مجلهٔ دانشکدهٔ پزشکی تهران
شمارهٔ اول ــ مهرماه ۱۳۵۲ - صفحه ۳۱

اندازه گیری شیمیائی بوسیله رادیوایمونولوژی

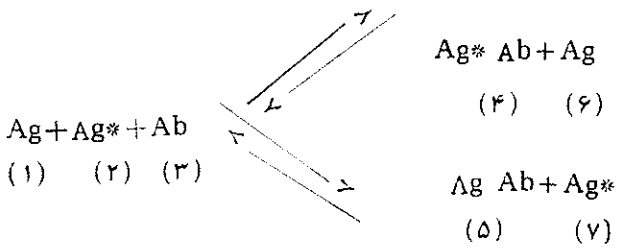
دکتر اکبر ملک‌پور*

Radioimmunoassay ۱ (RIA) جدیدترین وضمناً دقیقترین تکنیکی است که در آزمایشگاههای بیوشیمی برای اندازه‌گیری موادیکه تعداد آنها در حدود 10^{-9} (nongram) و 10^{-12} (picogram) گرم درمایعات بدن می‌باشد بکارمیرود . مزایای این تکنیک دراینست که خصوصیات روشهای ایمنولوژی و حساسیت متدهای Radiochemistry رایکجا دارا می‌باشد .

تکنیک RIA ، برای اولین بار درسال ۱۹۶۰ توسط Yollow وBerson برای اندازه‌گیری انسولین پلاسما مورد استفاده قرارگرفت [۱و۲] . درظرف ۱۳ سال گذشته این تکنیک چنان پیشرفتی نصیبش شده که امروز در بیشتر آزمایشگاههای تحقیقی و بیمارستانهای امریکا برای اندازه‌گیری موادی نظیر ACTH که تعدادمعمولی آن در حدود ۲۰ پیکوگرام دریك cc می‌باشد ازآن استفاده می کنند .

اساس این متد یك واکنش بین آنتی‌ژن (Ag) وآنتی بادی (Ab) است . این آنتی‌ژن ممکن‌است هورمون، ویتامین ،داروی مخدر ویا جسم دیگری باشد (جدول ۱). مثلا برای تعیین مقدار هورمون انسولین (Ag) آنرا بامقدار معینی ازانسولین نشان‌دار (Ag*) مخلوط می کنند . سپس آنتی بادی مخصوصی که بااین آنتی‌ژن میل ترکیبی داشته و می‌تواند باآن باند شود اضافه می‌نمایند. محلول را بمدت معین ودرحرارت ثابتی کمون(Incubate) نموده تا واکنش بحالت تعادل شیمیائی برسد.

بین Ag و Ag* یك رقابت فیزیك وشیمیائی برای متصل شدن بمحل آکتیو آنتی بادی بوجود آمده که این رقابت تا رسیدن واکنش بحالت تعادل شیمیائی ادامه دارد . سپس کمپلکس های AgAb و Ag* Ab رااز Ag و Ag* آزاد جدانموده و مقدار رادیو آکتیویتی Ag* آزاد و یا Ag*Ab را اندازه میگیرند .فرمول زیرین وشکل زیرحلاصه این اعمال را نشان می‌دهد .



۱ ــ Ag ــ هورمون، ویتامین، داروی مخدر، محلولهای استاندارد وغیره

۲ ــ Ag* ــ هورمون ، ویتامین ، داروی مخدر ، محلولهای استاندارد وغیره رادیوآکتیودار (نشاندار)

۳ ــ Ab ــ آنتی‌بادی Ag و Ag*

۴ ــ Ag* Ab ــ کمپلکس آنتی‌بادی وآنتی ژن نشاندار

۵ ــ Ag Ab ــ کمپلکس آنتی بادی وآنتی‌ژن

۶ ــ Ag ــ آنتی‌ژن آزاد

۷ ــ Ag* ــ آنتی ژن نشاندار آزاد .

---

۱ RIA را Radiostereoassay, Competitive Radioassay ویا Immune Radiometric Analysis نیزمی‌خوانند .

* از دانشگاه میشیگان «آمریکا»

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-17]

جدول ۱ ـ نام هورمونها : ویتامین‌ها و سایر موادیکه می‌توان باتکنیك RIA مقدار آنها رادر سرم پلاسما و عصاره بافتها اندازه‌گیری نمود

شماره	آنتی ژن	ایزوتوپ	نمونه(۱)	روش‌جدا کردن(۲)
A	هورمون			
۱	ACTH	I^{125}	P,S	DCC' DA
۲	آلدوسترون	H^3	P,U	سولفات آمونیوم
۳	آندوسترون	H^3	P,S	ژلاتین
۴	رنین (Renin)	I^{125}	P,S	DCC
۵	AngiotensinI	I^{125}	P	زغال
۶	Angiotensin II	I^{125}	P	DCC
۷	کورتیزول	I^{125}	P,S	DCC
۸	کورتیزون	I^{125}	P,S	DCC
۹	Deoxycorticosterone	I^{125}	P,U,S	DA
۱۰	استریول	H^3	P,S	سولفات آمونیوم
۱۱	استرادیول	H^4	P,S	سولفات آمونیوم
۱۲	استرون	H^3	P,S	سولفات آمونیوم
۱۳	گاسترین	I^{125}	P,S	DCC
۱۴	HCG	I^{125}	S,U	DA
۱۵	HFSH	I^{125}	P,S;U	DA
۱۶	HGH	I^{125}	P,S,U	DA
۱۷	HLH	I^{125}	P,S,U	DA
۱۸	HPL	I^{125}	P,S	DA
۱۹	HTSH	I^{125}	P.S	DA,DCC
۲۰	انسولین	I^{125}	P,S,U	DA,DCC
۲۱	پروژسترون	H^3	P,S	DCC
۲۲	تستوسترون	H^3	P,S	DCC
۲۳	T4	I^{125}	P,S,U	DA
۲۴	T3	I^{125}	P,S,U	DA
۲۵	TF تیروکسین‌آزاد	I^{125}	P,S	DA

شماره	آنتی ژن	ایزوتوپ	نمونه(۱)	روش‌جدا کردن(۲)
B	داروهای مخدر وغیره			سولفات آمونیوم
۲۶	مرفین	H^3	P,S,U	DA
۲۷	LSD	I^{125}	P,S,U	DCC
۲۸	اوبائین	H^3	P,S	DCC
۲۹	Digoxin	H^3I^{325}	P,S	DCC
۳۰	Digitoxin	H^3I^{125}	P,S	DCC
C	ویتامین‌ها و غیره			
۳۱	B_{12}			
۳۲	AMP حلقوی	I^{125}	P,S,U	DA
۳۳	HAA	I^{125}	S	SP_Ab (tube)
۳۴	HCG	I^{125}	S,U	DA
۳۵	IgE	I^{115}	S	PS-Ag
۳۶	ایمینوگلوبولین (IgG,IgA,IgM			
	IgE ,IgD مشتقاوت IgG	I^{125}	S	Sp_Ag
	Bence_Jonse)			
۳۷	پروستاگلاندین			
	E	H^3	S,E	DCC
	$E_1\alpha$	H^3	S,E	DCC
	$E_2\alpha$			
۳۸	فو لیك اسید	H^3	S,E	DCC
۳۹	α_Fitopro Tein			
۴۰	ماری وانا			
۴۱	آدرنالین			
۴۲	RNA			
۴۳	Vit D_3	(۴۵)	(۴۶)	
۴۴	پاراتیروئیدهورمون وباربیتول‌هاکلسترول، وغیره‌موادی هستندکه بطریقه RIA آنهارا اندازه‌گیری می‌نمایند			

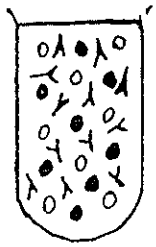
۱ـ p پلاسما، S ـ سرم، Uادرار، -Eـ عصاره‌بافتها

۲ـ DCC ـ Dextran_ Coated _Sharcoal ,DA -Double_Antibody _SP_Ag 'Solid_phase Antigen

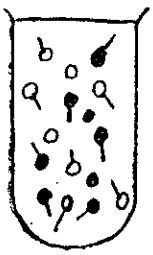
Solid_phase Antibody-SP_Ag

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-17]

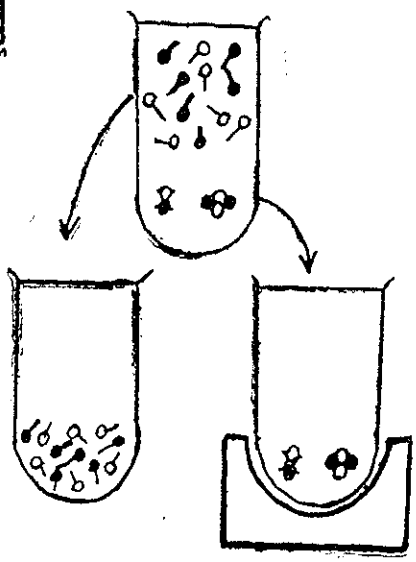
شکل ۱ ـ اساس اندازه گیری انسولین بامتد RIA



۱ ـ سرم و یا محلول استاندارد با انسولین نشاندار و آنتی بادی مخلوط میگردند



۲ ـ مدت ۴ روز در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود تا واکنش بحالت تعادل شیمیائی برسد .



۳ ـ ماده رسوب کننده را به‌محلول اضافه نموده تا Ag و Ag آزاد ته نشین نمایند

۴ ـ پس‌از سانتریفوژ کردن ، دوقسمت‌راجدا نموده شمارش می‌کنند ، سپس نسبت $\frac{B}{F}$ راه‌محاسبه می‌نمایند .

O سرم برای اندازه‌گیری انسولین و یا محلول استاندارد انسولین

● انسولین نشاندار (Insulin ـ I^{125})

۸ ـ آنتی‌بادی انسولین

x ـ ماده‌رسوب دهنده (Dextran-Coated Charcol)

$\frac{B}{F}$ نسبت بین‌انسولین نشاندار یا ند شده با نسولین‌نشاندار آزاد

شکل۲ ـ طرز محاسبه نسبت $\frac{B}{F}$ و ترسیم‌منحنی استاندارد

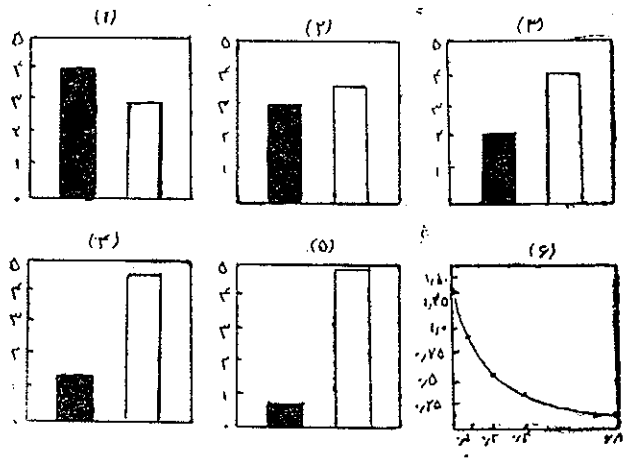
رقت آنتی بادی　　۱: ۱۰۰۰۰

غلظت Ag*　　./۱ ng

غلظت محلولهای استاندارد (Ag)　　o ـ ۰/۸ ng/ml

غلظت‌هورمون (Ag)

* ng/ml



(۱) $Ag = ۰$ ng/ml

$\frac{B}{F} = \frac{۴}{۳} = 1.33$

(۲) $Ag = ۰/۱$ ng/ml

$\frac{B}{F} = \frac{۳}{۳/۵} = ۰/۸۶$

(۳) $Ag = ./۲$ ng/ml

$\frac{B}{F} = \frac{۲}{۴} = ۰/۵$

(۴) $Ag = ۰/۴$ ng/ml

$\frac{B}{F} = \frac{۱/۳}{۴/۶} = ۰/۲۸$

(۵) $Ag = ./۸$ ng/ml

$\frac{B}{F} = \frac{۰/۷}{۴/۹} = ۰/۱۴$

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

(B) آنتی‌ژن باندشده ●

(F) آنتی‌ژن آزاد □

* Nonogram = ng/ml در یك سانتیمتر مکعب .

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-17]

برای تعیین مقدار انسولین (Ag) از منحنی استاندارد کمك میگیرند . جهت رسم این منحنی محلولهای استانداردرا که دارای غلظتهای مناسب می‌باشند آزمایش می‌نمایند . (۲)شکل . برای تبدیل منحنی استاندارد بخط مستقیم از فرمول Midgley و همکارانش می‌شود استفاده نمود

$$\text{Log ity} = (a+b)\ \text{Log ex}$$

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

روش RIA :

هنوز رمز اصلی واکنشی که بین Ag و Ab صورت میگیرد دقیقا روشن نشده است . ولی محقق است که این واکنش سرانجام بحالت تعادل شیمیائی میرسد [۵] واکنش بین Ag و Ab را می‌توان به‌صورت زیر نوشت:

$$Ag + Ab \underset{K_1}{\overset{K}{\rightleftharpoons}} Ag\,Ab$$

K عدد ثابت واکنش رفت و K_1 عدد ثابت واکنش برگشت می‌باشد .

در حالت تعادل شیمیائی برحسب قانون The Law of Mass Action مقدار Keq(عدد ثابت تعادل واکنش) بقرار زیر است .

$$Keq = \frac{K}{K_1} = \frac{[AgAb]}{[Ag]\,[Ab]} \quad (۱)$$

دراینموقع نسبت آنتی‌ژن غیر آزاد (B) (آنتی‌ژن باندشده با آنتی بادی) به آنتی ژن آزاد (F) چنین است .

$$\frac{B}{F} = \frac{[Ag\,Ab]}{[Ag]} \quad (۲)$$

بنابفرض Keq برای Ag* ، Ag (هورمون ، ویتامین، داروی مخدر، محلولهای استاندارد و غیره) مساوی هستند ولی مدت کمون(Incubation)ممکن است تغییراتی دراین اعداد بوجود آورده و Ab تبعیض بین Ag* و Ag بگذارد [۶] در مقدار RIA مقدار [Ag] و [Ab] رادرحالت تعادل شیمیائی می‌توان با فرمولهای زیرین محاسبه نمود .

$$[Ag] = [Ag\ \text{اولیه} - A\,gAb] \quad (۳)$$

$$[Ab] = [Ab\ \text{اولیه} - Ag\,Ab] \quad (۴)$$

باقراردادن مقادیر [Ag] و [Ab] در معادله (۲) معادلهٔ زیرین حاصل می‌شود .

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

باتغییرات مختصری معادله بالا بصورت زیر مرتب میگردد

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

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

$$[AgAb]\left(\frac{B}{F} + ۱\right) = \frac{B}{F}\,[Ag\ \text{اولیه}]$$

$$[AgAb] = \frac{\frac{B}{F}}{\frac{B}{F}+۱}\,[Ag\ \text{اولیه}] \quad (۵)$$

حال اگر فرمولهای (۱) ، (۲) ، (۳) ، (۴) و ۵ باهم درنظر گرفته شوند فرمول زیرین نتیجه می‌دهد :

$$K\left([Ag\ \text{اولیه}] - \frac{\frac{B}{F}}{\frac{B}{F}+۱}[Ag\ \text{اولیه}]\right)\left([Ab\ \text{اولیه}] - \frac{\frac{B}{F}}{\frac{B}{F}+۱}[Ag\ \text{اولیه}]\right) = \frac{B}{F} / \frac{B}{F} + ۱\,[Ag\ \text{اولیه}]$$

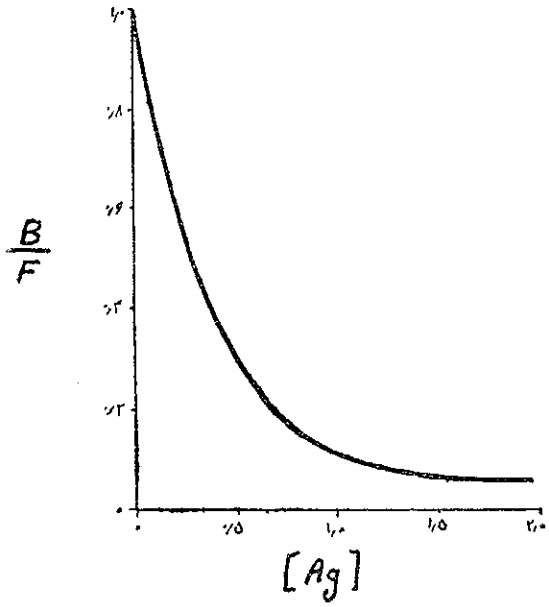
پس از حل این معادله جبری ، معادله کلی زیر بدست می‌آید .

$$\left(\frac{B}{F}\right)^۲ + \frac{B}{F}[۱ + K_{Ag}\ \text{اولیه} - K_{Ab}\ \text{اولیه}] - K_{Ab}\ \text{اولیه} = 0$$

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-17]

این معادله یک معادله درجه دوم یک مجهولی بوده و منحنی آن بشکل (۳) خواهد بود . با توجه به منحنی فوق معلوم می‌شود که هرچه غلظت Ag بیشتر شود مقدار $\frac{B}{F} = \frac{Ag^* - Ab}{Ag^*}$ کمتر خواهد شد . بنابراین تغییرات $\frac{B}{F}$ درحالیکه غلظت Ag نسبت به Ab خیلی کم باشد بسیار زیاد می‌شود: درحالتیکه غلظت Ag صفر باشد نسبت $\frac{B}{F}$ عبارتست از $\frac{B}{F} = Keq[Ab]$ اولیه

لذا Keq که بستگی به Ab دارد رل مهمی در حساسیت تستهای RIA خواهد داشت .



شکل ۳ ـ 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 می‌گیرند :

۱ ـ دقت (Precision) :درمتد RIA دقت بمیزان دوری و نزدیکی مقادیر بدست آمده ازیک سری آزمایشات (که ازیک نمونه بعمل آمده) بمقدار معدل حاصله ازهمان سری بستگی دارد. باین معنی که اگر نتایج حاصله بمعدل مقادیر سری خود نزدیک باشد دقت آزمایش خوب والا نتیجه قابل قبول نخواهد بود.[۳]

جهت معلوم نمودن میزان دقت ، ضریب دقت (λ) راکه آنرا Precision Coeffecient ویا Index of Precision نیز مینامند ، محاسبه می‌نمایند . 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 عدد متناسب آن از Logx کشیده می‌شود [۷] .

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

۲ ـ حساسیت (Sensitivity) حساسیت در RIA بستگی بکمترین مقدار Ag سرم دارد که بتوان آنرا اندازه گیری نمود. بعبارت دیگر تکنیک مورد آزمایش قادر باشد بین سرمی که Ag آن برابر صفر است باسرم دیگری که کمترین مقدار ممکن Ag را دارد تفاوت گذاشته و آنرا اندازه گیری نماید [۹]. در RIA حساسیت سنجش درحدود ۱×۱۰^{-۱۲} (Picogram) گرم Ag می‌باشد.

حساسیت مستقیما بدقت (Titer) و K آنتی بادی مربوط است. بنابراین هرآنتی بادی که با انرژی بیشتر ودررقت مناسبتری بتواند با Ag باند شود حساسیت بیشتری به تست خواهد داد [۱۰]

۳ ـ خصوصیت (Specificity) : اختصاصی بودن Ab برای Ag تحت تاثیر دو عامل مهم می‌باشد یکی Heterogenecity و دیگری Cross_Reaction .

تاکنون آنتی ژنی که بتواند فقط یک آنتی بادی خاص بوجود آورد (Homologous آنتی بادی) گزارش نشده است . معمولا هر Ag در بدن چندین Ab بوجود می‌آورد که آنرا آنتی بادیهای Heterogenous می‌نامند . بنابراین Ag با یک آنتی بادی چند تائی(Multiple Antibodies) برحسب میل ترکیبی و عوامل دیگر موجود بین آنها بایکدیگر باند خواهند شد. رسیدن این واکنش بحد تعادل شیمیائی نیز بستگی بمقدار Keq دارد .

نوع دیگر Heterogenecity نیز وجود دارد و آن عبارت از باندشدن Ag درمحلهای مختلف Ab و به نسبتهای متفاوت است. تکنیکهای جدا وخالص کردن آنتی بادیها کمک زیادی برای دست یافتن بیک آنتی بادی خالصتر و ازبین بردن مشکلات ناشی از Heterogenecity می‌نماید . پی بردن بوجود آنتی بادیهای چندتائی، باعث پیدایش انواع هورمونهای چندتائی نظیر انسولین

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-17]

[۱۱] وپاراتیروئید [۱۲] و گاسترین [۱۳] شده است .

ممکن‌است بین‌دونوع مختلف آنتی‌ژن ولی ازیك جنس و خانواده ، واکنش متقابل (Cross reaction) اتفاق‌افتد . مثلا بین گلیکوپروتئین‌های FSH و LH و TSH این واکنش متقابل ، بطورناقص ویاکامل بوجود می‌آید . واکنش‌متقابل‌بین هورمونهای‌چندتائی ، موادسازنده آنها Precursors ومشتقات آنها دیده می‌شود .

برای‌بدست‌آوردن یك‌نتیجه‌ایده‌آل از RIA باید آنتی‌ژنهائیکه مورداستفاده قرارمی‌گیرند ازیك‌نوع باشند . بعبارت دیگر Ag،*AgوAg استاندارد باید مثل‌هم باشند [۱۴] .

دراینجا ذکراین نکته ضروری‌است‌که واکنش متقابل‌بین داروهای مختلف وهورمونها نیزوجود دارد . بعنوان‌مثال‌میتوان ازواکنش بین‌تیروکسین وDiazepam نامبرد [۱۵] .

۴ ـ درستی (Accuracy) : هر قدرکه جواب یك آزمایش‌بمقدار واقعی‌آن نزدیکتر باشد ، آن‌تست درست‌تراست. بعبارت دیگر هرتیری‌که نزدیکتر بهدف اصابت‌کند ، مهارت تیرانداز را نشان می‌دهد .

درتکنیك RIA درستی‌آزمایشات رابانتایج‌بدست‌آمده‌از طریق Bioassay مقایسه میکنند . Bioassay بعنوان تست‌شاهد (Reference Method) بکارمیرود ولی‌باید درنظرداشت‌که همیشه نمیتوان متد Bioassay را بعنوان شاهد بکاربرد ، زیرا شرایطی‌که بتوان تکنیك RIA رابرای تستهای‌مختلف‌عیناشبیه Bioassay فراهم‌نمود عملا امکان ندارد . راه دیگری‌که‌درستی متد RIA راتحقیق می‌کنند افزودن مقدار معین از Ag بسرم بلانك و مقایسه نتیجه بدست آمده با مقدار واقعی Ag میباشد . بااین متد سریعتر وآسانتر میتوان درستی یك آزمایش را محك زد[۱۶] .

اساس روش RIA

۱- (آنتی‌ژن Ag): هرماده‌ای که‌پس‌ازورودبخون‌حیوان ایجادآنتی‌بادی‌نماید . آنرا آنتی‌ژن مینامند. آنتی‌ژنها بدودسته تقسیم‌میشوندکامل(Complete) ویاناقص (Uncomplete) . دسته‌اول‌ازپروتئین‌ها ، پلی‌ساکاریدها ویالیپوپروتئین‌ها بوده‌که وزن‌مولکولی شان‌از ۱۰/۰۰۰ بیشترمیباشد. این‌گروه‌بایدجسم خارجی (Foreign body) نسبت بمیزبان بوده و ضمناً محلهائی برای‌اتصال بامواددیگر درمولکول خودداشته باشند .

معمولا این مواد از طریق شکم تزریق میشوند تا دیرتر توسط آنزیمها تجزیه شده وخاصیت خودرا ازدست دهند .

آنتی‌ژنهای دسته‌دوم‌که آنهارا (Hapten) نیز مینامند دارای وزن‌مولکولی‌کمتربوده و همراه (Conjugate) باپلی پپتیدها و یاپروتئین‌هامیباشند.این‌آنتی‌ژنها رابا ماده دیگری‌که Freund's Complete Adjuvant مینامند مخلوط نموده و سپس تزریق مینمایند . متصل‌کردن این مواد باپروتئین‌ها و مخلوط نمودن آنهابا ماده فوق ، خاصیت آنتی ژنی بیشتری به آنها میدهد .

بطورکلی‌تهیه‌آنتی‌ژن‌خالص واختصاصی‌که بتواند بآسانی ماده رادیوآکتیو راقبول نموده وخاصیت Immunoreactivity خودراازدست‌ندهدبسیارمهم‌است[۷]. بعضی‌ازموادمثل‌استروئیدها بآسانی و بخوبی با H^3 و C^{14} نشاندار (Tagged)میشوند. هورمونهای دیگر که اززمره پلی‌پپتیدها هستندآسانتر I^{131} و یا I^{125} را قبول می‌نمایند . [۱۷]

رویهمرفته ید رادیوآکتیو را بیشتر برای نشان‌دارکردن آنتی‌ژنهابکارمیبرند. بین I^{131} و I^{125}، دومی را ترجیح میدهند بدلیل‌اینکه I^{131} نیمه‌عمرش‌کوتاه ، نگهداریش مشکل واستقامت (Stability) آن‌کم‌است . جدول (۲)

استفاده‌ازید رادیوآکتیودراندازه‌گیری هورمونهای‌پلی‌پپتید ازاین نظرشیوع پیداکرده است‌که یدمیل ترکیبی‌زیادی‌با اسیدامین‌دار تیروزین‌دارد. ازآنجاکه‌پلی‌پپتیدهادارای‌تیروزین هستندلذانشاندارکردن آنهاباید رادیوآکتیو آسانتر و استقامت آنهم‌بیشتر است . فاکتورهای دیگری‌که درانتخاب عناصررادیو آکتیو مؤثرند بقراردزیرند [۱۸] :

الف:قابلیت شمارش‌کردن(Counting Capability) . I^{125} اشعه‌گاما منتشرمی‌کند وچون‌اشعه γ قدرت‌نفوذش‌دراجسام زیاداست لذابرای شمارش‌کردن Scintillation آن‌از ظروف ضخیمی استفاده می‌نمایند . ولی H^3 که‌اشعه β منتشر می‌کند . (عبوراین اشعه حتی‌بوسیله یك‌ورق‌کاغذ جلوگیری میشود) برای شمارش‌کردن آن احتیاج‌به Liquid Scintillation دارد.

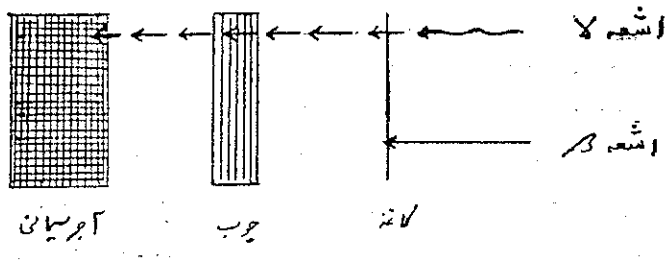
شکل (۴) امروزه بیشتر از عناصری‌که اشعه γ منتشر میسازند استفاده می‌شود .

ب : هزینه . برای اندازه‌گیری اشعه β احتیاج‌به کوکتل (Cocktail) می‌باشد بنابراین هزینه آزمایشاتی‌که با H^3 ونظایرآن انجام میشود بالنسبه‌گرانتراز I^{125} است .

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-17]

جدول ۲ ـ نیمه‌عمر واشعه منتشره از ایزوتوپهای مختلف

ایزوتوپ	نیمه عمر	اشعه منتشره
I^{131}	۸ روز	γ (۱۴۳)
P^{32}	۱۴ روز	β
Cr^{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



شکل ۴ قدرت نفوذکنندگی اشعه γ و β

ج ـ استقامت ، نیمه‌عمر ومیزان خطرکارکردن با انواع مختلف‌رادیوآکتیو عوامل‌دیگری هستندکه درانتخاب آنتی‌ژنها برای نشاندارکردنشان دخالت دارند .

بعدازنشاندارکردن آنتی‌ژن ، برای جدانمودن و خالص کردن آن تکنیکهای مختلفی بکار میبرند . از جمله روش Adsorption Column Chromatography است که از پودر سلولز استفاده می‌نمایند . پس‌ازعبور محلول‌ازستون‌کرو- ماتوگرافی ، نمکهای معدنی و (Ag) آزاد در ستون باقیمانده ولی آنتی‌ژن نشاندار(Ag*) از ستون خارج میشودکه میتوان آنرا بدست آورد . برای خلوص بیشتر وسایل حساستری نظیر Starch_gel و polyacrylamid gel الکتروفورز بکار میبرند . سرانجام باید درجه خلوص و میزان رادیوآکتیویتی آنتی‌ژن نشاندار شده‌را اندازه‌گیری نموده وثبت نمود .

۲ ـ آنتی‌بادی (Ab) :

عامل‌دیگری‌که دربالابردن ارزش‌تکنیك RIA اثرمهمی دارد تهیه‌یك آنتی‌بادی خالص ومؤثراست . آنتی‌بادیها گروهی ازپروتئین‌های‌سرم‌هستندکه‌آنهارا‌ایمنوگلوبولین‌نیزمی‌خوانند. بیشتر ایمنوگلوبولین‌ها از کلاس IgGهستند . سایر دسته‌های ایمنوگلوبولین (Immunoglobulin) را IgA، IgM، IgD، IgE نام نهاده‌اند . این گلوبولین‌ها نه تنها دارای Antibody Reaction Sites ـ هستند بلکه دارای Antigenic determinant Sites بوده و می‌توانند رل آنتی‌ژن راهم بازی نمایند . وقتی‌که این مواد به حیوانی تزریق شوند Antigenic ـ binding Site روی‌زنجیرهای سنگین (H) وسبك (L) ایمنوگلوبولینIgG اقامت‌می‌گیرند (۱۰) .

جهت‌تهیه آنتی‌بادی ، آنتی‌ژن خالص‌را با Freund's Adjuvant (مخلوطی ازروغن‌معدنی، واکس‌ها وباسیلهای‌کشته شده است‌که قدرت آنتی‌ژنی آنتی‌ژن را افزایش می‌دهد) [۱۹ و ۲۰] مخلوط نموده ، به‌یك‌یا چند حیوان تزریق می‌نمایند . تعداد ونوع حیوان، (موش، خوکچه هندی، گوسفندبزومیمون) بستگی بمقدار آنتی‌بادی مورد نیاز دارد . این عمل را چندین بارتکرار نموده وهربار مقدارآنتی‌ژن تزریقی راکم می‌کنند . پس‌از بوجودآمدن آنتی‌بادی ، ازقلب و یا شریان‌گوش حیوان خون‌می‌گیرند . سرم رابعد ازلخته شدن خون ، جدا نموده و آنتی‌بادی حاصله رااز نظرتیتر (Titer) ، اختصاصی بودن و میزان میل‌ترکیبی آن‌بآنتی‌ژن آزمایش می‌نمایند .

معمولا تیتر آنتی بادی را طوری تنظیم مینمایند که مقدار $\frac{B}{F}$ مساوی واحدگردد، باین‌معنی که‌فقط‌مقدار ۵۰ درصدآنتی‌ژن‌نشاندار(Ag*) بتواندباآنتی بادی‌باندشود(شکل۳) [۲۱]. همانطوریکه قبلا گفته شد اینگونه آنتی‌بادیها هتروژن (Heterogenous) بوده وبایدباکمك تکنیکهای‌مناسب، آنتی - بادی خالصتری بدست آوردکه میل ترکیبی آن باآنتی ژن زیاد باشد .

۳ ـ جداکردن آنتی‌ژنهای آزاد از آنتی ژنهای باند شده :

جداکردن‌آنتی‌ژنهای آزاد (Ag*وAg) ازکمپلکسهای AgAb و Ag*Ab عمل‌مهم دیگری درتکنیك RIA می‌باشد .

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-17]

روشهائیکه برای این منظور بکار میروند بستگی بنوع آنتی‌ژن و آنتی‌بادی مورد مصرف داشته وعبارتند از [۲۲] (جدول ۱):

الف : رسوب دادن کمپلکسهای AgAb و Ag*Ab : بـرای رسوب دادن ایـن کمپلکسها معمولا محلول ۵۰ درصد سولفات آمونیوم بکارمیبرند . بااین روش کمپلکسها رسوب نموده و Ag و Ag* آزاد در محلول باقی میماند. در اندازه گیری استروئیدها، پروستاگلاندین‌ها و AMP حلقوی از این محلول استفاده میکنند [۲۳]

ب ـ Double antibody Technic : کـمپلکسهای فوق را بکمك آنتی بادی مخصوص دیگری که فقط با آنها باندمیشود رسوب می‌دهند . ازاین متد در اندازه گیری هورمونهای پلی‌پپتید استفاده می‌شود [۲۴] .

ج ـ Solid_Phase Adsorption of Free Ag مواد نظیر Dextran Albumin Coated with Charcol، تالك، Florisil، QUSO، Sephalex و یا بعضـی از رزینها میتوانند Ag* آزاد را بخود جذب نموده و آنرا از محلول جدا سازند . برای اندازه‌گیری استروئیدها بیشتر زغال و Florisil بکارمیبرند [۲۵] .

د ـ Solid Phase Antibodies : یکی از روشهای جدید جدا کردن کمپلکس‌ها از آنتی‌ژنهای آزاد اینست که کمپلکس‌ها بوسیله مواد دیگری که غیر محلول هستند جذب شوند . باسانتریفوژ کردن و ته‌نشین دادن مواد غیر محلول ، کمپلکس‌ها از آنتی‌ژنها جدا می‌شوند [۲۶].

هـ ـ کرموالکتروفرازز (Chromoelectrophoresis): بااستفاده ازروش‌های کرموتوگرافی والکترو فرازز نیز می‌توان کمپلکس‌ها را از Ag ها جدا نمود [۲۷] .

۴ـ حرارت وزمان کمون (Incubation) حرارت وزمانی که لازم است تا واکنش بحالت تعادل شیمیایی خود برسد عوامل مهمی در تکنیك AIR می باشد. زمان لازم برای رسیدن به این تعادل بستگی بطرز تهیه‌های مختلف داشته وممکن 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 چهاردرجه سانتی گراد انجام میشود . آزمایشات دیگری هستند که در حرارت معمـولی آزمایشگاه بحالت تعادل شیمیائی میرسند . [۲۲]

اصطلاحات (Terminology) = جهت آشنائی باسایر تکنیکهائی که : شبیه RIA بوده ولی بانامهای دیگری خوانده می‌شوند و تکنیکهای دیگری که با RIA تفاوت کلی دارند ، لازم است توضیحاتی داده شود . لذا این مختصر بمقاله افزوده شده است .

۱ـ Saturation یا Displacement Analysis [۲۸] Analysis (۲۹) : در تعیین مقدار انسولین و یا T4 مقدار محدود ومعینی از آنتی بادی (Ab) را با مقدار زیادی از Ag و Ag* مخلوط می نمایند . این دو آنتی‌ژن رقابت برای متصل شدن بآنتی‌بادی نموده تا واکنش بحالت تعادل شیمیائی برسد . لـذا این دو تکنیك که کاملا نظیر RIA می‌باشند در بعضی کتابها ومقالات بنام های فوق ، خوانده می‌شوند .

۲ ـ Radio-Ligand Binding Analysis [۳۰] دراین متد Ag و Ag* را اولین مولکول یا Ligand و Ab را دومین مولکول و یا Spcific Reactor می‌خـوانند . مولکول دوم ممکن است پروتئین و یا غیر پـروتئین باشد ولی مولکول کوچکتر بایدشامل ماده نشاندار (Ag*) باشد .

۳ ـ Radioenzymatic [۳۱و۳۲] اگر مولکول دوم از آنزیم‌ها باشد مثل اسیدفولیك ردکتاز Folic Acid Reductase این متد را Radioenzymatic می گویند .

۴ـ Competitive Protein Binding Analysis [۳۳] درمتد CPBA مولکول دوم پروتئین بوده ومولکول اول (Ligand) بطوراختصاصی بآن متصل می‌شود . پروتئین‌هائیکه بعنوان مولکول دوم دراین سری ازتجزیه‌ها بکار میروند آلبومین وگلبولین‌های پلاسمای خون ویاپروتئین‌های Tissue Receptors میباشند. بعضی اوقات از گلوبین‌های خاصی که دارای خاصیت ایمنی نمیباشند (non - Immunologic globulin) بجای پروتئین‌های فوق‌الذکر استفاده مینمایند که عبارتند :

الف ـ Corticosteroid _Binding Globulin (CBG) که از پلاسمای انسان ویا سك بدست آمده و برای اندازه گیری کورتیکوئیکوئید و پروژستین بکار میرود [۳۴ و ۳۵] .

ب ـ Thyroxin - Binding Globulin (TBG) کـه برای اندازه گیری هورمون تیروکسین مصرف می‌شود . [۳۶ و ۳۷]

ج ـ Progesteron Binding Protein [۳۸] . از پلاسمای خوکچه‌هندی بدست آمده و برای اندازه گیری پروژسترون بکار میرود.

د ـ Testostero_ Binding Protein [۳۹] که در اندازه گیری تستوسترون استفاده می‌شود.

همچنین ازمتد CPBA برای تعیین مقدار آلدوسترون ، AMP حلقوی ، انواع ویتامین‌های D و B_{12} و

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-17]

Antithydroglobulin Antibodies نیز استفاده می‌نمایند .

دراین‌متدچون پروتئین بعنوان‌مولکول دوم مورد استفاده قرارمیگیرد ، لذا بایدپروتئین‌های غیر لازم سرم راکه احتمال باندشدن باآنتی‌ژن رادارند ، بوسیله الکل یامحلول آلی‌دیگری ازسرم جدانمود . این‌عمل‌میزان میل ترکیبی‌پروتئین موردنظر راباآنتی ژن‌کاهش می‌دهد . درحالیکه در RIA مولکول دوم Ab بوده ولازم‌نیست‌که پروتئین‌های غیرلازم سرم رااز پروتئین موردنظر جدانمود . البته‌دست یافتن به Ab خالص و اختصاصی ماهها وقت میگیرد ولی‌پس‌از یافتن‌آن ، دقت‌عمل ، مقدارصرف وقت هزینه‌آزمایشات بسیارکمتر از CPBA خواهد بود .

۵ – Immunoradiometric Assay [۴۰]

دراین متد Ab بجای Ag حامل‌ماده رادیو آکتیـویته می‌باشد . فوائداین‌متدعبارتند از : اولا Ab کەدارای مولکولهای بزرگتر ویکنواخت‌تری‌ازمولکولهای‌کوچك Ag هستند بآسانی‌قابل‌رادیو آکتیوشدن (Tagged) میباشند . ثانیاآنتی‌ژنهای غیرنشاندار بیشتر وبهتر می‌توانند دراکنش شرکت‌کنند. ثالثا Ab بهتر از Ag قابل‌نگهداری است . ازاین‌تکنیك برای اندازه‌گیری انسولین ، هورمون رشد وکالسی‌تونین وغیره استفاده میشود .

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. I.

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. Gasterology, 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 Polype - ptide 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

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-17]

22_ Daughaday, W. H. and Jacobs, L. S., In W. D. Odell and W. H. Daughaday (eds.) Principles of Cumpetitive 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.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-17]