تولید آنتی‌بادی مونوکلونال علیه آنزیم آلکالین فسفاتاز

محمدمهدی افتخاریان M.Sc.☆، سیدمحمد مؤذنی Ph.D.☆♦، علی‌اکبر پورفتح‌الله Ph.D.☆

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمونولوژی

★ دانشگاه علوم پزشکی همدان، گروه میکروبیولوژی

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمونولوژی

چکیده

* **هدف:** تولید آنتی‌بادی مونوکلونال علیه آنزیم آلکالین فسفاتاز به منظور استفاده در روشهای ایمونوهیستوشیمی و ایمونوسیتوشیمی مثل روش آلکالین فسفاتاز - آنتی‌آلکالین فسفاتاز (APAAP).

* **مواد و روشها:** در این پژوهش ابتدا موشهای Balb/c ماده تحت تزریقات منظم آنزیم آلکالین فسفاتاز قرار گرفتند و تیتر آنتی‌بادی تولید شده پس از هر تزریق مورد بررسی قرار گرفت. پس از اطمینان از ایمن‌شدن موشها بین لنفوسیتهای طحالی آنها و سلولهای میلومای Sp2/0 باکمک پلی‌اتیلن گلیکول (PEG، ۵۰درصد) امتزاج برقرار شد و هیبریدوماهای تولید شده به کمک محیط انتخابی HAT جداسازی شدند. بر روی مایع رویی تمام کلونهای هیبریدومائی تشکیل شده، آزمون الایزا انجام گرفت تا کلونهای مولد آنتی‌بادی علیه آلکالین فسفاتاز شناسایی و انتخاب شوند. کلونهای تولیدکننده آنتی بادی باکمک روش آخرین حد رقت (Limiting Dilution) (دو مرتبه) به صورت زیرکلون خالص در آمده و توسعه یافتند. چون پس از تشکیل کمپلکس APAAP، فعالیت آنزیمی باید حفظ شود تا بتوان از این کمپلکس در تکنیکهای ایمونوهیستوشیمی بهره برد، لذا اتصال آنتی‌بادی نباید باعث توقف فعالیت آنزیمی گردد. به منظور بررسی این موضوع، آزمایش الایزایی طراحی شده و مایع روئی کشت کلونهای هیبریدومائی انتخاب شده، توسط روش الایزای مذکور، بررسی شد. درمرحله بعد جهت تولید آنتی‌بادی با غلظت زیاد، هیبریدوماها به صفاق موش تزریق شدند و پس از تشکیل تومور، مایع صفاقی جمع‌آوری گردید. نهایتا آنتی بادیهای تولیدی توسط هیبریدوماهای بدست آمده تعیین ایزوتیپ شدند.

* **یافته‌ها:** در ۶ بار فیوژن، ۱۰۴ کلون هیبریدومائی بدست آمد که از این تعداد، ۲ کلون A1G8 و A1G9 که مولد آنتی‌بادی اختصاصی و واجد جذب بالا در آزمایش الایزا بودند، انتخاب شد. پس از اجرای روش آخرین حد رقت نهایتاً دو زیرکلون A1G8F7 و A1G9G3 که بصورت تک‌کلون درآمده بودند انتخاب گشتند. آزمایشات الایزا نشان داد که آنتی بادیهای تولیدی توسط هیبریدوماهای بدست آمده پس از اتصال به آنزیم، تاثیری بر فعالیت آن نگذاشته و به عبارت دیگر به ناحیه فعال آنزیم متصل نمی‌شوند. نتایج الکتروفورز مایع صفاقی موشهائی، که در آنها به وسیله هیبریدوماهای تولیدی، القاء تومور شده بود، باند پروتئینی مشخصی در ناحیه γ را نشان داد. آزمایشات مربوط به تعیین کلاس و زیرکلاس آنتی‌بادیهای تولید شده توسط کلونهای هیبریدومایی نشان داد: که هر دو آنتی‌بادی مذکور از کلاس IgG، زیرکلاس IgG1 و دارای زنجیره سبک κ هستند.

* **نتیجه‌گیری:** چون آنتی‌بادیهای تولید شده توسط کلونهای هیبریدومائی بدست آمده، از کلاس IgG بوده و روی فعالیت آنزیمی نیز تأثیری ندارند. لذا برای تشکیل کمپلکس APAAP مناسب به نظر می‌رسند. سایر مراحل این پژوهش تا تشکیل این کمپلکس و استفاده عملی از آن در تکنیکهای ایمونوهیستوشیمی در حال انجام است.

گل واژگان: آنتی‌بادی مونوکلونال، آلکالین فسفاتاز - آنتی‌آلکالین فسفاتاز، هیبریدوما

مقدمه

امروزه تکنیکهای ایمونوهیستوشیمی و ایمونوسیتوشیمی در تحقیقات پایه و تشخیص‌های بالینی، نقش مهمی ایفا می‌کنند (۱، ۲، ۳، ۴، ۵). به عنوان 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 (۴، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰). در واقع هدف از این تکنیکها، عموماً این است که آنتی‌ژن خاصی را در بافت، شناسایی و ردیابی کنند و حتی موقعیت آن را مشخص نمایند (Localization). برای نیل به این اهداف، حضور یک ردیاب یا ظاهرساز ضروری به‌نظر می‌رسد. این ردیابها می‌توانند، مواد فلوئورسنت، آنزیمها، مواد رادیواکتیو و... باشند.

یکی از مهمترین تکنیکهای ایمونوهیستوشیمی و ایمونوسیتوشیمی، سیستم آلکالین فسفاتاز-آنتی آلکالین فسفاتاز (APAAP) است که در آن، از آنزیم آلکالین فسفاتاز و واکنشش با **سوبسترا**، جهت ردیابی آنتی‌ژنها استفاده می‌شود (۱۱). در این روش به وسیله یک آنتی بادی پلی کلونال بر علیه ایمونوگلوبولین موشی، بین آنتی بادی مونوکلونال اولیه که بصورت اختصاصی آنتی ژنهای بافتی را تشخیص می‌دهد و کمپلکس APAAP اتصال بر قرار می‌گردد (۱۲). کمپلکس APAAP در واقع همان کمپلکس ایمنی است که حاصل اتصال آلکالین فسفاتاز به آنتی‌بادی مونوکلونال ضدش است. با افزودن سوبسترا که تحت تاثیر واکنش آنزیمی به محصول رنگی تبدیل شده و رسوب می‌نماید محل تجمع آنتی ژن در بافت ردیابی می‌گردد.

برای تولید کمپلکس APAAP به آنتی بادی مونوکلونال بر علیه آنزیم آلکالین فسفاتاز نیاز است. آنتی‌بادیهای مونوکلونال تفاوتهای زیادی با آنتی‌سرم‌ها (آنتی‌بادیهای پلی‌کلونال) دارند. این ترکیبات بیولوژیک که در حوزه‌های مختلف علوم بیولوژیک دارای کاربردهای فراوانی هستند، توسط سلول‌های هیبریدومائی تولید شده وتمام ملکولهای آن از نظر ویژگی و افینیتی، ثابت و یکنواخت هستند (۱۳). این خصوصیت آنتی بادیهای مونوکلونال باعث می‌شود که کمپلکس APAAP تولید شده یکنواخت بوده و نتایج آزمایشات مختلفی که با آن انجام می‌شود، تکرارپذیر باشد. هدف این پروژه کاربردی، ایمونیزه کردن (Immunization) موشهای Balb/c با آنزیم آلکالین فسفاتاز و تولید آنتی‌بادیهای مونوکلونال علیه این آنزیم بود تا در مراحل بعد، پس از تعیین افینیتی و تخلیص این پادتن، آن را بتوان در تشکیل کمپلکس APAAP بکار برد.

مواد و روشها

* الف) ایمن‌سازی موشها

در هر نوبت ایمن‌سازی ۵ سر موش Balb/c ماده با سن ۴ الی ۵ هفته (تهیه شده از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی) علیه آنزیم آلکالین فسفاتاز روده‌ای گاو (Type VII A)، (Sigma آمریکا) ایمن شدند. برای ایمن‌سازی ۵ میکروگرم از آنزیم آلکالین فسفاتاز همراه با ادجوانت کامل فروند (Sigma، آمریکا) به صورت داخل صفاقی به هر یک از موشها تزریق گردید. یک ماه بعد همان مقدار آنتی‌ژن همراه با ادجوانت ناکامل فروند (Sigma، آمریکا) به صورت داخل صفاقی به هر یک از موشها تزریق شد (۱۴ با اندکی تغییرات). ۲۰ روز بعد از هر تزریق آنتی‌ژنی، از طریق شبکه مویرگی چشم موشها خونگیری به عمل آمد و تیتر آنتی‌بادی علیه آنزیم آلکالین فسفاتاز در سرم موشها با روش الایزا اندازه گیری گردید. موشهائی که از پاسخ ایمنی خوبی بر خوردار بوده و دارای تیتر بالای آنتی‌بادی علیه آنزیم مذکور بودند جهت انجام عمل ادغام سلولی مورد استفاده قرار گرفتند. سه روز قبل از انجام ادغام سلولی نیز مقدار ۴ میکروگرم از آنتی‌ژن به صورت داخل وریدی به موشها تزریق گردید.

* ب) انجام آزمون الایزا

جهت انجام آزمایش الایزا ۵۰ میکرولیتر از محلول ۵μg/ml آنزیم آلکالین فسفاتاز در بافر فسفات سالین (PBS) در چاهکهای پلیت الایزا (NUNC، دانمارک) ریخته شده و مدت ۱۸ ساعت در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از شستشوی کامل چاهکها با محلول PBS حاوی ۰/۰۵درصد توین ۲۰ (Tween 20، Sigma، آمریکا) (PBS-T)، سرم موشها و یا مایع رویی کشت سلولها به صورت سریال رقت در محلول PBS-T و به مقدار ۵۰μl به چاهکها اضافه شد و مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از شستشوی مجدد حفره‌ها با PBS-T، از رقت $\frac{1}{4000}$ آنتی‌بادی بزی ضد ایمونوگلوبولین موش، کونژوگه شده با آنزیم پراکسیداز در PBS-T، (HRP conjugated goat anti-mouse immunoglobulin) (Immunotech، جمهوری چک) مقدار ۵۰μl به حفرات پلیت اضافه و مجدداً به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از شستشوی مجدد پلیت‌ها با PBS-T محلول سوبسترای OPD(Orthophenylen diamine) (Sigma، آمریکا) در بافر فسفات سیترات حاوی آب اکسیژنه به حفرات اضافه شد و پس از ظهور رنگ و توقف واکنش با اسید سولفوریک ۲۰درصد، میزان جذب نوری (optical density) با دستگاه قرائتگر الایزا (ELISA reader) (Labsystem، دانمارک) و با استفاده از فیلتر ۴۹۲ نانومتر قرائت شد (۱۴ و ۱۵ با بعضی تغییرات). لازم به ذکر است که رقت مناسب آلکالین فسفاتاز، سرم موش و آنتی‌بادی کونژوگه طی آزمایشات اولیه و با استفاده از سریال رقت تعیین شده بود. در تمام این آزمایشات از سرم موش ایمن و غیرایمن، بترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شد.

* ج) ادغام سلولی

چند روز قبل از انجام فیوژن سلولی، نسبت به کشت سلولهای میلومای SP2/0 (تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران) اقدام گردید. 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 استفاده گردید.

بدنبال اطمینان از ایمن شدن موشها، به یکی از موشها که بالاترین تیتر آنتی‌بادی را تولید کرده بود، آنتی‌ژن به صورت داخل وریدی تزریق گردید و ۳ الی ۵ روز بعد با برداشتن طحال، سوسپانسیون

سلولهای طحالی موش به صورت استریل در محیط کشت DMEM (Sigma، آمریکا) تهیه گردید. بعد از شستشوی کامل سلولهای طحالی با محیط کشت DMEM فاقد سرم جنین گاو این سلولها با نسبت $\frac{5}{1}$ با سلولهای SP2/0 مخلوط شده و با استفاده از محلول ۵۰درصد پلی‌اتیلن گلیکول (PEG, MW=3000-3700 Sigma)، آمریکا) ادغام سلولی انجام گرفت. نهایتاً سلولها در محیط کشت DMEM حاوی ۲۰درصد سرم جنین گاو (FCS) (Sigma، آمریکا) و (Hypoxanthine, Aminopterin, Thymidine) (HAT) (Gibco، انگلستان) به صورت سوسپانسیون درآمده و در حفرات پلیت کشت ۹۶ خانه‌ای (NUNC، دانمارک) و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد CO2 کشت داده شدند. حفرات پلیت کشت به صورت روزانه با استفاده از میکروسکوپ معکوس (Nikon، ژاپن) جهت مشاهده تشکیل کلون سلولی بررسی شد (۱۴ و ۱۶ با اندکی تغییرات).

* د) انتخاب کلونها

پس از رشد کلونهای هیبریدوما در محیط حاوی HAT و زرد شدن محیط کشت از مایع رویی کشت آن دسته از حفراتی که در آنها کلون سلولی رشد کرده بود، نمونه‌برداری انجام شد. مایع روئی کشت سلولها جهت شناسائی کلونهای مثبت ترشح کننده آنتی‌بادی ضدآلکالین فسفاتاز توسط آزمایش الایزا بررسی شد. سلولهای موجود در حفراتی که مایع روئی کشت آنها در آزمایش الایزا حاوی آنتی‌بادی علیه آنزیم آلکالین فسفاتاز بودند، انتخاب شده و جهت انجام مراحل بعدی بر روی محیط کشت DMEM حاوی HT (Hypoxanthine, Thymidine) (Gibco، انگلستان) با ۲۰ درصد سرم جنین گاو تکثیر شدند (۱۴، ۱۵، ۱۶).

* هـ) تک کلون‌سازی هیبریدوماها با استفاده از روش آخرین حدرقت (Limiting dilution) و توسعه آنها

برای تک‌کلون کردن کلونهای به دست آمده، سوسپانسیون سلولی حاوی ۲۰ cell/ml در محیط کشت ساخته شد، بصورتیکه با اضافه نمودن ۵۰ میکرولیتر در چاهکهای پلیت کشت ۹۶ خانه‌ای، در هر چاهک تنها یک سلول هیبریدومایی قرار می‌گرفت. پیت‌های کشت در انکوباتور کشت سلول انکوبه شدند و روزانه جهت بررسی تشکیل کلون توسط میکروسکوپ معکوس مطالعه شدند. پس از تشکیل و رشد تک‌کلونها از مایع رویی زرد شده آنها برداشته شده و تحت آزمون الایزا واقع شدند تا زیرکلونهای مولد آنتی‌بادی ضدآلکالین فسفاتاز شناسایی شده و توسعه یابند. پس از توسعه این تک‌کلونهای مثبت، روش آخرین حد رقت مجدداً تکرار شد و تک‌کلونهای مثبت نهایی که مولد آنتی‌بادی ضدآلکالین فسفاتاز بودند، با آزمون الایزا شناسایی شده و توسعه یافتند (۱۴، ۱۶). چند ویال از هر یک از این سلولها در تانک ازت مایع فریز شد تا ذخیره مناسبی از آنها موجود باشد.

* و) تعیین کلاس و زیرکلاس آنتی‌بادیهای بدست آمده

برای تعیین کلاس و زیرکلاس آنتی‌بادیهای به دست آمده از کیت ایزواستریپ (Isostrip, Rochebiochemicals، آلمان) استفاده شد. این کیت محتوی ۱۰ نوار و لوله بوده که در داخل هر لوله تعدادی ذرات لاتکس آبی رنگ وجود دارد که با آنتی‌بادیهای مونوکلونال ضد زنجیره‌های کاپا و لامبدا (κ و λ) پوشیده شده‌اند. همچنین در طول نوار و در نقاط مختلف، آنتی‌بادیهای ضد ایزوتیپهای مختلف ایمونوگلوبولین موشی و نیز ضد زنجیره‌های سبک کاپا و لامبدا قرار داده شده است. با رقیق نمودن و اضافه کردن نمونه مورد آزمایش به داخل لوله، آنتی‌بادیهای موجود در آن به ذرات لاتکس متصل شده که پس از قراردادن ته نوار درون لوله، مایع موجود در لوله، جذب نوار شده و در طول آن به سمت بالا حرکت می‌کند. در نقطه‌ای که آنتی‌بادیهای ضد زنجیره‌های پادتن نمونه وجود داشته باشد، ذرات لاتکس ایجاد یک باند آبی‌رنگ می‌کنند که با چشم غیرمسلح قابل رؤیت است.

* ز) تعیین میزان تأثیر آنتی‌بادی بر ناحیه فعال آنزیم

جهت بکارگیری آنتی‌بادی تولید شده برای تشکیل کمپلکس APAAP باید از عدم تأثیر آنتی‌بادی بر ناحیه فعال آنزیم مطمئن شد. بدین منظور دو تکنیک الایزا به کار گرفته شد: در تکنیک اول غلظتهای مختلف آنزیم آلکالین فسفاتاز در کف پلیت کوت شد و بر روی آن رقتهای متفاوت مایع رویی کلونها ریخته شد. در مرحله آخر نیز سوبسترای آلکالین فسفاتاز (محلول PNPP P-Nitrophenyl phosphate) (Sigma، آمریکا) مورد استفاده قرار گرفت و برای متوقف کرن واکنش، محلول سود ۲ مولار افزوده شد. قرائت نتایج در طول موج ۴۰۵ نانومتر صورت گرفت. در این آزمایش بعنوان کنترل منفی از PBS و بعنوان کنترل مثبت از سرم موشهای ایمن شده استفاده گردید. در تکنیک دوم، غلظتهای مختلف Goat anti-mouse Ab (Dako، دانمارک) در کف چاهکها کوت شد و بر روی آن مایع رویی کلونها و سپس محلول آلکالین فسفاتاز ریخته شد. پس از اضافه نمودن سوبسترای آلکالین فسفاتاز و متوقف کرن واکنش با محلول سود ۲ مولار، از طول موج ۴۰۵ نانومتر برای قرائت نتایج استفاده شد (۱۷ و ۱۸ با بعضی تغییرات). در این تکنیک نیز از PBS بعنوان کنترل منفی استفاده گردید. بدیهی است که بعد از هر مرحله سه بار عمل شستشوی حفرات صورت گرفت که به منظور رعایت اختصار ذکر نگردیده است.

* ح) تولید آنتی بادی با غلظت بالا در صفاق موش

پنج سرموش Balb/c نرمال انتخاب و ۰/۵ میلی‌لیتر پریستان (Pristane) (Sigma، آمریکا) به صورت درون صفاقی به آنها تزریق شد. پس از گذشت یک هفته، ۱۰ میلیون سلول هیبریدومایی شمارش گردید و همراه با PBS به فضای صفاقی این موشها تزریق گشت. موشها بصورت روزانه معاینه فیزیکی می‌شدند. پس از تشکیل تومور و رشد آن، موش حاوی تومور نخاعی شده و پس از باز کردن شکم مایع آسیت جمع‌آوری شد (۱۴).

* ط) الکتروفورز مایع صفاقی

پس از مرطوب نمودن کاغذ استات سلولز در بافر باربیتال (۸/۶ =

pH) ، 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 شده و مراحل زیر به ترتیب اجرا شد:

- قرار گرفتن در محلول رنگزا (پانسو S) (NAVECO، آرژانتین) به مدت ۱۰ دقیقه.
- قرار گرفتن در محلول رنگ‌بر (اسید استیک ۵درصد در آب مقطر) (Merk، آلمان) به مدت ۶ دقیقه.
- قرار گرفتن در محلول شفاف کننده (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 فیکس شده و به درون فور (با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) منتقل گردید تا شفاف گردد.

یافته‌ها

* الف) نتایج ایمن‌سازی موشها

نتایج آزمون الایزا پس از هر بار تزریق ثابت کرد که روند ایمن‌سازی موشها، صعودی بوده و پس از تزریق سوم به حداکثر رسیده است. بصورتیکه آزمایش الایزا بر روی رقت ۱/۱۰۰۰ سرم موشهای ایمن پس از تزریق سوم دارای جذب نوری متوسط ۰/۲۹ ± ۱/۴۴ بود که در مقایسه با سرم موش تزریق نشده (کنترل منفی) (۰/۱۹) به میزان قابل توجهی افزایش یافته است.

* ب) نتایج امتزاجهای سلولی

طی ۶ بار فیوژن جمعا ۱۰۴ کلون هیبریدومائی بدست آمد که بعد از انجام آزمایش الایزا روی سوپرناتانت کشت این کلونها مشخص گردید که بسیاری از آنها، آنتی‌بادی اختصاصی تولید نمی‌کنند. از بین کلونهای مثبت دو کلون A_1G_8 و A_1G_9 که بیشترین میزان تولید را داشته و سوپرناتانت کشت آنها در آزمایشات الایزا بیشترین واکنش را با آنزیم آلکالین فسفاتاز نشان می‌داد، جهت انجام سایر آزمایشات تکمیلی روی این کلونها انتخاب شد. نتایج مربوط به انجام امتزاجهای سلولی در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول ۱: جمع بندی نتایج امتزاجهای سلولی انجام گرفته

اطلاعات / شماره مربوطه فیوژن	تعداد کل چاهکهای مورد استفاده	تعداد کل کلونهای هیبریدومائی بدست آمده	درصد نسبت به کل به کل چاهکها
فیوژن اول	۱۹۲	۰	۰درصد
فیوژن دوم	۱۹۲	۲	۱/۰۴درصد
فیوژن سوم	۱۹۲	۱۲	۶/۲۵درصد
فیوژن چهارم	۱۹۲	۲۸	۱۴/۵۸درصد
فیوژن پنجم	۱۹۲	۱۹	۹/۸۹درصد
فیوژن ششم	۱۹۲	۴۳	۲۲/۳۹درصد
مجموع	۱۱۵۲	۱۰۴	۹/۰۲درصد

در فیوژن ششم که بیشترین تعداد کلونهای هیبریدومائی بدست آمد، اولین کلونها در روز سوم مشاهده شدند و تا روز هفتم ۴۳ کلون بدست آمد. دو کلون مثبت A_1G_8 و A_1G_9 به پلیت کشت ۲۴ خانه‌ای انتقال پیدا کرده و پس از چهار روز انکوباسیون، مجدداً آزمایش الایزا روی سوپرناتانت کشت آنها تکرار شد. نتایج حاصله در جدول شماره ۲ آورده شده است. پس از تکثیر کلونهای بدست آمده و انجماد چند ویال از هر کلون، روش آخرین حد رقت (limiting dilution) در مورد آنها اجراء شد. در L.D. اولیه و ثانویه کلون A_1G_8 به ترتیب ۱۳ و ۱۱ زیرکلون و در L.D. اولیه و ثانویه A_1G_9 ۱۵ و ۱۷ زیرکلون حاصل شد که پس از انجام آزمایشات الایزا روی مایع رویی کشت این سلولها نهایتا دو زیرکلون $A_1G_8F_7$ و $A_1G_9G_3$ که بیشترین جذب نوری را در آزمایش الایزا ایجاد کرده بودند، انتخاب شده و به میزان زیاد پاساژ و تکثیر داده شد. در ضمن تعدادی ویال از هر زیرکلون در ازت مایع منجمد و بمنظور استفاده‌های بعدی نگهداری گردید.

* ج) نتایج تعیین کلاس و زیرکلاس آنتی‌بادیهای مونوکلونال تولیدی

با بررسی باندهای آبی‌رنگ تشکیل شده بر روی نوار ایزواستریپ و مقایسه محل تشکیل آنها با نمونه موجود در کیت مشخص گردید که آنتی‌بادیهای حاصل از هر دو زیرکلون $A_1G_8F_7$ و $A_1G_9G_3$ از زیرکلاس IgG_1 با زنجیره سبک کاپا (κ) هستند.

* د) نتایج بررسی میزان تأثیر آنتی‌بادیها بر ناحیه فعال آنزیم

بدلیل استفاده از آنتی‌بادی تولید شده برای تشکیل کمپلکس APAAP اطمینان از عدم تأثیر آنتی‌بادی بر ناحیه فعال آنزیم ضروری بود. بدین منظور از دو تکنیک الایزا بهره گرفتیم. در تکنیک اول غلظتهای مختلف آنزیم آلکالین فسفاتاز در کف پلیت پوشش داده شد و بر روی آن رقتهای متفاوت مایع رویی کلونها ریخته شد. در مرحله آخر نیز سوبسترای آنزیم را اضافه نمودیم.

جدول ۲: نتایج آزمون الایزای مایع رویی کشت کلونهای A_1G_8 و A_1G_9 پس از انتقال به پلیت ۲۴ خانه‌ای

جذب	نمونه
۱/۵۳	A_1G_8
۱/۴۶	A_1G_9
۱/۵	کنترل مثبت $\frac{1}{1000}$
۱/۳۹	کنترل مثبت $\frac{1}{2000}$
۰/۰۵	کنترل منفی (PBS)
۰/۱۱	کنترل منفی (Serum)
۰/۱	کنترل منفی (SP2)

سوپر ناتانت کشت سلولهای میلومائی SP2=SP2/0

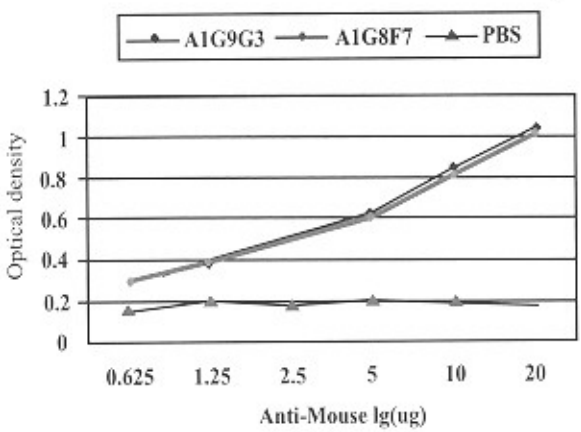
سرم موش تزریق نشده = Serum

جدول ۳: نتایج آزمون الایزا برای بررسی واکنش آنتی بادی با ناحیه فعال آنزیم (تکنیک اول)

رقتهای مختلف سوب / غلظتهای مختلف Coating (µg/ml)Alp	$A_1G_8F_7$	$A_1G_8F_7$ ($\frac{1}{3}$)	$A_1G_8F_7$ ($\frac{1}{6}$)	$A_1G_9G_3$	$A_1G_9G_3$ ($\frac{1}{3}$)	$A_1G_9G_3$ ($\frac{1}{6}$)	PBS	سرم موش ایمن ($\frac{1}{1000}$)
۲۰	۲/۱	۲/۰۸	۲/۱۱	۲/۰۹	۲/۰۹	۲/۰۷	۲/۰۵	۲/۰۲
۱۰	۱/۲	۱/۲۱	۱/۲۲	۱/۲۲	۱/۱۸	۱/۲۱	۱/۱۹	۱/۱۴
۵	۰/۸۱	۰/۸	۰/۸۳	۰/۸۱	۰/۸۲	۰/۸۵	۰/۸۶	۰/۷۵
۲/۵	۰/۵۲	۰/۵۱	۰/۵۲	۰/۵	۰/۴۹	۰/۵۲	۰/۵	۰/۳۸
۱/۲۵	۰/۳۸	۰/۳۸	۰/۳۷	۰/۳۹	۰/۳۶	۰/۳۹	۰/۳۶	۰/۱۲
۰/۶۲۵	۰/۲۹	۰/۲۶	۰/۲۹	۰/۲۸	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۸	۰/۱۱

- اعداد نشاندهنده جذب نوری (OD) در طول موج ۴۰۵ نانومتر هستند.

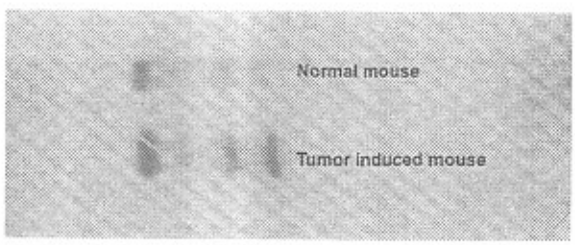
در صورت واکنش آنتی‌بادی با دهانه فعال آنزیم و ممانعت از فعالیت آنزیم، در غلظت پایین آنزیم، باید قادر به مهار واکنش آنزیمی و یا حداقل کاهش آن باشد. نتایج مربوط به این آزمایش در جدول شماره ۳ آورده شده است. همان‌طور که این یافته‌ها نشان می‌دهند آنتی‌بادی موجود در مایع رویی کشت سلولهای هیبریدوما تأثیری بر فعالیت آنزیمی نداشته است. در تکنیک دوم، غلظتهای مختلف Goat anti-mouse Ab در کف چاهکهای الایزا پوشش داده شد و بر روی آن مایع رویی کشت کلونهای هیبریدومائی و سپس محلول آلکالین فسفاتاز ریخته شد. در مرحله بعدی و پس از انجام مراحل شستشو، سوبسترای آلکالین فسفاتاز اضافه گردید و جذب نوری حفرات سنجیده شد (نمودار ۱). نتایج مربوط به این تکنیک الایزا نیز نشان دهنده عدم تأثیر آنتی‌بادی بر ناحیه فعال آنزیم است.



نمودار ۱: نتایج آزمون الایزا برای بررسی تاثیر آنتی بادی روی ناحیه فعال آنزیم (تکنیک دوم)

* هـ) نتایج تولید انبوه آنتی‌بادیها در صفاق موش

باندگاما (β)، پس از الکتروفورز مایع آسیت موشهائی که در آنها به وسیله کلونهای هیبریدومائی تومور ایجاد شده بود، بر روی کاغذ استات سلولز کاملاً واضح بود. این امر در مقایسه با مایع صفاقی موشهای کنترل منفی نشانگر تولید آنتی‌بادی با غلظت زیاد در صفاق این موشها بود (شکل ۱).



شکل ۱: نتیجه الکتروفورز مایع آسیت موش بعد از القاء توسط کلون هیبریدومائی در کنار مایع آسیت موش طبیعی

بحث

آنزیم آلکالین فسفاتاز در آزمایشهای ایمونولوژیک دارای کاربردهای فراوانی است (۱۱، ۱۹، ۲۰). یکی از مهمترین این کاربردها در روشهای ایمونوهیستوشیمی و ایمونوسیتو شیمی است (۱۱). امروزه تکنیکهای ایمونوهیستوشیمی و ایمونوسیتوشیمی، به دلیل کاربردهای فراوانشان، اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده‌اند. این تکنیکها عموماً در پاتولوژی، هیستولوژی، سیتولوژی، جنین‌شناسی، ایمونوپاتولوژی و ... استفاده می‌شوند (۲، ۴، ۷، ۸، ۹، ۱۰). روش APAAP یکی از متداولترین و شناخته شده‌ترین این روشها است که آنزیم آلکالین فسفاتاز در آن نقش کلیدی دارد. این آنزیم دارای سوبستراهای متعددی است که واکنش با برخی از آنها، منجر به تولید محصولات رنگی می‌شود. بنابراین، این آنزیم به عنوان یک نشانگر در روشهای ایمونوشیمی مانند الایزا و ایمونوهیستوشیمی مثل روش APAAP قابل استفاده است (۱۱، ۱۹، ۲۰). برای نشاندار کردن مولکولها با این آنزیم، روشهای متفاوتی وجود دارد که ابتدائی‌ترین آنها کونژوگاسیون است. کونژوگه کردن آنتی بادی با آنزیم یا با مولکولهای دیگر (نظیر آویدین - بیوتین) مستلزم صرف وقت بوده و به تجربه کافی نیاز دارد، به ویژه که در غالب موارد، این پروسه را باید در مورد تک تک آنتی بادیها اعمال نمود (۱۲). تشکیل کمپلکس ایمن آلکالین فسفاتاز -

آنتی‌آلکالین فسفاتاز، یکی دیگر از شیوه‌های نشاندارکردن مولکولها با این آنزیم است که به علت مزایای فراوانش، از جمله عدم نیاز به نشاندار نمودن مستقیم آنتی بادیهای لایه اول و تاثیری که بر افزایش حساسیت روش تشخیصی می‌گذارد، کاربردهای زیادی پیدا کرده است (۱۲). آنزیم آلکالین فسفاتاز از لحاظ منشأ دارای تنوع بسیار وسیعی است و محققین مختلف از Alp هایی با منشأهای متفاوت به منظور تولید آنتی بادی مونوکلونال استفاده کرده‌اند. در این پژوهش، از آلکالین فسفاتاز روده‌گوساله به منظور تولید آنتی‌بادی مونوکلونال استفاده شد. در اغلب منابع دز تزریقی توصیه شده برای ایمن کردن موشهای Balb/c، ۵ تا ۵۰ میکروگرم است و ما از حداقل مقدار استفاده کردیم. بسیاری از پژوهشگران از دزهای بیشتری برای تزریق این آنزیم استفاده کرده‌اند که در تمام موارد ایمن‌سازی کاملاً موفقیت‌آمیز بوده است (۱۵، ۱۷، ۱۸، ۱۹). نتایج این تحقیق از خاصیت ایمنی زائی قوی این آنزیم حمایت می‌کند. با توجه به اینکه آنزیم الکالین فسفاتاز یک پروتئین درشت مولکول با وزنی حدود ۱۴۰ کیلودالتون، با اسیدهای آمینه حلقوی (نظیر تیروزین) است (۲۱) بنابراین ایمونوژنیسیته بالای آن چندان دور از انتظار نیست. اصولاً فیوژن پدیده‌ای بسیار حساس است و لازمه موفقیت در آن، داشتن تمرین و ممارست است در این تحقیق جمعاً شش بار امتزاج سلولی انجام گرفت که در اولین آن، کلونی به دست نیامد ولی در امتزاجهای بعدی بتدریج با افزایش تجربه و ممارست، تعداد کلونهای هیبریدومائی بدست آمده و بازده روش امتزاج افزایش یافت (جدول شماره ۱) و به نتایج تحقیقات مشابه نزدیک شد. رای[1] در سال ۱۹۸۴، برای ادغام سلولی از ۵ پلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده کرد و به ۲۱۴ کلون دست یافت که از این تعداد، ۷ کلون مثبت و اختصاصی بودند. در واقع میزان موفقیت وی ۳/۳ درصد بود (۲۲). کردل[2] نیز در سال ۱۹۸۴ به ۱۴۴ کلون دست یافت که ۶۵ عدد از آنها مولد آنتی‌بادی ضد Alp بودند ولی فقط ۱۴ کلون توسط این پژوهشگر توسعه یافت (۱۹). استینمتز[3] در سال ۱۹۸۷، پس از امتزاج سلولها به موفقیتی معادل ۲۰ درصد نائل شد (۲۳). در صد موفقیت محققین مذکور با آنچه در امتزاجهای نهائی توسط ما بدست آمده است (۲۲/۳۹درصد) بسیار نزدیک است. از عوامل دیگری که در میزان موفقیت امتزاج سلولها مؤثرند می‌توان به غلظت PEG مورد استفاده و نسبت سلولهای طحالی به میلومایی اشاره کرد. یکی دیگر از تفاوتهای عملکرد محققین مختلف، نوع سلول میلوماست. در این پژوهش از میلومای Sp2/0 استفاده شد. غلظت PEG مورد استفاده، ۵۰ درصد و نسبت سلولهای طحالی به میلومایی $\frac{5}{1}$ تا $\frac{10}{1}$ بود. محققین دیگر نیز از همین غلظت PEG ما از سایر دودمانهای میلومائی به منظور تولید آنتی آلکالین فسفاتاز استفاده نموده و به نتایج مشابه دست یافته‌اند. بعنوان مثال کردل به منظور انجام امتزاج سلولی از دودمان میلومائی NS-1 (۱۹) و ماسوهارا[4] از دودمان P3.X63-Ag8 (۱۷) استفاده نمودند. پس از انجام آزمایشات الایزا روی سوپرناتانت کشت دودمانهای هیبریدومائی بدست آمده و شناسائی کلونهای A_1G_8 و A_1G_9 بعنوان کلونهای ترشح کننده آنتی بادی اختصاصی، هر دو کلون در پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت سلول رشد داده شدند و آزمون الایزا تکرار شد که نتایج مرحله قبل را تأیید می‌کرد و L.D. با موفقیت انجام شد. ۱۳ تک کلون از A_1G_8 و ۱۵ تک کلون از A_1G_9 بدست آمد. با توجه به اینکه جذب به دست آمده از تمام تک کلونهای حاصل از A_1G_8 مشابه بود، بنابراین به احتمال قریب به یقین این کلون از ابتدا خالص و تک کلون بوده است. همین استنتاج در مورد کلون A_1G_9 نیز صدق می‌کند. با این وجود هر دو کلون برای بار دوم تحت L.D. قرار گرفتند که از A_1G_8 و A_1G_9 به ترتیب ۱۱ و ۱۷ تک کلون به دست آمد و زیر کلونهای $A_1G_8F_7$ و $A_1G_9G_3$ با بیشترین جذب نوری در آزمایشات الایزا انتخاب شده و به میزان زیاد تکثیر و منجمد شدند. از آنجایی که هدف این پروژه تشکیل کمپلکس APAAP است لذا آنتی‌بادیهای حاصل باید واجد شرایط خاصی باشند، از جمله اینکه علیه ناحیه فعال آنزیم نباشند و در واکنش آنزیمی اختلال ایجاد ننمایند و از کلاس IgG باشند. بنابراین دو سیستم الایزا طراحی شد که به وسیله آنها آنتی‌بادیهای ضد ناحیه فعال آنزیم شناسایی می‌شدند. انجام این آزمایشات نشان داد که آنتی بادیهای مترشحه توسط هیچکدام از زیر کلونهای بدست آمده بافعالیت آنزیمی تداخل نمی‌نماید. سایر محققینی که روی تولید کمپلکس APAAP کار کرده‌اند، نیز با انجام آزمایشات مشابه به بررسی چگونگی واکنش آنتی بادی با آنزیم و تداخل آن در واکنش آنزیمی پرداخته‌اند (۱۷، ۱۹، ۲۲، ۲۳). مثلا ماسوهارا پس از قراردادن anti-mouse Ig در کف چاهکهای پلیت الایزا مایع روئی کلونهای تولیدی را اضافه نمود و پس از آن آنزیم آلکالین فسفاتاز استخوانی را اضافه کرد و با افزودن سوبسترا به بررسی فعالیت آنزیمی پرداخت (۱۷). هومان با تثبیت آنتی بادی موشی در کف پلیت الایزا و سپس افزودن anti-mouse Ig به چاهکها، در مرحله بعدی مخلوط مایع روئی کلونها و آنزیم آلکالین فسفاتاز را اضافه نمود و با افزودن سوبسترا فعالیت آنزیمی را مورد بررسی قرار داد (۲۰). تعیین کلاس آنتی بادیهای تولید شده نشان داد که هر دوی آنها از کلاس IgG با 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 (κ) هستند (بیش از ۹۰ درصد) این یافته چندان دور از انتظار نیست. به همین دلیل اغلب پژوهشگرانی که علیه Alp، آنتی‌بادی مونوکلونال موشی تهیه کرده‌اند، کلاس آنتی‌بادی بدست آمده را IgG و زنجیره سبک بدست آمده را از نوع کاپا (κ) گزارش کرده‌اند (۱۹، ۲۰، ۲۲). در هر صورت بدلیل اینکه آنزیم آلکالین فسفاتاز ملکول نسبتا بزرگی است و دارای اپی توپهای فراوان است، پس از تزریق این ملکول به حیوان آزمایشگاهی، لنفوسیتهای B متعددی که هر کدام بر علیه یک اپی توپ هستند تحریک شده و علاوه بر آن نیز بر علیه هر کدام از اپی توپهای ملکول نیز لنفوسیتهای B متعدد با افینیتی متفاوت تحریک می‌شوند. نهایتا کلون هیبریدومائی بدست آمده نتیجه ادغام یکی از لنفوسیتهای B مذکور با سلول میلوما است و احتمال اینکه دو لنفوسیت B کاملا مشابه

1. Wray
2. Cordell
3. Steinmetz
4. Masuhara

طی دو پروسه مجزای ادغام سلولی در تشکیل دودمانهای هیبریدومائی شرکت نمایند، تقریباً نزدیک به صفر است. بنابراین آنتی بادی تولیدی توسط هر محقق را از این نظر باید یک آنتی‌بادی موتوکلونال جدید تلقی کرد و مقایسه دقیق آنتی بادیهای تولیدی به سادگی امکان‌پذیر نیست.

در مجموع می‌توان گفت که آنتی‌بادیهای به دست آمده قدرت زیادی برای اتصال به آنزیم دارند و جذب نوری حاصل در آزمایشات الایزا موید این مطلب است. از طرف دیگر این آنتی‌بادیها علیه ناحیه فعال آنزیم، هیچ واکنشی نشان نمی‌دهند و مهارکننده عملکرد آنزیم آلکالین فسفاتاز نیستند و علاوه بر این از کلاس IgG هستند، بنابراین می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که قاعدتاً این دو پادتن برای تشکیل کمپلکس APAAP مناسب هستند و می‌توان از آنها در تکنیکهای ایمونوهیستوشیمی و ایمونوسیتوشیمی استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

این پروژه بخشی از طرح ملی تولید مجموعه‌های ایمنی PAP و APAAP به منظور توسعه روشهای چشمی تشخیص شاخصهای سلولی است. لذا لازم است از شورای پژوهشهای علمی کشور و سازمان مدیریت و برنامه ریزی بدلیل تامین اعتبار آن و سایر همکاریهائی که مبذول داشته‌اند، تشکر نمائیم. همچنین از گروه ایمونولوژی انستیتو پاستور ایران، بویژه آقای دکتر علیرضا خبیری که در بعضی از مراحل عملی این پروژه با ما همکاری داشته‌اند صمیمانه تشکر می‌نمائیم.

References

1. Villaplana M, Garcia Ayala A, Hernandes MP, Agulleiro B: Immunohistochemical and ulterastructural characterization of mammosomatotrope, growth hormone, and prolactin cells from the gilthead sea bream: an ontogenic study. J Morphol, 2003; 255(3): 347-57

2. 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, 2001; 6(1): 49-53

3. Hsu FD, Nielsen TO, Alkushi A, Dupuis B, Huntsman D, Liu CL, Van De Rijn M, Gilks CB: Tissue microarrays are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry. Mod Pathol, 2002; 15(12): 1374-80

4. Fukunaga M: Immunohistochemical characterization of p57(KIP2) expression in early hydatidiform moles. Hum Pathol, 2002; 33(12): 1188-92

5. Zigeuner RE, 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, 2003; 169(2): 701-5

6. Castilla EA, Prayson RA, Abramovich CM, Cohen ML: Immunohistochemical expression of cathepsin D in menengiomas. Am J Clin Pathol, 2003; 119(1): 123-8

7. 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, 2002; 22(6B): 33443-33448

8. Lau SK, Prakash S, Geller SA, Alsabeh R: Comparative immunohistochemical profile of hepatocellular carcinoma. cholangiocarcinoma and metastatic adenocarcinoma. Hum Pathol, 2002; 33(12): 1175-1181

9. Fujita D, Terada S, Ishizu H, Yokota O, Nakashima H, Ishihara T, Kuroda S: Immunohistochemical examination on intracranial calcification in neurodegenerative diseases. Acta Neuropathol, 2003; 105(3): 259-64

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

11. Arasteh KN, Simon V, Musch R, Weiss RO, Przytarski K, Futh UM, Pleuger F, Huhn ., Lage MP: Sensetivity and specificity of indirect immunoflourescence and Grocott-technique in comparison with immunocytology (alkaline phosphatase anti alkaline phosphatase= APAAP) for the diagnosis of Pneumocystis carinii in broncho-alveolar lavage. Eur J Med Res, 1998; 3(12): 559-63

12. Kiernan JA: Histological and histochemical methods. 2nd edition, Pergamon Press, Britain 1990, PP. 330-354

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

14. Margulies DH: Production of monoclonal antibodies. In: Current protocols in immunology. Edited by Golgien JE, 1991: (1), 2.5.1-2.5.17

15. Millan JL, 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, 1982; 42: 2444-2449
16. Zola H, Brooks D: Techniques for the production and characterization of monoclonal hybridoma antibodies. In: Monoclonal hybridoma antibodies: Techniques and applications.Edited by Hurrel JCR. 4th ed, CRC Press, Florida, 1985, PP: 1-58
17. Masuhara K, Yoshikawa R: Monoclonal antibody against human bone alkaline phosphatase. Int. Orthop, 1991; 15(1): 61-64
18. Sakharov Y: Monoclonal antibody to alkaline phosphatase from the intestinal mucosa of the harp seal, phoca groenlandica. Comp Biochem Physiol, 1992; 101B(4): 677-682
19. Cordell JL, Falini B, Erber WN: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). J Histochem-Cytochem, 1984l; 32(2): 219-229
20. Hohmann A, Hodgson AJ, Di W: Monclonal alkaline phosphatase-anti alkaline phosphatase (APAAP) complex: Production of antibody, optimization of activity, and use in immunostaining. J Histochem. Cytochem, 1988; 36(2): 137-143
21. Burrell MM: Enzymes of molecular biology. Humana press, U.S.A., 1993, P: 331-341
22. Wray LK, Harris H: Monoclonal antibodies against placental-like and intestinal-like alkaline phosphatases in a malignant human cell line. Eur J Biochem, 1984; 139: 503-508
23. Steinmetz HT, Pfreundschuh MG: Production of monoclonal antibodies against glucose oxidase, alkaline phosphatase and peroxidase. J Immunol Meth, 1987; 101: 251-259