مقاله پژوهشی

تولید انبوه آنتی‌بادی مونوکلونال علیه پپتید خارج سلولی CD20 و ارزیابی اتصال اختصاصی آن به سلول‌های بیان‌کننده CD20

کوشان سینه سپهر[۱]، بهزاد برادران[۲]، جعفر مجیدی[۳]، جلال عبدالعلی زاده[۴]

تاریخ دریافت 1392/11/05 تاریخ پذیرش 1393/01/21

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: امروزه با پیشرفت فنّاوری هیبریدوما در تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال این امکان فراهم شده که به‌واسطه این مواد، مارکرهای مختلف سلولی در سطح سلول‌های نرمال و بدخیم ارزیابی گردد. CD20، فسفوپروتئین غیر گلیکوزیله، یک مارکر مناسب در تشخیص لوسمی و لنفوم‌ها می‌باشد که تقریباً در ۹۵ درصد از سلول‌های B نرمال و بدخیم به جز در سلول‌های اولیه و پلاسماسل، بیان می‌گردد. هدف این مطالعه تولید آنتی‌بادی مونوکلونال برعلیه مارکر CD20 و ارزیابی اتصال اختصاصی آن در سلول‌های بیان کننده CD20 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا موش‌های Balb/c در چهار نوبت با ۱۰۰ میکروگرم پپتید خارج سلولی CD20، ایمونیزه گردیدند و سپس فیوژن سلول‌های طحال ایمن‌ترین موش با سلول‌های میلومایی SP2/0 به‌وسیله پلی‌اتیلن گلیکول(PEG) صورت گرفت. کلون مطلوب برای رقت سازی محدود (limiting dilution) انتخاب گردید. تولید انبوه آنتی‌بادی مونوکلونال به روش مایع آسیت صورت گرفت. تخلیص آنتی‌بادی مونوکلونال با روش افینیتی کروماتوگرافی پروتئین A انجام شد و با SDS-PAGE نیز تأیید گردید. اتصال اختصاصی آنتی‌بادی با ارزیابی‌های ایمونولوژیکی مثل الایزا و ایمونوفلورسانس و فلوسایتومتری صورت گرفت.

یافته‌ها: پس از انجام فیوژن سلولی و غربالگری کلون‌ها، یک کلون مطلوب با جذب نوری(OD) حدود ۲ در آزمون الایزا به دست آمد. با تخلیص مایع آسیت با ستون افینیتی کروماتوگرافی پروتئین A , ۵ میلی‌گرم آنتی‌بادی مونوکلونال خالص به دست آمد. نتایج SDS-PAGE خلوص محصول کروماتوگرافی را تأیید نمود. نتایج الایزا و ایمونوفلورسانس و فلوسایتومتری اتصال اختصاصی به CD20 را نیز تأیید نمود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که از آنتی‌بادی مونوکلونال تولیدشده علیه CD20 می‌توان در ارزیابی‌های ایمونولوژیکی نظیر الایزا و ایمونوفلورسانس و فلوسایتومتری استفاده نمود.

کلمات کلیدی: آنتی‌بادی مونوکلونال، CD20، افینیتی کروماتوگرافی، فلوسایتومتری

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره چهارم، ص ۳۷۲-۳۶۳، تیر ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه: مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز. تبریز، ایران- تلفن:۴۱۱۳۳۶۴۶۶۵

Email: behzad_im@ymail.com

مقدمه

لنفوسیت‌های B به‌عنوان یکی از سلول‌های سیستم ایمنی می‌باشد که سهم عمده‌ای در بدخیمی‌های سلول‌های خونی دارد به‌طوری‌که در حدود ۷۵ درصد کل لوسمی‌های لنفوئیدی و ۹۰ درصد از کل لنفوم‌ها از سلول‌های B منشأ می‌گیرند. سلول‌های B منشأ سلولی ایمنی همورال هستند و در خون ۱۵- ۱۰ درصد و در غدد لنفاوی ۲۵-۲۰ درصد و در طحال ۴۵-۴۰ درصد از لنفوسیت‌ها را شامل می‌گردند(۱).

اختلالات نئو پلاستیک سلول‌های B در مراحل مختلف رشد سلول‌های B اتفاق می‌افتد. بنابراین لنفوم‌های سلول B در مورفولوژی، مکانیسم و بروز آنتی‌ژن‌های سطحی سلول B یا ایمونوفنوتایپ بسیار متفاوت هستند(۲-۵). یکی از مارکرهای سلول‌های B که می‌توان از آن برای روند تشخیص لوسمی و لنفوم‌های سلول‌های B و تمایز مراحل مختلف بلوغ سلول‌های

[۱] کارشناس ارشد ایمنی شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی پزشکی، تبریز، ایران

[۲] استادیار ایمنی شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، داشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

[۳] استاد ایمنی شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، داشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

[۴] استادیار بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، داشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-24]

B استفاده نمود، CD20 می‌باشد که تقریباً در ۹۵ درصد از لنفوماهای سلول‌های B نیز بیان می‌گردد(۵-۸).

آنتی‌ژن CD20 یک فسفو پروتئین غشایی ۳۵ کیلو دالتونی است که بر روی pre-B و لنفوسیت B بالغ قرار گرفته است. CD20در طول توسعه طبیعی سلول‌های B نسبت به مارکرهای دیگر دیرتر ظاهر می‌شود و مقدار غشایی آن به‌طور پیش‌رونده‌ای در طول تمایز افزایش می‌یابد، این شاخص در تنظیم چرخه سلولی، روند تکامل سلول و همچنین به‌عنوان کانال یون کلسیم نیز عمل می‌نماید(۹-۱۱).

در حال حاضر برای تشخیص و تعیین انواع زیرگروه‌های لنفوما و لوسمی‌ها می‌توان از آنالیز ایمونوفنوتایپیک مارکرهای سطحی لنفوسیت‌ها توسط آنتی‌بادی منوکلونال استفاده نمود که میزان و نوع مارکر می‌تواند نشان‌دهنده نوع بدخیمی و مرحله‌ای که بدخیمی در آن قرار دارد باشد. در استفاده از این روش، فن رایج فلوسایتومتری می‌باشد که از آنتی‌بادی منوکلونال کونژوگه شده با ماده فلورسانس برای تشخیص مارکرهای سطحی سلول‌ها استفاده می‌گردد. این فن به علت استفاده از آنتی‌بادی منو کلونال دارای اختصاصیت و حساسیت بالایی است که حتی می‌تواند حضور آنتی‌ژن‌های سطحی را که مقدار آن‌ها کاهش یافته است را اندازه‌گیری نماید(۱۲-۱۴).

با انجام این تحقیق ما سعی در تولید آنتی‌بادی منوکلونال علیه CD20 را داریم تا بتوانیم از آن برای ارزیابی این مارکر در سطح سلول‌ها استفاده نماییم.

مواد و روش‌ها

ایمونیزاسیون:

ایمن‌سازی بر روی چهار موش ماده Balb/c صورت گرفت و یک پپتید سنتتیک از توالی N-terminal و خارج سلولی CD20 (SLVGPTQSF, Modmab, Sweden) انسانی به‌عنوان ایمونوژن انتخاب گردید و یک بنیان سیستئین برای تسهیل کونژوگاسیون با کریر در ناحیه C-terminus قرار داده شد سپس پپتید با Keyhole Limpet (KLH,Thermo, USA) Hemocyanin، کونژوگه شدند.

تزریق کونژوگه‌های پپتید به‌طور هم‌زمان به چهار موش و در چهار نوبت انجام گرفت. در نوبت اول، برای ایمونیزاسیون اولیه هر موش، ۱۰۰ میکروگرم کونژوگه پپتید-KLH را با ۱۰۰ میکرو لیتر از ادجوانت کامل فروند(Sigma-USA) مخلوط نموده و به هر موش امولسیون مذکور هم به‌صورت زیر جلدی و هم داخل صفاقی تزریق گردید.

۲۱ روز بعد از تزریق اول، تزریق یادآور انجام گرفت. تهیه آنتی‌ژن دقیقاً مشابه تزریق اولیه بود، با این تفاوت که در یادآوری‌ها از ادجوانت ناقص فروند استفاده گردید. آنتی‌ژن به‌صورت زیر جلدی در ناحیه پشت گردن و داخل صفاقی تزریق گردید. دومین تزریق یادآوری ۳ هفته پس از اولین تزریق یادآوری صورت گرفت. یک هفته قبل از انجام فیوژن، از ناحیه دم موش‌ها خون‌گیری به عمل آمد و تیتر آنتی‌بادی ضدپپتید به روش الایزا بررسی گردید. موشی که دارای بالاترین تیتر آنتی‌بادی بود، جهت انجام فیوژن انتخاب شد. سه روز قبل از انجام فیوژن، ۵۰ میکروگرم کونژوگه به‌صورت داخل وریدی (Intravenous Injection) بدون ادجوانت تزریق گردید.

آزمون الایزا ELISA :

برای تعیین تیتر آنتی‌بادی ضد پپتیدCD20 در موش‌های ایمن شده از روش الایزا استفاده گردید.

ابتدا، چاهک‌های پلیت الایزا , Nunc , Maxi sorp) (Denmark با پپتید-BSA با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در طول شب و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، پوشانده شدند .پس از سه بار شستشو با بافر(PBS-T(PBS -0.05% Tween 20 ، جایگاه‌های غیراختصاصی داخل هر چاهک با ۲ درصد (Bovine serum albumin)BSA مسدود گردید. پس از شستشوی مجدد، ۱۰۰ میکرو لیتر از رقت‌های مختلف سرم موش به چاهک‌های میکرو پلیت اضافه گردید. سپس سطح میکرو پلیت را با چسب نواری پوشانده و به مدت ۱ ساعت در $37^{\circ}C$ قرار داده شد.

پس از شستشو، Rabbit–anti mouse IgG کونژوگه با آنزیم *HRP* (شرکت فرا طب) را ۱/۴۰۰۰ رقیق نموده، به مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از آن به همه چاهک‌ها اضافه گردید و به مدت ۶۰ دقیقه در $37^{\circ}C$ انکوبه شد. پس از شستشو سوبسترای TMB (3, 3', 5, 5'- Tetra Methyl Benzidine) به همه چاهک‌های میکرو پلیت ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه و در جای تاریک انکوبه گردید. واکنش رنگی پس از ۱۵ دقیقه، با اسیدسولفوریک ۵ درصد متوقف و جذب نوری(Optical Density چاهک‌ها با دستگاه ELISA Reader (STAT FAX 303^{+}) در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

فیوژن سلولی و تولید سلول هیبریدوما:

یک هفته قبل از فیوژن، سلول‌هایSP2/0 میلومای موشی در محیط RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (Fetal bovine serum,Gibco,U.S.A) FBS، ۱۰۰Iu/ml پنی سلین، ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵ درصد Co2 و رطوبت اشباع، تکثیر شدند .فیوژن سلول‌های طحال موش با سلول‌هایSP2/0 با استفاده از Poly Ethylen Glycol

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-24]

(Sigma), (PEG1450)1450 و به نسبت ۵:۱ انجام شدند. سپس سلول‌های حاصل از فیوژن در محیط RPM I کامل حاوی ۲۰ درصد سرم جنین گاو و HAT(4x) در پلیت‌های ۹۶ خانه (Nunc, Denmark)در حجم ۱۰۰ میکرو لیتر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباتور CO2 کشت داده شد. سوپر ناتانت چاهک‌ها ۱۰،۷،۴ و ۱۴ روز پس از فیوژن با محیط HAT4X(Sigma) تعویض گردیدند.

غربالگری و کلونینگ هیبریدوما ها:

10روز پس از کشت سلول‌ها، سوپرناتانت چاهک‌های حاوی سلول‌های هیبریدوما جمع‌آوری شدند و ازنظر تولید آنتی‌بادی اختصاصی به روش الایزا موردبررسی قرار گرفتند .برای این کار به‌طور خلاصه ابتدا چاهک‌های الایزا با ۱۰µg/ml از BSA-پپتید پوشیده شدند و سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول رویی چاهک‌های حاوی سلول‌های هیبریدوما به چاهک‌ها اضافه گردید. از چاهک‌های دارای جذب بالا برای کلونینگ به روش رقت محدودکننده (Limiting Dilution) استفاده گردید. در این روش سلول‌ها به‌صورتی رقیق شدند که در هر ۱۰ میکرو لیتر یک سلول قرار بگیرد درنهایت سوپرناتانت تک کلون‌ها با استفاده از الایزا جهت تولید آنتی‌بادی غربالگری گردیدند و تک کلون با بالاترین جذب نوری به‌عنوان کلون مطلوب انتخاب گردید.

تعیین ایزوتایپ آنتی‌بادی:

برای تعیین کلاس و زیر کلاس زنجیره‌های سنگین و سبک آنتی‌بادی‌های منوکلونال تولیدشده، از کیت الایزا، (Thermo,USA) استفاده گردید. ابتدا مایع رویی کلون به نسبت ۱ به ۱۰ با بافر TBS (Tris Buffer Salin) رقیق گردید. سپس ۵۰ میکرو لیتر از مایع رویی کلون رقیق‌شده به ۸ چاهک مشخص‌شده در کیت ریخته شد(هر یک از چاهک‌ها جهت مشخص نمودن یک ایزوتایپ خاص بکار می‌رود).

۵۰ میکرو لیتر از Goat Anti-Mouse IgG+IgA+IgM کونژوگه با HRP به هر چاهک ریخته شد. پس از انکوباسیون در دمای اتاق سوبسترا TMBبه هر چاهک اضافه شد. جذب چاهک‌ها با الایزا ریدر در ۴۵۰ *nm* اندازه‌گیری شدند و جذب بالای ۰/۲ به‌عنوان مثبت در نظر گرفته شد.

تولید انبوه آنتی‌بادی منوکلونال:

ابتدا ۴ موش *Balb / c* ۴ الی ۶ هفته‌ای از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. سپس مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر پریستان (*SIGMA* , *P*1403, *UK*) به‌صورت داخل صفاقی به هر موش تزریق گردید. ۱۰ روز بعد، سلول‌های هیبریدوما که کاملاً زنده و براق بودند به تعداد $۱×۱۰^{۶}$ سلول که دوبار با (Phosphate buffered saline) PBS شسته شده بودند به داخل صفاق هر موش تزریق گردید.

۱۰ روز بعد از تزریق سلول‌ها، مایع آسیت تشکیل شده و شکم موش‌ها بزرگ و پوست آن کاملاً کشیده شده بود. در این مرحله با فرو بردن سرسوزن ۱۹ به داخل صفاق موش، مایع آسیت قطره‌قطره در بشر جمع‌آوری گردید. تیتر مایع آسیت توسط روش الایزا بررسی گردید.

تخلیص مایع آسیت توسط افینیتی کروماتوگرافی با پروتئین A:

. برای تخلیص مایع آسیت ابتدا از سولفات آمونیوم اشباع جهت تغلیظ و تخلیص نسبی استفاده شد و پس از یک شب دیالیز در مقابل PBS برای تخلیص بیشتر از افینیتی کروماتوگرافی A استفاده گردید.

ابتدا ستون Protein A- Sepharose با بافر PBS(100mM , pH:7.4) شستشو داده شد تا pH بافر خروجی با ورودی یکسان شود. سپس چون کلاس آنتی‌بادی تولیدی از نوع IgG2a بود از بافر تعویض‌کننده (100mM citrate buffer,10mM Tris.Hcl pH:4.5) استفاده کرده و نمونه‌ها توسط fraction collector در لوله‌ها جمع‌آوری گردید. برای Elute سایر ایمونوگلوبولین‌ها از بافر گلیسین (0.1M glycine ,PH:2.7) استفاده گردید. جذب لوله‌ها در ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند. واکنش‌پذیری آنتی‌بادی تخلیص شده با CD20 روی سلول‌های Raji (10^6 cells/well)و BSA-پپتید (10 µg/ml) به روش الایزا بررسی گردید.

تأیید خلوص آنتی‌بادی تولیدشده به روش SDS-PAGE:

برای تأیید خالص بودن آنتی‌بادی از SDS-PAGE استفاده شد که نمونه‌های خالص باهم مخلوط شده و درنهایت برای تأیید دوباره SDS-PAGE در شرایط احیا و غیر احیا گذاشته شد. (۱۰۰ میکروگرم)۸۰ میکرو لیتر از آنتی‌بادی تخلیص شده با ۲۰ میکرو لیتر بافر نمونه مخلوط گردید. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای جوش انکوبه گردید و روی یخ سرد گردید. الکتروفورز با غلظت ژل ۱۲/۵٪ توسط mini- PROTEAN electrophoresis instrument(Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) با جریان ۱۰۰ ولت به مدت یک ساعت صورت گرفت و سپس ژل مربوطه با رنگ کوماسی بلو R250 (Sigma) رنگ‌آمیزی گردید.

کونژوگاسیون آنتی‌بادی با FITC:

برای این کار ۲ mg/ml از آنتی‌بادی منوکلونال به ۴۵۰ میکرو لیتر بافر واکنش ,(pH = 9.2 500 Mm Carbonate) اضافه گردید و در مقابل PBS یک شبانه‌روز دیالیز انجام شد. ۱ میلی‌گرم

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-24]

FITC(SIGMA) در ۰/۱ میلی‌لیتر محلول DMSO Dimethyl sulfoxide) بدون آب حل شد. از محلول فوق ۸ میکروگرم برداشته و به ۰/۱ میلی‌گرم آنتی‌بادی اضافه‌شده و به مدت یک ساعت روی روتاتور قرار داده شد. برای جلوگیری از کاهش فلورسانس ماده فلوروکروم اطراف لوله با فویل آلومینیومی پوشانده شد. برای حذف FITC غیر کونژوگه از آنتی‌بادی کونژوگه، محلول موردنظر به مدت یک شبانه‌روز درمقابل بافر نگهداری(10mM Tris,150mM Nacl,0/1% NaH3,PH:8.2) دیالیز گردید.

رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس:

سلول‌های Raji به‌عنوان سلول‌های CD20+ و سلول‌های Molt-4 به‌عنوان کنترل منفی تهیه شدند.

سلول‌ها در پلیت‌های جداگانه توسط گلوتارآلدهید 0.25% (glutaraldehyde) کوت شدند و بعد از شستشو (PBS-T ,2times) توسط فرمالدئید ۳/۷ درصد فیکس گردیدند سپس از Skim milk 3% برای بلاکینگ استفاده شد.

آنتی‌بادی کونژوگه تولیدشده با رقت ۱۰۰۰ / ۱ به مدت یک ساعت (پوشانده با فویل و روی روتاتور) به سلول‌ها اضافه گردید. بعد از شستشو (PBS-T ,3times) در زیر میکروسکوپ فلورسانس بررسی شدند.

آنالیز CD20 در نمونه خون لوسمیک انسانی به روش فلوسایتومتری:

در این مرحله برای بررسی اتصال اختصاصی anti-CD20 به CD20 سطح سلول‌های خون انسانی، در شرایط پاراکلینیک از نمونه خون فرد مبتلا به (Acute lymphoblastic leukemia) ALL بستری‌شده در بخش لوسمی بیمارستان شهید قاضی تبریز استفاده شد و از آنتی‌بادی تولیدشده کونژوگه با FITC و آنتی‌بادی تجاری (کنترل مثبت) جهت شناسایی CD20 در نمونه موردنظر استفاده گردید.

ابتدا سلول‌های منونوکلوئر خون فرد بیمار توسط فایکول جدا شد. سپس در دو لوله مجزا و در هر لوله به تعداد $۱۰^{۶}$ سلول که در ۵۰۰ میکرو لیتر از PBS به‌صورت سوسپانسیون در آمده بود ریخته شد. سپس به مقدار مساوی از آنتی‌بادی تولیدشده و تجاری (Dako,Denmark) به لوله‌ها (آنتی‌بادی تولیدشده لوله شماره ۱ و آنتی‌بادی تجاری لوله شماره ۲) اضافه گردید و لوله‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردیدند پس از ۴۵ دقیقه سلول‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری(BD, USA) مورد آنالیز قرار گرفتند.

یافته‌ها

تیتراسیون سرم موش‌های ایمن شده به روش الایزا و با استفاده از پپتید -BSA نشان داد که موش‌ها پس از دریافت سومین دوز آنتی‌ژن، آنتی‌بادی با تیتر مناسب علیه پپتید موردنظر تولید کرده‌اند(جدول ۱). بعد از فیوژن، ۵ چاهک مثبت به دست آمد و ۳ چاهک جذب حدود ۱/۵ داشتند که یکی از آن‌ها برای LD استفاده گردید. از یک کلون استفاده‌شده برای LD یک کلون مطلوب (کلون 2-G8) دارای جذب ۱/۸ به دست آمد و درنهایت تمام مراحل ارزیابی با این کلون صورت گرفت.

جدول (۱): نتایج بررسی ایمونیزاسیون موش‌ها به روش الایزا

Mouse	*NC* *	*M* 1	*M* 2	*M* 3	*M* 4
OD	۰/۱	۱/۲	۰/۹	۱/۱	۰،۸

× کنترل منفی (سرم موش ایمن نشده با رقت ۱/۸۰۰۰).
- کلیه سرم‌ها با رقت ۱/۸۰۰۰ می‌باشد.

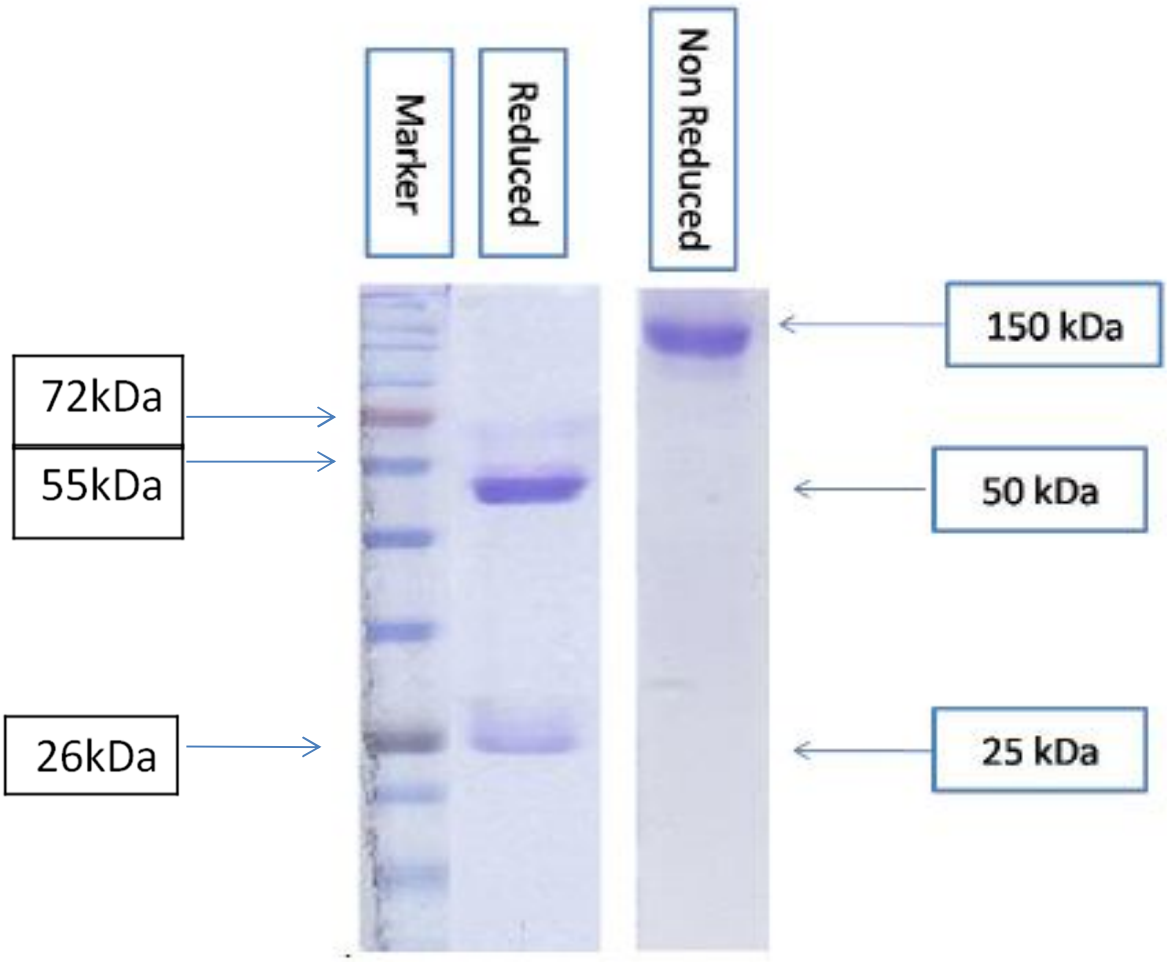
ایزوتایپ آنتی‌بادی منوکلونال تولیدی با استفاده از مایع رویی تک کلون مطلوب توسط کیت الایزا انجام شد و نتایج نشان داد که آنتی‌بادی منوکلونال حاصل از کلون 2-G8 از کلاس IgG2a و دارای زنجیره سبک کاپا می‌باشد.

برای تولید انبوه آنتی‌بادی منوکلونال در مایع آسیت ۱۰ روز پس از تحریک صفاق ۴ موش با پریستان، تعداد $۱۰^{۶}$× ۱ سلول از کلون مطلوب(2-G8) در حال رشد لگاریتمی به هر موش تزریق گردید؛ که پس از ۱۰ روز شکم ۴ موش بزرگ‌شده و مایع آسیت تشکیل یافت. که به‌وسیله سرسوزن ۱۹ در مرحله اول حدود *ml* ۵ مایع آسیت به دست آمد و مجدداً بعد از ۳ روز حدود *ml* ۳ دیگر مایع آسیت جمع‌آوری گردید.

در پروسه تخلیص آنتی‌بادی در ابتدا غلظت پروتئین در مایع آسیت تولیدی حدود mg/۸ ml ۴۰ بود که در مرحله بعد، پس از تخلیص نسبی توسط سولفات آمونیوم اشباع و یک‌شب دیالیز در

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-24]

مقابل بافر PBS، غلظت آن‌ها به ۱۸ میلی‌گرم کاهش پیدا کرد و درنهایت پس از شستن ستون افینیتی کروماتوگرافی توسط بافرسیترات در pH: ۴/۵، حدود ۵ میلی‌گرم آنتی‌بادی منوکلونال علیه CD20 با کلاس IgG2a به دست آمد. برای تأیید خالص بودن آنتی‌بادی از *SDS – PAGE* استفاده شد که نمونه‌های خالص باهم مخلوط شده و درنهایت برای تأیید دوباره *SDS – PAGE* در شرایط احیا و غیر احیا گذاشته شد. ۲ باند ظاهرشده در *SDS – PAGE* در شرایط احیا در موقعیت‌های ۲۵ و ۵۰ کیلو دالتون نشان‌دهنده زنجیره‌های سبک و سنگین می‌باشد. در شرایط غیر احیا نیز تنها باند ظاهرشده در موقعیت ۱۵۰ کیلو دالتون نشان می‌دهد که آنتی‌بادی به‌صورت خالص تولیدشده است (شکل ۱).



شکل (۱): *SDS – PAGE* آنتی‌بادی تخلیص شده در شرایط احیا و غیر احیا. در شرایط احیا دو باند,50kDa(زنجیره سنگین) و kDa۲۵ (زنجیره سبک) و در شرایط غیر احیاء تنها یک باند 150kDa (زنجیره سبک و سنگین) تشکیل گردید.

تیتر آنتی‌بادی تخلیص شده و مایع آسیت و قابلیت شناسایی مارکر CD20 در سطح سلول‌های راجی و شناسایی پپتید توسط آنتی‌بادی تخلیص شده توسط تست الایزا بررسی گردید. نتایج الایزا جذب نوری ۱/۷ برای پپتید – BSAو جذب نوری ۱/۵ برای سلول‌های راجی با رقت ۱/۱۶۰۰۰ آنتی‌بادی تخلیص شده نشان داد(جدول ۲).

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-24]

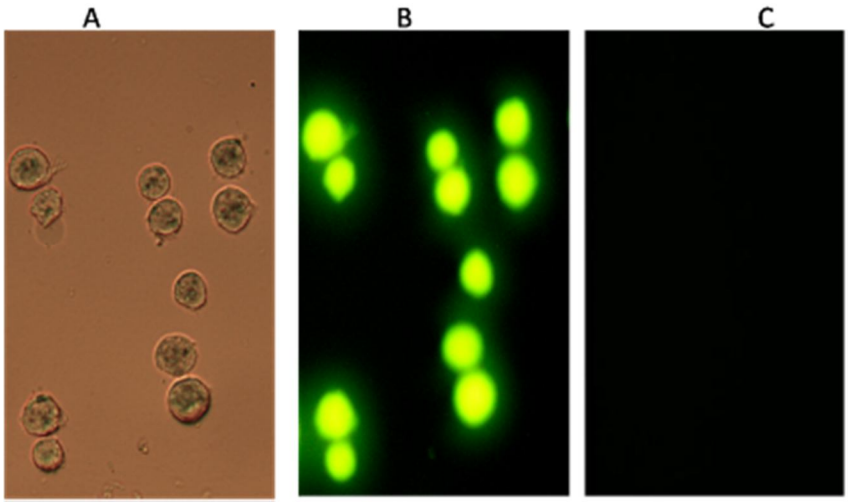
جدول (۲): بررسی مقایسه تیتر آنتی‌بادی در مایع آسیت و آنتی‌بادی تخلیص شده

NC (SP2/0)	NC* (Non-immune mouse serum)	PC** (Immune mouse serum)	Ascetic fluid/BSA-Peptide (1/16000 dilution)	Purified Antibody/BSA-Peptide (1/16000 dilution -	Purified Antibody/Raji cell (1/16000 dilution-
۰/۰۷	۰/۰۱	۱/۲	۱/۰۸	۱/۷	۱/۵

× کنترل منفی (سرم موش ایمن نشده با رقت ۱/۸۰۰۰).

×× کنترل مثبت (سرم موش ایمون با رقت ۱/۸۰۰۰).

برای بررسی قابلیت استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال در رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس، سلول‌های Raji و Molt-4 با آنتی‌بادی کونژوگه شده با FITC انکوبه شدند که درنهایت باعث رنگ گرفتن سلول‌های Raji به‌صورت اختصاصی گردید (شکل ۲).



شکل (۲): رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس سلول‌های .Raji با آنتی‌بادی تولیدشده

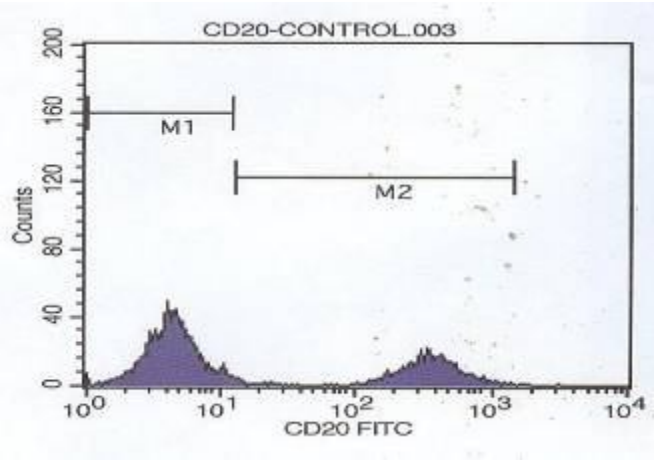
A. نمای سلول‌های راجی قبل از رنگ‌آمیزی، با میکروسکوپ نوری (۲۰X)

B. نمای سلول‌های راجی بعد از رنگ‌آمیزی، با میکروسکوپ ایمونوفلورسانس(۲۰X)

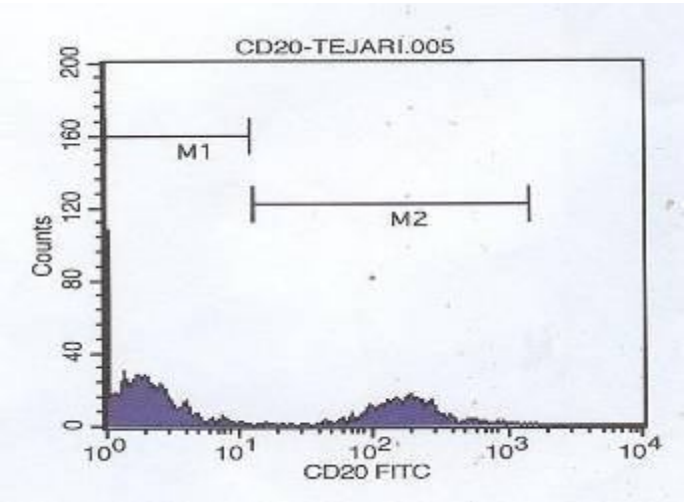
C. نمای سلول‌های Molt-4(کنترل منفی) بعد از رنگ‌آمیزی، با میکروسکوپ ایمونوفلورسانس (۲۰X)

نتایج فلوسایتومتری نشان‌دهنده اتصال اختصاصی آنتی‌بادی به CD20 می‌باشد. در مقایسه نتایج، میزان CD20 در سلول‌های فرد بیمار توسط آنتی‌بادی تولیدشده در این طرح ۳۱/۳۰ درصد (شکل ۳) و توسط آنتی‌بادی تجاری ۳۴/۹۲ درصد گزارش گردید(شکل ۴). طبق نتایج به‌دست‌آمده توانایی شناسایی آنتی‌بادی تولیدشده در مقایسه با آنتی‌بادی تجاری ۳/۶ درصد اختلاف دارد و این نتایج نشان‌دهنده این است که آنتی‌بادی تولیدشده تقریباً معادل آنتی‌بادی تجاری قدرت شناسایی مارکر CD20 در سطح سلول‌های خون انسانی در شرایط تشخیصی پاراکلینیک را دارد.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-24]



شکل (۳): نتایج فلوسایتومتری نمونه بیمار توسط آنتی‌بادی تولیدشده: میزان CD20 در سلول‌های فرد بیمار، توسط آنتی‌بادی تولیدشده ۳۱/۳۰ درصد گزارش گردید.



شکل (۴): نتایج فلوسایتومتری نمونه بیمار، توسط آنتی‌بادی تجاری: میزان CD20 در سلول‌های فرد بیمار، توسط آنتی‌بادی تجاری ۳۴/۹۲ درصد گزارش گردید.

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های خونی با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال کاربرد وسیعی در تشخیص و طبقه‌بندی اختصاصی لوسمی‌ها دارد و درواقع شناسایی هر مارکر سلولی توسط آنتی‌بادی‌های منوکلونال امکان شناسایی سلول خاصی را در جمعیت‌های مختلف سلولی که ممکن است ازلحاظ شکل ظاهری و نمای میکروسکوپی مشابه و حتی غیرقابل‌تفکیک باشد فراهم می‌آورد. در حال حاضر استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال به‌عنوان یک ابزار اساسی برای تشخیص‌های ایمونولوژیک از قبیل رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس، فلوسایتومتری، الایزا و... کاربرد گسترده‌ای دارد(۱۵, ۱۶).

در این پروژه، آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضدCD20 با استفاده از پپتیدی که دارای بخشی از توالی ناحیه خارج سلولی CD20 بود، تولید و خصوصیات آن‌ها موردبررسی قرار گرفت. در طراحی این پپتید، سکانس‌های هیدروفیل در سطح پپتیدها، مناسب بودن پپتید ازنظر کونژوگاسیون و نداشتن واکنش متقاطع موردتوجه بوده است. برای افزایش ایموژنسیتی، پپتیدها با پروتئین حامل Kyhole limpet haemocyanin کونژوگه شدند. در تحقیقی مشابه Hadavi و همکاران نیز از پپتید نستین کونژوگه شده با

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-24]

KLH برای ایمونیزاسیون استفاده نمودند و نتایج ایمونیزاسیون مطلوبی را کسب نمودند(۱۷). درنهایت پایش ایمونیزاسیون با طراحی الایزا صورت گرفت که OD بالا با تیتر ۱/۸۰۰۰ نشان‌دهنده موفقیت‌آمیز بودن ایمونیزاسیون می‌باشد.

در مرحله فیوژن سلول‌های طحال با سلول‌های میلومایی SP2/0 از PEG استفاده شد و سلول‌ها به نسبت ۵ به ۱ مخلوط شدند. از کلون استفاده‌شده برای LD یک کلون مطلوب دارای جذب ۱/۸ به دست آمد و درنهایت تمام مراحل ارزیابی با این کلون مطلوب صورت گرفت.

جهت تحریک صفاق موش با پریستان مقادیر مختلفی از پریستان استفاده‌شده است ولی در این بررسی از ۰/۵ ml پریستان جهت تحریک صفاق موش استفاده گردید که نتایج خیلی خوبی به دست آمد و تعداد سلول‌های تزریقی به صفاق موش نیز بین ۰/۵ الی ۲ میلیون برای هر موش توصیه‌شده است(۱۸, ۱۹) که در این تحقیق استفاده از $۱×۱۰^{۶}$ سلول نیز نتیجه بهتری به دست آمد.

از مایع آسیت پس از گذراندن ۲ مرحله شامل تغلیظ با سولفات آمونیوم اشباع و تخلیص با افینیتی کروماتوگرافی پروتئین A، ۵ میلی‌گرم آنتی‌بادی خالص حاصل گردید. این مقدار آنتی‌بادی خالص از موش در مقیاس آزمایشگاهی و با هزینه کم از اهمیت خاصی برخوردار است زیرا که با این مقدار آنتی‌بادی منوکلونال می‌توان هزاران تست الایزا، ایمونوبلاتینگ، رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس و فلوسایتومتری انجام داد.

تخلیص به روش افینیتی کروماتوگرافی پروتئین A یک روش ارزان و درعین‌حال اختصاصی می‌باشد. درعین‌حال از زیرکلاس‌های IgG موش IgG2a و IgG2b با افینیتی زیاد ولی IgG1 و IgG3 به‌صورت خیلی ضعیف به پروتئین A متصل می‌شوند که با عنایت به مشخص بودن ایزوتایپ آنتی‌بادی تولیدشده (IgG2a) این روش ما را در تخلیص اختصاصی‌تر کمک نمود(۲۰). در مرحله بعد جهت تأیید خلوص، از SDS -PAGE در شرایط احیا و غیر احیا استفاده شد که وجود تنها یک باند kDa ۱۵۰ در شرایط غیر احیا و دو باند kDa ۲۵ و kDa50 در شرایط غیر احیا، خالص بودن محصول را قویاً تأیید نمود که نشانه مناسب بودن روش تخلیص می‌باشد. برای بررسی قابلیت شناسایی و اتصال اختصاصی آنتی‌بادی منوکلونال به CD20 از سه روش الایزا و رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس و فلوسایتومتری استفاده گردید. درروش الایزا برای بررسی قابلیت شناخت مارکر CD20 توسط آنتی‌بادی از سلول‌های راجی به‌عنوان سلول‌های بیان‌کننده CD20 استفاده گردید که OD بالا در الایزا نشان‌دهنده قابلیت شناخت CD20 می‌باشد.

همچنین برای بررسی قابلیت شناسایی پپتید توسط آنتی‌بادی، ازکونژوگه BSA-پپتید استفاده گردید. علت استفاده از BSA در این مرحله به‌جای KLH حذف واکنش‌های متقاطع آنتی‌بادی با KLH بوده و درواقع نشان داده شد که جذب نوری خوانده‌شده در تست الایزا صرفاً ناشی از واکنش آنتی‌بادی با پپتید بوده است.

در رنگ‌آمیزی فلورسانس نیز سلول‌های راجی به‌عنوان کنترل مثبت و سلول‌های Molt-4 به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و ایجاد رنگ فلورسانس سبز در زیر میکروسکوپ فلورسانس نشانه شناخت CD20 توسط آنتی‌بادی می‌باشد.

ارزیابی اتصال آنتی‌بادی تولیدشده به مارکر CD20 در نمونه ALL به‌وسیله دستگاه فلوسایتومتری و مقایسه نتایج با آنتی‌بادی تجاری درمجموع نشان داد که آنتی‌بادی تولیدشده در این پروژه علاوه بر شناسایی اختصاصی CD20، قدرت مشابهی با آنتی‌بادی تجاری (با اختلاف کمتر از ۴درصد) در شناخت این مارکر نیز دارد.

درنهایت روش‌های مختلف ارزیابی اتصال اختصاصی نشان داد که این محصول علاوه بر اینکه توانایی شناخت اختصاصی CD20 در سطح سل لاین سرطانی را دارد توانایی شناسایی اختصاصی این مارکر را نیز در نمونه‌های خون بیماران لوسمیک در شرایط پاراکلنیک را دارا می‌باشد.

درمجموع به نظر می‌رسد آنتی‌بادی منوکلونال تولیدشده در این طرح پژوهشی، واکنش گری خوبی علیه CD20 دارد و می‌توان از آن در آزمون‌های مختلفی نظیر الایزا و ایمونوفلورسانس و فلوسایتومتری جهت کاربردهای تحقیقاتی و تشخیصی استفاده نمود.

References:

1. Longo D. Harrison's Hematology and Oncology. 17th ed. McGraw-Hill Professional; 2010.
2. Carter RH. B cells in health and disease. Mayo Clin Proc. 2006. 81(3): 377-84.
3. Salem DA, Abd El-Aziz SM. Flowcytometric immunophenotypic profile of acute leukemia: mansoura experience. Indian J Hematol Blood Transfus 2012;28(2):89–96.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-24]

4. Missotten T, Tielemans D, Bromberg JE, van Hagen PM, van Lochem EG, van Dongen JJM, et al. Multicolor flowcytometric immunophenotyping is a valuable tool for detection of intraocular lymphoma. Ophthalmology 2013;120(5):991–6.
5. Lin Z-K, Zhang R, Ge Z, Liu J, Wu Y-J, Guo X, et al. (Characteristics of 4 specific target antigens in adult acute lymphoblastic leukemia). Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 2013;21(2):289–95.
6. Boyd SD, Natkunam Y, Allen JR, Warnke RA. Selective immunophenotyping for diagnosis of B-cell neoplasms: immunohistochemistry and flow cytometry strategies and results. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2013;21(2):116–31.
7. Tbakhi A, Edinger M, Myles J, Pohlman B, Tubbs RR. Flow cytometric immunophenotyping of non-Hodgkin's lymphomas and related disorders. Cytometry 1996;25(2):113–24.
8. Tefferi A, Bartholmai BJ, Witzig TE, Li CY, Hanson CA, Phyliky RL. Heterogeneity and clinical relevance of the intensity of CD20 and immunoglobulin light-chain expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Am J Clin Pathol 1996;106(4):457–61.
9. Almasri NM, Duque RE, Iturraspe J, Everett E, Braylan RC. Reduced expression of CD20 antigen as a characteristic marker for chronic lymphocytic leukemia. Am J Hematol 1992;40(4):259–63.
10. Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. Immunol Today 1994;15(9):450–4.
11. Press OW, Farr AG, Borroz KI, Anderson SK, Martin PJ. Endocytosis and degradation of monoclonal antibodies targeting human B-cell malignancies. Cancer Res 1989;49(17):4906–12.
12. Gunduz E, Celebioglu M, Meltem Akay O, Uskudar Teke H, Sahin Mutlu F, Gulbas Z. The role of flow cytometry in the diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's lymphoma, granulomatous inflammation and reactive lymph node specimens. J BUON 2013;18(3):739–45.
13. Bikoue A, George F, Poncelet P, Mutin M, Janossy G, Sampol J. Quantitative analysis of leukocyte membrane antigen expression: normal adult values. Cytometry 1996;26(2):137–47.
14. Stetler-Stevenson M. Flow cytometry in lymphoma diagnosis and prognosis: useful? Best Pract Res Clin Haematol 2003;16(4):583–97.
15. Foon KA, Todd RF 3rd. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. Blood 1986;68(1):1–31.
16. Doggett RS, Wood GS, Horning S, Levy R, Dorfman RF, Bindl J, et al. The immunologic characterization of 95 nodal and extranodal diffuse large cell lymphomas in 89 patients. Am J Pathol 1984;115(2):245–52.
17. Hadavi R, Zarnani AH, Ahmadvand N, Mahmoudi AR, Bayat AA, Mahmoudian J, et al. Production of Monoclonal Antibody against Human Nestin. Avicenna J Med Biotechnol 2010;2(2):69–77.
18. Hoogenraad NJ, Wraight CJ. The effect of pristane on ascites tumor formation and monoclonal antibody production. Meth Enzymol 1986;121:375–81.
19. Janz S, Püschel W, Raabe F, Storch H. Induction of plasma cell tumours with 2,6,10,14-tetramethylpentadecane (pristane) and paraffin oil (paraffinum perliquidum) in BALB/c mice simultaneously exposed to sustained antigenic stimulation with bovine serum albumin (BSA). Arch Geschwulstforsch 1987;57(1):25–30.
20. Ey PL, Prowse SJ, Jenkin CR. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. Immunochemistry 1978;15(7):429–36.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-24]

Original Article

LARGE SCALE GENERATION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST EXTERACELLULAR PEPTIDE OF CD20 AND EVALUATION OF SPECIFIC BINDING TO CD20 EXPRESSING CELLS

Koushan Sineh Sepehr[1], Behzad Baradaran[2], Jafar Majidi[3], Jalal Abdolalizadeh[4]*

Received: 24 Jan, 2014; Accepted: 10 Apr, 2014

Abstract

Background & Aims: Nowadays, by advent of hybridoma technology in monoclonal antibodies production various cell markers could be evaluated in malignant and non-malignant cells. CD20, non-glycosylated phosphoprotein is as an ideal marker in leukemia and B-cell lymphoma diagnosis which is expressed on more than 95% of normal and neoplastic B-cells except for early B-cells and mature plasma. The prime aim of this study was to produce monoclonal antibody against CD20 and evaluation of specific binding to CD20 expressing cells.

Materials & Methods: First, Balb/c mice were immunized 4 times with 100µg peptide from extracellular domain of CD20. Spleen cells of the most immune mouse were fused with SP2/0 by Poly Ethylene Glycol (PEG). The desired clones were selected for limiting dilution (L.D). Large scale of monoclonal antibodies was produced by ascetic fluid method. Monoclonal antibody was purified by Protein-A-Sepharose column affinity chromatography then confirmed by SDS-PAGE. Afterward, evaluation of specific binding of these antibodies was determined by immunological assay such as ELISA and Immunofluorescence and flowcytometry.

Results: After cell fusion and screening, one desired monoclone achieved with absorbance about 2. Protein-A-Sepharose column affinity chromatography yielded about 5 mg of purified monoclonal antibody. The SDS-PAGE results confirmed purification of antibody. The result of ELISA, direct immunofluorescence staining and flow cytometry confirmed specific attachment to CD20.

Conclusions: These results indicate that such monoclonal antibodies against CD20 can be used in diagnosis of CD20 in the cells surface by immunological assay such as ELISA and Immunofluorescence and flowcytometry.

Keyword: Monoclonal antibodies, CD20, Affinity chromatography, Flowcytometry

Address: Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
Tel.: +98 411 3364665
***Email*:** behzad_im@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2014: 25(4): 372 ISSN: 1027-3727

[1] *MSc of Immunology, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran*
[2] *Assistant Professor, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (Corresponding Author)*
[3] *Professor ,Medical Immunology Department, Immunology Research Center (IRC), Tabriz University of Medical Science, Tabriz, Iran*
[4] *Assistant Professor, Clinical Biochemistry Department, Immunology Research Center (IRC), Tabriz University of Medical Science, Tabriz, Iran*

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-24]