

اندازه گیری ثابت تمایل (افینیتی) آنتی بادی مونوکلونال IgG ضد آنزیم آلکالین فسفاتاز با استفاده از روش الیزا

محسن ناصری^۱ - دکتر سید محمد مؤذنی^۲ - دکتر علی اکبر پورفتح الله^۲ - بهزاد مصباح زاده^۳

چکیده

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

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، روشهای متعددی برای تعیین افینیتی و آویدیتی آنتی بادی تاکنون ابداع شده‌اند. در همه این روشها از سیستمی استفاده شده که در آن آنتی ژن و آنتی بادی با هم به تعادل برسند و آنگاه بدون تغییر دادن حالت تعادل، مقادیر آنتی ژن آزاد و آنتی ژن همراه شده با آنتی بادی سنجیده می‌شود. در این تحقیق از یک روش سریع الیزای رقابتی - که افینیتی آنتی بادی را در حالت محلول اندازه گیری می‌کند - برای سنجش میل پیوندی آنتی بادی مونوکلونال IgG ضد آلکالین فسفاتاز تولید شده از کلون $A1G8F7$ استفاده شد.

یافته‌ها: غلظت ثابت آنتی بادی برای استفاده در الیزای اختصاصی مرحله دوم تعیین $Dissociation Constant$ (K_d) به روش کلاتر، توسط یک الیزای رقابتی برابر $1 \mu g$ به دست آمد؛ با رسم نمودار کلاتر K_d کلون $A1G8F7$ برابر $3/8 \times 10^{-9}$ تخمین زده شد.

نتیجه گیری: با توجه به این که K_d آنتی بادی‌های طبیعی بدن برای بیشتر آنتی ژن‌ها بین ۷-۱۰ الی ۱۱-۱۰ متغیر است و با توجه به این که هر چه اندازه K_d کوچکتر باشد، افینیتی آنتی بادی بیشتر خواهد بود، آنتی بادی ترشحاتی از کلون $A1G8F7$ برای بیشتر سنجشهای ایمونولوژیکی مناسب به نظر می‌رسد. عملاً در آزمایشهای ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی که با این آنتی بادی مونوکلونال - همراه با آنزیم ALP در لایه سوم - انجام گردید، نتیجه رنگ آمیزی بسیار عالی و قابل مقایسه با نمونه مشابه تجارتي (APAAP شرکت Dako) بود.

واژه‌های کلیدی: آنتی بادی مونوکلونال؛ افینیتی؛ آویدیتی؛ الیزا؛ آلکالین فسفاتاز

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

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 روش ها 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 روش های 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 ویژگی های فلئورسنت آنتی ژن متصل به آنتی بادی استفاده می کنند (۸).

با استفاده از اطلاعات به دست آمده از این روش ها، می توان ثابت تعادل (یعنی میل پیوندی یا K_a) را به دست آورد:

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

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 جایگاه های آزاد آنتی بادی، $[Ag]$ غلظت جایگاه های 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 هیبریدومای 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 رقت های 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 رقت ها - 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:

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

- ۱- جذب 492 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 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 ۱ و ۲، 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، $1 \mu\text{g/ml}$ 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، رفته‌های $1/2$ الی $1/64$ از آنتی‌بادی خارج شده با غلظت $2 \mu\text{g/ml}$ به صورت تریپلیکیت (Triplicate) اضافه شد. از PBS-T^{§§} به عنوان شاهد منفی و از سرم موش با رقت $1/100$ 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.

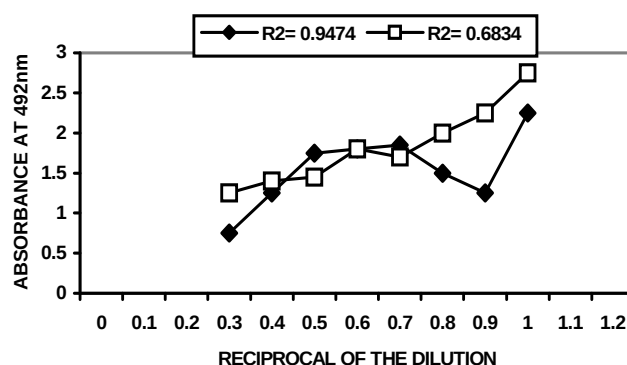
۵- نموداری بر حسب جذب نوری به دست آمده از دو پلیت در مقابل رفته‌های مختلف آنتی‌بادی رسم شد (نمودار ۱). بالاترین رقت از آنتی‌بادی (یعنی کمترین غلظت ممکن) که نمودار حاصل از پلیت‌های ۱ و ۲ بر هم منطبق باشند، انتخاب شد (رقت $1/4$ که برابر با غلظت $1/2 \mu\text{g}$ می‌باشد).

تعیین K_d (Dissociation Constant)

۱- به پلیت الیزا آلکالین فسفاتاز (به عنوان Ag) با غلظت $1 \mu\text{g/ml}$ 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 $100 \mu\text{g/ml}$ تا $0.39 \mu\text{g/ml}$) اضافه شد؛ سپس به آنها ۲۵۰ میکرولیتر از رقتی از آنتی‌بادی که در مرحله اول تعیین شد، $(1/4)$ 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 A₁G₈F₇

^{††} Optical Density (OD)

^{§§} Phosphate Buffered Saline (PBS)

آنتی ژن ALP اضافه شد و پس از انجام آزمون الیزا جذب نوری آنها در ۴۹۲ نانومتر قرائت گردید.

طبق معادله کلاتر، اگر اعداد به دست آمده از دستگاه قرائتگر الیزا را در این معادله قرار دهیم، y معادله که همان

$$\frac{A_0}{A_0 - A_n} \text{ می باشد، به دست می آید و مقدار } x \text{ معادله نیز}$$

$[^1/Ag_{tn}]$ می باشد؛ 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 می دهیم (نمودار ۲).

بحث و نتیجه گیری

اندازه گیری دقیق افینیتی آنتی بادی عملاً آسان نمی باشد. برای آنتی ژن های محلول که به آسانی خالص می شوند، می توان 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 می دهد، مناسب است.

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

شماره لوله	۲۵۰ میکرولیتر آنتی بادی (۲۵۰ μg/ml)	۲۵۰ میکرولیتر آنزیم آلکالین فسفاتاز (۲۵۰ μg/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 لوله ها به پلیت الیزا که در بند یک تهیه شده بود؛ اضافه شد و آزمون الیزا انجام شد.

۵- با روش کلاتر افینیتی محاسبه شد.

$$\frac{A_0}{A_0 - A_1} = \frac{KD}{[Ag_{t1}] + 1} \text{ معادله کلاتر}$$

A_0 : جذب نوری چاهکی است که حاوی محتویات اپندرف فاقد آنتی ژن است.

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

یافته ها

غلظت مناسب محلول آنتی بادی برابر $1/2 \mu g/ml$ به دست آمد؛ البته همان طور که قبلاً نیز بیان شد، غلظت محلول آنتی بادی در لوله ها بایستی دو برابر در نظر گرفته شود؛ زیرا پس از افزودن محلول آنتی ژن هم حجم آن، غلظت آنتی بادی به نصف ($1/2 \mu g$) کاهش می یابد. 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 غلظت های متغیر آنتی ژن در لوله با این رقت به دست آمده در مرحله اول مجاور شود.

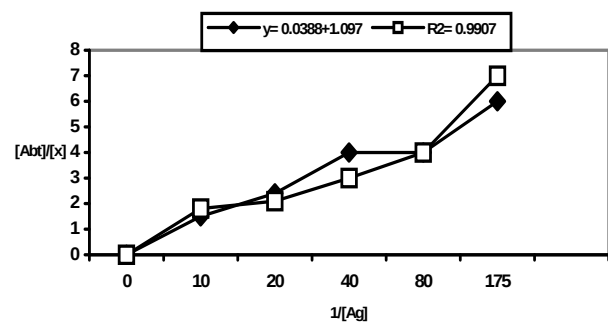
همان گونه که در جدول ۱ مشاهده می شود، در مرحله تعیین K_d ، سریال رقت آنزیم ALP از $100 \mu g/ml$ تا $0/18 \mu g/ml$ (۲۵۰ میکرولیتر از هر غلظت) انتخاب شد که به هر یک از آنها نسبت ۱:۱ از محلول آنتی بادی با غلظت ثابت $2/4 \mu g/ml$ اضافه شد.

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

ثابت نمودن آنتی ژن (در کف پلیت) اغلب باعث دنا توره 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 هیبریدومای App.1 مولد مونوکلونال آنتی بادی IgG₁ 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 A₁G₈F₇

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 مطمئنی 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

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 10^{-5} 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 A₁G8F7 حدود 10^{-9} 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 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 ($A_1G_8F_7$) 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 $1\mu g K_d$ of $A_1G_8F_7$ clone; through klotz fig, it was estimated to be 3.8×10^{-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 $A_1G_8F_7$ 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