

مقاله پژوهشی

تهیه آنتی بادی پلی کلونال علیه پروتئین فعال کننده سلول های B

رسول مردانی جوقنانی^۱، شیوا ایرانی^۱، مهدی حبیبی انبوهی^۲، مهدی بهدانی^{۳،۴*}

۱. گروه زیست شناسی، 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 بیومولکول های درمانی، انستیتو پاستور ایران، ایران، تهران

۴. مرکز تحقیقات بیماری های زئونوز، پژوهشکده شمال کشور، انستیتو پاستور ایران، آمل، ایران

دریافت: ۱۵ مهر ۱۴۰۲

پذیرش: ۲ بهمن ۱۴۰۲

چکیده

زمینه و هدف: پروتئین فعال کننده سلول های B (BAFF) عضوی مهم از خانواده ی فاکتور نکروزدهنده تومورها می باشد. بیان بیش از اندازه ی این پروتئین در برخی بیماری های خودایمنی و سرطان ها مشاهده شده است بنابراین این پروتئین می تواند به عنوان یک نشانگر تشخیصی و نیز یک هدف درمانی احتمالی مورد استفاده قرار گیرد. هدف مطالعه حاضر تولید پلی کلونال آنتی بادی شتری برای شناسایی بخش خارج سلولی پروتئین BAFF می باشد.

روش ها: سازه ژنی بیانی حاوی بخش خارج سلولی 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 آنتی بادی های پلی کلونال در شناسایی پروتئین BAFF سرم جدا شده شتر با تست های الایزا، وسترن بلاتینگ و فلوسایتومتری بررسی شد.

یافته ها: ایمن سازی شتر پس از تزریق پروتئین BAFF نو ترکیب با استفاده از تست الایزا اثبات شد. تست های فلوسایتومتری وسترن بلات نشان داد که آنتی بادی پلی کلونال حاصله قادر به شناسایی پروتئین در سطح سلول می باشد.

نتیجه گیری: باتوجه به نتایج بدست آمده، آنتی بادی پلی کلونال حاصل از سرم شتر قادر به تشخیص و اتصال اختصاصی به پروتئین BAFF بوده و قابلیت استفاده به عنوان یک عامل تشخیصی و درمانی را دارد.

واژه های کلیدی: آنتی بادی، پروتئین فعال کننده سلول های B، پلی کلونال آنتی بادی، شتر

مقدمه

T فعال شده، سلول های اپی تلیال و سلول های سرطانی B، بیان و ترشح می شود [۴، ۵]. بررسی بیماری ها نشان می دهد که تولید BAFF در برخی بیماران مبتلا به بیماری خود ایمنی مانند افراد مبتلا به لوپوس اریتماتوز سیستمیک (SLE)^۲، سندروم شوگرن^۴، مولتیپل اسکلروزیس (MS)^۵، اسکلروز سیستمیک^۶ و نیز بدخیمی های مرتبط با سلول های B بیش از اندازه نرمال بوده و

فاکتور فعال کننده سلول B (BAFF) عضوی مهم از خانواده ی TNF^۲ می باشد که با نام های BLys، TALL-1، THANK، zTNF4 یا TNFSF13b نیز شناخته می شود و نقش مهمی در زنده ماندن، تمایز و تکثیر سلول های B ایفا می کند [۱-۳]. این پروتئین به وسیله ی مونوسیت ها، دندریتیک سل ها، نوتروفیل ها، بازوفیل ها، سلول های استرومال، سلول های

⁴ Sjogress syndrome

⁵ Multiple sclerosis

⁶ Systemic sclerosis

¹ B-cell activating factor (BAFF)

² Tumor necrosis factor (TNF)

³ Systemic lupus erythematosus

کاربردهای درمانی مورد توجه گیرند [۱۳]. هدف از تحقیق حاضر تهیه پلی کلونال آنتی‌بادی شتری علیه بخش خارج سلولی (فرم محلول) پروتئین BAFF نوترکیب می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بیان نوترکیب و تخلیص پروتئین BAFF

قطعه ژنی ناحیه خارج سلولی پروتئین نوترکیب BAFF (NM_001145645.2) توسط شرکت بیومیتیک 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 و انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت انجام پذیرفت. پلت سلولی تشکیل شده پس از سانتریفیوژ محیط کشت، ابتدا در بافر بایندینگ^۸ حل شده و در نهایت به وسیله سونیکه کردن با دستگاه سونیکاتور ساخت شرکت سیگما-آلدريج^۹ آمریکا، این سلول‌ها 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^{۱۰}، جهت جدا کردن پروتئین نوترکیب BAFF از ستون بافر الوشن^{۱۱} استفاده شد. به منظور جداسازی بافر حاوی اوره از محلول حاوی پروتئین از کیسه دیالیز با اندازه منافذ ۱۲ کیلو دالتون و بافر نمک-فسفات (PBS)^{۱۲} استفاده گردید. در نهایت، پروتئین‌های تخلیص شده با تکنیک (SDS-PAGE)^{۱۳} الکتروفورز شدند. برای وسترن بلاتینگ از ضد-هیستیدین و سپس (HRP) ضد خرگوشی کونزوگه^{۱۴} ساخت شرکت بیولجند^{۱۵} آمریکا استفاده شد.

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 فعال‌کننده 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 به وسیله سه گیرنده میانجی‌گری می‌شود: TACI، BAFF-R و BCMA.

براساس گزارش‌های منتشر شده تخمین زده می‌شود که حدود ۵ درصد از جمعیت جهان به یکی از انواع بیماری‌های خود ایمن مبتلا باشند [۱۰]. از سوی دیگر سرطان یکی از مهمترین عوامل مرگ و میر در جهان به خصوص در جوامع در حال توسعه می‌باشد به همین جهت، بررسی عوامل دخیل در ابتلاء و نیز روش‌های تشخیصی مناسب برای این دسته از بیماری‌ها حائز اهمیت می‌باشد [۱۱، ۱۲]. امروزه استفاده از روش‌های مبتنی بر آنتی‌بادی مثل الایزا، وسترن بلات و فلوسایتومتري در تشخیص سرطان‌ها و بیماری‌های خودایمنی به صورت 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 (قطر ۲/۵ 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

¹² Phosphate-buffer saline (PBS)

¹³ Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

¹⁴ Anti-Rabbit Horseradish Peroxidase (HRP) conjugated

¹⁵ Biolegend

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

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) تخلیص شده 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-آلدریج، کامل مخلوط شد. سایر تزریقات با استفاده از ادجوانت ناقص فروند انجام شد. برای ارزیابی پاسخ ایمنی شتر به آنتی ژن از الایزا (ELISA)^{۱۶} استفاده شد.

استفاده از پلی کلونال 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 نیتروسولوز، 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 ۱:۲۰۰ اضافه شد و به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. در مرحله بعد و پس از شستشو با بافر نمک-فسفات، آنتی‌بادی ضدخرگوشی کونژوگ 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-آلدریج) رنگ آمیزی شد.

تشخیص BAFF نوترکیب در الایزا با آنتی‌بادی پلی کلونال 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. بلاک کردن 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 ۱:۲۰۰ 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 کونژوگ شده با HRP (ساخت شرکت سیگما-آلدریج)، با رقت ۱:۱۰۰۰ اضافه و به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. فعالیت پراکسیداز با افزودن (TMB)^{۱۷} (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 پلی کلونال موجود در سرم خون شتر ایمن‌شده نسبت به آنتی ژن rBAFF نیز از تست الایزا و استفاده از پروتئین‌های مختلف استفاده شد.

تشخیص پروتئین BAFF سطح سلول در فلوسایتومتری با آنتی‌بادی پلی کلونال شتری

سلول U937، تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، که رده‌ی سلولی لنفوما می‌باشد در محیط RPMI-1640 تولید شرکت سیگما-آلدریج، همراه با FBS ۱۰ درصد، دی‌اکسید کربن ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شد. برای انجام فلوسایتومتری تعداد 3×10^5 سلول در لوله فلوسایتومتری ریخته شد و دو مرتبه با محلول نمک-فسفات شستشو گردید. مقدار ۲ میکرولیتر از آنتی‌بادی پلی کلونال شتری به سلول‌ها اضافه شد و به‌مدت یک ساعت بر روی یخ انکوبه گردید. پس از

¹⁷ 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)¹⁶ Enzyme linked immunosorbent assay

پس از آخرین تزریق، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که آنتی‌بادی پلی‌کلونال شتری برای شناسایی آنتی‌ژن BAFF نو ترکیب در روش وسترن‌بلات می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (شکل ۲).

نتایج استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال شتری برای تشخیص پروتئین BAFF نو ترکیب با استفاده از 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. همانطور که مشخص است آنتی‌بادی پلی-کلونال شتری توانایی شناسایی پروتئین BAFF در سطح سلول را دارا می‌باشد.

بحث

بیماری‌های خودایمنی (AIDs)^{۱۹} مجموعه‌ای از بیماری‌ها را شامل می‌شود که بر روی سیستم‌های یک یا چند ارگانی تأثیر 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

شستشو ۱ میکروگرم از آنتی‌بادی خرگوشی ضدشتری تهیه شده در انستیتو پاستور ایران، در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر به سلول‌ها اضافه شد و به مدت یک ساعت بر روی یخ انکوبه گردید. در ادامه، سلول‌ها شسته شده و ۲ میکروگرم از آنتی‌بادی (FITC) ضد خرگوشی کونژوگه^{۱۸} (ساخت شرکت آبکم انگلستان) به سلول‌ها اضافه شد و به مدت 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 نو ترکیب BAFF

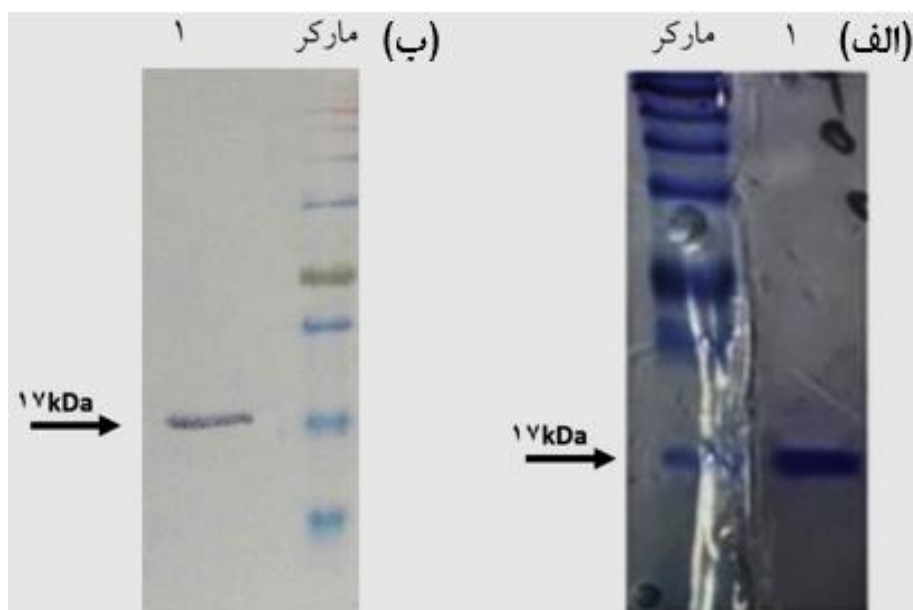
پس از ترانسفورم سازه‌ی ژن بخش خارج سلولی پروتئین BAFF به باکتری میزبان و کشت در حجم بالا، با استفاده از IPTG القاء گردید. به‌منظور بررسی بیان SDS-PAGE انجام پذیرفت. از آنجایی که در انتهای پروتئین نو ترکیب تگ-هیستیدین وجود داشت از روش افینیتی کروماتوگرافی نیکل-NTA- به‌منظور تخلیص پروتئین استفاده شد و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

نتایج استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال شتری برای تشخیص پروتئین BAFF نو ترکیب 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. باتوجه به این که هیچ بانندی در وسترن بلات با استفاده از سرم پیش از تزریق آنتی‌ژن تشکیل نشد و نیز تشکیل باندهای مورد انتظار در وسترن‌بلات با استفاده از سرم جداشده از خون شتر

¹⁹ Acquired immunodeficiency syndrome

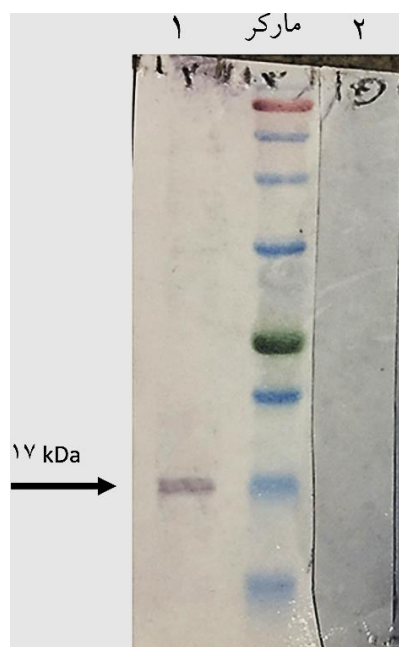
¹⁸ Anti-Rabbit Fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate



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

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^{۲۰}، گرانولوماتوز وگنر^{۲۱} و کم‌خونی همولیتیک خودایمنی نیز داشته است [۱۵].

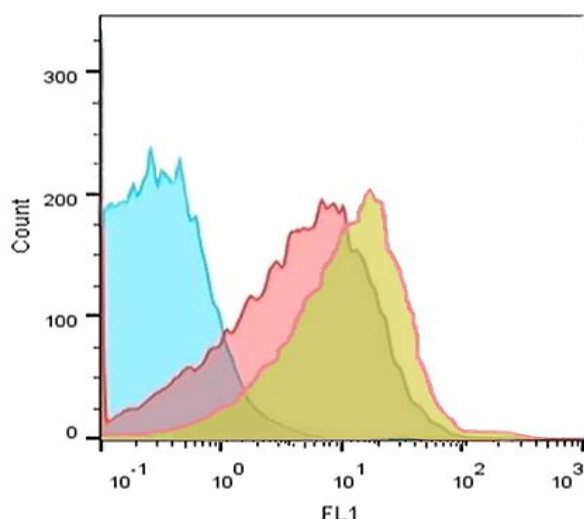
سال‌های اخیر شاهد پیشرفت‌های بسیاری در مورد شناخت مکانیسم‌های درگیر در بقاء سلول‌های B بوده‌ایم، شناخت فاکتور BAFF که عضوی از ابرخانواده گیرنده‌های فاکتور نکروز تومور بوده و از عوامل بقاء سلول‌های B می‌باشد یکی از مهمترین این پیشرفت‌ها محسوب می‌شود [۱۶]. بررسی بسیاری از بیماری‌ها نشان می‌دهد که تولید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



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

²¹Wegener's granulomatosis

²⁰ type II mixed cryoglobulinemia

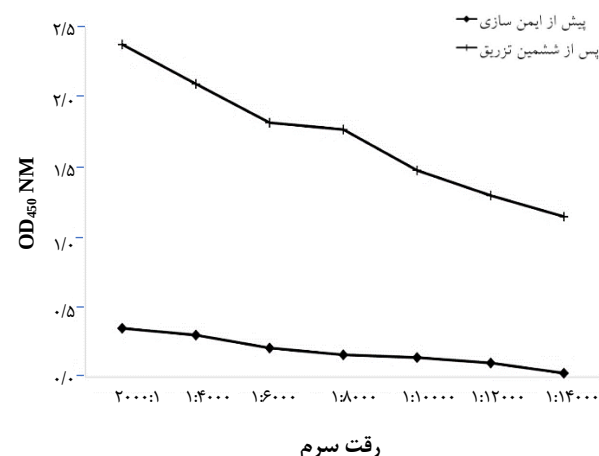


نمودار ۲- نتایج فلوسایتومتری سلول‌های U937 با استفاده از آنتی‌بادی پلی کلونال شتری علیه پروتئین BAFF. هیستوگرام آبی؛ سلول‌های U937 بدون تیمار با آنتی‌بادی، هیستوگرام سبز؛ سلول‌های U937 که با منوکلونال آنتی‌بادی تجاری بر علیه پروتئین BAFF تیمار شده‌اند، هیستوگرام قرمز؛ سلول‌های U937 تیمار شده با آنتی‌بادی پلی کلونال جدا شده از سرم ایمن شده علیه پروتئین نوترکین BAFF.

این دسته از آنتی‌بادی‌ها به علت خصوصیات ویژه منحصر به فرد خود می‌توانند برای این منظور 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 خارج سلولی 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 با استفاده از 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 پلی کلونال در استفاده در تست‌های تشخیصی مثل الایزا، وسترن بلات و فلوسیتومتری نشان داده شد. نتایج

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 به عنوان اولین هدف درمانی در بسیاری از بیماری‌های خود ایمن می‌باشد [۱۸]. در سال ۲۰۱۱، داروی بلیومومب^{۲۳} که نوعی آنتی‌بادی مونوکلونال بر علیه BAFF انسانی است به عنوان 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 انجام گرفته از آنتی‌بادی‌های خرگوشی و یا موشی استفاده شده است. پس از کشف و شناسایی نوع جدید آنتی‌بادی‌ها که از شترسانان جدا شده و به عنوان آنتی‌بادی‌های زنجیره‌ی سنگین (HcAbs)^{۲۴} شناخته می‌شوند،



نمودار ۱- نتایج تست الایزا با استفاده از پلی کلونال آنتی‌بادی شتری جهت تشخیص پروتئین BAFF.

²⁴Heavy chain antibodies

²²B-cell lymphoma

²³Belimumab

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- κ B, and c-Jun NH2-terminal kinase. *J*

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 پلی‌کلونال 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 سال ۲۰۲۰ نشان داده شد آنتی‌بادی پلی‌کلونال شتری علیه (NDM-1) 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 بدست‌آمده از شتر ایمن شده با استفاده نورو توکسین‌های توکسین عقرب^{۲۷} انجام شد نشان داد که نسبت قابل توجهی از آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین پلی‌کلونال به اجزای توکسین به‌ویژه به جزء AahII، که سمی‌ترین جزء زهر عقرب مذکور می‌باشد، متصل می‌شوند [۲۱].

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

²⁷ *Androctonus australis hector*

²⁵ Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

²⁶ NewDelhi Metallo- β -lactamase-1

- 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, Cauherff 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.

Research paper

Preparation of Polyclonal Antibody against B-cell activating factor

Rasoul Mardani-Jouneghani¹, Shiva Irani¹, Mahdi Habibi-Anbouhi², 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)