Archive of SID

تولید آنتی بادی پلی کلونال بر علیه گلبول های قرمز گوسفند(همولیزین) در خرگوش

جعفر مجیدی[1] مریم بنازاده امیرخیز[2]

تاریخ پذیرش : ۸۲/۸/۲۸

Title: Production of Polyclonal Antibodies against Sheep Red Blood Cells (SRBC) in Rabbit (Hemolysin)

Authors: Majidi J[1], Bannazadeh Amirkhiz M.,[2]

Abstract: Hemolysin has various diagnostic as well as academic applications. Apart from the regular teaching of this test to postgraduate students of different fields like medicine, pharmacy, immunology and biochemistry, the assessment of complement components' function by performing CH50 test is one of its applicability. The goal of this project was to take a step towards self-efficiency with a minimum expense. Hemolysin was produced in a rabbit by using sheep red blood cells (SRBC) as immunogen. Heparinized blood from several sheeps were mixed together (pooled) and then washed with serum physiology. The number of red blood cells was counted with a cell counter, and 1-5x109 numbers of red cells were injected intravenously into the rabbit. The production of polyclonal antibodies of IgM class reached its maximum level after seven to ten days of injection. The blood was withdrawn from the rabbit and its serum, rich in hemolysin, was separated. Hemolysin was titrated for assessment of the hemolysin function and its standardization. To do this and determining in which titer of hemolysin red blood cells only become sensitive and not agglutinated, different dilutions of hemolysin were made, and added to certain volumes of SRBC. The results showed that 2560 dilution of hemolysin was still capable of sensitizing SRBC for surveying function of total complement components. To be sure of hemolysin function at a standard level, CH50 test was performed using test and standard hemolysin at the same time. The results showed that 2560 dilution of test hemolysin, the same as standard hemolysin was capable of making sheep red blood cells sensitive. High titer of test hemolysin in comparison with titer of standard hemolysin clearly indicates that hemolysin produced in our laboratory is equal in potential to the standard. Thus it is a beneficial production and has importance for diagnostic purposes.

Key Words: Polyclonal Antibodies, Sheep Red Blood Cells (SRBC).

1. Assistant Professor, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences.
2. Research Assistant, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences.

۱ _ استادیار مرکز تحقیقات کاربردی دارویی ، دانشگاه علوم پزشکی تبریز .
۲ _ کارشناس مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز.

www.SID.ir

Archive of SID

چکیده

همولیزین کاربرد تشخیصی ـ آموزشی متعدد داشته که از جمله آنها سنجش عملکرد اجزای کمپلمان در قالب انجام تست CH50 و آموزش عملی این تست برای دانشجویان مقاطع کارشناسی ارشد و PhD رشته های مختلف مثل ایمونولوژی و بیوشیمی است. هدف از انجام این طرح تولید همولیزین در راستای خودکفایی با کمترین هزینه اقتصادی می باشد. برای تولید همولیزین در خرگوش از گلبول‌های قرمز گوسفند (SRBC) به عنوان ایمونوژن برای بدن خرگوش استفاده می شود. خون هپارینه از چندین گوسفند تهیه شده و با یکدیگر مخلوط (pooled) گردید. سپس با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد و با استفاده از Cell Counter شمارش گردید و به تعداد ۱۰۹×۵-۱ بطور داخل وریدی (IV) به خرگوش تزریق شد. هفت الی ده روز بعد از تزریق که اوج تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال از کلاس IgM می باشد، خونگیری از خرگوش به عمل آمد و سرم غنی از همولیزین جدا گردید. در راستای سنجش عملکرد همولیزین و استاندارد نمودن آن، همولیزین تیتر گردید. برای تعیین اینکه در چه تیتری از همولیزین، گلبول‌های قرمز فقط حساس می شوند و نه آگلوتینه، رقتهای مختلفی از همولیزین تهیه و روی حجم ثابتی از SRBC اضافه گردید. نتایج نشان داد که تیتر همولیزین تولیدی ۲۵۶۰ بود. یعنی با رقت ۲۵۶۰ نیز قادر به حساس کردن SRBCs به هدف بررسی عملکرد اجزای توتال کمپلمان بود. برای اطمینان از عملکرد در حد استاندارد، تست CH50 با استفاده از همولیزین تولیدی و همولیزین استاندارد (Sigma) به عمل آمد. نتایج نشان داد که همولیزین تولیدی با تیتر ۲۵۶۰ همچون همولیزین استاندارد قادر به حساس کردن گلبول‌های قرمز گوسفند می باشد. تیتر بالای همولیزین تولیدی در مقایسه با تیتر همولیزین استاندارد دال بر اهمیت و اقتصادی بودن محصول تولیدی دارد. بنابراین همولیزین تولیدی یک محصول مفید بوده و در اهداف تشخیصی دارای اهمیت می‌باشد.

گل واژگان: آنتی‌بادی پلی‌کلونال، گلبول‌های قرمز گوسفند.

مقدمه

آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال به آنتی‌بادی‌هایی گفته می‌شود که توسط کلون‌های مختلف بدن میزبان بر ضد مواد بیگانه نسبت به بدن که ایمونوژن نامیده می شوند تولید می گردند. بنابراین گلبول‌های قرمز گوسفند که ویژگی‌های یک ایمونوژن را دارا می باشند در تزریق داخل وریدی به بدن حیوانات مختلف از جمله خرگوش کلون‌های مختلفی از بدن خرگوش را تحریک نموده و منجر به تولید آنتی‌بادی‌های مختلف بر ضد اپی توپ‌های مختلف غشاء گلبول‌های قرمز گوسفند می گردند (۲و۱). آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تولید شده در بدن خرگوش بر ضد گلبول‌های قرمز گوسفند همولیزین نامیده می‌شوند (۳) که در سابق توسط ارلیخ، آمبوسپتور (Ambo Ceptor) اطلاق می‌شد. آمبو به معنی"هر دو "می باشد و از آن جائی که آنتی‌بادی دارای دو نقطه اتصال یکی برای آنتی‌ژن و دیگری برای کمپلمان می‌باشد این نام برای آن بکار برده می‌شد. امروزه همولیزین که همان آنتی‌بادی ضد گلبول‌های قرمز گوسفند از نوع IgM می‌باشد، به جای اصطلاح منسوخ شده آمبوسپتور بکار برده می‌شود (۴ و ۱).

همولیزین کاربردهای آموزشی ـ تشخیصی متعدد در سیستم‌های بیولوژیکی ـ دارویی دارد که از جمله آنها سنجش عملکرد اجزای کمپلمان در قالب انجام تستCH50 برای بیماران دچار نقص ایمنی و یا

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش عملکرد کمپلمان می باشد (۵). بدین ترتیب که همولیزین تیتر می شود و آن رقتی از همولیزین که قادر به حساس کردن گلبول‌های قرمز باشد و بتواند ایمون کمپلکس تشکیل داده، اجزای کمپلمان بیمار مورد نظر را از راه کلاسیک فعال نموده و منجر به تشکیل کمپلکس تهاجم غشایی (Membrane Attack Complex) و لیز گلبول‌های قرمز گوسفند گردد، شاخصی برای ارزیابی عملکرد صحیح اجزای کمپلمان از مسیر کلاسیک بوده و اساس تست CH50 را تشکیل می دهد (۶ و ۷). هدف از انجام این طرح استاندارد نمودن همولیزین است تا جایگزین مشابه خارجی گردیده، گامی در جهت خود کفایی کشور برداشته شود.

مواد و روش کار

برای تولید همولیزین در خرگوش از گلبول‌های قرمز گوسفند (SRBC) به عنوان ایمونوژن برای بدن خرگوش استفاده می شود. برای این منظور خون هپارینه از چند گوسفند تهیه و با یکدیگر مخلوط (pooled) شدند. سپس به نسبت یک به یک در محلول مغذی و نگهدارنده آلسیور مخلوط و حداقل یک هفته در یخچال نگهداری شد (۸ و ۹). پس از شستشوی گلبولهای قرمز pooled شده گوسفند شمارش توسط سل کانتر انجام گرفت و به تعداد ۱۰۹×۵-۱ عدد گلبول قرمز گوسفند به طور داخل وریدی (I.V) و از طریق رگ مارژینال خرگوش تزریق شد (۱۱، ۱۰ و ۱). هفت الی ده روز بعد از تزریق گلبول‌های قرمز گوسفند که اوج تولید آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال برضد گلبول‌های قرمز گوسفند (همولیزین) از کلاس IgM می باشد خونگیری از خرگوش بعمل آمد و سرم غنی از همولیزین جدا گردید. برای تأئید عملکرد همولیزین و مقایسه آن با همولیزین استاندارد خارجی (Sigma)، تیتراسیون همولیزین انجام گرفت. بدین ترتیب که رقت های مختلفی از آن بر روی حجم ثابتی از SRBCs اضافه گردید تا مشخص گردد که در چه رقتی از همولیزین گلبول‌های قرمز آگلوتینه نشده و بلکه فقط حساس می شوند. برای تأئید این امر از سرم بیماران مورد نظر استفاده شد.

نتایج

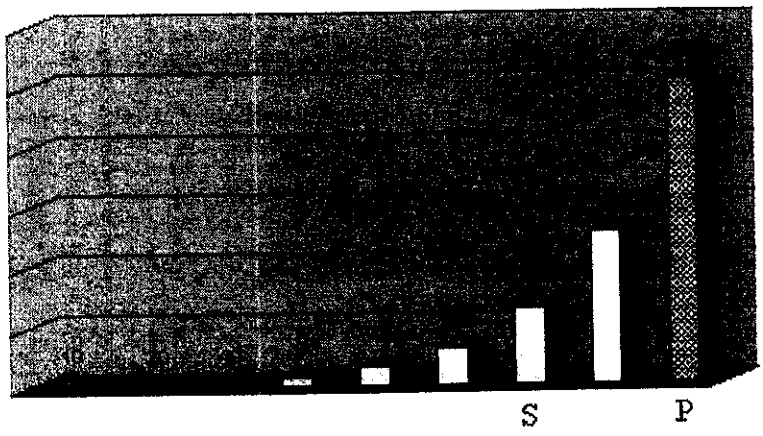
همولیزین تولیدی در خرگوش تعیین تیتر گردید و نتایج تیتراسیون نشان داد که حداقل تیتر ۲۵۶۰ از سرم خرگوش ایمون با گلبول‌های قرمز گوسفند قادر به حساس نمودن گلبول‌های قرمز گوسفند در محیط آزمایشگاهی (In-vitro) همانند تیتر ۶۴۰ از همولیزین استاندارد (Sigma) بود (دیاگرام یک). نتایج این طرح نشان می دهد که از یک خرگوش ایمون با گلبول‌های قرمز گوسفند می‌توان حدود ۱۲۵۰۰۰=۵۰×۲۵۰۰ یعنی ۱۲۵ لیتر همولیزین تولید نمود که بسیار با صرفه و اقتصادی است.

بحث

برای اینکه در گلبول‌های تزریقی گوسفند به خرگوش یک stability پدید آید به مدت یک هفته در یخچال نگهداری شد تا اولاً گلبول‌های قرمز پیر لیز شوند و از بین بروند و در ثانی آن عده از آنتی‌ژن‌های سطحی گلبول قرمز که ثابت نیستند sheding پیدا نموده جدا شوند.

www.SID.ir

Archive of SID



دیاگرام یک: تیتر همولیزین P در مقایسه با همولیزین استاندارد S

برای اطمینان از ایمن شدن خرگوش در برابر گلبول های قرمز گوسفند به عنوان ایمونوژن به هدف تولید همولیزین، تست آگلوتیناسیون مستقیم انجام شد و نتایج نشان داد که افزودن گلبول‌های قرمز گوسفند بر روی سرم خرگوش ایمون با گلبول های قرمز گوسفند منجر به آگلوتیناسیون شد چرا که گلبول‌های قرمز گوسفند ماهیتاً جزو آنتی‌ژن‌های ذره ای بوده و انتظار بدیهی این است که حاصل واکنش آنتی‌بادی با آنتی‌ژن ذره ای منتهی به آگلوتیناسیون شود. پس از اطمینان از ایمون شدن خرگوش به منظور تعیین اینکه در چه رقتی از همولیزین، گلبول‌های قرمز گوسفند آگلوتینه نشده و فقط حساس می‌شوند، تیتراسیون همولیزین انجام شد و حاصل تیتراسیون با استفاده از انجام تست CH50 نشان داد که تیتر ۲۵۶۰ از سرم خرگوش ایمون قادر به حساس کردن گلبول‌های قرمز گوسفند می‌باشد. به دلیل اینکه در این تیتر از همولیزین تشکیل ایمون کمپلکس سبب فعال شدن اجزای کمپلمان از راه کلاسیک شده و منجر به تشکیل MAC و لیز گلبول‌های قرمز گوسفند می‌شد که شاخص برای ارزیابی عملکرد اجزای کمپلمان در بیماران دچار نقص ایمنی است. تیتر بالای همولیزین تولیدی در مقایسه با همولیزین استاندارد (۶۴۰) دال بر اهمیت و اقتصادی بودن محصول تولیدی دارد. با توجه به اینکه از هر خرگوش پس از ایمون شدن می‌توان حداقل ۵۰ میلی لیتر سرم بدست آورد و با علم به اینکه تیتر ۲۵۶۰ از همولیزین تولیدی همانند همولیزین استاندارد عمل می‌نماید، لذا می‌توان از هر خرگوش ایمون حدود ۱۲۵ لیتر همولیزین تولید نمود که بسیار با صرفه و اقتصادی است. برای پایداری همولیزین تولیدی از سدیم آزاید 1 g/L استفاده شد طوری که می توان همولیزین تولیدی را حداقل یک سال با فعالیت تغییر نیافته و همانند روز اول نگه داری نمود (۱۳ و ۱۲). بعلاوه می‌توان همولیزین تولیدی را لیوفیلیزه کرد و به هنگام مصرف در آب مقطر حل نموده و مورد استفاده قرار داد و بدین ترتیب یعنی با لیوفیلیزه نمودن همولیزین پایداری آن از یک سال به چند سال افزایش داده می‌شود که یک مزیت عمده بر همولیزین‌های مایع محسوب می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه گیری

نظر به کاربردهای متعدد آموزشی - تشخیصی همولیزین و در راستای برداشتن گامی بیشتر بسوی خودکفایی می‌توان با صرف هزینه کم نسبت به تولید، پایدار و استاندارد نمودن همولیزین اقدام نمود. بدین ترتیب می‌توان نیاز استان و بلکه کشور را در صورت لزوم تأمین نمود.

References:

1-. Catty D. A practical approach, Antibodies 1988, IRL Press 1: 61.

2- Gupta SK, Arunan K. Generation of antisera-techniques of immunization, use of adjuvants. In: Talwar GP, Gupta SK, ed. A handbook of practical and clinical Immunology. India press, 1992, P: 75.

۳-. رضایی پور کاردوست ر. سرولوژی، ایمونولوژی و ایمونوشیمی آزمایشگاهی، انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، زمستان ۱۳۶۸، صفحات ۱۰۲ - ۱۰۱.

۴- پاکزاد پ. اصول و تفسیر آزمایشهای سرولوژی بالینی، انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، خرداد ۱۳۶۹، صفحات ۱۰۸-۱۰۷.

5- Giclas PC. Quality control in the complement laboratory. In: Nakamura RM, Burek CL, Cook L, Folds JD, Sever JL. Clinical Diagnostic Immunology: Protocols in Quality Assurance and Standardization. USA press, 1998, P: 94-95.

6- Tizard IR. Immunology: an introduction. 2nd ed. Sunders college Publishing, USA press, 1988, P: 287.

7- Henry JB, Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 20th ed. USA press, 2001, P: 908.

8- Mukani WO, Nyangao JNM, Kiamani JK, Omuse JK. Studies on the haemolytic complement of the dromedary camel (camelus dromedaries).I. Classical pathway haemolytic activity in serum. Veterinary Immunology and Immunopathology. 1995, 46: 339.

9- Heyman B, Hobbs MV, Weigle WO. IgM-Mediated Enhancement of In vivo Anti-Sheep Erythrocyte Antibody Responses: Isotype Analysis of the Enhanced Respomses. Cellular Immunology. 1985, 92: 134-141.

10- Hudson L, Hay FC. Practical Immunology. 3rd ed. Black well scientific publications, 1989, p: 265.

11- Bratcher RL. High Responder Rabbits to SRBC, A familial incidence. The Journal of Immunology. 1979, 122 (1):

www.SID.ir

Archive of SID

49-53.

12- Cook L. Principles of Quality Assurance and Quality Control in the Clinical Immunology Laboratory. In: Nakamura RM, Burek CL, Cook L, Folds JD, Sever JL. Clinical Diagnostic Immunology: Protocols in Quality Assurance and Standardization. USA press, 1998, P: 45-53.

13- Nakamura RM. National and International Reference Preparations for the Clinical Diagnostic Immunology Laboratory. In: Nakamura RM, Burek CL, Cook L, Folds JD, Sever JL. Clinical Diagnostic Immunology: Protocols in Quality Assurance and Standardization. USA press, 1998, P: 55.

www.SID.ir