دانشور
پزشکی

تولید آنتی‌بادی مونوکلونال علیه پراکسیداز

نویسندگان: علی اسدی[1]، دکتر علی‌اکبر پورفتح‌الله[2]، مهدی مهدوی[1] و دکتر سیدمحمد مؤذنی[*3]

۱. کارشناس ارشد گروه ایمونولوژی دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۲. استاد گروه ایمونولوژی دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۳. دانشیار گروه ایمونولوژی دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
* نویسنده مسئول: E-mail: Moazzeni@dr.com

چکیده

مقدمه و هدف: آنتی‌بادی مونوکلونال علیه آنزیم پراکسیداز دارای کاربردهای وسیعی است که از مهم‌ترین آن‌ها، تشکیل کمپلکس ایمنی پراکسیداز - آنتی‌پراکسیداز (PAP) است. این کمپلکس در بسیاری از روش‌های رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی و ایمونوسیتوشیمی کاربرد دارد. هدف از این مطالعه، تولید دودمان هیبریدومایی ترشح‌کننده آنتی‌بادی ضد پراکسیداز برای استفاده در کمپلکس ایمنی PAP است.

روش کار: به این منظور ابتدا موش‌های Balb/c ماده تحت تزریقات منظم پراکسیداز تربکوهی (HPR) قرار گرفتند. پس از اطمینان از ایمن شدن آن‌ها توسط آزمایش‌های الیزا، بین لنفوسیت‌های طحالی آن‌ها و سلول‌های میلومائی SP2/0 امتزاج سلولی برقرار شد و کلون‌های هیبریدومایی به‌دست آمده به‌وسیله محیط انتخابی HAT انتخاب شدند.

یافته‌ها: از هفت بار امتزاجی که صورت گرفت ۲۲۴ کلون هیبریدومایی به‌دست آمد که از بین آن‌ها ۶ کلون، تولیدکننده آنتی‌بادی ضد پراکسیداز بودند. از میان این ۶ کلون ۲ کلون انتخاب و توسعه یافتند. پس از انجام مرحله رقیق‌سازی متوالی (Limiting dilution) (دو مرتبه)، تک کلون‌های اختصاصی موردنظر توسعه یافتند. با استفاده از کیت Iso Strip مشخص گردید که هر دو آنتی‌بادی مونوکلونال ضد پراکسیداز) ۳ F ۶ F ۲ P۲ D ۱۱ F ۱ (P، از کلاس ۱ IgG هستند. ضمناً با استفاده از آزمون الایزا مشخص گردید که هر دو آنتی‌بادی مونوکلونال فوق روی فعالیت آنزیم پراکسیداز تأثیری ندارند.

بحث: بنابراین به نظر می‌رسد برای تشکیل کمپلکس ایمنی PAP مناسب باشند. سایر مراحل این پژوهش تا تشکیل کمپلکس ایمنی PAP و استفاده عملی آن‌ها در روش‌های ایمونوهیستوشیمی و ایمونوسیتوشیمی در حال انجام است.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌بادی مونوکلونال، پراکسیداز، کمپلکس PAP

دوماهنامه علمی - پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال سیزدهم - شماره ۶۲
اردیبهشت ۱۳۸۵

تاریخ وصول: ۸۲/۱۲/۴
تاریخ پذیرش: ۸۴/۴/۱۱

مقدمه

آنزیم‌هورسرادیش‌پراکسیداز(horseradish peroxidase: HRP) یک گلیکوپروتئین حاوی هسته هم است که آن را از ریشه ترب کوهی تهیه می‌کنند. این آنزیم دارای ۳۰۸ اسید آمینه و ۸ گروه کربوهیدرات و دارای وزن مولکولی حدود ۴۰/۰۰۰ دالتون است. حداقل ۷ ایزوآنزیم مشخص از این آنزیم جدا و خالص‌سازی شده است [۱]. از این آنزیم در روش‌های ایمونوهیستوشیمی و ایمونوسیتوشیمی بسیار استفاده می‌گردد [۲]. تکنیک‌های ایمونوهیستوشیمی و

Archive of SID
www.SID.ir

ایمونوسیتوشیمی امروزه در تحقیقات پایه و تشخیص‌های بالینی، نقش مهمی ایفا می‌کنند [۳،۴،۵،۶و۷]. برای مثال در تشخیص انواع سرطان‌ها، نظیر لنفوم‌ها و لوسمی‌ها قابل استفاده‌اند. همچنین در سیتولوژی تشخیصی، ایمونوپاتولوژی پوست، تشخیص بیماری‌های کلیوی و سایر بیماری‌ها کاربرد دارند [۶،۸،۹،۱۰،۱۱و۱۲]. در واقع، هدف از این تکنیک‌ها، عموماً این است که آنتی‌ژن خاصی را در بافت، شناسایی و ردیابی کنند و حتی موقعیت (localization) آن را مشخص کنند.

روش پراکسیداز-آنتی‌پراکسیداز (PAP) از مهم‌ترین روش‌های‌ایمونوهیستوشیمی‌و ایمونوسیتوشیمی است که اولین بار توسط استرنبرگر (Sternberger) در سال ۱۹۷۰ ابداع شد. در این روش از کمپلکس ایمنی پراکسیداز آنتی‌پراکسیداز استفاده می‌گردد که این کمپلکس‌ها با یک نسبت مولکولی از ۲ مولکول IgG و ۳ مولکول HRP تشکیل می‌گردند. اصول روش PAP همانند سایر روش‌های Immunolocalization است، بدین‌صورت که یک آنتی‌بادی اولیه به آنتی‌ژن‌های بافتی متصل می‌گردد و یک آنتی‌بادی ثانویه، کمپلکس PAP و آنتی‌بادی اولیه را به یکدیگر متصل می‌کند. روش PAP دارای مزایای زیاد است، از جمله این‌که کونژوگاسیون آنزیم به آنتی‌بادی صورت نمی‌گیرد، ضمن این‌که آزمایش از حساسیت بیش‌تری نیز برخوردار است [۲].

آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، آنتی‌بادی‌هایی هستند که به‌طور طبیعی و یا تجربی توسط یک کلون خاص لنفوسیتی ساخته می‌شوند. این آنتی‌بادی‌ها تفاوت‌های زیاد با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال دارند. از جمله این‌که تمام ملکول‌های آن‌ها از نظر قدرت اتصال و ویژگی اتصال ثابت و یکنواختند [۱۳]. این خصوصیت آنتی‌بادی‌های مونوکلونال باعث می‌گردد که بتوان در تولید کمپلکس PAP بتوان یک رویه واحد را در پیش گرفت و به‌علاوه، کمپلکس‌های حاصل یکنواخت بوده، نتایج آزمایش‌هایی که با استفاده از آن‌ها صورت می‌گیرد تکرارپذیر باشد. هدف از این مطالعه کاربردی، دستیابی به هیبریدوماهای تولیدکننده آنتی‌بادی علیه آنزیم پراکسیداز است. آنتی‌بادی مونوکلونال ضد HRP، کاربردهای زیادی دارد، اما یکی از مهم‌ترین کاربردهای آن در تشکیل کمپلکس PAP است. کمپلکس‌های PAP مونوکلونال در مقایسه با کمپلکس‌های پلی‌کلونال نتایج بهتر و قابل قبول‌تری را در روش‌های ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی که با استفاده از این کمپلکس صورت می‌گیرد، ارائه می‌دهد [۱۴و۱۵].

مواد و روش‌ها

الف) ایمن‌سازی موش‌ها: به ۱۰ سر موش Balb/c ماده با سن ۶-۴ هفته (تهیه شده از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی) مقدار ۵ میکروگرم آنزیم HRP (Merck آلمان) به‌صورت داخل صفاقی در ۳ نوبت و با فواصل زمانی یک ماهه تزریق شد. در مرحله اول از ادجوانت کامل فروند (CFA) (Sigma آمریکا) و در مرحله دوم از ادجوانت ناقص فروند (IFA) (Sigma آمریکا) استفاده گردید، ولی در مرحله سوم از هیچ ادجوانتی استفاده نشد و تزریق به‌صورت داخل وریدی انجام گرفت. دو هفته بعد از هر تزریق آنتی‌ژنی، از شبکه مویرگی چشم موش‌ها خونگیری به‌عمل آمد و تیتر آنتی‌بادی در سرم موش‌ها با روش الیزا اندازه‌گیری گردید. موش‌هایی که از پاسخ ایمنی خوبی برخوردار بوده، آنتی‌بادی با تیتر بالا علیه آنزیم پراکسیداز تولید کرده بودند، برای انجام عمل ادغام سلولی مورد استفاده قرار گرفتند [۱۶ با اندکی تغییرات].

ب) انجام آزمون الیزا: مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف سرم‌ها و یا مایع رویی کشت سلول‌ها به تمام چاهک‌های پلیت الیزا (NUNC دانمارک)که قبلاً توسط آنزیم HRP (Merck آلمان) پوشیده شده بود، اضافه گردید و پلیت مزبور به مدت ۲ ساعت در ۳۷°C انکوبه گردید. پس از انکوباسیون و سه بار شستشوی چاهک‌ها با محلول PBS حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۲۰

Archive of SID

www.SID.ir

(PBS-T) (Sigma-Tween20)، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت مناسب آنتی‌بادی ضد ایمونوگلوبولین موشی کانژوگه با بیوتین (Sigma آمریکا) اضافه و به مدت ۲ ساعت در ۳۷°C قرار گرفت. پس از شستشوی مجدد مطابق مرحله قبل، ۱۰۰ میکرو لیتر از رقت مناسب استرپتوآویدین کونژوگه با آلکالن فسفاتاز (Boehringer آلمان) اضافه شد و پس از دو ساعت انکوباسیون در ۳۷°C و شستشو با اضافه کردن سوبسترای آلکالن فسفاتاز (NPP ρ-Sigma آمریکا) و توقف واکنش پس از ۲۰ دقیقه با محلول ۳ مولار سود، مقدار رنگ ایجاد شده‌توسط دستگاه‌قرائت‌گر الیزا (Lab System دانمارک) و در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد. به‌عنوان کنترل منفی از سرم موش غیرایمن و یا مایع رویی کشت سلول‌های SP2/0 استفاده شد. لازم به ذکر است که رقت مناسب پراکسیداز، آنتی‌بادی کونژوگه و استرپتو اویدین کانژوگه با آلکالین فسفاتاز طی آزمایش‌های اولیه و با استفاده از سریال رقت تعیین گردیده بود [۱۶ و ۱۷ با بعضی تغییرات].

ج) مراحل قبل از امتزاج سلولی: یک هفته قبل از انجام امتزاج سلولی، یک لوله کرایو، حاوی سلول‌های میلومای SP2/0 (تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستورایران) از تانک ازت درآورده شد و ذوب گردید و با استفاده از محیط کشت RPMI-1640 (Sigma آمریکا) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو FCS (Gibco انگلستان) کشت داده شد. ۳ روز قبل از امتزاج سلولی مقدار ۵ میکروگرم از آنزیم HRP به‌طور داخل وریدی از طریق ورید دم موش به موش ایمن شده تزریق گردید. ۲ روز قبل از امتزاج سلولی با استفاده از سلول‌های گرفته شده از صفاق موش نرمال یک لایه تغذیه‌کننده در چاهک‌های ۲ پلیت کشت سلول ۹۶ خانه‌ای (Nunc دانمارک) تهیه شد، به‌طوری که در هر چاهک بین ۱۰۰۰ تا ۵۰۰۰ سلول قرارگرفت. یک روز قبل از امتزاج سلولی، سلول‌های SP2/0 در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شدند. از این سلول‌ها در فاز لگاریتمی رشد سلولی و هنگامی که بیش از ۹۷ درصد سلول‌ها در آزمایش تعیین درصد سلول‌های زنده (viability test) زنده بودند، برای انجام امتزاج سلولی استفاده شد.

د) امتزاج سلولی: پس از آماده کردن تمام مواد و وسایل کار و گرم کردن محیط‌های کشت، ابتدا سلول‌های میلومای SP2/0 در زیر هود بیولوژیک (Holten) و در شرایط استریل، ۳ بار با محیط RPMI شستشو داده شدند و شمارش سلولی انجام گرفت. موش ایمن شده مورد نظر نخایی شده و طحال آن در شرایط استریل از بدن خارج شد. یک سوسپانسیون سلولی از سلول‌های طحال در محیط کشت RPMI تهیه گردید و پس از ۳ بار شستشو، شمارش سلولی انجام شد. سوسپانسیون سلولی طحال به نسبت ۵ به ۱ با سلول‌های میلومای SP2/0 مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید تا سلول‌ها نزدیک یکدیگر قرار گیرند. آنگاه محیط رویی سلول‌ها دور ریخته شد و امتزاج سلولی با استفاده از محلول ۵۰ درصد پلی‌اتیلن گلیکول (Sigma) (PEG, MW=3000-3700) انجام گرفت. پس از شستشوی سلول‌ها و دور ریختن مایع رویی به توده سلول‌ها محیط کشت RPMI با ۲۰ درصد FCS حاوی HAT (Gibco) (Hypoxanthine, Aminopterine, Thymidine) اضافه گردید و در پایان، سوسپانسیون سلولی حاصل با استفاده از پیپت در چاهک‌های پلیت کشت سلول ۹۶ خانه‌ای تقسیم شد و در انکوباتور ۳۷°C با ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند. حفرات پلیت کشت به‌صورت روزانه با استفاده از میکروسکوپ معکوس (Nickon) جهت مشاهده تشکیل کلون سلولی مورد بررسی قرار گرفتند [۱۶ و ۱۸ با اندکی تغییرات].

ه) انتخاب و توسعه کلون‌ها: پس از رشد کلون‌های هیبریدوما در محیط حاوی HAT و زرد شدن محیط کشت از مایع رویی چاهک‌های حاوی هیبریدوما که در آن‌ها کلونی سلولی رشد کرده بود برداشته شده و با انجام آزمون الیزا، هیبریدوماهای ترشح‌کننده آنتی‌بادی علیه پراکسیداز مشخص و با محیط کشت

Archive of SID

www.SID.ir

RPMI کامل حاوی HT (Hypoxanthine, Thymidine) (Sigma) تکثیر شدند. این کلون‌های سلولی برای انجام مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

و) تک کلون کردن هیبریدوماها به روش آخرین حد رقت (limiting dilution): کلون‌های مثبت به‌دست آمده بایست به‌صورت تک کلون درآورده می‌شدند که برای اطمینان از تک کلون بودن سلول‌ها این عمل دوبار تکرار می‌شد. برای انجام این کار، سوسپانسیونی از سلول‌های در حال رشد لگاریتمی حاوی cell/ml ۲۰ ساخته شد، به‌طوری که با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر به چاهک‌های پلیت کشت ۹۶ خانه‌ای در هر چاهک حدود ۱ سلول قرار گیرد. سپس سلول‌ها با محیط کشت RPMI کامل حاوی HT (در مرحله اول) و فاقد HT (در مرحله دوم) تغذیه می‌شدند. پس از گذشت ۵ روز تک کلون‌ها در بعضی از چاهک‌ها قابل مشاهده بودند. پس از تشکیل و رشد تک‌کلون‌ها از مایع رویی زرد شده آن‌ها برداشته شد و تحت آزمون الایزا قرار گرفتند تا زیرکلون‌های مولد آنتی‌بادی ضد پراکسیداز شناسایی شده و توسعه یابند. پس از توسعه این تک‌کلون‌های مثبت، روش آخرین حد رقت بار دیگر تکرار شد و تک‌کلون‌های مثبت نهایی که مولد آنتی‌بادی ضد پراکسیداز بودند، با آزمون الایزا شناسایی شده و توسعه یافتند [۱۶و۱۸]. چند ویال از هر یک از این سلول‌ها در تانک ازت مایع منجمد شد تا ذخیره مناسبی از آن‌ها موجود باشد.

ز) تعیین ایزوتیپ آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به‌دست آمده: ابتدا ۱۰ میکرولیتر از مایع رویی کلون‌های ۳ F ۶ F ۲ P و ۲ D ۱۱ F ۱ P (کلون‌های هیبریدومایی که نهایتاً پس از دوبار تکرار روش آخرین حد رقت انتخاب گردیدند) برداشته شد و به ۴۹۰ میکرولیتر PBS که در داخل یک لوله آزمایش ریخته شده بود اضافه گردید (رقت ۱ به ۵۰). از طرف دیگر ۲ لوله مخصوص کیت ایزواستریپ (Boehringer آلمان) شماره‌گذاری شد و به هر کدام ۱۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق شده اضافه شد. سپس یک نوار مخصوص کیت در داخل هر لوله قرار گرفت که پس از ۵ دقیقه خطوط آبی رنگی روی نوار قابل مشاهده بودند. محل تشکیل نوارها، مشخص‌کننده ایزوتیپ زنجیره سبک و زنجیره سنگین آنتی‌بادی مونوکلونال مورد نظر است.

ح) تعیین میزان تأثیر آنتی‌بادی بر ناحیه فعال آنزیم: چون قرار است آنتی‌بادی تولید شده برای تشکیل کمپلکس PAP به‌کار رود، باید از عدم تأثیر آنتی‌بادی بر ناحیه فعال آنزیم مطمئن شد. بدین‌منظور، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف آنزیم پراکسیداز در حفرات پلیت الیزا ریخته شد و به‌مدت ۱۸ ساعت در ۴°C قرار گرفت. پس از شستشوی چاهک‌ها، رقت‌های مختلف از مایع رویی کشت سلول‌های هیبریدوما به چاهک‌ها اضافه گردید و پس از ۲ ساعت انکوباسیون در ۳۷°C و شستشو، سوبسترای آنزیم پراکسیداز محلول (OPD) (Orthophenilen) (Sigma) diamine) اضافه گردید. واکنش پس از ظهور رنگ با اسید سولفوریک ۲۰ درصد متوقف و جذب نوری در طول موج ۴۹۲ نانومتر قرائت گردید. در این آزمایش، به‌عنوان کنترل مثبت و منفی به ترتیب از رقت ۱۱۰۰۰ سرم موش‌های ایمن و غیرایمن استفاده گردید.

ط) تزریق سلول‌های هیبریدوما به موش برای تولید انبوه آنتی‌بادی مونوکلونال: ابتدا مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر Pristan (Sigma آمریکا) به ۴ سر موش Balb/c (انستیتو رازی) به‌طور داخل صفاقی تزریق شد. یک هفته بعد تعداد ۱۰ میلیون سلول هیبریدومای مورد نظر به‌طور داخل صفاقی به هر موش تزریق گردید. موش‌ها به‌صورت روزانه معاینه فیزیکی می‌شدند. پس از تشکیل تومور شکمی و رشد آن، موش‌ها دارای تومور نخاعی شدند و مایع صفاقی آن‌ها کشیده شد و پس از سانتریفوژ کردن، مایع رویی سلول‌ها جدا و منجمد گردید [۱۶].

Archive of SID

www.SID.ir

ی) الکتوفورز مایع صفاقی: پس از مرطوب کردن کاغذ استات سلولز در بافر باربیتال (pH=۸/۶)، ۲ میکرولیتر از هر نمونه مایع آسیت توسط اپلیکاتور روی آن منتقل گردید و الکتروفورز به مدت ۲۷ دقیقه در ولتاژ ۲۴۰ ولت انجام شد. در پایان کار، کاغذ برداشته و مراحل زیر به ترتیب در مورد آن اجرا شد:

– قرار گرفتن در محلول رنگزا (پانسو S (NAVECO آرژانتین) به مدت ۱۰ دقیقه.

– قرار گرفتن در محلول رنگبر (اسید استیک ۵ درصد در آب مقطر) (Merk آلمان) به مدت ۶ دقیقه.

– قرار گرفتن در محلول شفاف‌کننده (۲۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال + ۸۰ میلی‌لیتر متانول (Merk آلمان) به مدت ۱ دقیقه.

پس از این مراحل، کاغذ بر روی یک قطعه شیشه مربع شکل ثابت شد و به درون فور (با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) منتقل گردید تا شفاف گردد.

نتایج

الف) نتایج حاصل از ایمن‌سازی موش‌ها: ۲ هفته پس از هر تزریق از موش‌ها خونگیری شد و یک آزمون الیزا برای بررسی تیتر آنتی‌بادی تولید شده در موش‌ها صورت گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان می‌داد که تمام موش‌ها ایمن شده‌اند. جذب نوری به‌دست آمده در آزمایش‌های الیزای رقت ۱۱۰۰۰ سرم موش‌ها انتخاب و میانگین آن‌ها محاسبه شد. رسم این نتایج به‌صورت منحنی، نشان‌دهنده افزایش تولید آنتی‌بادی اختصاصی HRP در طی ۳ مرحله ایمونیزاسیون (۷۵ روز) است (نمودار ۱).

ب) نتایج حاصل از امتزاج سلولی: در این مطالعه، هفت بار عمل امتزاج سلولی صورت گرفت و هر بار ۲ پلیت کشت سلولی ۹۶ خانه‌ای (۱۹۲ چاهک) به‌کار برده شد. در تمام موارد از پلی‌اتیلن گلیکول ۵۰ درصد (Merck) استفاده گردید، غیر از امتزاج ششم که از پلی‌اتیلن گلیکول ۳۷ درصد (Sigma) استفاده شد. تعداد و درصد کلون‌های به‌دست آمده در این هفت بار امتزاج سلولی در جدول ۱ آمده است. در میان کلون‌های به‌دست آمده تعدادی تولیدکننده آنتی‌بادی و تعدادی هم غیرمترشحه بودند. تعداد کلون‌های هیبریدومای مثبت و اختصاصی که در هر بار امتزاج سلولی به‌دست آمد در جدول ۱ آمده است. همان‌طور که در جدول مشخص است در چهارمین امتزاج سلولی ۳ کلون (۵/۳ درصد)، در پنجمین امتزاج ۲ کلون (۴/۵ درصد) و در هفتمین امتزاج ۱ کلون (۲/۹ درصد) مثبت تولیدکننده آنتی‌بادی اختصاصی به‌دست آمد که در پایان فقط موفق به نگهداری ۲ کلون سلولی شدیم.

ج) نتایج حاصل از انجام کلونینگ با استفاده از روش آخرین حد رقت: در پنجمین امتزاج سلولی که صورت گرفت پس از تکثیر و رشد کلون مثبت و اختصاصی P ۱ F ۱۱ به‌دست آمده، اقدام به تک کلون کردن با استفاده از روش آخرین حد رقت شد. این عمل دوبار انجام گرفت. در اولین مرحله تک کلون کردن از ۱۸ تک کلون به‌دست آمده ۱۲ تک کلون، مثبت و اختصاصی بود و در دومین مرحله تک کلون کردن ۲۱ تک کلون به‌دست آمد که همگی اختصاصی و علیه HRP بودند (جدول ۲).

در هفتمین امتزاج سلولی نیز روی کلون مثبت و اختصاصی P ۲ F ۶ به‌دست آمده، عمل تک کلون کردن با استفاده از روش آخرین حد رقت صورت گرفت. در اولین مرحله تک کلون کردن ۱۵ تک کلون به‌دست آمد که ۱۰ تک کلون اختصاصی بودند. در دومین مرحله تک کلون کردن ۱۸ تک کلون حاصل گردید که تماماً اختصاصی و علیه HRP بودند. از بین زیرکلون‌های به‌دست آمده دو زیرکلون P ۱ F ۱۱ F ۲ و P ۲ F ۶ D ۳ که مایع رویی کشت آن‌ها بالاترین OD را در آزمایش‌های الیزا ایجاد کرد، توسعه یافته و نگهداری شدند.

د) تعیین ایزوتیپ آنتی‌بادی‌های مونوکلونال: هر دو آنتی‌بادی مونوکلونال P ۱ F ۱۱ F ۲ و P ۲ F ۶ D ۳

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱ نتایج حاصل از امتزاج‌های سلولی انجام شده

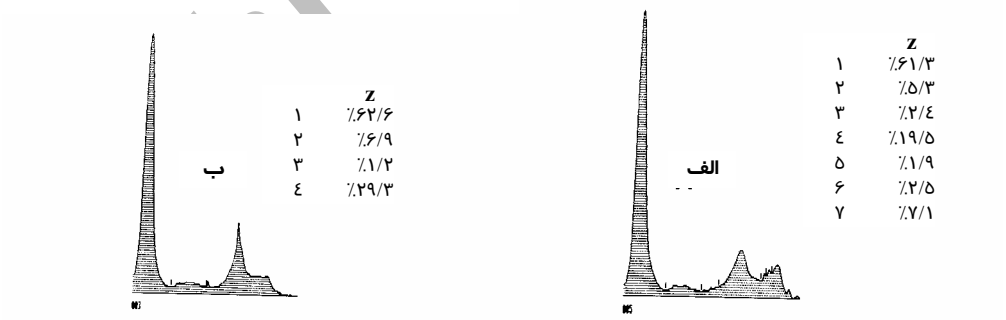
دفعات امتزاج	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
تعداد کل چاهک‌ها	۱۹۲	۱۹۲	۱۹۲	۱۹۲	۱۹۲	۱۹۲	۱۹۲
تعداد کلون‌ها	۱	۳	۸۵	۵۶	۴۴	۰	۳۵
(درصد کلون‌ها)	(۰/۵)	(۱/۵)	(۴۵)	(۲۹)	(۲۳)	(۰)	(۱۸)
تعدادکلون‌های تولیدکننده Ab	۱	۲	—	۲۶	۲۳	۰	۱۹
تعداد کلون‌های مثبت	۰	۰	—	۳	۲	۰	۱
درصد کلون‌های مثبت	۰	۰	—	۵/۳	۴/۵	—	۲/۹

جدول ۲ تعداد و درصد تک کلون‌های حاصل از روش رقیق‌سازی متوالی بر روی کلون P 1 F 11

	اولین Cloning	دومین Cloning
تعداد کل چاهک‌ها	۹۶	۹۶
تعداد کل تک کلون‌های به‌دست آمده و (درصد)	۱۸(٪۱۸/۵)	۲۱(٪۲۱/۸)
تعداد تک کلون‌های مثبت و (درصد)	۱۲(٪۱۲/۵)	۲۱ (٪۲۱/۸)

جدول ۳ تعداد و درصد تک کلون‌های حاصل از روش رقیق‌سازی متوالی بر روی کلون P 2 F 6

	اولین Cloning	دومین Cloning
تعداد کل چاهک‌ها	۹۶	۹۶
تعداد کل تک کلون‌های به‌دست آمده و (درصد)	۱۵(٪۱۵/۶)	۱۸(٪۱۸/۷)
تعداد تک کلون‌های مثبت و (درصد)	۱۰(٪۱۰/۴)	۱۸ (٪۱۸/۷)



شکل ۱ اسکن حاصل از الکتروفورز پروتئین مایع آسیت.

الف) مایع آسیت موش دریافت‌کننده کلون P1F11D2، ب) مایع آسیت موش نرمال

با استفاده از کیت ISO strip تعیین ایزوتیپ شدند. پس از انجام آزمایش مشخص شد که در هر دو کلون هیبریدومایی آنتی‌بادی تولیدی از کلاس IgG و دارای زنجیره سبک k (کاپا) است.

ه) نتایج حاصل از آزمون الیزا برای تشخیص عدم اتصال آنتی‌بادی به ناحیه فعال آنزیم: با انجام آزمون الیزا مشخص گردید که با بالا رفتن غلظت آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در لایه دوم مقدار OD به‌دست آمده دچار تغییر نمی‌شود، در حالی‌که در مورد

www.SID.ir

جدول ٤ نتایج حاصل از آزمون الایزا جهت تشخیص عدم اتصال آنتی‌بادی به ناحیه فعال آنزیم (اعداد داده شده OD به‌دست آمده از چاهک‌های الایزا است)

رقت‌های‌مختلف سوپ غلظت‌های مختلف (µ g/ml) HRP Coating	P2F6F3	P2F6F3 (۱۳)	P2F6F3 (۱۶)	P1F11D2	P1F11D2 (۱۳)	P1F11D2 (۱۶)	PBS	سرم موش ایمن (۱۱۰۰۰)
۲۰	۱/۸۰	۱/۷۵	۱/۸۳	۱/۷۳	۱/۷۵	۱/۷۳	۱/۷۵	۱/۷۱
۱۰	۱/۵۱	۱/۵۳	۱/۵۲	۱/۵۴	۱/۵۵	۱/۵۳	۱/۵۵	۱/۳۹
۵	۱/۱۲	۱/۱۲	۱/۰۹	۱/۱۵	۱/۱۳	۱/۱۲	۱/۱۵	۱/۰۸
۲/۵	۰/۷۱	۰/۷۳	۰/۷۴	۰/۷۵	۰/۷۳	۰/۷۵	۰/۷۱	۰/۵۳
۱/۲۵	۰/۵۲	۰/۵۵	۰/۵۴	۰/۵۵	۰/۵۳	۰/۵۴	۰/۵۵	۰/۳۱
۰/۶۲۵	۰/۳۵	۰/۳۳	۰/۳۴	۰/۳۴	۰/۳۱	۰/۳۳	۰/۳۵	۰/۱۵

– اعداد، نشان‌دهنده جذب نوری (OD) در طول موج ۴۹۲ نانومتر هستند.

کنترل مثبت (سرم موش ایمن) در مواردی که میزان آنزیم چسبیده به کف پلیت الیزا کم بود، با بالا رفتن تیتر آنتی‌بادی لایه دوم OD به‌دست آمده کاهش پیدا می‌کرد (جدول ۴). عدم تأثیر آنتی‌بادی مونوکلونال بر واکنش آنزیم و سوبسترا، نشانه عدم تأثیر آن بر ناحیه فعال آنزیم است.

و) نتایج حاصل از الکتروفورز پروتئین روی مایع آسیت حاصل از القای تومور در موش: انجام الکتروفورز پروتئین، روی مایع آسیت گرفته شده از موش‌هایی که سلول‌های هیبریدومای P 1 F 11 F 2 و P 2 F 6 D 3 به آن‌ها تزریق شده بود، وجود باند مشخصی را در ناحیه گاما نشان می‌داد، در حالی‌که در مایع آسیت موش طبیعی، این باند قابل تشخیص نبود. وجود باند گامای مشخص در روی ژل استات سلولز، نشان دهنده وجود آنتی‌بادی در نمونه‌های فوِ است (شکل-۱).

بحث

آنزیم پراکسیداز در آزمایش‌های ایمونولوژیک دارای کاربردهای فراوان است [۴،۶و۱۵]. یکی از مهم‌ترین کاربردهای آن در روش‌های ایمونوهیستوشیمی و ایمونوسیتو شیمی است [۲]. امروزه تکنیک‌های ایمونوهیستوشیمی و ایمونوسیتوشیمی، اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده‌اند. این تکنیک‌ها عموماً در پاتولوژی، هیستولوژی، سیتولوژی، جنین‌شناسی، ایمونوپاتولوژی و... استفاده می‌شوند [۴،۶،۹،۱۰،۱۱و۱۲]. روش PAP جزء متداول‌ترین و شناخته شده‌ترین این روش‌ها است که آنزیم پراکسیداز در آن نقش کلیدی دارد. این آنزیم دارای سوبستراهای متعدد است که واکنش با برخی از آن‌ها، منجر به تولید محصولات رنگی می‌شود. بنابراین از این آنزیم به‌عنوان یک نشانگر در روش‌های ایمونوشیمی، مانند الیزا و ایمونوهیستوشیمی، مانند روش PAP می‌توان استفاده کرد [۱،۲و۱۵]. برای نشاندار کردن مولکول‌ها با این آنزیم، روش‌های متفاوتی وجود دارد که ابتدایی‌ترین آن‌ها کونژوگاسیون است. کونژوگه کردن آنتی‌بادی با آنزیم یا با مولکول‌های دیگر (نظیر آویدین – بیوتین) مستلزم صرف وقت بوده، به تجربه کافی نیاز دارد، به‌ویژه که در غالب موارد، این پروسه را باید در مورد تک تک آنتی‌بادی‌ها اعمال کرد [۱۹]. تشکیل کمپلکس ایمن پراکسیداز – آنتی‌پراکسیداز، یکی دیگر از شیوه‌های نشاندار کردن مولکول‌ها با این آنزیم است که به علت مزایای فراوانش، از جمله عدم نیاز به نشاندار کردن مستقیم آنتی‌بادی‌های لایه اول و تأثیری که بر افزایش حساسیت روش تشخیصی می‌گذارد، کاربردهای زیاد

Archive of SID

www.SID.ir

پیدا کرده است [۱۹]. در این تحقیق، ما به‌دنبال آنتی‌بادی مونوکلونال ضد آنزیم HRP بودیم تا بتوان از این آنتی‌بادی در تهیه کمپلکس PAP استفاده کرد. انجام یک امتزاج سلولی موفقیت‌آمیز و دستیابی به دودمان هیبریدومایی پایدار، نیازمند بهبود بخشیدن و اصلاح مراحل مختلف کار از جمله پروتوکل ایمونیزاسیون، انتخاب موش مناسب (سوش و سن آن) مقدار FCS مصرفی، نوع سلول‌های میلوما و درصد PEG مصرفی است. برای انجام ایمونیزاسیون، مقدار ۵ میکروگرم از آنزیم HRP را ۳ بار به فواصل ۱ ماه به ۱۰ سر موش از طریق داخل صفاقی تزریق کردیم. براساس آزمون‌های انجام شده مشخص گردید تقریباً تمام موش‌ها ایمن شده‌اند. تیتر آنتی‌بادی ضد پراکسیداز نیز پس از هر بار تزریق افزایش می‌یافت و سیر صعودی داشت (نمودار ۱). اما دیده شد که تمام موش‌ها به یک میزان ایمن نشده‌اند که علت آن شاید کم بودن مقدار آنتی‌ژن تزریقی باشد. سمننکو (Semenenko) و همکارانش برای ایمونیزاسیون موش‌ها مقادیر ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم از آنزیم HRP را ۴ بار به‌صورت داخل جلدی و یا داخل صفاقی تزریق کردند. سه تزریق اول با فواصل یک هفته‌ای و تزریق چهارم ۳ هفته بعد انجام گرفت و مشخص گردید موش‌هایی که دز بالاتر HRP را دریافت کرده‌اند (۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم) تیتر بالاتری را نشان می‌دهند [۱۵]. در این تحقیق، هفت بار امتزاج سلولی انجام دادیم و موفق شدیم در کل از بین ۱۳۴۴ چاهک به‌کار رفته (۲ پلیت کشت سلول ۹۶ خانه‌ای × ۷) به ۲۲۴ کلون هیبریدوما دست پیدا کنیم. بنابراین در این مورد، راندمان کار ما در حدود ۱۷ درصد بود. در امتزاج اول به یک کلون و در امتزاج دوم به ۳ کلون دست یافتیم که هیچ‌کدام اختصاصی نبودند. علت عدم دستیابی به هیبریدوماهای زیاد در امتزاج‌های اول و دوم را عدم داشتن مهارت کافی در انجام امتزاج سلولی می‌دانیم و باید گفت که نوع سلول میلوما و درصد زنده بودن آن، نسبت سلول‌های طحالی به میلومایی، و تعداد این سلول‌ها، نوع محیط کشت و تازه بودن آن، نحوه انجام امتزاج سلولی، میزان مجاورت PEG با سلول‌ها، نحوه اضافه کردن محیط کشت به سلول‌ها پس از مجاورت با PEG، زمان سانتریفوژ و دور آن، زمان انجام امتزاج سلولی و موارد دیگر از این قبیل می‌تواند در میزان موفقیت امتزاج سلولی و دستیابی به هیبریدوما مؤثر باشد [۲۰].

در امتزاج چهارم از ۵۶ کلون به‌دست آمده ۲۶ کلون تولیدکننده آنتی‌بادی بودند که از میان آن‌ها ۳ کلون اختصاصی و مثبت بود (۵/۳ درصد از کل کلون‌های به‌دست آمده)، اما این کلون‌ها در طی مراحل بعدی از دست رفتند و رشد نکردند. «رای» در سال ۱۹۸۴، برای ادغام سلولی از ۵ پلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده کرد و توانست به ۲۱۴ کلون دست یابد که از این تعداد، ۷ کلون مثبت و اختصاصی بودند. در واقع میزان موفقیت وی ۳/۳ درصد بود [۲۱]. در امتزاج پنجم، از بین ۱۹۲ چاهک، ۴۴ چاهک حاوی کلون بودند (۲۳ درصد) که ۲۳ کلون تولیدکننده آنتی‌بادی و از میان آن‌ها ۲ کلون تولیدکننده آنتی‌بادی اختصاصی ضد HRP بود (۴/۵ درصد کل کلون‌های به‌دست آمده). اما یکی از این کلون‌ها در هفته سوم منفی شد. احتمالاً مخلوط با کلون اختصاصی، کلون‌های غیرمترشحه هم وجود داشته و تحقیقات نشان می‌دهند که سلول‌های غیرمترشحه دارای رشد بیش‌تر هستد و جلوی رشد سلول‌های اختصاصی را می‌گیرند [۲۲]. کلون P ۱ F ۱۱ که همچنان مثبت بود سریعاً دو بار به روش رقیق‌سازی متوالی به‌صورت تک کلون درآمد.

در امتزاج ششم متأسفانه نتوانستیم به هیچ کلونی دست پیدا کنیم. از آن‌جا که در این امتزاج، برخلاف امتزاج‌های دیگر، به جای PEG ۵۰ درصد با M.W=۴۰۰۰ از PEG ۳۷ درصد با M.W=۳۰۰۰-۳۷۰۰ استفاده شد، شاید PEG مصرفی و یا درصد کم PEG سبب عدم موفقیت در امتزاج سلولی باشد [۲۰].

در امتزاج هفتم از ۳۵ کلون به‌دست آمده ۱ کلون اختصاصی و مثبت بود (۲/۹ درصد کل کلون‌های به‌دست آمده). برای از دست ندادن کلون به‌دست آمده

Archive of SID

www.SID.ir

(P2F6) خیلی سریع آن‌ها را به روش رقیق‌سازی متوالی در ۲ نوبت به‌صورت تک کلون درآوردیم تا کاملاً پایدار گردد.

پس از تعیین ایزوتیپ آنتی‌بادی‌های تولیدی مشخص گردید که هر دو آنتی‌بادی مونوکلونال ۲ D ۱۱ F ۱ P و ۳ F ۶ F ۲ P از کلاس IgG و زیر کلاس ۱ IgG بوده، دارای زنجیره سبک کاپا (κ) هستند که با توجه به غلبه IgG در پاسخ‌های ایمنی ثانویه و با در نظر گرفتن این‌که اغلب آنتی‌بادی‌های ساخته شده در بدن موش دارای زنجیره سبک کاپا هستند (بیش از ۹۰ درصد) این نتیجه چندان دور از انتظار نیست. از آن‌جا که هدف این پروژه، تشکیل کمپلکس PAP است، آنتی‌بادی‌های به‌دست آمده باید واجد شرایط خاصی باشند؛ از جمله این‌که علیه ناحیه فعال آنزیم نباشند، در واکنش آنزیمی اختلال ایجاد نکنند و علاوه بر این، از کلاس IgG باشند. انجام آزمایش‌های الیزا نشان داد که آنتی‌بادی‌های مترشحه توسط هیچ‌کدام از زیر کلون‌های به‌دست آمده بافعالیت آنزیمی تداخل نمی‌کنند. سایر محققینی که در خارج از کشور روی تولید کمپلکس PAP کار کرده‌اند نیز با انجام آزمایش‌های مشابه به بررسی چگونگی واکنش آنتی‌بادی با آنزیم و تداخل آن در واکنش آنزیمی پرداخته‌اند [۲۳و۲۴]. با توجه به نتایج مذکور و کلاس آنتی‌بادی تولیدی به نظر می‌رسد آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به‌دست آمده برای تهیه کمپلکس ایمنی PAP کاملاً مناسب و ایدئال باشند و می‌توان از آن‌ها در تکنیک‌های ایمونوهیستوشیمی و ایمونوسیتوشیمی استفاده کرد. سایر مراحل این تحقیق در دست انجام است.

تقدیر و تشکر

این پروژه بخشی از طرح ملی تولید مجموعه‌های ایمنی PAP و APAAP به‌منظور توسعه روش‌های چشمی تشخیص شاخص‌های سلولی است. لازم است از شورای پژوهش‌های علمی کشور و سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی به‌دلیل تأمین اعتبار آن و سایر همکاری‌هایی که مبذول داشته‌اند تشکر کنیم. همچنین از اعضای گروه ایمونولوژی انستیتو پاستور ایران، به‌ویژه آقای دکتر علیرضا خبیری که در بعضی از مراحل عملی این پروژه با ما همکاری داشته‌اند، صمیمانه سپاسگزاریم.

منابع

1. Mesulam M.M. Tracing neural connection: with horseradish peroxidese In: IBRO Hondbook series: Methods in the neuroscinces, smith A.D. (ed), John wiley & sons, schichester, New york, 1982.
2. Burns J. The unlabelled antibody peroxidase-anti peroxidese (PAP) In: Techniques in immunocytochemistry, Eds, Bullock G.R. & Petrusz P. 1 (eds): 91-106, 1989.
3. Villaplana M., Garcia Ayala A., Hernandes M.P., Agulleiro B. Immunohistochemical and ulterastructural characterization of mammosomatotrope, growth hormone, and prolactin cells from the gilthead sea bream: an ontogenic study. J. Morphol., 255(3): 347-57, 2003.
4. Saga K. Histochemical and immunohistochemical markers for human eccrine and apocrine sweat glands: an aid for histopathologic differentiation of sweat gland tumors. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc., 6(1): 49-53, 2001.
5. Hsu F.D., Nielsen T.O., Alkushi A., Dupuis B., Huntsman D., Liu C.L., Van De Rijn M., Gilks C.B. Tissue microarrays are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry. Mod. Pathol., 15(12): 1374-80, 2002.
6. Fukunaga M. Immunohistochemical characterization of p57(KIP2) expression in early hydatidiform moles. Hum Pathol., 33(12): 1188-92, 2002.
7. Zigeuner R.E., Riesenberg R., Pohla H., Hofstetter A., Oberneder R. Isolation of circulating cancer cells from whole blood by immunomagnetic cell enrichment and unenriched immunocytochemistry in vitro. J. Urol., 169(2): 701-5, 2003.
8. Castilla E.A., Prayson R.A., Abramovich C.M., Cohen M.L. Immunohistochemical expression of cathepsin D in menengiomas. Am. J. Clin. Pathol., 119(1): 123-8, 2003.
9. Carbone M., Rizzo P., Powers A., Bocchetta M., Fresco R., Krausz T. Molecular analyses, morphology and immunohistochemistry together differentiate pleural synovial sarcomas from mesotheliomas: clinical implications. Anticancer Res., 22(6B): 33443-8, 2002.
10. Lau S.K., Prakash S., Geller S.A., Alsabeh R. Comparative immunohistochemical profile of hepatocellular carcinoma. cholangiocarcinoma and metastatic adenocarcinoma. Hum Pathol., 33(12): 1175-81, 2002.
11. Fujita D., Terada S., Ishizu H., Yokota O., Nakashima H., Ishihara T., Kuroda S. Immunohistochemical examination on intracranial calcification in neurodegenerative diseases. Acta Neuropathol., 105(3): 259-64, 2003.

Archive of SID
www.SID.ir

12. Li C.Y., The role of morphology, cytochemistry and immunohistochemistry in the diagnosis of chronic myeloproliferative diseases. Int. J. Hematol., 76(S2): 608, 2002.

13. Kohler G. and Milstein C. Continous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature., 256: 495-497, 1975.

14. Cullo A. C. Immunohistochemistry II In: IBRO Hand Book series: methos in the neurosciences; smieth A. D (ed). Ist ed, volume 14, John willey & Sons, chichester, New york, 1993.

15. Semenenko F.M. Development of a mouse antiperoxidase secreting hybridoma for use in the production of a mouse PAP complex for immunocytochemistry and as a parent cell line in the development of hybrid Histochemistry, 83: 405-8, 1985.

16. Margulies D.H. Production of monoclonal antibodies. In: Current protocols in immunology. Edited by Golgien J.E., Vol. 1, 2.5.1-2.5.17, John wiley & Sons publishing, American, 1991.

17. Millan J.L. and Stigbrand T. Characterization and use of an allotype-specific monoclonal antibody to placental alkaline phosphatase in the study of cancer-related phosphatase polymorphism. Cancer Research., 42: 2444-2449, 1982.

18. Zola H., Brooks D. Techniques for the production and characterization of monoclonal hybridoma antibodies. In: Monoclonal hybridoma antibodies: Techniques and applications.Edited by Hurrel J.C.R. 4th ed., CRC Press, Florida, PP. 1-58, 1985.

19. Kiernan J.A. Histological and histochemical methods. 2nd edition, Pergamon Press, Britain, PP. 330-354, 1990.

20. Klebe R.J. & Bentley K.L. Chemically mediated cell fusion In: Methods of hybridoma formation, Bartal A.H. & Hirshaut y. (eds),: 77-96, 1986.

21. Wray L.K. and Harris H. Monoclonal antibodies against placental-like and intestinal-like alkaline phosphatases in a malignant human cell line. Eur. J. Biochem., 139: 503-508, 1984.

22. Mayer R. J & Walker J.H. Production and use of monodonal antibodies In: Immunochemical methods in cell and molecular biology, second printing, Academic press, london, 97-177, 1990.

23. Stenmetz H. T. Production of monochonal antibodies against glucose oxidase, alkalin phosphatase and peroxidase. J. Immunol. Meth., 101: 251-9, 1987.

24. Ternynck T., Gregoire J. & A Vrameas S. Enzyme/anti - anzyme monochonal antibody soluble immune complexes (EMAC): their use in quantiative immunoenzymatic assay. J. Immunol. meth., 58: 109-18, 1983.

Archive of SID

www.SID.ir