مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۴۷/هفته اول مهر ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۲/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۵/۱۵

تولید آنتی‌بادی پلی کلونال علیه مولکول هورمون رشد نوترکیب انسانی و تهیه‌ی کیت ELISA برای اندازه‌گیری آن و مقایسه‌ی برخی شاخص‌های ارزش تشخیصی کیت با نوع تجاری

مصطفی مانیان[۱]، دکتر سید حمید زرکش اصفهانی[۲]، مجتبی اکبری[۳]، دکتر حسین خان احمد[۴]، دکتر محسن مسجدی[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: یکی از روش‌های حساس و دقیق اندازه‌گیری هورمون رشد انسانی (Human growth hormone یا hGH) روش ELISA می‌باشد. برای انجام مطالعات مربوط به تولید این هورمون و اندازه‌گیری کلینیکی آن، نیاز به آنتی‌بادی بر علیه آن و کیت اندازه‌گیری می‌باشد. با توجه به این که کیت‌های ELISA مربوطه در ایران از کشورهای دیگر تهیه می‌شوند، این مطالعه برای تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال بر ضد هورمون رشد و یک کیت ELISA داخلی برای اندازه‌گیری هورمون رشد انجام شد.

روش‌ها: آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد hGH با ایمونیزاسیون خرگوش به مدت ۱۰ هفته تزریق، تولید شد. سپس ویژگی آن به وسیله‌ی ایموبلاتینگ بررسی گردید. آنتی‌بادی خالص‌شده برای طراحی کیت ELISA استفاده شد. روش ELISAی ساندویچی طراحی‌شده از لحاظ مقادیر آنتی‌بادی پوشاننده و آنتی‌بادی کونژوگه استاندارد گردید. در پایان میزان حساسیت و ویژگی کیت طراحی‌شده با نمونه‌ی خارجی مقایسه شد

یافته‌ها: آنتی‌بادی پلی‌کلونال با موفقیت بر علیه هورمون رشد در خرگوش تولید و خالص شد. این آنتی‌بادی قابلیت استفاده در تست‌های وسترن بلاتینگ و ELISA را داشت. سپس کیت طراحی‌شده با نوع خارجی از نظر ارزش‌های تشخیصی مقایسه شد و ارزش تشخیصی آن ۹۸ درصد به دست آمد.

نتیجه‌گیری: این کیت دارای ارزش تشخیصی در سنجش hGH است به صورتی که می‌تواند جایگزین مناسبی برای نمونه خارجی باشد. تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال و کیت اندازه‌گیری مربوطه با هزینه‌ی بسیار کمتر مقدور است و گامی در جهت خودکفایی کشور محسوب می‌شود.

واژگان کلیدی: هورمون رشد انسانی، آنتی‌بادی پلی‌کلونال، ELISA

ارجاع: مانیان مصطفی، زرکش اصفهانی سید حمید، اکبری مجتبی، خان احمد حسین، مسجدی محسن. **تولید آنتی‌بادی پلی کلونال علیه مولکول هورمون رشد نوترکیب انسانی و تهیه‌ی کیت ELISA برای اندازه‌گیری آن و مقایسه‌ی برخی شاخص‌های ارزش تشخیصی کیت با نوع تجاری.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۴۷): ۱۱۸۴-۱۱۷۳

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۳۹۱۳۰۸ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات ایمونولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشجوی دکتری، گروه اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۴- استادیار، گروه علوم تشریح و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۵- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر سید حمید زرکش اصفهانی
Email: s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk

مقدمه

هورمون رشد یک پپتد ترشحی از سلول‌های غده‌ی هیپوفیز همه‌ی مهره‌داران است و نقش مهمی در رشد ایفا می‌کند (۱). هورمون رشد انسانی (hGH یا Human growth hormone) یا سوماتوتروپین توسط سوماتوتروف‌های اسید دوست بخش جلویی غده‌ی هیپوفیز که حدود ۵۰ درصد از غده را تشکیل می‌دهند، ساخته می‌شود و به جریان خون آزاد می‌گردد (۲). چندین شکل از این هورمون در بدن وجود دارد اما نوع غالب آن با وزنی معادل ۲۲ کیلودالتون است. hGH موجود در گردش خون نیمه عمر کوتاهی (۳۰-۲۰ دقیقه) دارد و سطح سرمی آن تحت تأثیر برخی عوامل مانند کاهش قند خون، ورزش و برخی از اسیدهای آمینه قرار می‌گیرد. این عوامل باعث افزایش سطح hGH می‌شود، در صورتی که گلوکز و کورتیزول باعث مهار hGH می‌شوند. اندازه‌گیری کمی hGH وسیله‌ی مناسبی برای تشخیص موارد پاتولوژیکی مانند آکرومگالی، ژیگانتیسم، هیپوسوماتیزم و سندرم‌های کم کاری هیپوفیز، است (۴-۳).

تولید هورمون رشد نوترکیب انسانی ازاولویت‌های وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی می‌باشد. برای مطالعات مربوط به تولید این هورمون و اندازه‌گیری کلینیکی آن، نیاز به آنتی‌بادی بر علیه آن و کیت‌های اندازه‌گیری می‌باشد. تکنیک ایده‌آلی که برای اندازه‌گیری GH استفاده می‌شود، باید حساسیت کافی برای اندازه‌گیری مقادیر کم GH در خون و ادرار را دارا باشد (۵)، طراحی آزمایشگاهی ساده و قابل دسترسی برای بررسی نمونه‌های متعدد و میزان بالای دقت و تکرارپذیری را داشته باشد. امروزه تکنیک ELISA به جهت داشتن حساسیت، دقت و سرعت بالادر بیشتر مراکز تشخیصی کاربرد فراوانی دارد (۷-۶). هدف از این تحقیق طراحی یک کیت دقیق و حساس ELISA جهت اندازه‌گیری hGH می‌باشد که کمترین وابستگی را به خارج از کشور داشته باشد. اولین قدم برای این امر تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال می‌باشد.

آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال با ایمونیزه کردن یک حیوان مناسب که به طور معمول پستاندار می‌باشد، تولید می‌گردد (۸). آنتی‌ژن مورد نظر به همراه ادجوان مناسب به حیوان تزریق می‌شود. آنتی‌بادی‌هایی از کلاس IgG علیه آنتی‌ژن در بدن حیوان توسط لنفوسیت‌های B اختصاصی تولید می‌شوند. این آنتی‌بادی‌ها از سرم حیوان تخلیص می‌گردند (۹). بدین طریق، IgG اختصاصی با غلظت حدود ۱۰-۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر را می‌توان به دست آورد. آنتی‌بادی‌های تولیدشده با این روش، از لنفوسیت‌های B اختصاصی علیه اپی‌توپ‌های متفاوت مشتق می‌شوند و بنابراین پلی‌کلونال (Polyclonal) نامیده می‌شوند (۱۱-۱۰). آنتی‌سرم از کلون‌های سلول‌های مختلفی به وجود می‌آید و در نتیجه کلاس، زیر کلاس یا ایزوتایپ آنتی‌بادی‌های تولیدشده، ویژگی‌ها، تیتر و Affinity آن‌ها متفاوت می‌باشد. در یک آنتی‌سرم ممکن است آنتی‌بادی‌های مختلفی علیه آنتی‌ژن‌های متفاوت که دارای اختصاصیت گوناگون هستند وجود داشته باشد. همچنین ممکن است آنتی‌بادی‌های مختلفی علیه تعداد اندک آنتی‌ژن با اختصاصیت کم و یا علیه یک آنتی‌ژن با خصوصیات منفرد وجود داشته باشند، ولی حتی اگر آنتی‌بادی علیه یک آنتی‌ژن به وجود آمده باشند، ویژگی‌های

مختلفی دارد. این به این دلیل است که یک ایمونوژن ممکن است دارای چندین محل یا شاخص آنتی‌ژنیک باشد که قادر است واکنش تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال را تحریک کند و حتی چندین ایزوتایپ مختلف به وجود آورد. آنتی‌سرم پلی‌کلونال ترکیبی از آنتی‌بادی‌ها با ویژگی خاص هستند (۱۴-۱۲).

آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد هورمون رشد با ایمونیزاسیون خرگوش تولید شد. پس از انجام مراحل خالص‌سازی و تعیین غلظت و ویژگی، آنتی‌بادی تولیدشده در طراحی کیت ELISA مورد استفاده قرار گرفت. پس از آن کیت طراحی‌شده از نظر رقت آنتی‌بادی پوشاننده و آنتی‌بادی کونژوگه استاندارد گردید و سپس تست‌های تعیین حساسیت و ویژگی کیت و تعیین ارزش تشخیصی آن در مقایسه با نوع تجاری انجام پذیرفت.

روش‌ها

برای تهیه‌ی آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد hGH از خرگوش استفاده شد. خرگوش به مدت ۱۰ هفته‌ی متوالی با ۰/۵ سی‌سی آنتی‌ژن با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر hGH (ثام تروپین) که با ۰/۵ سی‌سی ادجوانت مخلوط شده بود، ایمیون شد (۱۵). تزریق اول با ادجوانت کامل فروند (Sigma) و تزریق‌های یادآور بعدی با استفاده از ادجوانت ناقص فروند (Sigma) صورت گرفت (۱۶). برای افزایش تیتر آنتی‌بادی پلی‌کلونال در هفته‌های نهم و دهم به صورت وریدی تزریق شد و به این ترتیب بعد از هفته‌ی دهم تیتر آنتی‌بادی دو تا سه برابر گردید. به منظور سنجش نسبی تولید آنتی‌بادی Dot blot انجام شد. مقدار جزیی از پروتئین GH بارقت‌های ۱۰ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۱ نانوگرم در میلی‌لیتر بر روی کاغذ نیتروسلولز ریخته شد. سپس این غشا توسط شیر خشک ۵ درصد بلوکه شد. پس از آن نوارهای نیتروسلولز بعد از شستشو در معرض سرم‌های رقیق‌شده قرار گرفت. بعد از شستشوی مجدد در محلول آنتی‌بادی Goat anti- rabbit HRP conjugate (شرکت سیتو متین ژن) با رقت ۱ به ۱۰۰۰۰ قرار گرفت و بعد از شستشو در نهایت توسط TMB (Tetramethylbenzidine) (شرکت سیتو متین ژن) تیمار گردید (۱۸-۱۷). برای شاهد منفی از TGFβ (Transforming growth factor beta) (Abcam) استفاده شد.

سرم خرگوش برای خالص‌سازی ایمونوگلوبولین‌ها و حذف ناخالصی‌ها با محلول پروتئینی با آمونیوم سولفات ۴۰ درصد رسوب داده شد. برای این منظور به بشر حاوی سرم در اتاق سرد و بر روی همزن سولفات آمونیوم اضافه کردید. سانتریفیوژ محلول حاصل در ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد صورت گرفت. رسوب غنی از ایمونوگلوبولین تشکیل‌شده در ته ظرف در بافر PBS 1 X حل شد و جهت خارج نمودن نمک آمونیوم سولفات، دیالیز گردید. محلول پروتئینی حل‌شده در کیسه‌ی دیالیز ۱۰ کیلودالتونی ریخته شد و آن را در حجم یک لیتری بافر تریس ۲۰ میلی‌مولار به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با سه بار تعویض بافر دیالیز گردید (۲۰-۱۹). برای مشخص کردن مقدار آنتی‌بادی از اسپکتروفتومتر با جذب نور در طول موج ۲۸۰ نانومتر استفاده گردید. OD (Optical density) به دست‌آمده بر عدد ثابت ۱/۴ تقسیم شد تا غلظت

تقریبی آنتی‌بادی بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آید (۲۱). جهت بررسی ویژگی آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولیدشده در تکنیک وسترن بلاتینگ ابتدا SDS-PAGE (کیت شرکت سیتو متین ژن) پروتئین GH در غلظت‌های ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۱، ۰/۱و ۰/۰۱ میکروگرم در میلی‌لیتر در دستگاه الکتروفورز Bio Rad روی ژل ۱۲/۵ درصد پلی‌اکریل‌آمید انجام شد. پروتئین‌ها از ژل به کاغذ نیتروسلولز منتقل شدند. عمل انتقال با استفاده از دستگاه الکتروبلاتینگ در مدت ۱/۵ ساعت با ولتاژ ۷۰ میلی‌آمپر انجام گرفت. کاغذ در محلول بلاگینگ (شیر خشک ۵ درصد) در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک شب قرارگرفت. بعد از شستشو با بافر TBST، در محلول آنتی‌بادی پلی‌کلونال با رقت ۱/۱۰۰۰۰۰ انکوبه شد (۲ ساعت). پس از شستشوی مجدد کاغذ در آنتی‌بادی Goat anti- rabbit HRP conjugate (شرکت سیتو متین ژن) با رقت ۱/۱۰۰۰۰ به مدت ۱/۵ ساعت کونژوگه شد. در پایان توسط محلول TMB باندهای GH آشکار گردید (۱۷). جهت کشاهد منفی از پروتئین هپسیدین (R & D) استفاده شد.

جهت اندازه گیری GH سرم از روش Sandwich ELISA استفاده گردید. غلظت مناسب برای کوتینگ آنتی‌بادی و حداقل غلظت آنتی‌ژن توسط روش تیتراسیون و با استفاده ازروش Checker board تعیین شد. در این روش محلول آنتی‌ژن به طور سریال در عرض پلیت رقیق می‌شود، در حالی که محلول آنتی‌بادی کوتینگ در طول پلیت رقیق می‌شود سپس یک آنتی‌بادی ثانویه‌ی نشان‌دارشده با آنزیم با یک غلظت ثابت به تمام چاهک‌ها افزوده می‌شود (۲۲). با کامل شدن مراحل سنجش و بر اساس جذب نوری مناسب، غلظت‌های مناسب آنتی‌ژن و آنتی‌بادی محاسبه می‌شود. برای به دست آوردن نتایج مطلوب لازم است مقادیر مناسب آنتی‌بادی پوشاننده؛ آنتی‌بادی کونژوگه و همچنین سرم استاندارد گردد. جهت تعیین رقت مناسب آنتی‌بادی کونژوگه از پلیت‌های پوشاننده با رقت مناسب آنتی‌بادی پوشاننده به دست‌آمده در مرحله‌ی قبل استفاده می‌گردد. تمام مراحل کار طبق دستور ذکرشده انجام شد، با این تفاوت که تمام پارامترها ثابت بودند و از رقت‌های مختلف آنتی‌بادی کونژوگه‌شده استفاده شد. در پایان بالاترین میزان جذب نوری و کمترین جذب نوری زمینه (Background) به عنوان رقت مناسب انتخاب شد و در آزمایش به کار گرفته شد (۲۳).

جهت استانداردسازی پس از انتخاب میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای Maxisorp (شرکت Nunc) به عنوان فاز جامد ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱/۱۰۰۰ به پایین از آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولیدشده در بافر بی کربنات- کربنات با pH = ۹/۶، در هر یک از حفره‌ها ریخته شد و پلیت به مدت ۱۸ ساعت در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از گذشت این زمان، پلیت ۳ مرتبه با Wash buffer (PBS حاوی ۰/۰۵ درصد Tween 20) شسته شد و سپس جهت بلوکه کردن، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر PBS حاوی ۵ درصد شیر خشک به حفره‌ها اضافه گردید و پلیت به مدت ۲ ساعت در۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس چاهک‌ها ۳ مرتبه با Wash buffer شسته شدند و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر GH ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از رقت ۱/۱۰ به پایین در حفره‌ها ریخته شد و پلیت به مدت ۲ ساعت در دمای

۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. چاهک‌ها ۳ مرتبه باWash buffer شسته شدند و ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی موشی ضد hGH کونژوگه با بیوتین (10A7 دانشگاه شفیلد) (۲۴) با رقت ۱/۱۰۰۰۰ به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید. پلیت به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد در اتاقک مرطوب قرار داده شد. پس از ۳ مرتبه شستن چاهک‌ها با Wash buffer، ۱۰۰ میکرولیتر ازStreptavidin – HRP (شرکت Sanquin هلند) با رقت ۱/۱۰۰۰۰ به چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس دوباره با Wash buffer سه مرتبه شستشو داده شد و پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر TMB (شرکت سیتو متین ژن) به عنوان سوبسترای آنزیم در حفره‌ها ریخته شد و پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از گذشت این مدت با ریختن ۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۱ مولار واکنش متوقف شد و سپس میزان جذب نوری با استفاده از ELISA Reader (Hyperion-USA) با طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد و در نهایت رقتی از آنتی‌بادی پوشاننده به عنوان رقت مناسب انتخاب گردید، که مناسب‌ترین میزان جذب نوری و کمترین میزان جذب نوری زمینه را ایجاد نماید (۲۵).

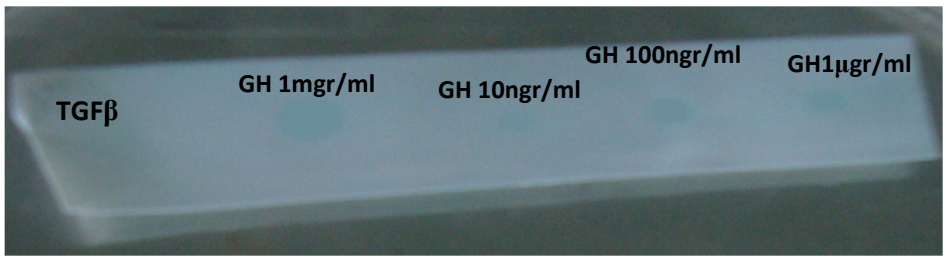
پس از استاندار کردن تست، میزان حساسیت و ویژگی کیت طراحی‌شده با نمونه‌ی خارجی (شرکت Monobind، آمریکا) مقایسه شد (۲۶).

یافته‌ها

آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد hGH، با ایمونیزاسیون خرگوش به مدت ۱۰ هفته تزریق متوالی تولید شد. تزریق‌های نهم و دهم به صورت وریدی انجام گرفت و آنتی‌بادی با تیتر و افینیتی بالا تولید شد. سپس آنتی‌بادی تولیدشده از لحاظ ویژگی بررسی شد.

برای مطالعه‌ی ویژگی و حساسیت آنتی‌بادی پلی‌کلونال تست Dot blotting انجام گرفت که در رقت‌های ۱/۱۰۰۰۰۰ آنتی‌بادی و غلظت ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر هورمون رشد، نتیجه‌ی Dot مثبت بود، برای شاهد منفی از TGFβ استفاده شد. یافته‌های به دست‌آمده در شکل ۱ نشان داده شده است.

غلظت آنتی‌بادی خالص‌شده ۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه شد که در رقت ۱/۱۰۰۰۰۰ آنتی‌بادی پلی‌کلونال Coat شده در روش ELISA غلظت ۱ نانوگرم در میلی‌لیتر هورمون رشد را با OD مناسب و اپتیموم (۱/۰۱) شناسایی کرد. آنتی‌بادی تولیدشده از لحاظ توانایی کاربردی در وسترن بلات مورد بررسی قرارگرفت که در این تست کمترین Background دیده شد.



شکل ۱. نتایج Dot blot آنتی‌بادی پلی‌کلونال بر ضد هورمون رشد که در آن TGFβ به عنوان کنترل منفی و هورمون رشد در رقت‌های مختلف استفاده شد.

شکل ۲. نتایج وسترن بلات آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوشی ضد هورمون رشد انسانی

جهت اطمینان از حضور آنتی‌بادی پلی‌کلونال در سرم خرگوش، الکتروفورز آنتی‌ژن GH در غلظت‌های بیان‌شده انجام شد. سپس در تست وسترن بلاتینگ آنتی‌بادی پلی‌کلونال در رقت ۱/۱۰۰۰۰ استفاده گردید و جهت کنترل منفی از پروتئین هپسیدین استفاده شد. با توجه به مشخص بودن وزن مولکولی پروتئین GH و مقایسه با پروتئین مارکر، باندهای آنتی‌ژنی در محدوده ۲۲ کیلودالتون مشاهده شدند. یافته‌های به دست‌آمده در شکل ۲ نشان داده شده است.

دراین مطالعه تکنیک Sandwich ELISA طراحی شد که در آن آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوشی تولیدشده به عنوان Capture آنتی‌بادی در کف پلیت ELISA، Coat شد. روش Sandwich ELISA طراحی‌شده از لحاظ مقادیر آنتی‌بادی پوشاننده و آنتی‌بادی کونژوگه استاندارد گردید و در رقت ۱/۱۰۰۰۰۰ آنتی‌بادی پلی‌کلونال Coat شده در روش ELISA غلظت ۱ نانوگرم در میلی‌لیتر هورمون رشد را با OD مناسب و اپتیموم (۱/۰۱) شناسایی کرد.

در این مطالعه میزان صحت (Accuracy)، حساسیت و ویژگی کیت طراحی‌شده با نمونه‌ی خارجی (شرکت Monobind، آمریکا) مقایسه شد.

هر دو کیت بر روی ۲۹نمونه‌ی سرم بیماران دارای نقص hGH تحت درمان بررسی شدند. در ۱۳ مورد داده‌ها مشابه هم بود و بر اساس Cut off point اعلام‌شده توسط کیت Monobind، هر دو کیت در دو نمونه نتیجه‌ی مثبت (بیمار) گزارش کرد. در دو نمونه کیت خارجی نتیجه را مثبت (بیمار) نشان داد، در حالی که کیت طراحی‌شده، منفی (سالم) بود. در یک نمونه نیز کیت طراحی‌شده نتیجه را مثبت (بیمار) و کیت خارجی منفی گزارش کرد. در بقیه‌ی نمونه‌ها هر دو کیت نتیجه را سالم گزارش کردند. میانگین نمره‌ی تست در جدول ۱ نشان داده شده است.

بر اساس آزمون همبستگی Spearman، بین این

دو تست ۹۲/۵ با فاصله اطمینان ۹۵ درصد ۰/۸۴-۰/۹۶ دیده شد (P < ۰/۰۰۱).

مقایسه‌ی میانگین نمره‌های دو کیت در جدول ۲ نشان داده شده است.

همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است تفاوت بین این دو تست معنی‌دار نبود (P = ۰/۷۸۴) و این نشان‌دهنده‌ی عملکرد یکسان دو کیت است.

نتایج انجام آزمایش بر روی ۲۹ نمونه توسط هر دوکیت در جدول ۳ نشان داده شده است. نتیجه‌ی منفی کیت مورد آزمایش به معنای غلظت کمتر از ۵۵ میکروواحد در میلی‌لیتر است.

در جدول ۴ بر اساس نتایج به دست‌آمده حساسیت، ویژگی و ارزش‌های اخباری مثبت و منفی نشان داده شده است.

جدول ۱. میانگین نمره Monobind در لایه‌های مختلف تست مذکور

GR Gs	تعداد	میانگین	انحراف معیار
تست مثبت	۴	۸۳/۰۰	۵۳/۷۱
تست منفی	۲۵	۱۳/۲۷	۱۷/۳۲

GS: Gold standard; Gr :Group test

جدول ۲. مقایسه‌ی میانگین نمره‌های دو کیت

	Test	Monobind
حجم نمونه	۲۹	۲۹
میانگین	۲۲/۸۸	۲۵/۷۸
حدود اطمینان ۹۵ درصد	۹/۹۱-۳۵/۸۷	۸/۶۰-۴۲/۹۷
انحراف معیار	۳۴/۱۳	۴۵/۱۷
سطح معنی داری	P = ۰/۷۸۴	

جدول ۳. فراوانی افراد مورد مطالعه از نظر بیمار بودن و سالم بودن در دو تست

(درصد) تعداد	کیت استاندارد		
	مثبت	منفی	کیت طراحی‌شده
۲۶ (۸۹/۷)	۲	۲۴	منفی
۳ (۱۰/۳)	۲	۱	مثبت
۲۹ (۱۰۰)	۴ (۱۳/۸)	۲۵ (۸۶/۲)	(درصد) تعداد

جدول ۴. شاخص‌های ارزش تشخیصی کیت طراحی‌شده

	میانگین	فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد
حساسیت	۵۰/۰۰	۸/۳۰-۹۱/۷۰
ویژگی	۹۶/۰۰	۷۹/۵۸-۹۹/۳۳
ارزش اخباری مثبت	۶۶/۶۷	۱۱/۵۵-۹۴/۵۳
ارزش اخباری منفی	۹۲/۳۱	۷۴/۸۳ -۹۸/۸۳

جدول ۵. سطح زیر منحنی و مقادیر ارزش تشخیصی تست طراحی‌شده با توجه به **Cut off point** پیشنهادی به دست‌آمده

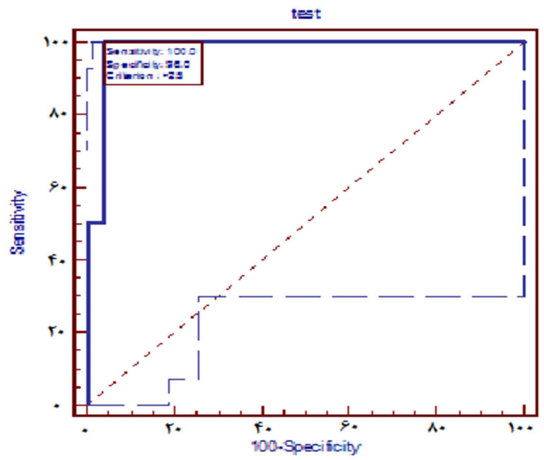
سطح زیر منحنی (AUC)	خطای استاندارد	فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد	آماره Z	مقدار P
۰/۹۸	۰/۰۵	۰/۸۴–۰/۹۹	۹/۵۳	< ۰/۰۰۱

معیار	حساسیت	فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد	ویژگی	فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد	ارزش اخباری مثبت	فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد	ارزش اخباری منفی	فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد
*>۲۵	۱۰۰	۴۰/۲–۱۰۰	۹۶	۷۹/۶–۹۹/۳	۸۰	۲۸/۸ – ۹۶/۷	۱۰۰	۸۵/۶–۱۰۰

AUC: Area under the curve

با توجه به داده‌های به دست‌آمده از نمونه‌های مورد مطالعه و بررسی اعداد توسط نرم‌افزار از لحاظ کمی نتایج سنجش کیفی– کمی کیت طراحی‌شده در جدول ۵ نشان داده شده است. این جدول سطح زیر منحنی و Standard error و حدود اطمینان را نشان می‌دهد.

بر اساس آنالیز کمی انجام شده، مقدار بالاتر از ۲۵ میکروواحد در میلی‌لیتر به عنوان Cut off مشخص گردید. (AUC = ۰/۹۸ ،P < ۰/۰۰۱). در این مطالعه حساسیت و ویژگی در این نقطه‌ی برش به ترتیب معادل ۱۰۰ و ۹۶ درصد می‌باشد (شکل ۳).



شکل ۳. منحنی **ROC** کیت طراحی‌شده و نمایش حساسیت و ویژگی تست

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که کیت طراحی‌شده از ارزش تشخیصی مناسبی در سنجش هورمون رشد انسانی برخوردار است، به صورتی که می‌تواند جایگزین مناسبی برای Monobind باشد.

hGH یا سوماتوتروپین یک پروتئین ترشحی در خون است. به علت فعالیت‌های بیولوژیکی مهم و متنوع هورمون رشد این هورمون دارای کاربردهای گسترده‌ای در پزشکی و بیوتکنولوژی می‌باشد و از این لحاظ اندازه‌گیری این هورمون حائز اهمیت است. برای مطالعات مربوط به تولید این هورمون و اندازه‌گیری کلینیکی نیاز به آنتی‌بادی بر علیه هورمون رشد و کیت‌های اندازه‌گیری می‌باشد. در بین تکنیک‌های قابل استفاده برای اندازه‌گیری کلینیکی هورمون رشد انسانی به کارگیری روش ELISA مناسب‌تر به نظر می‌رسد، زیرا روش‌هایی مثل ایمونوبلاتینگ و رادیوایمونواسی اگر چه از ارزش تشخیصی مناسبی برخوردار می‌باشند ولی استفاده از آن‌ها به دلیل پیچیدگی روش اجرا و خطراتی مانند تشعشع و تولید زباله‌های رادیواکتیو در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مقدور نمی‌باشد. در مقابل مزایای ELISA یا سنجش‌های نشان‌دار آنزیمی

عبارتند از: قیمت ارزان تر دستگاه‌ها، معرف‌های ارزان، سرعت خوانش بالا و امکان افزایش حساسیت روش که با تغییر شرایط فعالیت یک آنزیم یا استفاده از آنزیم‌هایی با فعالیت بالا می‌توان حساسیت روش را بسیار افزایش داد (۲۷). تاکنون کیت‌های ELISA مربوطه از کشورهای دیگر وارد می‌شدند و مورد استفاده قرار می‌گرفتند. تنها در یک مورد کیت ELISA در داخل کشور مونتاژ می‌گردد که آن هم به طور کامل از مواد وارداتی و به خصوص آنتی‌بادی وارداتی تهیه می‌شود. بنابراین ضرورت دیده شد که آنتی‌بادی پلی‌کلونال بر ضد هورمون رشد تولید شود و یک کیت ELISA داخلی برای اندازه‌گیری هورمون رشد طراحی شود.

استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کونال به عنوان Capture آنتی‌بادی به این دلیل است که آنتی‌سرم پلی‌کلونال (با خصوصیت ناهمگن بودن) دسته‌ای اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنیک را می‌شناسد. بنابر این اثر تغییر روی یک یا شمار کمی از اپی‌توپ‌ها قابل توجه نمی‌باشد. اکثریت آنتی‌سرم‌های پلی‌کلونال دارای آنتی‌بادی‌هایی هستند که از لحاظ میل پیوندی در طیف وسیعی قرار می گیرند و ثابت افینیتی آن‌ها از کمتر از 10^{6} M^{-1} تا بیش از 10^{9} M^{-1} می‌باشد. اتصال آنتی‌بادی پلی‌کلونال به آنتی‌ژن خود تحت طیف وسیعی از pH (pH = ۴-۹) و غلظت نمک ۱-۰ مولار پایدار است. در حالی که آنتی‌بادی مونوکلونال به هر دو تغییر بسیار حساس است. تحت تأثیر بسیاری از عوامل مثل اتصال با دیگر پروتئین‌ها، تغییرات بعد از ترجمه، دما، pH و غلظت نمک شکل فضایی ممکن است تغییر کند. زمانی که از آنتی‌بادی پلی کلونال استفاده شود اثر تغییرات شکل فضایی نگرانی کمتری به دنبال خواهد داشت، چون آنتی‌بادی پلی‌کلونال اپی‌توپ‌های مولتیپل را شناسایی می‌کند که برخی از آن‌ها خطی هستند و تغییرات کونفورماسیون روی همه‌ی این توپ‌ها با یک درجه اثر نمی‌کند (۲۹-۲۸).

در این مطالعه برای بررسی آنتی‌بادی پلی‌کلونال تست Dot blotting انجام گرفت که در رقت‌های ۱/۱۰۰۰۰۰ آنتی‌بادی و غلظت ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر هورمون رشد نتایج تست مثبت بود. نتایج حاصل از تست Dot blot که با هدف بررسی ویژگی و مقدار قابل سنجش آنتی‌بادی انجام شد، نشان داد که آنتی‌بادی پلی‌کلونال بر ضد هورمون رشد با تیتر بالا تولید می‌شود. علاوه بر این در مقایسه با شاهد منفی (TGFβ)، گروه شاهد مثبت نشان داد که آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوشی تولیدشده واکنش متقاطعی نداشت. باندهای دیده‌شده (۲۲ کیلودالتونی) در نتایج وسترن بلات نیز نشان داد که آنتی‌بادی پلی‌کلونال با باندهای آنتی‌ژن (هورمون رشد) اتصال خوبی برقرار کرد که تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال را تأیید می‌کند (۳۰).

پس از بررسی آنتی‌بادی پلی‌کلونال توسط تست‌های ایمونوبلاتینگ، کیت ELISA طراحی شد. برای افزایش حساسیت از روش Sandwich ELISA استفاده شد که در آن آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده به عنوان Capture آنتی‌بادی استفاده شد و آنتی‌بادی نشان‌دارشده با بیوتین به عنوان آنتی‌بادی Detection استفاده شد. سپس آنزیم HRP کونژوگه به استرپتاویدین اضافه شد. در این مطالعه مقادیر ۱/۱۰۰۰۰۰ آنتی‌بادی پلی کلونال تولیدشد و از رقت ۱/۱۰۰۰۰ آنتی‌بادی منوکلونال ضد GH نشان‌دار با بیوتین و مقادیر از Streptavidin –HRP Conjugated

با غلظت ۱/۱۰۰۰۰ استفاده شد. با توجه به نتایج، این پروتکل می‌تواند تا مقادیر ۱ نانوگرم در میلی‌لیتر هورمون رشد انسانی را به خوبی اندازه‌گیری نماید و قابل مقایسه با نمونه‌ی آمریکایی مشابه می‌باشد. علاوه بر این، مطالعه نشان داد که حیوان به خوبی ایمن شده است. به طور خلاصه می‌توان گفت که در این مطالعه آنتی‌بادی پلی‌کلونال با موفقیت بر علیه هورمون رشد انسانی در خرگوش تولید و خالص شد که قابلیت استفاده در تست‌های وسترن بلاتینگ و ELISA را دارد.

در این مطالعه در مقایسه با مطالعات قبلی راهکارهای مناسبی به منظور کاهش رنگ زمینه‌ای به کار برده شد (۳۱). اولین راهکار، افزایش تعداد دفعات و مدت زمان شستشو تا ۴ مرتبه بود و همچنین در آخرین مرحله‌ی شستشو، بعد از ریختن بافر شستشو اجازه دادیم این بافر به مدت ۵ دقیقه در پلیت باقی بماند، سپس آن را خالی کردیم. راهکار دیگر استفاده از شیر خشک ۵ درصد به عنوان بلاکر به مدت یک شبانه روز و یا ۹۰ دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بود که کاهش رنگ زمینه‌ای بهتری را به دنبال داشت (به میزان ۰/۰۸).

کیت طراحی‌شده با نوع تجاری آمریکایی (Monobind) از نظر ارزش‌های تشخیصی مقایسه شد که بر اساس نتایج آزمون‌ها و نمودارها ارزش تشخیصی ۹۸ درصدی را نشان داد. بر اساس سطح زیر منحنی حساسیت ۱۰۰ درصد و ویژگی ۹۶ درصد بود. نتیجه‌ی نهایی تمام تست‌ها نشان داد که این کیت دارای ارزش تشخیصی در سنجش هورمون رشد انسانی است به صورتی که می‌تواند جایگزین مناسبی برای Monobind باشد.

در کل می‌توان گفت که تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال و کیت اندازه‌گیری مربوطه با هزینه‌ی بسیار کمتر مقدور است و گامی در جهت خودکفایی کشور محسوب می‌شود. به علاوه محصول به دست‌آمده قابل توزیع به صورت محصول پایدار می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان برای تأمین هزینه‌های این پایان‌نامه تشکر می‌شود.

References

1. Shalet SM, Rahim A, Toogood AA. Growth hormone therapy for adult growth hormone deficiency. Trends Endocrinol Metab 1996; 7(8): 287-90.
2. Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang BH, Kitagawa K, Inagaki C. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86(9): 4284-91.
3. Corpas E, Harman SM, Blackman MR. Human growth hormone and human aging. Endocr Rev 1993; 14(1): 20-39.
4. Cassorla F, Cianfarani S, Haverkamp F, Labarta JI, Loche S, Luo X, et al. Growth hormone and treatment outcomes: expert review of current clinical practice. Pediatr Endocrinol Rev 2011; 9(2): 554-65.
5. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. Bull World Health Organ 1976; 53(1): 55-65.
6. Popii V, Baumann G. Laboratory measurement of growth hormone. Clin Chim Acta 2004; 350(1-2): 1-16.
7. Andersen M, Petersen PH, Blaabjerg O, Hangaard J, Hagen C. Evaluation of growth hormone assays using ratio plots. Clin Chem 1998; 44(5): 1032-8.
8. Kitano K, Fukuda Y, Nagahira K, Nasu T, Noguchi C, Izumi R, et al. Production of

polyclonal antibody specific for human natriuretic peptide receptor B. J Immunol Methods 1996; 194(2): 147-53.
9. Melchior F. Generation and purification of rabbit or goat polyclonal antibodies. Melchior's lab protocols 2002 [Online]. [cited 2013]; Available from: http://www.rubicon-net.org/data/file/716_EN_generationandpurificationofrabbitorgoatpolyclonalantibodies.pdf.
10. Diestre C, Martinez-Lorenzo MJ, Bosque A, Naval J, Larrad L, Anel A. Generation of rabbit antibodies against death ligands by cDNA immunization. J Immunol Methods 2006; 317(1-2): 12-20.
11. Cooper HM, Paterson Y. Production of polyclonal antisera. Curr Protoc Immunol 2001; Chapter 2: Unit.
12. Zhang S, Xiang J, Cheng A, Wang M, Li X, Li L, et al. Production, purification and characterization of polyclonal antibody against the truncated gK of the duck enteritis virus. Virol J 2010; 7: 241.
13. Wadhwa M, Thorpe R, Bird CR, Gearing AJ. Production of polyclonal and monoclonal antibodies to human granulocyte colony-stimulating factor (GCSF) and development of immunoassays. J Immunol Methods 1990; 128(2): 211-7.
14. Ostler EL, Resmini M, Brocklehurst K, Gallacher G. Polyclonal catalytic antibodies. J Immunol Methods 2002; 269(1-2): 111-24.
15. Kurpisz M, Gupta SK, Fulgham DL, Alexander NJ. Production of large amounts of mouse polyclonal antisera. J Immunol Methods 1988; 115(2): 195-8.
16. Jean J, Turcotte C, Simard RE, Fliss I. Production and characterization of polyclonal antibodies against cholecalciferol (vitamin D3). J Immunol Methods 1999; 223(2): 155-63.
17. Stott DI. Immunoblotting and dot blotting. J Immunol Methods 1989; 119(2): 153-87.
18. Prasad S, Thraves P, Kanai Y, Smulson M, Dritschilo A. A dot-blot method for screening polyclonal and monoclonal antisera to poly(ADP-ribose). J Immunol Methods 1989; 116(1): 79-85.
19. Nakazawa M, Mukumoto M, Miyatake K. Production and purification of polyclonal antibodies. Methods Mol Biol 2010; 657: 63-74.
20. Andrew SM, Titus JA. Purification of immunoglobulin G.In: Current protocols in cell biology. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc.; 2001.
21. Hong TH, Chen ST, Tang TK, Wang SC, Chang TH. The production of polyclonal and monoclonal antibodies in mice using novel immunization methods. J Immunol Methods 1989; 120(2): 151-7.
22. Samavati N, Mirjalili A, Boutorabi M. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against brucellosis in cattle or humans. J Isfahan Med Sch 2012; 30(205): 1403-14. [In Persian].
23. Paulie S, Perlmann H, Perlmann P. Enzyme-linked Immunosorbent Assay. eLS. New York, NY: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
24. Rezaei M, Zarkesh-Esfahani SM. Production of recombinant human growth hormone by eukaryotic CHO cell and measurement of its biological activity by gene reporter assay. Razi J Med Sci 2013; 19(104): 1-9. [In Persian].
25. Crowther J. ELISA Theory and practice: Humanupress Totowa New Jersey; 1995.
26. Yaseri MM, Pakpour Haji A, Rahmani S, Rangin H, Akaberi A, Yekani Nejad MS. Self-Learning concepts of diagnostic tests by graphical approach: sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value. J North Khorasan Univ Med Sci 2012; 4(2): 275-82. [In Persian].
27. Hashimoto Y, Ikeda I, Ikeda M, Takahashi Y, Hosaka M, Uchida H, et al. Construction of a specific and sensitive sandwich enzyme immunoassay for 20 kDa human growth hormone. J Immunol Methods 1998; 221(1-2): 77-85.
28. Barazesh A, Madjidi J, Fallah E, Jamali R, Ghazanchaei A, Abdolalizadeh J. Prodution of polyclonal antibody against giardia Lamblia in rabbit. J Ilam Univ Med Sci 2006; 14(4): 26-31. [In Persian].
29. Alizadeh H, Alizadeh H, Alizadeh H, Alizadeh H, Golchinfar F, Emami T. Preparation and purification of polyclonal antibodies against mycobacterium avium paratuberculosis antigens in rabbit. J Fasa Univ Med Sci 2012; 2(3): 168-73. [In Persian].
30. Kaboutari J, Arab HA, Foroumadi A, Nikbakht GR, Taheri M. Polyclonal antibody production against bovine serum albuminconjugated artemisinin in rabbit. Iranian Journal of Veterinary Medicine 2008; 2(1): 87-94. [In Persian].
31. Zare N, Zarkesh Esfahani SH, Shaygannejad V, Gharagozloo M. Designing of an ELISA method for the measurement of serum antibodies against interferon-beta and the study of the frequency of these antibodies in patients with multiple sclerosis treated with CinnoVex. J Isfahan Med Sch 2012; 30(207): 1481-91. [In Persian].

Journal of Isfahan Medical School
Received: 10.05.2013
Vol. 31, No. 247, 1st Week, October 2013
Accepted: 06.08.2013

Production of Polyclonal Antibody against Recombinant Growth Hormone and Designing an ELISA Kit and Comparing Some of its Diagnostics Indices with a Commercial Kit

Mostafa Maneian[1], Sayyed Hamid Zarkesh Esfahani PhD[2], Mojtaba Akbari MSc[3], Hossein Khanahmad PhD[4], Mohsen Masjedi PhD[5]

Original Article

Abstract

Background: Human growth hormone (hGH) is a secretory protein of the blood which is used extensively in biotechnology and medical sciences. Recombinant human growth hormone production is still one of the priorities of the Iranian Ministry of Health. One of the most sensitive and accurate techniques for the measurement of this hormone is the ELISA method. Scientists need to produce antibody against hGH to measure the serum level of hGH in patients. Commercial ELISA kits are commonly imported from other countries to Iran. Therefore, the current study aimed to produce a polyclonal antibody against hGH in order to make a domestic ELISA kit to measure this hormone.

Methods: Rabbit polyclonal antibody against hGH was produced following 10 weeks of immunization by the antigen injection. The antibody characteristics were evaluated by immunoblotting. The purified antibody was used to design the ELISA kit. The designed sandwich ELISA method was standardized concerning the amount of antibody coating and antibody conjugate. Ultimately, the sensitivity and specificity of the designed kit was compared with the foreign kits.

Findings: The polyclonal antibody against hGH was produced in rabbits and purified successfully. This antibody can be used in the western blot and ELISA methods. The diagnostic value of the designed kit was 98%, compared with the foreign kits.

Conclusion: This kit has a diagnostic value in the assessment of hGH; therefore, it can be a good alternative to the commercial kits. Therefore, this antibody and ELISA kit can be produced more cost-effectively and can be a step towards self-sufficiency.

Keywords: Growth hormone, Polyclonal antibody, ELISA

Citation: Maneian M, Zarkesh Esfahani SH, Akbari M, Khanahmad H, Masjedi M. **Production of Polyclonal Antibody against Recombinant Growth Hormone and Designing an ELISA Kit and Comparing Some of its Diagnostics Indices with a Commercial Kit.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(247): 1173-84

* This paper is derived from a MSc thesis No. 391308 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- MSc Student, Department of Immunology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine AND Cellular and Molecular Immunology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan AND Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
3- PhD Student, Department of Epidemiology, School of Health and Nutrition, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
4- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine AND Pediatrics Inherited Diseases Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5- Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Sayyed Hamid Zarkesh Esfahani PhD, Email: s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk