

**Radiochemical Studies on the Development of
Radioimmunoassay (RIA) System for the
Assessment of the Progesterone as
a Diagnostic Tool for Clinical
Applications**

**Thesis Submitted
By**

Khaled Mohamed Sallam Salem

**Ass. Lecturer in Labelled Compounds Department, Hot
Labs Centre, Atomic Energy Authority**

**To
Chemistry Department, Faculty of Science,
Ain Shams University**

**For
The Award of Ph.D. of Science in Chemistry**

2007

**Radiochemical Studies on the Development of
Radioimmunoassay (RIA) System for the
Assessment of the Progesterone as
a Diagnostic Tool for Clinical
Applications**

**Thesis Submitted
By**

Khaled Mohamed Sallam Salem

For the Degree of Ph. D. of Science in Chemistry

Under Supervision of

**Prof. Dr. Maher Abdel Aziz El-Hashash
Professor of Organic Chemistry,
Faculty of Science, Ain Shams University**

**Prof. Dr. Mohamed Taha Hussein El-Kolaly
Professor of Radiopharmaceuticals and
Vice Chairman of Atomic Energy Authority
for Search projects**

**Dr. Nagy Lahzy Mehany
Assist. Prof. of Biochemistry and Head of Labelled Compounds
Department, Hot Labs Centre, Atomic Energy Authority**

**Faculty of Science,
Ain Shams University**

2007

دراسات كيميائية إشعاعية لتطوير منظومة التقدير المناعي
الإشعاعي لتقدير هرمون البروجسترون كوسيلة تشخيصية
للتطبيقات العملية

رسالة مقدمة من
خالد محمد سلام سالم

للحصول على درجة الدكتوراه في العلوم
(الكيمياء)

تحت إشراف

أ.د./ محمد طه حسين القللى
أستاذ الصيدلة الإشعاعية
ونائب رئيس هيئة الطاقة الذرية
للمشروعات البحثية

أ.د./ ماهر عبدالعزيز الحشاش
أستاذ الكيمياء العضوية
كلية العلوم
جامعة عين شمس

د. ناجى لحظى مهنى
أستاذ مساعد الكيمياء الحيوية
ورئيس قسم المركبات المرقمة
مركز المعامل الحارة
هيئة الطاقة الذرية

كلية العلوم
جامعة عين شمس

2007

***Dedicated to My Parents,
My Brothers and My Sisters
Dedicated to My Family***

ACKNOWLEDGEMENT

First of all, thanks to **ALLAH**, the lord of the world for this favor and persistent supply with patience.

I would like to express my deep gratitude and appreciation to **Prof. Dr. Maher Abdel Aziz El-Hashash**, Prof. of Organic Chemistry, Faculty of Science, Ain Shams University for his sponsorship of the thesis, helpful guidance.

I would like to express my deep thanks to **Prof. Dr. Mohamed Taha El-Kolaly**, Prof. of Radiopharmaceuticals and Vice Chairman of Atomic Energy Authority (AEA) for Search Projects, for his interest and valuable sharing, sponsoring this work, sincere help and encouragement during the work.

I would like to express my sincere appreciation to **Dr. Nagy Lahzy Mehany**, Assist. Prof. of Biochemistry and Head of Labelled Compounds Department, Hot Labs Centre, Atomic Energy Authority, for his patience and time spent in supervising, valuable comments, continuous effort, fruitful suggestions and guidance for performing this work.

I wish to express my thanks to **Dr. Ahmed Abdel-Mouty**, Assist. Prof. of Radiochemistry and Head of Radioisotope Production Department, Hot Labs Centre, AEA, for his great help in practical part of this work and encouragement throughout this work.

I wish to express my thanks to **Dr. Ahmed Sami Abuo Bakr**, Lecturer of Biochemistry, Hot Labs Centre, Atomic Energy Authority, for his cooperation. I am also deeply thankful to all colleagues in the Labelled Compounds Department, for their help and cooperation.

Kh. M. Sallam

دراسات كيميائية إشعاعية لتطوير منظومة التقدير المناعي
الإشعاعي لتقدير هرمون البروجسترون كوسيلة تشخيصية
للتطبيقات العملية

المشرفون

التوقيع

أ.د./ ماهر عبدالعزيز الحشاش
أستاذ الكيمياء العضوية - كلية العلوم - جامعة عين شمس

أ.د./ محمد طه حسين القللى
أستاذ الصيدلة الإشعاعية - نائب رئيس الهيئة للمشروعات
البحثية- هيئة الطاقة الذرية

د. ناجى لحظى مهنى
أستاذ مساعد الكيمياء الحيوية - ورئيس قسم المركبات
المركبة - مركز المعامل الحارة - هيئة الطاقة الذرية

جامعة عين شمس
كلية العلوم
قسم الكيمياء

اسم الطالب : خالد محمد سلام سالم
الدرجة العلمية: دكتوراه الفلسفة فى العلوم – كيمياء عضوية.
القسم التابع له: الكيمياء
الكلية : العلوم
الجامعة : عين شمس
سنة التخرج : 1993
سنة المنح : 2007

شكر

أشكر السادة الأساتذة الذين قاموا بالإشراف على الرسالة وهم:

1- أ.د./ ماهر عبدالعزيز الحشاش

2- أ.د./ محمد طه حسين القللى

3- د. ناجى لحظى مهنى

والذين تعاونوا معى وهم:

1- د. أحمد عبد المعطى

2- د. أحمد سامى أبو بكر

وكذلك الهيئات الآتية:

1- هيئة الطاقة الذرية

2- جامعة عين شمس

**Radiochemical Studies on the Development of
Radioimmunoassay (RIA) System for the
Assessment of the Progesterone as
a Diagnostic Tool for Clinical
Applications**

Thesis Advisors

Approval

- 1- Prof. Dr. Maher Abdel Aziz El-Hashash.....**
Professor of Organic Chemistry,
Faculty of Science, Ain Shams University
- 2- Prof. Dr. Mohamed Taha Hussein El-Kolaly.....**
Professor of Radiopharmaceuticals and Vice Chairman of
Atomic Energy Authority for Search Projects
- 3- Dr. Nagy Lahzy Mehany**
Assist. Prof. of Biochemistry and Head of Labelled
Compounds Department, Hot Labs Centre,
Atomic Energy Authority

Prof. Dr. El-Sayed A. Soliman

**Head of Chemistry Dept.
Faculty of Science,
Ain Shams University.**

دراسات كيميائية إشعاعية لتطوير منظومة التقدير
المناعي الاشعاعي لتقدير هرمون البروجسترون
كوسيلة تشخيصية للتطبيقات المعملية

رسالة مقدمة من الباحث

خالد محمد سلام سالم
المدرس المساعد بقسم المركبات المرقمة
هيئة الطاقة الذرية

للحصول على

درجة دكتوراه الفلسفة في العلوم
(الكيمياء)

الى

كلية العلوم
جامعة عين شمس

2007

جامعة عين شمس
كلية العلوم
قسم الكيمياء

رسالة دكتوراه

اسم الباحث / خالد محمد سلام سالم

عنوان الرسالة / دراسات كيميائية إشعاعية لتطوير منظومة التقدير المناعي
الإشعاعي لتقدير هرمون البروجسترون كوسيلة تشخيصية
للتطبيقات المعملية

اسم الدرجة / دكتوراه الفلسفة في العلوم (كيمياء)

لجنة الإشراف

أ.د. / ماهر عبدالعزيز الحشاش
أستاذ الكيمياء العضوية
كلية العلوم - جامعة عين شمس

أ.د. / محمد طه حسين القللى
أستاذ الصيدلة الإشعاعية ونائب رئيس
هيئة الطاقة الذرية للمشروعات البحثية

د. ناجى لحظى مهنى
أستاذ مساعد الكيمياء الحيوية
ورئيس قسم المركبات المرقمة
هيئة الطاقة الذرية

لجنة الحكم

- 1
- 2
- 3
- 4

تاريخ البحث / /
ختم الاجازة
الدراسات العليا
أجيزت بتاريخ / / 2007م

موافقة مجلس الكلية
موافقة مجلس الجامعة

بتاريخ / / 2007م
بتاريخ / / 2007م

CONTENTS

Page

LIST OF FIGURES.....	i
LIST OF TABLES	iii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	vii
ABSTRACT.....	ix
 CHAPTER 1	
INTRODUCTION.....	1
I. Determination of Hormones.....	1
A- Isotopic Techniques	1
1. Radioimmunoassay (RIA)	3
2. Immunoradiometric Assay (IRMA)	6
B- Non-isotopic Techniques	8
1. Enzyme Immunoassay (EIA)	9
2. Fluorescence Immunoassay	10
3. Chemiluminescence Immunoassay	10
II. Reagents of Radioimmunoassay	12
A- Preparation of Tracer for Radioimmunoassay	13
1. Direct Iodination Methods	14
a. Chloranime-T method	15
b. Iodogen method	16
c. Enzymatic iodination using lactoperoxidase	16
d. N-bromosuccinimide method	17
2. Indirect Radioiodination Techniques	17
a. Peptides and polypeptides	18
b. Steroids	19
c. Conjugation labeling of progesterone	20
3. Purification of Radioiodinated Tracers	22
4. Specific Activity	23
5. Iodination Damage	24
B- Antibodies	26
1. Production of Polyclonal Antibodies	28
a. Preparation of immunogen	28
b. Choice of animal	30
c. Route of injection	31
d. Blood collection and separation of serum	31
e. Characterization of polyclonal antibody	32
2. Production of Monoclonal Antibodies (MoAbs)	34
C- Standards and Quality Controls for Immunoassays	35

1. Standards for chemically defined molecules	36
2. Standards for “biological” materials	36
3. Diluent for reference standards	36
III. Separation Techniques	38
A- Homogenous Assay	38
B- Heterogenous Assay	38
1. Liquid phase techniques	39
2. Solid phase techniques	40
a. Solid phase cellulose particles	41
b. Solid phase magnetic particles	42
c. Immobilization methods for solid phase antibodies	43
d. Advantages of solid phase	45
IV- Validation Tests in Radioimmunoassay	46
A- Sensitivity	46
B- Specificity	47
C- Precision	48
D- Accuracy	48
E- Comparison with Reference Method	49
V- Steroid Hormones	50
A- Progesterone	52
1. Biosynthesis, Metabolism and Physiology	53
2. Methods for Determination of Progesterone in Blood	55
B- Normal Menstrual Cycle	58
1. Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH)	59
2. Follicle-Stimulating Hormone (FSH)	61
3. Luteinizing Hormone (LH)	62
4. Estradiol (E ₂)	62
5. Progesterone (P ₄)	63
CHAPTER 2	
MATERIALS AND METHODS.....	64
I- Materials	64
A. Equipment	64
B. Tools	65
C. Chemicals	65
D. Preparation of Reagents	69
II- Methods	71
A. Radioiodination Methods	71
1. Activation and conjugation of progesterone 11 α -hemisuccinate (P ₄ -HS)	72
a. Tyramine hydrochloride	72

b. Tyrosine methyl ester (TME)	72
c. Histamine	73
d. Serotonin hydrochloride	73
2. Iodination of progesterone derivatives	73
a. Chloramine-T method	73
b. Iodogen method	74
c. Lactoperoxidase method	75
3. Characterization of ¹²⁵ I-progesterone tracer	75
a. Purification and radiochemical yield of ¹²⁵ I-progesterone tracer	75
b. Radiochemical purity of ¹²⁵ I-progesterone tracer	76
c. Immunoreactivity	76
4. Effect of different factors on the iodination technique	77
a. Effect of reaction time	77
b. Effect of pH	77
c. The molar ratio between P ₄ -HS and oxidizing agent	77
d. The molar ratio between P ₄ -HS and ligand	77
e. Specific activity	78
f. Stability of the tracer prepared	78
B. Polyclonal Antibody Production	79
1. Choice of the host animals	79
2. Preparation of progesterone 11 α -hemisuccinate (P ₄ -HS: BSA immunogens	79
3. Preparation of immunogen-adjuvant mixture	80
4. Route of injection	80
5. Immunization schedule	80
6. Blood sampling	80
7. Serum collection and storage	81
8. Characterization of antibody obtained for RIA system	81
C. Preparation of Progesterone Standards in Different Matrixes.....	83
1. Preparation of hormone free serum (HFS)	83
2. Preparation of progesterone standards	84
3. Comparison between DPC-RIA standards and local standards.	84
III. Formulation of RIA Systems for Estimation of Progesterone Human Serum	85
A. Liquid Phase RIA System	85
1. The requirements of this system	85
2. Optimization of liquid phase RIA system	86
a. Incubation time	86
b. Sample volume	87
c. Incubation temperature	87

d. Radioactivity	87
e. Precipitating solutions	87
3. The validity of the proposed liquid phase RIA system	87
a. Sensitivity (Minimal detectable dose)	88
b. Specificity (cross reactivity)	88
c. Precision	88
d. Accuracy	88
e. Method comparison	89
B. Solid Phase Coated Tube RIA System	90
1. Coating process	90
a. Purification of the produced antiserum for coating process ...	90
b. Coating buffers	91
c. Factors affecting the coating process	92
d. Assay design	93
2. Optimization of solid phase coated tube RIA system	93
a. Incubation time	93
b. Sample volume	93
c. Incubation temperature	93
d. Radioactivity of the tracer.....	94
e. Washing procedure	94
f. Stability of the coated tubes	94
3. Validation tests for progesterone coated tube RIA method	94
a. Sensitivity (Minimal detectable dose)	94
b. Specificity (cross reactivity)	95
c. Precision	95
d. Accuracy	95
e. Method comparison	96
VII- Statistical Analysis	97
CHAPTER 3	
RESULTS AND DISCUSSION.....	99
I- Radioiodination of Progesterone	102
A. Characterization of ¹²⁵ I-Progesterone Tracer	106
1- Radiochemical yield	106
2- Radiochemical purity	111
3- Immunoreactivity	113
B. Factors Affecting the Iodination of Progesterone	113
1- Effect of reaction time	114
2- Effect of pH	114
3- Effect of molar ratio between P ₄ -HS and different oxidizing agents on the radiochemical yield percent of ¹²⁵ I-	