تولید و بررسی خصوصیات آنتی بادی منوکلونال موشی علیه اپی توپ فضایی هورمون گونادوتروپین جفتی انسان (hCG)

علی اکبر صبور یراقی (دانشجوی Ph.D.)[1]، رویا قدس (M.Sc.)[2]، فاضل شکری (Ph.D.) [3]

۱- دانشجوی Ph.D. ، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- کارشناس ارشد بیوشیمی، بخش ایمونولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- دانشیار بخش ایمونولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

هورمون hCG متعلق به خانواده هورمون های گلیکوپروتئینی است . سایر اعضا این خانواده شامل هورمون محرک فولیکولی (FSH)، هورمون لوتئینیزه کننده (LH) و هورمون محرک تیروئید (TSH) می باشد. هر یک از این هورمون ها از دو زیر واحد آلفا و بتا ساخته شده اند که به کمک اتصالات غیر کووالان به هم متصل هستند. ساختمان زیر واحد آلفا در تمام هورمونهای این خانواده یکسان، ولی زیر واحد بتای آنها متفاوت است. بدلیل شباهت زیاد ساختمانی میان اعضاء این خانواده تشخیص و سنجش کمی این هورمون ها مستلزم تولید آنتی بادی منوکلونال علیه اپی توپهای غیر مشترک در زیر واحد بتا یا شکل فضایی اختصاصی هر هورمون می باشد. در این مطالعه یک آنتی بادی منوکلونال موشی علیه شکل دایمر هورمون hCG با استفاده از تکنولوژی هیبریدوما تولید و ویژگی این آنتی بادی به روش الایزا و ایمونوبلاتینگ و با استفاده از هورمونهای متعددی مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی از هورمون hCG نوترکیب و شکل طبیعی خالص شده از ادرار خانم های بار دار، زیر واحد آلفا و بتای نوترکیب هورمون hCG، قطعه پپتیدی انتهای کربوکسیلی زیر واحد بتای hCG شامل اسیدهای آمینه ۱۴۵-۱۰۹ (βhCG-CTP)، هورمون خالص hLH و FSH و هورمون نوترکیب TSH و بالاخره پروتئین های ادراری (UP) استفاده شد. نتایج نشان می دهد که آنتی بادی منوکلونال بدست آمده تنها با شکل دایمر hCG نوترکیب و hCG بدست آمده از منبع ادرار خانم های باردار واکنش می دهد و با زیر واحدهای آلفا و بتای هورمون به تنهایی و نیز با فرم احیاء شده hCG و همچنین هورمون نوترکیب TSHو هورمون FSH هیچگونه واکنش متقاطعی ندارد ولی با هورمونhLH واکنش میدهد. با بکارگیری غلظت های مختلف βhCG-CTP مشخص شد که این پپتید نمی تواند اتصالhCG با آنتی بادی را مهار نماید. این نتیجه نشان میدهد که قطعه انتهای کربوکسیلی زیر واحد بتای hCG که حاوی اپی توپ های خطی این زیر واحد است، دخالتی در تشکیل اپی توپ مورد شناسایی این آنتی بادی منوکلونال ندارد. در مجموع نتایج فوق نشان میدهد که این آنتی بادی برای اتصال نیاز به شکل دایمر هورمون دارد و یک اپی توپ فضایی (Conformational) وابسته به زیر و احد بتای هورمون hCG را شناسایی می کند.

گل واژگان: ، هورمونهای گلیکوپروتئینی، هورمون گونادوتروپین جفتی انسان (hCG)، آنتی بادی منوکلونال، تعیین نقشه جایگاههای آنتی ژنی (Epitope Mapping)

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، بخش ایمونولوژی، دکتر فاضل شکری

Downloaded from http://www.jri.ir

مقدمه

هورمون hCG تنها عضو خانواده هورمونهای گلیکوپروتئینی است که توسط جفت ترشح می شود. سایر هورمون های این خانواده شامل FSH,LH و TSH از غده هیپوفیز ترشح می شوند (۱). هر یک از اعضا این خانواده از دو زیر واحد آلفا و بتا تشکیل شده اند که زیر واحد آلفا در تمام این هورمون ها یکسان و از ۹۲ اسیدآمینه ساخته شده است ولی زیر واحد بتای هر هورمون با هورمون دیگر متفاوت است. با این وجود بین زیر واحد بتای هورمون hCG (βhCG) و بتای هورمون hLH (βhLH) بیش از ۸۰ درصد همولوژی وجود دارد. در حقیقت تنها تفاوت اساسی βhCG و βhLH وجود یک قطعه پپتیدی واقع در انتهای کربوکسیل زیر واحد βhCG بنام βhCG-CTP است که شامل اسیدهای آمینه ۱۴۵-۱۱۵ می باشد. این قطعه فقط درزیر واحد βhCG وجود دارد و زیر واحد βhLH فاقد آن است (۲و۱).

hCG و سایر هورمون های گلیکوپروتئینی ملکول های غنی از پیوندهای دی سولفیدی بوده، بطوریکه زیر واحدهای آلفا و بتای هورمون hCG به ترتیب دارای ۵و۶ پیوند دی سولفیدی در ساختمان خود هستند (۳و۲). اخیراً مقالات مروری در مورد انواع اشکال متابولیکی، ضرورت و اهمیت بالینی اندازه گیری، روش های سنجش ایمونولوژیکی هورمون hCG و متابولیت های آن به چاپ رسیده است (۵و۴). سنجش و تشخیص ایمونولوژیکی hCG با آنتی سرم یا آنتی بادی پلی کلونال دارای مشکلات زیادی است که مهمترین آن وجود واکنش متقاطع بین اعضاء خانواده هورمون های گلیکو پروتئینی است که بنوبه خود مربوط به یکسان بودن زیر واحد آلفا در این هورمون ها و شباهت نسبی زیر واحدهای بتا است. یکی از راههای بالقوه در جهت برداشتن این مشکل تولید آنتی بادی منوکلونال علیه اپی توپهای اختصاصی برای این هورمون ها است.

این اپی توپها ممکن است بصورت خطی و پیوسته (Continuous) و یا بطور غیر پیوسته (Discontinuous) باشد (۹). اپی توپهایی نیز شناخته شده اند که اسیدهای آمینه سازنده آنها قسمتی بر روی یک زیر واحد و قسمتی بر روی زیر واحد دیگر هورمون وجود دارد. اینگونه اپی توپ ها را که وابسته به ساختمان سوم و چهارم پروتئین هستند، اصطلاحاً اپی توپ های فضایی (Conformational) می نامند. به استثناء دو اپی توپ پیوسته و خطی که در ناحیه انتهای کربوکسیلی مولکول βhCG (βhCG-CTP) و بخشی از دو جایگاه آنتی ژنی که در زیر واحد آلفا وجود دارد، اپی توپ هایی که درمولکول hCG وجود دارند از نوع غیر پیوسته و وابسته به ساختمان سوم و چهارم ملکول hCG و زیر واحدهای آن است (۷و۶).

در این پژوهش یک آنتی بادی منوکلونال موشی علیه هورمون hCG تولید شده و خصوصیات این آنتی بادی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

- ایمونیزاسیون:

ایمونیزاسیون بروی موش های ماده نژاد Balb/C با سن ۸-۶ هفته انجام و hCG تخلیص شده از منبع ادراری به عنوان ایمونوژن استفاده شد. تزریق hCG به این موش ها در سه نوبت انجام گرفت، در نوبت اول ۴۰ میکروگرم آنتی ژن با ادجوانت کامل فروند (Sigma, U.S.A) بداخل صفاق موش تزریق شد. تزریقات دوم وسوم با فاصله ۳ هفته و مقدار ۲۰ میکروگرم آنتی ژن به همراه ادجوانت ناقص فروند (Sigma, U.S.A) و بصورت داخل صفاقی انجام گرفت. حدود ۲ تا ۳ هفته پس از سومین تزریق از موشها خونگیری به عمل آمد و حیوان دارای بیشترین تیتر آنتی بادی برای انجام فیوژن انتخاب و سه روز قبل از

Downloaded from http://www.jri.ir

فیوژن ۲۰ میکروگرم از آنتی ژن محلول در بافر سالین بصورت داخل وریدی به حیوان مورد نظر تزریق شد.

- تکثیر و آماده سازی سلول های میلوما:

یک هفته قبل از فیوژن سلول های میلومای موشی با نام SP2/O در محیط کشت کامل حاوی محیط DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's Medium,Gibco,U.S.A) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو FCS(Fetal bovine serum,Gibco,U.S.A) و آنتی بیوتیکهای پنی سیلین G (۱۰۰۰۰۰ U/L) و استرپتومایسین (۱۰۰ mg/L) (Sigma, U.S.A) و اسیدآمینه ال- گلوتامین، در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵ درصد CO_2 و رطوبت اشباع، تکثیر شدند. هنگامیکه رشد سلول ها به فاز لگاریتمی رسید و تعداد سلولهای زنده به بیش از ۹۵ درصد رسید از آنها برای فیوژن استفاده شد.

- فیوژن وتولید سلول های هیبریدوما:

سلولهای طحال موش ایمن شده بیرون آورده شد و با استفاده از پلی اتیلن گلیکول (PEG 1000 ٪۵۰ , Sigma, U.S.A) با سلول های میلومای موشی SP2/0 بانسبت ۱:۷ با روش استاندارد ادغام شدند (۱۰). سلول های بدست آمده از این فیوژن در محیط کشت کامل DMEM حاوی ۲۰ درصد سرم جنین گاو قرار داده شد و سپس سلول ها با پی پت هم زده شد تا بطور یکنواخت پراکنده شود. این سلول ها در پلیت های ۹۶ حفره ای (Nunc,Denmark) تقسیم شدند. پلیت ها در انکوباتور با ۵ درصد Co_2 و حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد و رطوبت اشباع به مدت یک روز قرارگرفتند. سپس۵۰ میکرولیتر از محیط انتخابی HAT حاوی هیپوگزانتین ۵×۱۰^{-۳} مولار، آمینوپترین ۲×۱۰^{-۵} مولار و تیمیدین ۸×۱۰^{-۴} مولار (HAT,50X, Sigma,U.S.A) به آنها اضافه شد. حفرات سلولی به فاصله چند روز یکبار با محیط انتخابی HAT تعویض محیط شدند.

- غربالگری و کلونینگ هیبریدها:

محلول رویی (سوپرناتانت) پلیت ۹۶ حفره ای حاوی سلول های هیبرید در حال رشد از نظر تولید آنتی بادی مورد آزمون قرار گرفت. سلول های هیبرید مثبت، پایدار و مولد آنتی بادی با استفاده از روش رقت محدود کننده (Limiting dilution) چند مرتبه کلون شدند و هر بار بهترین حفرات از نظر تولید آنتی بادی و تراکم سلولی انتخاب و تا حصول اطمینان از تک کلون شدن هیبریدها، عمل کلونینگ ادامه داده شد. تک کلون انتخابی تکثیر و از پلیت ۹۶ حفره ای به پلیت ۲۴ حفره ای (Nunc,Denmark) وسپس فلاسک های ۵۰ میلی لیتری (Nunc,Denmark) انتقال داده و به تعداد کافی جمع آوری و در ازت مایع نگهداری شد.

- تعیین مشخصات آنتی بادی منوکلونال:

تعیین مشخصات آنتی بادی منوکلونال با استفاده از روشهای الایزا و ایمونوبلاتینگ مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. یک مجموعه از هورمونهای بسیار خالص و نیز شکل نوترکیب آنها شامل hCG طبیعی (CG-B,Sigma,U.S.A) و hLH طبیعی (Seradyn,U.S.A) و هورمونهای نوترکیب βhCG-CTP, hCG,αhCG,βhCG,TSH (Sigma,U.S.A) وFSH طبیعی (Seradyn, U.S.A) در این بررسی مورد استفاده قرار گرفت.

۱- آزمون الایزا برای تعیین ویژگی آنتی بادی منوکلونال ترشحی ضد hCG

ابتدا محلول حاوی ۲ میکروگرم در میلی لیتر هر آنتی ژن را در بافر PBS ۰/۱۵ مولار و pH=۷/۲ تهیه کرده و ۵۰ میکرولیتر از آن را به حفرات میکروپلیت الایزا(Maxi sorp,Nunc,Denmark) اضافه شد. پلیت های مذکور ۹۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و سپس با بافر شستشو [(بافر PBS حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ (Merck,Germany)] سه مرتبه شسته شدند. در لایه دوم از ۵۰ میکرولیتر

Downloaded from http://www.jri.ir

سوپ روئی سلول های مولد آنتی بادی یا ۵۰ میکرولیتر از آنتی بادی تخلیص شده با غلظت ٤-۲ میلی گرم در میلی لیتر استفاده شد و پس از ۹۰ دقیقه انکوباسیون در۳۷درجه سانتی گراد و شستشوی پلیت ها با بافر شستشو، برای آشکار کردن آنتی بادیهای منوکلونال متصل به آنتی ژن از کونژوگه پراکسید از ضدایمونوگلوبولین موش (Sigma, U.S.A) (HRP-Sheep anti mouse-Ig) با رقت ۱:۱۰۰۰ استفاده شد. پس از ۹۰ دقیقه انکوباسیون و شستشوی مجدد از سوبسترای O-Phenylenediamine(OPD, Sigma, U.S.A)به منظور تولید رنگ استفاده شد. پس از ۱۵-۱۰ دقیقه واکنش با اسید سولفوریک ۲۰ درصد متوقف و OD(Optical Density) حاصل با استفاده از دستگاه (Organon Teknika, Reader 210 ,Austria) Elisa Reader در طول موج ٤۹۲ نونامتر تعیین و نتایج ثبت شد.

۲- آزمون الایزا برای تشخیص ایمونوگلوبولین ترشحی موش :

سوپ حفرات حاوی هیبریدهای در حال رشد از نظر تولید مجموع آنتی بادیهای موشی با روش الایزا مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا ۵۰ میکرولیتر آنتی بادی تصفیه شده گوسفند ضد ایمونوگلوبولین موش (تولید شده در آزمایشگاه آقای دکتر شکری) با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر در بافر PBS ۰/۱۵ مولار و pH=۷/۲ در حفرات الایزا قرارگرفت. پس از شستشوی حفرات با بافر شستشو ، ۵۰ میکرولیتر از سوپ حفرات سلول های هیبرید به پلیت اضافه شد. ادامه آزمون الایزا مشابه روش ذکر شده در قسمت قبل انجام گرفت.

۳- بررسی تاثیر مهاری پپتید βhCG-CTP بر اتصال hCG به آنتی بادی منوکلونال:

ابتدا ۵۰ میکرولیتر از هورمون hCG نوترکیب با غلظت ۲ میکروگرم در بافر PBS در حفرات الایزا تثبیت شد. سپس کونژوگه پراکسید ازآنتی بادی منوکلونال تولید شده علیه hCG با رقت ۱:۷۵۰ موارد فوق باشد. اضافه شد (این کونژوگه بروش پرآیودات در آزمایشگاه دکتر شکری تولید شده است). قبل از اضافه کردن کونژوگه؛ به مدت ۲ ساعت این کونژوگه با پپتید βhCG-CTP(Sigma,U.S.A) با غلظت های ۵،۵/۱۰،۲۵/۲ /۱و ۰/٦۱ میکروگرم در میلی لیتر در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. در حفرات کنترل کونژوگه مورد نظر بدون مجاورت با پپتید استفاده شد و میزان مهار آنتی بادی توسط هورمون hCG با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد مهار} = \frac{\text{OD(بامهار کننده)} - \text{OD(بدون مهار کننده)}}{\text{OD(بدون مهار کننده)}} \times ۱۰۰$$

۴- تعیین ایزوتیپ آنتی بادی منوکلونال بروش الایزا:

ابتدا آنتی بادی های ضد زیر کلاس های IgA,IgG3,IgG2b,IgG2a,IgG1 و IgM موشی که از بز تهیه شده اند (Sigma, U.S.A) با رقت مناسب در پلیت الایزا تثبیت شدند. سپس سوپ مربوط به آنتی بادی منوکلونال به همه حفرات اضافه شد.شرایط آزمون الایزا و ادامه آزمون مشابه مراحل مورد ۱ در بالا می باشد.

۵- ایمونوبلاتینگ:

فعالیت و ویژگی آنتی بادی منوکلونال با استفاده از روش استاندارد ایمونوبلاتینگ (۱۱) مورد ارزیابی قرار گرفت. بطور خلاصه ابتدا آنتی ژن های طبیعی خالص ویا نوترکیب با روش الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) با استفاده از ژل ۱۲/۵ درصد الکتروفورز شد. این آنتی ژنها قبل از الکتروفورز به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول بدون احیاء پیوندهای دی سولفیدی موجود در ساختمان آنها و گروه دوم همان آنتی ژنها با احیاء پیوندهای دی سولفیدی به کمک ترکیب احیاء کننده ۲- مرکاپتواتانول (2ME) الکتروفورز شدند. هر دو گروه آنتی ژن ها در بافر Tris-Hcl یک مولار و pH=7 حاوی SDS و رنگ بروموفنل بلو و ساکاروز ۸۰ درصد حل شدند. و قبل از الکتروفورز به

Downloaded from http://www.jri.ir

مدت ۳-۲ دقیقه جوشانیده شده و سپس به چاهک های ژل الکتروفورز منتقل و الکتروفورز با جریان حداکثر و ولتاژ ۱۵۰ ولت انجام شد. پس از الکتروفورز، پروتئین ها از داخل ژل به کاغذ نیترات سلولز (Schleicher & Schuell,Germany) منتقل شد. عمل انتقال با استفاده از دستگاه الکتروبلاتینگ (شرکت اختریان ، ایران) و در طول شب با ولتاژ ماکزیمم و شدت جریان ٦۰ میلی آمپر انجام گرفت. با رنگ آمیزی کاغذ نیترات سلولز با رنگ پانسو-S (Ponceau S stain,Gelman,U.S.A) با غلظت ۰/۵ گرم در لیتر، در بافرPBSمحل انتقال باندها مشخص و ردیف های مربوط به هر آنتی ژن با تیغ بریده و شمارگذاری شد. سپس رنگ پانسو S با بافر PBS شسته شد. به منظور بلوکه کردن نواحی فاقد پروتئین در ورقه نیترات سلولز و پیشگیری از واکنش غیر اختصاصی از شیر خشک فاقد چربی (Skim Milk,Merck,Germany) با غلظت ۲/۵ گرم درصد استفاده شد سپس آنتی ژنهای روی کاغذ نیترات سلولز بمدت ۱۲۰ دقیقه باسوپ حاوی آنتی بادی منوکلونال بر روی شیکر مجاور شدند. پس از ۵ بار شستشو با PBS هر بار به مدت ۵ دقیقه روی شیکر، کاغذهای نیترات سلولز با کونژوگه پراکسید از ضد ایمونوگلوبولین موش (HRP-Sheep anti mouse-Ig, Sigma, U.S.A.)با رقت ۱:۵۰۰ به مدت۹۰ دقیقه مجاور و سپس ۵ بار با PBS شسته شدند. تشکیل اتصال آنتی ژن- آنتی بادی با استفاده از ۲۵ میلی گرم سوبسترای دی آمینوبنزیدین (DAB hydrochloride.Sigma, U.S.A.) در ۵۰ میلی لیتر با فرTris – Hcl ۰/۰۵ مولار و ۷/٦ =PH بهمراه ۱۵۰ میکرولیتر محلول ۳ درصد H_2O_2 ظاهر شد. پس از ظهور باندها و اکنش با شستشوی کاغذ نیترات سلولز با آب مقطر متوقف گردید.

- تهیه آسیت و تشخیص آنتی بادی منوکلونال با روش الکتروفورز استات سلولز:

٤-۳ میلیون از سلول های هیبریدومای مولد آنتی بادی را با ۰/۵ میلی لیتر از محیط DMEM بدون سرم مخلوط کرده و بداخل صفاق موش Balb/C تزریق گردید. موشها یک هفته قبل از تزریق سلول ۰/۵ میلی لیتر ماده پریستین (Pristane,Sigma,U.S.A.) بطور داخل صفاقی دریافت کرده بودند. ۱۵-۱۰ روز پس از تزریق سلول ها، مایع آسیت در زیر صفاق موش جمع شد که پس از کشتن موش در شرایط استریل از صفاق خارج و به داخل لوله استریل منتقل و پس از سانتریفوژ، مایع رویی بعنوان مایع آسیت که منبع غنی از آنتی بادی است جمع آوری و در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. سلول های تکثیر شده در صفاق موش نیز فریز و نگهداری شدند. مایع آسیت با استفاده از روش استاندارد الکتروفورز استات سلولز، الکتروفورز شد. بطور خلاصه نمونه مایع آسیت بروی کاغذ استات سلولز (Helena,U.S.A) قرار گرفت و با استفاده از منبع تغذیه و تانک الکتروفورز (شرکت اختریان ، ایران) و بافر باربیتال سدیم ۰/۰۳ مولار و ۸/٦ =PH با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ٤۵ دقیقه عمل الکتروفورز انجام شد. سپس کاغذ استات سلولز به مدت ۱۰ دقیقه در رنگ پانسو-S قرار گرفت و بعد از آن سه مرتبه هر بار ۲ دقیقه در داخل محلول رنگبر (اسید استیک ۵ درصد) رنگ آن حذف گردید. در مرحله بعد کاغذ استات سلولز بمدت ۵ دقیقه در متانول خالص آبگیری شد و سپس ۱۰ دقیقه در محلول شفاف کننده (Clearaid, Helena,U.S.A.) قرار گرفت و بالاخره کاغذ استات سلولز در انکوباتور ٦۰-۵۰ درجه سانتیگراد خشک شد.

-تعیین تیتر آنتی بادی منوکلونال در مایع آسیت با روش الایزا:

مشابه آزمونهای قبل hCG با غلظت ۲ میکروگرم در میلی لیتر در پلیت الایزا تثبیت شد. سپس مایع آسیت در رقت های متوالی از ۱:۲۵۰ تا $۱:۱۰^{۶}$ به حفرات پلیت

Downloaded from http://www.jri.ir

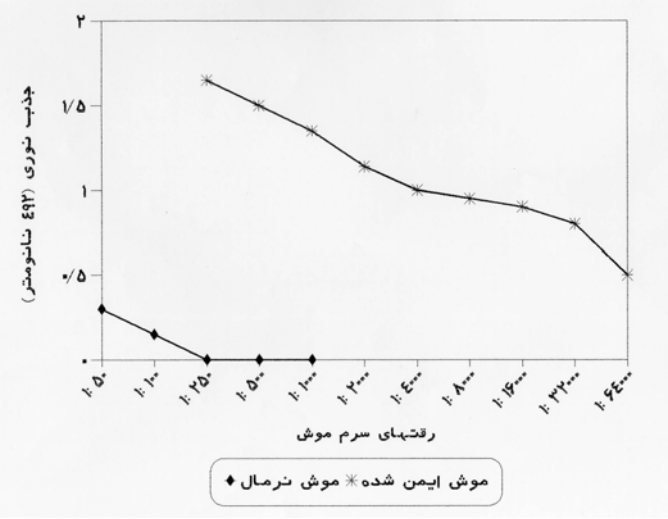
اضافه و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. همزمان از سرم موش ایمن نشده با رقت های متوالی از ۱:۵۰ تا ۱:۲۰۰۰ به عنوان کنترل منفی استفاده شده است مشابه روش الایزا در قسمتهای قبل ادامه آزمون انجام گرفت.

نتایج

- ایمونیزاسیون حیوانات:

تیتراسیون سرم موش های ایمن شده با hCG طبیعی نشان داد که تمام حیوانات پس از دریافت سومین دوز آنتی ژن، آنتی بادی با تیتر مناسب تولید کرده اند. منحنی تیتراسیون سرم یکی از موش ها در مقایسه با موش ایمن نشده در شکل (۱) نشان داده شده است.

شکل (۱): منحنی تیتراسیون سرم موش ایمن شده با



هورمون hCG و مقایسه آن با موش ایمن نشده

- تولید و انتخاب هیبریدومای مولد آنتی بادی ضدhCG

پس از غربالگری اولیه، از بین هیبریدهای در حال رشد یکی از آنها که با hCG و اکنش مثبت قوی نشان داده و با پروتئین های ادراری (UP) واکنش نداشت انتخاب و پس از کلون و ساب کلون کردن ویژگی آن مورد بررسی بیشتر قرار گرفت. سوپ کلون مورد نظر با یک سری کامل از آنتی ژن های خالص وهمچنین اشکال نوترکیب هورمونهای گلیکوپروتئینی با آزمون الایزا و ایمونوبلاتینگ مورد بررسی قرارگرفت و نتایج حاصل در جدول (۱) آمده است.

- بررسی ویژگی آنتی بادی منوکلونال ضد hCG با آزمون الایزا

نتایج الایزا نشان داد که آنتی بادی منوکلونال بدست آمده با hCG تخلیص شده از منبع ادرار و hCG نوترکیب بیشترین واکنش را دارد و با سایر هورمونهای گلیکوپروتئینی به استثناء hLH واکنش نمی دهد (جدول ۱).

جدول ۱- بررسی واکنش آنتی آبادی منوکلونال ضد hCG با هورمونهای گلیکو پروتئینی و زیر واحدهای آنها

آنتی ژن ها	OD (۴۹۲nm)
hCG طبیعی	۱/۹۱
hCG نوترکیب	۱/۷۳
hCGα نوترکیب	۰/۰۱
hCGβ نوترکیب	۰/۰۱
hLH طبیعی	۱/۵۲
FSH طبیعی	۰/۰۱
TSH نوترکیب	۰/۰۱
BSA-hCGβCTP	۰/۰۱
BSA	۰/۰۱
UP	۰/۰۱
آنتی بادی ضد ایمونوگلوبولین موش	۱/۸۵

آلبومین سرم گاو =BSA پروتئین ادرار = UP

پاسخ این آنتی بادی منوکلونال با هورمون FSH و شکل نوترکیب TSH تقریباً صفر است. از طرفی آنتی بادی

Downloaded from http://www.jri.ir

منوکلونال بدست آمده با زیر واحدهای آلفا و بتای نوترکیب هورمون hCG به تنهایی پاسخ نمی دهد.

- تعیین ایزوتیپ آنتی بادی منوکلونال:

آزمون الایزا مربوط به تعیین ایزوتیپ آنتی بادی تولید شده نشان داد که این آنتی بادی دارای زیر کلاس IgG1 می باشد (جدول ۲).

جدول ۲- تعیین ایزوتیپ آنتی بادی منوکلونال تولید شده علیه hCG

ایزوتیپ	۴۹۲ nm OD
IgG1	۱/۲۹۶
IgG2a	۰/۱۶۲
IgG2b	۰/۱۴۷
IgG3	۰/۱۱۱
IgA	۰/۱۰۸
IgM	۰/۱۲۳
شاهد	۰/۱۳۲
کنترل مثبت	۱/۳۲۷

- بررسی اثرمهاری βhCG-CTP بر واکنش هورمون با آنتی بادی منوکلونال

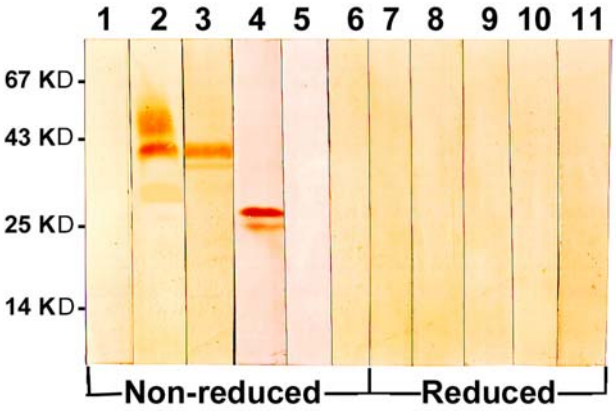
نتایج مربوط به بررسی اثر مهاری پپتید βhCG-CTP بر اتصال hCG به آنتی بادی منوکلونال تولید شده نشان داد که انکوباسیون این قطعه پپتیدی در غلظت های متفاوت با کونژوگه پراکسیداز آنتی بادی منوکلونال تاثیر مهاری برواکنش هورمون hCG با آنتی بادی منوکلونال ندارد (جدول ۳).

جدول ۳- تاثیر پپتید βhCG-CTP بر واکنش آنتی بادی منوکلونال با هورمون hCG

درصد مهار واکنش آنتی ژن آنتی بادی نسبت به کنترل مثبت	OD Nm ۴۹۲	غلظت βhCG-CTP مجاور شده با آنتی بادی (میکرو گرم در میلی لیتر)
۱/۶۲	۱/۸۲	۱۰
۰	۱/۸۹	۵
۲/۷	۱/۸۰	۲/۵
۸/۱	۱/۷۰	۱/۲۵
۱/۶۲	۱/۸۲	۰/۶۲
۰	۱/۸۷	۰
___	۱/۸۵	کنترل مثبت
___	۰/۱۳۴	شاهد

مطالعه ویژگی آنتی بادی منوکلونال ضد hCG با روش ایمونوبلاتینگ:

آنتی ژنهای اصلی بکار رفته در آزمون الایزا، در ایمونوبلاتینگ نیز مورد استفاده قرارگرفتند. نتایج ایمونوبلاتینگ نشان میدهد که آنتی بادی منوکلونال بدست آمده در گروه اول آنتی ژن ها که شامل هورمونهای احیاء نشده است، فقط با شکل دایمر hCG و hLH طبیعی و hCG نوترکیب واکنش می دهد. این آنتی بادی منوکلونال هیچگونه واکنشی با فرم احیاء شده هورمونها نشان نداده است (شکل ۲).



شکل ۲- الگوی ایمونوبلاتینگ آنتی بادی منوکلونال ضد hCG با اشکال احیاء نشده (ردیف های ۱ الی ٦) و احیاء شده(ردیف های ۷ الی ۱۱) هورمونهای گلیکوپروتئینی که به ترتیب شامل : ۱- UP (پروتئین های ادرار)،۲- hCG تخلیص شده از ادرار، ۳- hCG نوترکیب، ٤- hLH طبیعی، ٥- FSH طبیعی، ٦- TSH نوترکیب، ۷- hCG تخلیص شده از ادرار،۸- hCG نوترکیب،۹- hLH طبیعی،۱۰- FSH طبیعی، ۱۱- TSH نوترکیب

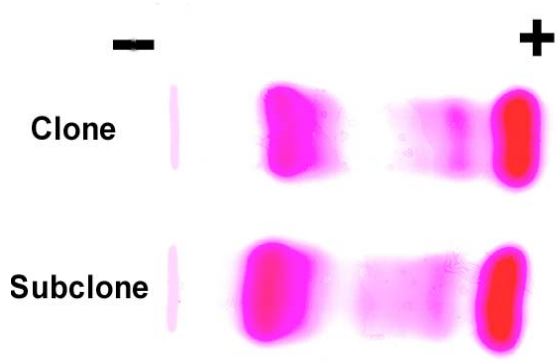
- تشخیص وجود آنتی بادی منوکلونال در مایع آسیت و تراسیون آن:

با تزریق ٦ میلیون سلول به ۲ موش Balb/C حدود ۳ میلی لیتر مایع آسیت بدست آمد. الگوی الکتروفورز

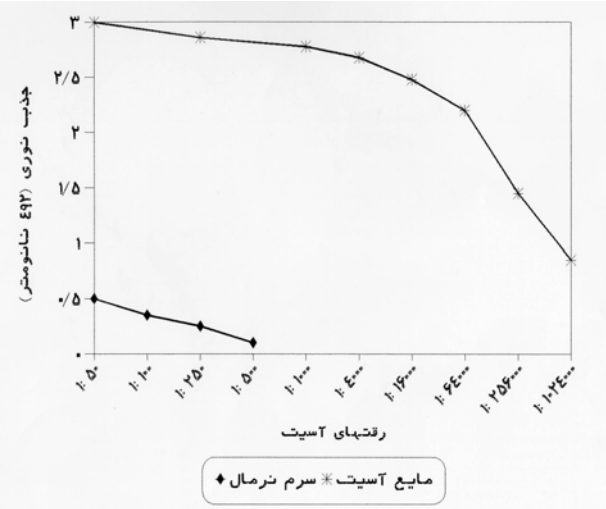
Downloaded from http://www.jri.ir

استات سلولز مایع آسیت وجود باند قوی مربوط به آنتی بادی منوکلونال را در ناحیه گاما نشان میدهد (شکل ۳). تیتراسیون مایع آسیت باآزمون الایزا نشان داد که مایع آسیت تا رقت $۱:۱۰^{۶}$ قادر است جذب نوری نسبتاً خوبی ناشی از اتصال آنتی بادی با آنتی ژن داشته باشد که بیانگر غلظت و آفینیتی بالای آنتی بادی در مایع آسیت است.

الگوی الکتروفورز استات سلولز آسیت در ناحیه ایمونوگلوبولین ها نیز یک باند قوی را نشان میدهد (شکل ٤) که نتایج تیتراسیون مایع آسیت را تائید می کند.



شکل ۳- الگوی الکتروفورز استات سلولز پروتئین های مایع آسیت حاوی آنتی بادی منوکلونال ضد hCG



شکل ۴- منحنی تیتراسیون مایع آسیت موش

بحث

چنانچه پروتئین بیگانه ای در معرض سیستم ایمنی قرار گیرد، همهٔ اجزاء و اپی اتوپهای آن می توانند مورد شناسایی قرار گرفته و علیه آنها آنتی بادی تولید شود. بنابراین تمرکز تولید آنتی بادی علیه بعضی از شاخصهای آنتی‌ژنیک بر روی یک مولکول پروتئین که اصطلاحاً آنها را اپی‌توپهای غالب[1] می‌نامند، مطلق نبوده و بستگی به ساختار پروتئین و زمینه‌های ژنتیکی حیوان پاسخ دهنده دارد (۱۲).

این اصل کلی در مورد هورمونهای گلیکوپروتئینی نیز مصداق دارد و آنتی‌بادیهای مونوکلونال مختلفی علیه این هورمونها تولید و از آنها جهت مطالعه جایگاههای آنتی‌ژنی و تهیه نقشه جغرافیایی اپی‌توپهای[2] این هورمونها استفاده شده است (۱۳،۹،٦). این مطالعات نشانداده است که سه نوع اپی‌توپ اصلی در تمام هورمونهای گلیکوپروتئینی انسان قابل شناسایی است. گروهی از اپی‌توپها فقط در زیر واحد آلفای این هورمونها قرار دارد و از آنجائیکه زیر واحد آلفا در تمام این هورمونها مشترک است، آنتی‌بادیهای مونوکلونال تولید شده علیه این اپی‌توپها با سایر هورمونهای این خانواده واکنش متقاطع دارند. گروه دوم، اپی‌توپهایی هستند که منحصراً در زیر واحدهای بتای این هورمونها قرار دارند و لذا آنتی‌بادیهای تولید شده علیه این اپی‌توپها غالباً اختصاصی بوده و با سایر هورمونهای این خانواده واکنش متقاطع ندارند. گروه سوم اپی‌توپهایی هستند که قسمتی از آنها در زیر واحد آلفا و قسمتی در زیرواحد بتای این هورمونها قرار دارد و یا اینکه کلاً بروی یک زیر واحد قرار داردولی بروز آنها نیاز به شکل فضایی طبیعی آن زیر واحد و یا اتصال دو زیر واحد آلفا و بتا دارد و به همین دلیل به اپی‌توپهای فضایی[3] معروف هستند (۱۳، ۸-٦). کلیه اپی‌توپهای

1- Immunodominant
2- Epitope Mapping
3- Conformational epitope

Downloaded from http://www.jri.ir

فوق‌الذکر بروی هورمون hCG نیز مطالعه و شناسایی شده است. اخیراً در مطالعاتی که توسط Nagy و همکارانش (۱۳) انجام گرفته چندین آنتی‌بادی مونوکلونال علیه hCG و زیرواحدهای آن تولید شده است. این آنتی‌بادیها بر اساس نوع اپی‌توپ مورد شناسایی به گروه های متفاوتی تقسیم‌بندی شده‌اند که شامل آنتی‌بادیهای مونوکلونال علیه زیرواحد آلفا، زیرواحد بتا، و شکل دایمر و یا آنتی‌بادیهای که بطور مشترک فرم دایمر و آلفا و یا فرم دایمر و بتا را شناسایی می‌کنند. این دانشمندان با استفاده از روش ایمونوبلاتینگ نشان دادند که در اثر احیاء hCG با ماده ۲-مرکاپتواتانل (2ME) باندهای دی‌سولفیدی در هر دو زیرواحد آلفا و بتا باز شده و آن گروه از آنتی‌بادیهای منوکلونالی که اپی‌توپهای فضایی را شناسایی می‌کنند قدرت شناسایی خود را از دست داده و قادر به اتصال به هورمون احیاء شده نیستند. این یافته‌ها قبلاً توسط دانشمندان دیگر نیز گزارش شده است (۱۸،۱۷). از طرفی اپی‌توپهای خطی و فضایی متفاوت و گاهی منحصر بفردی توسط محققین مختلف شناسایی و گزارش شده است که در بازشناسی ساختار هورمون و تعیین نقشهٔ جغرافیایی اپی‌توپهای آن بسیار مفید و مؤثر بوده است (۹-٦).

در این پژوهش ویژگی یکی از آنتی بادیهای منوکلونال انتخابی که برعلیه هورمون hCG تولید شده و اپی توپ فضایی جالب توجهی را شناسایی می کند مورد مطالعه قرارگرفته است. نتایج مربوط به الایزا نشان داد که این آنتی بادی منوکلونال با فرم دایمر hCG طبیعی و نوترکیب واکنش قوی دارد ولی با هیچکدام از زیر واحدهای الفا و بتای هورمون به تنهایی واکنش نمی دهد. بنابراین اولین نتیجه منطقی در مورد این آنتی بادی این است که یک اپی توپ وابسته به ساختمان سوم و چهارم پروتئین را شناسایی می کند. از طرفی نتایج الایزا نشانداده است که این آنتی بادی با FSH طبیعی و TSH نوترکیب هیچگونه واکنش متقاطعی ندارد، لذا دومین نتیجه منطقی این است که زیر واحد آلفا به تنهایی در شکل فضایی خود برای شناسایی این آنتی بادی منوکلونال کافی نیست و حضور هر دو زیر واحد آلفا وبتا (شکل فضایی دایمر) ضروری است. از طرفی این آنتی بادی منوکلونال با هورمون hLH واکنش متقاطع دارد (جدول ۱). این مسئله نشان میدهد که چون تنها اختلاف hLH و hCG وجود قطعه پپتیدی واقع در انتهای کربوکسیل زیر واحد hCG است، لذا اپی توپ مربوط به این آنتی بادی منوکلونال احتمالاً در ناحیه βhCG-CTP قرار ندارد، چرا که اگر اپی توپ مورد شناسایی در این ناحیه قرار می گرفت آنتی بادی منوکلونال بدست آمده با hLH واکنش متقاطع نداشت (١٦-١٤). نتایج بدست آمده از الایزای مربوط به اثر مهاری قطعه پپتیدی انتهای کربوکسیل (βhCG-CTP) بر اتصال آنتی بادی منوکلونال به hCG در جدول (۳). این استنتاج را تائید کرده است. نتایج این الایزا نشان میدهد که حتی غلظت های بالای پپتید βhCG-CTP تا ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر تاثیری در مهار واکنش آنتی ژن – آنتی بادی ندارد. مطالعات قبلی نشانداده است که اپی توپ های موجود در ناحیه βhCG-CTP فقط از نوع خطی و پیوسته بوده و سایر اپی توپ های βhCG عموماً از نوع غیر پیوسته هستند (٨-٦). عدم واکنش این آنتی بادی با قطعه پپتیدی حاوی اسیدهای آمینه ۱۱۹-۱۰۹ که مربوط به قسمت انتهایی کربوکسیل هورمون βhCG است نیز این نظر را تائید می کند (جدول ۱). اپی توپهای مشترکی که بروی هر دو مولکول hCG و hLH بروز می یابند نیز قبلاً توسط دانشمندان دیگر شناسائی گزارش شده است (۱۸).

نتایج مربوط به ایمونوبلاتینگ، نتایج آزمون الایزا را تائید و برصحت نتیجه گیریهای فوق تاکید میکند. نتایج ایمونوبلاتینگ نشان میدهد که آنتی بادی منوکلونال بدست آمده با آنتی ژن hCG و hLH احیاء نشده پاسخ داده و باندهای قوی در ایمونوبلاتینگ ایجاد میکند اما

Downloaded from http://www.jri.ir

هورمونهای فوق هنگامیکه با استفاده از ترکیب 2ME احیاء میشوند وباندهای دی سولفیدی درون ملکولی از هم گسسته‌می‌شود و شکل فضایی هورمون از بین می رود دیگر با آنتی بادی منوکلونال‌تولید شده واکنشی نمی دهند.

عدم وجود واکنش با هورمونهای FSH طبیعی و TSH نوترکیب و پروتئین های ادراری (UP) نیز در ایمونوبلاتینگ تائید شده است. استفاده از پروتئین های ادراری بدین منظور انجام شده است تا احتمال واکنش غیر اختصاصی آنتی بادی باپروتئین های ناخالص درهورمون های hCG و FSH که از ادرار تخلیص شده اند منتفی گردد.

شباهت زیاد بین ساختمان اول هورمونهای hCG و hLH منجر به شباهت بین اشکال طبیعی این دو هورمون نیز شده است بطوریکه برای هر دو هورمون فوق یک نوع گیرنده وجود دارد. بنابراین اثرات بیولوژیکی این دو هورمون بسیار بهم شبیه بوده به همین دلیل در درمان اختلالات ناباروری مربوط به کمبود LH و یا در القاء تخمک گذاری(LH surge) از داروی hCG استفاده می شود. با توجه به چنین شباهت ساختمانی از آنتی بادی منوکلونال تولید شده می توان در پیشگیری از اتصال هورمون به گیرنده و در نتیجه خنثی نمودن اثرات بیولوژیکی مربوط به این دو هورمون در تحقیقات پیش گیری از اثرات هورمون hCG در بارداری و موارد مشابه استفاده کرد. از طرفی به دلیل وجود مقادیر بسیار جزئی hCG در سرم افراد طبیعی و خانم های غیر باردار می توان این آنتی بادی را در سنجش هورمون hLH نیز بکار گرفت. از آنتی بادی های منوکلونال علیه hCG در تشخیص های بالینی متعددی نظیر تشخیص بارداری و اختلالات مربوط به آن ، بیماریهای تروفوبلاستیک و نیز تشخیص انواع سرطانها و تومورهای غیر تروفوبلاستیک می توان استفاده کرد (۱۹). از طرفی در تشخیص به موقع بارداریهای نابجا[1] و تشخیص قبل از تولد سندرم دان و بیماریهای متعدد دیگر این آنتی بادیها قابل استفاده هستند (۲۱و۲۰).

در خاتمه نتایج بدست آمده در مورد آنتی بادی منوکلونال تولید شده در این پژوهش بشرح زیر جمع بندی می شود:

۱- این آنتی بادی منوکلونال اختصاصاً هورمون hCG راشناسایی نموده و به استثناء هورمون hLH با سایر هورمونهای گلیکو پروتئینی وپروتئین های ادراری واکنش متقاطع ندارد.

۲- این آنتی بادی منحصراً شکل دایمر هورمون hCG و hLH را شناسایی کرده و با زیر واحدهای هورمون به تنهایی واکنشی ندارد.

۳- این آنتی بادی یک اپی توپ غیر پیوسته و فضایی وابسته به زیر واحد بتا را در ملکول hCG شناسایی نموده که بروز آن به حضور هر دو زیر واحد آلفا و بتای هورمون بطور همزمان نیاز دارد.

تشکر و قدردانی

از راهنمائیها و ارشادات سرکار خانم دکتر فاطمه کرمی تهرانی و پیشنهادات و انتقادات سازنده جناب آقای دکتر جواد رسایی ازگروه بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس سپاسگزاری می نماید. همچنین از استاد ارجمند جناب آقای دکتر محمود جدی تهرانی از پژوهشکده ابن سینا و سرکار خانم قرگزلو، جناب آقای خشنودی و سرکار خانم روحی از بخش ایمونولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران بدلیل ارائه کمک های علمی و عملی ارزنده صمیمانه تشکر و قدردانی می نماید. بخش عمده ای از هزینه های مالی این مطالعه توسط معاونت پژوهشی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی تأمین شده است. که بدینوسیله از آن معاونت محترم سپاسگزاری می نماید. از زحمات خانم سلیمی و خانم اسکندری از واحد نشریات پژوهشکده ابن سینا نیز تشکر و قدردانی می شود.

1- Ectopic pregnancy

Downloaded from http://www.jri.ir

References

1. Cole L.A. hCG, its free subunits and its metabolites, roles in pregnancy and trophoblastic disease. J Reprod Med. 1998, 43: 3-10.
2. Pierce JG, parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. Ann Rev Biochem. 1981, 50:465-95.
3. Lapthorn A J, Harris DC, et al. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. Nature. 1994, 369:455-61.
4. Sturgeon CM, McAllister, EJ. Analysis of hCG: Clinical applications and assay requirement. Ann Clin Biochem.1998, 35:460-91.
5. Cole LA. Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites, Clin Chem. 1997, 43:2233-43.
6. Berger P, Bidart, J M, et al. Immunochemical mapping of gonadotropins, Mol Cell Endocrinol. 1996, 125:33-43.
7. Berger P, Klieber R, et al. Monoclonal antibodies against the free subunits of human chorionic gonadotropin. J Endocrinol. 1990, 125: 301-9.
8. Venketesh N, Krishnaswamy, S, et al. Epitope analysis and molecular modeling reveal the topography of the C-terminal peptide of the β-subunit of human chorionic gonadotropin. Eur J Biochem. 1999, 265:1061-6.
9. Bidart JM. Functional mapping of proteins with monoclonal antibodies. In: Gosling, J. P. and Reen, D.J(eds). Immunotechnology, portland press, U.K. 1993, 77-89.
10. Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antiboby of predefined specificity. Nature. 1975, 256:495-7.
11. Gharagozloo S, Sharifian RA, et al. Analysis of the expressed immunoglobulin variable region heavy chain gene products in paraproteins from Iranian patients with multiple myeloma, Pathol Oncol Res. 2000, 6:185-90.
12. Benjamin DC, Berzofsky JA, et al. The antigenic structure of proteins: A Reappraisal. Ann Rev Immunol. 1984, 2:67-101.
13. Nagy AM, Vanbellinghen AM, et al. Epitope mapping on intact, heated and reduced molecular variants of human chorioric gonadotrophin. Mol Cell Endocrinol. 1996, 122:51-7.
14. Caraux J, Chichehian B, et al. Non cross-reactive monoclonal antibodies to human chorionic gonadotropin generated after immunization with a synthetic peptide. J Immonol. 1985, 134:835-40.
15. Bidart JM, Bellet DH, et al. The immune response to a synthetic peptide analogous to the 109-145 βhCG carboxyl terminus is directed against two major and two minor regions. Mol Immunol. 1987, 24:339-45.
16. Bellet D, Bidart JM, et al. A monoclonal antibody against a synthetic peptide is specific for the free native human chorionic gonadotropin β- subunit. Endocrino. 1984, 115:330-6.
17. Bidart JM, Tralen F, et al. Immunochemical mapping of a specific domain on human choriogonadotropin using anti-protein and anti-peptide monoclonal antibodies. J Biol Chem. 1987, 262:15483-9.
18. Ehrich PH, Mostapha Z, et al. Characterization and relative orientation of epitopes for monoclonal antibodies and antisera specific for human chorionic gonadotropin. Am J Reprod Immunol Microbiol. 1985, 8:48-54.
19. Alfthan H, Stenman U. Pathophysiological importance of various molecular forms of human choriogonadotropin. Mol Cell Endocrinol. 1996, 125:107-120.
20. Ankum WM. Diagnosing suspected ectopic pregrancy.Biomed J. 2000, 321:1235-6.
21. Kornman LH, Morssink LP, et al. Maternal urinary β- core hCG in chromosomally abnormal pregnanies in the first trimester. Prenat Diagnos. 1997, 17:135-9.

Downloaded from http://www.jri.ir