J. of Nuclear Sci. and Tech.
No. 30, pp. 17-24, 2004

مجله علوم و فنون هسته‌اي
شماره ۳۰، صفحات ۲۴- ۱۷،

تهيّه لوله‌هاي پلي‌استيرني و پلي‌پروپيلني پوشش‌دار شده با پادتن T3 براي كيت‌هاي T3-RIA

بهزاد مهدياني*، مسعود محرم‌زاده، موسي پورعبدي، رضا نجفي
مركز تحقيقات هسته‌اي، سازمان انرژي اتمي ايران، صندوق پستي: ۱۳۳۹- ۱۴۱۵۵، تهران - ايران

چكيده: بهترين روش براي سريعتر انجام دادن آزمونهاي تيروئيدي، كاستن مراحل آزمايشي توسّط آزمايش‌كنندگان است. مراحل كلّي در آزمايش «پرتو ايمن آزموني» عبارتند از افزودن استانداردها، هورمون نشاندارشده با يُد راديوآكتيو و پادتن‌ها. چنانچه يكي از اين مراحل كاسته شود، سرعت انجام آزمايش افزايش مي‌يابد. در اين مورد طي سال‌هاي گذشته تحقيقات و آزمايشهاي متعدّدي در بخش راديوايزوتوپ سازمان به عمل آمده كه نتيجة آنها حذف مرحلة افزودن پادتن در آزمايشهاي تيروئيدي به روش پوشش‌دار كردن لوله‌هاي آزمايش با پادتن است. در اين باره، احتمالات و شرايط مؤثّر در آزمايشها بررسي شده‌اند و در اين تحقيقات، انواع لوله‌هاي پلي‌پروپيلني و پلي‌استيرني بكار رفته‌اند. همچنين شرايط فيزيكي و شيميايي متعدّدي، هم در مرحله تهيّه لوله‌ها و هم در طي انجام آزمايشهاي كنترل كيفي مطالعه و بررسي شده‌اند و كيت‌هاي تهيّه شده به صورت آزمايشي در اختيار آزمايشگاه‌هاي تشخيص طبّي و بيمارستان‌هاي معتبر قرار گرفته و اغلب تأييد شده‌اند. نتيجه كلّي اين فعّاليتها و تحقيقات مؤيّد توان اين بخش در تهيّه و توليدكيت‌هاي تيروئيدي T3 و T4، داراي لوله‌هاي پوشش داده شده با پادتن است كه توأم با تغييرات ويژة اِعمال‌شده به آنها بوده و مستلزم پشتيباني است.

واژه‌هاي كليدي: *آنتي‌ژن، پادتن، پوشش‌داركردن، كيت‌هاي تيروئيدي، پرتو ايمن آزموني*

Preparation of Polystyrene and Polypropylene Tubes Coated with T3 Antibody for Using in T3-RIA Kits

B. Mahdiani*, M. Moharamzadeh, M. Pourabdi, R. Najafi
Nuclear Research Center, AEOI, P.O. Box: 14155 - 1339, Tehran - Iran

Abstract: For performing rapid Thyroid test, the best approach is to reduce the steps of the experiments which is usually made by the manufacturers. The sequential steps in a typical Radioimunoassay (RIA) are: Adding Standards, Adding Tracer, and Adding Ab. So, if we can eliminete one of these steps, the test rapidity will be increased. During the past few years many research studies have been carried out in the Deptment of Radioisotopes at the NRC (NRC, R. D.) of the AEOI in order to eliminete the Adding Ab step in the RIA by coating the Ab on the inner surface of the local tubes. During these studies all physical and chemical conditions experimented for polypropylene and polystyrene tubes (both local and imported) were used and for each condition, QC tests were performed. Finally, the ready for use kits were tested by some creditable Medical Laboratories and the accuracy and precision of kits were confirmed. The final results of these studies were shown the ability of NRC, R. D. for producing T3 and T4 Coated Tubes for RIA Kits by using modified local made tubes.

Keywords: ***antigen, antibody, coating, thiriod kits, radioimunoassay (RIA)***

تاريخ دريافت مقاله: ۱۳۸۲/۲/۱ تاريخ پذيرش مقاله: ۱۳۸۲/۱۰/۱۷
*email:bh_mahdiani@parsimail.com

۱ - مقدمه

اندازه‌گيري مواد معدني و آلـ موجود در بدن انسان هموار راهگشاي بسياري اـ مشكلات درماني بوده است. اين اندازه‌گيري‌ها كه عموماً در آزمايشگاه‌هاي تشخيص طبّي صورت مي‌گيرند، نيازمند وسايل و روش‌ها و مواد خاصّ خود مي‌باشند. در برخي از اين اندازه‌گيري‌ها از روش‌هاي زيست شيميايي استفاده مي‌شود. امّا در پاره‌اي از موارد، اندازه گيري‌هاي زيست شيميايي، به لحاظ كوچك بودن بيش از حد مولكول‌ها، امكان‌پذير نيست. در اين موارد، استفاده از مواد راديوآكتيو ويژه ممكن است مفيد واقع شود. عنصر راديوآكتيو را پس از اتّصال به مولكول بسيار كوچك، مي‌توان با شمارش آكتيويته آن به وسيلة دستگاه شمارشگر، شناسايي كرد و بر اساس مقايسه با يك سري استانداردها، آن را براي تشخيص پايين و بالا بودن ميزان مولكول مورد نظر بكار برد [۱ و ۲ و ۳].

هورمون T3 كه از غدّه تيروئيد ترشّح مي‌شود و كم يا زياد بودن آن در بدن موجب بروز اختلالات عصبي و گوارشي يا رواني مي‌گردد، از جمله مولكول‌هاي كوچكي است كه به روشهاي متداول در آزمايشگاه‌ها قابل اندازه‌گيري نيست؛ بنابراين، آن را با عنصر I^{125} راديوآكتيو نشاندار كرده و همراه با مواد ديگر، كه مجموعاً در يك كيت قرار مي‌گيرند، به روش RIA اندازه‌گيري مي‌كنند [۱ تا ٤].

اساس واكنش بدين صورت است كه اين مجموعه نشاندارشده در محيطي كه داراي آنتي‌ژن نشاندارنشدة سرم بيمار است، در حضور يك پادتن واكنش رقابتي انجام مي‌دهد كه پس از گذشت زمان لازم (براي اين كار ۲ ساعت)، با افزودن يك محلول رسوب‌دهنده، پس از سانتريفوژكردن و شمارش آكتيويتة رسوب حاصل، كمي يا زيادي هورمون T3، به عبارت ديگر، كم‌كاري يا پركاري غدّه تيروئيد مشخّص مي‌شود [٤ و ٥ و ٦].

از طرف ديگر، چون تعداد مراجعه‌كنندگان به آزمايشگاه‌ها براي انجام آزمايشهاي تيروئيدي روزافزون است، دو نكته بايد مورد توجّه قرار گيرد: كاستن مدّت آزمايشها و كاستن مراحل آزمايشها. براي اين منظور، يك راه حل اين است كه پادتن محيط واكنش روي گويچه‌هاي پلي‌استيرني پوشش داده شود: اين گويچه‌ها را درون لوله‌هاي آزمايش قرار مي‌دهيم و با استفاده از درپوش خاص، كه مانع خروج گويچه‌ها از لوله شود ولي افزودن مايعات ديگر به سهولت صورت گيرد، سر لوله‌ها را مي‌بنديم. بدين ترتيب از مراحل كلّي آزمايش، يعني افزودن محلول هاي استاندارد، افزودن آنتي‌ژن نشاندار، افزودن پادتن، يك مرحله (مرحله آخر) كم مي‌شود. امّا در اين حالت، اشكال عمده كار توزيع تك تك گويچه‌ها در لوله‌ها (۱۰۰ لوله در يك كيت RIA) و بستن سر آنها با درپوش خاص پيش مي‌آيد. براي اجتناب از اين مشكل مي‌توان پادتن را در قسمت پايين‌ي لوله‌ها، روي جدار داخلي آنها پوشش داد. به اين ترتيب سرعت تهيّه لوله‌هاي پوشش داده شده چندين برابر سرعت تهيّه لوله‌هاي حاوي گويچه‌هاي پلي‌استيرني خواهد بود. از طرف ديگر ممكن است خطاي فرد توزيع‌كننده گويچه‌ها در لوله‌ها سبب شود كه بعضي از لوله‌ها فاقد گويچه و برخي ديگر داراي دو گويچه شوند. در روش جايگزين، يعني پوشش‌داركردن لوله‌ها با پادتن، احتمال اين خطا از بين مي‌رود [٦ و ۷].

آزمايشهاي پي در پي و در شرايط مختلف نشان دادند كه استفاده از لوله‌هاي پوشش داده شده با پادتن نسبت به گويچه‌هاي متناظر خود، علاوه بر اين كه از دقّت و صحّت بيشتري در كيت‌هاي تشخيص بيماري‌هاي تيروئيدي برخوردارند،

طول عمر مفيد نسبتاً بالايي (۳ ماه) دارند.

لازم به ذكر است كه روش پيش گفته براي انجام دادن آزمايشهاي تيروئيدي كه مراحل آن در ذيل بيان شده است و معمولاً با نام «فاز جامد»[۱] ناميده مي‌شود، در واقع جايگزين روش پيشين است كه به نام «فاز مايع»[۲] معروف بود. در آن روش، پادتن به جاي آنكه از ابتدا درون لوله پوشش داده شود، در آخرين مرحله به لوله‌ها اضافه مي‌شد و پس از زمان معين با افزودن PEG و بدست آوردن رسوب راديوآكتيو كار ادامه مي‌يافت. در اين روش نيز آزمايشهاي متعدّدي هم از لحاظ كنترل كيفي و هم از لحاظ توليد انبوه طي چند سال گذشته انجام گرفت. خوشبختانه نتايج حاصل در شرايط بسيار مطلوب بودند و براي عرضة آنها به مراكز ذيربط اعلام آمادگي شد. با توجّه به استقبال اين مراكز از روش جايگزين، روش قبلي هم به صورت فاز جامد تغيير داده شد. در اين مورد نيز با توجّه به توان توليد انبوه بسياري از مواد بكار رفته در اين روش در سازمان انرژي اتمي ايران، براي استفاده در مراكز داخل كشور، به شرط در اختيار گذاشتن مواد تكميلي و دستگاه‌هاي خاص توزيع‌كننده، وجود دارد.

در حال حاضر براي پوشش داركردن لوله‌ها به وسيلة پادتن، روش ديگري با نام "Passive" در حال بررسي است. اين روش در عين حال كه سريعتر است ولي به لحاظ مصرف نسبتاً زياد پادتن ايجاب مي‌كند كه پادتن مورد استفاده در داخل كشور ساخته شود. به همين جهت، طي چند سال گذشته اقدام به تهيّه پادتن موردنظر از خرگوش‌هاي خانه حيوانات شده است كه تا اندازه‌اي نياز به واردكردن پادتن از خارج كشور را كمتر مي‌كند. بديهي است كه براي تهيّه مقادير مورد نياز اين پادتن وسايل و امكانات بيشتر و پيشرفته‌تري لازم است.

۲ - مواد و روش‌ها

جهت پوشش‌دار نمودن لوله‌هاي پلي استيرني[۳] با پادتن T3[۴] از مواد و روشهاي زير استفاده مي‌شود:

۲ - ۱ محلول‌هاي مورد استفاده

- بافر پوشاننده (Coating Buffer)
  بافر بيكربنات سديم + ۰/۱٪ سديم آزايد (NaN3)
- محلول بندآور (Blocking Solution)
  محلول ۱٪ ژلاتين هيدروليزشده در بافر بي‌كربنات سديم
- محلول فسفات بافر سالين (PBSX)
  بافر فسفات ۰/۰۵ مولار+۰/۱ درصد Triton X-100+NaN3
- محلول آغازگر (Priming Buffer)
  محلول PBSX بدون Triton X-100
- محلول تثبيت‌كننده (Glazing Solution)
  محلول ۲٪ لاكتوز در آب مقطر
- پودر رطوبت‌گير (Silicagel)

۲- ۲ نحوه پوشش‌داركردن لوله‌هاي پلي‌استيرني با پادتن T3

- پروتئين APE[۵] را در بافر پوشاننده طوري رقيق مي‌كنيم كه غلظت آن به ۵۰ ميكروگرم در ميلي ليتر برسد
- از اين محلول به مقدار ۳۰۰ ميكروليتر در هر يك از لوله‌ها مي‌ريزيم
- لوله‌ها را به مدّت ۳ شبانه روز در دماي ۳۷ درجه سانتي‌گراد نگه‌مي‌داريم
- لوله‌ها را خالي كرده و به محتواي هر يك ۳۰۰ ميكروليتر از محلول ۱٪ بندآور اضافه مي‌كنيم
- لوله‌ها را به مدّت سه ساعت تا يك شبانه روز در دماي ۳۷ درجه سانتي‌گراد نگه‌مي‌داريم
- لوله‌ها را ۳ بار با محلول PBSX مي‌شوييم
- پادتن ثانويه را در محلول آغازگر طوري رقيق مي‌كنيم كه به نسبت ۱ به ۴۰ برسد
- از اين محلول به اندازة ۳۰۰ ميكروليتر در هر لوله مي‌ريزيم

- لوله‌ها را به مدّت ۱ شبانه روز در دماي ۳۷ درجه سانتي‌گراد نگه‌مي‌داريم
- لوله‌ها را ۳ بار با محلول PBSX مي‌شوييم
- پادتن اوّليه را در محلول آغازگر به نسبت ۱ به ۱۰۰۰ رقيق مي‌كنيم
- از اين محلول به اندازة ۳۰۰ ميكروليتر در هر لوله مي‌ريزيم
- لوله‌ها را به مدّت ۱ شبانه روز دماي ۳۷ درجه سانتي‌گراد نگه‌مي‌داريم
- لوله‌ها را ۳ بار با محلول PBSX مي‌شوييم
- از لوله‌ها، يا بايد بلافاصله بعد از پوشش‌دارشدن با پادتن استفاده كرد و يا روي آنها عمل تثبيت انجام داد تا بتوان آنها را به مدّت طولاني در يخچال نگهداشت.

۲ - ۳ روش تثبيت

- به محتواي هر لوله، مقدار ۳۰۰ ميكروليتر محلول تثبيت كننده اضافه مي‌كنيم
- لوله‌ها را به مدّت كافي در دماي ۳۷ درجه سانتي‌گراد نگه‌مي‌داريم سپس آنها را خالي كرده و در دستگاه فريزدرايرِ خشك و در بسته‌بندي‌هاي محتوي كيسه‌هاي سليكاژل (رطوبت‌گير) قرار مي‌دهيم. براي استفاده‌هاي بعدي مي‌توانيم آنها را در يخچال نگهداري كنيم.

۲ - ٤ بررسي عوامل مؤثّر در پوشش پادتن

در جريان تهيّه لوله‌هاي پلي پروپيلني[٦] و پلي‌استيرني پوشش داده شده با پادتن T3، همانند هر ۱۹ تولید مادّه شيميايي ديگر، د شرايط خاص آزمايشگاهي وجود داشته باشد. در اين كار تجربي نيز سعي شده است تا با تغييردادن شرايط فيزيكي و شيميايي آزمايش، بهترين نتيجه حاصل شود. عواملي كه در روند آزمايش مورد بررسي قرار گرفته‌اند عبارتند از دما، غلظت محلول بندآور، غلظت پادتن مورد استفاده و جنس لوله‌ها.

براي انجام دادن آزمايش در هر يك از شرايط خاص، كه در جدول ۱ مندرج است، در هر يك از لوله‌ها مقدار ۵۰ ميكروليتر محلول استاندارد T3 (با غلظت مشخصي از T3 در بافر فسفات) و ۲۰۰ ميكروليتر هورمون T3 نشاندارشده با $I^{۱۲۵}$ افزوده‌ايم. پس از گذشت حدود يك ساعت، محلول‌هاي درون لوله‌ها را دور ريخته و لوله‌ها را با ۲ ميلي‌ليتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار داراي سديم آزايد و سرم آلبومين شسته‌ايم. سپس آكتيويته هر لوله را با دستگاه شمارنده گاما اندازه گرفته‌ايم و با توجّه به اعداد و ارقام بدست‌آمده، نمودار استاندارد لگاريتمي-لگاريتمي (log-log) را كه در آن ميزان شمارش (cpm) نسبت به غلظت محلول‌هاي استاندارد (nmol/L) رسم مي‌شود، بدست آورده‌ايم.

ضمن آزمايشهاي انجام شده در مورد انتخاب دماي مطلوب، نتيجه گرفته شد كه بهترين دما ۳۷ درجه سانتي‌گراد است. شرايط مختلف آزمايشگاهي به طور خلاصه در جدول ۱ مندرج است.

۳ - بحث و نتيجه‌گيري

جدول تغييرات شرايط فيزيكي و شيميايي تهيّه لوله‌هاي پلي پروپيلني و پلي‌استيرني پوشش داده شده با پادتن T3 نشان مي‌دهد كه بهترين شرايط فيزيكي براي توليد اين لوله‌ها به شرح زير است:

- كليّه واكنش‌ها در دماي ۳۷ درجه سانتي‌گراد انجام پذيرند. (يادآور مي‌شود كه تمام تغييرات شرايط فيزيكي و شيميايي مندرج در اين جدول در دماي معمولي آزمايشگاه نيز انجام گرفته است ولي به علّت نامناسب بودن پاسخ‌ها و نتايج ذكر آنها بي‌مورد است، ولي انجام مراحل مختلف آزمايش در دماي ۳۷ درجه سانتي‌گراد همواره بهترين نتايج را به همراه داشته است).
- آزمايش كيت نهايي در شرايط گردان (Rotary) صورت گيرد.

يعني لوله‌ها را در دستگاهي قرار دهيم كه واكنش مربوط به كيت در حالت چرخش انجام شود و مواد به طور دائم در تماس مستمر (Mixing) باشند. اگر اختلاط و تركيب مواد و محلول‌ها در لوله‌هاي پلي‌پروپيلني و پلي‌استيرني در حالت سكون صورت گيرد، احتمال تماس مواد با يكديگر كاهش يافته و در نتيجه روند پوشش‌دار شدن لوله‌ها با كندي پيش خواهد رفت و ممكن است كارايي لازم را در آزمايشهاي تيروئيدي نداشته باشند؛ حتي در طي آزمايش‌هايي مشاهده شده است كه در صورت عدم وجود شرايط چرخان، عمل پوشش‌دار شدن لوله‌ها صورت نگرفته است.

بهترين شرايط شيميايي براي توليد اين لوله‌ها بايد به شرح زير باشند:

- غلظت محلول بندآور برابر ۱% باشد.
- غلظت پادتن در حد متوسّط باشد (كه بر اساس آزمايش عيارسنجي بدست مي‌آيد).
- حجم مواد درون لوله‌ها ۰۰ ميكروليتر انتخاب شود.

بر اين اساس نمودارهاي ۱۵ و ۱۷ و ۱۸ به لحاظ شيب مطلوب و شمارش آكتيويته مناسب، نشان‌دهنده بهترين شرايط آزمايشگاهي براي توليد لوله‌هاي پوشش داده شده با پادتن T3 مي‌باشند. شرايط موردنظر مربوط به اين منحني‌ها در جدول۱ مندرج است.

تذكّر اين نكته نيز لازم است كه پس از اِعمال شرايط خاص روي لوله هاي پلي‌پروپيلني ساخت داخل، از آنها بجاي لوله‌هاي مشابه خارجي استفاده شد و نتايج بسيار مطلوبي بدست آمد. بنابراين كاربرد بسيار زياد لوله‌هاي پلي‌پروپيلني ساخت داخل، توجيه اقتصادي و صرفه‌جويي ارزي را دربردارد.

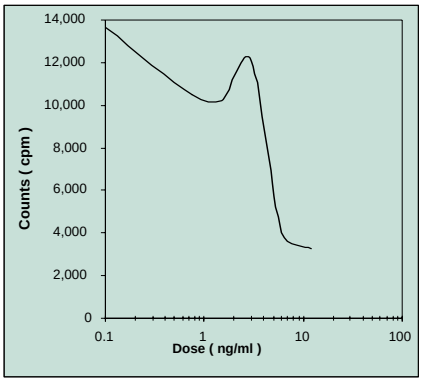
در خاتمه بايد گفت كه با توجّه به مدّت پايداري لوله‌هاي پلي پروپيلني داخلي پوشش داده شده با پادتن T3 كه بيش از ۳ ماه است، در صورت در اختيار گذاردن امكانات و تجهيزات كامل، آمادگي توليد انبوه اين لوله‌ها و در نتيجه توليد انبوه كيت‌هاي تيروئيدي به روش " Coated Tubes" وجود دارد.

تشكر و قدرداني

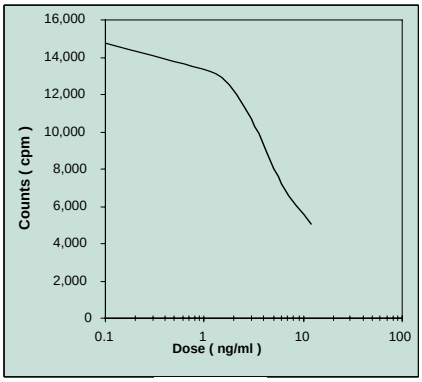
بدين وسيله مراتب تشكر و قدرداني خود را از همكار محترم آقاي هنرمند در آزمايشگاه راديوايمونواسي و آقايان عبدالله‌پور و حمزه‌اي در آزمايشگاه كنترل كيفي كه ما را در انجام مراحلي از آزمايشها ياري دادند اعلام مي‌داريم.

جدول ۱- مقايسه تأثير تغيير فيزيكي و شيميايي در پوشش‌دار كردن لوله‌هاي

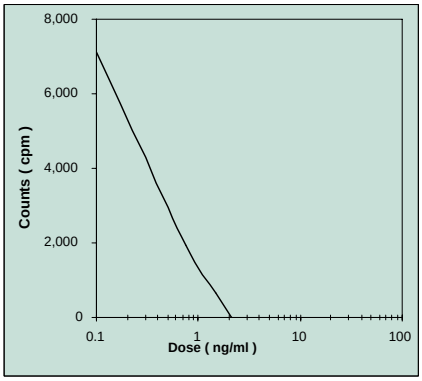
شرايط فيزيكي انجام آزمايش كيت	غلظت محلول بندآور (مقدار درصد)	غلظت پادتن	حجم مواد (ميكروليتر)	جنس لوله	شماره نمودارهاي بدست‌آمده
بدون حركت	۱	كم	۳۰۰	پلي‌استيرن داخلي	نمودار۱
		متوسط			نمودار ۲
		زياد			نمودار ۳
	۵	كم			نمودار ٤
		متوسط			نمودار ۵
		زياد			نمودار ٦
متحرك (Rotary)	۵	كم			نمودار ۷
		متوسط			نمودار ۸
		زياد			نمودار ۹
	۱	كم			نمودار ۱۰
		متوسط			نمودار ۱۱
		زياد			نمودار ۱۲
		متوسط	۵۰۰	پلي‌استيرن خارجي	نمودار ۱۳
			۳۰۰	پلي‌استيرن داخلي	نمودار ۱٤
			۵۰۰	پلي‌استيرن داخلي	نمودار ۱۵
			۳۰۰	پلي‌استيرن خارجي	نمودار ۱٦
			۵۰۰	پلي‌استيرن داخلي	نمودار ۱۷
			۳۰۰	پلي‌استيرن داخلي	نمودار ۱۸



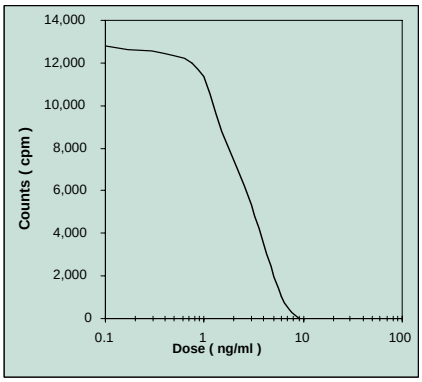
نمودار ٣



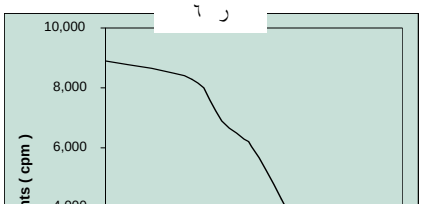
نمودار ٤

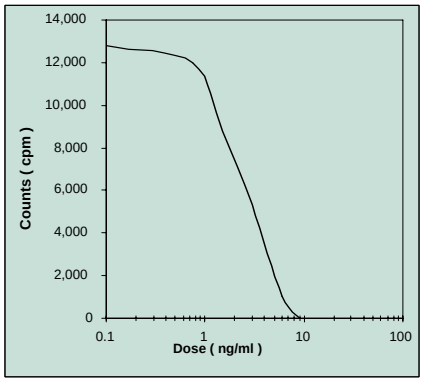


نمودار ٥

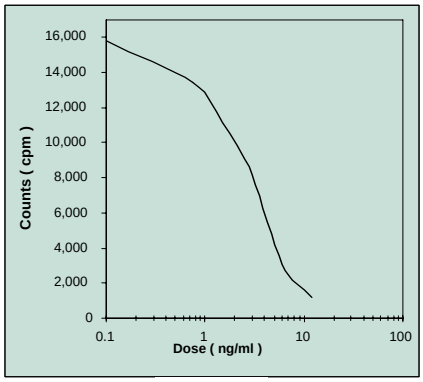


نمودار ٦

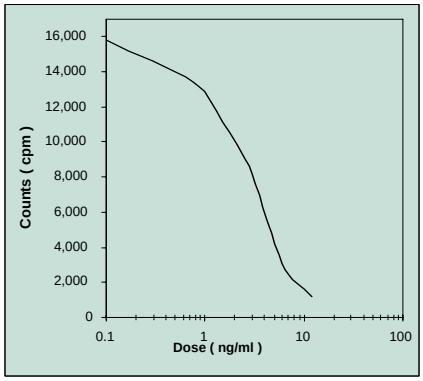




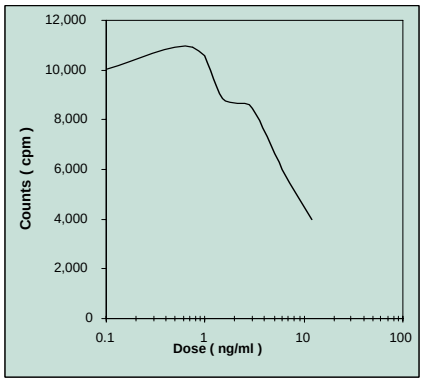
نمودار ٧



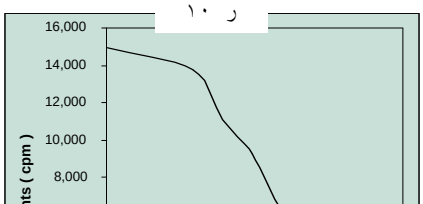
نمودار ٨



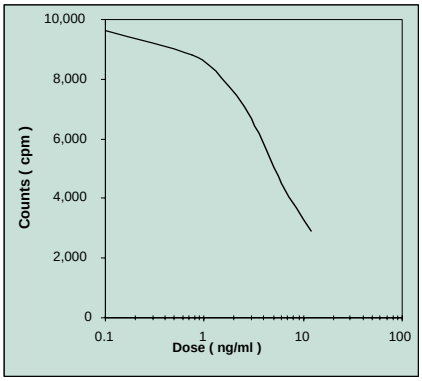
نمودار ٩



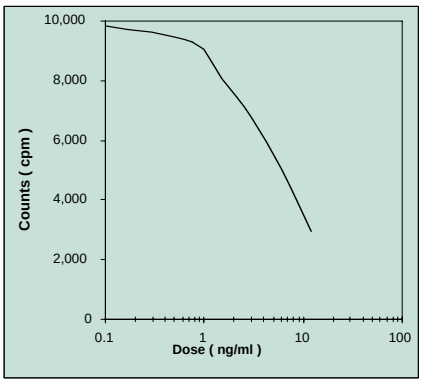
نمودار ١٠



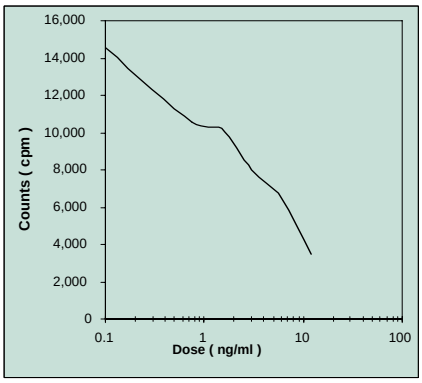
نمودار ۱۱



نمودار ۱۲

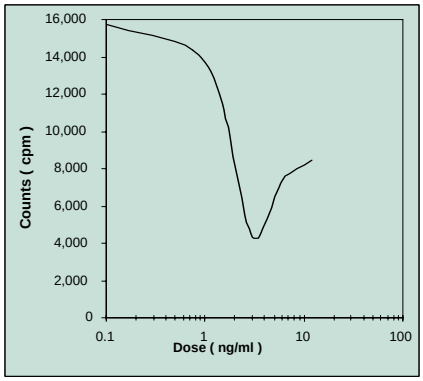


نمودار ۱۳

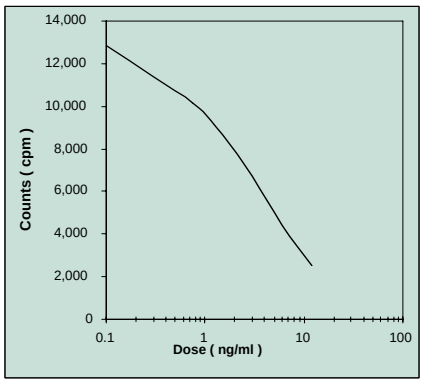


نمودار ۱۴

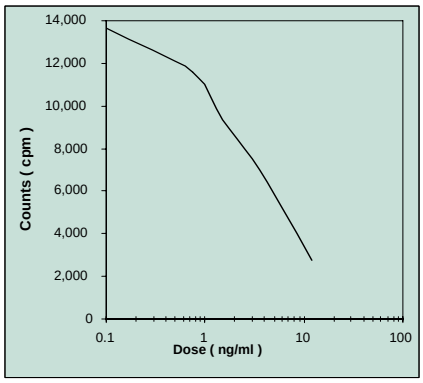
نمودار ۱۵



نمودار ۱۶



نمودار ۱۷



نمودار ۱۸

پي‌نوشت‌ها :

١- Solid Phase
٢ – Liquid Phase
٣ – Polystyrene Tubes
٤ – Triiodo Thyronine
٥ – Affinity Protein Enhancer
٦ – Polypropylene Tubes

References:

1. I. Sarandi, “Coated Tube RIA-IRMA,” Institute of Isotopes, Budapest, Hungary (2001).

2. S.E.Rasmussen,“Complementary mmunoassays,” W. P. Collins (1988).

3. M. R. A. Pillai, “Radioimmunoassay,” Bhabha Atomic Research Center, Bombay (1994).

4. R. Edwards, “The essentials of radioimmunoassay and related techniqes,” England (1998).

5. Panagiota S. Petrou, “Antibody coating approach involving gamma globulins from non- immunized animal and second antibody antiserum,” Immunoassay QC Lab., Athene, Greece (1995).

6. P. Esser, “Adsorption Geometry In Nunc products for solid phase assays,” Athene, Greece (2001).

7. S. E. Rasmussen, “Stability of Nunc-Immuno MaxiSorp Surface,” Athene, Greece (1988).