تخلیص و تعیین خصوصیات اینترلوکین٤ نوترکیب و آنتی بادی ضد اینترلوکین ٤ به ترتیب از رده سلولی CHO انتقال یافته با ژن اینترلوکین ٤ و هیبریدومای ترشح کننده آنتی بادی ضد آن

*دکتر جلیل توکل افشاری، **مهرداد غلامزاد، ***علیرضا زمانی

*مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

**گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

*** گروه ایمونولوژی و هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

خلاصه

اینترلوکین۴ (IL-4) سایتوکاینی با فعالیت پلئوتروپیک بوده و عمدتاً توسط لنفوسیتهای T کمک کننده (T helper lymphocyte) سنتز می شود. از جمله مهمترین اثرات آن بر سلولهای مختلف می توان از القاء لنفوسیتهای B انسان در جهت تولید IgE و IgG4 و افزایش ملکولهای سطحی سلول از جمله MHC بر روی لنفوسیتهای B و ماکروفاژها نام برد که این پدیده منجر به افزایش ظرفیت عرضه آنتی ژن در آنها می شود. IL-4 همچنین به عنوان یك فاکتور رشد لنفوسیتهای T به تنهایی و یا با دیگر سیتوکاین‌ها مانند IL-2 در رشد و نگهداری رده های سلولهای لنفوسیتی T در کشت سلولی کاربرد قابل توجهی دارد. منبع تهیه اولیه این سایتوکاین لنفوسیتهای T تحریك شده می باشد. تحقیقات متعددی در مورد استخراج ژن IL-4 و بیان cDNA در سیستمهای بیان ژنی مختلفی از قبیل E.coli، مخمر و اخیراً سلول پستانداران انجام پذیرفته است و در نتیجه با تکثیر هرکدام از این سیستمهای بیان می توان سایتوکاین نوترکیب مورد نظر را به دست آورد. استخراج و تعیین مشخصات اینترلوکین ۴ انسانی نوترکیب که در رده سلولی CHO بیان شده باشد، تاکنون گزارش نشده است. لذا در این تحقیق سعی شد تا با استفاده از سلول پستانداران (CHO) حاوی ژن IL-4 (به عنوان سیستم بیان) و رشد آن در in vitro ، IL-4 انسانی نوترکیب تهیه و پس از خالص سازی، تعیین خصوصیت گردد. سیستم بیان مورد استفاده در این مطالعه، سلول تخمدان هامستر چینی (Chines Hamster Overy) بود که با استفاده از cDNA ژن hIL-4 به داخل آن ترانسفکت شده بود. همچنین برای تهیه آنتی بادی نیز از سلول هیبریدومای ترشح کننده آنتی بادی ضد IL-4 استفاده شد. پس از کشت این سلولها، آنتی بادی ضد IL-4 از محلول رویی کشت هیبریدوما به وسیله پروتئین A خالص و به ژل فعال شده سفاروز متصل گردید و ژل کروماتوگرافی میل ترکیبی ساخته شد. سپس کارآیی روش کروماتوگرافی میل ترکیبی برای جدا سازی IL-4 نوترکیب از روئین کشت حاوی پروتئینهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. از این ستون کروماتوگرافی با میل ترکیبی و دارای لیگاند آنتی IL-4 جهت خالص سازی rhIL-4 استفاده شد. برای بررسی خلوص و شناسایی IL-4 نوترکیب به دست آمده از روش SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ استفاده شد. در SDS-PAGE نمونه خالص شده باندی با وزن مولکولی حدود ۲۷ کیلودالتون را نشان داد. سپس با انتقال این باند به کاغذ نیتروسلولز و با استفاده از آنتی بادی ضد IL-4 و کونژوگه anti-mouse متصل به HRP آزمایش وسترن بلاتینگ انجام شد. این آزمایش حضور rIL-4 در باند خالص شده را تایید می کند.

کلمات کلیدی: اینترلوکین۴، رده سلولیT، سلول CHO، هیبریدوما.

مقدمه

سایتوکاینها، پروتئینها یا گلیکوپروتئینهای محلولی هستند که به وسیله لکوسیتها و در بعضی از موارد توسط سایر انواع سلولها تولید شده و به عنوان رابطین شیمیایی بین سلولها عمل می‌کنند ولی خود به تنهایی مولکول عمل کننده (effector) نیستند(۱۴). اغلب آنها ترشحی هستند اما بعضی می توانند بر روی غشاء سلول عرضه شده و یا درون مخزنی در ماتریکس خارج سلولی نگهداری شوند. سایتوکاینها به گیرنده های ویژه ای بر روی سطح سلول هدف متصل شده و از این طریق باعث انتقال پیام و فعال شدن مسیرهای پیامبر ثانویه می شوند(۱۴، ۱۵). در ایمنی اختصاصی بیشتر سایتوکاینها را لنفوسیتهای T فعال شده تولید می کنند. لذا این مولکولها را

Archive of SID

www.SID.ir

لنفوکاین نیز می نامند. سلولهای T سایتوکاینهای گوناگونی را ترشح می کنند که در تنظیم رشد و دگرگونی (تمایز) جمعیتهای مختلف لنفوسیتی موثر هستند و نقش بسیار مهمی در مرحله فعال شدن پاسخهای ایمنی وابسته به سلول T دارند.

دهه ۱۹۸۰ را بایستی دوران طلایی برای پژوهشهای سایتوکاینها نام برد، زیرا در این دوره بود که به کمك کلون کردن ملکولی و بروز ملکولهای هر سایتوکاین و تولید آنتی بادیهای خنثی کننده کاملاً اختصاصی (مونوکلونال) مشخصات آنها تعیین شد. در دسترس بودن سایتوکاینهای نوترکیب و باز دارنده آنها از این نظر مهم است که شرایطی را برای محققین پدید می آورد تا با کاربرد آنها پاسخهای ایمنی و التهابی را تعدیل نمایند و با دیدی پیش بین، بر دوره بیماری تاثیر گذارند(۱۷، ۱۸).

تا به امروز دسته بندیهای مختلفی برای سایتوکاینها توصیف شده است که از آن جمله دسته بندی Mossman و همکارانش می باشد، آنها دو گروه از سایتوکاینها را شناسایی کردند که هر گروه به وسیله لنفوسیتهای T کمك کننده مختلفی تولید می‌شوند. یك گروه که باعث تقویت ایمنی سلولی و ایمنی التهابی می‌باشند نظیر IFN-γ و IL-2 که توسط سلولهای Th1 ترشح می‌شوند و دسته ای دیگر که به وسیله سلولهای Th2 ترشح می‌شوند و باعث تقویت ایمنی همـــورال با واسطه آنتی بادی می‌شوند (نظیرIL-4، IL-5، IL-6، IL-10، و IL-13) (۱۵، ۱۷).

IL-4 که توسط سلولهای Th2 ترشح می شود سایتوکاینی است که به طور مستقیم اثرات زیادی بر روی سلولهای B دارد، به طوری که باعث افزایش بقا و افزایش بیان مولکول MHC-II و گیرنده IL-4، افزایش آنتی ژن CD40 و زنجیره P_{75} گیرنده IL-2 بر سطح سلول B می شود(۱۸،۱۷). در توضیح نقش IL-4 در ساخت آنتی بادی، این نکته را باید ذکر کرد که IL-4 در تبدیل سلولهای ترشح کننده ایمونوگلبولین موثر بوده و نقش مهمی در تغییر کلاس ایمنوگلبولینها دارد(۱). به خصوص IL-4 باعث می شود که سلولهای B فعال شده در موش مقادیر زیادی IgG1 و IgE تولید کنند. همچنین IL-4 در انسان باعث تولید IgG4 و IgE از سلول فعال شده می گردد(۳ ، ۸).

از آنجا که این سایتوکاین باعث تقویت ایمنی هومورال و کاهش قدرت ایمنی سلولی می‌شود، می توان تصور کرد که نقش مهمی در بروز بیماریهای آلرژیك و همچنین جلوگیری از دفع پیوند دارد. از این رو می‌توان با اندازه‌گیری آن در بدن انسان، شاخص خوبی برای پیش بینی و پیشگیری از بیماریها معرفی نمود(۸). یکی از کاربردهای مهم IL-4 در رشد و نگهداری رده های سلـولی لنفوسیت T می باشد(۱۲ ، ۱۳). در کشت سلولی، IL-4 به همراه دیگر سایتوکاین‌ها نظیر IL-2 به طور روتین مورد استفاده قرار می گیرد. اولین بار IL-4 در محلول رویی کشت سلولهای فعال شده EL-4 گزارش شد و به عنوان عامل تحریك کننده و نگهدارنده رده های سلولی لنفوسیت T (T-cell lines) مورد استفاده قرار گرفت(۲۲).

در سال ۱۹۹۸ اینترلوکین ۴ انسانی نوترکیب (rhIL-4) از محلول رویی رده سلولی کلیه میمون (Cos-7 monkey cells) و سلولهای L929 که ترانسفکت شده با hIL-4 cDNA بودند، به روش‌های کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون (gel filtration chromatography) و HPLC استخراج شدند(۱۶ ، ۲۰). امروزه با توجه به کاربرد وسیع IL-4 در زمینه های درمان، تشخیص و تحقیق، تهیه این سیتوکاین به روش نوترکیب و استفاده از سیستم های مختلف اکسپرسیون انجام می شود (۱۶، ۲۲). تاکنون استخراج و تعیین مشخصات rhIL-4 که در رده سلولهای پستانداران بیان شده باشد، انجام نپذیرفته است.

لذا، هدف از این تحقیق نیز، تخلیص IL-4 نوترکیب به دست آمده از محلول رویی کشت سلول CHO که به وسیله hIL-4 cDNA ترانسفکت شده‌اند و تعیین خصوصیات آن با استفاده از محلول رویی کشت هیبریدومای ترشح کننده آنتی IL-4 می باشد.

مواد و روش کار

Archive of SID

www.SID.ir

کشت سلول CHO و هیبریدوما: سلول CHO (اهدایی از طرف پروفسور هاچینسون، دپارتمان ایمونولوژی، دانشگاه منچستر، انگلستان) ترشح کننده rhIL-4 در محیط کشت Hams'F10 (Gibco-BRL,Scotland) ، حاوی FCS10% (Gibco- BRL,Scotland) دکمپلمانه شده، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین (جابربن‌حیان، ایران) و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین (جابربن حیان، ایران) در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی CO_2 ۵٪ رشد داده شد. محیط محلول رویی آن برای خالص سازیهای مراحل بعد جمع آوری گردید(۲۱).

هیبریدومای ترشح‌کننده آنتی‌بادی IL-4 نیز در محیط RPMI1640 (Gibco-BRL, Scotland) حاوی ۱۰٪ FCS دکمپلمانه، ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین و ۱۰۰ unit/ml پنی‌سیلین کشت داده شد (بر اساس پروتکل پیشنهادی ECACC). هیبریدومای فوق با شماره ECACC92020517 (بانک سلولی اروپا، انگلستان) آنتی بادی مونوکلونال از نوع IgG1 ترشح می‌کند. انکوباسیون سلولها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در حضور CO_2 ۵٪ انجام شد.

تخلیص آنتی بادی ضد اینترلوکین٤: بعد از جمع آوری محلول رویی کشت سلول هیبریدوما از ستونهای کروماتوگرافی میل ترکیبی حاوی لیگاند و پروتئین A برای تخلیص ایمنوگلوبولینها استفاده شد. پروتئین A به واسطه تمایل زیادش برای اتصال به ناحیه Fc ایمونوگلوبولین به آن متصل می گردد (۶ ، ۷ ،۱۹). حدود ۱/۵ گرم ژل سفاروز حاوی پروتئین A (Sigma,USA) در ۱۰ میلی لیتر PBS به مدت یك ساعت قرار داده شد تا ژل متورم شود. سپس این ژل درون یك ستون کروماتوگرافی (از سرنگ ۵۰ سی سی جهت ستون استفاده شده) که از قبل آماده شده بود، پك گردید. ستون کروماتوگرافی با بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH=۸ متعادل شد و حدود ۲ میلی لیتر از بافر فسفات با pH= ۸ به ۴ میلی لیتر مایع رویی کشت اضافه و pH آن به کمك بافر Tris-HCl ۱مولار با pH=۹ به ۸/۱ رسانده شد. نمونه محلول رویی بر روی ستون قرار داده شد و با ۳۰ میلی لیتر بافر NaCl-Gly با pH=۲/۸ به ستون اضافه شد. pH فراکسیونهای به دست آمده به سرعت با NaOH یك مولار خنثی گردید. در ادامه کار جذب فراکسیونهای جمع آوری شده، در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده و نمودار جذب در برابر حجم فراکسیونهای پیك دوم با هم مخلوط و به کمك PEG20000 (Merck) تغلیظ شد.

تهیه ژل کروماتوگرافی میل ترکیبی حاوی لیگاند Anti-IL-4: به عنوان بستر از ژل سفاروز 4B فعال شده با سیانوژن بروماید (Pharmacia, Sweeden) استفاده شد. مقدار ۱ گرم از ژل لیوفیلیزه در محلول HCl ۱ میلی مولار قرار داده شد. سپس ژل به کمك قیف بوخنر به مدت ۱۵ دقیقه با HCl ۱ میلی مولار شسته شد. لیگاند Anti-IL-4 در ۵ میلی لیتر بافر اتصالی حل و به ژل اضافه گردید و مخلوط ژل و لیگاند به مدت ۲۴ ساعت به کمك یك شیکر مخلوط شد. برای حذف لیگاندهای متصل نشده، ژل با بافر اتصالی شسته شد و جهت اشغال گروهای فعال باقی مانده ژل به مدت ۱۶ ساعت (در حرارت ۴ درجه) درون بافر اتانل آمین ۱ مولار با pH=۹ قرار داده شد. سپس ژل با سه دوره متفاوت PBS شسته شد. هر سیکل شامل شستشو با PBS دارای pH=۷ و بافر NaCl-Gly با pH=۲/۸ بود. پس از متعادل کردن ستون ۵ میلی لیتر نمونه گذاری انجام شد. بافر آغازگر بافر فسفات ۲۰میلی مولار با pH=۸ و بافر جداکننده گلایسین ۰/۲ مول کلرید سدیم با pH=۸ بود. حجم فراکسیونها حدود ۱ میلی لیتر بود. فراکسیونهای پیك دوم با هم مخلوط و پس از خنثی سازی در برابر بافر فسفات ۲۰میلی مولار با pH=۷ دیالیز و با PEG20000 در حدود ۲۰ برابر تغلیظ شد(۴ ، ۱۱).

تخلیص rhIL-4 : سلولهای CHO برای مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در محیط کشت Ham's-F10 رشد داده شده و سپس محلول رویی سلولها در شرایط استریل جمع آوری و سانتریفوژ شدند (با سرعت rpm ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه). جهت خالص سازی rhIL-4 ، ابتدا از آنتی بادی ضد BSA (تهیه شده در مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد) جهت جدا سازی FCS محیط کشت استفاده شد. سپس با استفاده از

Archive of SID

www.SID.ir

ژل کروماتوگرافی افینیته حاوی لیگاند anti-IL-4 اقدام به خالص سازی rhIL-4 شد (۴، ۱۰، ۱۱).

تعیین وزن مولکولی پروتئین خالص شده: در طی مراحل مختلف کار برای بررسی خلوص و شناسایی پروتئین مورد نظر از روش الکتروفورز عمودی روی ژل آکریل آمید با درصدهای مختلف، تحت شرایط دناتوره کننده، انجام شد. برای مشخص کردن وزن مولکولی باندهای حاصل، از استانداردهای وزن مولکولی (Sigma, USA) استفاده شد. استانداردهای مورد استفاده شامل ۱۳ پروتئین با وزن مولکولی ۶/۵، ۱۴/۲، ۲۰، ۲۴، ۲۹، ۳۶، ۴۵، ۵۵، ۶۶، ۸۴، ۹۷، ۱۶۶، ۲۰۵ کیلودالتون بود. SDS-PAGE با درصدهای مختلف ژل آکریل آمید (Sigma, USA) انجام شد وRF پروتئینهای استاندارد از رابطه زیر محاسبه شد:

$$RF = \frac{\text{مسافت طی شده توسط پروتئین}}{\text{مسافت طی شده توسط رنگ}}$$

در هر درصد از آکریل آمید، لگاریتم وزن مولکولی در گستره خاصی با RF ارتباط خطی دارد. بنابراین منحنی استاندارد وزن مولکولی (Log MW) در برابر RF ژل ۱۲/۵ درصد و ۱۵ درصد در گستره خطی رسم و با استفاده از آن وزن مولکولی باندهای مربوط به آنتی بادی موشی خالص شده و IL-4 نوترکیب خالص شده تعیین شد.

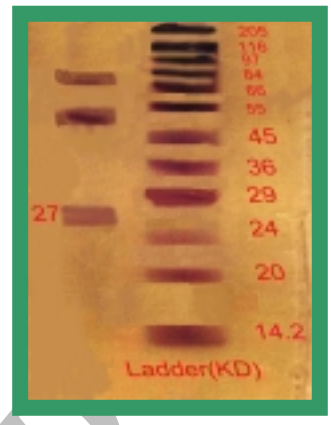
بلاتینگ با ردیابی آنزیمی : برای اثبات وجود rhIL-4 در نمونه خالص شده از روش بلاتینگ استفاده شد. برای انجام این آزمایش ابتدا اجزاء نمونه با روش الکتروفورز SDS-PAGE در ژل ۱۴٪ جدا و سپس باندهای پلی پپتیدی تحت ولتاژ ۵۰ ولت به مدت ۱۶ ساعت به کاغذ نیتروسلولز انتقال یافت. بعد از اشباع کاغذ نیتروسلولز با BSA ۱٪ به مدت ۳۰ دقیقه، کاغذ نیتروسلولز به مدت یك ساعت درون محلول آنتی بادی ضد IL-4 قرار داده شد. بعد از گذشت این زمان و شستشو با BSA ۱٪ جهت حذف پروتئینهای باند نشده، کاغذ نیتروسلولز به مدت یك ساعت درون محلول آنتی بادی ضد آنتی بادی موشی متصل به HRP قرار داده شد در مرحله آخر بعد از شستشوی کاغذ با BSA ۱٪ ، به آن محلول سوبسترا کروموژن ۴-کلرو۱-نفتول (Sigma, USA) اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه درون تاریکی قرار داده شد. در این مرحله به تدریج باند رنگی ظاهر شد. برای توقف واکنش به محیط آب مقطر اضافه گردید.

نتایج

سلولهای تخمدان هامستر چینی(CHO) که به وسیله ژن اینترلوکین ۴ ترانسفکت شده بودند، در محیط های کشت سلولی مختلف مانندHam's-F10 ، RPMI و MEM در شرایطی که قبلاً اشاره شد، کشت داده شد. مناسبترین محیط برای رشد سلولهای CHO، محیط کشت Ham's-F10 حاوی ۱۰ درصد FCS بود. محیط کشت Ham's-F10 در مقایسه با دیگر محیطهای کشت رایج از درصد بالاتری از مواد غذایی، آمینو اسیدها و قندها تشکیل شده است. به طور کلی برای رشد سلولهای پستانداران از محیطهای کشت مقوی تر مانند Ham's-F10 استفاده می شود. سلولهای CHO که از نوع سلـــولهای اتصالی (Anchorage-dependent) می باشند، پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت رشد، سطح فلاسك کشت سلولی ۲۵ سانتی متر مکعب را به طور کامل پوشانده و رنگ محیط کشت را اسیدی نمودند. در این زمان محیط رویی که حاوی IL-4 نوترکیب می باشد، در شرایط کاملاً استریل جمع آوری شد و تا زمان تخلیص در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. با استفاده از آنتی بادی ضد BSA، آلبومین گاوی موجود در محیط که به واسطه اضافه نمودن FCS به محیطهای کشت باعث ناخالصی در rhIL-4 می شود، تخلیص گردید. شکل ۱ نشان دهنده آنالیز SDS-PAGE مایع رویی سلولهای CHO پس از افزودن آنتی BSA و جدا سازی آلبومین گاوی می باشد. درحالی که پس از استفاده ژل افینیتی کروماتوگرافی متصل به لیگاند آنتی IL-4 ، آنالیز SDS- PAGE بیانگر باند مشخص ۲۷ کیلو دالتونی مربوط به rhIL-4 می باشد (شکل ۲).

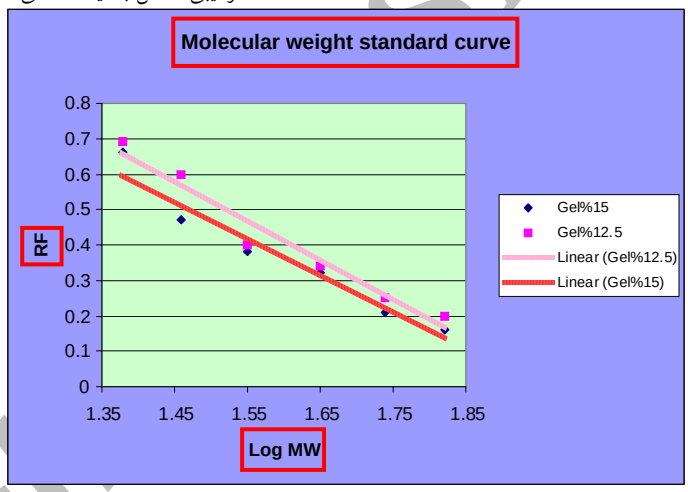
Archive of SID

www.SID.ir

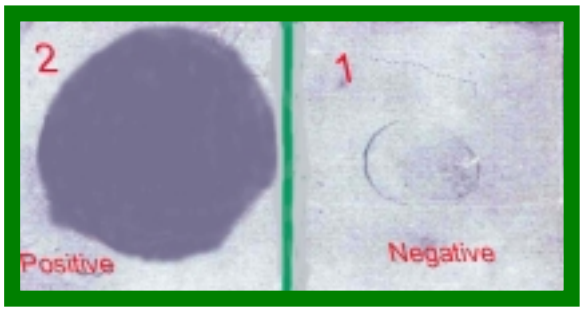


شکل ۱: آنالیز SDS-PAGE (ژل ۱٤ درصد، رنگ آمیزی کوماسی بلو) از محلول رویی کشت رده سلولی CHO ترانسفکت شده با hIL-4 cDNA پس از تخلیص با آنتی BSA. استاندارد وزن مولکولی و rIL-4 با وزن مولکولی ۲۷ کیلو دالتون.

شکل ۲: آنالیز SDS-PAGE (ژل ۱٤٪ و رنگ آمیزی کوماسی بلو) از محلول رویی کشت رده سلولی CHO ترانسفکت شده با hIL-4 cDNA ۱) بدون تخلیص و ۲)، پس از تخلیص با روش کروماتوگرافی میل ترکیبی متصل به لیگاند آنتی IL-4 و ۳) استاندارد وزن مولکولی.



شکل ۵: منحنی استاندارد وزن مولکولی با استفاده از روش الکتروفورز عمودی بر روی ژل آکریل آمید با درصدهای مختلف، تحت شرایط دناتوره کننده. استانداردهای مورد استفاده شامل ۱۳ پروتئین با وزن های مولکولی بین ٦/٥ تا ۲۰۵ کیلو دالتون بوده است.



شکل ۳: آنالیز دات بلاتینگ با ردیابی آنزیمی HRP و سوبسترا کروموژن ٤-کلرو ۱- نفتول.
۱- negative sample حاوی محیط کشت قبل از مورد استفاده قرار گرفتن در کشت سلولی سلولهای CHO، ۲- rIL-4 به دست آمده پس از کشت سلولهای ترانسفکت شده CHO به وسیله hIL-4 cDNA

شکل ۴: آنالیز وسترن بلاتینگ بر روی کاغذ نیترو سلولز و با ردیابی آنزیم HRP و سوبسترا کروموژن ۴ کلرو ۱- نفتول. نمونه شامل rIL-4 تخلیص یافته از محلول رویی کشت رده سلولی ترانسفکت شده با hIL-4 cDNA می باشد. آنتی بادی مونوکلونال تخلیص یافته از کشت هیبریدومای ترشح کننده IL-4 پس از خالص سازی با پروتئین A است.

www.SID.ir

تعیین وزن مولکولی پروتئین خالص شده بر اساس روش SDS-PAGE انجام شد و شکل ۵ نشان دهنده منحنی استاندارد وزن مولکولی با استفاده از پروتئینهای با وزنهای مولکولی متفاوت را نشان می دهد. همچنین وجود یك باند غالب که تمامی الگوی الکتروفورز SDS-PAGE را تحت الشعاع قرار داده است، بیانگر ناخالصی های موجود در مایع رویی کشت سلول CHO می باشد که عمدتاً مربوط به آلبومین گاوی است. همچنین آنتی بادی مونوکلونال ضد IL-4 نیز از محیط رویی کشت سلولهای هیبریدوما که پس از رشد کامل و در مراحل نهایی مرگ سلول جمع آوری شده بود با استفاده از ژل حاوی پروتئین A تهیه گردید. پروتئین A با توجه به میل ترکیبی بالا برای بخش Fc ایمونوگلوبولین IgG ، برای خالص سازی منوکلونال آنتی بادیها از مایع رویی کشت سلولی به طور وسیع استفاده می شود. در مرحله اول، آزمایش دات بلاتینگ وجود rIL-4 در روئین کشت سلول CHO حاوی cDNA اینترلوکین۴ را تایید نمود (شکل۳). در ادامه با استفاده از تکنیك وسترن بلاتینگ، وجود rhIL-4 تخلیص یافته با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی و آنتی IL-4 تخلیص یافته، خصوصیات IL-4 نوترکیب مشخص گردید (شکل۴). در طی مراحل مختلف خالص سازی، سعی بر کاهش محتوای پروتئین رویی کشت شد که حاوی مقدار زیادی آلبومین گاوی (به واسطه افزودن FCS) می باشد. برای این کار از آنتی بادی ضد BSA استفاده گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که کاهش محتوای پروتئینی مایع رویی کشت قبل از انجام کروماتوگرافی میل ترکیبی باعث بهبود کیفیت جداسازی می گردد (شکل۲و۳).

بحث

rIL-4 کاربرد وسیعی در تحقیقات، به ویژه در رشد و نگهداری رده لنفوسیتهای T دارد (۱، ۱۴، ۱۵، ۱۷، ۱۸). برای تهیه rIL-4 از سیستم های بیان متفاوتی تاکنون استفاده و گزارش شده است (۵، ۷، ۲۱) که عملکرد بیولوژیك آنها در مورد کاربردهای گوناگون به طور کامل تعریف نشده است. اما تعیین مشخصات rIL-4 که در سلول CHO بیان شده باشد، تاکنون گزارش نشده است(۱۳،۲۰). استفاده از سیستم اکسپرسیون در سلولهای پستانداران نظیر CHO به دلیل بازده بالای پروتئینی از توجه خاصی برخوردار است(۲، ۲۱). در این تحقیق، با استفاده از آنتی IL-4 مشخصات IL-4 نوترکیب، خالص شده از سلولهای ترانسفکت شده به وسیله rhIL-4 cDNA در رده سلول CHO نشان داده شد. وزن مولکولی rIL-4 خالص شده به کمك روش SDS-PAGE حدود ۲۷ کیلودالتون تعیین گردید(۱۵). توضیح اینکه Le و همکاران (۱۳) با استفاده از سلول COS-7 وزن مولکولی rIL-4 استخراج شده را حدود ۱۸ کیلودالتون ذکر کرده اند که این تفاوت وزن مولکولی به دست آمده به علت استفاده از سلولهای متفاوت بیان کننده ژن و تفاوت میزان گلیکوزیلاسیون پروتئین نوترکیب بوده و هیچ تاثیری در فعالیت بیولوژیك آن ندارد(۱۳، ۲۲). همچنین نوع دیگری از rhIL-4 از مایع رویی کشت رده سلولی L929 ترانسفکت شده با rhIL-4 cDNA گزارش شده است (۱۱). پروتئینهایی با وزن مولکولی ۲۵-۲۲ کیلو دالتون برای rhIL-4 گزارش شده است. در اینکه آیا تفاوت در وزن مولکولی rIL-4 تاثیری در عملکرد بیولوژیك این سیتوکاین دارد، گزارشی وجود ندارد. Todd و همکاران (۲۲) نشان دادند که قابلیت رشد rIL-4 که از رده سلولی L929 استخراج و خالص شده است، برای رده لنفوسیت های T به میزان ۲۵ درصد در مقایسه با rIL-4 استخراج شده از رده سلول COS-7 کاهش دارد. بنابراین به این نکته می‌توان اشاره کرد که نوع rIL-4 در فعالیتهای بیولوژیك ذکر شده برای این سیتوکاین موثر است. همچنین باید به این نکته اشاره نمود که در تحقیقات مربوط به کشت سلولهای لنفوسیتی، استفاده از نوع rIL-4 که بیشترین قابلیت برای رشد نگهداری رده سلولی را دارد، ضروری است.

همچنین نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که روش کروماتوگرافی میل ترکیبی جهت تخلیص پروتئینهای نوترکیب دارای کارآیی مناسب می باشد(۶، ۷). در

Archive of SID

www.SID.ir

خالص سازی rIL-4 روشهای متفاوتی، از جمله استفاده از کروماتوگرافی تعویض کاتیونی (cation-exchange chromatorgraphy) بر روی ژل S سفاروز (۱۳، ۲۲) و روش HPLC (۲۱) به کار رفته است. در مقایسه با روش های ذکر شده، روش کروماتوگرافی میل ترکیبی که در این تحقیق به کار رفته، ضمن داشتن اختصاصیت بالا، بسیار ساده بوده و در طی مراحل جداسازی هیچ آسیبی نیز به پروتئین نمی رساند. در مقالات و منابع موجود، روشهای مختلفی برای جداسازی پروتئینهای نوترکیب از مایع رویی کشت سلول پستانداران که با ژن سازنده پروتئین مورد نظر ترانسفکت شد، ارائه گردیده است. از روشهای یاد شده می توان از ترسیب با سولفات آمونیوم، کروماتوگرافی تعویض آنیونی یا کاتیونی و همچنین کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و حتی FPLC و HPLC فاز معکوس(reverse phase HPLC) نام برد(۲، ۵). در این مطالعه سعی شد تا با استفاده از آنتی بادی ضد IL-4، روش ساده و یك مرحله ای طراحی شود که توانایی جدا کردن این ماده از مایع رویی کشت، حاوی انواع مختلف پروتئینها را داشته باشد. نتایج بررسی ما نشان می دهد در صورتی که از ستونهای بزرگتر حاوی مقادیر بیشتر ژل، دارای لیگاند (آنتی بادی ضد IL-4) استفاده شود، این روش ضمن داشتن اختصاصیت بالا دارای کارآیی خوبی برای جداسازی این پروتئین نوترکیب می باشد. اگر چه این روش قدرت بازیافت بالایی همانند روش HPLC که گاهی تا ۹۵٪ می رسد، را ندارد ولی به لحاظ ساده و سریع بودن روش و بازیافت مناسب آن، در بسیاری از موارد روش مناسبی است. در مجموع با توجه به دامنه وسیع فعالیتهای بیولوژیك IL-4 و استفاده روتین آن در نگهداری و رشد رده لنفوسیتها، مقایسه فعالیت بیولوژیك انواع rIL-4 که در سیستم های متفاوت بیان شده اند، ضروری می باشد.

References:

1. Bergstedt-Lindqvist S., Moon H. B., Persson U., 1998, Interleukine 4 instructs uncommitted B-Lymphocytes to switch to IgG1 and IgE, Euro. J. Immunol., 18: 1073-2077.
2. Cabrillat H., Galizzi J. P., Djossou O., Arai N., Yokota T., Banchereau J., 1997, High affinity binding of human interleukin 4 to cell lines, Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 995-1001.
3. Coffman R. L., Lebman D. A., Rothman P., 1993, The mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching, Adv. Immunol., 54: 229-270.
4. Cuatrecasas P., Anfinsen C. B., 1971, Affinity chromatography, Meth. Enzymol., 22, 345-378.
5. Galizzi J. P., Zuber C. E., Harada N., Gorman D. M., Djossou O., Kastelein R., 1995, Molecular cloning of a cDNA encoding the human interleukin 4, Int. Immunol., 2, 669-675.
6. Goding J. W., 1987, Use of Staphylococcol protein A as an immunological reagent, J. Immunol. Methods., 20, 241-253.
7. Harada N., Castle B. E., Gorman D. M., Itoh, N., Schreurs J., Barrett R. L., Howard M., 1997, Expression cloning of a cDNA encoding the murine interleukin 4 based on lingand binding, Prod. Natl. Acad. Sci., 87, 857-861.
8. Hsieh C. S., Heimberger A. B., Gold J. S., 1992, Differential regulation of T-helper phenotype development by IL-4 and IL-10 in an αβ-trangenic system, Proc. Natl. Acad. Sci. (wash.), 89: 6065-6069.
9. Isakson P. C., Pure E., Vitetta E. S., 1998, T cell derived B-cell differentiation factor(s). Effect on the isotype switch of murine B cells, J. Exp. Med., 155: 734-748.
10. Johnson G., Garvey J. S., 1977, Improved methods for separation and purification by affinity chromatography, J. Immunol. Methods, 15, 29-37.
11. Langone J. J., 1982, Protein A of Staphylococcus aureus and related immunoglobulin receptors produced by streptococci and pneumococci, Adv. Immunol., 32, 157-252.
12. Le Gros G., Ben-Sasson S. Z., Conrad D. H., 1990, Generation of interleukine 4 (IL-4) producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4 producing cells, J. Exp. Med., 172: 921-929.
13. Le H. V., Labdon J. E., Mays-Ichinco C. A., Syto R., Arai N., Tratta P., 1988, Isolation and characterization of multiple variatnts of recombinant human interleukin 4 expressed in mammalian cells, J. Biol. Chem., 22, 10817-10823.
14. Mosmann T., Zlotnik A., 1990, Multiple function of Interleukine 4 and it's role in immune regulation, in growth factors differentiation factors and cytokines (A. Habenicht) Springer-verlag, Heidelberg, Berlin. pp129-146.
15. Mosmann T. R., Cherwinski H., Bond M. W., 1986, Two types of murine helper T cell clones. I. Definition according to profile of lymphokine

Archive of SID

www.SID.ir

activities and proteins, J. Immunol., 136: 2348-2357.
16. Pippin B. A., Rosentein M., Jacob W. J., 1994, Local IL-4 delivery enhances immune reactivity to murine tumors: gene therapy in combination with IL-2, Cancer Gen. Ther., 9: 35-42.
17. Salgame P., Abrams J. S., Clayberger C., 1993, Differing Lymphokine profiles of functional subsets of Human CD4 and CD8 T cell clones, Science, 254: 279-282.
18. Spits H., IL-4: Structure and function, CRC press Inc, Bica Raton, Fl., 1992, pp25-31.
19. Surokia A., Pain D., Khan M. I., 1982, Protein A: Nature's universal anti-antibody, Trends Biochem. Sci., 7, 74-76.
20. Swain S. L, Huston G., Rogers M., 1998, IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors, J. Immunol., 145: 3796-3806.
21. Szabo S. J., Gold J. S., Muphy T. L., 1999, Identification of cis-acting regulatory elements controlling interleukin-4 gene expression in T cells, Mol. Cell. Biol., 13, 4793-4805.
22. Todd M. D., Grusby M. J., Lederer J. A., 1993, Transcription of the interleukine4 gene is regulated multiple promoter elements, J. Exp. Med., 177: 1663-1674.
23. Wofsy L., Burr B., 1969, The use of affinity chromatography for the specific purification of antibodies and antigens, J. Immunol., 103, 380-382.

Archive of SID

www.SID.ir