

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

محسن ناصری<sup>۱</sup> - دکتر سیدمحمد مؤذنی<sup>۲</sup> - دکتر علی‌اکبر پورفتح‌الله<sup>۲</sup> - بهزاد مصباح‌زاده<sup>۳</sup>

## 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 ایمنواسی (RIA) و ایمونوهیستوشیمی دارد. مطالعه حاضر با هدف سنجش افینیتی آنتی‌بادی مونوکلونال محصول کلون هیبریدوما A1G8F7 تولید شده نسبت به آنزیم الکالین 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 الکالین فسفاتاز تولید شده از کلون A<sub>1</sub>G<sub>8</sub>F<sub>7</sub> استفاده شد.

**یافته‌ها:** غلظت ثابت آنتی‌بادی برای استفاده در الیزای اختصاصی مرحله دوم تعیین Dissociation Constant ( $K_d$ ) به روش کلاتر، توسط یک الیزای رقابتی برابر  $1 \mu\text{g}$  به دست آمد؛ با رسم نمودار کلاتر  $K_d$  کلون A<sub>1</sub>G<sub>8</sub>F<sub>7</sub> برابر  $3/8 \times 10^{-9}$  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 تجارتي (APAAP شرکت Dako) بود.

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

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند (دوره ۱۱، شماره ۴، سال ۱۳۸۳)

<sup>۱</sup> 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

<sup>۲</sup> دانشیار گروه آموزشی ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

<sup>۳</sup> کارشناس ارشد فیزیولوژی؛ عضو هیأت علمی گروه آموزشی فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند

## مقدمه

## تعیین میل پیوندی آنتی بادی

افینیتی یک آنتی بادی به آنتی ژن مربوطه خود، در بسیاری موارد تأثیر بیولوژیکی مهمی در عمل آن آنتی بادی دارد؛ همچنین تولید زیاد آنتی بادی های با افینیتی پایین به عنوان یک نقص ایمنی در نظر گرفته می شود. افینیتی آنتی بادی بدون شک در ایمونوپاتولوژی بیماری های خودایمن و بیماری های کمپلکس ایمنی نیز دخالت دارد (۱-۴).

نقش افینیتی آنتی بادی در روش های 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 روش های متعددی برای تعیین افینیتی و آویدیتی آنتی بادی ابداع شده اند. در هریک از این روشها از سرمی استفاده می شود که در آن آنتی ژن و آنتی بادی با هم به تعادل رسیده اند ( $Ab+Ag \rightleftharpoons Ab-Ag$ )؛ آنگاه بدون تغییر دادن حالت تعادل، مقادیر آنتی ژن آزاد و آنتی ژن همراه شده با آنتی بادی، سنجیده می شود. برای انجام این کار، چند راه وجود دارد. برخی از محققان با استفاده از روشهای فیزیکی مانند دیالیز، فیلتراسیون با ژل، سانتریفوژ و رسوب، آنتی بادی یا آنتی ژن آزاد را از آنتی ژن متصل به آنتی بادی جدا می کنند (۵-۷). برخی نیز از تغییرات به وجود آمده در ویژگیهای فلئورسنت آنتی ژن متصل به آنتی بادی استفاده می کنند (۸).

با استفاده از اطلاعات به دست آمده از این روشها، می توان ثابت تعادل (یعنی میل پیوندی یا  $K_a^{\square\square}$ ) را به دست آورد:

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

در این معادله،  $[Ab-Ag]$  معادل غلظت آنتی ژن متصل به آنتی بادی،  $[Ag]$  معادل غلظت آنتی ژن آزاد و  $[Ab]$  معادل غلظت نواحی آزاد متصل شونده به آنتی ژن در حال تعادل است.

واکنش بین آنتی ژن و آنتی بادی یک واکنش تعادلی به

صورت زیر است:



چنانچه  $[Ab]$  غلظت جایگاههای آزاد آنتی بادی،  $[Ag]$  غلظت جایگاههای آزاد آنتی ژن،  $[x]$  غلظت کمپلکس Ag-Ab،  $[Abt]$  غلظت آنتی بادی کل و  $[Agt]$  غلظت آنتی ژن کل فرض شوند، با تغییراتی در معادله فوق معادله کلاتز به دست می آید:

$$\text{Klotz Equation: } [Abt]/[x] = K_d/[Ag] + 1$$

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 آنتی بادی مونوکلونال محصول کلون هیبریدوما A1G8F7 تولید شده در دانشگاه تربیت مدرس تهران، نسبت به آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) انجام گردید.

## روش بررسی

## اندازه گیری افینیتی آنتی بادی در حالت محلول با استفاده از روش الیزای رقابتی:

برای اندازه گیری  $K_d$  کلون A1G8F7 در این مطالعه تجربی، از یک روش الیزای رقابتی که افینیتی آنتی بادی را در حالت محلول اندازه گیری می کند، استفاده شد؛ این روش دارای دو مرحله اساسی می باشد:

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

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

§ Affinity

\*\* Radioimmunoassay (RIA)

†† Association Constant ( $K_a$ )

## تعیین غلظت ثابت آنتی‌بادی:

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.

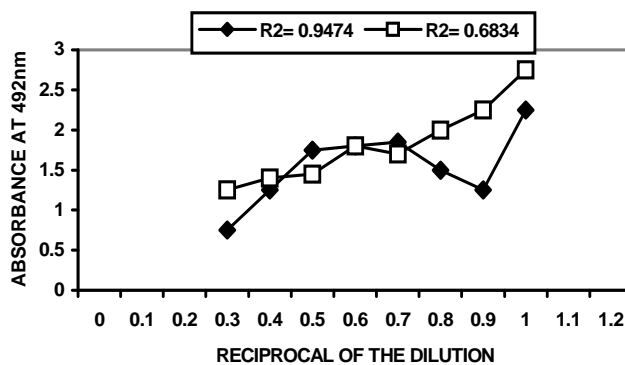
۵- نموداری بر حسب جذب نوری به دست آمده از دو پلیت در مقابل رفتهای مختلف آنتی‌بادی رسم شد (نمودار ۱). بالاترین رقت از آنتی‌بادی (یعنی کمترین غلظت ممکن) که نمودار حاصل از پلیت‌های ۱ و ۲ بر هم منطبق باشند، انتخاب شد (رقت ۱/۴ که برابر با غلظت ۱/۲ μg می‌باشد).

تعیین  $K_d$  (Dissociation Constant)

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

مونوکلونال پپید  $A_1G_8F_7$

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

۱- جذب  $OD$  به دست آمده در مرحله 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 کوت شده 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 ۱ و ۲، نیاز به تعیین دامنه غلظت آنتی‌ژن کوت شده و زمان مطلوب انکوباسیون محلول آنتی‌بادی در چاهک کوت شده 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، رفتهای ۱/۲ الی ۱/۶۴ از آنتی‌بادی خارج شده با غلظت ۲ μg/ml به صورت تریپلیکیته (Triplicate) اضافه شد. از PBS-T<sup>§§</sup> به عنوان شاهد منفی و از سرم موش با رقت ۱/۱۰۰ به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. برای نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد عمل انکوباسیون انجام شد.

۳- محتویات این پلیت - هر ردیف سه تایی در یک اپندرف جداگانه- با دقت جمع‌آوری شد (که کمی کمتر از ۳۰۰ میکرولیتر اپندرف خواهد شد) و به پلیت دوم به صورت

†† Optical Density (OD)

§§ Phosphate Buffered Saline (PBS)

۴- به منظور بررسی میزان آنتی بادی 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.

آنتی ژن 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 می‌باشد، به دست می‌آید و مقدار  $x$  معادله نیز  $\frac{A_0}{A_0 - A_n}$  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  $Ag_{tm}$  قرار می‌دهیم (نمودار ۲).

### بحث و نتیجه گیری

اندازه گیری دقیق افینیتی آنتی بادی عملاً آسان نمی‌باشد. برای آنتی ژن‌های محلول که به آسانی خالص می‌شوند، می‌توان مقدار لازم آنتی ژن 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 آنتی بادی (۲۵۰ $\mu\text{g/ml}$ )	۲۵۰ میکرولیتر آنزیم آلکالین فسفاتاز (۲۵۰ $\mu\text{g/ml}$ )	جذب
۱	۲/۴	۲۵	۰/۱۳۳
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

۴- به منظور بررسی میزان آنتی بادی 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.

$$\frac{A_0}{A_0 - A_1} = \frac{KD}{[Ag] + 1}$$

معادله کلاتز  $A_0$ : جذب نوری چاهکی است که حاوی محتویات ایندرف فاقد آنتی ژن است.  $A_1$ : جذب نوری خوانده شده از چاهکی است که حاوی محتویات ایندرف شماره ۱- که دارای بالاترین مقدار آنتی ژن ( $100 \mu\text{g}$ ) است- می‌باشد. مقدار  $x$  نیز برابر  $[1/Ag_{tm}]$  خواهد بود؛ البته بایستی در این فرمول غلظت آنتی ژن برحسب مول باشد.

### یافته‌ها

غلظت مناسب محلول آنتی بادی برابر  $1/2 \mu\text{g/ml}$  به دست آمد؛ البته همان‌طور که قبلاً نیز بیان شد، غلظت محلول آنتی بادی در لوله‌ها بایستی دو برابر در نظر گرفته شود؛ زیرا پس از افزودن محلول آنتی ژن هم حجم آن، غلظت آنتی بادی به نصف ( $1/2 \mu\text{g}$ ) کاهش می‌یابد. چنانچه از سوپ سلولی تخلیص نشده 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 آنتی ژن در لوله با این رقت به دست آمده در مرحله اول مجاور شود.

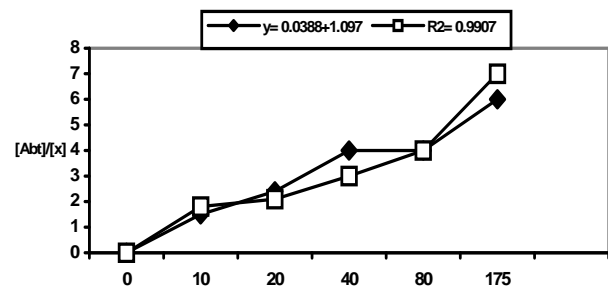
همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، در مرحله تعیین  $K_d$ ، سریال رقت آنزیم ALP از  $100 \mu\text{g/ml}$  تا  $0/18 \mu\text{g/ml}$  ( $250$  میکرولیتر از هر غلظت) انتخاب شد که به هر یک از آنها نسبت ۱:۱ از محلول آنتی بادی با غلظت ثابت  $2/4 \mu\text{g/ml}$  اضافه شد.

در مرحله بعد - پس از انجام واکنش آنتی ژن و آنتی بادی در لوله- محتوی لوله‌ها به پلیت الیزای کوت شده با  $1 \mu\text{g}$

ثابت نمودن آنتی ژن (در کف پلیت) اغلب باعث دناتورده شدن پروتئین می شود؛ بنابراین خواص اتصال آن نیز تغییر می کند؛ علاوه بر این  $K_d$  در حالت محلول تعریف شده است؛ یعنی در فاز مایعی که آنتی ژن و آنتی بادی هر دو به صورت محلول می باشند؛ 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 آنتی بادی توتال بیشتر از  $K_d$  باشد، نتایج تعیین افینیتی رضایت بخش نخواهند بود. حساسیت روش ایمنوآنزیماتیک (EIA) با سوبسترای کروموزنیک غلظت حداقل آنتی بادی توتال را به حدود  $10^{-10}$  M محدود می کند (۱۷)؛ بنابراین برای یک Ab با افینیتی خیلی بالا، باید آزمایش با کونژوگه های آلكالین فسفاتاز یا بتا-گالاکتوزیداز انجام شود؛ زیرا این آنزیم ها حساسیت آزمایش را افزایش می دهند و امکان کار کردن با غلظتهای پایین تر آنتی بادی را فراهم می سازند (۱۸، ۱۹).

$K_d$  آنتی بادی ها از  $10^{-7}$  تا  $10^{-11}$  متغیر است که هر چه عدد  $K_d$  کوچکتر باشد، افینیتی آن آنتی بادی بیشتر خواهد بود؛ البته در تمامی سنجشهای ایمنولوژیکی، بالا بودن افینیتی Ab مزیت نخواهد بود؛ به عنوان مثال چنانچه از مونوکلونال آنتی بادی به دست آمده، بخواهیم در تخلیص آنتی ژن در روش ستون کروماتوگرافی تمایلی استفاده نماییم،  $K_d=10^{-11}$  برای آنتی بادی دیگر مناسب نخواهد بود؛ زیرا در هنگام جداسازی آنتی ژن از ستون Allocation نیاز به کاهش شدید pH بافر می باشد؛ لازم به ذکر است که بافر خیلی اسیدی، توانایی برهم زدن ساختار طبیعی آنتی ژن و کاهش عمر ستون کروماتوگرافی تمایلی را دارد؛ برای مثال در تحقیق Sakharov و همکاران، کلون هیبریدوما ی App.1 مولد مونوکلونال آنتی بادی IgG<sub>1</sub> ضد آنزیم ALP و دارای ثابت تجزیه  $10^{-10} \times 8/5$  بود که پس از اتصال به سفارز در ستون کروماتوگرافی به دلیل بالا بودن نسبی افینیتی آنتی بادی برای



نمودار ۲- نمودار کلاتز حاصل از اتصال ALP به آنتی بادی مونوکلونال A<sub>1</sub>G<sub>8</sub>F<sub>7</sub>

چون در مراحل نشاندار کردن پروتئین، کوچکترین تغییری در مولکول آنتی ژن ممکن است اپی توپ اختصاصی آنتی بادی را از بین ببرد یا حداقل افینیتی اتصال آنتی بادی را تغییر دهد، نتایجی که از به کار بردن آنتی ژن نشاندار به دست می آید باید با احتیاط تفسیر شود. هنگام به کار بردن آنتی بادی آزاد - وقتی آنتی بادی نشاندار در آزمون به کار برده می شود- ثابت افینیتی به دست آمده، ممکن است تغییر نماید (۱۲، ۱۳).

همچنین بایستی توجه داشت که اغلب آنتی سرم های پلی کلنال حاوی جمعیت گوناگونی از آنتی بادی علیه قسمتهای مختلف یک آنتی ژن است و هر آنتی بادی دارای مقادیر K خاص خود است؛ تحت این شرایط دیگر نمودار اسکاچارد خطی نخواهد بود و به صورت یک منحنی در می آید که نشانگر ترکیب شدن خطها از هر آنتی بادی است.

تعیین یک شاخص کمی، شبیه ثابت تجزیه تعادلی یک کمپلکس Ab-Ag، به روش قابل اعتماد و مطمئن نیاز دارد. دیالیز تعادلی، روش انتخابی برای هاپتن ها و آنتی ژن های قابل دیالیز می باشد؛ در صورتی که برای آنتی ژن های ماکرومولکولی قابل انجام نمی باشد.

از روشهای بسیاری از قبیل الیزا، Surface Plasmon Resonance با آنتی ژن یا مونوکلونال آنتی بادی ثابت شده روی پلیت ها یا روی Sensor Chip (مانند طلای پوشیده با هیدروژل دکستران کربوکسی متیله شده)، اغلب برای اندازه گیری افینیتی استفاده می شود (۱۴، ۱۵).

چنین روشهایی بندرت  $K_d$  واقعی را نشان می دهند؛ زیرا

افینیتی بسیار مناسب به نظر می رسد (۲۲).  
 با توجه به این که  $K_d$  آنتی بادی مونوکلونال کلون A<sub>1</sub>G<sub>8</sub>F<sub>7</sub> حدود  $10^{-9}$  محاسبه گردید، انتظار می رود در اغلب سنجش های 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 می باشد.

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

در تحقیق Wu و همکاران نیز، آنتی بادی های 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 مطالعه ای دیگر، مولد مونوکلونال آنتی بادی با افینیتی  $10^{-5}$  بود که اساساً برای استفاده در ستون کروماتوگرافی

### 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 solution 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-Ohanian 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.

## Measurement of affinity constant of Anti-human IgG Monoclonal antibodies with alkaline phosphatase 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<sub>1</sub>G<sub>8</sub>F<sub>7</sub>) 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<sub>1</sub>G<sub>8</sub>F<sub>7</sub>) 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  $1\mu\text{g}$   $K_d$  of A1G8F7 clone; through klotz fig, it was estimated to be  $3.8 \times 10^{-9}$

**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<sub>1</sub>G<sub>8</sub>F<sub>7</sub> 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