

تهیه و تخلیص آنتی‌بادی منوکلونال علیه آنتی‌ژن لیپوآرابینومان مانوزیله میکوباکتریوم بویس

نویسندگان: رسول موخواه^{۱*}، محمد تقی‌خانی^۲، علیرضا خیبری^۳، سید عطاالله
سادات شاندیز^۱

۱. کارشناس ارشد، بخش تحقیقات ب ت ژ، مجتمع تولیدی- تحقیقاتی انستیتوپاستور ایران، کرج، ایران
۲. استاد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. استادیار، گروه انگل‌شناسی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران

E-mail: r_moukhah@yahoo.com

* نویسنده مسئول:

چکیده

مقدمه و هدف: لیپوآرابینومان مانوزیله (ManLAM) از آنتی‌ژن‌های گلیکولیپیدی است که درصد قابل توجهی از دیواره سلولی باکتری میکوباکتریوم بویس ب ت ژ را تشکیل می‌دهد. نظر به اینکه تولید آنتی‌بادی منوکلونال آن، به‌ویژه در طراحی کیت تشخیص سریع بیماری سل کاربردهایی فراوان دارد، لذا هدف از تحقیق حاضر، تولید آنتی‌بادی منوکلونال ضد این آنتی‌ژن می‌باشد.

مواد و روش کار: پس از تزریق‌های منظم موش‌های BALB/c با BCG سونیکیت‌شده، آنتی‌ژن LAM، تیتراژ آنتی‌بادی تولیدشده بررسی‌گردید. لئوسیت‌های طحالی موش‌ها و سلول‌های میلوهای Sp2/0 با کمک پلی‌اتیلن‌گلیکول امتزاج‌داده شدند. سلول‌ها در محیط HAT انتخاب شدند و کلون‌های مولد آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن LAM با استفاده از آزمون الایزا شناسایی شدند؛ پس از تخلیص آنتی‌بادی منوکلونال، شناسایی آنتی‌ژن‌های لیپوآرابینومان مانوزیله و BCG سونیکیت‌شده با روش وسترن بلاتینگ انجام گرفت.

نتایج: تعداد ۲ کلون H1-3D3 , H2-3B9 مولد آنتی‌بادی اختصاصی با جذب بالا در آزمایش الایزا، انتخاب شدند. نتایج وسترن بلاتینگ، باند ۳۰ کیلو دالتونی مربوط به آنتی‌ژن‌های لیپوآرابینومان مانوزیله و BCG سونیکیت‌شده با استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال IgM و IgG₃ را تأیید می‌کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که امکان تولید و تخلیص آنتی‌بادی منوکلونال با استفاده از امتزاج لئوسیت‌های B طحال موش‌های ایمن‌شده و سلول‌های میلوما وجود داشته، تأیید واکنش اختصاصی آنتی‌بادی مذکور قبل از انجام مطالعات تشخیصی در شناسایی سریع سل در ادرار بیماران و بررسی‌های مصونیت‌زایی واکسن ب ت ژ مورد توجه خواهد بود.

واژگان کلیدی: لیپوآرابینومانان مانوزیله، میکوباکتریوم بویس، آنتی‌بادی منوکلونال

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال هیجدهم- شماره ۹۱
اسفند ۱۳۸۹

دریافت: ۸۹/۹/۱۶

آخرین اصلاح‌ها: ۸۹/۱۰/۲۱

پذیرش: ۸۹/۱۰/۲۲

مقدمه

لیپوآرایینومان مانوزیله (ManLAM) یک آنتی ژن گلیکولیپیدی دیواره سلولی باکتری مایکوباکتریوم بویس ب ت ژ *Mycobacterium Bovis BCG* (سویه 1173P2) است که بخشی عمده از دیواره را به خود اختصاص داده است. از مهم ترین عملکردهای این آنتی ژن می توان به توقف بلوغ فاگوزوم ها، مهار مسیر پیام رسانی γ -IFN، برداشت رادیکال های آزاد اکسیژن و مهار پروتئین کیناز c سلول میزبان اشاره کرد (۱). اولین بار هاتر و همکارانش ساختمان این آنتی ژن را توصیف کردند. طی سال های اخیر، محققان بررسی های مختلفی روی عملکرد، ساختمان و ساختار آنتی ژنیسته لیپوآرایینومان مانوزیله انجام داده اند (۳، ۴، ۵). این آنتی ژن دارای وزن ملکولی ۱۷ تا ۳۸ کیلودالتون (۶، ۷) و یکی از عوامل مهارکننده سیستم ایمنی میزبان به شمار می رود (۲). وجود این آنتی ژن در BCG یکی از عواملی است که مصونیت زایی این واکسن را کاهش می دهد. اجزاء تشکیل دهنده ساختمان این آنتی ژن شامل موارد زیر است: لنگر فسفاتیدیل اینوزیتول در غشاء باکتری، پلیمرهایی از قند مانوز، آرابینوز و همچنین کلاهی که در انتهای آنتی ژن قرار دارد (۹، ۱۰، ۱۱). مایکوباکتریوم های مختلف، کلاهی های متفاوتی دارند، به طوری که در گونه های تند رشد غیربیماری زا مانند مایکوباکتریوم اسمگماتیس - کلاهی از نوع فسفاتیدیل اینوزیتول بوده، در گونه های کند رشد بیماری زایی چون: مایکوباکتریوم بویس، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم لپره، کلاهی از نوع قند مانوز است که تعداد آنها در گونه های بیماری زا تفاوت دارد؛ دسته سوم هم در مایکوباکتریوم چگونه وجود دارد که فاقد کلاهی معرفی شده اند که لیپوآرایینومان در آنها آرابینوزیلات لیپوآرایینومانان (AraLAM) نام دارد (۱۲). آنتی ژن لیپوآرایینومان مانوزیله در بیمارانی که سل فعال دارند، از طریق ادرار دفع می شود؛ همچنین یکی از عوامل بیماری زایی مایکوباکتریوم ها محسوب می شود و دارای اعمالی مختلف چون: جلوگیری از فعال شدن

ماکروفازها، مهار تولید سایتوکاین های α -TNF، IL-12، مهار آپوپتوز ماکروفازهای آلوده است. تولید آنتی بادی منوکلونال ضد آنتی ژن لیپوآرایینومان مانوزیله، کاربردهای فراوانی دارد که از آن جمله می توان به طراحی کیت تشخیص سریع برای شناسایی بیماری سل از طریق ادرار، اشاره کرد (۱۳). کاربرد آنتی بادی های منوکلونال ضد شاخص های آنتی ژنی خاص در حوزه های مختلف زیستی از اهمیتی ویژه برخوردارند، برای نمونه می توان به آزمایش های تشخیص طبی، میکروبیولوژی، ایمونوترابی سرطان، ایمونوهمیستوشیمی، ایمونوسیتوشیمی و ... اشاره کرد که در تمامی موارد مذکور، پاتن های تک کلون اهمیتی ویژه دارند (۱۵، ۱۶). یکی از متداول ترین روش های تولید آنتی بادی های منوکلونال، امتزاج لئوسیت های B طحال موش ایمن شده و سلول های میلوما است. نظربه اینکه روش های PCR و تشخیص کشت میکروبی برای شناسایی بیماری سل، به زمان و هزینه ای بالا نیاز دارند، هدف از این تحقیق، تهیه و تخلیص آنتی بادی منوکلونال ضد آنتی ژن لیپوآرایینومان مانوزیله بوده، که از این روش بتوان کیت تشخیصی مناسبی برای شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از طریق ادرار بیماران طراحی کرد.

مواد و روش کار

موش های BALB/c این تحقیق از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران واقع در کرج تهیه شد. واکسن BCG از انستیتو پاستور ایران، آنتی ژن لیپوآرایینومانان و تمامی مواد شیمیایی از شرکت های Sigma و Merck خریداری شدند.

تزریق BCG به هر موش، در نوبت اول به صورت داخل صفاقی انجام گرفت. غلظت $10 \mu\text{g/ml}$ از BCG سونیکیت شده در بافر PBS تهیه شد. سپس، ۱ میلی لیتر از این محلول با ۱ میلی لیتر ادجوانت ناقص فروند به خوبی مخلوط شد تا غلظت $5 \mu\text{g/ml}$ از BCG سونیکیت شده حاصل شود. در فواصل بین تزریق ها و در زمانی، حدود دو هفته پس از تزریق اول، به منظور ارزیابی میزان پاسخ

TMB² افزوده شد. پس از توقف واکنش و قرائت جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر هیبریدهای مثبت از لحاظ وجود آنتی‌بادی انتخاب شد؛ سپس رقت‌سازی متوالی برای به دست آوردن کلون سلولی انجام گرفت (به طوری که در هر چاهک یک سلول هیبریدوما قرار گیرد).

تعیین کلاس و زیرکلاس آنتی‌بادی‌ها: پس از انتخاب چاهک‌های ترشح‌کننده آنتی‌بادی اختصاصی ضد BCG و آنتی‌ژن لیپوآرآینومان مانوزیله، کلاس و زیر-کلاس آنها بررسی شدند؛ در این مرحله چاهک‌هایی که آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن لیپوآرآینومان مانوزیله ترشح می‌کردند شناسایی شده. کلاس و زیرکلاس‌های کلون‌ها به روش Capture ELISA مشخص شد؛ بدین ترتیب که آنتی‌سرم‌های ضد $\gamma_3, \gamma_{2b}, \gamma_{2a}, \gamma_1, \mu, \alpha$ مربوط به ایمونوگلوبولین موش موجود در کیت ISO-2 از شرکت سیگما، با PBS به میزان ۱:۱۰۰۰ رقیق گردید. ۵۰ میکرولیتر در هر چاهک پلیت الیزا افزوده شد و پس از پوشاندن چسب روی پلیت، در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت انکوبه شد. پلیت الیزا سه مرتبه با بافر شستشو (PBS-Tween20) شسته شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوپ کشت کلون‌های رشدیافته به هر چاهک اضافه شد (از سرم موش قبل از فیوژن با رقت ۱:۱۰۰۰ و سرم موش ایمن شده با رقت ۱:۱۰۰۰ به عنوان کنترل مثبت و از سوپ کشت سلول‌های SP2/0 به عنوان کنترل منفی استفاده شد)؛ دوباره پلیت الیزا با چسب پوشانده شده و انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت برای آن اعمال شد. پس از سه مرتبه شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی کنژوگه - HRP-Labeled Goat Anti-Mouse IgG (Fab specific) antibody رقیق شده با نسبت ۱:۱۰۰۰ در بافر شستشو، به هر چاهک اضافه شد. به طور مجدد انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه و شستشو در سه مرحله انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوپ‌سترای TMB به هر چاهک پلیت اضافه شد و در دمای اتاق و تاریکی به

سیستم ایمنی نسبت به آنتی‌ژن، آزمون الیزا انجام شد؛ تزریق دوم BCG سونیکیت شده مانند تزریق اول چهار هفته بعد انجام شد؛ پانزده روز پس از تزریق دوم، پاسخ ایمنی موش ارزیابی و در این مرحله، آزمون الیزا برای BCG و لیپوآرآینومان مانوزیله گذاشته شد سپس موشی که بهترین پاسخ را به هر دو آنتی‌ژن داده بود برای تزریق سوم انتخاب شد و سه تا پنج روز قبل از فیوژن با سلول‌های میلوما، ۰/۲ میلی‌لیتر آنتی‌ژن لیپوآرآینومان مانوزیله با غلظت ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر که در PBS تهیه شده بود، از طریق دم تزریق گردید؛ در مرحله بعد، موش انتخاب شده کشته شد و سلول‌های طحال آن به نسبت ۳ به ۱ یا ۱۰ به ۱ با سلول‌های میلوما Sp2/0 با کمک پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG) ۵۰ درصد (از شرکت سیگما) ادغام شدند؛ بعد از این مرحله، سلول‌ها در محیط انتخابی HAT¹ قرار داده شده، در چاهک‌های متعددی تقسیم شدند. پس از فیوژن و تقسیم‌بندی هیبریدها در پلیت ۹۶ خانه ای و کشت آنها، غربالگری چاهک‌ها از لحاظ ترشح ایمونوگلوبولین انجام گرفت. بدین ترتیب که پلیت با آنتی‌بادی ضد ایمونوگلوبولین موش پوشانده شد. پس از شستشو، سوپ محیط کشت حفرات حاوی هیبرید به خانه‌های پلیت اضافه گردید. از سرم موش ایمن شده با آنتی‌ژن با رقت ۱:۱۰۰۰ در بافر شستشو به عنوان کنترل مثبت و محیط کشت کامل (شامل محیط کشت RPMI-1640 (Sigma) حاوی ۲ میلی‌مولار ال-گلوتامین، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر حسب میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (FCS) به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. پلیت به مدت ۹۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه و سپس سه تا چهار مرتبه با بافر شستشو، شسته شد. به تمام حفرات پلیت میزان ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی کنژوگ شده با horseradish peroxidase ضد موش (۱:۴۰۰۰ در بافر شستشو رقیق می‌گردد) افزوده شد؛ پس از ۹۰ دقیقه انکوباسیون و شستشو به تمام حفرات بافر

نتایج

در فیوژن انجام شده ۵۴ کلون به دست آمد که با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. نتایج غربالگری هیبریدهای ایجاد شده از لحاظ ترشح آنتی بادی موشی و نتایج ارزیابی هیبریدهای ترشح کننده آنتی بادی اختصاصی ضد آنتی ژن BCG و لیپوآرایینومان مانوزیله در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. از مجموع ۵۴ کلون فقط ۲۰ کلون ترشح کننده آنتی بادی بودند که از بین آنها به ترتیب کلون های H1-3D3 و H2-3B9 علیه آنتی ژن BCG و لیپوآرایینومان مانوزیله آنتی بادی ترشح می کردند؛ در این مرحله برای به دست آوردن کلونی با جذب بالا و ترشح کننده آنتی بادی، رروی کلون های H1-3D3 و H2-3B9، رقت های متوالی انجام گرفت. بدین ترتیب، کلاس و زیر کلاس آنتی بادی های آنها تعیین گردید که نتایج آن در جدول شماره ۲ آورده شده است. همان طور که مشاهده می شود دو ساب کلون H1-3D3-3E11 و H2-3B9-3G4 زیر کلاس آنتی بادی IgM و سه ساب کلون H1-3D3-2C9، H2-3B9-3F11 و H2-3B9-1G4 زیر کلاس IgG₃ را تولید می کنند که از بین آنها H1-3D3-3E11 و H2-3B9-1G4 با توجه به اینکه تک کلون اند و فقط یک نوع آنتی بادی ترشح می کنند، انتخاب شدند. پس از انجام مراحل تخلیص، باند مورد نظر با وزن مولکولی ۳۰ کیلو دالتونی مربوط به آنتی ژن ManLAM و BCG سونیکیت- شده با استفاده از آنتی بادی منوکلونال IgM و IgG₃ از طریق روش وسترن بلاتینگ تأیید شد (شکل ۱).

مدت ۲۰-۳۰ دقیقه قرارداد شد. واکنش با افزودن ۵۰ میکرولیتر اسید کلریدریک یک نرمال متوقف شد. جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد.

خالص سازی آنتی بادی منوکلونال با ستون پروتئین A

ابتدا به صفاق ۵ سر موش ۰/۵ میلی لیتر Pristan و تعداد 2×10^6 سلول زنده از تک کلون ترشح کننده IgG₃ تزریق شد، یک هفته بعد، مایع صفاق غنی از آنتی-بادی مورد نظر جمع آوری گردید و از ستون پروتئین A (Protein A-Sepharose CL-4B) عبور داده شد. براساس این روش، مولکول های IgG₃ موجود در نمونه از طریق F.c خود به پروتئین A متصل شده، با شستشوی ستون، پروتئین های اضافه حذف می شوند؛ سپس با تغییر pH اتصال های آنتی بادی و لیگانند از بین رفته، آنتی بادی از ستون جدا می شود.

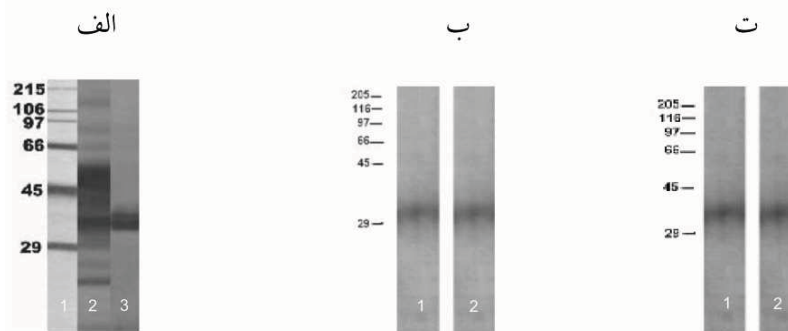
وسترن بلات

آنتی ژن های لیپوآرایینومان مانوزیله و BCG سونیکیت- شده پس از جداسازی روی ژل ۱۰ درصد SDS-PAGE براساس یک روش استاندارد (۱۴) به غشاء نیتروسولوز منتقل شده، باندهای مربوط با افزودن آنتی بادی های منوکلونال IgG₃ و IgM (Sigma) و آنتی بادی کنژوگه با HRP (Sigma) و محلول رنگزای DAB قابل رؤیت شدند.

جدول ۱: نتایج غربالگری هیبریدهای ایجادشده به دست آمده با روش الیزا در طول موج ۴۵۰ nm از لحاظ ترشح آنتی بادی موشی و نتایج ارزیابی هیبریدهای ترشح کننده آنتی بادی اختصاصی ضد آنتی ژن BCG و ManLAM

ترشح آنتی بادی نام هیبرید	موشی	ضد Man-LAM	ضد آنتی ژن BCG	کلاس آنتی بادی
H1-1E8	۱/۸	+/۱۳	۱	γ_1
H1-2G3	۲>	+/۱۵	۲>	γ_{2a}
H1-3D3	۲>	۲>	۲>	γ_1, γ_3, μ
H2-1B9	۲>	+/۱۸	+/۳۵	γ_{2a}, γ_{2b}
H2-1C2	۱/۳	+/۱۲	+/۵	$\gamma_1, \gamma_{2a}, \gamma_{2b}$
H2-2C7	۱	+/۱۵	+/۹	γ_{2a}, μ
H2-2E9	۱/۷	+/۱۶	+/۸۹	γ_1, γ_{2a}
H2-2G4	۲>	+/۰۹	۲>	γ_{2a}
H2-3B9	۲>	۲>	۲>	$\gamma_{2a}, \gamma_3, \mu$
H1-3D3	۲>	+/۰۵	۱/۹	γ_{2a}
H2-3E2	۱/۸	+/۱۸	۱/۵	γ_{2b}
H3-3F4	۲>	+/۰۴	۲>	γ_1, γ_3
H3-3F11	۱	+/۱۹	+/۷۵	γ_{2b}, μ
H3-3G5	۱/۴	+/۱۷	+/۸	γ_1
H3-1B7	۲>	+/۱۰	+/۳۵	γ_1
H4-2D11	۲>	+/۱۵	۲>	γ_{2b}
H4-3B5	۲>	+/۱۳	+/۴	γ_{2a}, γ_{2b}
H5-2B10	۱/۷	+/۱۱	+/۳۱	γ_{2b}, μ
H5-2F6	۱/۹	+/۰۸	+/۹۵	$\gamma_1, \gamma_{2a}, \gamma_{2b}$
H5-4C2	۲>	+/۱۷	+/۸۷	γ_{2b}
کنترل مثبت*	۲>	۲>	۲>	$\gamma_1, \gamma_{2a}, \gamma_{2b}, \mu, \gamma_3, \alpha$
کنترل منفی*	+/۱۵	+/۱۳	+/۱۴	—

* از سرم موش ایمن شده با آنتی ژن با رقت ۱:۱۰۰۰ در بافر شستشو به عنوان کنترل مثبت و محیط کشت کامل به عنوان کنترل منفی استفاده شد.



شکل ۱ (الف): روش SDS-PAGE ۱۰ درصد با شاخص مولکولی (۱) و آنتی ژن های BCG (۲) و ManLAM (۳):

(ب) انجام وسترن بلاتینگ ضد BCG با استفاده از سوپ کشت کلون های مولد (۱) IgG_3 و (۲) IgM

(ج) انجام وسترن بلاتینگ ضد ManLAM با استفاده از سوپ کشت کلون های مولد (۱) IgG_3 و (۲) IgM .

جدول ۲: کلاس و زیر کلاس‌های به دست آمده از ساب کلون‌های H1-3D-3 و H2-3B9 و انجام تست الیزا برای انتخاب ساب کلون‌هایی

که به طور اختصاصی ضد BCG و ManLAM آنتی بادی ترشح می‌کنند

BCG	LAM	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM	کلاس و زیر کلاس
								کلون
+ / ۳۴	+ / ۰۱	+ / ۱۱	+ / ۰۳	+ / ۰۱	+ / ۸۷	+ / ۱۱	+ / ۱۷	H1-3D3-1E8
۱ / ۱۲	+ / ۰۳	۱ / ۱	+ / ۱۳	+ / ۰۳	+ / ۳	+ / ۱۴	+ / ۱۳	H1-3D3-2E8
+ / ۴۷	+ / ۱۹	+ / ۱۳	+ / ۱۱	+ / ۱۴	+ / ۰۹	+ / ۱۱	+ / ۱۷	H1-3D3-5F6
۱ / ۸۴	۱ / ۷	+ / ۱۶	+ / ۱۳	+ / ۱۳	+ / ۱۱	+ / ۱۳	۱ / ۹	H1-3D3-3E11
+ / ۴	+ / ۱۸	+ / ۱۲	+ / ۱۳	+ / ۱۱	۱ / ۶	+ / ۱	+ / ۰۵	H1-3D3-2C2
۱ / ۲۳	+ / ۱۲	+ / ۱۶	+ / ۱۲	+ / ۱۸	+ / ۲۵	+ / ۱۳	+ / ۱۱	H1-3D3-5B6
+ / ۳۷	+ / ۱۶	+ / ۱۸	+ / ۱۷	+ / ۱۹	+ / ۲۲	+ / ۱۷	+ / ۰۴	H1-3D3-5C2
+ / ۲۱	+ / ۱۵	+ / ۱۶	+ / ۰۹	+ / ۱۷	+ / ۱۵	+ / ۱۸	+ / ۱۷	H1-3D3-5G3
۱ / ۱۹	۱	+ / ۱۴	+ / ۱۶	+ / ۰۴	۲ >	+ / ۱۳	+ / ۱۴	H1-3D3-2C9
+ / ۱۵	+ / ۰۹	+ / ۱۳	+ / ۰۳	+ / ۱۸	+ / ۱۳	+ / ۱۳	+ / ۲۸	H2-3B9-4E4
۱ / ۸	۱ / ۱۳	+ / ۱۵	+ / ۱۱	+ / ۱۱	+ / ۱۶	+ / ۰۷	۲ >	H2-3B9-3G4
۱ / ۱۱	+ / ۱۲	+ / ۱۶	۱ / ۵۶	+ / ۰۹	+ / ۸۵	+ / ۱۲	+ / ۱۹	H2-3B9-3C9
۱ / ۳	+ / ۱۵	+ / ۱۱	۱ / ۴۷	+ / ۱۷	+ / ۱۹	+ / ۱۵	+ / ۱	H2-3B9-1B3
+ / ۳۵	+ / ۱۴	+ / ۱۵	+ / ۱۸	+ / ۱۵	+ / ۲۵	+ / ۱۹	+ / ۱۳	H2-3B9-2D9
۱ / ۸	۱ / ۱۲	+ / ۱۷	+ / ۱۳	+ / ۱۳	۱ / ۸	+ / ۱۵	+ / ۲۵	H2-3B9-3F11
۱ / ۶	۱ / ۴	+ / ۱۸	+ / ۱۴	+ / ۱۱	۲ >	+ / ۱۵	+ / ۰۷	H2-3B9-1G4
+ / ۴۷	+ / ۱۱	+ / ۱۶	۱ / ۱۰	+ / ۰۶	+ / ۱۴	+ / ۱۷	+ / ۱	H2-3B9-1G11
+ / ۱۵	+ / ۰۸	+ / ۰۸	+ / ۱۱	+ / ۱۴	+ / ۰۹	+ / ۱۳	+ / ۱۲	کنترل منفی سوپ کشت سلول SP2/0
+ / ۱۲	+ / ۱۸	۲ >	۲ >	۲ >	۲ >	۲ >	۲ >	کنترل مثبت سرم موش بارقت ۱ / ۱۰۰۰
۲ >	۲ >	۲ >	۲ >	۲ >	۲ >	۲ >	۲ >	سرم موش قبل از فیوژن بارقت ۱ / ۱۰۰۰

بحث

در این تحقیق مشخص شد که آنتی بادی‌های منوکلونال علیه آنتی ژن لیپوآرآیینومان مانوزیله از منشأ مایکوباکتریوم بویس BCG با کلاس و زیر کلاس نوع IgG₃ و IgM بوده، توانایی شناسایی آنتی ژن ۳۰ کیلودالتونی در BCG و کمپلکس آنتی ژنی LAM را دارند. تهیه آنتی بادی کلاس IgG₃ نشان دهنده تحریک اختصاصی سیستم ایمنی توسط آنتی ژن است با این حال برای بررسی وجود آنتی ژن مشابه با اپی توپ یکسان در گونه‌های مختلف لازم است که واکنش‌های متقاطع با گونه‌های مختلف بررسی شود.

تاکنون سلول کامل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، آنتی بادی‌های منوکلونال را تهیه کرده بود که از بین سه آنتی بادی 5c11(IgM)، 4F11(IgM) و 9d8(IgG3) فقط آنتی بادی 5c11(IgM) است در حالی که در این تحقیق، آنتی بادی تهیه شده ضد آنتی ژن LAM با کلاهیک مانوزی بوده، از نوع IgG₃ است (۱۹ تا ۲۱).

به منظور تحریک سیستم ایمنی هومورال نیاز است که دیواره سلولی بسیار محکم BCG شکسته شود برای این منظور ما از BCG سونیکیت شده استفاده کرده‌ایم؛ در این حالت، سیستم ایمنی موش به خوبی ضد آنتی ژن لیپوآرآیینان مانوزیله که قسمت عمده دیواره را تشکیل می‌دهد، تحریک می‌شود؛ از طرف دیگر، وجود دیواره متلاشی شده BCG نیاز ما را به استفاده از ادجوانت کامل مرتفع می‌کند. استفاده از ادجوانت ناقص برای ارائه آنتی ژن به مقدار مناسب و در طی زمان مناسب به منظور تحریک سیستم ایمنی ضروری است در غیر این صورت، آنتی ژن در بدن حذف شده، پاسخ مناسبی ضد آن داده-

باید دارای غلظت ۴۰ تا ۵۰ درصدی باشد در صورت غلیظ تر بودن سمی و کشنده است و در صورت رقیق تر بودن راندمان ادغام کاهش می‌یابد لازم به ذکر است که موفقیت در این مرحله به مهارت فرد بستگی دارد. شایان توجه است که گونه‌های مختلف مایکوباکتریومی، لیپوآرابینومانان‌های مختلفی دارند حتی در یک گونه، تعدادی متنوع از این آنتی‌ژن وجود دارد. این آنتی‌بادی منوکلنال تهیه شده مربوط به سویه p2 BCG ۱۱۷۳ است که با انواع تهیه شده به صورت تجاری (5c11(IgM), 4F11(IgM), 9d8(IgG3)) که از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تهیه شده، متفاوت است.

نتیجه‌گیری

به منظور مطالعه آنتی‌ژن از نظر ساختمانی و از نظر ایمنولوژیکی ضروری است که این آنتی‌ژن جداسازی و تخلیص شود؛ بدین منظور، این آنتی‌بادی را می‌توان در کروماتوگرافی تمایلی استفاده کرد؛ در ضمن برای بررسی تاثیر بلوک کردن آنتی‌ژن لیپوآرابینومانان مانوزیله در افزایش کارایی واکسن BCG می‌توان از آنتی‌بادی منوکلنال تهیه شده، استفاده کرد. از آنجاکه آنتی‌ژن لیپوآرابینومانان مانوزیله و کاربردهای ذکر شده در مورد استفاده از آنتی‌بادی منوکلنال در تشخیص سریع بیماری سل، بررسی نقش این آنتی‌ژن روی سطح باکتری در تحریک سیستم ایمنی و وجود اپی‌توپ یکسان این آنتی‌ژن در گونه‌های مختلف بسیار اهمیت دارد، پیشنهاد می‌شود بررسی‌های بیشتری پس از تخلیص این آنتی‌بادی در جهت ایجاد کمترین واکنش متقاطع با گونه‌های دیگر مایکوباکتریوم انجام شود.

نمی‌شود. در این پژوهش از موش BALB/c ماده با سن چهار هفته استفاده شد، چون در این سن سیستم ایمنی موش کامل می‌شود.

دو هفته بعد از تزریق، مدت زمان لازم برای ارزیابی سیستم ایمنی تحریک شده بعد از اولین مواجهه با آنتی‌ژن است. بعد از اطمینان از پاسخ ایمنی ضد آنتی‌ژن، تزریق دوم هم با BCG سونیکیت شده انجام می‌شود تا سلول‌های خاطره‌ای ایجاد شوند؛ در تزریق سوم، ما از آنتی‌ژن لیپوآرابینومانان مانوزیله استفاده کردیم تا سلول‌هایی که آنتی‌بادی ضد این آنتی‌ژن را ترشح می‌کنند، تکثیر شوند. سلول‌های Sp2/0 که سلول‌های سرطانی BALB/c هستند به دلیل نامیرایی، عدم توانایی در تولید آنتی‌بادی و فقدان آنزیم‌های مسیر سنتز باز یافت نوکلئوتیدها (هیپوگزانتین-گوانین فسفوریبوزیل ترانسفراز (HGPRT) و تیمیدین کیناز (TK)) استفاده شدن؛ این سلول‌ها به دلیل فقدان این دو آنزیم در محیط انتخابی HAT از بین می‌روند زیرا علاوه بر فقدان مسیر سنتز باز یافت (Salvage) نوکلئوتیدها، مسیر سنتز از نو (Denovo) آنها توسط آمینوپترین موجود در HAT نیز مهار می‌شود و سلول قادر به همانندسازی نیست ولی در صورتی که این سلول‌ها با سلول‌های طحال ادغام شوند به دلیل کسب توانایی تولید HGPRT و TK از سلول‌های طحال قادر به ادامه همانندسازی از مسیر سنتز باز یافت نوکلئوتیدها هستند، همچنین توانایی تولید آنتی‌بادی را از سلول‌های طحالی کسب می‌کنند. در صورتی که سلول طحال با سلول میلوما ادغام نشده باشد طی زمان می‌میرد.

از محدودیت‌های موجود در این روش می‌توان به پاسخ‌های متفاوت ایمنی (بسته به شدت و ضعف سیستم ایمنی) در افراد مختلف، اپی‌توپ‌های متنوع آنتی‌ژن، عدم اطمینان از جداسازی کامل سلول‌های مولد آنتی-بادی از طحال و تصادفی بودن امتزاج سلول مولد آنتی-بادی با سلول میلوما نام برد. برای این منظور ما از تعداد ۱۰ موش استفاده کردیم که از بین آنها موشی را که پاسخ ایمنی بهتری به تزریق‌های آنتی‌ژن داد، انتخاب کردیم. پلی اتیلن گلیکول استفاده شده در امتزاج سلولی،

منابع

- Anne Lise K, Hestvik, Hmama Z, Av-Gay Y, Mycobacterial manipulation of the host cell, FEMS Microbiology Reviews. 2005;29: 1041-1050.
- Hunter S.W, Gaylord H, Brennan P.J, Structure and antigenicity of the phosphorelated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tuberculocle bacilli. J Biol Chem 1986; 261:12345-12351.
- Besra G.S, Morehouse C.B, Rittner C.M, Waechter C J, Brennan P.J Biosynthesis of Mycobacterial Lipoarabinomannan. J OF Biological Chem. 1997; 272: 18460-18466.
- David J, Gilooly L. Phosphoinositides and phagocytosis. j cell Biology. 2002;155:15-17.
- Brennan PJ, Tessema, Hamasur B, Structure, function and biogenesis of cell wall of mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis. 2003; 83:91-97.
- Birch H. L, Alderwick L.J, Biosynthesis of mycobacterial arabinogalactan: identification of a novel $\alpha(1\rightarrow3)$ arabinofuranosyltransferase Mol Microbiol. 2008; 69: 1191-1206.
- Hamasur B, Kallenius G, Stefan B. A new rapid and simple method for large-scale purification of mycobacterial Lipoarabinomannan, FEMS Immun and Med Microb. 1999; 24:11-17.
- Kaur D, Obregon A, Pham H, chatterjee D, Lipoarabinomannan of Mycobacterium: Mannose capping by a multifunctional terminal mannosyltransferase , PNAS. 2008 ;105 :17973-17977.
- Karakousis, P. C., Bishai W. R., Dorman S. E.. Mycobacterium tuberculosis cell envelope lipids and the host immune response. Cell. Microbiol. 2004; 6:105-116.
- Nigou J , Mamadoud Affe. The phosphatidyl myoinositol anchor of the Lipoarabinomannans from mycobacterium bovis bacillus calmette guerian. Biological chemistry 1997 ;37:23094-23103.
- Hamasur B, Kallrniys G, Stefan B. Synthesis and immunologic characterisation of Mycobacterium tuberculosis Lipoarabinomannan specific oligosaccharide-protein conjugates, Vaccine . 1999; 17:2853-2861.
- Welin A, Winberg M E, Abdalla H, Sarndahl E, Rasmusson B, Stendahl O, et al. Incorporation of Mycobacterium tuberculosis Lipoarabinomannan into Macrophage Membrane Rafts is a Prerequisite for the Phagosomal Maturation Block, Infect and Immune. 2008; 76:2882-2887.
- Glatman-Freedman, A, A. Casadevall Z, Dai, W. R. Jacobs, Jr., A. Li, S. L. Morris, J. A. Navoa, S. *et al.* Antigenic evidence of prevalence and diversity of Mycobacterium tuberculosis arabinomannan. J Clin. Microb. 2004;42:3225-3231.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Biotechnology. 1992; 24: 145-149
- Duval D, Comparison of various methods for monitoring hybridoma cell proliferation. J immunol, Meth, 1990;134:177-185.
- Weiner LM, Dhodapkar MV, Ferrone S. Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. Lancet, 2009; 373: 1033-40.
- Kaufmann SH. Tuberculosis and AIDS- a devilish liaison. Drug Discovery Today. 2007;12: 891-893.
- Mason, P. R., L. Gwanzura, O. Lowe, and A. H. J. Kolk. The use of monoclonal antibodies to identify mycobacteria grown in culture in Zimbabwe. Tubercle Lung Dis 1993; 74:195-199.
- Freedman A.G, Martin J M, Riska P F, Bloom B R, Casadevall A, Monoclonal Antibodies to Surface Antigens of Mycobacterium tuberculosis and Their Use in a Modified Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay for Detection of Mycobacteria, J Clinical Microbiology .1996;34:2795-2802.
- López Y, Falero-Díaz G, Yero D, Solís R.L, Sarmiento M.E, Acosta. A, Antibodies in the protection against mycobacterial infections: what have we learned? ,Procedia in Vaccinology 2010; 2: 172-177.
- Glatman-Freedman , Monoclonal antibodies to mycobacterium tuberculosis and a modified ELISA assay, (2003) US patent 6,545,130 B2.