Downloaded from journal.bums.ac.ir at 10:00 IRST on Sunday February 25th 2018

# اندازه‌گیری ثابت تمایل (افینیتی) آنتی‌بادی مونوکلونال IgG ضد آنزیم الکالین فسفاتاز با استفاده از روش الیزا

**محسن ناصری[۱]- دکتر سیدمحمد مؤذنی[۲]- دکتر علی‌اکبر پورفتح‌الله[۲]- بهزاد مصباح‌زاده[۳]**

## چکیده

**زمینه و هدف:** افینیتی آنتی‌بادی به آنتی‌ژن در بسیاری از موارد تأثیر بیولوژیکی مهمی در فعالیت آن آنتی‌بادی و همچنین در انجام سنجشهای آزمایشگاهی ایمونولوژیکی مانند رادیو ایمونواسی (RIA) و ایمونوهیستوشیمی دارد. مطالعه حاضر با هدف سنجش افینیتی آنتی‌بادی مونوکلونال محصول کلون هیبریدومای A1G8F7 تولید شده نسبت به آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) انجام گردید.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، روشهای متعددی برای تعیین افینیتی و آویدیتی آنتی‌بادی تاکنون ابداع شده‌اند. در همه این روشها از سیستمی استفاده شده که در آن آنتی‌ژن و آنتی‌بادی با هم به تعادل برسند و آنگاه بدون تغییر دادن حالت تعادل، مقادیر آنتی‌ژن آزاد و آنتی‌ژن همراه شده با آنتی‌بادی سنجیده می‌شود. در این تحقیق از یک روش سریع الیزای رقابتی- که افینیتی آنتی‌بادی را در حالت محلول اندازه‌گیری می‌کند- برای سنجش میل پیوندی آنتی‌بادی مونوکلونال IgG ضد آلکالین فسفاتاز تولید شده از کلون $A_1G_8F_7$ استفاده شد.

**یافته‌ها:** غلظت ثابت آنتی‌بادی برای استفاده در الیزای اختصاصی مرحله دوم تعیین Dissociation Constant ($K_d$) به روش کلاتز، توسط یک الیزای رقابتی برابر ۱μg به دست آمد؛ با رسم نمودار کلاتز $K_d$ کلون $A_1G_8F_7$ برابر $۳/۸\times۱۰^{-۹}$ تخمین زده شد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به این که $K_d$ آنتی‌بادی‌های طبیعی بدن برای بیشتر آنتی‌ژن‌ها بین ۷-۱۰ الی ۱۱-۱۰ متغیر است و با توجه به این که هر چه اندازه $K_d$ کوچکتر باشد، افینیتی آنتی‌بادی بیشتر خواهد بود، آنتی‌بادی ترشحی از کلون A1G8F7 برای بیشتر سنجشهای ایمونولوژیکی مناسب به نظر می‌رسد. عملاً در آزمایشهای ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی که با این آنتی‌بادی مونوکلونال- همراه با آنزیم ALP در لایه سوم- انجام گردید، نتیجه رنگ‌آمیزی بسیار عالی و قابل مقایسه با نمونه مشابه تجارتی (APAAP شرکت Dako) بود.

**واژه‌های کلیدی:** آنتی‌بادی مونوکلونال؛ افینیتی؛ آویدیتی؛ الیزا؛ آلکالین فسفاتاز

**مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند (دوره ۱۱, شماره ٤, سال ۱۳۸۳)**

[۱] نویسنده مسؤول؛ کارشناس ارشد ایمونولوژی؛ عضو هیأت علمی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند
آدرس: بیرجند- خیابان غفاری- دانشگاه علوم پزشکی بیرجند- دانشکده پزشکی- بخش ایمونولوژی
تلفن: ۰۵۶۱-۴۴۴۳۰۴۱ دورنگار: ۰۵۶۱-۴۴۴۳۰۰۱ پست الکترونیک: naseri_m2003@yahoo.com
[۲] دانشیار گروه آموزشی ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران
[۳] کارشناس ارشد فیزیولوژی؛ عضو هیأت علمی گروه آموزشی فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند

Downloaded from journal.bums.ac.ir at 10:00 IRST on Sunday February 25th 2018

## مقدمه

### تعیین میل پیوندی[§] آنتی‌بادی

افینیتی یک آنتی‌بادی به آنتی‌ژن مربوطهٔ خود، در بسیاری موارد تأثیر بیولوژیکی مهمی در عمل آن آنتی‌بادی دارد؛ همچنین تولید زیاد آنتی‌بادی‌های با افینیتی پایین به عنوان یک نقص ایمنی در نظر گرفته می‌شود. افینیتی آنتی‌بادی بدون شک در ایمونوپاتولوژی بیماریهای خودایمن و بیماریهای کمپلکس ایمنی نیز دخالت دارد (۱-۴).

نقش افینیتی آنتی‌بادی در روشهای ایمونواسی مانند الیزا، RIA[**]، ایمونوسیتوشیمی، ایمونوهیستوشیمی، افزایش اتصالات اختصاصی و کاهش اتصالات غیر اختصاصی و در نتیجه افزایش ضریب اطمینان جواب آزمایش خواهد بود.

تاکنون روشهای متعددی برای تعیین افینیتی و آویدیتی آنتی‌بادی ابداع شده‌اند. در هریک از این روشها از سرمی استفاده می‌شود که در آن آنتی‌ژن و آنتی‌بادی با هم به تعادل رسیده‌اند ($Ab+Ag \rightleftharpoons Ab\text{-}Ag$)؛ آنگاه بدون تغییر دادن حالت تعادل، مقادیر آنتی‌ژن آزاد و آنتی‌ژن همراه شده با آنتی‌بادی، سنجیده می‌شود. برای انجام این کار، چند راه وجود دارد. برخی از محققان با استفاده از روشهای فیزیکی مانند دیالیز، فیلتراسیون با ژل، سانتریفوژ و رسوب، آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن آزاد را از آنتی‌ژن متصل به آنتی‌بادی جدا می‌کنند (۵-۷). برخی نیز از تغییرات به وجود آمده در ویژگیهای فلئورسنت آنتی‌ژن متصل به آنتی‌بادی استفاده می‌کنند (۸).

با استفاده از اطلاعات به دست آمده از این روشها، می‌توان ثابت تعادل (یعنی میل پیوندی یا $K_a$[††]) را به دست آورد:

$$K = \frac{[Ab\text{-}Ag]}{[Ab][Ab]}$$

در این معادله، [Ab-Ag] معادل غلظت آنتی‌ژن متصل به آنتی‌بادی، [Ag] معادل غلظت آنتی‌ژن آزاد و [Ab] معادل غلظت نواحی آزاد متصل‌شونده به آنتی‌ژن در حال تعادل است.

واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی یک واکنش تعادلی به صورت زیر است:

$$[Ab] + [Ag] \rightleftharpoons [x]$$

چنانچه [Ab] غلظت جایگاههای آزاد آنتی‌بادی، [Ag] غلظت جایگاههای آزاد آنتی‌ژن، [x] غلظت کمپلکس Ag-Ab، [Abt] غلظت آنتی‌بادی کل و [Agt] غلظت آنتی‌ژن کل فرض شوند، با تغییراتی در معادله فوق معادله کلاتز به دست می‌آید:

Klotz Equation: $[Abt]/[x]= K_d/[Ag]+1$

حال چنانچه غلظت [Abt] و [Agt] را داشته باشیم، تعیین میزان $K_d$ یا $K_a$ مستلزم دانستن یکی از سه شاخص [Ab]، [Ag] یا [x] خواهد بود (۹).

مطالعه حاضر با هدف سنجش افینیتی آنتی‌بادی مونوکلونال محصول کلون هیبریدومای A1G8F7 تولید شده در دانشگاه تربیت مدرس تهران، نسبت به آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) انجام گردید.

## روش بررسی

### اندازه‌گیری افینیتی آنتی‌بادی در حالت محلول با استفاده از روش الیزای رقابتی:

برای اندازه‌گیری $K_d$ کلون A1G8F7 در این مطالعه تجربی، از یک روش الیزای رقابتی که افینیتی آنتی‌بادی را در حالت محلول اندازه‌گیری می‌کند، استفاده شد؛ این روش دارای دو مرحله اساسی می‌باشد:

الف- ابتدا بایستی آنتی‌بادی در یک غلظت ثابت (که تعیین مقدار این غلظت توضیح داده شده است)، با رقتهای متوالی از آنتی‌ژن، در لوله مجاور شوند تا در یک فاز محلول به تعادل برسند.

ب- سپس میزان آنتی‌بادی آزاد باقیمانده در هر یک از رقتها - پس از رسیدن به حالت تعادل در لوله- با روش الیزای غیر مستقیم- که در آن آنتی‌ژن کف پلیت کوت شده است- ارزیابی گردد (۱۰،۱۱).

---

§ Affinity
** Radioimmunoassay (RIA)
†† Association Constant ($K_a$)

Downloaded from journal.bums.ac.ir at 10:00 IRST on Sunday February 25th 2018

**تعیین غلظت ثابت آنتی‌بادی:**

برای این که تخمین صحیح از غلظت آنتی‌بادی آزاد در حال تعادل به وجود آید، چند نکته باید در نظر گرفته شود:

۱- جذب[‡‡] به‌دست‌آمده در مرحلهٔ آخر الیزای غیرمستقیم -که غلظت آنتی‌بادی آزاد را منعکس می‌کند- بایستی با غلظت آنتی‌بادی تست شده، متناسب باشد.

۲- فقط درصد کمی از مولکول‌های آنتی‌بادی آزاد (کمتر از ۱۰٪)، بایستی به آنتی‌ژن‌های کوت‌شده در کف پلیت الیزا متصل شوند؛ زیرا از هر گونه اختلال در تعادل فاز مایع جلوگیری شود.

۳- چون $K_d$ معمولاً به حرارت وابسته است، دما بایستی در تمام مراحل ثابت نگاه داشته شود.

برای رعایت نکات ۱و۲، نیاز به تعیین دامنه غلظت آنتی‌ژن کوت‌شده و زمان مطلوب انکوباسیون محلول آنتی‌بادی در چاهک کوت‌شده است. برای به دست آوردن این دامنه از غلظت آنتی‌بادی از یک روش الیزای غیرمستقیم به شرح زیر استفاده گردید:

۱- دو پلیت الیزا به کار برده شد؛ در پلیت شماره ۱، به ۳ ردیف و در پلیت شماره ۲ به ۲ ردیف از چاهکها، ۱ μg/ml آلکالین فسفاتاز - به عنوان آنتی‌ژن- اضافه شد و پلیت‌ها یک شب در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفتند.

۲- به پلیت شماره ۱، پس از ۳ بار شستشو، رقتهای ۱/۲ الی ۱/۶۴ از آنتی‌بادی خارج شده با غلظت ۲ μg/ml به صورت تریپلیکیت (Triplicate) اضافه شد. از PBS[§§]-T به عنوان شاهد منفی و از سرم موش با رقت ۱/۱۰۰۰ به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. برای نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد عمل انکوباسیون انجام شد.

۳- محتویات این پلیت - هر ردیف سه‌تایی در یک اپندرف جداگانه- با دقت جمع‌آوری شد (که کمی کمتر از ۳۰۰ میکرولیتر اپندرف خواهد شد) و به پلیت دوم به صورت دوتایی به همان ترتیب قبلی اضافه شد و برای نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد.

۴- برای هر پلیت پس از پایان انکوباسیون مراحل آزمایش الیزا ادامه یافت.

۵- نموداری بر حسب جذب نوری به دست آمده از دو پلیت در مقابل رقتهای مختلف آنتی‌بادی رسم شد (نمودار ۱).

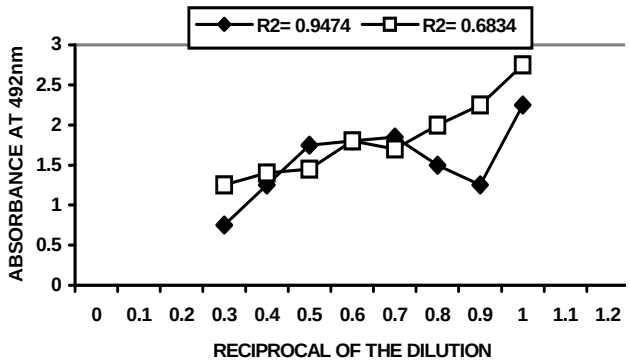
بالاترین رقت از آنتی‌بادی (یعنی کمترین غلظت ممکن) که نمودار حاصل از پلیت‌های ۱ و ۲ بر هم منطبق باشند، انتخاب شد (رقت ۱/۴ که برابر با غلظت ۱/۲μg می‌باشد).

**تعیین Dissociation Constant ($K_d$)**

۱- به پلیت الیزا آلکالین فسفاتاز (به عنوان Ag) با غلظت ۱ μg/ml افزوده شد و عمل کوتینگ در دمای ۴ درجه سانتیگراد برای یک شب انجام شد.

۲- در ۱۰ لوله به میزان ۲۵۰ میکرولیتر از ۱۰ سریال رقت مختلف آنتی‌ژن (تهیه شده در PBS-T از رقت ۱۰۰ μg/ml تا ۰/۳۹ μg/ml) اضافه شد؛ سپس به آنها ۲۵۰ میکرولیتر از رقتی از آنتی‌بادی که در مرحله اول تعیین شد، (۱/۴) افزوده شد. در یک لوله (لوله شماره ۱۱) ۵۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی بدون حضور آنتی‌ژن اضافه شد.

۳- تمامی لوله‌ها برای یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند تا واکنش آنتی‌ژن- آنتی‌بادی به تعادل برسد.




**نمودار ۱- نمودار مربوط به تعیین غلظت ثابت آنتی‌بادی مونوکلونا پیل $A_1G_8F_7$**

[‡‡] Optical Density (OD)
[§§] Phosphate Buffered Saline (PBS)

Downloaded from journal.bums.ac.ir at 10:00 IRST on Sunday February 25th 2018

۴- به منظور بررسی میزان آنتی‌بادی آزاد موجود در هر لوله به صورت دوتایی از محتوی لوله‌ها به پلیت الیزا که در بند یک تهیه شده بود؛ اضافه شد و آزمون الیزا انجام شد.

۵- با روش کلاتز افینیتی محاسبه شد.

معادله کلاتز : $\frac{A_0}{A_0 - A_1} = KD/[Agt1]+1$

$A_0$: جذب نوری چاهکی است که حاوی محتویات اپندرف فاقد آنتی‌ژن است.

$A_1$: جذب نوری خوانده شده از چاهکی است که حاوی محتویات اپندرف شماره ۱- که دارای بالاترین مقدار آنتی‌ژن (۱۰۰ µg) است- می‌باشد. مقدار x نیز برابر $[^1/Ag_{tn}]$ خواهد بود؛ البته بایستی در این فرمول غلظت آنتی‌ژن برحسب مول باشد.

## یافته‌ها

غلظت مناسب محلول آنتی‌بادی برابر ۱/۲µg/ml به دست آمد؛ البته همان‌طور که قبلاً نیز بیان شد، غلظت محلول آنتی‌بادی در لوله‌ها بایستی دو برابر در نظر گرفته شود؛ زیرا پس از افزودن محلول آنتی‌ژن هم حجم آن، غلظت آنتی‌بادی به نصف (۱/۲ µg) کاهش می‌یابد. چنانچه از سوپ سلولی تخلیص‌نشده برای تعیین افینیتی استفاده شود، بایستی به کمک الیزای اختصاصی مرحله اول، رقت ثابتی از سوپرناتانت لازم برای مرحله دوم (تعیین $K_d$) به دست آید و غلظتهای متغیر آنتی‌ژن در لوله با این رقت به دست آمده در مرحله اول مجاور شود.

همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، در مرحله تعیین $K_d$، سریال رقت آنزیم ALP از ۱۰۰µg/ml تا ۰/۱۸ µg/ml (۲۵۰ میکرولیتر از هر غلظت) انتخاب شد که به هر یک از آنها نسبت ۱:۱ از محلول آنتی‌بادی با غلظت ثابت ۲/۴ µg/ml اضافه شد.

در مرحله بعد - پس از انجام واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در لوله- محتوی لوله‌ها به پلیت الیزای کوت شده با ۱µg آنتی‌ژن ALP اضافه شد و پس از انجام آزمون الیزا جذب نوری آنها در ۴۹۲ نانومتر قرائت گردید.

طبق معادله کلاتز، اگر اعداد به دست آمده از دستگاه قرائتگر الیزا را در این معادله قرار دهیم، y معادله که همان $\frac{A_0}{A_0 - A_n}$ می‌باشد، به دست می‌آید و مقدار x معادله نیز $[^1/Ag_{tn}]$ می‌باشد؛ مقدار غلظت آنزیم ALP -که به صورت سریال رقت در مرحله دوم تعیین $K_d$ به کار گرفته شده بود- را برحسب مول حساب نموده، به جای $Ag_{tn}$ قرار می‌دهیم (نمودار ۲).

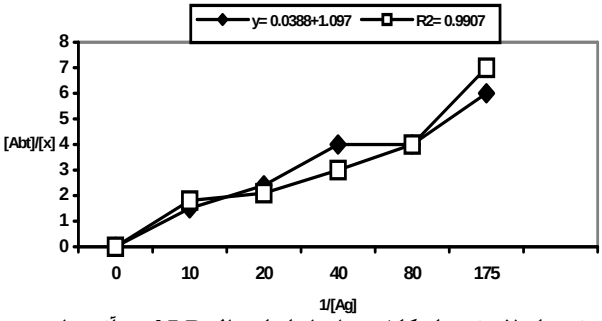
## بحث و نتیجه‌گیری

اندازه‌گیری دقیق افینیتی آنتی‌بادی عملاً آسان نمی‌باشد. برای آنتی‌ژن‌های محلول که به آسانی خالص می‌شوند، می‌توان مقدار لازم آنتی‌ژن خالص را به دست آورد و نشاندار نمود. در این صورت، روش RIA با آنالیز اسکاچارد، که امکان محاسبه ثابت افینیتی را می‌دهد، مناسب است.

**جدول ۱- نتایج مربوط به تعیین $K_d$ کلون $A_1G_8F_7$**

| شماره لوله | ۲۵۰ میکرولیتر آنتی‌بادی (µg/ml) | ۲۵۰ میکرولیتر آنزیم آلکالین فسفاتاز (µg/ml) | جذب |
|---|---|---|---|
| ۱ | ۲/۴ | ۲۵ | ۰/۱۲۳ |
| ۲ | ۲/۴ | ۱۵ | ۰/۱۳۳ |
| ۳ | ۲/۴ | ۱۲/۵ | ۰/۱۴۵ |
| ۴ | ۲/۴ | ۱۰ | ۰/۱۳۵ |
| ۵ | ۲/۴ | ۸ | ۰/۱۵۶ |
| ۶ | ۲/۴ | ۶/۲۵ | ۰/۱۵۷ |
| ۷ | ۲/۴ | ۴ | ۰/۲۲۷ |
| ۸ | ۲/۴ | ۳/۲۵ | ۰/۲۱۵ |
| ۹ | ۲/۴ | ۱/۵۶ | ۰/۳۲۷ |
| ۱۰ | ۲/۴ | ۰/۷۸ | ۱/۰۳۲ |
| ۱۱ | ۲/۴ | ۰/۳۹ | ۱/۲۳۱ |
| ۱۲ | ۲/۴ | ۰/۱۹ | ۱/۳۲۱ |
| ۱۳ | ۲/۴ | ۰/۰۹ | ۱/۳۵۱ |
| ۱۴ | ۲/۴ | ۰/۰۰ | ۱/۳۵۳ |
| ۱۵ | شاهد منفی (PBS) | | ۰/۰۸ |

Downloaded from journal.bums.ac.ir at 10:00 IRST on Sunday February 25th 2018




**نمودار ۲- نمودار کلاتز حاصل از اتصال ALP به آنتی‌بادی مونوکلونال $A_1G_8F_7$**

چون در مراحل نشاندارکردن پروتئین، کوچکترین تغییری در مولکول آنتی‌ژن ممکن است اپی‌توپ اختصاصی آنتی‌بادی را از بین ببرد یا حداقل افینیتی اتصال آنتی‌بادی را تغییر دهد، نتایجی که از به کاربردن آنتی‌ژن نشاندار به دست می‌آید باید با احتیاط تفسیر شود. هنگام به کاربردن آنتی‌بادی آزاد – وقتی آنتی‌بادی نشاندار در آزمون به کار برده می‌شود– ثابت افینیتی به دست آمده، ممکن است تغییر نماید (۱۳،۱۲).

همچنین بایستی توجه داشت که اغلب آنتی‌سرم‌های پلی‌کلنال حاوی جمعیت گوناگونی از آنتی‌بادی علیه قسمتهای مختلف یک آنتی‌ژن است و هر آنتی‌بادی دارای مقادیر K خاص خود است؛ تحت این شرایط دیگر نمودار اسکاچارد خطی نخواهد بود و به صورت یک منحنی در می‌آید که نشانگر ترکیب شدن خطها از هر آنتی‌بادی است.

تعیین یک شاخص کمی، شبیه ثابت تجزیه تعادلی یک کمپلکس Ab-Ag، به روش قابل اعتماد و مطمئنی نیاز دارد. دیالیز تعادلی، روش انتخابی برای هاپتن‌ها و آنتی‌ژن‌های قابل دیالیز می‌باشد؛ در صورتی که برای آنتی‌ژن‌های ماکرومولکولی قابل انجام نمی‌باشد.

از روشهای بسیاری از قبیل الیزا، Surface Plasmon Resonance با آنتی‌ژن یا مونوکلونال آنتی‌بادی ثابت‌شده روی پلیت‌ها یا روی Sensor Chip (مانند طلای پوشیده با هیدروژل دکستران کربوکسی متیله‌شده)، اغلب برای اندازه‌گیری افینیتی استفاده می‌شود (۱۵،۱۴).

چنین روشهایی بندرت $K_d$ واقعی را نشان می‌دهند؛ زیرا ثابت‌نمودن آنتی‌ژن (در کف پلیت) اغلب باعث دناتوره‌شدن پروتئین می‌شود؛ بنابراین خواص اتصالی آن نیز تغییر می‌کند؛ علاوه براین $K_d$ در حالت محلول تعریف شده است؛ یعنی در فاز مایعی که آنتی‌ژن و آنتی‌بادی هر دو به صورت محلول می‌باشند؛ در حالی که در آزمایشات فاز جامد یکی از آنها غیر متحرک است؛ بنابراین تخمین افینیتی ($K_a$) به کمک روشهای فاز جامد، ممکن است دور از مقدار واقعی آن باشد (۱۶).

از طرفی اگر غلظت آنتی‌بادی توتال بیشتر از $K_d$ باشد، نتایج تعیین افینیتی رضایت‌بخش نخواهند بود. حساسیت روش ایمونوآنزیماتیک (EIA) با سوبسترای کروموژنیک غلظت حداقل آنتی‌بادی توتال‌را به حدود M $۱۰^{-۱۰}$ محدود می‌کند (۱۷)؛ بنابراین برای یک Ab با افینیتی خیلی بالا، باید آزمایش با کونژوگه‌های آلکالین فسفاتاز یا بتا–گالاکتوزیداز انجام شود؛ زیرا این آنزیم‌ها حساسیت آزمایش را افزایش می‌دهند و امکان کارکردن با غلظتهای پایین‌تر آنتی‌بادی را فراهم می‌سازند (۱۹،۱۸).

$K_d$ آنتی‌بادی‌ها از $۱۰^{-۷}$ تا $۱۰^{-۱۱}$ متغیر است که هر چه عدد $K_d$ کوچکتر باشد، افینیتی آن آنتی‌بادی بیشتر خواهد بود؛ البته در تمامی سنجشهای ایمونولوژیکی، بالا بودن افینیتی Ab مزیت نخواهد بود؛ به عنوان مثال چنانچه از مونوکلونال آنتی‌بادی به دست آمده، بخواهیم در تخلیص آنتی‌ژن در روش ستون کروماتوگرافی تمایلی استفاده نماییم، $K_d=۱۰^{-۱۱}$ برای آنتی‌بادی دیگر مناسب نخواهد بود؛ زیرا در هنگام جداسازی آنتی‌ژن از ستون Allocution نیاز به کاهش شدید pH بافر می‌باشد؛ لازم به ذکر است که بافر خیلی اسیدی، توانایی برهم زدن ساختار طبیعی آنتی‌ژن و کاهش عمر ستون کروماتوگرافی تمایلی را دارد؛ برای مثال در تحقیق Sakharov و همکاران، کلون هیبریدومای App.1 مولد مونوکلونال آنتی‌بادی $IgG_1$ ضد آنزیم ALP و دارای ثابت تجزیه $۸/۵*۱۰^{-۱۰}$ بود که پس از اتصال به سفارز در ستون کروماتوگرافی به دلیل بالا بودن نسبی افینیتی آنتی‌بادی برای

Downloaded from journal.bums.ac.ir at 10:00 IRST on Sunday February 25th 2018

آنزیم نتایج خیلی خوبی از ستون به دست نیامد؛ در صورتی که در رنگ‌آمیزیهای ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی نتایج بسیار عالی نشان داد (۲۰).

در تحقیق Wu و همکاران نیز، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به دست آمده از کلون 4G10، پس از اتصال به سفارز در ستون کروماتوگرافی به منظور تخلیص اینترفرون آلفا به کار برده شدند که بازده آن بسیار عالی گزارش شد (با درجه خلوص بیش از ۹۵٪) (۲۱).

در مطالعه‌ای دیگر، مولد مونوکلونال آنتی‌بادی با افینیتی $۵*۱۰^{-۵}$ بود که اساساً برای استفاده در ستون کروماتوگرافی افینیتی بسیار مناسب به نظر می‌رسد (۲۲).

با توجه به این که $K_d$ آنتی‌بادی مونوکلونال کلون $A_1G_8F_7$ حدود $۱۰^{-۹}$ محاسبه گردید، انتظار می‌رود در اغلب سنجش‌های ایمونولوژیکی مناسب و کارایی داشته باشد و عملاً نیز در آزمونهای الیزا – به عنوان لایه دوم– و آزمونهای ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی – همراه با آنزیم ALP به صورت کمپلکس APAAP برای لایه سوم– بسیار عالی و قابل مقایسه با کمپلکس APAAP خریداری شده از شرکت Dako می‌باشد.

## منابع:


1- Zola H. Monoclonal Antibodies. New York: Bios Scientific; 2000.

2- Steward MW, Lew AM. The importance of antibody affinity in the performance of immunoassays for antibody. J Immunol Methods. 1985, 78 (2): 173-90.

3- Marie-Pierre L, Lisa DO, Barry N, Michel EG. Measurement of the dissociation rate constant of antigen/antibody complexes in solition by enzyme-linked immunosorbent assay. J Immunol Methods. 1994, 170: 167-75.

4- Macdonald RA, Hosking CS, Jones CL. The measurement of relative antibody affinity by ELISA using thiocyanate elution. J Immunol Methods. 1988; 106: 191-94.

5- Dellerich M. Enzyme- immunoassay: a review. J Clin Chem Clin Biochem 1984; 22: 895-904.

6- Landon J. Enzyme immunoassay: techniques and uses. Nature. 1977; 268: 483-85.

7- Porstmann T, Kiessig ST. Enzyme immunoassay techniques: an overview. J Immunol Methods. 1992; 150: 5-21.

8- Phillips DJ, Wells TW, Reimer CB. Estimation of association constants of 42 monoclonal antibodies to human IgG epitopes using a fluorescent sequential-saturation assay. Immunol Lett. 1988; 17(2): 159-68.

9- Stenberg M, Nygren H. Kinetics of antigen-antibody reactions at solid-liquid interfaces. J Immunol Methods. 1988; 113 (1): 3-15.

10- Friguet B, Dyavacli L, Goldberg ME. Immunochemical Analysis of Protein Conformation. In: Creighton TE. Protein Structure: A Practical Approach. New York: Oxford University Press; 1997. pp. 323-49.

11- Rath S, Stanley CM, Steward MW. An inhibition enzyme immunoassay for estimating relative antibody affinity and affinity heterogeneity. J Immunol Methods. 1988; 106: 245-49.

12- Besman M, Coleman JE. Isozymes of bovine intestinal alkaline phosphatase. J Biol Chem. 1985; 260 (20): 11190-93.

13- Jacobsen C, Frich JR, Steensgaard J. Determination of affinity of monoclonal antibodies against human IgG, J Immunol Methods. 1982; 50 (1): 77-88.

14- Loomans EE, Roelen AJ, Van Damme HS, Bloemers HP, Gribnau TC, Schielen WJ. Assessment of the functional affinity constant of monoclonal antibodies using an improved enzyme-linked immunosorbent assay. J Immunol Methods. 1995; 184 (2): 207-17.

15- Larvor MP, Djavadi-Ohaniance L, Nall B, Goldberg ME. Measurement of the dissociation rate constant of antigen/antibody complexes in solution by enzyme-linked immunosorbent assay. J Immunol Methods. 1994; 170 (2): 167-75.

16- Underwood PA. Problem and pitfalls with measurement of antibody affinity using solid phase binding in the ELISA. J Immunol Methods. 1993, 164 (1): 119-30.

17- Ong GL, Mattes MJ. Re-evaluation of the concept of functional affinity as applied to bivalent antibody binding to cell surface antigens. Mol Immunol. 1993; 30 (16): 1455-62.

18- Alves CM, Marzocchi-Machado CM, Azzolini AE, Lucisano-Valim YM. The complement-fixing activity of immune complexes containing IgG antibodies of different functional affinities: effects on superoxide production by rabbit neutrophils. Immunol Invest. 2004; 33 (1): 39-50.

19- Li CK. ELISA-based determination of immunological binding constants. Mol Immunol 1985; 22 (3): 321-27.

20- Sakharov IYu, Mechetner EB, Stepanova IE, Shekhonin BV, Pletjushkina OYu. Monoclonal antibody to alkaline phosphatase from the intestinal mucosa of the harp seal, Phoca groenlandica. Comp Biochem Physiol B. 1992; 101 (4): 677-82.

21- Wu M, Ai Y, Ren R, Liang Y, Li J, Song W, et al. Preparation and application of monoclonal antibodies to recombinant human IFN alpha. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi. 2002; 16 (3): 261-63. Chinese.

22- Yan J, Wang S, Mi JB, Guo ZQ, Chang WB. Production and characterization of anti-recombinant human erythropoietin (rhEPO) monoclonal antibody. J Immunoassay Immunochem. 2004; 25 (1): 91-101.

Downloaded from journal.bums.ac.ir at 10:00 IRST on Sunday February 25th 2018

Downloaded from journal.bums.ac.ir at 10:00 IRST on Sunday February 25th 2018

# Measurement of affinity constant of Anti-human IgG Monoclonal antibodies with alkaline phosphatas enzyme by an ELISA-based method

**M. Naseri*,SM. Moazzen**, AA. Pourfathollah**, B. Mesbahzadeh*****

* Instructor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
** Associate Professor, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran
*** Instructor, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

## Abstract

**Background and Aim:** The affinity of an antibody with its antigen is a crucial parameter in its biological activity and carrying out immunologic tests such as radioimmunoassay (RIA) and immunohistochemistry. This study was done in our laboratory at Tarbiat Modarres University to measure the affinity constant of specific monoclonal antibodies/MAB ($A_1G_8F_7$) with alkaline phosphatase enzyme produced.
**Material and Methods:** Several Methods have been innovated to determine the affinity and avidity of antibodies. In all of them a serum is used in which antigen and antibody would reach balance and, without a change in the balance, free antigen and antigen associated with antibody are measured. Applying a rapid and simple ELISA-based method the affinity constant of specific MAB ($A_1G_8F_7$) against alkaline phosphatase was measured.
**Results:** Constant density of antibody for use in specific ELISA used to determine dissociation constant ($K_d$), applying klotz methodology-by means of a competitive ELISA proved to be 1μg $K_d$ of A1G8F7 clone; through klotz fig, it was estimated to be $3.8\times10^{-9}$
**Conclusion:** considering that the $K_d$ of natural antibodies in the body for most antigens ranges from $10^{-7}$ to $10^{-11}$ and that the less $K_d$ the more affinity of the antibody, the antibody secreted by $A_1G_8F_7$ clone seems suitable. Practically, in immunocytochemistry for most immunologic measuring, histochemistry test done with mAb-ALP enzyme in three line-staining led to pretty good and comparable results with the similar trade sample of APAAP (Dako, Denmark).

**Key Words:** Monoclonal antibody; Affinity avidity; ELISA; Alkaline phosphatase