادژن ویژه‌ی پروستات نشان‌دار از طریق دو روش کلروآمین-T و یدوژن، مقایسه و تأثیر عامل‌های مختلف از قبیل نسبت پادتن به مقدار فعالیت پرتوزایی ید در روش کلروآمین-T، نسبت مقدار عامل یددارکننده به پادتن و سایر عامل‌های مؤثر بر نشان‌دارسازی مورد بررسی قرار گرفت. به منظور دست‌یابی به روش بهینه‌ی نشان‌دارسازی پادتن به عنوان ردیاب در کیت پرتوسنجشی ایمن پادتن ویژه‌ی پروستات، خلوص رادیوشیمیایی و عملکرد آن توسط کیت مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت با انتخاب روش بهینه‌ی نشان‌دارسازی، پادتن نشان‌دار شده به عنوان ردیاب، در کیت پرتوسنجشی ایمن[۷] داخلی برای تجزیه‌ی نمونه‌های سرم واقعی بیماران در مقایسه با کیت مرجع خارجی مورد استفاده قرار گرفت.

۲. بخش تجربی

۱.۲ مواد و دستگاه‌ها

دستگاه‌های مورد استفاده در این پژوهش عبارت‌اند از: شمارگر گاما (Gamma tech model ۶۰۰B)، جمع‌کننده‌ی قطره‌ها (Pharmacia Biotech)، پمپ پریستالتیک

Archive of SID

www.SID.ir

(Pharmacia LKB pump). جفت پادتن تک‌تاگی ضد پادژن ویژه‌ی پروستات (PSA) از شرکت مدیکس بایوکمیکا[۸] تهیه شد. استانداردهای پادژن ویژه‌ی پروستات با غلظت‌های (۰، ۱، ۳، ۱۰، ۳۰، ۱۰۰ ng ml^{-1}) و لوله‌های پوشش داده شده با جفت پادتن تک‌تاگی، هر دو در آزمایشگاه تهیه شدند. کلروآمین T، یدوژن، سدیم آزید، سرم آلبومین گاوی (BSA)، دی‌کلرومتان، سدیم متابی‌سولفیت، پتاسیم یدید، بافر PBSX (بافر فسفات ۱ مولار، سدیم کلرید ۳ مولار، سدیم آزید، تریتون X-۱۰۰)، بافر رقیق‌کننده (بافر فسفات ۰٫۰۵ مولار، BSA ٪۱، مانیتول ٪۱ و سدیم آزید ٪۰٫۱)، بافر آزمون (حاوی ٪۱۰ بافر رقیق‌کننده و ٪۹۰ بافر PBSX)، بافر فسفات (۰٫۵ و ۱ مولار)، رزین سفادکس G۲۵، و تمام مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت‌های مرک و سیگما تهیه شدند.

۲.۲ روش نشان‌دارسازی پادتن تک‌تاگی ضد پادژن ویژه‌ی پروستات

۱.۲.۲ روش کلروآمین-T

در این روش، ید-۱۲۵ با فعالیت پرتوزایی تقریبی ۰٫۵ تا ۱ میلی‌کوری به حجم‌های متفاوت پادتن تک‌تاگی به غلظت ۵٫۳ mg ml^{-1} و بافر فسفات ۰٫۵ مولار اضافه شده و سپس کلروآمین-T به میزان ۲ mg ml^{-1} برای انجام واکنش اکسایش به مخلوط افزوده شد؛ زمان واکنش بین ۳۰ تا ۶۰ ثانیه در نظر گرفته شد. در ادامه با افزودن متابی‌سولفیت به میزان ۲ mg ml^{-1} واکنش خاتمه یافت. در نهایت پتاسیم یدید به میزان ۱۰ mg ml^{-1} برای رقیق کردن محلول فوق به آن اضافه شد. در این مطالعه تأثیر نسبت پادتن به فعالیت پرتوزایی ید (µg mCi)، نسبت مقدار کلروآمین-T به پادتن (µg/µg) و زمان نشان‌دارسازی مورد بررسی قرار گرفت.

۲.۲.۲ روش یدوژن

در این روش محلول یدوژن به غلظت (۰٫۱ mg ml^{-1} در دی‌کلرومتان) به همراه مقدار اضافی دی‌کلرومتان به وسیله‌ی گاز نیتروژن بر روی سطح داخلی ویال شیشه‌ای پوشش داده شد، سپس ۵۰ µl بافر فسفات ۰٫۵ مولار (pH=۷٫۴) و محلول پادتن به غلظت ۱ mg ml^{-1} به آن اضافه و ید-۱۲۵ برای یددار کردن به مخلوط یدیناسیون افزوده شد. پس از گذشت ده دقیقه بافر فسفات ۰٫۰۱ مولار حاوی سدیم کلرید ۱ مولار (pH=۷٫۴) به آن اضافه و مخلوط نهایی به ویال دیگری انتقال داده شد. بعد از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، ۲۵۰ µl بافرفسفات ۰٫۰۵ مولار حاوی (۰٫۵ درصد) BSA و ۵ درصد KI برای خاتمه‌ی واکنش به مخلوط نهایی افزوده شد. تأثیر غلظت یدوژن، مقدار اضافی دی‌کلرومتان و اندازه‌ی ویال پوشش داده شده بر روی کیفیت نشان‌دارسازی مورد مطالعه قرار گرفت.

۳.۲ تخلیص پادتن تک‌تاگی نشان‌دار شده با ستون سفادکس G۲۵

تخلیص پادتن نشان‌دار، با استفاده از کروماتوگرافی ژل- صافی[۹] انجام شد. در این روش از ستون سفادکس G۲۵ (قطر ۰٫۹ cm و طول ۳۰ cm) و محلول شستشوی حاوی ۰٫۰۵ مول بر لیتر بافرفسفات، ۱ درصد BSA، و ۰٫۰۲ درصد سدیم آزید برای تخلیص پادتن نشان‌دار استفاده شد. تعداد شمارش خروجی ستون برحسب زمان رسم شد که در آن فاصله‌ی بین قله‌های ید- ۱۲۵ و پادتن نشان‌دار معرف کارآیی مناسب جداسازی با ستون بود.

پس از اطمینان از جداسازی و تخلیص مناسب پادتن نشان‌دار، خلوص رادیوشیمیایی (نسبت تعداد شمارش پادتن نشان‌دار شده به شمارش کل) با روش کروماتوگرافی کاغذی- صافی واتمن (TLC) (حلال متانول ٪۱۰ در آب) تعیین شد. با توجه به بازده رادیوشیمیایی، پادتن نشان‌دار شده به میزان مورد نیاز با بافر آزمون رقیق و در حجم‌های متفاوت در تجزیه‌ی کیت پرتوسنجشی ایمن مورد استفاده قرار گرفت.

۴.۲ کاربرد پادتن نشان‌دار در تجزیه‌ی کیت پرتوسنجشی ایمن

۵۰ میکرولیتر از نمونه یا استاندارد با ۵۰۰ میکرولیتر پادتن نشان‌دار شده‌ی رقیق با تعداد شمارش کل ۱۰۰۰۰۰ min^{-1} به مدت ۲ ساعت در لوله‌های پوشش داده شده با جفت پادتن تک‌تاگی، گرماگذاری شد. پس از گرماگذاری، و شستشو با محلول برای حذف مواد اضافی و جذب نشده، با استفاده از شمارگر گاما لوله‌ها مورد شمارش قرار گرفته و منحنی مقیاس‌بندی رسم شد. با توجه به منحنی مقیاس‌بندی غلظت نمونه‌ها تعیین و کنترل کیفی به طور هم‌زمان به وسیله‌ی کیت تولید شده‌ی داخلی و کیت مرجع خارجی مورد ارزیابی قرارگرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

۳. یافته‌ها و بحث

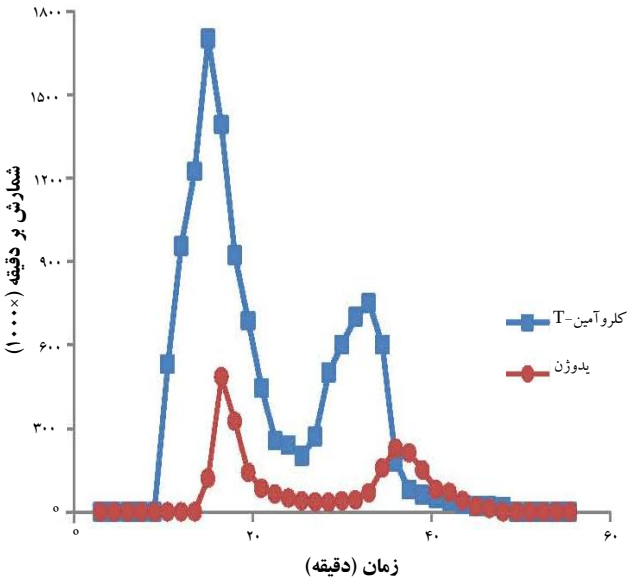
۱.۳ مقایسه‌ی میزان جداسازی پادتن نشان‌دار شده با ید- ۱۲۵ با دو روش کلروآمین-T و یدوژن

شمارش خروجی ستون مربوط به هر دو روش برحسب زمان در شکل ۱ نمایش داده شده است. با توجه به شکل ۱ اولین قله‌ی مربوط به پادتن نشان‌دار شده با روش یدوژن نسبت به روش کلروآمین-T با فاصله‌ی مناسب‌تری از دومین قله‌ی مربوط به ید آزاد جدا شده است، ولی میزان شمارش پادتن نشان‌دار شده با روش کلروآمین-T نسبت به روش یدوژن بیش‌تر است.

روش نشان‌دارسازی کلروآمین-T با توجه به خلوص رادیوشیمیایی پادتن نشان‌دار حاصل (حدود ٪۸۰) نسبت به روش یدوژن (حدود ٪۵۰) از راندمان مناسب‌تری برخوردار بود.

۲.۳ تأثیر عامل‌های مختلف بر نشان‌دارسازی پادتن در هر دو روش

بیشینه مقدار پیوند (٪) پادتن نشان‌دار شده با روش کلروآمین-T در تجزیه‌ی کیت نشان داد که تغییر نسبت پادتن (µg) به ید (mCi) تغییر چندانی در خلوص رادیوشیمیایی و فعالیت زیست‌شیمیایی پادتن نشان‌دار ایجاد نمی‌کند (جدول ۱). نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که فعالیت پرتوزایی ید در پادتن مورد استفاده اختلالی در واکنش زیست‌شیمیایی آن ایجاد نمی‌کند.



شکل ۱. مقایسه‌ی میزان جداسازی پادتن نشان‌دار شده با ید- ۱۲۵ با روش کلروآمین-T و یدوژن در ستون سفادکس G۲۵.

جدول ۱. تأثیر نسبت پادتن به ید در روش نشان‌دارسازی با کلروآمین-T

ید/ پادتن (µg/mCi)	درصد خلوص شیمیایی	بیشینه مقدار پیوند (٪)
۱۷٫۶	۷۹	۴۰
۱۹٫۱	۶۸	۴۲
۲۶٫۵	۷۳	۴۳
۳۳٫۹	۸۰	۴۷
۵۳	۶۹	۳۸

برای انتخاب شرایط بهینه با توجه به منحنی‌های مقیاس‌بندی مربوط به پادتن نشان‌دار تهیه شده در شرایط متفاوت، نمونه‌های کنترل (سه بار تکرار) مورد تجزیه قرار گرفت. گستره‌ی غلظتی نمونه‌های کنترل با کیت خارجی مرجع تعیین شد. در جدول ۲ بیشینه مقدار پیوند و غلظت نمونه‌های کنترل (C۱ و C۲) در زمان‌های مختلف نشان‌دارسازی با نسبت‌های مختلف کلروآمین- T به پادتن (µg/µg) مقایسه شده است. براساس اطلاعات این جدول، نسبت کلروآمین-T به پادتن ۱٫۵ و زمان ۵۰ ثانیه مناسب‌ترین انتخاب برای انجام واکنش نشان‌دارسازی است. در شکل ۲ تعدادی از منحنی‌های مقیاس‌بندی کیت پرتوسنجشی ایمن مربوط به پادتن نشان‌دار در شرایط متفاوت (مطابق با جدول ۲) نمایش داده شده است؛ براساس منحنی مقیاس‌بندی، حالت مربوط به نشان‌دارسازی در زمان ۴۵ ثانیه دارای شیب مناسب و فاقد اثر هوک[۱۰] است. هم‌چنین پادتن نشان‌دار برای بررسی پایداری آن، در دمای ۴ °C نگه‌داری و طی سی روز با کیت داخلی پرتوسنجشی ایمن مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که پادتن نشان‌دار، از پایداری مناسبی برخوردار است (شکل ۲).

با توجه به جدول ۳ غلظت بهینه‌ی یدوژن و حجم بهینه‌ی دی‌کلرومتان استفاده شده در نشان‌دارسازی، به ترتیب، $mg\ ml^{-1}$ ۰٫۱ و µl ۲۰۰ هستند. در شکل ۳ منحنی‌های مقیاس‌بندی پادتن نشان‌دار در شرایط مختلف با کیت پرتوسنجشی ایمن نمایش داده شده است. پس از گذشت دو هفته، پادتن نشان‌دار که در دمای ۴ °C نگه‌داری شده بود، برای بررسی پایداری با کیت پرتوسنجشی ایمن مجدداً مورد تجزیه قرار گرفت و براساس نتایج به دست آمده بیشینه مقدار پیوند حدود ٪۳۸ کاهش یافت و افت فاحشی در غلظت نمونه‌های کنترل مشاهده شد.

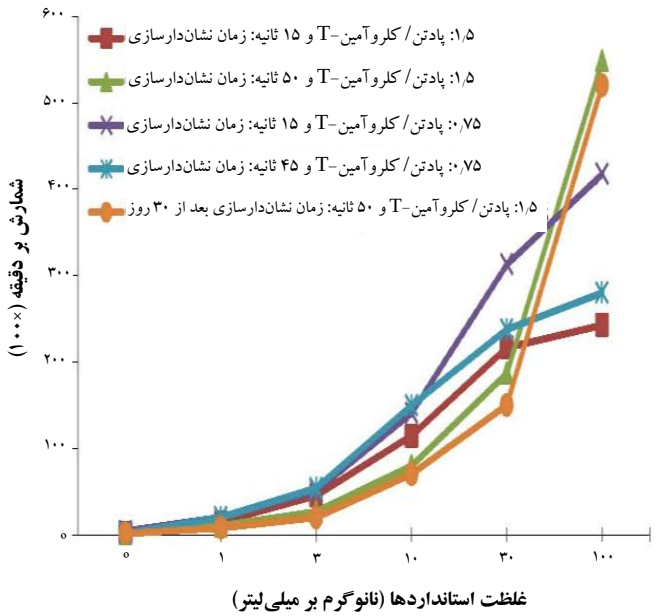
Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲. تأثیر نسبت‌های مختلف کلروآمین-T به پادتن و زمان نشان‌دارسازی

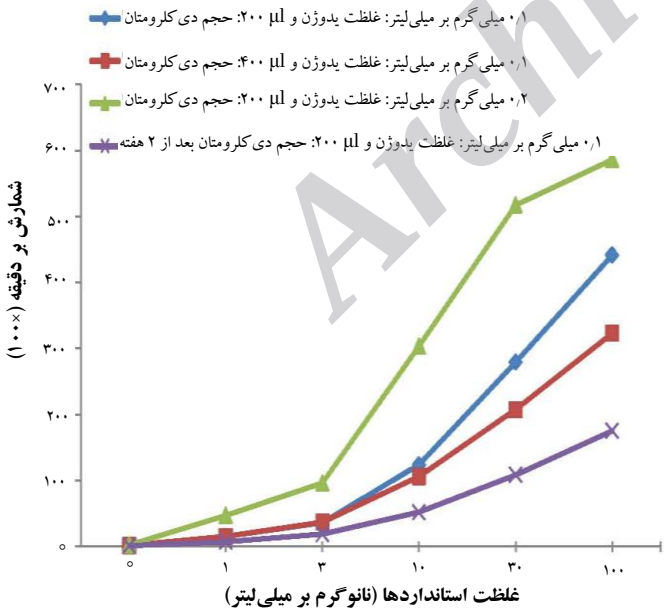
ردیف	پادتن/ کلروآمین-T	زمان نشان‌دارسازی (ثانیه)	بیشینه مقدار پیوند (٪)	گستره‌ی غلظت C_1 (۵٫۷ ng ml^{-1} تا ۳٫۵)	گستره‌ی غلظت C_2 (۲۸٫۷ ng ml^{-1} تا ۱۶٫۷)
۱	۱٫۵	۱۵	۳۰	۶٫۸ ±۰٫۳	۲۹٫۸ ±۰٫۵
۲	۱٫۵	۳۰	۳۵	۶٫۵ ±۰٫۲	۲۹٫۹ ±۰٫۳
۳	۱٫۵	۴۵	۳۷	۶٫۴ ±۰٫۶	۳۰٫۲ ±۰٫۵
۴	۱٫۵	۵۰	۴۷	۴٫۹ ±۰٫۲	۲۶٫۴ ±۰٫۵
۵	۱٫۵	۶۰	۲۳	۳٫۸ ±۰٫۴	۲۵٫۸ ±۰٫۴
۶	۰٫۷۵	۱۵	۲۳	۷٫۸ ±۰٫۶	۳۴٫۷ ±۰٫۶
۷	۰٫۷۵	۳۰	۳۰	۶٫۱ ±۰٫۳	۳۲٫۹ ±۰٫۳
۸	۰٫۷۵	۴۵	۳۰	۷٫۴ ±۰٫۷	۳۰٫۵ ±۰٫۸
۹	۰٫۷۵	۵۰	۲۰	۸٫۸±۰٫۸	۳۱٫۴±۰٫۳
۱۰	۰٫۷۵	۶۰	۱۸	۸٫۴±۰٫۶	۳۲٫۳±۰٫۶

جدول ۳. تأثیر غلظت یدوژن و حجم دی‌کلرومتان بر روی خلوص رادیوشیمیایی و فعالیت زیست‌شیمیایی پادتن نشان‌دار

غلظت یدوژن mg ml^{-1}	حجم دی‌کلرومتان (kl)	TLC (٪)	بیشینه مقدار پیوند (٪)	گستره‌ی غلظت C_1 (۵٫۷ ng ml^{-1} تا ۳٫۵)	گستره‌ی غلظت C_2 (۲۸٫۷ ng ml^{-1} تا ۱۶٫۷)
۰٫۱	–	۳۶	–	–	–
۰٫۱	۲۰۰	۵۷	۴۲	۴٫۹±۰٫۳	۱۵٫۷±۰٫۴
۰٫۱	۴۰۰	۳۰	۲۵٫۲	۷٫۳±۰٫۵	۲۳٫۹±۰٫۶
۰٫۲	۲۰۰	۳۷	۴۶٫۸	۵٫۳±۰٫۶	۱۹٫۴±۰٫۲



شکل ۲. منحنی‌های مقیاس‌بندی کیت پرتوسنجشی ایمن مربوط به پادتن نشان‌دار شده با روش کلروآمین-T در شرایط متفاوت.



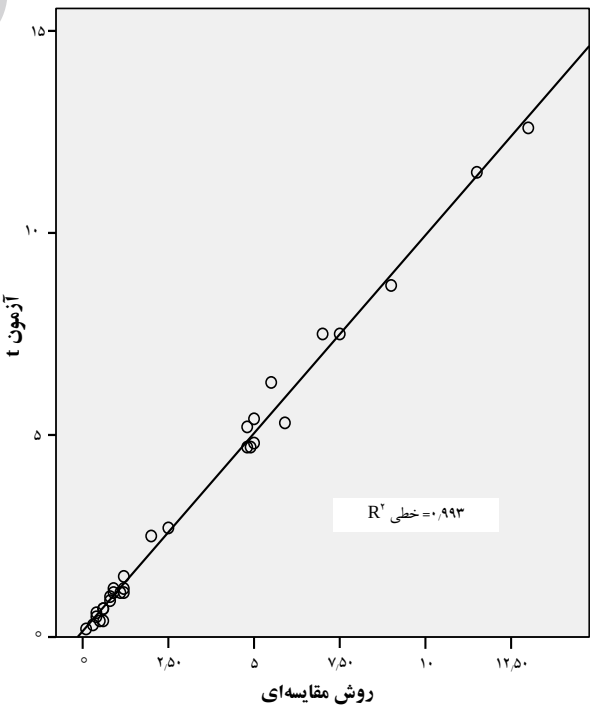
شکل ۳. منحنی‌های مقیاس‌بندی کیت پرتوسنجشی ایمن مربوط به پادتن نشان‌دار شده با روش یدوژن در شرایط متفاوت.

Archive of SID
www.SID.ir

۳.۳ کنترل کیفی کیت پرتوسنجشی ایمن

با مقایسه‌ی نتایج حاصل از نشان‌دارسازی در شرایط مختلف، روش کلروآمین-T نسبت به روش یدوژن از کارآیی بهتر و پادتن نشان‌دار حاصل از آن از پایداری بهتر برخوردار بود. لذا برای کنترل کیفی کیت پرتوسنجشی ایمن از پادتن نشان‌دار شده با روش کلروآمین-T استفاده شد. برای این منظور ۳۰ نمونه‌ی واقعی به طور هم‌زمان به وسیله‌ی کیت معتبر خارجی ایمینوتک[11] و کیت داخلی مورد تجزیه قرار گرفت. نمودار مقایسه‌ای رگرسیون خطی رسم (شکل ۴) و آزمون t برای محاسبه‌ی مؤلفه‌های رگرسیون، ضریب همبستگی (R^2=۰٫۹۹۳)، اختلاف میانگین‌ها (۰٫۱= انحراف) و خطای محاسبه (۶٫۱) انجام شد. هم‌ترازی نتایج حاصل از دو کیت با توجه به معیار تصمیم‌گیری حاصل از آزمون مورد بررسی قرار گرفت.

براساس آزمون دو نمونه‌ی مستقل، با فرض برابری واریانس‌های نتایج کیت داخلی و کیت مرجع، معیار تصمیم‌گیری ضریب Sig (دو دامنه) برابر با ۰٫۹۹۳ به دست آمد که از ٪۵ (فاصله‌ی اطمینان ٪۹۵) بسیار بزرگ‌تر است. در نتیجه می‌توان هم‌ترازی نتایج حاصل از دو کیت را تأیید کرد.



شکل ٤. نمودار مقایسه‌ای رگرسیون خطی نمونه‌های واقعی با کیت مرجع (روش مقایسه‌ای) و کیت داخلی (آزمون t).

٤. نتیجه‌گیری

هدف اصلی این کار پژوهشی نشان‌دارسازی بدون تخریب و تجزیه‌ی مولکولی پادتن تک‌تاگی ضد پادژن ویژه‌ی پروستات با فعالیت ویژه‌ی مناسب برای استفاده در کیت پرتوسنجشی ایمن بود. برای انجام این مهم، از دو روش متفاوت کلروآمین-T و یدوژن استفاده شد. در روش کلروآمین-T، سرعت یددار شدن، بالا، زمان واکنش بسیار کوتاه، و قدرت اکسایش بیش‌تر است در حالی که روش یدوژن در شرایط ملایم‌تر و در زمان طولانی‌تر انجام می‌شود. در هر دو روش، پادتن نشان‌دار با ید- ۱۲۵ با ستون سفادکس G۲۵ تخلیص و جداسازی شد. سپس شرایط نشان‌دارسازی در هر دو روش با توجه به خلوص رادیوشیمیایی و فعالیت زیست‌شناختی پادتن‌های نشان‌دار در استفاده از آن‌ها در کیت پرتوسنجشی ایمن مورد بررسی قرار گرفت.

براساس مطالعه‌های انجام شده، هر دو روش کلروآمین-T و یدوژن به عنوان روش‌های معمول نشان‌دارسازی برای ارزیابی پادتن‌های نشان‌دار شده با ید پرتوزا در کیت‌های تشخیصی و تصویربرداری به منظور ردیابی و درمان بیماری‌ها و سرطان‌ها به کار گرفته می‌شوند. دو ویژگی مهم در انتخاب روش مناسب عبارت از ۱) ویژگی فیزیکی و شیمیایی پادتن ۲) کیفیت موردنظر پادتن نشان‌دار شده و نوع کاربرد آن هستند. در پژوهش انجام شده، عامل‌های مؤثر بر واکنش یددار شدن از قبیل مقدارهای ماده‌ی اکسنده و سایر مواد واکنش‌زا، پایداری پادتن در برابر شرایط واکنش، نسبت مولی ید به پادتن و زمان واکنش برای دست‌یابی به بهترین کیفیت، مورد ارزیابی قرار گرفت [۱۴]. در بعضی موارد، شرط پایداری ترکیب پروتیینی روش کلروآمین-T به علت سرعت، مقدار فعالیت ویژه و کارآیی مناسب محصول نهایی از ارجحیت برخوردار است [۱۳].

در این پژوهش، در روش کلروآمین-T نسبت پادتن به ید (µg / mCi) از ۱۷٫۶ تا ۵۳ تغییر داده شد؛ نتایج نشان داد که نسبت‌های مختلف پادتن به ید تأثیر چندانی بر درصد خلوص رادیوشیمیایی و فعالیت زیست‌شیمیایی پادتن نشان‌دار نداشت. این، نشان‌دهنده‌ی پایداری پادتن در مقدارهای مختلف ید در روش نشان‌دارسازی با کلروآمین-T است.

دو نسبت کلروآمین-T به پادتن (µg/µg)، ۰٫۷۵ و ۱٫۵ در محدوده‌ی زمانی ۱۵ تا ۶۰ ثانیه مورد مطالعه قرارگرفت. با توجه به منحنی مقیاس‌بندی، بیشینه مقدار پیوند (٪) و اندازه‌یابی غلظت نمونه‌های کنترل، بهترین نسبت کلروآمین-T به پادتن ۱٫۵ برابر و

Archive of SID
www.SID.ir

زمان نشان‌دارسازی ۵۰ ثانیه به دست آمد. با این نسبت واکنش اکسایش پادتن برای نشان‌دارسازی باید به طور کامل انجام شده و زمان ۵۰ ثانیه فرصت کافی برای واکنش اکسایش را فراهم سازد.

با تغییر غلظت یدوژن (۰٫۱ و ۰٫۲ $mg\ ml^{-1}$) و حجم دی‌کلرومتان (۵۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ µl) نشان‌دارسازی پادتن به روش یدوژن مورد مطالعه قرارگرفت. غلظت یدوژن و حجم دی‌کلرومتان در حالت بهینه ۰٫۱ $mg\ ml^{-1}$ و ۲۰۰ µl به دست آمد. پس از گذشت دو هفته، کارآیی پادتن نشان‌دار به کار رفته در کیت پرتوسنجشی ایمن کاهش چشمگیری داشت.

روش یدوژن نسبت به روش کلروآمین-T ملایم‌تر و در زمان طولانی‌تری انجام شد که می‌تواند بر روی ساختمان پادتن حساس، در طی نشان‌دارسازی تأثیر کم‌تری داشته باشد ولی پادتن نشان‌دار شده‌ی حاصل از این روش از فعالیت ویژه‌ی کم‌تری برخوردار بود و با گذشت زمان، کارآیی آن در کیت کاهش یافت، در صورتی که پادتن نشان‌دار شده با روش کلروآمین-T در زمان کوتاه‌تر با فعالیت ویژه‌ی بالاتر به دست آمد. لازم به ذکر است که پادتن نشان‌دار شده با روش کلروآمین-T نسبت به مقدار ید- ۱۲۵ به کار رفته و شرایط نشان‌دارسازی مقاوم بود. این، در انتخاب نوع پادتن بسیار مهم است.

مقایسه‌ی نتایج حاصل از نشان‌دارسازی در شرایط مختلف نشان داد که روش کلروآمین-T برای این نوع پادتن تک‌تاگی نسبت به روش یدوژن از کارآیی و پایداری بهتری برخوردار است. لذا برای کنترل کیفی کیت پرتوسنجشی ایمن از پادتن نشان‌دار شده با روش کلروآمین-T استفاده شد. تجزیه‌ی ۳۰ نمونه‌ی سرم خون بیماران با کیت داخلی و مرجع خارجی و معیار تصمیم‌گیری ضریب Sig (دو دامنه) برابر با ۰٫۹۹۳ براساس آزمون t، هم‌ترازی دو کیت داخلی و مرجع خارجی را تأیید نمود.

پی‌نوشت‌ها

1. Prostate Speafic Antigen
2. Kallikerin
3. Enzymimmuno assay
4. Radioimmuno assay, IRMA
5. Luminescence assay
6. Monocolonal antiboby
7. Immunoradionetric kit
8. Medix biochemica
9. Gel filtration chromatography
10. Hook
11. Immunotech

مرجع‌ها

[1] M. Frydenberg, Diagnosing prostate cancer, Australian Family Physician, 36 (2007) 345-347.

[2] I.M. Thomson, D.P. Ankerst, Prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer, CMAJ, 176 (2007) 1853-1858.

[3] S.A.R. Kort, F. Martens, H. Vanpoucke, H.L. van Duijnhoven, M.A. Blakenstein, Comparison of 6 automated assays for total and free PSA with special reference to their reactivity toward the WHO 96/670 reference preparation, Clin Chem, 52 (2006) 1568-1574.

[4] G. Brown, N.R. Ling, Murine monoclonal antibodies, In: Catty, D. (ed) Antibodies, a practical approach, IRL Press, Oxford, (1988).

[5] J.W. Feihtner, The early detection and treatment of prostate cancer, J. Urol, 152 (1994) 1682-1684.

[6] M.R.A. Pillai, S.D. Bhandarkar, Radioimmuno assay: principles and practice, Devi printers and binders, Thane, India (1998).

[7] R.H. Seevers, R.E. Counsell, Radioiodination techniques for small organic molecules, Chem. Rev., 82 (1982) 575-590.

[8] A. Bolton, W. Hunter, The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a 125I-containing acylating agent, Biochem. J., 133 (1973) 529-539.

[9] J. Marchalonis, An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins, Biochem. J., 113 (1969) 299-305.

[10] M. Morrison, Lactoperoxidase-catalyzed iodination as a tool for investigation of proteins, Meth. Enzymol., 70 (1980) 214-220.

[11] W.M. Hunter, F.C. Greenwood, Preparation of Iodine-131 labeled human growth hormone of high activity, Nature, 194 (1962) 495-496.

[12] P.J. Franker, J.C. Speck, Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloramide, Biochem. Biophy. Res. Common, 80 (1978) 849-857.

[13] W.G. Wood, Experiences using chloramine-T and 1, 3, 4, 6-Tetrachloro-3a, 6a-diphenylglycoluril (Iodogen®) for radioiodination of materials for radioimmunoassay, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 19 (1978) 1051-1056.

[14] A.P. Richardson, P.J. Mountford, A.C. Baird, E. Heyderman, T.C. Richardson, A.J. Coakley, An improved iodogen method of labelling antibodies with I-123, Nucl Med Commun., 7(5) (1986) 355-362.

Archive of SID

www.SID.ir

J. of Nucl Sci. and Tech.
72, 2015, 46-53

مجله‌ی علوم و فنون هسته‌ای
۷۲، ۱۳۹۴، ۴۶-۵۳

Comparative study of different radioiodination methods of monoclonal antibody for immunoradiometric assay of prostate specific antigen

H. Foroutan*, M. Khodabakhsh, F. Johari Deha, L. Pourabdi
Radiation Applications Research School, Nuclear Science & Technology Research Institute, AEOI, P.O.Box: 11365-3486, Tehran – Iran

Abstract: Prostate specific antigen (PSA), a serine protease, is a highly reliable biochemical marker used for detection and management of prostate cancer. PSA in serum samples is measured by an immunoanalytical technique such as immunoradiometric assays (IRMA). In this study the preparation method and the effective factors on the efficiency and the stability of the labeled anti-PSA monoclonal antibody with I-125 as a tracer in the immunoradiometric kit (IRMA) were investigated. To perform an IRMA assay, at first, the labeled anti-PSA monoclonal antibody was formed using oxidizing agents, namely Chloramine-T and Iodogen, then the product was separated and purified by Sephadex G-25 column. After the determination of radiochemical purity, I-125 labeled antibody was used in the in-house PSA IRMA kit. The effects of the proportion antibody/I-125(17.6-53 µg/mCi), Chloramine-T/antibody (0.75 & 1.5 µg/µg) and the labeling time (15-60 s) on the efficiency and stability of the labeled antibody were studied. According to the calibration curve and concentration of control samples, Chloramine-T radioiodination procedure was optimized (Chloramine-T/antibody: 1.5 µg/µg & labeling time: 50s). The variety of the proportion antibody/I-125 was ineffective in radioiodination efficiency. The Chloramine-T radiolabeled antibody was found to be stable for 30 days when stored at 4°C. Also radioiodination using Iodogen was studied at different Iodogen concentrations (0.1&0.2 mg/ml) and Dichlromethane volumes (0,200&400 µl). According to the obtained results, the appropriate amount of Iodogen and Dichlromethane were obtained to be 0.1mg/ml and 200µl. But Iodogen radiolabeled antibody showed poor immunoradioactivity and stability after two weeks. The results show that the Chlroamine-T procedure is more suitable than the Iodogen method, so the Chloramine-T radiolabeled antibody could be used as a tracer in IRMA system for quality control of in-house PSA kit. By studying the results of t-Test analysis, the decision criteria (sig 2-tailed= 0.993) and confidence interval (95%), it can be seen that the values are well correlated.

Keywords: ***Specific prostate antigen kit, Immunoradiometric assay, Monoclonal antibody, Radioiodination, Chlroamine-T, Iodogen, Sephadex G-25, Immunoradianetric kit***

Archive of SID

*email: hforoutan@aeoi.org.ir
تاریخ دریافت مقاله: ۹۳/۹/۱۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۴/۵/۲۱

www.SID.ir