مقاله اصیل

تولید کمپلکس آلکالین فسفاتاز، آنتی‌آلکالین فسفاتاز (APAAP) و استفاده از آن در رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی

محسن ناصری .M.Sc[۲،۱]، سید محمد مؤذنی .Ph.D[۱]*، علی اکبر پورفتح ا... .Ph.D[۱]

۱. گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۲. گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند
* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق‌پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی
پست الکترونیک: Email: moazzeni@dr.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۸/۱۳، پذیرش مقاله: ۸۶/۳/۲

هدف: تولید کمپلکس آلکالین فسفاتاز-آنتی آلکالین فسفاتاز(APAAP) با هدف به کارگیری آن در یکی از کاربردی‌ترین روش‌های تعیین جایگاه آنتی‌ژن در بافت یا سلول (تکنیک APAAP) و مقایسه آن با محصولات مشابه خارجی

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، آنتی‌بادی‌های ترشحی دو کلون هیبریدومایی $A_1G_8F_7$ و $A_1G_9G_3$ تولید شده در داخل کشور، تغلیظ و خالص‌سازی شدند و افینیتی آنها مشخص شد. سپس کمپلکس APAAP با غلظت‌های مناسب از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد آلکالین فسفاتاز (AAP) و آنزیم آلکالین فسفاتاز(AP) تهیه شد و برای رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی(ICC) و ایمونوهیستوشیمی (IHC) در مقایسه با نمونه تجارتی مشابه (شرکت DAKO، دانمارک) استفاده شد.

یافته‌ها: هر دوکلون سلولی توانایی تولید آنتی‌بادی مونوکلونال ضدآلکالین فسفاتاز با افینیتی بالا را حفظ کرده بودند و کمپلکس به دست آمده از آنتی‌بادی مونوکلونال و آنزیم در تکنیک APPAP بسیار کارا و از نظر کیفیت رنگ‌آمیزی قابل مقایسه با نمونه مشابه خارجی بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به افینیتی مناسب آنتی‌بادی‌های مونوکلونال محصول کلون‌های هیبریدومایی مورد مطالعه و پایداری کمپلکس حاصل از مخلوط آنتی‌بادی مونوکلونال و آنزیم آلکالین فسفاتاز برای زمان طولانی، می‌توان از این دو کلون سلولی برای تهیه کمپلکس APPAP در حد نیمه صنعتی و صنعتی کمک گرفت و از آن در رنگ‌آمیزی‌های ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی استفاده کرد.

کلیدواژگان: آنتی‌بادی مونوکلونال، APAAP، ایمونوسیتوشیمی، ایمونوهیستوشیمی، آلکالین فسفاتاز

فصلنامه پژوهشی یاخته، سال نهم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۶، صفحات ۳۰-۲۳

مقدمه

از زمان معرفی تکنولوژی رنگ آمیزی ایمونولوژیک (Immunostaining) در اوایل دهه ۱۹۴۰ تا به امروز این تکنیک در زمینه تعیین جایگاه آنتی‌ژن در بافت (Immunohistochemistry) و سلول (Immunocytochemistry) در مقایسه با روش‌های ابداعی دیگر پیشرفت‌های چشمگیری داشته است که بسیاری از این پیشرفت‌ها مدیون استفاده از آنزیم‌هایی همچون آلکالین فسفاتاز است (۳-۱).

در اغلب این روش‌ها، بافت یا سلول را با آنتی‌بادی نشان‌دار مجاور می‌کنند و با استفاده از میکروسکوپ مناسب موقعیت محل رنگ‌پذیر و در نتیجه موقعیت آنتی‌ژن را در بافت یا سلول مشخص می‌کنند. امروزه تحقیقات هیستوپاتولوژیک، بدون در نظر گرفتن روش‌های رنگ‌آمیزی ایمونولوژیک غیر قابل تصور است. به عنوان مثال این روش‌ها در تشخیص انواع سرطان‌ها نظیر لنفوم‌ها و لوسمی‌ها و یا در سیتولوژی تشخیصی، ایمونوپاتولوژی پوست، تشخیص بیماری‌های کلیوی و سایر بیماری‌ها کاربرد بسیار گسترده‌ای دارد (۹-۴).

از بین روش‌های متعدد رنگ‌آمیزی ایمونولوژیک به کمک آنزیم (Immunoenzymestaining)، روش غیرمستقیم سه لایه از طریق اتصال ایمونولوژیکی آنزیم-آنتی‌بادی (the unlabeled antibody enzyme method) به دلیل سادگی، حساسیت بالا و قابلیت تکرارپذیری و همچنین کاهش رنگ غیراختصاصی و اجتناب از به هدر رفتن آنتی‌بادی در حین عمل نشانه‌گذاری محبوبیت بیشتری دارد. مهمترین تکنیک‌هایی که در این دسته قرار می‌گیرند، روش‌های (peroxidase-Anti peroxidase: PAP) و (Alkaline phosphatase-Anti Alkaline phosphatase: APAAP) هستند (۱۲-۱۰).

در تکنیک APAAP به وسیله یک آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه ایمونوگلوبین موشی، بین آنتی‌بادی مونوکلونال اولیه که به صورت اختصاصی آنتی‌ژن‌های بافتی را تشخیص می‌دهد و کمپلکس APAAP اتصال برقرار می‌شود. کمپلکس APAAP، حاصل اتصال

ایمونولوژیکی آنزیم آلکالین فسفاتاز به آنتی‌بادی مونوکلونال موشی ضد خودش است. با افزودن سوبسترا که تحت تاثیر واکنش آنزیمی به محصول رنگی تبدیل می‌شود و رسوب می‌کند محل تجمع آنتی‌ژن در بافت ردیابی می‌شود (۱۳).

در این مطالعه از محصول کلون‌های هیبریدومایی $A_1G_9G_3$ و $A_1G_8F_7$ (تولید شده توسط ما)، مولد آنتی‌بادی مونوکلونال علیه آنزیم آلکالین فسفاتاز روده‌ای گاو (Type VII A) (۱۴)، برای تشکیل کمپلکس APAAP استفاده شد و کارآیی کمپلکس حاصل در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی و ایمونوسیتوشیمی با نمونه مشابه خارجی (DAKO) مورد مقایسه قرار گرفت. با توجه به کارآیی مناسب کمپلکس تولیدی و کاربرد وسیع این کمپلکس در آزمایش‌های تشخیصی پاتولوژی و تحقیقات هیستولوژی و سیتولوژی تولید داخلی این کمپلکس می‌تواند به صرفه‌جویی ارزی قابل توجهی منجر شود.

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌ها برای اثبات پایداری و توان تولید آنتی‌بادی مونوکلونال توسط دو کلون هیبریدومای $A_1G_9G_3$ و $A_1G_8F_7$

پس از ذوب نمونه‌های سلولی منجمد ذخیره شده از کلون‌های هیبریدومایی تولید شده در دانشگاه تربیت مدرس (۱۴) و تعیین درصد زنده بودن سلول‌ها، کلون‌های هیبریدومایی در محیط RPMI (Sigma، آمریکا) حاوی ده درصد سرم جنین گاو FCS (Gibco، انگلستان) کشت داده شدند و مایع رویی کشت سلولی برای اثبات تولید آنتی‌بادی مونوکلونال با استفاده از روش الیزا بررسی شد (۱۴).

تولید آنتی‌بادی با غلظت بالا در موجود زنده

۱۰ سر موش Balb/c انتخاب و ۰/۵ میلی‌لیتر پریستان (Sigma، آمریکا) به صورت درون صفاقی به آنها تزریق شد. پس از گذشت یک هفته، ۱۰ میلیون سلول هیبریدومایی شمارش و همراه با PBS به فضای صفاقی این موش‌ها تزریق شد و موش‌ها روزانه از نظر تشکیل تومور مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از تشکیل تومور و رشد آن، موش حاوی تومور نخاعی و پس از بازکردن شکم مایع آسیت جمع‌آوری شد (۱۵).

تغلیظ آنتی‌بادی به کمک رسوب سولفات آمونیوم و تخلیص آن با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی متصل به پروتیین G

با حل کردن مقدار اضافی سولفات آمونیوم در آب مقطر، محلول اشباع سولفات آمونیوم آماده شد. محلول اشباع سولفات آمونیوم به آرامی و به صورت قطره قطره به همان حجم سوپرناتانت سلولی یا مایع آسیت به دست آمده که در داخل بشر و حمام یخ قرار داده شده بود، اضافه شد.

پس از ۳۰ دقیقه چرخش مگنت در داخل محلول، بشر حاوی سوپرناتانت برای یک شب در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس رسوب حاصل از سانتریفیوژ سوسپانسیون فوق در کمترین مقدار PBS حل و به مدت ۴۸ ساعت با دو بار تعویض بافر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد دیالیز شد. اثبات حضور پروتیین و تخمین غلظت آن در محلول تغلیظ شده با اندازه‌گیری جذب نوری در ۲۸۰ نانومتر انجام گرفت.

مقدار کافی از ژل CNBr Activated Sepharose 4B متصل به پروتیین G (Sigma، آمریکا) درون یک لوله به قطر پیپت پاستور ولی با دیواره ضخیم‌تر ریخته شد. ستون فوق با PBS شستشو داده شد و نمونه پروتیین تغلیظ شده حاصل از مرحله قبل به سطح ژل اضافه شد. عمل شستشو با بافر PBS و سرعت ۱۰ میلی‌لیتر در ساعت برای حذف پروتیین‌های متصل نشده به ستون انجام گرفت. به منظور جدا کردن آنتی‌بادی از پروتیین G "بافرگلایسین" با pH=۳/۵ استفاده شد و بافر خروجی از ستون به صورت فراکشن‌های یک میلی‌لیتری در لوله‌های محتوی بافر تریس غلیظ با pH=۷ جمع‌آوری و جذب نوری آن در ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. لوله‌های خروجی دارای جذب بالا نیز با هم مخلوط و در برابر بافر PBS به مدت ۲۴ ساعت دیالیز شدند.

جهت ارزیابی مراحل تخلیص، نمونه‌های به دست آمده از هر مرحله تخلیص، پس از آماده‌سازی، به ترتیب در داخل چاهک‌های ژل پلی‌اکریل آمید قرار گرفت و الکتروفورز در محیط حاوی SDS انجام شد. پس از رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی بلو، عمل رنگبری به مدت دو روز با تعویض متناوب رنگبر انجام پذیرفت.

محاسبه میل پیوندی (Affinity) آنتی‌بادی و تشکیل کمپلکس APAAP

برای اینکه کمپلکس APAAP از پایداری لازم جهت انجام آزمایش‌ها و امکان نگهداری برخوردار باشد، میل پیوندی آنتی‌بادی مونوکلونال برای آنزیم باید مناسب باشد تا اتصال بین آنتی‌بادی و آنتی‌ژن به راحتی جدا نشود. برای تخمین افینیتی آنتی‌بادی‌های تولید شده، از روش الیزای غیررقابتی و رسم منحنی کلاتز استفاده شد (۱۶).

با توجه به افینیتی بالای آنتی‌بادی‌های محصول هر دو کلون هیبریدومای $A_1G_9G_3$ و $A_1G_8F_7$ برای آنزیم آلکالین فسفاتاز، از هر دو کلون برای تشکیل کمپلکس APAAP استفاده شد. کمپلکس آلکالین فسفاتاز-آنتی‌آلکالین فسفاتاز به آسانی با مخلوط نمودن سوپرناتانت کشت سلولی و آنزیم خالص شده یا ناخالص آماده می‌شود ولی پایداری کمپلکس و شدت رنگ به دست آمده در آزمایش‌های ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی بستگی به غلظت مناسب آنتی‌بادی و آنتی‌ژن در این کمپلکس دارد.

ابتدا حدود نسبت مناسب این دو با توجه به نتایج به دست آمده از آزمایش‌های تعیین افینیتی (۱۶) تخمین زده شد. آنگاه غلظت‌های ۱، ۲، ۴ و ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر از آلکالین فسفاتاز (Sigma, Type 1) با غلظت ثابت ۲/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی‌بادی مجاور و پس از گذشت ۲۴ ساعت از کمپلکس‌های APAAP تولیدی برای رنگ‌آمیزی ایمونولوژیکی سلول

و بافت استفاده شد.

آزمایش‌های ایمونوسیتوشیمی

سه میلی‌لیتر خون هپارینه با همان حجم محیط کشت مخلوط و با استفاده از فایکول لایه سلول‌های تک هسته‌ای (مونونوکلئر) جداسازی شد. گسترش سلولی به کمک دستگاه سل سانتریفیوژ (Cytospin)، آماده شد. در این مرحله با ۷۵۰ دور در دقیقه و به مدت ۶ دقیقه سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان بر روی لام‌های آغشته به چسب (3-Amino propyltriethoxy silane: APES) (Sigma) پخش شدند.

اسمیرهای سلولی پس از خشک شدن به مدت یک دقیقه در ظرف حاوی استون فیکس شدند. پس از شستشوی اسلایدها با بافر TBS (pH=۷/۶) آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد CD4 و CD8 (Mouse Anti-human CD8 ،CD4) (Sigma) با غلظت مناسب به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه عمل انکوباسیون در اتاقک مرطوب انجام گرفت. بعد از شستشو و خشک کردن اسلایدها از سرم بز با رقت ۱/۲۰ در بافر TBS حاوی BSA یک درصد برای عمل مسدود کردن (Blocking) استفاده شد. آنگاه مقدار ۳۰ میکرولیتر از غلظت مناسب آنتی‌بادی پلی کلونال ضد آنتی‌بادی‌های موشی (goat anti-mouse Ig) (Dako، دانمارک) روی نمونه ریخته شد و انکوباسیون در اتاقک مرطوب به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت. در مرحله بعد پس از شستشو و خشک کردن اسلایدها ایمونوکمپلکس APAAP به نمونه اضافه و پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون عمل شستشو انجام شد. در این مرحله به منظور بهینه‌سازی کمپلکس APAAP، غلظت‌های متفاوتی از آنتی‌بادی و آنزیم آلکالین فسفاتاز مخلوط و کمپلکس‌های تولیدی مورد آزمایش قرار گرفتند. سوبسترای واکنش با اضافه نمودن قرص‌های سوبسترا که حاوی Fast Red TR. Naphthol AS-MX phosphate (Sigma) است به بافر تریس ۰/۱ مولار (pH=۸/۲) تهیه و سپس این مجموعه از فیلتر عبور داده شد. پس از خشک شدن اسلایدها سوبسترا اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. در تمامی مراحل رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی فرآیند انکوباسیون در اتاقک مرطوب و در درجه حرارت اتاق انجام شد (۱۷).

ایمونوهیستوشیمی

برای نشان دادن کارآیی کمپلکس APAAP تولیدی در آزمایش‌های ایمونوهیستوشیمی، از برش‌های آپاندیس و آنتی‌بادی آنتی‌سایتوکراتین (Sigma) استفاده شد. برش‌های پارافینی آپاندیس (۴ میکرومتر) بر روی اسلایدهای پوشیده شده از سیلان (Sigma) قرار داده شدند و عمل پارافین زدایی با استفاده از گزیلن (دو دفعه، هر بار ۱۰ دقیقه) و اتانل ۹۹ درصد (دو بار هر دفعه ۵ دقیقه) انجام شد. بعد از شستشوی اسلایدها با بافر TBS، عمل بازیافت (Retrieval) توسط میکروویو و بافر سیترات انجام شد. بعد از شستشوی مجدد اسلایدها در بافر TBS آنتی‌بادی لایه اول (Anti-cytocratin-Sigma) روی اسلاید اضافه و برای ۳۰ دقیقه انکوبه شد. پس از شستشو از سرم گونه‌ای که آنتی‌بادی ثانویه از آن گرفته شده (سرم بز ۵درصد)، روی اسلاید ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. بعد از شستشو و خشک کردن اسلاید، آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد آنتی‌بادی‌های موشی (goat anti-mouse Ig) (Dako ، دانمارک) به مدت ۳۰ دقیقه روی نمونه‌ها انکوبه شد. پس از شستشوی اسلایدها، ایمونوکمپلکس APAAP اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. در نهایت سوبسترای Fast (Syctek, logan, UT) (Sigma، آمریکا) در بافر فسفات دنتول و لوامیزول ۵۰ میلی مول اضافه شد. بعد از ۲۰ دقیقه شستشو توسط آب مقطر به واکنش میان آنزیم و سوبسترا خاتمه داده شد. اسلایدها با هماتوکسیلین مایر رنگ‌آمیزی زمینه (Counterstainted) و بعد از غوطه‌ور شدن در آب آمونیاکی با بافر تریس شستشو داده شدند. به کمک یک قطره چسب انتلان لامل روی لام قرار داده شد و با میکروسکوپ نوری بررسی و عکس‌برداری انجام شد (۱۸).

یافته‌ها

نتایج تداوم توانایی تولید آنتی‌بادی مونوکلونال توسط هر دو کلون $A_1G_9G_3$ و $A_1G_8F_7$

نتایج آزمون الیزای رقت‌های مختلف مایع رویی (سوپرناتانت) کلون‌های $A_1G_8F_7$ و $A_1G_9G_3$ ثابت کرد که این دو کلون بعد از ذوب مجدد هنوز توانایی تولید آنتی‌بادی را حفظ کرده‌اند. به صورتی که رقت‌های مختلف مایع رویی کشت کلون‌های هیبریدومایی قابلیت اتصال به آنزیم آلکالین فسفاتاز را داشته و در آزمایشات الیزا (Optical Density: OD) قابل قبولی را نشان می‌دادند (جدول ۱).

تولید آنتی‌بادی در صفاق موش

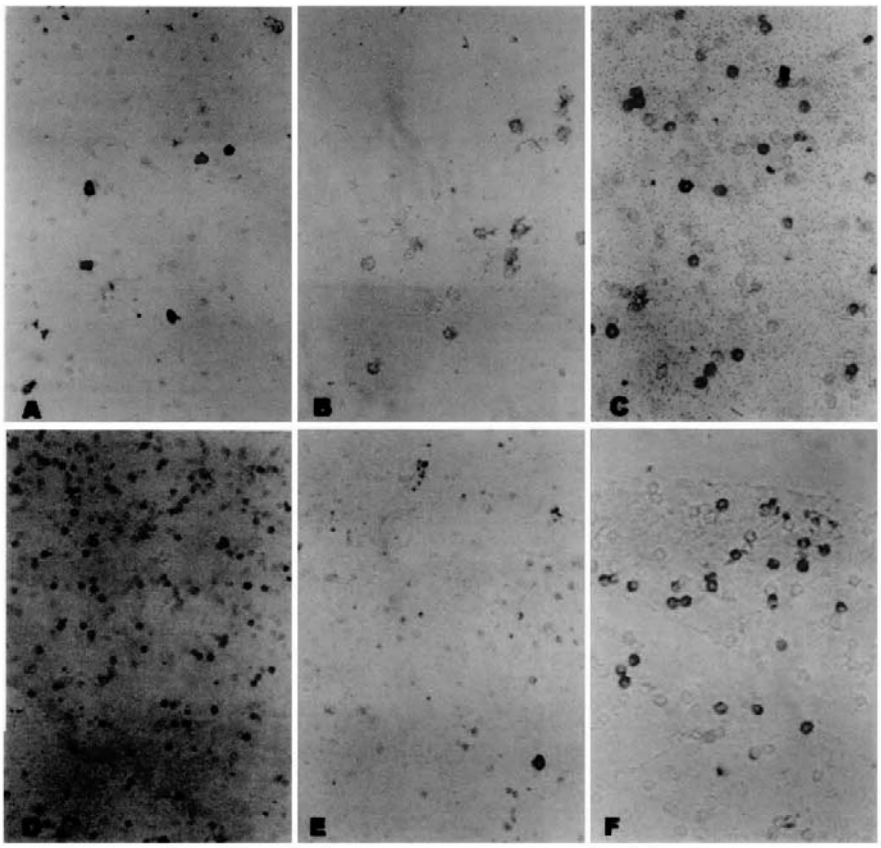
از ده سر موش تزریق شده به وسیله کلون‌های هیبریدومایی در ۶ موش تومور القا شد که پس از بزرگ شدن تومورها و قبل از مرگ، موش‌های توموری نخاعی شدند و مایع آسیت جمع‌آوری شد. از هر موش ۲ الی ۳ میلی‌لیتر مایع آسیت جمع‌آوری شد که در آزمایش‌های الکتروفورز باند گاما‌ی قوی را ایجاد می‌کردند (اطلاعات ارایه نشده است).

نتایج حاصل از تخلیص آنتی‌بادی

پس از تغلیظ آنتی‌بادی‌های مونوکلونال موجود در سوپرناتانت کشت سلولی، از ستون کروماتوگرافی تمایلی پروتیین G متصل به سفارز 4B برای خالص‌سازی آنتی‌بادی استفاده شد. میزان (Optical Density: OD) فراکشن‌های جمع‌آوری شده در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمودار ۱ نمونه‌ای از کروماتوگرام‌های به دست آمده را نشان می‌دهد.

جدول ۱: نتایج آزمون الیزای اختصاصی مایع رویی کشت دو کلون هیبریدومایی مورد آزمایش

جذب	نمونه	جذب	نمونه	جذب	نمونه
—	کنترل مثبت (سرم موش ایمن شده)	۱/۸۱	A1G9G3	۱/۵۱	A1G8F7
۲/۱۰	۱/۱۰۰۰	۱/۲۵	۱/۲	۱/۳۳	۱/۲
۱/۸۹	۱/۲۰۰۰	۱/۲۰	۱/۴	۱/۴۰	۱/۴
۱/۸۲	۱/۴۰۰۰	۱/۰۰	۱/۸	۱/۱۰	۱/۸
۱/۳۵	۱/۸۰۰۰	۰/۸۰	۱/۱۶	۱/۰۰	۱/۱۶
۱/۰۳	۱/۱۶۰۰۰	۰/۴۷	۱/۲۳	۰/۹۲	۱/۳۲
—	—	۰/۴۵	۱/۶۴	۰/۷۹	۱/۶۴
—	—	۰/۳۵	۱/۱۲۸	۰/۴۲	۱/۱۲۸
۰/۰۷	کنترل منفی	۰/۰۷	کنترل منفی	۰/۰۵	کنترل منفی



شکل ۱: رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمیایی لام سیتواسپین تهیه شده از لنفوسیت‌های خون محیطی به کمک کمپلکس APAAP تولیدی با غلظت‌های مختلف آنزیم آلکالین فسفاتاز. رنگ‌آمیزی زمینه با استفاده از هماتوکسیلین انجام گرفته است.

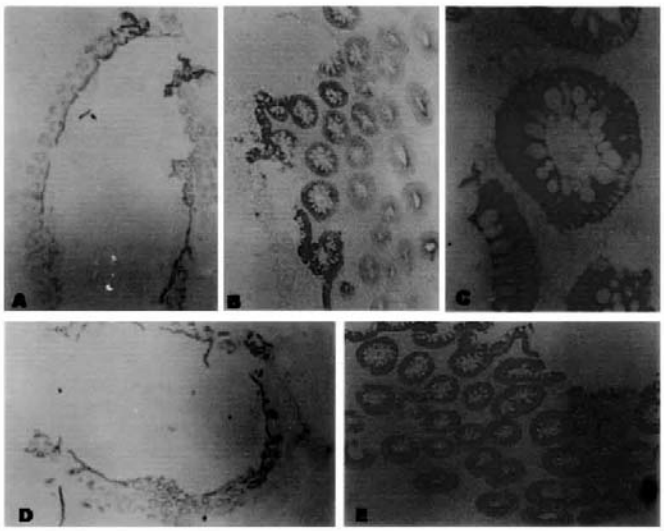
A: رنگ‌آمیزی لنفوسیت‌های CD_4^+ با کمک کمپلکس APAAP به دست آمده از کلون $A_1G_8G_3$ (غلظت آنزیم ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) (X۲۰۰)

B: رنگ‌آمیزی لنفوسیت‌های CD_4^+ با کمک کمپلکس APAAP به دست آمده از کلون $A_1G_9G_3$ (غلظت آنزیم ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) (X۲۰۰)

C: رنگ‌آمیزی لنفوسیت‌های CD_4^+ با کمک کمپلکس APAAP به دست آمده از کلون $A_1G_9G_3$ (غلظت آنزیم ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر) (X۲۰۰)

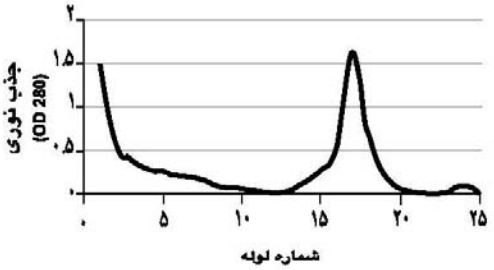
D: رنگ‌آمیزی لنفوسیت‌های CD_4^+ با کمک کمپلکس APAAP به دست آمده از کلون $A_1G_9G_3$ (غلظت آنزیم ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) (X۱۰۰)

E و F: رنگ‌آمیزی لنفوسیت‌های CD_4^+ با کمک کمپلکس APAAP به دست آمده از کلون $A_1G_8F_7$ (غلظت آنزیم به ترتیب ۱ و ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) (X۲۰۰)



شکل ۲: مقایسه رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی مقطع بافتی آپاندیس با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی ضد سیتوکراتین اپی‌تلیال و کمپلکس APAAP تجاری و تولیدی
A، B و C: رنگ‌آمیزی مقطع بافتی آپاندیس با کمک آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضدسیتوکراتین و APAAP تجارتی
شکل D و E: رنگ‌آمیزی مقطع بافتی آپاندیس با کمک آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضدسیتوکراتین و APAAP حاصل از کلون $A_1G_8F_7$. غلظت آنزیم به کار رفته در این کمپلکس ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر است.

همان طور که در این کروماتوگرام مشخص است پس از شستشوی کامل ستون کروماتوگرافی تمایلی و حذف پروتیین‌های اضافی OD نمونه خروجی به سمت صفر میل کرده و با اضافه کردن بافر با pH اسیدی آنتی‌بادی متصل شده به ستون از لوله شماره ۱۳ شروع به خارج شدن کرده است.



نمودار ۱: کروماتوگرام حاصل از خالص سازی آنتی بادی مونوکلونال $A_1G_9G_3$ با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی متصل به پروتیین G

نتایج ایمونوسیتوشیمی

با توجه به مناسب بودن میل پیوندی هر دو آنتی‌بادی مونوکلونال $A_1G_9G_3$ و $A_1G_8F_7$ برای آلکالین فسفاتاز، چرا که مقدار KD برای آنتی‌بادی مونوکلونال $A_1G_8F_7$ ،M $^{-9}$۳/۸×۱۰ و برای آنتی‌بادی مونوکلونال $A_1G_9G_3$ ،M $^{-9}$۴/۳×۱۰ به دست آمد (۱۶)، از هر دو برای تشکیل کمپلکس APAAP تولیدی استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی نمونه‌های سیتواسپین لنفوسیت‌های خون محیطی از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد CD4 و CD8 استفاده شد. به عنوان لایه سوم نیز از کمپلکس‌های APAAP تولیدی استفاده شد. نمونه‌ای از نتایج رنگ‌آمیزی لنفوسیت‌های خون محیطی با استفاده از کمپلکس‌های APAAP تولیدی و APAAP تجارتی در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج آزمایش‌های ایمونوسیتوشیمی نشان داد که کمپلکس APAAP تولید شده از غلظت ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر آنزیم آلکالین فسفاتاز و غلظت ۲/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی‌بادی‌های تولیدی از نظر کیفیت رنگ‌آمیزی کاملا قابل رقابت با کمپلکس تجاری است.

نتایج ایمونوهیستوشیمی

مقاطع بافت آپاندیس از نوع پارافینی بود که پس از عمل پارافین‌زدایی، آب‌گیری و رتریوال با استفاده از آنتی‌بادی آنتی‌سایتوکراتین و ایمونوکمپلکس APAAP تولیدی و تجاری رنگ‌آمیزی شدند. به عنوان سوبسترا از Fast Red استفاده شد و اسلایدها با هماتوکسیلین مایر رنگ‌آمیزی زمینه (Counterstainted) شدند. شکل ۲ نمونه‌ای از استفاده از کمپلکس تولیدی در روش ایمونوهیستوشیمی و مقایسه آن را با کمپلکس تجاری

نشان می‌دهد. همان طور که در رنگ‌آمیزی‌ها مشخص است کمپلکس APAAP تولیدی کارآیی مشابه نمونه خارجی در رنگ‌آمیزی‌های ایمونوهیستوشیمی دارد.

بحث

سنجش ایمنی (Immunoassay) شامل تمام آزمایش‌هایی است که براساس اتصال آنتی‌بادی اختصاصی به آنتی‌ژن استوار شده‌اند. با این تعریف سنجش ایمنی یا ایمونواسی شامل حوزه بسیار وسیعی از فعالیت‌های تشخیصی آزمایشگاهی می‌شود. یکی از پرکاربردترین تکنیک‌ها در ایمونواسی روش رنگ‌آمیزی ایمونولوژیک (Immunostaining) است که اولین بار در سال ۱۹۴۰ توسط کونز در دانشگاه پزشکی هاروارد برای ردیابی آنتی‌ژن‌های مربوطه در برش‌های منجمد با استفاده از آنتی‌بادی‌های نشان‌دار شده با فلورسیین (ایمونوفلورسانس) ابداع و به کار گرفته شد (۱).

امروزه به تمامی تکنیک‌های ایمونولوژیکی که جهت مشخص کردن آنتی‌ژن‌های اختصاصی موجود در بافت‌ها یا سلول‌ها بر پایه شناسایی کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی صورت می‌پذیرد، ایمونوهیستوشیمی (IHC) یا ایمونوسیتوشیمی (ICC) اطلاق می‌شود. از مهمترین دلایل توسعه این تکنیک‌ها در پاتولوژی تشخیصی، پیشرفت‌های تکنیکی در IHC است که ایجاد سیستم‌های حساس تشخیصی را در پی داشته است. در میان آنها نشانه‌گذاری آنزیمی (Immunoenzymestaining) که اولین بار به وسیله اورامس و همکاران در سال ۱۹۶۶ معرفی شد، شاید مهمترین روش باشد (۱۹، ۲۰).

ابداعات پی در پی بعدی از جمله ابداع تکنیک‌های چند مرحله‌ای نظیر پراکسیداز-آنتی‌پراکسیداز (PAP)، آلکالین فسفاتاز-آنتی‌آلکالین فسفاتاز (APAAP)، روش‌های بیوتین-استرپتاویدین (B-SA) همراه با روش‌های تقویت کننده (نظیر Tyamide) و سیستم‌های نشانه‌گذاری بسیار حساس براساس پلیمر، بیش از پیش استفاده از تکنیک‌های IHC را در آسیب‌شناسی عمومیت بخشید (۲).

از مهمترین مزایای روش‌های رنگ‌آمیزی ایمونولوژیک آنزیمی (Immunoenzymestaining) مقرون به صرفه بودن آن از نظر اقتصادی به علت امکان استفاده از رقت‌های بالای آنتی‌بادی‌های لایه اول و همچنین امکان بررسی نتایج با میکروسکوپ نوری معمولی و عدم نیاز به میکروسکوپ‌های گران قیمت ایمونوفلورسانس است. به ویژه با تکنیک‌های غیرمستقیم چند لایه نظیر APAAP و با امکان تکرار لایه‌های آخر، حساسیت (sensitivity) آزمایش بسیار افزایش پیدا می‌کند و با انتخاب صحیح آنتی‌بادی لایه اول اختصاصیت (specificity) آزمون نیز بسیار مناسب است (۲۱).

برای اینکه کمپلکس APAAP از پایداری لازم جهت انجام آزمایش‌ها و امکان نگهداری برخوردار باشد، میل پیوندی آنتی‌بادی مونوکلونال برای آنزیم باید مناسب باشد تا اتصال بین آنتی‌بادی و آنتی‌ژن به راحتی جدا نشود. برای تخمین افینیتی آنتی‌بادی‌های تولید شده، از روش الیزای غیررقابتی و رسم منحنی کلاتز استفاده شد. (۲۲) با توجه به افینیتی بالای آنتی‌بادی‌های تولیدی توسط هردو کلون هیبریدومایی، از محصول هردو کلون برای تولید کمپلکس APAAP استفاده شد.

بر اساس این تحقیق، کمپلکس ایمن به دست آمده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کلون‌های هیبریدومای $A_1G_9G_3$ و $A_1G_8F_7$ با آنزیم آلکالین فسفاتاز روده‌ای گاو می‌تواند در روش‌های آنتی‌بادی غیرنشاندار (Unlabelled Ab Procedures) از جمله تکنیک چند مرحله‌ای APAAP به منظور رنگ‌آمیزی آنتی‌ژن‌های بافت و سلول با حساسیت، ویژگی و کارآیی مناسب و قابل مقایسه با نمونه‌های مشابه خارجی (APAAP, DAKO) به کار گرفته شود.

مهمترین مساله‌ای که برای تهیه کمپلکس APAAP باید مدنظر قرار گیرد استفاده از غلظت مناسب آنتی‌بادی و آنتی‌ژن (آنزیم آلکالین فسفاتاز) جهت تشکیل یک کمپلکس پایدار با کارآیی و حساسیت بالا و در عین حال مقرون به صرفه است.

به طور کلی اگر مقدار آنتی بادی مونوکلونال به کار رفته در کمپلکس زیاد (excess) باشد، شدت رنگ کاهش خواهد داشت و چنانچه مقدار آنتی‌ژن زیاد (excess) باشد، موجب هدر دادن آنزیم خواهد شد.

در این مطالعه به منظور تولید کمپلکس مورد نظر از غلظت‌های ۸ و ۲/۴ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنزیم آلکالین فسفاتاز با غلظت ثابت ۴ میکروگرم آنتی‌بادی استفاده شد و بر طبق نتایج رنگ‌آمیزی مشاهده شده، اقتصادی‌ترین غلظت آنزیم ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد. هر چند در مقایسه، غلظت ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر وضوح بیشتری دارد.

از آنجایی که برای آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تولیدی با افزایش بیشتر غلظت آنتی‌ژن (از ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) نتیجه آزمایش ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی تغییری نکرد، می‌توان نتیجه گرفت کمپلکس بدست آمده از آن حداکثر از یک مولکول آنتی‌بادی و دو مولکول آنزیم تشکیل می‌شود و شبکه‌ای از آنتی‌بادی و آنتی‌ژن به وجود نمی‌آید. بنابراین پس از اشباع شدن سایت‌های اتصالی آنتی‌بادی توسط آنتی‌ژن، آنزیم‌های متصل نشده طی مراحل شستشو حذف خواهند شد. این استدلال با نتایجی که کردل و هومان نیز ارایه کرده‌اند مطابقت می‌کند. همچنین ناتوانی آنتی‌بادی مونوکلونال برای تشکیل کمپلکس‌های ایمن بزرگ خطر بی‌ثباتی کمپلکس را در مدت زمان نگهداری کاهش می‌دهد (۱۲، ۲۰).

نتیجه‌گیری

به طور کلی در روش‌های ایمونوهیستوشیمی و ایمونوسیتوشیمی برای انتخاب یک نشان (label) مانند آلکالین فسفاتاز (ALP) یا پراکسیداز (HRP) ملاحظات اولیه عبارتند از: پایداری یا تداوم نتایج، حساسیت آن، حضور یا عدم حضور نوع اندوژنوس نشان در بافت و مشکلات موجود در حذف آن، نوع رنگ زمینه‌ای که می‌تواند با آن به کار گرفته شود و امکان

نشانه‌گذاری دو گانه (Double Labeling). استفاده از کمپلکس APAAP در روش‌های رنگ‌آمیزی ایمونولوژیکی غالبا می‌تواند کارگشا باشد (۲۵-۲۳). با توجه به موارد مذکور و کارآیی کمپلکس APAPP تولیدی استفاده از آن در آزمایش‌های پاتولوژی تشخیصی توصیه می‌شود.

تقدیر و تشکر

این پروژه بخشی از طرح ملی تولید مجموعه‌های ایمنی PAP و APAAP به منظور توسعه روش‌های چشمی تشخیصی شاخص‌های سلولی است، لذا لازم است از شورای پژوهش‌های علمی کشور و سازمان مدیریت و برنامه ریزی به خاطر تامین اعتبار آن و سایر همکاری‌هایی که مبذول داشته‌اند، تشکر کنیم.

References

1. Coons AH: The beginnings of immunoflurescense. J. Immunol. 1961; 87: 499-503

2. Brandtzaey P: The increasing power of immunohistochemistry and immunocytochemistry. J Immunol Meth, 1998; 216: 49-67

3. Engel C, Forberg J, Holinski-Feder E, Pagenstecher C, Plaschke J, Kloor M: Novel strategy for optimal sequential application of clinical criteria, immunohistochemistry and microstellite and lysis in the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Int J Cancer, 2006; 118(1): 115-122

4. Castilla EA, Prayson RA, Abramovich CM, Cohen ML. Immunohistochemical expression of cathepsin D in menengiomas. Am J Clin Pathol, 2003; 119(1): 123-128

5. 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

6. Honig A, Rieger L, Kapp M, Dietl J, Kammere U: Immunohistochemistry in human placental tissue – pit falls of antigen detection. J Histochem Cytochem, 2005; 53(11): 1413-1420

7. Vinograd TM, Balashova EE, Smirnov VN, Bystrevskaya VB. Detection of the centriole tyr- or acet-tubulin changesin endothelial cells treated with thrombin using microscopic immunocytochemistry. Cell Motil Cytoskeleton, 2005; 62(1): 1-12

8. Das DK, Pathan SK, Agyash EH. Metastatic neuroendocrine carcinoma with cytologic features suggestive of secretory activity; a study by fine-needle aspiration and immunocytochemistry. Diagn Cytopathol, 2005; 33(3): 173-175

9. Wanninger A. Immunocytochemistry of the nervous system and the musculature of the chordoid larva of symbion Pandora J Morphol, 2005; 265(2): 237-243

10. Stenberger LA, Hardy Jr PH, Cuculis IJ, Mayer HG. The unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen- antibody complex and its use in identification of spirochetes. J Histochem Cytochem, 1970; 1(8): 315-333

11. Peter ML, Theo HV, Martin D, Wimp Z. Stepwise amplified immunoperoxidase (PAP) staining. Cellular morphology in relation to membrane markers. J Histochem Cytochem, 1984; 32(2): 172-178

12. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghash AK, Abdolaziz Z, Mac Donald S, Poulfar KA, Stein H, Mason DY. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP) complexes. J. Histochem Cytochem 1984; 32: 219-29

13. Arasteh KN, Simon V, Musch R, Weiss RO, Przytarski K, Futh UM, Pleuger F, Huhn Lage MP. Sensitivity 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): 559-563

14. Eftekharian MM, Moazzeni SM, Pourfathollah AA. Production of monoclonal antibody against alkaline phosphatase. Yakhteh, 2004; 19: 129-136

15. Margulies DH. Production of monoclonal antibodies. In: Current protocols in immunology. Edited by Golgien JE. 1991; 251-257

16. Naseri N. Moazzeni SM, Pourfathollah AA, Mesbahzadeh B. Measurement of affinity constant of anti- alkaline phosphatase monoclonal antibody using an ELISA based method. Journal of Birjand University of Medical Sciences, 2005; 11(4): 33-39

17. Swerts K, Ambors PF, Brouzes C, Navarro JM, Gross N, Rampling D, Schumacher- Kuckelkorn R. Standardization of the immunocytochemical detection of neuroblastoma cells in bone marrow. J Histochem Cytochem, 2005; 53(12): 1433-1440

18. Missotten GS, Korver JG, Wplf-Rouen daal D.

Heat shock protein expression in the eye and in uveal melanoma. IOVS, 2003; 44(7): 3059-3065
19. Avrameas S, Uriel J: Method of antigen and antibody labeling with enzymes and its immunodiffusion application. C. R. Acad Sci, 1966; 262: 2543-2545
20. Cooper G, Wilson L, Reid C, Baldwin D, Hand C, Spiehler V. Validation of the cozart microplate EIA for analysis of opiates in oral fluid. Forensic Sci Int. 2005; 154(2-3): 240-246
21. Hohmann A, Hodgson AJ, Skinner JM, Bradley J, Zola H. Monoclonal alkaline phosphatase – anti-alkaline phosphatase (APAAP) complex: production of antibody, optimization of activity, and use in immunostaining. J Histochem Cystochem, 36: 137
22. Rath S, Stanly CM, Steward MW. An inhibition enzyme immunoassay for heterogenicity. J Immunol. Meth 1998; 106: 245-249
23. Babic T, Basic H, Miljkovic B, Kocic B, Tasic G. Detection of helicobacter pylori in gastric biopsy and resection specimens, vojnosanit pregl, 2005; 62(1): 39-43
24. Splichal I, Fagerhol MK, Trebichsky I, Splichalova A, Schulze J: The effect of intestinal colonization of germ- free pigs with escherchia coli on calprotectin levels in plasma, intestinal and bronchoalveolar lavages. Immunobiol, 2005; 209(9): 681-687
25. Jaskiewicz K, Rzepko R, Dubaniewicz A, Jassem E, Raczynska K: Pregranulomatous phase of sarcoidosis: Immunohistochemical diagnosis, Acta Histochem, 2006; 107(9): 473-4770