

تولید و خالص سازی آنتی بادی پلی کلونال علیه مولکول CD166 خرگوش

فرشته مهدی پور^۱، آترین میرشاهی^۲، احمد حسینی^۳، منوچهر میرشاهی^۴، عباس قادری^۵

تاریخ دریافت ۱۴۰۲/۰۳/۲۸ تاریخ پذیرش ۱۴۰۲/۰۴/۱۴

چکیده

پیش زمینه و هدف: CD166 یک مولکول چسبنده لکوسیت فعال شده (ALCAM) است و به عنوان مولکول چسبنده سلول به سلول عمل می کند. CD166 نقش مهمی در زنده ماندن، رشد و تهاجم سلول های سرطانی دارد. این پژوهش به منظور تهیه آنتی بادی پلی کلونال علیه آنتی ژن CD166 طراحی گردید.

مواد و روش کار: پپتید انتخاب شده از مولکول CD166 سنتز شده و پس از کانژوگه شدن با پروتئین KLH، در امولسیون با ادجونت کامل فروند، به دو خرگوش ماده نیوزیلندی به صورت زیر جلدی و در چند نوبت تزریق شد. سپس آنتی بادی های موجود در سرم خرگوش با روش FPLC تخلیص شده و مقدار آن با روش الیزای غیرمستقیم تعیین گردید. با روش خالص سازی ژل سیانوزن-بروماید، آنتی بادی های اختصاصی بر ضد پپتید CD166 متصل به KLH جدا شده، و غلظت آنتی بادی تولیدی علیه پپتید یا پپتید -KLH با روش الیزا تعیین گردید.

یافته ها: بعد از تزریق مکرر پپتید CD166 متصل به KLH، آنتی بادی بر ضد پپتید CD166 تولید شده ولی از تیترا پایینی برخوردار بود. بخش عمده ای از آنتی بادی تولیدی علیه قسمت اتصال پپتید-KLH ساخته شده بود. همچنین تمایل آنتی بادی های تولیدی برای اتصال به پپتید-KLH در مقایسه با پپتید به تنهایی بیشتر بود.

بحث و نتیجه گیری: آنتی بادی های تولیدی، بیشتر بر ضد شاخص آنتی ژنی پپتید-KLH بود. سنتتیک و کوچک بودن پپتید تزریق شده می تواند دلیلی برای کم بودن تیترا و میل اتصال آنتی بادی به آن باشد.

کلیدواژه ها: CD166، سلول بنیادی مزانشیمی، آنتی بادی پلی کلونال، سلول سرطانی

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و چهارم، شماره پنجم، ص ۲۵۸-۲۴۷، مرداد ۱۴۰۲

آدرس مکاتبه: شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سرطان شیراز، تلفن: ۰۷۱۳۲۳۰۳۶۸۷

Email: ghaderia@sums.ac.ir

مقدمه

۳۴ اسید آمینه تشکیل شده است (۱، ۲). یکی از خصوصیات این مولکول آن است که توالی اسید آمینه آن به خصوص در بخشی از آن که به CD6 متصل می شود در بین پستانداران بسیار شبیه هم است (۳).

CD166 در سطح لکوسیت های فعال، سلول های بنیادی خون ساز و پیش ساز های سلول های لنفوییدی وجود دارد. علاوه بر بیان CD166 در سلول های خونی، این مولکول در سلول های عصبی، مغز استخوان و سلول های بنیادی مزانشیمی نیز یافت می شود (۴، ۵).

CD166 در سطح سلول های دیگری مانند فیبروبلاست ها،

مولکول چسبندگی لکوسیت فعال (Activated leukocyte adhesion cell-ALCAM) که تحت عنوان CD166 شناخته می شود، برای اولین بار به عنوان لیگاند CD6 موجود روی لکوسیت ها شناسایی و معرفی شد. CD166 گلیکوپروتئینی است از خانواده ایمنوگلوبولین ها که از ۵ دومین خارج سلولی متشکل از ۵۰۰ اسید آمینه شامل دو دومین متغیر V1 و V2 (Variable domain) و سه دومین ثابت C1، C2 و C3 (Constant domain)، یک دومین داخل غشایی با ۲۲ اسید آمینه و یک دومین داخل سیتوپلاسمی با

^۱ استادیار ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران^۲ دانشجوی دکترای حرفه ای پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران^۳ دانشجوی دکترای تخصصی پژوهشی، ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران^۴ استاد بیوشیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران^۵ استاد ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران (نویسنده مسئول)

طول عمر مناسب (۵-۶ سال)، کنترل راحت، خون گیری آسان و تولید آنتی بادی به میزان کافی و حساسیت بالا است. خرگوش ها تنها یک نوع کلاس IgG دارند (بدون زیر کلاس دیگری) و این بدان معناست که آنتی بادی های IgG در خرگوش، ناحیه Fc قابل پیش بینی دارند که می توان از این ویژگی در اتصال به پروتئین های G و A استفاده کرد (۲۴، ۲۵).

با توجه به اهمیت مارکر CD166 در تشخیص و پیگیری روند سرطان و همچنین شناسایی سلولهای بنیادی مزانشیمی، پژوهش حاضر انجام شد تا آنتی بادی پلی کلونال خرگوش ضد اپی توبی از این مولکول که در بخش خارج سلولی آن قرار دارد، تولید گردد.

مواد و روش کار

حیوان مورد استفاده:

بنابراین در این مطالعه از دو خرگوش برای تزریق پپتید و به دست آوردن آنتی بادی و یک خرگوش به عنوان کنترل (بدون تزریق) استفاده شد.

انتخاب پپتید:

برای ایمن کردن خرگوش ها نیاز بود ناحیه ای مشخصی از مولکول CD166 انتخاب شود. بعد از بررسی مقالات، توالی مورد نظر از پپتید CD166 بر اساس امتیازنامه ای (patent) که مربوط به تولید آنتی بادی مونوکلونال علیه CD166 پرندگان بود انتخاب شده (شماره امتیاز نامه: US2009/0269787A1) و این توالی سنتز (Genosphere Biotechnologies، فرانسه) و به خرگوش تزریق شد. توالی اسید آمینه در این پپتید به صورت زیر بود: ^۱ آلانین لوسین پرولین والین سرین سیستئین ترئونین ایزولوسین سرین سرین آرژنینن آسپارژین آلانین ترئونین والین فنیل آلانین تریپتوفان ایزولوسین ^{۲۰} لیزین. توالی نظیر آن در انسان به صورت ^۱ آلانین لوسین پرولین والین سرین سیستئین ترئونین ایزولوسین سرین آلانین سرین آرژنینن آسپارژین آلانین ترئونین والین والین تریپتوفان متیونین ^{۲۰} لیزین است که دارای ۳ تفاوت در اسید آمینه های شماره ۱۰، ۱۷ و ۱۹ با پپتید تزریقی می باشد. لازم به ذکر است که در امتیازنامه مربوطه ذکر شده بود که آنتی بادی تولید شده به CD166 انسانی نیز متصل می شود.

تزریق پپتید هدف به خرگوش:

پپتیدهای کوچک ایمینوژن های ضعیفی هستند، بنابراین برای افزایش قدرت ایمنی زایی پپتید CD166، این پپتید به پروتئین Keyhole limpet hemocyanin (KLH) (Sigma، آمریکا) متصل گردید (۲۶). تولیدی نخستین تزریق پپتید CD166 متصل به KLH به همراه ادجوانت کامل فروند (Sigma) به صورت زیرجلدی انجام شد و تزریق مجدد پس از گذشت ۲ هفته از تزریق

سلول های کبدی، عصبی و سلول های اپیتلیال نیز بیان می شود (۶). علاوه بر نقش CD166 به عنوان یک مولکول چسبان در ملانوما، این مولکول در سلول های بنیادی سرطان مانند سرطان روده بزرگ، پانکراس، ریه، تخمدان و سرطان پستان نیز یافت می گردد (۱۲-۷). CD166 برای زنده ماندن، حرکت، رشد و همچنین تهاجم طی متاستاز و پیشرفت تومور مهم است. بیان بیش از حد، از بین رفتن و یا اختلال در عملکرد CD166 می تواند در جدا شدن سلول توموری و در نتیجه تهاجم به بافت های اطراف و پیشرفت تومور نقش داشته باشد (۱۳). می توان از CD166 به عنوان مارکری در شناسایی و تعیین روند پیشرفت سرطان استفاده کرد. به طور مثال تجمع سیتوپلاسمی ALCAM در سلول های سنگفرشی حفره دهان نشان دهنده پیش آگهی بد بیماری است (۱۴). از طرفی در برخی دیگر از سلول های سرطانی مثل سرطان اپیتلیال تخمدان، کاهش یا از بین رفتن ALCAM روی غشا نشان دهنده پیش آگهی بد است (۱۵). از CD166 می توان به عنوان مارکر غشایی در شناسایی سرطانهای روده بزرگ، ریه، پستان، مری، مثانه، کبد، تخمدان، حلق و بینی و پانکراس استفاده کرد (۹، ۱۶، ۱۷). برای شناسایی و تعیین میزان بیان این مولکول در سطح سلولهای لکوسیتی، مزانشیمی و یا سرطانی و استفاده از این مارکر برای تعیین پیش آگهی تومور نیاز به آنتی بادی مونوکلونال یا پلی کلونال اختصاصی می باشد.

آنتی بادی های مونوکلونال، مولکول هایی با ویژگی، افینیتی و فعالیت بیولوژیک یکسان هستند در حالی که آنتی بادی های پلی کلونال مخلوطی از آنتی بادی ها هستند که بر ضد آنتی ژن های مستقل و اپی توپ های متعدد یک آنتی ژن، واکنش نشان می دهند. همچنین تمایل (افینیتی) آنتی بادی های پلی کلونال نسبت به یک شاخص آنتی ژنی (اپی توپ) متفاوت می باشد و از آنجا که مشتمل بر کلاس های متفاوت آنتی بادی می باشند فعالیت های بیولوژیکی متفاوتی را هم بروز می دهند (۱۸، ۱۹). آنتی بادی های پلی کلونال می توانند بسیار سریعتر، با هزینه کمتر و با مهارت فنی کمتری نسبت به آنتی بادی های مونوکلونال تولید شوند (۲۰). آنتی بادی های پلی کلونال غالباً واکنش بهتری نسبت به آنتی بادی های مونوکلونال دارند زیرا توسط تعداد زیادی کlon سلول B تولید می شوند. آنتی بادی های پلی کلونال ناهمگن هستند و اپی توپ های مختلف آنتی ژن میزبان را تشخیص می دهند و تغییر یک یا گروه کوچکی از شاخص های آنتی ژنی تأثیر چشمگیری در شناسایی آنتی بادی های پلی کلونال نمی گذارد (۲۳-۲۱). برای ساخت آنتی بادی پلی کلونال از حیوانات مختلفی از جمله خرگوش، بز، اسب و الاغ می توان استفاده کرد (۲۴) خرگوش جزء پر مصرف ترین حیوانات در در زمینه تولید آنتی بادی می باشد. این حیوان دارای ویژگی هایی از جمله اندازه و

اول، به همراه ادجوانت ناقص فروند (Sigma) صورت گرفت (۲۶)، خون گیری قبل از هر تزریق به فاصله هر سه هفته با سر سوزن انسولین از قلب خرگوش انجام شد. جهت جداسازی سرم، ابتدا خون را به مدت ۱-۲ ساعت در دمای اتاق گذاشته و سپس لوله ها را با دور ۳۵۰۰ rpm به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه سانتریفیوژ نمودیم. سرم ها جدا و در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

بررسی واکنش های ایمنی زایی در خرگوش:

پس از تزریق آنتی ژن، آنتی بادی تولید شده با روش الایزای غیرمستقیم بررسی شد. از سرم خرگوش به عنوان آنتی بادی اولیه و از Goat Anti Rabbit Poly HRP (Sina Biotech، ایران) به عنوان آنتی بادی ثانویه استفاده شد. برای هر خرگوش، غلظت ۱۱۰ μg/ml از پپتید CD166 را در بافر پوشش دهی (coating buffer) تهیه و ۱۰۰ μL از آن در چاهک های تعیین شده ریخته و ۱۸ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد تا به کف چاهک بچسبد. پس از دو بار شست و شو، مسدودسازی (blocking) با افزودن ۱۰۰ μL از محلول بلاکینگ (PBS-Tween20 -10mg/ml BSA) (هر دو از Sigma) به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انجام شد. سپس، چاهک ها تخلیه شدند و پس از دوبار شستشو رقت های مختلفی از سرم خرگوش در بافر بلاکینگ تهیه و ۱۰۰ μL از آن به هر چاهک اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد و پس از آن سه بار شست و شو داده شد. با استفاده از بافر بلاکینگ رقت ۱/۵۰۰۰ از آنتی بادی Goat Anti Rabbit Poly HRP تهیه و ۱۰۰ μL از آن به تمامی چاهک ها اضافه و ۱ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. پس از ۴ بار شست و شو، ۱۰۰ μL از محلول TMB به تمامی چاهک ها اضافه و پلیت در تاریکی قرار داده شد. پس از ۱۰ دقیقه تغییر رنگ آبی حاصل و واکنش با افزودن محلول مخصوص توقف واکنش، متوقف و خوانش در طول موج ۴۵۰ نانومتر انجام شد. تمام شستشوها با ۰/۰۵٪ PBS-Tween20 انجام شد (۲۶، ۲۷).

رسوب دهی آنتی بادی با استفاده از آمونیوم سولفات:

از خاصیت آمونیوم سولفات (Merck، آلمان) برای رسوب دادن IgG های خرگوش استفاده کردیم. اضافه کردن این نمک با غلظت اشباع به محلول حاوی پروتئین باعث حذف مولکول های آب از محیط شده در نتیجه باعث رسوب پروتئین ها می شود (۲۶). محلول حاوی IgG های خرگوش و محلول آمونیوم سولفات را به نسبت ۵۵٪ به ۴۵٪ از نظر حجمی با هم مخلوط کردیم و به مدت حداقل ۸ ساعت در دمای ۴ درجه ای سانتیگراد نگه داری نموده تا IgG های خرگوش کامل ته نشین شوند.

تخلیص آنتی بادی ها به روش کروماتوگرافی تمایلی به وسیله پروتئین G:

ابتدا ستون با ۵ ml از ژل سفارز پروتئین G آماده شده و سپس با ۵۰ ml محلول PBS شست و شو و با محلول تعادل سازی به تعادل رسانده شد. مقدار ۵ ml از سرم خرگوش سانتریفیوژ و سپس از فیلتر ۰.۴ میکرومتری عبور داده شد. سرم صاف شده روی ستون سفارز پروتئین G بارگذاری شد. سپس برای خروج مواد اضافی و پروتئین های متصل نشده، ستون با بافر متعادل سازی شستشو شد تا زمانیکه جذب نوری محلول خروجی در طول موج ۲۸۰ نانومتر به صفر رسید. پس از آن ستون با بافر شستشو (گلاسیسین-HCl) مجاور شد و خروجی ستون در حجم های ۱ میلی لیتر جمع آوری گردید و pH آن به وسیله تریس ۱ مولار تصحیح شده و به pH فیزیولوژیک رسانده شد. جذب نمونه ها پس از دیالیز در ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری و با استفاده از فرمول بیر-لامبرت ($A=\epsilon Cl$) تعیین غلظت گردید (۲۶، ۲۷).

آماده سازی ژل سفارز CNBr:

ابتدا پپتید CD166 در ۵۰ μL محلول (Sigma) DMSO حل شد، محلول به دست آمده به محلول اتصال که بافر ۰.۱M NaHCO₃ (Merck) با PH 8.3 حاوی ۰.۵M NaCl است اضافه گردید. ژل سفارز فعال شده CNBr با محلول ۸ mM HCL شست و شو داده شد تا ژل کاملاً متورم و شسته شود. محلول حاوی پپتید در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت با ژل سفارز فعال مجاور شد. برای مجاور سازی از دستگاه همزن دورانی استفاده گردید. در مرحله بعد، برای بلاک کردن گروه های واکنشی باقی مانده، از محلول ۰.۱M Tris-HCL (Merck) با pH 8 استفاده و حدود ۲ ساعت با این محلول مجاور شد. محصول به دست آمده حداقل در ۳ چرخه با pH های مختلف و حداقل ۵ برابر حجم ژل شست و شو داده شد. هر چرخه شست و شو شامل بافر ۰.۱M acetate (Merck) با pH 4 و ۰.۱M Tris-HCL (Merck) با pH 8 و به دنبال آن بافر ۰.۱M NaCl (Merck) بود (۲۶).

تعیین خلوص آنتی بادی ها به روش الکتروفورز SDS-PAGE:

در این روش، جداسازی پروتئین ها بر اساس اختلاف وزن مولکولی صورت می گیرد (۲۷، ۲۸). برای این کار ابتدا ژل ۱۲/۵ آکریل امید آماده شد و سپس ۳۰ میکرولیتر از هر نمونه که با بافر لودینگ حاوی SDS (Merck) و DTT، GE Healthcare، آمریکا) مخلوط شده بود به همراه مارکر لدر در چاهک ها ریختیم. الکتروفورز با ولتاژ ۱۲۰ ولت تا رسیدن رنگ نشانگر به انتهای ژل انجام گرفت. سپس ژل را از دستگاه الکتروفورز جدا کرده و به مدت یک شب در رنگ کوماسی به لو قرار دادیم. در آخر هم توسط آب مقطر رنگ زدایی از ژل انجام شد (۲۶، ۲۷).

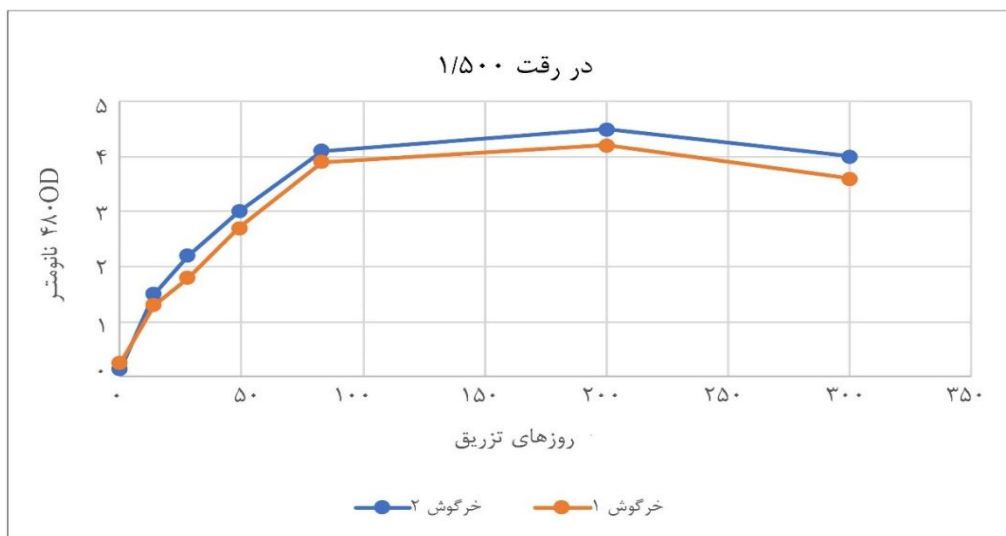
یافته‌ها

سنجش غلظت آنتی‌بادی در سرم خرگوش‌های ایمن

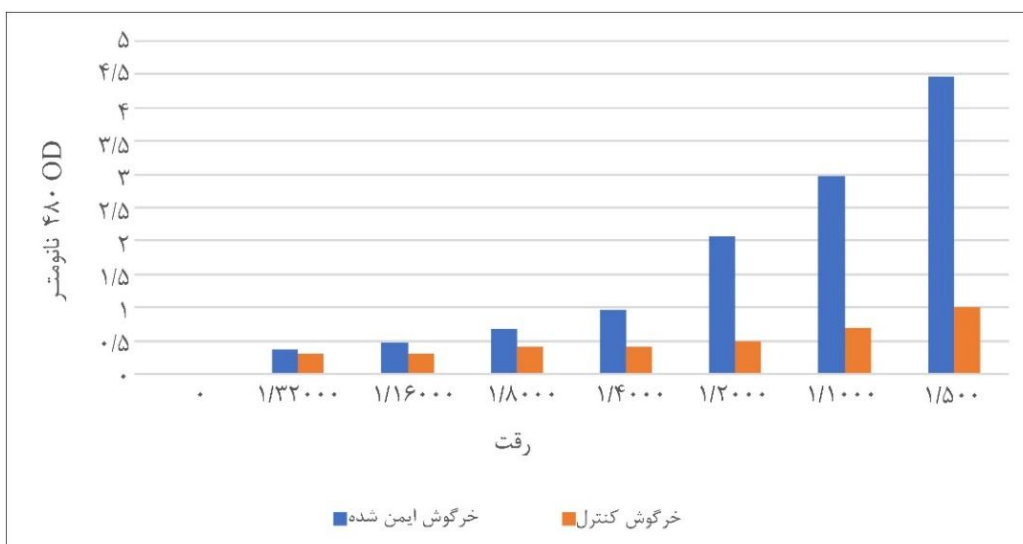
شده:

بعد از ایمن کردن خرگوش‌ها و تزریق بوستر در فواصل زمانی مشخص و سپس خونگیری و جدا کردن سرم‌ها، از تست الایزا برای تأیید وجود آنتی‌بادی علیه پپتید CD166 استفاده کردیم. همانگونه

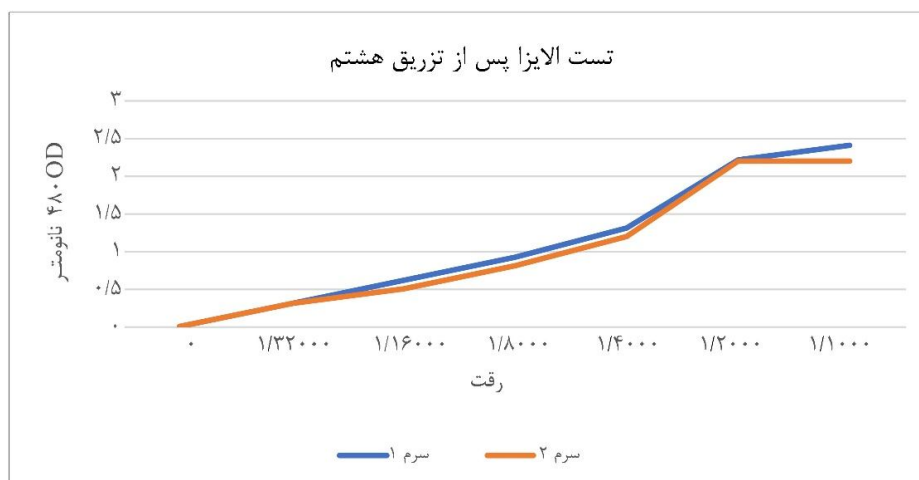
که در شکل ۱ نشان داده شده است، تزریق در روزهای ۰، ۱۴، ۲۸، ۴۹، ۸۳، ۲۰۰ و ۳۰۰ انجام شده و خرگوش‌ها طی ایمونیزاسیون‌های متوالی، علیه پپتید CD166 آنتی‌بادی تولید کرده‌اند. در شکل ۲ نیز غلظت آنتی‌بادی خرگوش کنترل (خرگوشی که ایمن نشده) و خرگوش ایمن شده مقایسه شده است. در شکل ۳ نیز نتایج تست الایزا پس از تزریق هشتم نشان داده شده است.



شکل (۱): نتایج تولید آنتی‌بادی در خرگوش‌های ایمونیزه شده در روزهای مختلف. تزریق در روزهای ۰، ۱۴، ۲۸، ۴۹، ۸۳، ۲۰۰ و ۳۰۰ انجام شده و خرگوش‌ها طی ایمونیزاسیون‌های متوالی، علیه پپتید CD ۱۶۶ آنتی‌بادی تولید کرده‌اند. در این آزمایش، تست الایزا با رقت ۱/۵۰۰ از سرم خرگوش‌ها تهیه شده است.



شکل (۲): مقایسه‌ی تیتر آنتی‌بادی در خرگوش ایمن شده و خرگوش کنترل

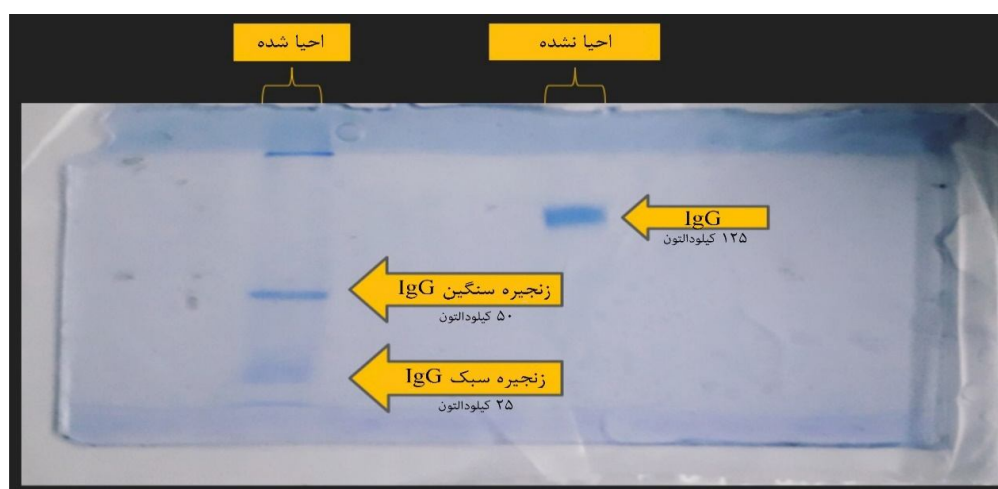


شکل (۳): مقایسه‌ی غلظت آنتی‌بادی در خرگوش‌های ۱ و ۲ بعد از تزریق هشتم

خالص‌سازی آنتی‌بادی‌های خرگوش و اندازه‌گیری غلظت آنتی‌بادی‌های خالص‌شده:

برای خالص کردن آنتی‌بادی‌های خرگوش، از ستون ژل سفارز پروتیین G استفاده کردیم (۲۶). در انتها آنتی‌بادی‌های خرگوش را که به پروتئین G متصل شده بودند، جدا کرده، و در لوله‌های

جداگانه جمع‌آوری نمودیم. در این مرحله غلظت IgG ها را اندازه گرفتیم. پس از تخلیص، از خرگوش شماره ۲، 7.5 mg/ml آنتی‌بادی و از خرگوش شماره‌ی ۱ 4 mg/ml آنتی‌بادی به دست آمد. سپس خلوص IgG های خرگوش به‌وسیله‌ی الکتروفورز SDS-PAGE در شرایط احیایی و غیر احیایی تأیید شد (شکل ۴).

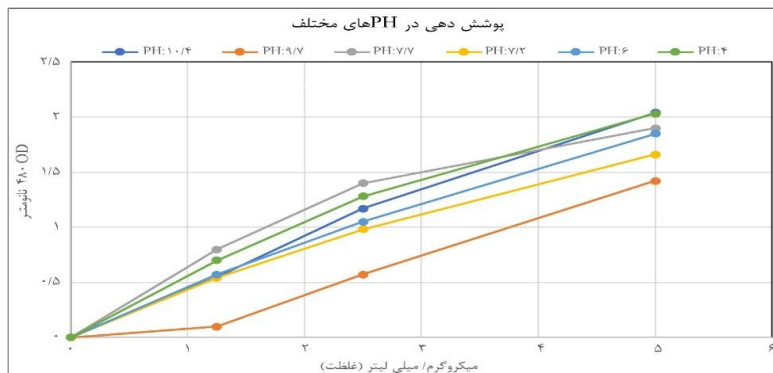


شکل (۴): تأیید خلوص IgG های خرگوش به‌وسیله‌ی الکتروفورز SDS-PAGE. در نوار احیایی ۲ باند مشاهده می‌شود که یکی زنجیره‌ی سبک و دیگری زنجیره‌ی سنگین IgG است. زنجیره‌ی سبک به‌واسطه‌ی وزن کمتری که دارد سریع‌تر به قطب مثبت نزدیک می‌شود در نتیجه پایین‌تر قرار می‌گیرد. با توجه به این که در نوار غیر احیایی، تنها ۱ باند تشکیل شده می‌توان نتیجه گرفت که روش خالص‌سازی IgG به روش ژل سفارز پروتئین G موفقیت‌آمیز بوده است.

بررسی اثر pH بر پوشش دهی پپتید CD۱۶۶ در کف چاهک‌ها:

با توجه به این که بعد از تزریقات متوالی پپتید CD166 متصل به خرگوش، پاسخ ایمنی قابل‌توجهی مشاهده نشد و غلظت

پوشش دادن پپتید را بیابیم. به همین دلیل این پپتید در pH های مختلف پوشش داده شد و تأثیر pH بر پوشش دهی پپتید را بررسی کردیم (۲۹). پپتید CD166 را در شش pH مختلف که شامل ۴, ۶, ۷, ۷, ۹, ۱۰, ۴ بود با غلظت یکسان پوشش دادیم. طبق نتایج به دست آمده، تفاوت معناداری در پوشش دهی پپتید CD166 در pH های مختلف مشاهده نشد (شکل ۵).

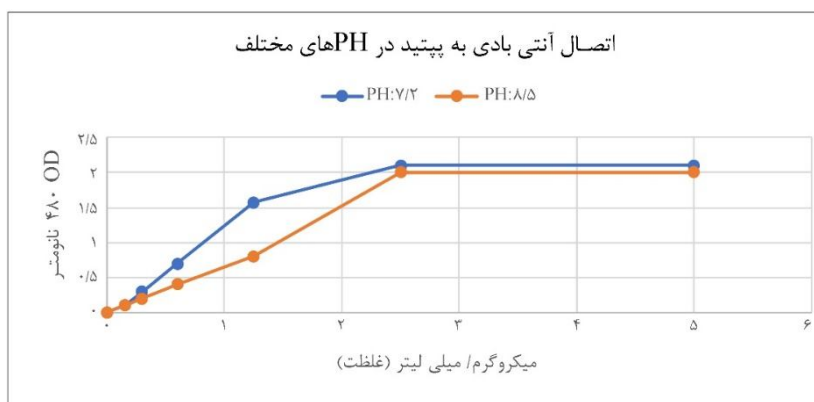


شکل (۵): پوشش دهی پپتید CD166 در pH های مختلف. پپتید CD166 در شش pH مختلف که شامل ۴, ۶, ۷, ۷, ۹, ۱۰, ۴ است با غلظت یکسان در کف چاهک‌ها پوشش داده شدند. بقیه‌ی شرایط الایزا برای تمام چاهک‌ها یکسان بوده و نهایتاً واکنش با افزودن HCL متوقف و جذب در ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

شکل ۶، آنتی‌بادی در pH 7.2 در مقایسه با pH قلیایی بهتر به پپتید متصل می‌شود. بعد از انجام تست الایزا در شرایط مختلف، تفاوت معناداری برای توجیه نامناسب بودن شرایط آشکار سازی به روش الایزا پیدا نشد. با توجه به پایین بودن تیر آنتی‌بادی‌های به دست آمده این سؤال برایمان پیش آمد که یا فینیتی آنتی‌بادی برای پپتید کم است و یا اینکه این آنتی‌بادی اپیتوپی متشکل از پپتید- KLH را می‌شناسد. برای پاسخ به این سؤال آزمایشات را به صورت زیر ادامه دادیم.

بررسی اثر pH بر واکنش آنتی‌بادی با پپتید پوشش داده شده CD166:

یکی دیگر از عوامل تأثیر گذار در الایزا، اتصال آنتی‌بادی به پپتید در pH های مختلف است. در pH اسیدی این امکان وجود دارد که آنتی‌بادی به پپتید متصل نشود (۳۰، ۳۱). در این مرحله، دو تست الایزا برای مقایسه تأثیر اتصال آنتی‌بادی به پپتید در pH ۷, ۲ و ۸, ۵ انجام شد. با توجه به نمودار بالا، آنتی‌بادی در pH 7.2 در مقایسه با pH قلیایی بهتر به پپتید متصل می‌شود. با توجه به

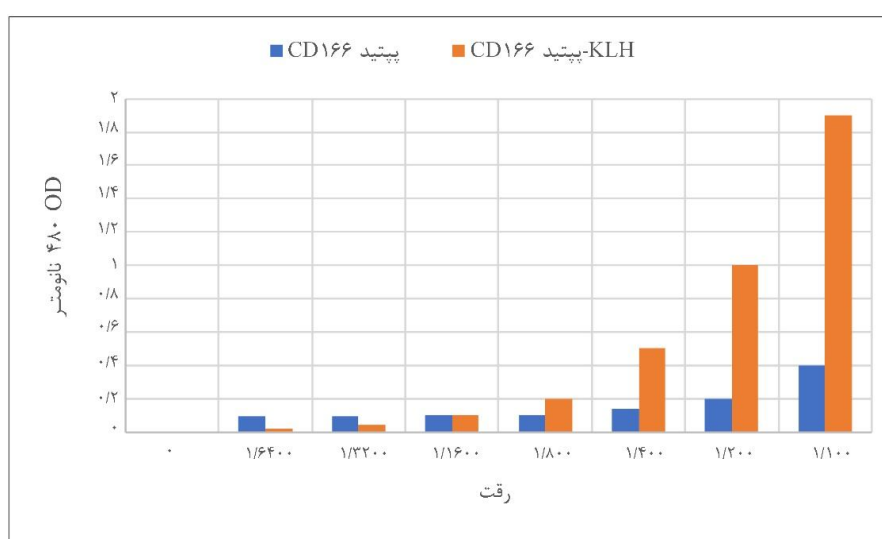


شکل (۶): مقایسه‌ی اتصال آنتی‌بادی به پپتید CD166 در pH های مختلف

خالص سازی آنتی بادی ضد پپتید CD166 با استفاده از ستون سفارز:

بعد از آماده سازی ژل و اتصال پپتید CD166 به ژل سفارز CNBr (26)، سرم خرگوش را چند بار از ستون عبور دادیم و در انتها با اسیدی کردن pH آنتی بادی های چسبیده به ژل را جدا کردیم. برای تأیید عملکرد آنتی بادی های خالص شده، تست الایزا انجام شد. با توجه به این که خرگوش ها با پپتید CD166 متصل به KLH ایمن شده بودند، این احتمال وجود دارد که آنتی بادی های تولید شده، ناحیه ی خاصی از کمپلکس پپتید CD166 متصل به KLH را شناسایی کنند. زمانی که CD166 به KLH متصل

می شود، شکل فضایی آن تغییر می کند. آنتی بادی های تولید شده توسط خرگوش بسته به اینکه ضد کدام ناحیه از این کمپلکس باشد، به نواحی مختلفی متصل می شوند. برای نشان دادن این که آنتی بادی های خالص شده پپتید CD166 را بهتر شناسایی می کنند یا پپتید CD166 متصل به KLH، یکبار پپتید CD166 و بار دیگر پپتید CD166 متصل به KLH را در کف چاهک ها ریختیم و با روش الایزا غیرمستقیم، واکنش آنتی بادی های خالص شده را با هر کدام مورد بررسی قرار دادیم. همانگونه که در شکل ۷ مشخص است، آنتی بادی های خالص شده، پپتید CD166 متصل به KLH را بهتر از پپتید CD166 شناسایی می کنند.



شکل (۷): مقایسه ی عملکرد آنتی بادی های پلی کلونال اختصاص در شناسایی پپتید CD166 و پپتید CD166 متصل به KLH

مولکول، به خصوص بخشی از آن که به لیگاند (CD6) متصل می شود، در میان پستانداران بود (۳)، بنابراین دست یافتن به آنتی بادی علیه این مولکول با تزریق پپتید CD166 انسانی به موش و یا خرگوش بسیار سخت و یا حتی غیرممکن است (رجوع شود به امتیازنامه US2009/0269787A). این قطعه پپتیدی از آن جهت که مربوط به بخش خارج سلولی مولکول CD166 بود جهت ساخت آنتی بادی برای شناسایی و یا هدف قرار دادن سلول های بیان کننده آن مناسب تر بود. با توجه به این که این پپتید کوچک بود و به تنهایی نمی توانست سیستم ایمنی خرگوش را به خوبی تحریک کند تحریک کند (۳۲)، با KLH که یک پروتئین بزرگ است کانژوگ گردید (۲۶). اگر چه بعد از تزریقات مکرر پپتید -KLH، خون گیری از خرگوش و انجام تست الایزا، مشخص شد که تیتراژ آنتی بادی افزایش قابل توجهی ندارد. با خالص کردن IgG خرگوش ایمن شده و همچنین انجام تست الایزا در PH مختلف نشان داده شد که علت

بحث و نتیجه گیری

هدف از انجام این پروژه تولید آنتی بادی پلی کلونال اختصاصی علیه بخش خارج سلولی مولکول CD166 بود که در نهایت بتوان با کمک آن سلول های بیان کننده این مولکول مانند سلول های مزانشیمی، سلول های T فعال شده و یا سلول های توموری را شناسایی و یا مورد هدف قرار داد (۱، ۲، ۵، ۹). مزیت آنتی بادی پلی کلونال نسبت به آنتی بادی مونوکلونال، این است که تولید آن راحت تر و ارزاتر است و می توان مقدار زیادی آنتی بادی اختصاصی آنتی ژن را از مقدار نسبتاً کمی سرم حیوان به دست آورد (۲۰). توالی مورد نظر از پپتید CD166 پرندگان با استفاده از امتیازنامه ای که مربوط به ساخت آنتی بادی مونوکلونال علیه پپتید CD166 ماکیان در موش بود، انتخاب شد (US2009/0269787A1). علت انتخاب CD166 ماکیان به جای CD166 انسانی شباهت زیاد و تفاوت بسیار کم این

References:

1. Ferragut F, Vachetta VS, Troncoso MF, Rabinovich GA, Elola MT. ALCAM/CD166: A pleiotropic mediator of cell adhesion, stemness and cancer progression. *Cytokine Growth Factor Rev* 2021;61:27-37.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.07.001>
2. Cardeñes B, Clares I, Bezos T, Toribio V, López-Martín S, Rocha A, et al. ALCAM/CD166 Is Involved in the Binding and Uptake of Cancer-Derived Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci* 2022;23(10).
<https://doi.org/10.3390/ijms23105753>
3. Bowen MA, Bajorath J, D'Egidio M, Whitney GS, Palmer D, Kobarg J, et al. Characterization of mouse ALCAM (CD166): the CD6-binding domain is conserved in different homologs and mediates cross-species binding. *Eur J Immunol* 1997;27(6):1469-78.
<https://doi.org/10.1002/eji.1830270625>
4. Cortés F, Deschaseaux F, Uchida N, Labastie MC, Frieria AM, He D, et al. HCA, an immunoglobulin-like adhesion molecule present on the earliest human hematopoietic precursor cells, is also expressed by stromal cells in blood-forming tissues. *Blood* 1999a;93(3):826-37.
<https://doi.org/10.1182/blood.v93.3.826>
5. Brinkhof B, Zhang B, Cui Z, Ye H, Wang H. ALCAM (CD166) as a gene expression marker for human mesenchymal stromal cell characterisation. *Gene X* 2020;5:100031.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.100031>
6. Weichert W, Knösel T, Bellach J, Dietel M, Kristiansen G. ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *J Clin Path* 2004;57(11):1160-64.
<https://doi.org/10.1136/jcp.2004.016238>
7. Fujiwara K, Ohuchida K, Sada M, Horioka K, Ulrich III CD, Shindo K, et al. CD166/ALCAM expression is characteristic of tumorigenicity and invasive and migratory activities of pancreatic cancer cells. *PLoS One* 2014;9(9):e107247.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107247>
8. Kim DK, Ham MH, Lee SY, Shin MJ, Kim YE, Song P, et al. CD166 promotes the cancer stem-like properties of primary epithelial ovarian cancer cells. *BMB Rep* 2020;53(12):622-27.
<https://doi.org/10.5483/bmbrep.2020.53.12.102>
9. Kalantari E, Taheri T, Fata S, Abolhasani M, Mehrazma M, Madjd Z, et al. Significant co-expression of putative cancer stem cell markers, EpCAM and CD166, correlates with tumor stage and invasive behavior in colorectal cancer. *World J Surg Oncol* 2022;20(1):15.
<https://doi.org/10.1186/s12957-021-02469-y>
10. Tachezy M, Zander H, Wolters-Eisfeld G, Müller J, Wicklein D, Gebauer F, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166): an "inert" cancer stem cell marker for non-small cell lung cancer? *Stem Cells* 2014;32(6):1429-36.
<https://doi.org/10.1002/stem.1665>
11. Jezierska A, Matysiak W, Motyl T. ALCAM/CD166 protects breast cancer cells against apoptosis and autophagy. *Med Sci Monit* 2006;12(8):BR263-73.
12. Donizy P, Zietek M, Halon A, Leskiewicz M, Kozyra C, Matkowski R. Prognostic significance of ALCAM (CD166/MEMD) expression in cutaneous melanoma patients. *Diagn Pathol* 2015;10:86. <https://doi.org/10.1186/s13000-015-0331-z>
13. Ihnen M, Köhler N, Kersten J, Milde-Langosch K, Beck K, Höller S, et al. Expression levels of Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM/CD166) in primary breast carcinoma and distant breast cancer metastases. *Dis Markers* 2010;28(2):71-8.
<https://doi.org/10.1155/2010/812509>

14. Swart GW. Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration. *Eur J Cell Biol* 2002;81(6):313-21. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00256>
15. Mezzanzanica D, Fabbì M, Bagnoli M, Staurengo S, Losa M, Balladore E, et al. Subcellular localization of activated leukocyte cell adhesion molecule is a molecular predictor of survival in ovarian carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2008;14(6):1726-33. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-0428>
16. Erturk K, Tastekin D, Bilgin E, Serilmez M, Bozbey HU, Sakar B. Serum activated leukocyte cell adhesion molecule and intercellular adhesion molecule-1 in patients with gastric cancer: Can they be used as biomarkers? *Biomed Pharmacother* 2016;77:86-9. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.12.006>
17. Kulasingam V, Zheng Y, Soosaipillai A, Leon AE, Gion M, Diamandis EP. Activated leukocyte cell adhesion molecule: a novel biomarker for breast cancer. *Int J Cancer* 2009;125(1):9-14. <https://doi.org/10.1002/ijc.24292>
18. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J* 2005;46(3):258-68. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.258>
19. Demlie T, Balcha E, Fesseha H. Monoclonal Antibody and its Diagnostic Application-Review. *Biomed J Sci Techn Res* 2020;30(4):23645-51.
20. Stapleton S, O' Kennedy R, Tully E. IMMUNOASSAYS | Production of Antibodies. In: Worsfold P, Townshend A, Poole C, editors. *Encyclopedia of Analytical Science* (Second Edition). Oxford: Elsevier; 2005. p. 306-16. <https://doi.org/10.1016/b0-12-369397-7/00263-6>
21. Ascoli CA, Aggeler B. Overlooked benefits of using polyclonal antibodies. *Biotechniques* 2018;65(3):127-36. <https://doi.org/10.2144/btn-2018-0065>
22. Schunk MK, Macallum GE. Applications and optimization of immunization procedures. *ILAR J* 2005;46(3):241-57. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.241>
23. Nakazawa M, Mukumoto M, Miyatake K. Production and Purification of Polyclonal Antibodies. *High-Resolution Imaging of Cellular Proteins: Methods Protocols* 2016:49-59. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6352-2_3
24. Stills HF. Polyclonal antibody production. The laboratory rabbit, Guinea pig, Hamster, and other rodents: Elsevier; 2012. p. 259-74. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-380920-9.00011-0>
25. Bollen LS, Crowley A, Stodulski G, Hau J. Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. *J Immunol Methods* 1996;191(2):113-20. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00010-5](https://doi.org/10.1016/0022-1759(96)00010-5)
26. Hancock DC, O'Reilly NJ. Production of polyclonal antibodies in rabbits. *Methods Mol Biol* 2005;295:27-40.
27. Nakazawa M, Mukumoto M, Miyatake K. Production and Purification of Polyclonal Antibodies. *Methods Mol Biol* 2016;1474:49-59. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6352-2_3
28. Al-Tubuly AA. SDS-PAGE and Western Blotting. *Methods Mol Med* 2000;40:391-405. <https://doi.org/10.1385/1-59259-076-4:391>
29. Geerligs HJ, Weijer WJ, Bloemhoff W, Welling GW, Welling-Wester S. The influence of pH and ionic strength on the coating of peptides of herpes simplex virus type 1 in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* 1988;106(2):239-44. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(88\)90203-7](https://doi.org/10.1016/0022-1759(88)90203-7)

30. Doucet J, Zhao A, Fu J, Avrameas A. Development and validation of an ELISA at acidic pH for the quantitative determination of IL-13 in human plasma and serum. *Dis Markers* 2013;35(5):465-74. <https://doi.org/10.1155/2013/290670>
31. Li Q, Gordon M, Cao C, Ugen KE, Morgan D. Improvement of a low pH antigen-antibody dissociation procedure for ELISA measurement of circulating anti-Abeta antibodies. *BMC Neurosci* 2007;8:22. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-22>
32. Lee BS, Huang JS, Jayathilaka LP, Lee J, Gupta S. Antibody Production with Synthetic Peptides. *Methods Mol Biol* 2016;1474:25-47.
33. Camacho CJ, Katsumata Y, Ascherman DP. Structural and thermodynamic approach to peptide immunogenicity. *PLoS Comput Biol* 2008;4(11):e1000231. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000231>
34. Amini N, Vishteh MN, Zarei O, Hadavi R, Ahmadvand N, Rabbani H, et al. Production and characterization of polyclonal antibody against a synthetic peptide from β -actin protein. *Iran J Basic Med Sci* 2014;17(6):396-400. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.08.018>
35. Razavi H, Teimoori A, Saberfar E, Soleimanzahi H, Goodarzi Z. Peptide based polyclonal antibody production against bovine rotavirus non structure protein4 (NSP4). *Archives of Razi Institute* 2015;70(3):157-61.

PRODUCTION AND PURIFICATION OF RABBIT ANTI-CD166 POLYCLONAL ANTIBODY

Fereshteh Mehdipour¹, Atrine Mirshahi², Ahmad Hoseini³, Manouchehr Mirshahi⁴, Abbas Ghaderi⁵

Received: 18 June, 2023; Accepted: 29 July, 2023

Abstract

Background & Aims: CD166 is an Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) which acts as a cell-to-cell adhesion molecule. CD166 has an important role in the growth, survival and invasion of the tumor cells. The aim of the present study was to produce polyclonal antibodies against CD166.

Materials & Methods: The selected peptide was synthesized from the CD166 molecule and after conjugation with KLH protein, in an emulsion with Freund's complete adjuvant, it was injected subcutaneously to two female New Zealand rabbits several times. Then the antibodies in rabbit serum were purified by FPLC method and their amounts were determined by indirect ELISA method. By CNBr gel purification method, specific antibodies against CD166 peptide bound to KLH were isolated, and the concentration of produced antibody against peptide or KLH-peptide was determined by ELISA method.

Results: After repeated injection of CD166 peptide bound to KLH, antibody against CD166 peptide was produced, but it had a low titer. Most of the antibody produced was directed against the KLH-peptide binding site. Also, the tendency of produced antibodies to bind to KLH-peptide was higher compared to the peptide alone.

Conclusion: The produced antibodies were mostly against the antigenic index of KLH peptide. The synthetic and small size of the injected peptide can be the reason for the low titer and affinity of the antibody to it.

Keywords: CD166, Mesenchymal Stem Cells, Polyclonal Antibody, Tumor Cells

Address: Shiraz Institute for Cancer Research, Shiraz Medical School, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Tel: +987132303687

Email: ghaderia@sums.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2023; 34(5): 258 ISSN: 2717-008X

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

¹ Assistant Professor of Immunology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

² MD student, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

³ Ph.D. student, Immunology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

⁴ Professor of Biochemistry, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

⁵ Professor of Immunology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran (Corresponding Author)