دانشور
پزشکی

تهیه و تخلیص آنتی‌بادی منوکلونال علیه آنتی‌ژن لیپوآرابینومان مانوزیله مایکوباکتریوم بویس

نویسندگان: رسول موخواه[1*]، محمد تقی‌خانی[2]، علیرضا خبیری[3]، سید عطاالله سادات شاندیز[1]

۱. کارشناس ارشد، بخش تحقیقات ب ث ژ، مجتمع تولیدی- تحقیقاتی انستیتوپاستور ایران،کرج،ایران
۲. استاد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس،تهران،ایران
۳. استادیار، گروه انگل‌شناسی، انستیتوپاستور ایران،تهران،ایران

* نویسنده مسئول: **E-mail: r_moukhah@yahoo.com**

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال هیجدهم– شماره ۹۱
اسفند ۱۳۸۹

دریافت: ۸۹/۹/۱۶
آخرین اصلاح‌ها: ۸۹/۱۰/۲۱
پذیرش: ۸۹/۱۰/۲۲

چکیده

مقدمه و هدف: لیپوآرابینومان مانوزیله(ManLAM) از آنتی‌ژن‌های گلیکولیپیدی است که درصد قابل توجهی از دیواره سلولی باکتری مایکوباکتریوم بویس ب ث ژ را تشکیل می‌دهد. نظر به اینکه تولید آنتی‌بادی منوکلونال آن، به‌ویژه در طراحی کیت تشخیص سریع بیماری سل کاربردهایی فراوان دارد، لذا هدف از تحقیق حاضر، تولید آنتی بادی منوکلونال ضد این آنتی‌ژن می‌باشد.

مواد و روش کار: پس از تزریق‌های منظم موش‌های BALB/c با BCG سونیکیت‌شده، آنتی‌ژن LAM، تیتر آنتی‌بادی تولیدشده بررسی‌گردید. لنفوسیت‌های طحالی موش‌ها و سلول‌های میلومای Sp2/0 با کمک پلی‌اتیلن‌گلیکول امتزاج‌داده‌شدند. سلول‌ها در محیط HAT انتخاب‌شدند و کلون‌های مولد آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن LAM با استفاده از آزمون الایزا شناسایی‌شدند؛ پس از تخلیص آنتی‌بادی منوکلونال، شناسایی آنتی‌ژن‌های لیپوآرابینومان مانوزیله و BCG سونیکیت‌شده با روش وسترن بلاتینگ انجام‌گرفت.

نتایج: تعداد۲ کلون H1-3D3 , H2-3B9 مولدآنتی‌بادی اختصاصی با جذب بالا در آزمایش الایزا، انتخاب‌شدند. نتایج وسترن بلاتینگ، باند۳۰ کیلو دالتونی مربوط به آنتی‌ژن‌های لیپوآرابینومان مانوزیله و BCG سونیکیت‌شده با استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال IgM و IgG_3 را تأییدمی‌کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان‌داد که امکان تولید و تخلیص آنتی‌بادی منوکلونال با استفاده از امتزاج لنفوسیت‌های B طحال موش‌های ایمن‌شده و سلول‌های میلوما وجودداشته، تأیید واکنش اختصاصی آنتی‌بادی مذکور قبل از انجام مطالعات تشخیصی در شناسایی سریع سل در ادرار بیماران و بررسی‌های مصونیت‌زایی واکسن ب ث ژ مورد توجه خواهدبود.

واژگان کلیدی: لیپوآرابینومانان مانوزیله، مایکوباکتریوم بویس، آنتی‌بادی منوکلونال

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

لیپوآرابینومان مانوزیله (ManLAM) یک آنتی‌ژن گلیکولیپیدی دیواره سلولی باکتری مایکوباکتریوم بویس ب ث ژ (*Mycobacterium Bovis* BCG)(سویه 1173P2 است که بخشی عمده از دیواره را به خود اختصاص-داده‌است. از مهم‌ترین عملکردهای این آنتی‌ژن می‌توان به توقف بلوغ فاگوزوم‌ها، مهار مسیر پیام‌رسانی IFN-γ، برداشت رادیکال‌های آزاد اکسیژن و مهار پروتئین کیناز c سلول میزبان اشاره‌کرد(۱). اولین بار هانتر و همکارانش ساختمان این آنتی‌ژن را توصیف‌کردند. طی سال‌های اخیر، محققان بررسی‌های مختلفی روی عملکرد، ساختمان و ساختار آنتی‌ژنیسیته لیپوآرابینومان مانوزیله انجام‌داده‌اند (۳،٤،۲و۵). این آنتی‌ژن دارای وزن ملکولی ۱۷ تا ۳۸ کیلودالتون(۷،٦) و یکی از عوامل مهارکننده سیستم ایمنی میزبان به‌شمارمی‌رود(۲). وجود این آنتی‌ژن در BCG یکی از عواملی است که مصونیت‌زایی این واکسن را کاهش‌می‌دهد. اجزاء تشکیل‌دهنده ساختمان این آنتی‌ژن شامل موارد زیر است: لنگر فسفاتیدیل اینوزیتول در غشاءباکتری، پلیمرهایی از قند مانوز، آرابینوز و همچنین کلاهکی که در انتهای آنتی‌ژن قراردارد (۹،۱۰،۸و۱۱). مایکوباکتریوم‌های مختلف، کلاهک‌های متفاوتی دارند، به‌طوری‌که در گونه‌های تند رشد غیربیماری‌زا مانند مایکوباکتریوم اسمگماتیس - کلاهک از نوع فسفاتیدیل اینوزیتول بوده، در گونه‌های کند رشد بیماری‌زایی چون: مایکوباکتریوم بویس، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم لپره، کلاهک از نوع قند مانوز است که تعداد آنها در گونه‌های بیماری‌زا تفاوت‌دارد؛ دسته سومی هم در مایکوباکتریوم چگونه وجوددارد که فاقد کلاهک معرفی‌شده‌اند که لیپوآرابینومان در آنها آرابینوزیلات لیپوآرابینومانان (AraLAM) نام‌دارد(۱۲). آنتی‌ژن لیپوآرابینومان مانوزیله در بیمارانی که سل فعال دارند، از طریق ادرار دفع‌می‌شود؛ همچنین یکی از عوامل بیماری‌زایی مایکوباکتریوم‌ها محسوب می‌شود و دارای اعمالی مختلف چون: جلوگیری از فعال‌شدن ماکروفاژها، مهار تولید سایتوکاین‌های TNF-α،IL-12 ، مهار آپوپتوز ماکروفاژهای آلوده است. تولید آنتی‌بادی منوکلونال ضد آنتی‌ژن لیپوآرابینومان مانوزیله، کاربردهای فراوانی دارد که از آن جمله می‌توان به طراحی کیت تشخیص سریع برای شناسایی بیماری سل از طریق ادرار، اشاره‌کرد (۱۳). کاربرد آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد شاخص‌های آنتی ژنی خاص در حوزه‌های مختلف زیستی از اهمیتی ویژه برخوردارند، برای نمونه می‌توان به آزمایش‌های تشخیص طبی، میکروبیولوژی، ایمنوتراپی سرطان، ایمنوهیستوشیمی، ایمنوسیتوشیمی و ... اشاره‌کرد که در تمامی موارد مذکور، پاتن‌های تک‌کلون اهمیتی ویژه دارند(۱٦،۱۵). یکی از متداول‌ترین روش‌های تولید انبوه آنتی‌بادی‌های منوکلونال، امتزاج لنفوسیت‌های B طحال موش ایمن‌شده و سلول‌های میلوما است. نظربه‌اینکه روش‌های PCR و تشخیص کشت میکروبی برای شناسایی بیماری سل، به زمان و هزینه‌ای بالا نیازدارند، هدف از این تحقیق، تهیه و تخلیص آنتی‌بادی منوکلونال ضد آنتی ژن لیپوآرابینومان مانوزیله بوده، که از این روش بتوان کیت تشخیصی مناسبی برای شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از طریق ادرار بیماران طراحی‌کرد.

مواد و روش کار

موش‌های BALB/c این تحقیق از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی انستیتوپاستور ایران واقع در کرج تهیه‌شد. واکسنBCG از انستیتو پاستور ایران، آنتی‌ژن لیپوآرابینومانان و تمامی مواد شیمیایی از شرکت‌های Sigma و Merck خریداری‌شدند.

تزریق BCG به هر موش، در نوبت اول به صورت داخل صفاقی انجام‌گرفت. غلظتµg/ml ۱۰ از BCG سونیکیت‌شده در بافر PBS تهیه‌شد. سپس، ۱ میلی‌لیتر از این محلول با ۱ میلی‌لیتر ادجوانت ناقص فروند به‌خوبی مخلوط شد تا غلظت µg/ml ۵ از BCG سونیکیت‌شده حاصل شود. در فواصل بین تزریق‌ها و در زمانی، حدود دو هفته پس از تزریق اول، به‌منظور ارزیابی میزان پاسخ

Archive of SID

www.SID.ir

سیستم ایمنی نسبت به آنتی‌ژن، آزمون الایزا انجام‌شد؛ تزریق دوم BCG سونیکیت‌شده مانند تزریق اول چهار هفته بعد انجام‌شد؛ پانزده روز پس از تزریق دوم، پاسخ ایمنی موش ارزیابی و در این مرحله، آزمون الایزا برای BCG و لیپوآرابینومان مانوزیله گذاشته‌شد سپس موشی که بهترین پاسخ را به هر دو آنتی‌ژن داده‌بود برای تزریق سوم انتخاب‌شد و سه تا پنج روز قبل از فیوژن با سلول-های میلوما، ۰/۲ میلی‌لیتر آنتی‌ژن لیپوآرابینومان مانوزیله با غلظت ٤ میکروگرم در میلی‌لیتر که در PBS تهیه‌شده-بود، از طریق دم تزریق‌گردید؛ در مرحله بعد، موش انتخاب‌شده کشته‌شد و سلول‌های طحال آن به نسبت ۳ به ۱ یا ۱۰ به ۱ با سلول‌های میلومای Sp2/0 با کمک پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG)۵۰ درصد (از شرکت سیگما) ادغام‌شدند؛ بعد از این مرحله، سلول‌ها در محیط انتخابی HAT[1] قرارداده‌شده، در چاهک‌های متعددی تقسیم‌شدند. پس از فیوژن و تقسیم‌بندی هیبریدها در پلیت ۹٦ خانه ای و کشت آنها، غربالگری چاهک‌ها از لحاظ ترشح ایمنوگلوبولین انجام‌گرفت. بدین‌ترتیب‌که پلیت با آنتی‌بادی ضد ایمونوگلوبولین موش پوشانده‌شد. پس از شستشو، سوپ محیط کشت حفرات حاوی هیبرید به خانه‌های پلیت اضافه گردید. از سرم موش ایمن‌شده با آنتی‌ژن با رقت ۱:۱۰۰۰ در بافر شستشو به عنوان کنترل مثبت و محیط کشت کامل(شامل محیط کشت RPMI-1640)(Sigma) حاوی۲ میلی مولار ال--گلوتامین، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میگروگرم بر حسب میلی‌لیتر استرپتومایسین و۱۰ درصد سرم جنین گوساله (FCS) به عنوان کنترل منفی استفاده-گردید. پلیت به مدت ۹۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه و سپس سه تا چهار مرتبه با بافر شستشو، شسته‌شد. به تمام حفرات پلیت میزان ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی کنژوگ‌شده با horseradish peroxidase ضد موش (۱:٤۰۰۰ در بافر شستشو رقیق می‌گردد) افزوده‌شد؛ پس از ۹۰ دقیقه انکوباسیون و شستشو به تمام حفرات بافر TMB[2] افزوده‌شد. پس از توقف واکنش و قرائت جذب نوری در طول موج ٤۵۰ نانومتر هیبریدهای مثبت از لحاظ وجود آنتی‌بادی انتخاب‌شد؛ سپس رقت‌سازی متوالی برای به‌دست‌آوردن کلون سلولی انجام گرفت (به‌طوری‌که در هر چاهک یک سلول هیبریدوما قرار گیرد).

تعیین کلاس و زیرکلاس آنتی‌بادی‌ها: پس از انتخاب چاهک‌های ترشح‌کننده آنتی‌بادی اختصاصی ضد BCG و آنتی‌ژن لیپوآرابینومان مانوزیله، کلاس و زیر-کلاس آنها بررسی‌شدند؛ در این مرحله چاهک‌هایی که آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن لیپوآرابینومان مانوزیله ترشح-می‌کردند شناسایی‌شده. کلاس و زیرکلاس‌های کلون‌ها به روش Capture ELISA مشخص شد؛ بدین‌ترتیب‌که آنتی‌سرم‌های ضد $\gamma_3, \gamma_{2b}, \gamma_{2a}, \gamma_1, \mu, \alpha$ مربوط به ایمونوگلوبولین موش موجود در کیت ISO-2 از شرکت سیگما، با PBS به میزان ۱:۱۰۰۰ رقیق گردید. ۵۰ میکرولیتر در هر چاهک پلیت الایزا افزوده‌شد و پس از پوشاندن چسپ روی پلیت، در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت انکوبه شد. پلیت الایزا سه مرتبه با بافر شستشو (PBS-Tween20) شسته‌شد. مقدار۱۰۰ میکرولیتر از سوپ کشت کلون‌های رشدیافته به هر چاهک اضافه شد (از سرم موش قبل از فیوژن با رقت ۱:۱۰۰۰ و سرم موش ایمن‌شده با رقت۱:۱۰۰۰ به عنوان کنترل مثبت و از سوپ کشت سلول‌های SP2/0 به عنوان کنترل منفی استفاده‌شد)؛ دوباره پلیت الایزا با چسب پوشانده‌شده و انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت برای آن اعمال‌شد. پس از سه مرتبه شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی کنژوگه - HRP-Labeled Goat Anti-Mouse IgG (Fab specific) antibody رقیق‌شده با نسبت ۱:٦۰۰۰ در بافر شستشو، به هر چاهک اضافه شد، به‌طورمجدد انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه و شستشو در سه مرحله انجام‌شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای TMB به هر چاهک پلیت اضافه شد و در دمای اتاق و تاریکی به

1- Hypoxanthine Aminopterin Thymidine

2- 3,3, 5,5-Tetramethylbenzine

Archive of SID

www.SID.ir

مدت ۲۰-۳۰ دقیقه قرارداده‌شد. واکنش با افزودن۵۰ میکرولیتر اسید کلریدریک یک نرمال متوقف شد. جذب نوری در طول موج ٤٥٠ نانومتر قرائت‌شد.

خالص‌سازی آنتی‌بادی منوکلونال با ستون پروتئین A

ابتدا به صفاق ۵ سر موش ۰/۵ میلی‌لیتر **Pristan** و تعداد ۲×۱۰^{۵} سلول زنده از تک‌کلون ترشح‌کننده IgG_3تزریق‌شد، یک هفته بعد، مایع صفاق غنی از آنتی-بادی مورد نظر جمع‌آوری‌گردید و از ستون پروتئین **A** (**Protein A-Sepharose CL-4B**) عبور داده‌شد. براساس این روش، مولکول‌های IgG_3 موجود در نمونه از طریق **F.c** خود به پروتئین **A** متصل شده، با شستشوی ستون، پروتئین‌های اضافه حذف‌می‌شوند؛ سپس با تغییر **pH** اتصال‌های آنتی‌بادی و لیگاند ازبین-رفته، آنتی‌بادی از ستون جدا می‌شود.

وسترن بلات

آنتی‌ژن‌های لیپوآرابینومان مانوزیله و BCG سونیکیت-شده پس از جداسازی روی ژل۱۰ درصد SDS-PAGE براساس یک روش استاندارد (١٤) به غشاء نیتروسلولز منتقل شده، باندهای مربوط با افزودن آنتی‌بادی‌های منوکلونال IgM وIgG_3 (Sigma) و آنتی‌بادی کنژوگه با HRP (Sigma) و محلول رنگزای DAB قابل رؤیت شدند.

نتایج

در فیوژن انجام‌شده ٥٤ کلون به‌دست‌آمد که با میکروسکوپ نوری بررسی‌شدند. نتایج غربالگری هیبریدهای ایجادشده از لحاظ ترشح آنتی‌بادی موشی و نتایج ارزیابی هیبریدهای ترشح‌کننده آنتی‌بادی اختصاصی ضدآنتی‌ژن BCG و لیپوآرابینومان مانوزیله در جدول شماره ۱ نشان‌داده‌شده‌است. از مجموع ٥٤ کلون فقط ۲۰ کلون ترشح‌کننده آنتی‌بادی بودند که از بین آنها به ترتیب کلون‌های H1-3D3 و H2-3B9 علیه آنتی‌ژن BCG و لیپوآرابینومان مانوزیله آنتی‌بادی ترشح‌می‌کردند؛ در این مرحله برای به‌دست‌آوردن کلونی با جذب بالا و ترشح‌کننده آنتی‌بادی، رروی کلون‌های H1-3D3 و H2-3B9، رقت‌های متوالی انجام‌گرفت. بدین‌ترتیب، کلاس و زیرکلاس آنتی‌بادی‌های آنها تعیین‌گردید که نتایج آن در جدول شماره ۲ آورده‌شده‌است. همان‌طورکه مشاهده-می‌شود دو ساب کلون H1-3D3-3E11 وH2-3B9-3G4 زیرکلاس آنتی‌بادی IgM و سه ساب‌کلون H1-3D3-2C9، H2-3B9-3F11 و H2-3B9-1G4 زیرکلاس IgG_3 را تولید-می‌کنند که از بین آنها H1-3D3-3E11 و H2-3B9-1G4 با توجه به اینکه تک‌کلون‌اند و فقط یک نوع آنتی‌بادی ترشح‌می‌کنند، انتخاب‌شدند. پس از انجام مراحل تخلیص، باند مورد نظر با وزن مولکولی ۳۰ کیلو دالتونی مربوط به آنتی ژن ManLAM و BCG سونیکیت-شده با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال IgM و IgG_3 از طریق روش وسترن بلاتینگ تأییدشد (شکل۱).

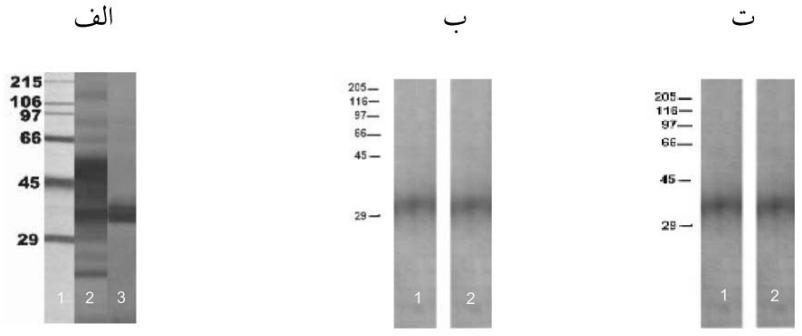
Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: نتایج غربالگری هیبریدهای ایجادشدهٔ به‌دست‌آمده با روش الیزا در طول موج nm ۴۵۰ از لحاظ ترشح آنتی‌بادی موشی و نتایج ارزیابی هیبریدهای ترشح‌کننده آنتی‌بادی اختصاصی ضدآنتی‌ژن BCG و ManLAM

ترشح آنتی‌بادی نام هیبرید	موشی	ضد Man-LAM	ضد آنتی‌ژن BCG	کلاس آنتی‌بادی
H1-1E8	۱/۸	۰/۱۳	۱	γ_1
H1-2G3	۲>	۰/۱۵	۲>	γ_{2a}
H1-3D3	۲>	۲ >	۲ >	γ_1, γ_3, μ
H2-1B9	۲>	۰/۱۸	۰/۳۵	γ_{2a}, γ_{2b} ,
H2-1C2	۱/۳	۰/۱۲	۰/۵	$\gamma_1, \gamma_{2a}, \gamma_{2b}$
H2-2C7	۱	۰/۱۵	۰/۹	γ_{2a}, μ
H2-2E9	۱/۷	۰/۱۶	۰/۸۹	γ_1, γ_{2a}
H2-2G4	۲>	۰/۰۹	۲>	γ_{2a}
H2-3B9	۲>	۲>	۲>	$\gamma_{2a}, \gamma_3, \mu$
H1-3D3	۲>	۰/۰۵	۱/۹	γ_{2a}
H2-3E2	۱/۸	۰/۱۸	۱/۵	γ_{2b}
H3-3F4	۲>	۰/۰۴	۲>	γ_1, γ_3
H3-3F11	۱	۰/۱۹	۰/۷۵	γ_{2b}, μ
H3-3G5	۱/۴	۰/۱۷	۰/۸	γ_1
H3-1B7	۲>	۰/۱۰	۰/۳۵	γ_1
H4-2D11	۲>	۰/۱۵	۲>	γ_{2b}
H4-3B5	۲>	۰/۱۳	۰/۴	γ_{2a}, γ_{2b}
H5-2B10	۱/۷	۰/۱۱	۰/۳۱	γ_{2b}, μ
H5-2F6	۱/۹	۰/۰۸	۰/۹۵	$\gamma_1, \gamma_{2a}, \gamma_{2b}$
H5-4C2	۲>	۰/۱۷	۰/۸۷	γ_{2b}
کنترل مثبت*	۲>	۲>	۲>	$\alpha\ \gamma_1, \gamma_{2a}, \gamma_{2b}, \mu, \gamma_3$
کنترل منفی*	۰/۱۵	۰/۱۳	۰/۱۴	ــــ

* از سرم موش ایمن‌شده با آنتی‌ژن با رقت ۱:۱۰۰۰ در بافر شستشو به عنوان کنترل مثبت و محیط کشت کامل به عنوان کنترل منفی استفاده‌شد.



شکل ۱ (الف): روش SDS-PAGE ۱۰ درصد با شاخص مولکولی(۱) و آنتی‌ژن‌های BCG (۲) ManLAM(۳)؛
ب) انجام وسترن بلاتینگ ضد BCG با استفاده از سوپ‌کشت کلون‌های مولد(۱)IgG_3 و(۲) IgM
ج) انجام وسترن بلاتینگ ضد ManLAM با استفاده از سوپ‌کشت کلو ن‌های مولد (۱)IgG_3 و (۲) IgM.

www.SID.ir

جدول ۲: کلاس و زیرکلاس‌های به‌دست‌آمده از ساب‌کلون‌های H1-3D-3 و H2-3B9 و انجام تست الایزا برای انتخاب ساب کلون‌هایی که به‌طو ر اختصاصی ضد BCG و ManLAM آنتی‌بادی ترشح‌می‌کنند

کلاس و زیر کلاس / کلون	IgM	IgA	IgG3	IgG2b	IgG2a	IgG1	LAM	BCG
H1-3D3-1E8	۰/۱۷	۰/۱۱	۰/۸۷	۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۱۱	۰/۰۱	۰/۳۴
H1-3D3-2E8	۰/۱۳	۰/۱۴	۰/۳	۰/۰۳	۰/۱۳	۱/۱	۰/۰۳	۱/۱۲
H1-3D3-5F6	۰/۱۷	۰/۱۱	۰/۰۹	۰/۱۴	۰/۱۱	۰/۱۳	۰/۱۹	۰/۴۷
H1-3D3-3E11	۱/۹	۰/۱۳	۰/۱۱	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۶	۱/۷	۱/۸۴
H1-3D3-2C2	۰/۰۵	۰/۱	۱/۶	۰/۱۱	۰/۱۳	۰/۱۲	۰/۱۸	۰/۴
H1-3D3-5B6	۰/۱۱	۰/۱۳	۰/۲۵	۰/۱۸	۰/۱۲	۰/۱۶	۰/۱۲	۱/۲۳
H1-3D3-5C2	۰/۰۴	۰/۱۷	۰/۲۲	۰/۱۹	۰/۱۷	۰/۱۸	۰/۱۶	۰/۳۷
H1-3D3-5G3	۰/۱۷	۰/۱۸	۰/۱۵	۰/۱۷	۰/۰۹	۰/۱۶	۰/۱۵	۰/۲۱
H1-3D3-2C9	۰/۱۴	۰/۱۳	۲ >	۰/۰۴	۰/۱۶	۰/۱۴	۱	۱/۱۹
H2-3B9-4E4	۰/۲۸	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۸	۰/۰۳	۰/۱۳	۰/۰۹	۰/۱۵
H2-3B9-3G4	۲>	۰/۰۷	۰/۱۶	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۱۵	۱/۱۳	۱/۸
H2-3B9-3C9	۰/۱۹	۰/۱۲	۰/۸۵	۰/۰۹	۱/۵۶	۰/۱۶	۰/۱۲	۱/۱۱
H2-3B9-1B3	۰/۱	۰/۱۵	۰/۱۹	۰/۱۷	۱/۴۷	۰/۱۱	۰/۱۵	۱/۳
H2-3B9-2D9	۰/۱۳	۰/۱۹	۰/۲۵	۰/۱۵	۰/۱۸	۰/۱۵	۰/۱۴	۰/۳۵
H2-3B9-3F11	۰/۲۵	۰/۱۵	۱/۸	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۷	۱/۱۲	۱/۸
H2-3B9-1G4	۰/۰۷	۰/۱۵	۲>	۰/۱۱	۰/۱۴	۰/۱۸	۱/۴	۱/۶
H2-3B9-1G11	۰/۱	۰/۱۷	۰/۱۴	۰/۰۶	۱/۱۰	۰/۱۶	۰/۱۱	۰/۴۷
کنترل منفی سوپ کشت سلول SP2/0	۰/۱۲	۰/۱۳	۰/۰۹	۰/۱۴	۰/۱۱	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۱۵
کنترل مثبت سرم موش بارقت۱/۱۰۰۰	۲>	۲>	۲>	۲>	۲>	۲>	۲>	۰/۱۲
سرم موش قبل ازفیوژن بارقت۱/۱۰۰۰	۲>	۲>	۲>	۲>	۲>	۲>	۲>	۲>

بحث

در این تحقیق مشخص شد که آنتی‌بادی‌های منوکلونال علیه آنتی‌ژن لیپوآرابینومان مانوزیله از منشأ مایکوباکتریوم بویس BCG با کلاس و زیرکلاس نوع IgM و IgG_3 بوده، توانایی شناسایی آنتی‌ژن ۳۰ کیلودالتونی در BCG و کمپلکس آنتی‌ژنی LAM را دارند. تهیه آنتی‌بادی کلاس IgG_3 نشان‌دهنده تحریک اختصاصی سیستم ایمنی توسط آنتی‌ژن است بااین‌حال برای بررسی وجود آنتی‌ژن مشابه با اپی‌توپ یکسان در گونه‌های مختلف لازم است که واکنش‌های متقاطع با گونه‌های مختلف بررسی‌شود.

تاکنون سلول کامل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، آنتی‌بادی‌های منوکلنال را تهیه‌کرده‌بود که از بین سه آنتی‌بادی 5c11(IgM)، 4F11(IgM) و 9d8(IgG3) فقط 5c11(IgM) ضد LAM است درحالی‌که در این تحقیق، آنتی‌بادی تهیه‌شده ضد آنتی‌ژن LAM با کلاهک مانوزی بوده، از نوع IgG_3 است (۱۹ تا ۲۱).

به‌منظور تحریک سیستم ایمنی هومورال نیاز است که دیواره سلولی بسیار محکم BCG شکسته‌شود برای این منظور ما از BCG سونیکیت‌شده استفاده‌کرده‌ایم؛ در این حالت، سیستم ایمنی موش به‌خوبی ضد آنتی‌ژن لیپوآرابینان مانوزیله که قسمت عمده دیواره را تشکیل-می‌دهد، تحریک می‌شود؛ ازطرف‌دیگر، وجود دیواره متلاشی‌شده BCG نیاز ما را به استفاده از ادجوانت کامل مرتفع‌می‌کند. استفاده از ادجوانت ناقص برای ارائه آنتی‌ژن به مقدار مناسب و در طی زمان مناسب به‌منظور تحریک سیستم ایمنی ضروری است درغیراین‌صورت، آنتی‌ژن در بدن حذف‌شده، پاسخ مناسبی ضد آن داده-

www.SID.ir

نمی‌شود. در این پژوهش از موش BALB/c ماده با سن چهار هفته استفاده‌شد، چون در این سن سیستم ایمنی موش کامل می‌شود.

دو هفته بعد از تزریق، مدت زمان لازم برای ارزیابی سیستم ایمنی تحریک‌شده بعد از اولین مواجه با آنتی‌ژن است. بعد از اطمینان از پاسخ ایمنی ضد آنتی‌ژن، تزریق دوم هم با BCG سونیکیت‌شده انجام‌می‌شود تا سلول‌های خاطره‌ای ایجادشوند؛ در تزریق سوم، ما از آنتی‌ژن لیپوآرابینومانان مانوزیله استفاده‌کردیم تا سلول‌هایی که آنتی‌بادی ضد این آنتی‌ژن را ترشح‌می‌کنند، تکثیرشوند. سلول‌های Sp2/0 که سلول‌های سرطانی BALB/c هستند به دلیل نامیرایی، عدم توانایی در تولید آنتی‌بادی و فقدان آنزیم‌های مسیر سنتز بازیافت نوکلئوتیدها (هیپوگزانتین-گوانین فسفوریبوزیل ترانسفراز (HGPRT) و تیمیدین کیناز (TK)) استفاده‌شدن؛ این سلول‌ها به دلیل فقدان این دو آنزیم در محیط انتخابی HAT ازبین‌می‌روند زیرا علاوه‌بر فقدان مسیر سنتز بازیافت (Salvage) نوکلئوتیدها، مسیر سنتز ازنو (Denovo) آنها توسط آمینوپترین موجود در HAT نیز مهار می‌شود و سلول قادر به همانندسازی نیست ولی درصورتی‌که این سلول‌ها با سلول‌های طحال ادغام‌شوند به دلیل کسب توانایی تولید HGPRT و TK از سلول‌های طحال قادر به ادامه همانندسازی از مسیر سنتز بازیافت نوکلئوتیدها هستند، همچنین توانایی تولید آنتی‌بادی را از سلول‌های طحالی کسب‌می‌کنند. درصورتی‌که سلول طحال با سلول میلوما ادغام‌نشده‌باشد طی زمان می‌میرد.

از محدودیت‌های موجود در این روش می‌توان به پاسخ‌های متفاوت ایمنی (بسته به شدت و ضعف سیستم ایمنی) در افراد مختلف، اپی‌توپ‌های متنوع آنتی‌ژن، عدم اطمینان از جداسازی کامل سلول‌های مولد آنتی-بادی از طحال و تصادفی‌بودن امتزاج سلول مولد آنتی-بادی با سلول میلوما نام‌برد. برای این منظور ما از تعداد ۱۰ موش استفاده‌کردیم که از بین آنها موشی را که پاسخ ایمنی بهتری به تزریق‌های آنتی‌ژن داد، انتخاب-کردیم. پلی اتیلن گلیکول استفاده‌شده در امتزاج سلولی، باید دارای غلظت ۴۰ تا۵۰ درصدی باشد در صورت غلیظ‌تربودن سمی و کشنده است و در صورت رقیق‌تر-بودن راندمان ادغام کاهش‌می‌یابد لازم به ذکر است که موفقیت در این مرحله به مهارت فرد بستگی‌دارد.

شایان توجه است که گونه‌های مختلف مایکوباکتریومی، لیپوآرابینومانان‌های مختلفی دارند حتی در یک گونه، تعدادی متنوع از این آنتی‌ژن وجوددارد. این آنتی‌بادی منوکلنال تهیه‌شده مربوط به سویه p2 BCG ۱۱۷۳ است که با انواع تهیه‌شده به‌صورت تجاری (5c11(IgM)، 4F11(IgM)، 9d8(IgG3)) که از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تهیه‌شده، متفاوت است.

نتیجه‌گیری

به‌منظور مطالعه آنتی‌ژن از نظر ساختمانی و از نظر ایمونولوژیکی ضروری است که این آنتی‌ژن جداسازی و تخلیص شود؛ بدین‌منظور، این آنتی‌بادی را می‌توان در کروماتوگرافی تمایلی استفاده‌کرد؛ درضمن برای بررسی تاثیر بلوکه‌کردن آنتی‌ژن لیپوآرابینومانان مانوزیله در افزایش کارایی واکسن BCG می‌توان از آنتی بادی منوکلنال تهیه‌شده، استفاده‌کرد.

ازآنجاکه آنتی‌ژن لیپوآرابینومان مانوزیله و کاربردهای ذکرشده در مورد استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال در تشخیص سریع بیماری سل، بررسی نقش این آنتی‌ژن روی سطح باکتری در تحریک سیستم ایمنی و وجود اپی‌توپ یکسان این آنتی‌ژن در گونه‌های مختلف بسیار اهمیت‌دارد، پیشنهادمی‌شود بررسی‌های بیشتری پس از تخلیص این آنتی‌بادی در جهت ایجاد کمترین واکنش متقاطع با گونه‌های دیگر مایکوباکتریوم انجام‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1. Anne Lise K, Hestvik, Hmama Z,Av-Gay Y, Mycobacterial manipulation of the host cell, FEMS Microbiology Reviews. 2005;29: 1041-1050.

2. Hunter S.W, Gaylord H, Brennan P.J, Structure and antigenicity of the phosphorelated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tuberculocle bacilli. J Biol Chem 1986; 261:12345-12351.

3. Besra G.S, Morehouse C.B, Rittner C.M, Waechter C J, Brennan P.J Biosynthesis of Mycobacterial Lipoarabinomannan. J OF Biological Chem. 1997; 272: 18460–18466.

4. David J, Gilooly L. Phosphoinositides and phagocitosis. j cell Biology. 2002;155:15-17.

5.Brennan PJ, Tessema, Hamasur B, Structure, function and biogenesis of cell wall of mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis. 2003; 83:91-97.

6. Birch H. L, Alderwick L.J, Biosynthesis of mycobacterial arabinogalactan: identification of a novel α(1→3) arabinofuranosyltransferase Mol Microbiol. 2008; 69: 1191–1206.

7. Hamasur B, Kallenius G, Stefan B. A new rapid and simple method for large-scale purification of mycobacterial Lipoarabinomannan, FEMS Immun and Med Microb. 1999; 24:11-17.

8. Kaur D, Obregon A, Pham H, chatterjee D, Lipoarabinomannan of Mycobacterium: Mannose capping by a multifunctional terminal mannosyltransferase , PNAS. 2008 ;105 :17973–17977.

9. Karakousis, P. C,. Bishai W. R,. Dorman S. E.. Mycobacterium tuberculosis cell envelope lipids and the host immune response. Cell. Microbiol. 2004; 6:105-116.

10.Nigou J , Mamadoud Affe. The phosphatidyl myoinositol anchor of the Lipoarabinomannans from mycobacterium bovis bacillus calmette guerian. Biological chemistry 1997 ;37:23094-23103.

11.Hamasur B, Kallrniys G, Stefan B. Synthesis and immunologic characterisation of Mycobacterium tuberculosis Lipoarabinomannan specific oligosacharide-protein conjugates,Vaccine . 1999; 17:2853-2861.

12.Welin A,Winberg M E,Abdalla H, Sarndahl E, Rasmusson B, Stendahl O, et al. Incorporation of Mycobacterium tuberculosis Lipoarabinomannan into Macrophage Membrane Rafts is a Prerequisite for the Phagosomal Maturation Block, Infect and Immune. 2008; 76:2882–2887.

13. Glatman-Freedman, A, A. Casadevall Z, Dai, W. R. Jacobs, Jr., A. Li, S. L. Morris, J. A. Navoa, S. *et al.* Antigenic evidence of prevalence and diversity of Mycobacterium tuberculosis arabinomannan. J Clin. Microb. 2004;42:3225-3231.

14. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Biotechnology. 1992; 24: 145-149

15. Duval D, Comparison of various methods for monitoring hybridoma cell proliferation. J immunol, Meth, 1990;134:177-185.

16. Weiner LM, Dhodapkar MV, Ferrone S. Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. Lancet, 2009; 373: 1033–40.

17.Kaufmann SH. Tuberculosis and AIDS- a devilish liaison. Drug Discovery Today. 2007;12: 891-893.

18.Mason, P. R., L. Gwanzura, O. Lowe, and A. H. J. Kolk.. The use of monoclonal antibodies to identify mycobacteria grown in culture in Zimbabwe. Tubercle Lung Dis 1993; 74:195–199.

19. Freedman A.G, Martin J M, Riska P F, Bloom B R, Casadevall A, Monoclonal Antibodies to Surface Antigens of Mycobacterium tuberculosis and Their Use in a Modified Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay for Detection of Mycobacteria, J Clinical Microbiology .1996;34:2795–2802.

20. López Y, Falero-Díaz G, Yero D, Solís R.L, Sarmiento M.E, Acosta. A, Antibodies in the protection against mycobacterial infections: what have we learned? ,Procedia in Vaccinology 2010; 2: 172–177.

21.Glatman-Freedman , Monoclonal antibodies to mycobacterium tuberculosis and a modified ELISA assay, (2003) US patent 6,545,130 B2.

Archive of SID

www.SID.ir

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University Seventeenth Year, No.91 February, March 2011

Received: 7/12/2010
Last revised: 11/1/2011
Accepted: 12/1/2011

Production and Purification of Monoclonal Antibody against ManLAM antigen from *Mycobacterium Bovis*

Rasool Moukhah[1*], Mohammad Taghikhani[2], Alireza Khabiry[3], Seyed Ataollah Sadat Shandiz[1]

1. M.Sc Student - BCG Department, Integrated Manufacturing Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
2. Professor - Clinical Biochemistry Department, Medical Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3. Assistant Professor - Parasitology Department, Institute Pasteur of Iran, Tehran, Iran.

E-mail: r_moukhah@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: Lipoarabinomannan mannesylated (Man-LAm) is one of the lipoglycans which forms a considerable percent of *Mycobacterium Bovis* BCG' cellular wall. Considering that generation of monoclonal antibody against ManLAM antigen has many applications, specifically, in order to design the diagnostic kit for rapid diagnosing of tuberculosis, so the main objective of this study was based on production of monoclonal antibody against this antigen.

Materials and Methods: The female BALB/c mice were immunized by regular injections of sonicated BCG and LAM antigen, then after each injection, circulation of generated antibodies were investigated. Spleen lymphocytes of immunized mice and SP2/0 myeloma cells were fused into each other. The cells were selected by HAT medium. Identification and selection of anti-LAM antigen producing clones were performed using ELISA test. After purification of anti-ManLAM, detection of ManLAM antigen and sonicated BCG carried out by western blot technique.

Results: The two H1-3D3, H2-3B9 clones, producing specified antibody were selected which had higher absorbance in ELISA test. The results of Western blotting showed that 30KDa band was related to sonicated BCG and ManLam antigen, using IgG3 IgM antibodies.

Conclusion: The results indicated that using the fusion of hybridoma myeloma cells, it is possible to produce and purify monoclonal antibodies, and before performing diagnostic studies in order to have rapid diagnosing of tuberculosis in patient`s urine, and investigations for immunizing the BCG vaccine, conformation of specified reaction of mentioned antibody will be considered.

Key words: Lipoarabinomannan, *Mycobacterium Bovis* BCG, Monoclonal Antibody

www.SID.ir