IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران

سال ۱۴۰۲، دوره ۷، پیاپی ۱۷ صفحه ۲۰۵-۱۹۷

مقاله پژوهشی

تهیه آنتی بادی پلی‌کلونال علیه پروتئین فعال‌کننده‌ی سلول‌های B

رسول مردانی‌جونقانی[۱]، شیوا ایرانی[۱]، مهدی حبیبی‌انبوهی[۲]، مهدی بهدانی[۳،۴*]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. بخش بانک سلولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول‌های درمانی، انستیتو پاستور ایران، ایران، تهران
۴. مرکز تحقیقات بیماری‌های زئونوز، پژوهشکده شمال کشور، انستیتو پاستور ایران، آمل، ایران

دریافت: ۱۵ مهر ۱۴۰۲ پذیرش: ۲ بهمن ۱۴۰۲

چکیده

زمینه و هدف: پروتئین فعال‌کننده‌ی سلول‌های B (BAFF) عضوی مهم از خانواده‌ی فاکتور نکروزدهنده تومورها می‌باشد. بیان بیش از اندازه‌ی این پروتئین در برخی بیماری‌های خودایمنی و سرطان‌ها مشاهده شده است بنابراین این پروتئین می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر تشخیصی و نیز یک هدف درمانی احتمالی مورد استفاده قرار گیرد. هدف مطالعه حاضر تولید پلی‌کلونال آنتی‌بادی شتری برای شناسایی بخش خارج‌سلولی پروتئین BAFF می‌باشد.

روش‌ها: سازه ژنی بیانی حاوی بخش خارج‌سلولی پروتئین BAFF انسانی تهیه و به باکتری اشرشیاکولی (*E.coli BL21* (DE3)) منتقل شد. بیان این پروتئین توسط ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید القاء و تخلیص با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی NTA- نیکل انجام شد. پروتئین به صورت زیرجلدی در چند مرحله به همراه ادجوانت فروند به شتر تزریق شد. عملکرد آنتی‌بادی های پلی‌کلونال در شناسایی پروتئین BAFF سرم جدا شده شتر با تست‌های الایزا، وسترن بلاتینگ و فلوسایتومتری بررسی شد.

یافته‌ها: ایمن‌سازی شتر پس از تزریق پروتئین BAFF نوترکیب با استفاده از تست الایزا اثبات شد. تست‌های فلوسایتومتری وسترن بلات نشان داد که آنتی‌بادی پلی‌کلونال حاصله قادر به شناسایی پروتئین در سطح سلول می‌باشد.

نتیجه‌گیری: باتوجه به نتایج بدست آمده، آنتی‌بادی پلی‌کلونال حاصل از سرم شتر قادر به تشخیص و اتصال اختصاصی به پروتئین BAFF بوده و قابلیت استفاده به‌عنوان یک عامل تشخیصی و درمانی را دارد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌بادی، پروتئین فعال کننده‌ی سلول‌های B ، پلی‌کلونال آنتی‌بادی، شتر

مقدمه

فاکتور فعال‌کننده‌ی سلول B (BAFF)[1] عضوی مهم از خانواده‌ی TNF[2] می‌باشد که با نام‌های BLys، TALL-1، THANK، zTNF4 یا TNFSF13b نیز شناخته می‌شود و نقش مهمی در زنده‌ماندن، تمایز و تکثیر سلول‌های B ایفا می‌کند [۱-۳]. این پروتئین به‌وسیله‌ی مونوسیت‌ها، دندریتیک سل‌ها، نوتروفیل‌ها، بازوفیل‌ها، سلول‌های استرومال، سلول‌های T فعال‌شده، سلول‌های اپی‌تلیال و سلول‌های سرطانیB، بیان و ترشح می‌شود [۵، ۴]. بررسی بیماری‌ها نشان می‌دهد که تولید BAFF در برخی بیماران مبتلا به بیماری خود ایمنی مانند افراد مبتلا به لوپوس اریتماتوز سیستمیک (SLE)[3]، سندروم شوگرن[4]، مولتیپل اسکلروزیس (MS)[5]، اسکلروز سیستمیک[6] و نیز بدخیمی‌های مرتبط با سلول‌های B بیش از اندازه نرمال بوده و

[1] B-cell activating factor (BAFF)
[2] Tumor necrosis factor (TNF)
[3] Systemic lupus erythematosus
[4] Sjogress syndrome
[5] Multiple sclerosis
[6] Systemic sclerosis

* نویسنده مسئول مکاتبات: behdani@pasteur.ac.ir (ORCID ID: 0000-0002-4839-5123)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2024-07-16]

با این بیماری‌ها ارتباط دارد [۶]. همچنین مطالعات نشان داده است که این پروتئین نقش مهمی در علائم سرطان، رگ‌زایی، تکثیر، متاستاز و مقاومت به مرگ سلول‌های سرطانی در بدخیمی‌های مانند مولتیپل میلوما، لوسمی لنفوسیتی مزمن سلول B و سرطان پانکراس و کولورکتال دارد [۷–۹].

پروتئین فعال‌کننده‌ی سلول‌های B به دو فرم وجود دارد؛ محلول و غشایی. زمانی که پروتئین BAFF غشایی در معرض فورین پروتئازها قرار گیرد، شکسته شده و مولکول ۱۷ کیلو دالتونی آزاد می‌شود که دارای فعالیت بیولوژیکی بوده و فرم محلول پروتئین می‌باشد. اتصال BAFF به سلول‌های B به‌وسیله‌ی سه گیرنده میانجی‌گری می‌شود: BAFF-R، TACI و BCMA.

براساس گزارش‌های منتشر شده تخمین زده می‌شود که حدود ۵ درصد از جمعیت جهان به یکی از انواع بیماری های خود ایمن مبتلا باشند [۱۰]. ازسوی‌دیگر سرطان یکی از مهمترین عوامل مرگ و میر در جهان به‌خصوص در جوامع در حال توسعه می‌باشد به‌همین‌جهت، بررسی عوامل دخیل در ابتلاء و نیز روش‌های تشخیصی مناسب برای این دسته از بیماری‌ها حائز اهمیت می‌باشد [۱۲، ۱۱]. امروزه استفاده از روش‌های مبتنی بر آنتی‌بادی مثل الایزا، وسترن‌بلات و فلوسایتومتری در تشخیص سرطان‌ها و بیماری‌های خودایمنی به‌صورت گسترده در حال انجام می‌باشد. نوع خاص و غیرمتعارفی از آنتی‌بادی در سرم شترسانان در سال ۱۹۸۹ کشف شد. این آنتی‌بادی‌ها از لحاظ ساختاری به علت فقدان زنجیره‌ی سبک (آنتی‌بادی‌هایی که تنها دارای زنجیره‌ی سنگین آنتی‌بادی‌ها هستند) و ویژگی‌های منحصر به فرد نسبت به آنتی‌بادی‌های معمول متفاوت هستند. این ویژگی‌ها مانند افینیتی و اختصاصیت بالای آن‌ها، مقاومت در برابر دمای بالا، حلالیت خوب و رفتار کاملاً یکنواخت، اندازه‌ی کوچک آن‌ها (قطر۲/۵ نانومتر، طول ۴ نانومتر و وزن تقریبی ۱۵ کیلودالتون)، هزینه‌ی تولید نسبتاً کم، سادگی مهندسی ژنتیک، انعطاف‌پذیری، ایمنی‌زایی کم و نفوذ بالا به بافت‌ها می‌باشد. لذا این آنتی‌بادی‌ها می‌توانند در تست‌های تشخیصی و نیز کاربردهای درمانی مورد توجه گیرند [۱۳]. هدف از تحقیق حاضر تهیه پلی‌کلونال آنتی‌بادی شتری علیه بخش خارج‌سلولی (فرم محلول) پروتئین BAFF نوترکیب می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بیان نوترکیب و تخلیص پروتئین BAFF

قطعه ژنی ناحیه خارج‌سلولی پروتئین نوترکیب BAFF (NM_001145645.2) توسط شرکت بیومتیک کانادا سنتز و در پلاسمید pET-22 کلون گردید. این پلاسمید با استفاده از روش شوک حرارتی به *اشرشیاکولی BL21(DE3)* ترانسفورم گردید. برای اطمینان از انتقال سازه ژنی به میزبان از تکنیک کلونی PCR استفاده شد. کشت کلونی انتخاب شده ابتدا در حجم کم (۵ میلی‌لیتر؛ برای بررسی بیان) و سپس در حجم بالای (۲۵۰ میلی‌لیتر؛ برای تخلیص پروتئین) محیط کشت انجام پذیرفت. القاء بیان پروتئین BAFF با استفاده از غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG[7] و انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت انجام پذیرفت. پلت سلولی تشکیل‌شده پس از سانتریفیوژ محیط کشت، ابتدا در بافر بایندینگ[8] حل شده و درنهایت به‌وسیله‌ی سونیکه‌کردن با دستگاه سونیکاتور ساخت شرکت سیگما–آلدریچ[9] آمریکا، این سلول ها لیز شدند. پس از سانتریفیوژ و فیلتراسیون، محلول فیلتر شده به ستون NTA- نیکل که قبلاً با بافر بایندینگ شستشو شده بود منتقل گردید. پس از شستشو با بافر شستشو[10]، جهت جداکردن پروتئین نوترکیب BAFF از ستون از بافر الوشن[11] استفاده شد. به‌منظور جداسازی بافر حاوی اوره از محلول حاوی پروتئین از کیسه دیالیز با اندازه منافذ ۱۲ کیلو دالتون و بافر نمک–فسفات (PBS)[12]استفاده گردید. درنهایت، پروتئین‌های تخلیص‌شده با تکنیک (SDS-PAGE)[13] الکتروفورز شدند. برای وسترن بلاتینگ از ضد–هیستیدین و سپس(HRP) ضد خرگوشی کونژوگه[14] ساخت شرکت بیولجند[15] آمریکا استفاده شد.

[7] Isopropyl-β-thiogalactopyranoside

[8] 8M urea, 20mM Tris-HCL, 500mM NaCl pH 8.0

[9] Sigma-Aldrich

[10] 8 M urea, 20 mM Tris-HCL, 500 mM NaCl pH 6.3

[11] 8 M urea, 20 mM Tris-HCL, 500 mM NaCl pH 4.5

[12] Phosphate-buffer saline (PBS)

[13] Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

[14] Anti-Rabbit Horseradish Peroxidase (HRP) conjugated

[15] Biolegend

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2024-07-16]

ایمن‌سازی شتر

این مطالعه بر اساس مجوز کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران با کد اخلاق IR.PII.REC.1400.041 انجام شد. یک شتر ماده ۹ ماهه که در بخش علوم حیوانات انستیتو پاستور ایران (کرج) نگهداری می‌شد، با استفاده از پروتئین نوترکیب BAFF (rBAFF) تخلیص‌شده در مرحله‌ی قبل ایمن‌سازی شد. تزریق زیر جلدی به‌منظور ایمن‌سازی شش مرتبه و به فاصله‌ی زمانی یک بار در هفته و در محل‌های نزدیک به غدد لنفاوی شتر (گردن و جدار شکم) انجام شد. در اولین تزریق ۲۰۰ میکروگرم پروتئین BAFF نوترکیب با حجم مساوی از ادجوانت فروند ساخت شرکت سیگما–آلدریچ، کامل مخلوط شد. سایر تزریقات با استفاده از ادجوانت ناقص فروند انجام شد. برای ارزیابی پاسخ ایمنی شتر به آنتی ژن از الایزا (ELISA)[16] استفاده شد.

استفاده از پلی‌کلونال آنتی‌بادی شتری در تشخیص پروتئین BAFF نوترکیب توسط وسترن بلات

پروتئین نوترکیب BAFF پس از آماده سازی در ترکیب با لودینگ و جوشاندن، در ژل SDS-PAGE ۱۵ درصد ران شد. پس از انتقال پروتئین‌ها به کاغذ نیتروسلولز، مرحله بلاکینگ کاغذ با استفاده از شیر خشک ۳ درصد، به‌مدت ۱۶ ساعت و دمای ۴ درجه سانتیگراد انجام شد. کاغذ با سرم شتر پیش از ایمن‌سازی و نیز سرم پس از آخرین ایمن‌سازی با رقت ۱:۲۰۰ و به‌مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. پس از شستشو، آنتی‌بادی خرگوشی ضد شتر تهیه شده در انستیتو پاستور ایران، با رقت ۱:۲۰۰۰ اضافه شد و به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. در مرحله بعد و پس از شستشو با بافر نمک–فسفات، آنتی‌بادی ضدخرگوشی کونژوگه HRP (ساخت شرکت بیولجند آمریکا)، با رقت ۱:۱۰۰۰ اضافه و در دمای اتاق به‌مدت یک ساعت انکوبه گردید. درنهایت پس از آخرین شستشو، کاغذ با استفاده از محلول ۴–کلرو ۱– نفتول (ساخت شرکت سیگما–آلدریچ) رنگ آمیزی شد.

تشخیص BAFF نوترکیب در الایزا با آنتی‌بادی پلی‌کلونال شتری

به پلیت‌های الایزا غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر پروتئین BAFF نوترکیب در بافر بی کربنات اضافه گردید و به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. بلاک‌کردن با استفاده از شیر خشک ۳ درصد در بافر نمک–فسفات انجام و به‌صورت شبانه در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوباسیون انجام پذیرفت. رقت‌های ۱:۱۰۰، ۱:۲۰۰، ۱:۴۰۰، ۱:۸۰۰، ۱:۱۶۰۰، ۱:۳۲۰۰، ۱:۶۴۰۰ و ۱:۱۲۸۰۰ از سرم شتر پیش از ایمن‌سازی و سرم پس از شش روز از آخرین تزریق با استفاده بافر نمک–فسفات تهیه شد و به چاهک‌های پلیت الایزا اضافه شد. انکوباسیون به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انجام شد. شستشو با بافر نمک–فسفات انجام و در ادامه آنتی‌بادی خرگوشی ضد شتر تهیه شده در انستیتو پاستور ایران، با رقت ۱:۲۰۰۰ به چاهک‌ها اضافه و انکوباسیون یک‌ساعته در دمای اتاق انجام شد. در مرحله‌ی بعد و پس از شستشو با بافر نمک–فسفات آنتی بادی ضد خرگوشی کونژوگه شده با HRP (ساخت شرکت سیگما–آلدریچ)، با رقت ۱:۱۰۰۰ اضافه و به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. فعالیت پراکسیداز با افزودن (TMB)[17] (ساخت شرکت پیشتاز طب ایران)، بررسی شد. جذب نوری (OD) در طول موج ۴۵۰ نانومتر پس از افزودن اسید سولفوریک ۲ نرمال اندازه‌گیری شد. برای مقایسه اختصاصیت تشخیص و اتصال آنتی‌بادی پلی‌کلونال موجود در سرم خون شتر ایمن‌شده نسبت به آنتی‌ژن rBAFF نیز از تست الایزا و استفاده از پروتئین‌های مختلف استفاده شد.

تشخیص پروتئین BAFF سطح سلول در فلوسایتومتری با آنتی‌بادی پلی‌کلونال شتری

سلول U937 ،تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، که رده‌ی سلولی لنفوما می‌باشد در محیط RPMI-1640 تولید شرکت سیگما–آلدریچ، همراه با FBS ۱۰ درصد، دی‌اکسید کربن ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شد. برای انجام فلوسایتومتری تعداد ۳×۱۰^{۵} سلول در لوله فلوسایتومتری ریخته شد و دو مرتبه با محلول نمک–فسفات شستشو گردید. مقدار ۲ میکرولیتر از آنتی‌بادی پلی‌کلونال شتری به سلول‌ها اضافه شد و به‌مدت یک ساعت بر روی یخ انکوبه گردید. پس از

[16] Enzyme linked immunosobent assay

[17] 3,3',5,5;-tetramethylbenzidine (TMB)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2024-07-16]

شستشو ۱ میکروگرم از آنتی‌بادی خرگوشی ضدشتری تهیه شده در انستیتو پاستور ایران، در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر به سلول‌ها اضافه شد و به‌مدت یک ساعت بر روی یخ انکوبه گردید. در ادامه، سلول‌ها شسته شده و ۲ میکروگرم از آنتی‌بادی (FITC) ضد خرگوشی کونژوگه[18](ساخت شرکت آبکم انگلستان) به سلول‌ها اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ انکوبه شد. درنهایت، سلول‌ها شسته شده و با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر پارتک سایفلو (ساخت شرکت سیسمکس ژاپن) مورد بررسی قرار گرفت. به‌عنوان کنترل از آنتی‌بادی اختصاصی برعلیه پروتئین BAFF (آنتی‌بادی منوکلونال موشی، ساخت شرکت آر اند دی سیستم آمریکا) استفاده شد.

یافته‌ها

بیان پروتئین نوترکیب BAFF

پس از ترانسفورم سازه‌ی ژن بخش خارج‌سلولی پروتئین BAFF به باکتری میزبان و کشت در حجم بالا، بااستفاده‌از IPTG القاء گردید. به‌منظور بررسی بیان SDS-PAGE انجام پذیرفت. ازآنجایی‌که در انتهای پروتئین نوترکیب تگ-هیستیدین وجود داشت از روش افینیتی کروماتوگرافی نیکل NTA- به‌منظور تخلیص پروتئین استفاده شد و پروتئین تخلیص‌شده بر روی SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱الف). باتوجه‌به شکل می‌توان تک باند در حدود ۱۷ کیلو دالتون را مشاهده کرد. در ادامه و جهت تایید پروتئین، وسترن‌بلات بااستفاده‌از ضدهیستیدین انجام پذیرفت (شکل ۱ب).

نتایج استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال شتری برای تشخیص پروتئین BAFF نوترکیب با تکنیک وسترن بلات

برای بررسی قابلیت آنتی‌بادی پلی‌کلونال شتری در تکنیک وسترن‌بلات، پروتئین BAFF به کاغذ نیتروسلولز منتقل گردید و سپس سرم شتر قبل از تزریق و پس از ایمن‌سازی به آن اضافه شد. باتوجه‌به این‌که هیچ باندی در وسترن بلات با استفاده از سرم پیش از تزریق آنتی‌ژن تشکیل نشد و نیز تشکیل باندهای مورد انتظار در وسترن‌بلات بااستفاده‌از سرم جداشده از خون شتر پس از آخرین تزریق، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که آنتی‌بادی پلی‌کلونال شتری برای شناسایی آنتی‌ژن BAFF نوترکیب در روش وسترن‌بلات می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (شکل ۲).

نتایج استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال شتری برای تشخیص پروتئین BAFF نوترکیب بااستفاده‌از الایزا

نتایج حاصل از الایزا نشان‌دهنده توانایی آنتی‌بادی در شناسایی پروتئین BAFF و نیز ایمن‌سازی شتر در برابر این پروتئین می‌باشد. همانطور که نمودار ۱ مشخص است میزان جذب نوری با کاهش رقت سرم کاهش می‌یابد. همچنین نسبت به سرم پیش از تزریق جذب نوری تفاوت تا حدود شش برابری در رقت‌های مختلف را نشان می‌دهد.

نتایج استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال شتری برای تشخیص پروتئین BAFF به روش فلوسایتومتری

سلول دارای آنتی‌ژن BAFF با استفاده از آنتی‌بادی پلی-کلونال شتری مورد بررسی قرار گرفت. بررسی سلول با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر انجام شد و هیستوگرام آن در نمودار ۲ نشان داده شده است. همانطورکه مشخص است آنتی‌بادی پلی-کلونال شتری توانایی شناسایی پروتئین BAFF در سطح سلول را دارا می‌باشد.

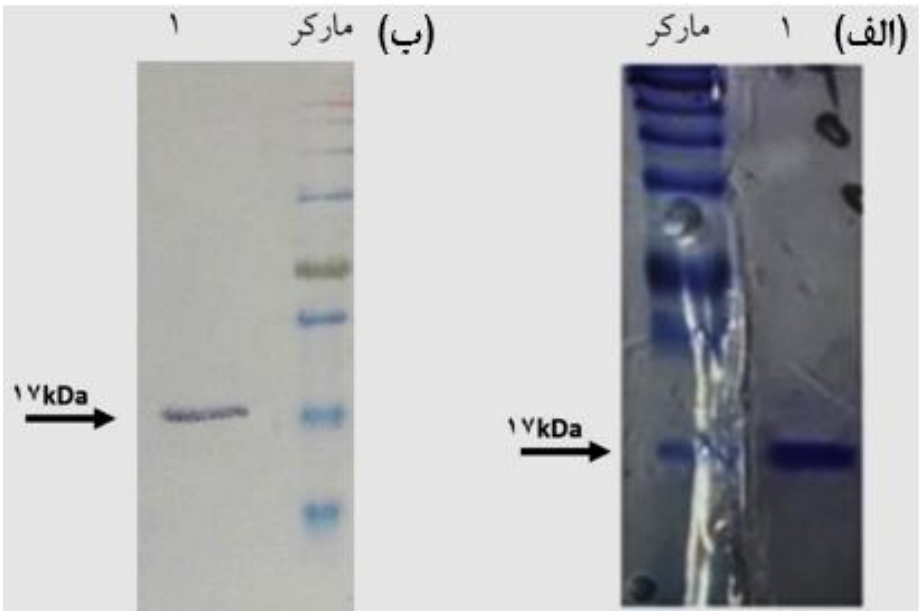
بحث

بیماری‌های خودایمنی (AIDs)[19] مجموعه‌ای از بیماری‌ها را شامل می‌شود که بر روی سیستم‌های یک یا چند ارگانی تاثیر می‌گذارند. این دسته از بیماری‌ها از آن جهت قابل توجه و بررسی است که براساس گزارش‌های منتشرشده تخمین زده می‌شود که حدود ۵ درصد از جمعیت ایالات متحده آمریکا به یکی از این نوع بیماری‌ها مبتلا می‌باشند [۱۴]. اخیراً براساس تحقیقاتی که بر روی اجزائی از سلول‌های B که با سیستم ایمنی اختصاصی ارتباط دارند صورت گرفته، اهمیت درگیربودن این دسته از سلول‌ها با برخی از بیماری‌های خودایمنی مشخص گردیده است [۱۴]. به‌عنوان نمونه، مطالعاتی که با استفاده از داروی رتوکسان (دارویی که با مهار گیرنده‌ی D20 باعث مرگ سلول‌های B

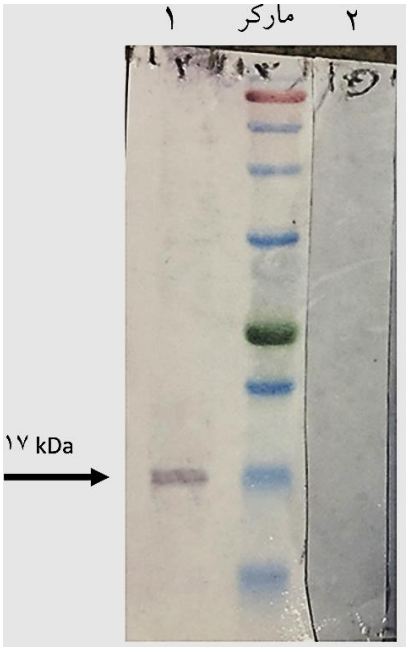
[18] Anti-Rabbit Fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate

[19] Acquired immunodeficiency syndrome

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2024-07-16]



شکل ۱- بیان، تخلیص و تایید بیان پروتئین نوترکیب BAFF . الف) پروتئین تخلیص شده با کروماتوگرافی تمایلی؛ ب) وسترن بلات پروتئین BAFF تخلیص‌شده با ضدهیستیدین.



شکل ۲- وسترن‌بلات با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال شتری به‌منظور شناسایی پروتئین نوترکیب BAFF. ۱: با استفاده از سرم پس از ایمن‌سازی شتر؛ ۲: بااستفاده‌از سرم پیش از ایمن‌سازی شتر.

می‌شود) صورت گرفت نتایج امیدوارکننده‌ای نه تنها در بیماری‌های خودایمنی مهمی مانند لوپوس اریتماتوز سیستمیک (SLE)، آرتریت روماتوئید (RA) و اسکلروز سیستمیک (SS) داشته بلکه در بیماری‌های نادرتری مانند تیپ دو کرایوگلوبولین نوع مختلط[20]، گرانولوماتوز وگنر[21] و کم‌خونی همولیتیک خودایمنی نیز داشته است [۱۵].

سال‌های اخیر شاهد پیشرفت‌های بسیاری در مورد شناخت مکانیسم‌های درگیر در بقاء سلول‌های B بوده‌ایم، شناخت فاکتور BAFF که عضوی از ابرخانواده گیرنده‌های فاکتور نکروز تومور بوده و از عوامل بقاء سلول‌های B می‌باشد یکی از مهمترین این پیشرفت‌ها محسوب می‌شود [۱۶]. بررسی بسیاری از بیماری‌ها نشان می‌دهد که تولید بیش‌ازحد BAFF با بیماری‌های خودایمنی و نیز بدخیمی‌های مرتبط با سلول‌های B ارتباط دارد [۶]. به‌عنوان نمونه میزان BAFF و رسپتورهای آن در مبتلایان

[20] type II mixed cryoglobulinemia

[21] Wegener's granulomatosis

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2024-07-16]

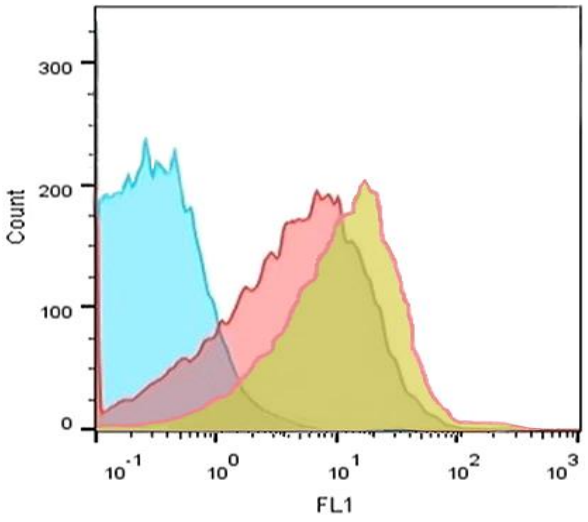
به لنفوما بیشتر است، و یا به عبارت بهتر در لنفوم سلول B[22] میزان BAFF با درمان، روش درمان، پیش‌آگهی و بقاء ارتباط دارد. مطالعاتی که اخیراً انجام شده نشان داده است که بسیاری از بیماران مبتلا به CLL میزان بالاتری از BAFF را در مقایسه با افراد سالم دارند. در شرایط *in vitro* درمان سلول‌های CLL بوسیله‌ی آنتی‌بادی‌های ضد BAFF نشان داد که میزان مرگ‌ومیر آن‌ها در مقابل سلول‌هایی که این آنتی‌بادی‌ها در آن‌ها استفاده نشده بود بیشتر بود (۱۷). این گونه مطالعات پیشنهاد می‌کند که یک پتانسیل مناسب برای استفاده از آنتاگونیست BAFF برای درمان بدخیمی‌های مربوط به سلول‌های B وجود دارد و به همین دلیل مسیر BAFF به‌عنوان اولین هدف درمانی در بسیاری از بیماری‌های خود ایمن می‌باشد [۱۸]. در سال ۲۰۱۱، داروی بلیمومب[23] که نوعی آنتی‌بادی مونوکلونال برعلیه BAFF انسانی است به‌عنوان اولین داروی دارای تاییدیه و موفق در درمان برخی بیماران مبتلا به SLE معرفی گردید [۱۸].

تا به امروز بیشتر مطالعاتی که بر روی آنتی‌بادی‌ها جهت شناسایی بیومارکرهای سرطانی و یا ابزاری برای درمان بیماری‌های خود ایمنی و سرطان انجام‌گرفته از آنتی‌بادی‌های خرگوشی و یا موشی استفاده شده است. پس از کشف و شناسایی نوع جدید آنتی‌بادی‌ها که از شترسانان جدا شده و به‌عنوان آنتی‌بادی‌های زنجیره‌ی سنگین (HcAbs)[24] شناخته می‌شوند،

نمودار ۱– نتایج تست الایزا بااستفاده‌از پلی‌کلونال آنتی‌بادی شتری جهت تشخیص پروتئینBAFF.

[22]B-cell lymphoma

[23]Belimumab



نمودار ۲– نتایج فلوسایتومتری سلول‌های U937 بااستفاده‌از آنتی‌بادی پلی کلونال شتری علیه پروتئین BAFF. هیستوگرام آبی؛ سلول‌های U937 بدون تیمار با آنتی‌بادی، هیستوگرام سبز؛ سلول‌های U937 که با منوکلونال آنتی‌بادی تجاری برعلیه پروتئین BAFF تیمار شده‌اند، هیستوگرام قرمز؛ سلول‌های U937 تیمار شده با آنتی‌بادی پلی‌کلونال جداشده از سرم ایمن‌شده علیه پروتئین نوترکیب BAFF.

این دسته از آنتی‌بادی‌ها به‌علت خصوصیات ویژه منحصر به فرد خود می‌توانند برای‌این‌منظور مفید باشند. از جمله مهمترین این ویژگی‌ها توانایی تحمل شرایط محیطی نامطلوب مثل دمای بالا را می‌توان ذکر نمود. این ویژگی سبب می‌شود تا بتوانیم کیت‌های تشخیصی برای استفاده در شرایط محیطی با دمای بالا و یا مناطقی که امکان استفاده از یخچال نمی‌باشد را تهیه نماییم. در مطالعه‌ی حاضر سازه‌ی ژنی حاوی بخش خارج‌سلولی پروتئین BAFF طراحی شد و پروتئین به صورت نوترکیب در باکتری *E. coli* بیان گردید. پروتئین نوترکیب به روش افینیتی کروماتوگرافی NTA- نیکل تخلیص گردید. پروتئین تخلیص شده بااستفاده‌از ادجوانت جهت ایمن‌سازی به شتر تزریق گردید. شش روز پس از آخرین تزریق سرم از خون شتر گرفته شد و برای انجام تست‌های الایزا، وسترن بلات و فلوسایتومتری استفاده شد. نتایج این بررسی نشان داد که شتر نسبت به پروتئین نوترکیب BAFF ایمن گردیده است. همچنین قابلیت این آنتی‌بادی پلی‌کلونال در استفاده در تست‌های تشخیصی مثل الایزا، وسترن‌بلات و فلوسیتومتری نشان داده شد. نتایج

[24]Heavy chain antibodies

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2024-07-16]

تست‌های تشخیصی با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال شتری با نتایج سایر مطالعات مشابهت داشت. برای نمونه، مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۹ توسط ستوده و همکاران جهت تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال برعلیه پروتئین ۴ مرتبط با لنفوسیت‌های تی سایتوتوکسیک (CTLA-4)[۲۵] انجام شد نشان داد که آنتی‌بادی‌های پلی کلونال بدست‌آمده از شتر ایمن‌سازی‌شده پس از تزریق پروتئین نوترکیب CTLA-4 قادر به شناسایی و اتصال مناسب و قوی به پروتئین CTLA-4 هم در سطح سلول و هم در بافت می‌باشد. سنجش این اتصال توسط فلوسایتومتری و نیز رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی انجام پذیرفت [۱۹]. همچنین در مطالعه انجام شده در سال۲۰۲۰ نشان داده شد آنتی‌بادی پلی‌کلونال شتری علیه (NDM-1) [۲۶]قادر است از هیدرولیز این آنتی‌بیوتیک‌ها جلوگیری نماید. در این مطالعه، ایزوتیپ‌های ایمونوگلوبولین G شتری (IgG) حاوی آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین و معمولی پس از ایمن‌سازی موفقیت‌آمیز شتری با استفاده از مقادیر افزایشی آنزیم نوترکیب NDM-1 مورد آزمایش قرار گرفت [۲۰]. پژوهشی دیگری که در سال ۲۰۰۳ به منظور تعیین اتصال آنتی‌بادی پلی‌کلونال بدست آمده از شتر ایمن شده با استفاده نوروتوکسین‌های توکسین عقرب[۲۷] انجام شد نشان داد که نسبت قابل‌توجهی از آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین پلی‌کلونال به اجزای توکسین به‌ویژه به جزء AahII، که سمی‌ترین جزء زهر عقرب مذکور می‌باشد، متصل می‌شوند [۲۱].

نتیجه‌گیری

آنتی‌بادی پلی‌کلونالی که در این مطالعه از سرم شتر بدست آمد توانست پروتئین BAFF را بخوبی تشخیص داده و به آن متصل شود. استفاده از این آنتی‌بادی در تشخیص و درمان نیاز به انجام مطالعات تکمیلی دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان برخود لازم می‌دانند تا از تلاش‌های خانم دکتر هاجرالسادات قادری و خانم دکتر نازلی ستوده و آقای محمد حسینی‌نژاد به خاطر راهنمایی‌های ارزشمندشان در انجام این پروژه تشکر و قدردانی نمایند.

ملاحظات مالی

این مطالعه با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران (شماره گرنت ۹۹۴) انجام شد.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

ر.م.ج.: نگارش و انجام مطالعه؛ م.ب.: ایده ، طراحی و نظارت بر مطالعه؛ ش.ا.: همکاری در نظارت بر مطالعه؛ م.ح.ا: همکاری در نظارت بر مطالعه.

فهرست منابع

[1] Gross JA, Johnston J, Mudri S, Enselman R, Dillon SR, Madden K, Xu W, Parrish-Novak J, Foster D, Lofton-Day C, Moore M, Littau A, Grossman A, Haugen H, Foley K, Blumberg H, Harrison K, Kindsvogel W, Clegg CH, TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. ***Nature*** 404 (2000) 995-999.

[2] Mukhopadhyay A, Ni J, Zhai Y, Yu G-L, Aggarwal BB, Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor-κB, and c-Jun NH2-terminal kinase. ***J Biol Chem*** 274 (1999) 15978-15981.

[3] Shu HB, Hu WH, Johnson H, TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens. ***J leukoc Biol*** 65 (1999) 680-683.

[4] Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer J-L, Holler N, Ambrose C, Lawton P, Bixler S, Acha-Orbea H, Valmori D, Romero P, Werner-Favre C, Zubler RH, Browning JL, Tschopp J, BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. ***J Exp Med*** 189 (1999) 1747-1756.

[5] Davidson A, Targeting BAFF in autoimmunity. ***Current Opin Immunol*** 22 (2010) 732-739.

[6] Shen Y, Wang S, Ai H, Min C, Chen Y, Zhang S, Molecular structure, bioinformatics analysis, expression and bioactivity of BAFF (TNF13B) in dog (Canis

[25] Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

[26] NewDelhi Metallo-β-lactamase-1

[27] *Androctonus australis hector*

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2024-07-16]

familiaris). ***Vet Immunol Immunopathol*** 142 (2011) 133-139.

[7] Bolkun L, Lemancewicz D, Jablonska E, Kulczynska A, Bolkun-Skornicka U, Kloczko J, Dzieciol J, BAFF and APRIL as TNF superfamily molecules and angiogenesis parallel progression of human multiple myeloma. ***Ann Hematol*** 93 (2014) 635-644.

[8] Dong X, Qin J, Ma J, Zeng Q, Zhang H, Zhang R, Huang S, Chen L, BAFF inhibits autophagy promoting cell proliferation and survival by activating Ca2+-CaMKII-dependent Akt/mTOR signaling pathway in normal and neoplastic B-lymphoid cells. ***Cell Signal*** 53 (2019) 68-79.

[9] Park S, Jang J-W, Moon E-Y, BAFF attenuates oxidative stress-induced cell death by the regulation of mitochondria membrane potential via Syk activation in WiL2-NS B lymphoblasts. ***Sci Rep*** 10 (2020) 11784.

[10] Singh SP, Wal P, Wal A, Srivastava V, Tiwari R, Sharma RD, Understanding autoimmune disease: an update review. ***IJPTB*** 3 (2016) 51-65.

[11] Street W, Cancer Facts & Figures 2019. [cited 2024 Jan 18]. Available from: https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2018.html

[12] Srinivas PR, Kramer BS, Srivastava S, Trends in biomarker research for cancer detection. ***Lancet Oncol*** 2 (2001) 698-704.

[13] Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, Cauerhff A, Danquah W, Rissiek B, Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Boyer O, Seman M, Licea A, Serreze DV, Goldbaum FA, Haag F, Koch-Nolte F, Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. ***Med Microbiol Immunol*** 198 (2009) 157-174.

[14] Gorman C, Leandro M, Isenberg D, B cell depletion in autoimmune disease. ***Arthritis Res Ther*** 5 (2003) S17-S21.

[15] Somer BG, Tsai DE, Downs L, Weinstein B, Schuster SJ, Improvement in Sjögren's syndrome following therapy with rituximab for marginal zone lymphoma. ***Arthritis Rheum*** 49 (2003) 394-398.

[16] Kalled SL, The role of BAFF in immune function and implications for autoimmunity. ***Immunol Rev*** 204 (2005) 43-54.

[17] Briones J, Timmerman JM, Hilbert DM, Levy R, BLyS and BLyS receptor expression in non-Hodgkin's lymphoma. ***Exp Hematol*** 30 (2002) 135-141.

[18] Hu J, Yu Y, Han H, Civoli F, Zhuang Y, Thomas J, Swanson S, Jing S, Gupta S, Development of a novel BAFF responsive cell line suitable for detecting bioactive BAFF and neutralizing antibodies against BAFF-pathway inhibiting therapeutics. ***Cells*** 3 (2014) 79-91.

[19] Sotoudeh N, Noormohammadi Z, Habibi-Anbouhi M, Kazemi-Lomedasht F, Behdani M, Evaluation of laboratory application of Camelid Sera containing heavy-chain polyclonal antibody against recombinant cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4. ***Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*** 38 (2019) 235-241.

[20] Ben Abderrazek R, Chammam S, Ksouri A, Perilli M, Dhaouadi S, Mdini I, Benlasfar Z, Amicosante G, Bouhaouala-Zahar B, Piccirilli A, Inhibitory potential of polyclonal camel antibodies against New Delhi metallo-β-lactamase-1 (NDM-1). ***Molecules*** 25 (2020) 4453.

[21] Meddeb-Mouelhi F, Bouhaouala-Zahar B, Benlasfar Z, Hammadi M, Mejri T, Moslah M, Karoui H, Khorchani T, El Ayeb M, Immunized camel sera and derived immunoglobulin subclasses neutralizing Androctonus australis hector scorpion toxins. ***Toxicon*** 42 (2003) 785-791.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2024-07-16]

Research paper

Preparation of Polyclonal Antibody against B-cell activating factor

Rasoul Mardani-Jouneghani[1], Shiva Irani[1], Mahdi Habibi-Anbouhi[2], Mahdi Behdani[3,4*]

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
3. Biotechnology Research Centre, Venom and Biotherapeutics Molecules Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
4. Zoonoses Research Centre, Pasteur Institute of Iran, Amol, Iran

Received: 7 October 2023 Accepted: 22 January 2024

Abstract

Background and Aim: B-cell activating factor (BAFF) belongs to the tumor necrosis factor (TNF) superfamily and plays a critical role in B-cell survival and differentiation. Overexpression of BAFF has been linked to autoimmune diseases and B-cell malignancies. The biologically active segment of this protein is a soluble domain, making it a promising target for antibody-based therapies. This study aimed to develop a polyclonal camel antibody capable of detecting BAFF on cell surfaces.

Methods: An expression vector, pET22b, containing the extracellular domain of the BAFF protein (NM_001145645.2), was constructed and introduced into Escherichia coli BL21 (DE3) using the calcium chloride heat shock method (CaCl2). Subsequently, the recombinant protein was induced using 1mM IPTG and protein purification was carried out with $Ni2^{+}$–NTA resin. A 9-month-old female *Camelus dromedaries* was immunized with purified recombinant BAFF protein (rBAFF) mixed with Freund's adjuvant. Following immunization, the isolated polyclonal antibody was assessed using ELISA, western blotting, and flow cytometry to detect rBAFF protein.

Results: The study confirmed the successful preparation of recombinant BAFF protein and the effectiveness of camel immunization and purification processes. The isolated polyclonal antibody demonstrated the ability to identify recombinant BAFF proteins in ELISA and western blot tests. Flow cytometry demonstrated its capacity to detect BAFF protein on cell surfaces.

Conclusion: Given the significance of diagnosing and developing novel adjuvant treatment methods for autoimmune diseases and cancer, this study's findings support the potential use of polyclonal antibodies targeting the BAFF antigen as valuable tools for these purposes.

Keywords: B-cell activating factor, Camel, Heavy chain antibody, Polyclonal antibody

Please cite this article as follows:

Mardani-Jouneghani R, Irani S, Habibi-Anbouhi M, Behdani M, Preparation of Polyclonal Antibody against B-cell activating factor ***Iran J Physiol Pharmacol*** 7 (2023) 197-205.

*Corresponding author: behdani@pasteur.ac.ir (ORCID ID: 0000-0002-4839-5123)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2024-07-16]