مجله دانشکده پزشکی ـ دانشگاه ملی ایران
سال چهارم ـ شماره اول صفحه ۲۰ ـ ۳۱

روش اندازه‌گیری پلی‌پپتیدها بطریقه رادیو ایمونو اسی

RADIOIMMUNOASSAY

دکتر هوشنگ نصر * دکتر احمد فتحی‌زاده

در اواخر دهه ۱۹۵۰ برسون BERSON ویالو YALOW برای اولین بار هنگام اندازه‌گیری پادتن‌های ضد انسولین‌در بیماران مبتلا به مرض قند ، روش رادیو ایمونواسی RADIO IMMUNOASSAY (RIA) را برای اندازه گیری انسولین بکار بردند . دیری نگذشت که بوسیله اونگرUNGER واکینز EKINS کار برد این روش ، دراندازه‌گیری گلوکوگان وویتامین ب ـ ۱۲ کشف گردید . در دهه ۱۹۶۰ برای‌اندازه گیری‌بسیاری از هورمونهای پلی‌پپتیدی ازقبیل هورمون‌رشد ، کورتیکوتروپین ، ملانوتروپین MSH ، تیروتروپین TSH, FSH, LH گونادوتروپین‌جفت‌انسانی HCG هورمون‌شیرساز جفت انسان HPL کالسیتونین و هورمون غده پاراتیروئید ، روش‌هائی بطریقه‌رادیو ایمونواسی RIA ابداع شد . یک نمونه جالب از این پیشرفتها کشف روش اندازه گیری پرولاکتین انسان‌بود که این‌روش پس ازبدست آوردن نوع خالص‌هورمون بوجودآمد. RIA بعدا "برای‌اندازه‌گیری‌هورمونهای‌استروئیدی و حتی مواد غیر هورمونی از قبیل آنتی‌ژن استرالیائی‌وبعضی از داروها بکار برده شد . بطور کلی هر ماده خالصی که‌بتوان آنرا با رادیوایزوتوپی نشاندار کرد و همچنین خود بتنهائی ویا باچسبانیدن به پروتئین دیگری قابلیت ایجاد پادتن در بدن داشته باشد ، میتواند بوسیله روش RIA اندازه گیری گردد .

در زیست شناسی تولید مثل ، RIA جانشین مطلق روشهای سابق برای‌اندازه گیری گونادوتروپین‌ها شده است و درنتیجه امکاناتی که این روش اندازه گیری‌هورمون بدست محققین داده است ، عقاید انقلابی فراوانی در علم زیست شناسی بوجود آمده است .

بخاطر تولید هورمونهای خالص و پادتن آنها توسط موسساتی ازقبیل‌موسسه ملی بهداشت آمریکا ، شورای تحقیقات پزشکی بریتانیا ، سازمان‌بهداشت جهانی ، موسساتی ازقبیل‌موسسه تحقیقات بیولوژی تولید مثل ایران وابسته به وزارت بهداری موفق به بکار گرفتن این روش در این منطقه شده‌اند .

اصول : مبنای اندازه گیری پلی‌پپتیدها و استروئیدها بطریقه RIA یکسان‌است واساس آن‌رقابت‌بین‌هورمون موردانداز‌ه‌گیری با مقدار معینی از همان هورمون که با رادیوایزوتوپی نشاندار شده است برای چسبیدن به مقدار معینی از پادتن ضد آن هورمون است

$$Ab + Ag^* \longrightarrow AbAg^*$$

پادتن — پادزای — پادزای نشاندار — به پادتن می‌چسبد

حالا به محیط بالا مقداری Ag مورد اندازه گیری را میافزائیم چون معادله فوق برگشت پذیر است آنتی‌ژن Ag (پادزای) اضافه شده‌قادر است جایگزین‌آنتی‌ژن نشاندار *Ag گشته و خود به پادتن Ab بچسبد . بنابراین رقابتی بین آنتی‌ژن مورد اندازه گیری Ag وهورمون‌نشاندار *Ag برای چسبیدن به پادتن بوجود میآید . چون در روی ملکول پادتن فقط نقاط مخصوص و محدودی هستند که‌قابلیت چسبیدن به آنتی‌ژن را دارند ، بنابراین موقعیکه روی یک ملکول‌پادتن‌مثلا " آنتی‌ژن‌موردانداز‌ه‌گیری می‌چسبد ،آنتی‌ژن نشاندار ناچار محل خود را رها کرده و آزاد میگردد .

به بیان دیگر اگر مقداری هورمون بدون نشان رادیواکتیو به طرف‌راست معادله بالا بافزائیم Ag اضافه شده جای*Agراروی Ab میگیرد و تبدیل به AbAg میکند و*Ag در محیط‌آزاد میگردد . همواره نسبتی بین آنتی‌ژن بی نشان‌رادیو اکتیو Ag و رادیو اکتیویته موجود درAb*Agرسوب شده‌وجود دارد .

---

* بخش داخلی بیمارستان لقمان الدوله ادهم .

اگر مقادیر صعودی معینی از آنتی‌ژن به نشان رادیو اکتیوبکار بریم اعدادمختلف و متناسبی از رادیواکتیویته و رسوب Ag*Ab، نیزمیتوانیم بدست آوریم که بوسیله آنها میتوانیم یک منحنی استاندارد رسم نمائیم . یک محور این منحنی نشان دهنده مقادیرمختلف آنتی‌ژن ومحوردیگر نشان‌دهنده‌رادیواکتیویته موجود در Ag*Ab خواهد بود .

با در دست داشتن منحنی استاندارد و موادی که در زیرذکر شده‌اند ، میتوانیم غلظت یک هورمون را در یک سرم بدست آوریم مواد لازم عبارتند از ;

۱ ــ مقداری آنتی‌ژن نشاندار (از جنس هورمون مورد اندازه گیری) .

۲ ــ مقداری پادتن ضد این آنتی‌ژن .

۳ ــ وسیله‌ای برای‌جدا کردن آنتی‌ژن‌نشاندار آزاداز‌آنتی‌ژن نشانداری که به پادتن مربوطه چسبیده است .

۴ ــ مقدار معین ومناسبی از آنتی‌ژن مورد اندازه گیری بدون نشان رادیو اکتیو .

برای‌اینکه نتیجه آزمایش‌از قابلیت اطمینان‌بیشتری برخوردار باشد باید پیرو شرایط‌آماری مخصوص باشیم که درصفحات آینده ذکر خواهد شد .

هورمون نشاندار: بر خلاف استروئیدها که‌ازرادیوایزوتوپهای ئیدروژن H3 و کربن C14 برای نشاندارکردن‌نشان‌استفاده‌میشد درمورد پلی‌پپتیدها از ید ۱۲۵ ویا ید ۱۳۱ استفاده‌مینمائیم .

دراولین باری‌که‌از ید رادیو اکتیو برای نشاندارکردن‌هورمون استفاده شد ۸۰ میلیکوری ید رادیو اکتیو مصرف گردید . با متدی که گرین وود Green Wood و هانتر Hunter کشف‌کردندفقط مقادیری برحسب میکروکوری ازید رادیواکتیو بکار برده میشود . کشف این دودانشمند با استقبال فراوان روبرو شده است وبه تکنیک رادیو ایمونواسی این امکان‌داده شده که بطور فراوان مورد استفاده قرار گیرد . از زمانیکه‌متد کلرآمین ــ ت‌برای نشاندارکردن هورمونهابکار برده میشود، تهیه هورمون نشاندار خیلی آسان گشته و تکنیک رادیو ــ ایمونواسی از محبوبیت فراوانی در آزمایشگاهها برخوردار است .

روش‌کلرآمین ــ تی Chloramine-T که بوسیله گرین‌وود وهانترابداع شده از زمان پیدایش تا کنون تغییرات مهمی نکرده است . هم ید ۱۳۱ و هم ید ۱۲۵ را میتوان‌در این روش بکار برد ، گرچه حجم و مقدار دقیق مواداولیه‌ای که بکار برده میشود در آزمایشگاههای مختلف تفاوت جزئی دارد ، فرمول اصلی و زمان عکس‌العمل در همه جا یکسان است ، برای مثال :

۱ ــ فسفات سدیم ۰/۰۱ تا ۰/۲۵% سی سی	۰/۵ ملار pH ۷/۵
۲ ــ ید ۱۳۱ وید ۱۲۵ ۰/۰۲ ــ ۰/۰۱ سی سی	۲ ــ ۱ میلی کوری
۳ ــ پلی پپتید ۰/۰۵ ــ ۰/۰۱ سی سی	۵ ــ ۱ میکروگرم
۴ ــ کلرآمین ــ تی ۰/۰۲۵ ــ ۰/۰۱ سی سی	۵۰ ــ ۱۰ میکروگرم
۵ ــ متابی‌سولفیت سدیم ۰/۰۵ ــ ۰/۰۱ سی سی	۱۵۰ ــ ۱۰۰ میکروگرم
۶ ــ آلبومین‌گاوی ۵ در صد در بافر فسفالین ۰/۲ ــ ۰/۱۰۱ " سی سی	
حجم کل =	۰/۷۳ ــ ۰/۱۵ سی سی

مواد شماره از ۱ تا ۳ را در داخل یک ظرف قرارداده‌وقتیکه کلرآمین ــ تی به آن اضافه میکنیم فعل و انفعال بمدت ۲۰ تا ۶۰ ثانیه ادامه می‌یابد . کلرآمین ــ تی ــ ین ید I^- با بار منفی را اکسیده کرده و آنرا به ید بدون بار $I^{(0)}$ و احتمالا" با بار مثبت $I^{(+)}$ تبدیل مینماید .

ید بدون بار $I^{(0)}$ و یا ید با بار مثبت $I^{(+)}$ با ملکولهای تیروزین پلی‌پپتیدها ترکیب میشود وبدین ترتیب‌هورمون را بوسیله خود نشاندار مینماید . این عکس‌العمل ممکن است بحدی پیش برود که بقیه اسیدهای آمینه‌ملکول‌پلی ــ پپتیدها رانیزدر بر گرفته و به انهدام ملکول پلی پپتید بیانجامد . برای جلوگیری از این کار ، عکس‌العمل های ناخواسته رابا اضافه کردن ماده‌احیاء کننده متابی‌سولفیت سدیم متوقف میسازیم . متابی‌سولفیت سدیم ید بدون‌بار یا بار مثبت را تبدیل به ید با بار منفی مینماید و از عکس‌العملهای اضافی جلوگیری بعمل میآورد . از نظر جلوگیری از خراب شدن پروتئینها بوسیله تشعشع‌رادیو ــ اکتیو ، و همچنین برای رقیق کردن مواد مختلف جهت جلوگیری از چسبیدن پلی پپتیدهای نشاندار به ظروف شیشه‌ای ــ ۶۰تا ۱۲۰ثانیه بعدازاضافه‌کردن محلول احیاء کننده ــ یک محلول پاک کن به محیط‌آزمایش میافزائیم. محلول پاک‌کن مخلوطی‌استازفسفات سدیم و بافرفسفالین که مقدار زیادی پروتئین مثل آلبومین گاوی دارد .

آلبومین گاوی از چسبیدن پلی پپتیدهای نشاندار با ماده رادیو اکتیو به دیواره ظروف شیشه‌ای جلوگیری میکند و همچنین ازاثر تخریبی اشعه رادیو اکتیو بر ملکول هورمون میکاهد . دستورالعمل اولیه " گرین‌وود " و "هانتر "اضافه کردن "یدورپتاسیم "را نیز به محلول پاک‌کن توصیه مینماید .

محلولها را از روی ستونی از " سفادکس Sephadex یا بیوژل Biogel که قبلا "بوسیله‌محلول ۰/۰۵ ملار فسفات سدیم از لحاظ اسیدی و بازی متعادل‌گردیده و همچنین بوسیله پروتئین اشباع شده است میگذرانیم . عمل‌اشباع ممکن‌است بوسیله آلبومین گاوی ۵ ـ ۲ در صد و یا سرم موجوداتی که قبلا " هیپوفیز آنها برداشته شده است‌انجام گیرد . هدف ازاشباع بوسیله‌پروتئین جلوگیری از چسبیدن متفرقه نشاندار به وسائل شیشه‌ای و یا ذرات سفادکس‌وهمچنین احتمالا "چسبیدن‌وجذب قطعات خورد شده هورمون مورد اندازه گیری میباشد . وظیفه ستون سفادکس یا بیوژل جدا کردن ید رادیو اکتیو آزاد از ید رادیواکتیوی است که‌به‌پروتئین هاچسبیده است . انتخاب اندازه ستون و اندازه ذرات سفادکس و یا بیوژل بستگی‌به نوع هورمون مورد اندازه گیری دارد . میتوان از هورمون نشاندار که در ستون سفادکس گذشته است‌مستقیما "برای آزمایش استفاده نمودیااینکه آنرا ازستون دومی‌ازسفادکس عبور داد . هدف از بکار بردن ستون دوم سفادکس یا بیوژل جدا نمودن ملکولهای سالم هورمون از ملکولهای بهم‌چسبیده ، خورده شده و یا فاسد شده بوسیله ماده رادیو اکتیو است . قبل از خالص کردن مجدد هورمون میشود آنرا برای مدتی نیز نگهداشت .

نکته اساسی در تهیه هورمون نشاندار اینست که ما باید سعی‌کنیم تا آنجا که میتوانیم هورمون نشانداری‌رابدست آوریم که‌هیچگونه خرابی درآن بوجود نیامده وتمام‌خواص خود را حفظ‌کرده باشد . در صورتیکه مقدار کمتری ید رادیو اکتیو مصرف نمائیم اگر مقدار زیاد ازحدیدرادیو ـ اکتیو بکاربریم ملکولهای هورمون در موقع نگهداری و یا موقع فعل و انفعال بوسیله ماده رادیو اکتیو فاسد خواهد شد . در صورتیکه‌از ید رادیو اکتیو ۳۰۰ ـ ۱۵۰ میکروکوری در هر میکروگرم داشته باشیم از ید I131 یک اتم در هر ملکول و از ید I125 یک تا دو اتم در هر ملکول هورمون بدست خواهد آمد . انتخاب ید I131 و I125 بستگی به سلیقه افراد دارد تقریبا " هیچ نوع هورمونی وجود ندارد که‌فقط بتوان‌بوسیله یکی از این دو هورمون نشاندارکرد . فقط بعضی‌اختلافات جزئی در تکنیک نشاندارکردن‌بوسیله این‌دو رادیو ایزوتوپ وجود دارد و این اختلاف هادراثر متمایز بودن غلظت رادیو ایزوتوپی محلولهای این دو است . غلظت رادیوایزوتوپی برای I131، ۲۰ ـ ۱۵ درصد وبرای I125 ۹۵ ـ ۸۵ درصداست . اما میتوان‌بوسیله‌هردو رادیوایزوتوپ محلولهای هورمون نشاندار باحساسیت‌های متشابه بدست آورد .

بواسطه اینکه دو اتم از ید ۱۲۵ در هر ملکول هورمون بکارمیرود این رادیو ایزوتوپ اثر مخرب بیشتری در روی ملکول هورمون داردولی امتیاز آن‌اینستکه چون نصف‌عمر آن نسبتا " طولانی‌تر است میتوان این‌رادیو ایزوتوپ را از ۶ ـ ۴ هفته نگهداری کرد و بعداً " آنرا قبل ازاستعمال مجددا " خالص نمود . اما هورمونی بوسیله I131 نشاندار میشود که بواسطه کوتاه بودن نسبی نصف عمر آن که فقط هشت روز است فقط تا یک هفته بعد از بعمل آوردن قابل استفاده است . اگر مجبور باشیم ماده رادیو اکتیو مصرفی خودرا ازفواصل دور وارد نمائیم بهتر است‌ازرادیواکتیوی استفاده نمائیم که‌نصف عمر آن‌طولانی‌تر باشد یعنی باید از ید ۱۲۵ استفاده نمائیم .

نکته قابل توجه دیگر در انتخاب نوع ید رادیو اکتیو این است که در صورتیکه دقت دستگاه شمارشگر رادیو اکتیو ما زیادنباشد اشعه گامای کم انرژی که‌ازید ۱۲۵ بوجودمیآید قابل‌ثبت شدن بوسیله دستگاه‌نبوده و از دقت عمل‌کاسته میگردد . گرچه تکنیک نشاندار کردن‌هورمون‌باماده‌رادیو ـ اکتیو هورمون در همه جا یکسان است معهذا در بعضی هورمون ها این عمل بآسانی انجام میگیردکه‌دربعضی موارد هیچگونه هورمون نشانداری بوجود نمیآید . وقتی هیچ ملکول‌هورمونی نشاندارنشد ، ید آزاد اززیرستون‌سفادکس بیرون‌میآید . هورمونها بعدازنشاندارشدن‌حتما "میبایست تمام خواص ایمونولوژیکی‌خود را حفظ‌کرده باشند تا در چسبیدن به‌پادتن‌ضدخود با هورمونهای مشابه‌بدون‌نشان رادیواکتیو رقابت کنند . خود عمل نشاندار کردن ملکول یدی که روی تیروزین‌پلی پپتیدها قرار گرفته ، تشعشعات رادیو اکتیو در حین عمل نشاندار کردن و عبور ازستون سفادکس یابیوژل همه وهمه ممکن‌است خواص ایمونولوژیک یک هورمون را تغییر دهند . اگر تغییرات داده شده در خواص‌ایمونولوژیک شدید باشد ، هورمون‌نشاندار به‌پادتن

مربوطه نخواهدچسبید واگر تغییرات جزئی باشداین‌کاهش قدرت چسبندگی به پادتن باعث کاهش حساسیت در اندازه گیری خواهد شد و البته بمقدار کمتری نیز از دقت وصحت‌عمل خواهد کاست . اگرآسیب وارد شده به ملکول هورمون درلحظات اول بعد از نشاندار شدن زیاد نباشد ، تغییرات جزئی‌فعلی در خاصیت‌ایمونولوژیکی ، بعدا "ممکن است‌درنتیجه نگهداشتن محلول بمدت‌طولانی به‌تغییرات کلی‌تری تبدیل‌گردد . بهترین راه آزمایش کردن خاصیت ایمونولوژیکی هورمون اینستکه عکس‌العمل آنرا با پادتن مربوطه تعیین‌کرده وآنرا بامنحنی استاندارد مقایسه‌نمود . در صورتیکه این عمل امکان پذیر نباشد میتوان‌از کروماتوالکتروفورز روی کاغذ ، کاغذ 3 MC، ستون ذغال دکستران و همچنین تستهای ساده چسبیدن هورمون به پادتن‌اضافی راممکن است مورداستفاده قرار داد تا میزان آسیبی‌که‌به‌هورمون رسیده‌است‌قبل از شروع به اندازه‌گیری تعیین نمود . وقتی که میخواهیم هورمون رادیو اکتیو را مصرف نمائیم ــ در صورتیکه این هورمون فعالیت زیادی برای‌ترکیب‌باپادتن‌خود داشته‌باشد ــ آنرا رقیق مینمائیم بطوریکه درهر ۰/۱ سی سی محلول ۱۰/۰۰۰ تا ۲۰/۰۰۰ شمارش رادیو اکتیویته داشته باشیم .استفاده از هورمون نشاندارمیبایست به حد اقل ممکن تقلیل یابد زیرا دراین صورت مقدار کمتری‌هورمون‌مصرف‌خواهدشدو مقادیرخیلی کم هورمون را میتوان‌درسرمهای مختلف اندازه‌گیری‌کرد . علت اینکه نمیتوانیم مقادیر هورمون نشاندار که کمتر از ۱۰/۰۰۰ شمارش‌رادیواکتیو در هر ۰/۱ میلی‌لیترهورمون دارد بکار بریم اینستکه تغییرات فاحشی ممکن است در شمارش رادیواکتیو لوله‌های مختلف که‌همین حجم مایع را دارندوجودداشته باشد .دومین علت اینستکه در مقادیر کم‌رادیواکتیویته‌نزدیک‌هورمون‌شمارش‌رادیواکتیویته‌زمینه‌ای به شمارش رادیواکتیویته محتوای لوله‌های آزمایش ممکن است باعث کاهش دقت عمل گردد .

تازگیها متدهائی آنزیمی که‌به‌کمک آنها عمل نشاندار کردن با یدرا انجام میدهند بوجود آمده که کمتر باعث خراب‌شدن‌هورمون میگردد اما این روشها هنوز درمقیاس وسیع بکار برده نشده‌اند .

پادتن (آنتی‌سرم) . تنها عامل تعیین کننده دقت‌و حساسیت یک‌آزمایش پادتن بکاررفته است .بوجودآوردن پادتن‌مناسب‌تا اندازه‌ای بستگی به شانس دارد اماعوامل زیادی‌دراین عمل موثر هستند . اول اینکه تمام موادیکه مورداندازه گیری قرار میگیرند باید پادزا (Immunogen) باشند ، یعنی‌اینکه قابلیت ایجاد پادتن ضدخودرادا شته باشند . بطور کلی پروتئین‌ها و پلی پپتیدهائی که‌ملکول آنها بزرگ است یعنی از ۵۰۰۰ بیشتر است پادزاهای (Immunogen) خوبی هستند .

پلی پپتیدهای کوچک ، مانند استروئیدها را میتوان به یک‌پروتئین دیگرچسبانید واز آن پادزای خوبی‌ساخت که قابلیت‌ایجادمقدارزیادی پادتن داشته باشد .بنظرمیرسد هورمونهای مختلف‌جدا از وزن ملکولیشان دارای‌خاصیت پادزائی متفاوتی میباشند و این به آن علت‌است‌که‌ملکول با خاصیت پادزائی بیشتر عوامل پادزائی بیشتری‌درروی خود حمل میکند . مثلا" هورمون رشد خاصیت پادزائی بیشتری‌نسبت به‌ملکول هورمون کالسیتونین‌دارد .افزودن مواد یاور مخصوصا" یاورفروند FREUND ADJUVANT به پادزاها ، میتواند خاصیت پادزائی این مواد راافزایش دهد .

خرگوش یا خوکچه هندی را میتوان برای بوجود آوردن پادتن‌مورداستفاده قرار داد و در صورتیکه بعد از سه ماه مقدار کافی پادتن بوجود نیامد میتوان از حیوان دیگری استفاده نمود . برای تهیه پادتن ۰/۵ تا ۵ میلیگرم از هورمون را هر ماه یکبار برای مدت سه ماه در داخل غدد لنفاوی ، داخل‌جلدویاداخل‌عضله‌۶تا ۱۰حیوان‌تزریق کرده و۱۰ تا۱۴ روزبعد از آخرین تزریق‌خون‌آنهارامیگیریم . چون‌هورمونهای با ملکول بزرگتر عوامل پادزائی بیشتری روی هر ملکول خود دارند انواع مختلف پادتن‌که‌همگی ازنوع **7 S** gamma globulin هستند بوجود میآیندکه‌روی هم برروی آنتی‌ژن مورد نظر بر فعل و انفعالات چسبیده خواهند شد . پادتن بوجود آمده را قبل از آزمایش میبایست از لحاظ‌کمی و کیفی مورد آزمایش قرار دادوسه عامل مهم یعنی ظرفیت (تیتر)،اختصاصی SPECIFICITY و قابلیت چسبندگی به پادزا ANTIBODY AFFINITY را در پادتن بدست آمده‌باید موردبررسی‌قرار داد .

تیتر یا ظرفیت . عبارتست‌از بالاترین‌غلظت‌مناسب‌پادتن درلوله آزمایش‌رادیو ایمونواسی‌و این‌غلظت‌مناسب‌پادتن عبارتست از مقدار پادتنی که ۶۰ ــ ۴۰ در صدهورمون نشاندار را بخود جذب نماید .

غلظتهای متفاوتی از پادتن یعنی

۱/۱۲۸۰۰۰ و ۱/۴۰۰۰ و ۱/۲۰۰۰ و ۱/۱۰۰۰

را به محلول بافرو هورمون نشاندار میافزائیم و بعداز Incubation (به طرز عمل مراجعه شود) هورمون آزاد و هورمون چسبیده به پادتن از هم جدا میکنیم . بامنحنی تیتراسیون بدست‌آمده ، لولدآزمایش را که محتوی‌مقدار مناسب پادتن باشد جهت آزمایش رادیوایمونواسی‌انتخاب‌مینمائیم .اگرلوله‌های‌باتیتراسیون خیلی کم انتخاب نمائیم پادتن اضافی باعث خواهد شد که‌رقابت خیلی ضعیفی بین هورمون نشاندار وهورمون بدون‌نشان‌رادیو اکتیو بوجود بیاید ودرنتیجه بازده‌عمل چندان‌دقیق‌نخواهد بود . ولی‌اگر تیتر زیادتری‌ازپادتن داشته باشیم مقدار کافی پادتن شرایط Assay را تا آخرعمل یکسان‌قرارخواهدداد . علیرغم آنچه گفته شد گاهی‌تیتر پائین پادتن نیز جوابی مشابه تیتر بالای پادتن خواهد داد زیرا در حقیقت حساسیت یک تست بیشتر بستگی به تمایل پادتن برای چسبیدن به پادزا (هورمون) دارد و این آن چیزی است که به‌آن Affinity میگویند .

Affinity عبارتست از میزان تمایل یک پادتن‌برای چسبیدن به یک پادزا که این تقریبا " مشابه به ضریب ترکیب ، K. Association Constant در شیمی‌میباشد .

$$\frac{\text{(غلظت ترکیب پادزاد پادتن)}}{\text{(غلظت هورمون آزاد) (غلظت پادتن آزاد)}}$$

در رادیو ایمونواسی میزان Affinity را از روی منحنی استاندارد نشان‌میدهیم که‌خود بیان کننده‌میزان‌حساسیتی است که پادتن نشان میدهد . به بیان دیگر Affinity عبارتست ازکمترین مقدارهورمون بدون‌نشان‌رادیواکتیوی که‌بااطمینان‌خاطرمیتوان‌بوسیله‌پادتن‌اندازه‌گرفت. Affinity را میتوان از روی منحنی استاندارد نشان داد . یعنی هرچه‌شیب‌منحنی‌بیشترباشد Affinity بیشترخواهدبود. بنابراین بهترین‌راه‌تعیین‌میزان‌تمایل‌پادتن‌برای‌چسبیدن به پادزا یعنی تعیین میزان Affinity رسم یک منحنی استاندارد برای پادتن میباشد .

هورمونی که با غلظت خیلی کمی جریان می‌یابد ــ مثلا " غلظتهائی در ردیف Pg/ml به پادتنی‌با affinity خیلی‌بیشتر ازپادتنی‌که برای هورمونهای با غلظت‌بالاتر مثلا " در ردیف ug/ml جریان می‌یابد احتیاج دارد . پس تقریبا "هر چه غلظت هورمون مورداندازه ــ گیری کمتر باشد ، دقت عمل نیز کمتر است .

ویژگیهای پادتن‌ها . پادتن و یا پادتن ها در مقابل یک یاچندعامل‌پادزائی‌که روی ملکول هورمون قرارگرفته‌اند ، بوجود میآیند . بنا بر این پادتنی‌که دررادیوایمونواسی بکار برده میشود باید مختص‌هورمون مورداندازه‌گیری باشد . همچنین ممکن است هورمونهای دیگری باشندکه عوامل پادزائی مشابه با هورمون مورد اندازه‌گیری‌داشته باشند و نیز ممکن است قطعاتی از ملکول هورمون مورد اندازه گیری‌نیزدرمحلول وجود داشته باشند که تعدادی عوامل پادزائی را با خود حمل نمایند . در هر دوی‌این مواردپادتن‌به‌این‌مواد چسبیده خواهد شدوجواب‌آزمایش دقیق‌نخواهدبود . تقریبا " غیرممکن است پادتنی بوجود آوریم که به هورمونهای دیگری که دارای عوامل‌پادزائی مشترک‌باهورمون مورداندازه گیری‌میباشندترکیب‌نگردد .

برای جلوگیری از این کار ما تا حدود امکان از خالصترین نوع هورمون استفاده مینمائیم . قبل از شروع آزمایش بایدتعیین‌کنیم که چه هورمونهائی دارای عوامل پادزائی مشترک با هورمون مورد اندازه گیری میباشند . برای این کار منحنی های استاندار را با بکار بردن پادتن مورد نظر ، هورمون نشاندار رادیو اکتیو و هورمونهای مختلفی که میخواهیم اشتراک‌خاصیت پادزائی آنرا باهورمون‌مورد اندازه گیری تعیین کنیم ، بکار میبریم . هورمونهائی را که خاصیت پادزائی یکسان با هورمون مورد نظر دارند منحنی‌هائی درست بموازات و در جهت منحنی‌هورمون مورداندازه گیری‌بوجودمیآورند . درصورتیکه‌هورمونهائی که این خاصیت را نداشته باشند منحنی‌های افقی یا غیر موازی با منحنی استانداردبوجود میآورند .

روش‌دیگری که برای تعیین هورمونهای با خاصیت‌پادزائی مشترک‌بکار برده میشود بکار بردن منحنی‌های تیتراسیون نمونه‌های نشاندار هورمونهای مختلف است . هورمونهای نشاندارمختلف‌که‌خاصیت پادزائی مشترک با هورمون‌مورد نظر دارند تا اندازه‌ای به پادتن مربوطه می‌چسبند در صورتیکه این حالت در مورد هورمونهای دیگر اتفاق نمی‌افتد .

گونادوتروپین‌جفت‌انسانی FSH, LH تیروتروپین مثالهائی هستند از هورمونهائی که خاصیت پادزائی مشترک دارند .

بررسی‌ساختمان این ملکولها نشان داده است که عوامل پادزائی مشابهی درروی ملکول‌این هورمونهاوجوددارند که باعث میشوند که این هورمونها همگی با یک پادتن ترکیب‌گردند . یکی دیگراز عواملی که باعث میشود پادتن بوجود آمده چندان اختصاصی‌نباشد بکار بردن نوع‌نا ـ خالص هورمون برای تهیه پادتن میباشد . گاهی اوقات خاصیت چسبیدن یک پادتن برای دو هورمون آنقدر زیاد است‌که‌مثلا" اگر بخواهیم مقدارHCG را اندازه بگیریم در عمل مقدار FSH اندازه گرفته میشود . برای جلوگیری از چنین خطاها که در اثر وجود یک یا چند عامل پادزائی مشترک بین دو هورمون بوجود میآید روش‌های زیررا بکار می‌بریم :

۱ ـ پادتن مربوطه را با هورمونی که ملکولهایش یک یا چند عامل پادزائی مشترک با هورمون مورد اندازه گیری داردمخلوط‌کرده و در شرایط مخصوص نگهمیداریم . بعد از مدتی مقداری‌از پادتن با هورمونی که خاصیت پادزائی مشترک دارد ترکیب شده وآنرا خنثی میکند و پادتنهائی که فقط‌با عوامل پادزائی اختصاصی‌هورمون‌موردانداره ـ گیری قابل ترکیب هستند در محلول باقی میمانند .

۲ ـ روش دوم برای تهیه پادتن اختصاصی اینست که‌در تزریق هورمون به حیوانات برای‌تهیه پادتن آن قسمت‌از ملکول را تزریق مینمائیم که خاصیت پادزائی مشترک با هورمونهای‌دیگر نداشته باشد و عوامل‌پادزائی آن مختص خود هورمون باشد . البته در این موارد میبایست دانش عمیقی‌درباره ملکول‌هورمون موردنظر داشته‌باشیم .

۳ ـ برای تهیه پادتن اختصاصی بکار بردن روشهای شیمیائی و یا الکتروفورز میباشد که‌این متد بیشتر در رادیو ایمونواسی استروئیدها بکاربرده میشود ولی در رادیو ایمونواسی پلی‌پپتیدها چندان عملی نیست .

جدا کردن‌پادزای‌آزاد (آنتی‌ژن)از پادزای‌ترکیب‌شده‌با پادتن

برای‌جدا کردن هورمونهای آزاداز هورمونهای نشاندار چسبیده به پادتن در نتیجه رسم منحنی برای تعیین مقدار هورمون نمونه‌های مختلف ، روشهای زیادی به کار برده میشود . البته بهترین روشها روشی است‌که سریع ، قابل تکرار ، ارزان و ساده باشد . اساس متدهای‌مختلف رامیتوان در شش روش زیرخلاصه‌نمود .

۱ ـ روش الکتروفورز کروماتوالکتروفورز

یالو Yalow و Berson برای اولین بار از الکتروفورز روی کاغذ برای جدا کردن هورمون آزاد ازهورمون‌نشاندار چسبیده به پادتن استفاده کردند . انواع ژل الکتروفورز را نیز میتوان در این مورد بکار برد . کروماتوالکتروفورز نیز برای جدا کردن قاطع هورمون‌آزادازهورمون‌چسبیده به پادتن‌بکاربرده‌میشود . دراین‌روش‌چون کاغذهای بکاربرده‌شده (مثلا MC ۳ یا DEAE) قدرت این را دارند که فقط هورمون آزاد را بخود جذب کنند ، باعث میشوند که سرعت سیر هورمون آزاد و هورمون چسبیده به‌پادتن‌درمیدان الکتریکی‌متفاوت باشد .اختلاف وزن و اندازه ملکول هورمون آزاد و هورمون چسبیده به پادتن باعث این اختلاف سرعت میگردند . اشکالاتی که در این‌روش وجوددارد ، طولانی‌بودن ، کار زیاد ، احتیاج به تجربه و مصرف‌فراوان وسائل و جا میباشد .

۲ ـ تصفیه بوسیله ژل

برای‌جدا کردن هورمون آزاد از هورمون چسبیده به پادتن‌میتوانیم از پلی مردکستران (سفادکس)استفاده نمائیم در این روش نیز از اختلاف وزن بین دوماده مورد نظر استفاده میکنیم . در رادیو ایمونواسی از ستونهای خیلی کوچک سفادکس استفاده میشود ولی این روش نیز عملا" خیلی مشکل بوده و احتیاج به مکان ، زمان و انرژی فراوان دارد

۳ ـ رسوب غیر اختصاصی‌هورمونهای‌چسبیده‌به‌پادتن

سولفیت‌سدیم ، اتانول ، سولفات آمونیم ،اسیدتری کلرواستیک وغیره‌باعث میشوند که هورمونهای‌چسبیده به‌پادتن رسوب کنند . البته هنوز اصلاحات فراوانی در این روش باید بوجود آید تا بتوان آنرا برای رادیو ایمونواسی پلی پپتیدها بکار برد .

۴ ـ طریقه استفاده از رسوب ایمونولوژیکی

اصولا" هورمون‌چسبیده به پادتن خود محلول میباشد ولی اگر پادتن دومی بر علیه پادتن‌اول به محلول اضافه کنیم ، هورمون چسبیده به پادتن‌رسوب‌میکند .

اوتیگرUTIGERو همکارانش برای اولین بار از این‌روش در رادیو ایمونواسی استفاده‌نمودند . و این‌روش امروزه بطورمتداول در رادیو ایمونواسی پلی‌پپتیدها بکاربرده میشود . پادتن دوم را با تزریق گاماگلوبولین حیوانی که از پادتن اول درست کرده‌ایم (خوکچه هندی یا خرگوش) به‌حیوان‌دیگری نظیر بز و بره‌بدست‌میآوریم در غلظتهای خیلی کم پادتن اول ، پادتن دوم قادر است فقط بمقدار کمی رسوب بوجود آورد که خود اشکالات‌زیادی‌رادرجداکردن آن سبب‌میشود . بااضافه کردن‌یک‌پروتئین ناقل Carrier مانند سرم معمولی و یا گاماگلوبولین حیوانی که پادتن اول را داده است (غلظت‌آن $\frac{1}{50}$ تا $\frac{1}{3000}$ غلظت نهائی است) . پادتن دوم قادر خواهد بود رسوب کافی از گاماگلوبولین نامبرده و پادتن اول را بوجود آورده گاماگلوبولین یا سرمی را که به محلول میافزائیم پروتئین ناقل یا حمال نامیده میشود که این درنتیجه بوجود آوردن رسوب بیشتر امکان جدا کردن رسوب را از محلول بدست میدهد . البته برای ترکیب پادتن دوم با هورمون چسبیده به پادتن اول باید به مدت ۷۲ ــ ۱۶ ساعت مخلوط‌این دو ماده را در ۴ درجه حرارت سانتیگراد نگهداریم و بعد آنرا سانتریفوژ نمائیم . از اشکالاتی‌که در این روش وجود داردترکیب سرم انسان و پادتن دوم در اثر وجود کمپلیمانها در سرم میباشد . با EDTA کلسیم خون را جذب میکنیم زیرادرمحلول بدون‌کلسیم‌کومپلیمانها فعالیتی‌نخواهند داشت و پادتن ثانویه بسادگی میتواند کار خودش را انجام دهد . البته مکانیسم دقیق این پدیده معلوم نیست ، سرم انسانی ازراههای مختلف میتواند روی پادتن ثانویه اثرگذاشته و باعث کم و زیاد شدن‌رسوب گردد روی این اصل از سرم حیوانات دیگر و یا سرم موجودات‌دیگرو یاسرم موجودات‌بدون‌هیپوفیزاستفاده مینمائیم ، تامقدارسرم درلوله‌های استانداردولوله‌های محتوی‌هورمون موردانداز‌ه‌گیری‌یکسان‌باشد . روش‌دو ــ پادتنی که دربالاذکرشدباموفقیت فراوان در رادیو ــ ایمونواسی پلی‌پپتیدهابکاربرده میشود .

۵ ــ جذب هورمون بوسیله فاز جامد

SOLID PHASE ABSORPTION

محلول شامل هورمون آزاد و هورمون چسبیده‌به‌پادتن رامیتوان‌از روی مواد نا محلولی‌از قبیل ذغال ، تالک ، سیلیکا ، فلوریسیل و بعضی از رزین‌ها عبور داد . در این عمل هورمون آزاد به این مواد نا محلول چسبیده خواهد شد . و از هورمون چسبیده به پادتن جدا میگردد . این موادباسرعت پلی‌پپتیدها را بخودجذب مینمایند اما بیشتر در رادیو ایمونواسی استروئیدها بکاربرده میشوند . ارزانی ، سرعت و سهولت استفاده ازاین‌مواد این متد را خیلی مقبول ترازروش‌دوپادتنی و الکتروفورز نموده است . ذغال از همه بیشتر بکار برده میشود . بهتر است قبلا" ذغال را با دکستران‌و پروتئینها شستشو دهیم تااز جذب هورمون چسبیده‌به پادتن‌جلوگیری‌نمائیم . هر آزمایشگاه باید مقدارنسبی ذغال دکستران و همچنین طول مدت Incubationرا برای هورمون مورد اندازه گیری‌تعیین نماید . گاهی از اوقات هرآزمایشگاه ممکن است با بکار بردن متد " جذب به فاز جامد " با اشکالاتی روبرو شود که در این صورت میبایست متدهای دیگری را مورد بررسی قرار داد .

۶ ــ روش استفاده از فازجامد پادتن‌دار

SOLID PHASE ANTIBODY System.

متد دیگر جدا کردن هورمون آزاد ازهورمونهای‌چسبیده به‌پادتن ، استفاده ازروش جدیدی است که در آن‌قبلا" پادتنها را جذب مواد غیر محلولی از قبیل دیسکهای پلی‌تترافلورواتیلن ، پلی پروپیلن‌ولوله‌های‌پلی‌استیرن مینمایند . بوسیله محلولهای غلیظ پادتن لوله ها و دیسکهای نامبرده را آغشته مینمایند . دیسکها ولوله‌ها را میشود ماهها قبل از مصرف نگهداشت . هورمون‌و یا بافر را به این دیسکهاو یا لوله‌ها میافزائیم و بعداز Incubation آنرا میشوئیم . مقدار رادیواکتیویته ای که باقی میماند نمایانگر جزء ترکیب شده هورمون‌با پادتن است . این روش را میتوان با تغییرات دیگری‌نیز بکار برد که در آن پلی‌مرهای دکستران (CROSS LINKED DEXTRAN) یاآگاروز AGAROSE سفادکسی و سفاروز Sepharose برای جذب پادتن بکار میبریم . این روش هنوز به طور کامل‌مورد قبول قرار نگرفته است . روش دیگری که برای این عمل بکار میبرند استفاده از پلی‌مرها یا Aggregation پادتن است که بصورت غیر محلول درآمده‌وباهورمونها ترکیب میشود و آنرا از هورمونهای چسبیده به‌پادتن‌جدا میکند .

هورمون استاندارد مورد مراجعه REFERENCE STANDARD

مقدار هورمون نشاندار مناسب و پادتن مخصوص آن سومین چیزی‌که میبایست داشته باشیم استانداردهای مناسب میباشد . منحنی‌های استاندارد برای هرآزمایش لازم است زیرا درهر آزمایش پیچیدگی هائی درتهیه هورمون وپادتن و ترکیب آنها وجود دارد که یک آزمایش را از آزمایش دیگر متفاوت میسازد . در آزمایشهای بزرگ ممکن است شرایط از اول تا آخر تغییر کنند بطوریکه منحنی‌های استاندارد فراوانی برای قسمتهای مختلف لازم خواهد شد . چون تهیه استانداردها معمولا " بوسیله مراکزبزرگ اندازه‌گیری هورمون انجام میگیرد ، این وظیفه آنها خواهد بود که استانداردهائی با شرایط مخصوص و متفاوت تهیه‌نمایند . این اختصاصات عبارتند از یکسان بودن با هورمون مورد اندازه گیری ، پایداری و نوع تهیه‌ای که میشود بطور یکسان در اختیار لابراتوارهای مختلف گذاشت . یکسان بودن محلولهای استاندارد مورد مراجعه با نمونه هورمون مورد اندازه گیری خیلی ایده‌آل است زیرا هر دوی آنها بطور مشابهی برای چسبیدن به پادتن مربوطه رقابت میکنند .

اگر دو هورمون یکسان نباشد سرعت عکس‌العمل محلول استاندارد هورمون و نمونه مورد اندازه‌گیری هورمون با پادتن مربوطه یکسان نخواهد بود . گر چه در صورت امکان بهتر است از هورمون آسیب ندیده و کاملا " خالص استفاده نمود .

در رادیو ایمونواسی پلی‌پپتیدها معمولا " انواع خام هورمون نیزبدون اشکالات چندانی استفاده مینمایند . هورمونهای سنتتیک از قبیل آرژنین ـ وازوپرسین را مینوان بصورت خیلی خالص بدون از دست دادن خواص شیمیائی وفیزیکی آن استانداردیزه کرد . بدون اینکه احتیاج داشته باشیم نوع استاندارد آنرا از موسسات بزرگ وارد کنیم . اما بسیاری دیگر از هورمونهای غیرسنتتیک میبایست ازبافتهای مختلف جدا گردند . البته درتهیه نوع خالص آنها بدین طریق اشکالات فراوانی وجود دارد و ملکولهای هورمون در این روش آسیب فراوانی میبینند و در نتیجه هورمون بدست آمده چندان هم خالص نیست و خام میباشد . نوع خام هورمون ـ تا موقعیکه فعال پادزائی هورمون دست نخورده بوده پادتن کاملا " اختصاصی باشد ـ قابل استفاده است . در نمونه‌های استاندارد شده هورمون نمیبایست ذرات خرد شده هورمون و هورمون تغییر شکل یافته وجود داشته‌باشد زیرا این ذرات ممکن است برای چسبیدن به پادتن با ملکولهای سالم هورمون رقابت کنند . برای نمونه هورمون گونادوتروپین یائسگی انسان که دومین نمونه مورداستفاده بین‌المللی است دارای مقادیری ازهورمونهای LH و FSH میباشد . برای تعیین کمی و کیفی هورمون محلول استاندارد باید آنرا بروشهای فیزیکی و شیمیائی از قبیل الکتروفورز و تصفیه از روی ژل و غیره مورد آزمایش قرار دهیم . محلول های استاندارد هورمون ها را بوسیله والانس‌گرم Mass equivalent و یاواحدهای دیگر می‌سنجند . تعریف واحدهای یاد شده بوسیله یک کمیته مرکزی ازقبیل " کمیته متخصصین میزان کردن مواد بیولوژیکی سازمان بهداست‌جهانی " بر اساس آزمایشهائی که دریک آزمایشگاه بزرگ مرکزی انجام میدهند ، تعیین میگردد . با در نظر گرفتن مقدار حقیقی هورمون در محلول استاندارد میشود فهمید که واحد بکار برده شده تقریبا " واحدی ساختگی است و بستگی به استانداردهای قبلی و بیواسی دارد . والانس گرم Mass equivalent نیز خود فقط یک‌تقریب نزدیک به صحیح از مقدار هورمون بدست‌میدهد والا مقدار حقیقی هورمون در نمونه استاندارد معلوم نیست . تنهاراه تعیین مقدار حقیقی هورمون در نظر گرفتن شکل ملکولی هورمون و تعیین مقدار ملکول دست نخورده از هورمون در مقدار معینی از محلول است . باید در نظر داشت که در حال حاضر که این روش یک متد غیر عملی برای تعیین مقدار هورمون در نمونه‌های استاندارد میباشد ، درحقیقت برای مقاصد تحقیقی و کلینیکی‌در جائیکه تعیین غلظت حقیقی امکان پذیر نیست مقدار غلظت نسبی هورمون‌کفایت خواهد کرد .

پایداری هورمون

پایداری هورمون بستگی به نوع ذخیره کردن هورمون از قبیل محلول نگهداشتن و یا لیوفیلیزه کردن ، درجه حرارت ، ظرف نگهدارنده و بافر استفاده شده‌دارد . کاهش ۳ در صد فعالیت هورمون‌درهر سال‌مورد قبول‌است ولی هر چند گاهی محلولهای استاندارد را باید مجددا " غلظت سنجی‌نمود . از دست داردن خواص‌هورمون‌ممکن است بعلت چسبیدن هورمون‌به دیواره ظرف نگهدارنده دایمریزه وپلی‌مریزه شدن‌هورمون ، تجزیه هورمون‌بوسیله آنزیم آزاد شده از بافتها ، میکربها و از دست دادن

گروه های آمیدی هورمون باشد . نوع لیوفیلیزه هورمون بیشتر از نوع محلول آن پایدار میماند . استانداردها را معمولا" درلوله آزمایشودر برودت ۲۰ ــ درجه‌سانتیگراد و یا حتی درجات پائین‌تر ذخیره میکنند .

هورمون استانداردی که‌درآزمایشگاههای مختلف بکاربرده میشود و همچنین هورمونی که در یک آزمایشگاه درطی آزمایشهای متعدد بکار برده میشود باید یکسان باشد تا جوابهای‌آزمایش ،باهم تطبیق‌نمایند .گرچه‌آزمایشگاهائی که محلولهای استاندارد خود را از بافتهای مختلف جدا میکنند اطلاعات و تجربیات خوبی در باره RIA هورمونها کسب مینمایند ، معهذا عمل آنها باعث ایجاد اختلافاتی درجوابهای آزمایش بین آنهاوآزمایشگاههای دیگرخواهدشد . روی این‌اصل‌استفاده از استانداردهائی که بوسیله آزمایشگاههای مرکزی تهیه میشود از جهت از بین بردن اختلاف در جواب آزمایشگاهها ضروری بنظر میرسد . موسسه ملی بهداشت امریکا ، موءسسه تحقیقات هیپوفیز ایالات متحده ، شورای تحقیقات پزشکی Medical Res. COUNCIL وسازمان‌بهداشت‌جهانی بهترین‌ومهم‌ترین‌مراکزتهیه کننده هورمونهای استاندارد میباشند .

بررسی و تحلیل آماری رادیو ایمونواسی

منحنی‌های استاندارد برای‌تعیین مقدار هورمون درنمونه های مورد آزمایش می‌بایست در اول کار ترسیم گردد . راههای مختلفی برای نمایش‌گرافیک‌جوابها وجوددارند . منحنی خطی شمارش رادیو اکتیو هورمون آزاد و هورمون چسبیده به‌پادتن رامیتوان روی‌محورافقی دستگاه‌مختصات با بکار بردن اعداد زیر مجسم ساخت .

الف : نسبت و یا در صد شمارش رادیو اکتیو در هورمون چسبیده به پادتن به کل شمارش رادیو اکتیودر هر لوله آزمایش .

ب : نسبت و یا در صد شمارش رادیو اکتیو در هورمون چسبیده به پادتن به شمارش رادیو اکتیو در لوله‌آزمایشی که‌بیشترین‌مقدار رادیو اکتیویته داشته و هیچگونه‌هورمون استانداردی ندارد .

پ : نسبت و یا درصد شمارش رادیو اکتیو در هورمون چسبیده به پادتن به شمارش رادیو اکتیو در جزء آزاد هورمون‌که‌در قسمت زلال (ته نشست نشده) لوله‌آزمایش قرار دارد .

ت : شمارش حقیقی رادیواکتیو در هورمون‌چسبیده به پادتن .

ث : عکس نسبتهای یاد شده در بالا .

منحنی بدست آمده مثلا" منحنی (ب) یعنی نسبت شمارش رادیو اکتیو که در جزء چسبیده به پادتن هورمون به شمارش لولدای که ماکزیمم رادیو اکتیویته داشته و هیچگونه محلول استانداردی در آن نیست ، را میشودبه عدد لگیت (logit) تبدیل نمود تا در رسم منحنی بجای‌یک‌منحنی یک‌خط مستقیم بدست‌آوریم‌ودرنتیجه‌آنرادر کامپیوتر استفاده نمائیم . مقدار نمونه استاندارد درلوله آزمایش رانیز میتوان مستقیما" و یا بطور لگاریتمی روی محور مختصات برد .

وقتی که رادیو ایمونواسی شروع به کار کرد باید از نتیجه عمل اطمینان حاصل کرد . برای اطمینان باید دقت ، صحت ، حساسیت و خصوصیات و قابل تکرار بودن آن را مورد بررسی و توجه قرارداد .مقصودازدقت Precision اینستکه تعیین کنیم تا چه اندازه تکرار یک آزمایش با مقایسه بامنحنی‌استاندارد جوابهای مشابه بوجودمیآورد که این خود مبین میزان خطای آزمایش بوده و معمولا" بستگی‌به قابلیت و شایستگی و کیفیت عمل یک آزمایشگاه میباشد .

مقصود از صحت جوابها accuracy عبارتست‌ازمیزان نزدیک بودن جواب تعداد زیادی از دفعات اندازه‌گیری یک هورمون با مقدار اصلی و حقیقی این هورمون در یک نمونه . اما چون مقدار حقیقی و مطلق هورمون را در یک نمونه معمولا" نمیدانیم‌فقط قادرهستیم به یک‌صحت‌عمل نسبی در رادیو ایمونواسی RIA برسیم و این صحت‌عمل نسبی را میتوان با در نظر گرفتن جوابهائی که از اندازه گیری‌هورمون با متدهای بیولوژیکی (Bioassay) بدست آمده و با در نظر گرفتن وضعیت‌کلینیکی بدست آوریم .

حساسیت (Sensitivity) عبارتست از کمترین مقدار هورمونی که میشود با اطمینان آماری اندازه‌گرفت . اگرشیب‌منحنی استاندارد رااندازه بگیریم هر چه شیب زیادتر باشدحساسیت آزمایش بیشتر است . حساسیت‌یک آزمایش را میتوان با بکار بردن هورمونهای نشانداری که خصوصیات فوق‌العاده داشته و یا با بکار بردن پادتنی‌که تمایل خیلی زیادبرای‌چسبیدن به هورمون را داشته‌باشد افزایش دهیم (رجوع شود به مطالب قبل) .

SPECIFICITY یا ویژگی تعیین کننده میزانی‌است که هورمونهای دیگر غیر از هورمون مورد اندازه گیری در اندازه گیری یک هورمون دخالت مینمایند . این دخالت ممکن است به یکی از علل زیر باشد .

۱ ـ هورمون استانداردبکاربرده شده، ممکن است کاملا" یکسان با هورمون مورد اندازه گیری نباشد .

۲ ـ ذرات خردشده‌هورمون ممکن است در عمل دخالت نمایند .

۳ ـ هورمونهای دیگری‌که ازلحاظ ایمونولوژیک‌باهورمون مورد نظر مشابهت دارند ممکن است وارد عمل شوند .

۴ ـ عوامل غیر مشخص از قبیل محیط یونی ، PH هپارین ، غلظتهای متفاوت پلاسمادر لوله استانداردو لوله‌های محتوی هورمون مورد اندازه‌گیری .

این عوامل رابا استفاده از تجربیات و تئوریها و یکسان کردن‌غلظت پلاسما در لوله استاندارد و لوله محتوی‌ماده [illegible] ای

موازی منحنی استاندارد باشد . اگر منحنی موازی‌منحنی استاندار نباشد میتوان نتیجه گرفت که آزمایش RIA ویژگی برای‌هورمون مورد نظر نداشته و هورمونهای‌دیگری که خاصیت ایمونولوژیکی مشترک با هورمون مورد اندازه گیری داشته ویا قطعات خرد شده‌هورمون‌مورد اندازه‌گیری ویااستفاده ازپادتن غیر اختصاصی باعث ایجادجوابهای غلط شده‌اند که این عوامل میبایست قبل از شروع RIA از بین برده شوند .

قابل تکرار بودن آزمایش REPRODUCIBILITY میزانی که اندازه گیریهای مکرر هورمون جوابهای یکسان را به وجودمیآوردتعیین میکند . اختلافاتی که دراین‌آزمایشها بوجود میآیند گرچه اجتناب ناپذیرند ولی بمقدار زیاد میشود آنها را کاهش داد . برای کنترل کیفیت‌آزمایش میتوانیم سرمهائی به‌ارزشهای پائین ، متوسط‌و بالادر هنگام آزمایش مورد استفاده قرار دهیم . وقتی که‌ضمن آزمایش باسرمهای کنترل جوابهای غیر منتظره‌ای بدست

انکوباسیون اولیه‌پادتن‌ثانویه‌رااضافه میکنیم وبعدمجددا " ۲۴ الی ۷۲ساعت‌درحرارت ۴درجه‌سانتیگرادنگهمیداریم . بایستی پروتئین حمال از قبیل سرم خرگوش در صورتیکه پادتن اولیه نیز از خرگوش درست شده باشد ، دراین مرحله بکاربرد .بعد ازانکوباسیون دوم ، لوله‌های‌آزمایش را در سانتریفوژ قرار داده و سرعت دستگاه گریز از مرکزرا در ۲۵۰۰ تا ۳۰۰۰ دور در دقیقه تنظیم مینمائیم وبعداز ۳۰ دقیقه سانتریفوژ قسمت زلال روی لوله های آزمایش را بیرون ریخته و یا با سرنگ جدا کرده و بدور میریزیم و ته نشست لوله ها را برای ۱ یا ۲ دقیقه درشمارشگررادیواکتیو Scintilation Counter قرار داده وآنرامیخوانیم .

بعدشمارش های خوانده شده را تبدیل به نسبت یا در صد نموده و روی یک محور مختصات آنرا ثبت مینمائیم . و لگاریتم‌دوز Logit راروی‌محور دیگر میبریم .میتوانیم بجای اینکه این اعمال را با دست انجام دهیم از یک کامپیوتر که بتواند نسبت شمارشها را به Logit تبدیل کند استفاده نمائیم . مقدار هورمون در نمونه‌های مورد آزمایش را با مقایسه مقدار رادیواکتیویته در این لوله‌ها و در لوله‌های استاندارد میتوان معین کرد . تنها با روش رادیوایمونواسی مقادیر بسیار کم هورمونها در خون‌وادرار را بآسانی میتوان اندازه‌گیری کرده استفاده از این روش برای اندازه گیری مواد دیگر در پزشکی روزبروز افزایش می‌یابد .

شماره لوله	بافر	رادیواکتیویته	استاندارد	پادتن اول	سرم هیپوکس	سرم نمونه
۲ ــ ۱ (شمارش رادیواکتیوکل)	ــ	۰/۱سی‌سی	ــ	ــ	ــ	ــ
۴ ــ ۳ ترکیبهای غیراختصاصی)	۰/۷سی‌سی	۰/۱ سی‌سی	ــ	ــ	۰/۱سی‌سی	ــ
۶ ــ ۵ (ترکیب‌ماکزیمم)	۰/۶سی‌سی	۰/۱سی‌سی	ــ	۰/۱سی‌سی	۰/۱سی‌سی	ــ
۲۲ ــ ۶ (استانداردها)	۰/۵سی‌سی	۰/۱سی‌سی	۰/۱سی‌سی	۰/۱سی‌سی	۰/۱سی‌سی	ــ
۳۳ به بعد	۰/۶سی‌سی	۰/۱سی‌سی	ــ	۰/۱سی‌سی	ــ	۰/۱سی‌سی

REFERENCES:

1. S.A. Berson, R.S. Yalow, S.M. Glick, and J. Roth, "Immunoassay of Protein and Peptide Hormones," Metabolism, 13, 1135 (1964).

2. S.A. Berson, and R.S. Yalow, "General Principles of Radioimmunoassay," Clin. Chim. Acta, 22, 51 (1968).

3. E. Diczfalusy, Ed., "Immunoassay of Gonadotrophines," Acta Endocrinol., 63, Supplementum 142 (1969).

4. E. Diczfalusy, Ed., "Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, "Stockholm, (1969).

5. E. Diczfalusy, Ed., "Steroid Assay by Protein Binding," Acta Endocrinol., 64, Supplementum 147 (1970).

6. W.G. Duddleson, A.R. Midgley, Jr., and G.D. Niswender, "Computer Program Sequence for Analysis and Summary of Radioimmunoassay Data, Comput. Biomed. Res., 5, 205 (1972).

7. R. Ekins, and B. Newman, "Theoretical Aspects of Saturation Analysis," Acta Endocrinol., 64, Supplementum 147, 11 (1970).

8. C. Faiman, and R.J. Ryan, "Radioimmunoassay for Human FSH, J. Clin. Endocrinol., 27, 444, (1967).

9. F.C. Greenwood, W.M. Hunter, and J.S. Glvoer, "the Preparation of 1131-Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity, "Biochem J., 89, 114, (1963).

10. V. Herbert, K.S. Lau, C.W. Gottlieb, and S.J. Bleicher, "Coated Charcoal Immunoassay of Insulin J. Clin Endocrinol., 25, 1375 (1965).

11. K.E. Kirkham and W.M. Hunter, Eds., "Radioimmunoassay Methods," Churchill Livingstone, Edinburgh, Scotland, (1971).

12. M. Margoulies, Ed., "Protein and Polypeptide Hormones," Part 1, Excerpta Med. Int. Congr. Series No. 161, Amsterdam, the Netherlands, (1969).

13. A.R. Midgley, "Radioimmunoassay for Human Follicle Stimulating Hormone, J. Clin. Endocrinol. 27, 295, (1967).

14. G.D. Niswender and A.R. Midgley, Jr., Hapten Radioimmunoassay for Steroid Hormones in "Immunologic Methods in Steroid Determination, F.G. Peron and B.V. Caldwell, Eds., pp 149-73, Appleton-Century Crofts, New York, N.Y., (1970).

15. W.D. Odell and W.H. Daughaday, Eds., "Principles of Competitive Protein-Binding Assays," Lippincott. Philadelphia, Pa., (1971).

16. F.G. Peron and B.V. Caldwell, Eds., "Immunologic Methods in Steroid Determination," Appleton-Century-Crofts, New York, N.Y., (1970).

17. J.T. Potts, Jr., L.M. Sherwood, J.L.H. O'Riordan, and G.D. Aurbach, Radioimmunoassay of Polypeptide Hormones, Advan. Int. Med., 13, 183 (1967).

18. D. Rodbard, P.L. Rayford, J.A. Copper, and G.T. Ross, Statistical Quality Control of Radioimmunoassays, J. Clin. Endocrinol. Metab., 28, 1412 (1968).

19. D. Rodbard, H.J. Ruder, J. Vaitukaitis, and H.S. Jacobs, Mathematical Analysis of Kinetics of Radioligand Assays: Improved Sensitivity obtained by Delayed Addition of Labeled Ligand, J.Clin. Endocrinol. Metab., 33, 343 (1971).

20. D.S. Skelley, L.P. Brown, and P.K. Besch, Radioimmunoassay, Clin. Chem., 19, 146 (1973).

21. J. Vaitukaitis, J.B. Robbins, E. Nieschlag, and G.T. Ross, A Method for Producing Specific Antisera with small Doses of Immunogen, J. Clin. Endocrinol. Metab., 33, 988 (1971).