پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰، صفحات ۹۳ تا ۹۸

مقاله اصلی
(Original Article)

تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال شتری علیه گیرنده ۲ فاکتور رشد سلول‌های آندوتلیال عروق و بررسی عملکرد آن

مهدی بهدانی[۱]، مرتضی کریمی پور[۱]، حسین خان احمد[۲]، نادر اسدزاده[۳]، کیهان آزادمنش[۴]، علیرضا خبیری[۵]، مهدی حبیبی انبوهی[۶]، سیروس زینلی[۱*]

[۱] بخش پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران
[۲] بخش ب ث ژ، واحد تولیدی - تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران
[۳] گروه اصلاح نژاد، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
[۴] بخش ویروس شناسی، انستیتو پاستور ایران
[۵] بخش قارچ شناسی، انستیتو پاستور ایران
[۶] بخش بانک سلولی، انستیتو پاستور ایران

چکیده

سابقه و هدف: *بخشی از آنتی‌بادی‌های شتر فاقد زنجیره سبک هستند و ناحیه اتصال به آنتی‌ژن در این نوع از آنتی‌بادی‌ها تنها دارای یک دومین می‌باشد. یکی از پروتئین‌های درگیر در آنژیوژنز گیرنده ۲ فاکتور رشد سلول‌های آندوتلیال عروق (VEGFR-2) است که در تومورهای مختلف افزایش دارد و بررسی آن در سطح سلول‌ها با آنتی‌بادی در تحقیقات انجام می‌گیرد.*

روش بررسی: *دو شتر نر توسط آنتی‌ژن VEGFR-2 ایمن شدند. برای بررسی ایمن شدن شترها تست الایزا انجام گرفت. آنتی‌بادی‌های شتری توسط ستون‌های کروماتوگرافی پروتئین A و G تخلیص گردیدند. از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال جدا شده در تست الایزا بر پایه سلول (Cell-based ELISA) جهت بررسی میزان بیان پروتئین VEGFR-2 در سطح سلول‌های 293/KDR، HUVECs و A431 مورد استفاده قرار گرفت.*

یافته‌ها: *در تست الایزا، سرم شترها تا رقت ۱/۱۲۸۰۰ پاسخ دادند. آنتی‌بادی‌های تک زنجیره‌ای توسط ستون‌های افینیتی کروماتوگرافی جدا شدند و در SDS-PAGE تایید شدند. در تست الایزا بر پایه سلول (Cell-based ELISA)، سلول 293/KDR نسبت به سلول HUVECs جذب نوری بالاتری داشت و در مقابل سلول A431 جذب نوری کمتری را نشان داد که دلیل آن عدم حضور VEGFR-2 در سطح این سلول می‌باشد.*

نتیجه‌گیری: *آنتی‌بادی پلی کلونال تک زنجیره‌ای می‌تواند در طراحی کیت الایزا برای تشخیص شکل محلول این پروتئین، استفاده در فلوسیتومتری برای تشخیص سلول‌های بیان کننده این گیرنده، انجام وسترن بلاتینگ و ایمنوهیستوشیمی بر روی بافت‌ها استفاده شود.*

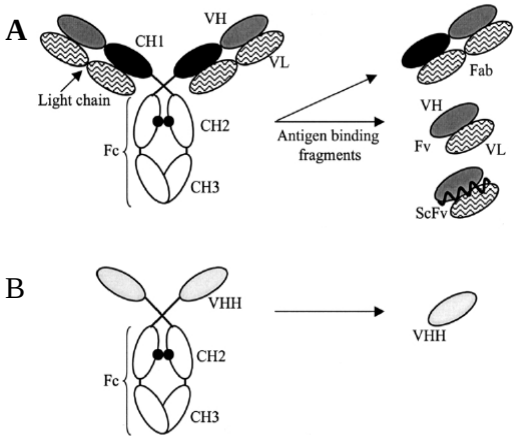
واژگان کلیدی: *شتر، آنتی‌بادی تک زنجیره‌ای، آنتی‌بادی پلی‌کلونال، گیرنده ۲ فاکتور رشد سلول‌های آندوتلیال عروق.*

مقدمه

شتر دارای ویژگی‌های فنوتیپی منحصر به فردی می‌باشد که در سایر پستانداران وجود ندارد. این ویژگی‌های منحصر به فرد در جنبه‌های سلولی و مولکولی نیز می‌توانند حائز توجه باشند. در دهه ۱۹۸۰، خصوصیت متفاوت آنتی‌بادی‌های شتر در سطح مولکولی مشخص گردید (۱). آنتی‌بادی‌ها در انسان و سایر پستانداران از دو زنجیره سنگین و سبک تشکیل شده است و هر زنجیره سنگین نیز دارای یک دومین متغیر و ۴-۳ دومین ثابت می‌باشد. این در حالی است که حدود نیمی از آنتی‌بادی‌های شتر فاقد زنجیره سبک بوده و تنها دارای

آدرس نویسنده مسئول: تهران، خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران، بخش پزشکی مولکولی، دکتر سیروس زینلی (**e-mail:** sirouszeinali@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۸/۱۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۴/۱۴

زنجیره سنگین می‌باشند و به این مناسبت به عنوان آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین یا HcAb (Heavy chain Antibody) یا آنتی‌بادی‌های تک زنجیره‌ای شناخته می‌شوند. در این آنتی‌بادی‌ها دومین CH1 نیز از زنجیره سنگین حذف شده‌است. در آنتی‌بادی‌های تک زنجیره‌ای به علت حذف زنجیره سبک جایگاه اتصال به آنتی‌ژن تنها از یک دومین متغیر تشکیل شده است و به عنوان VHH خوانده می‌شود. دومین VHH کوچک‌ترین جزء آنتی‌بادی است که قابلیت اتصال به آنتی‌ژن را دارد و حدود ۱۵KDa وزن دارد (شکل ۱)(۲). دومین VHH که از شترهای ایمن شده جدا می‌شود در مقایسه با اجزاء آنتی‌بادی مثل Fab، Fv و ScFv که از سایر پستانداران به دست می‌آید، دارای مزایایی می‌باشد که مهم‌ترین آنها قدرت تحمل شرایط سخت مثل اسید معده و مواد شیمیایی و نیز قابلیت بیان در سیستم‌های بیانی باکتریایی و مخمری می‌باشد (۲, ۳). از این قابلیت آنتی‌بادی‌های شتری می‌توان در حوزه پزشکی برای درمان بیماری‌هایی مثل درمان شوره سر و بیماری‌های گوارشی، که در آنها امکان استفاده از آنتی‌بادی‌های معمول نمی‌باشد، استفاده نمود (۴, ۵).



شکل ۱- تفاوت ساختاری آنتی‌بادی‌های معمول پستانداران با آنتی‌بادی‌های تک زنجیره‌ای شتری. A، ساختار آنتی‌بادی‌های معمول در پستانداران را نشان می دهد که متشکل از دو زنجیره سبک و دو زنجیره سنگین بوده و جایگاه اتصال به آنتی‌ژن از دو بخش VH و VL تشکیل شده است. B، ساختار آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین شتری را نشان می‌دهد که فاقد زنجیره‌های سبک می‌باشد و جایگاه اتصال به آنتی‌ژن تنها از یک دومین VHH تشکیل شده است (۲).

گیرنده ۲ فاکتور رشد سلول‌های آندوتلیال عروق یا VEGFR-2 یکی از مولکول‌های دخیل در فرآیند شکل‌گیری عروق خونی جدید یا آنژیوژنز می‌باشد. این پروتئین نوعی گیرنده خارج سلولی از تیروزین‌کینازهای ترانس‌ممبران نوع III می‌باشد که با داشتن پایانه تیروزینی در بخش داخل سلولی خود سبب انتقال پیام فعال‌سازی به داخل سلول می‌گردد (۶). VEGFR-2 گیرنده اصلی جهت رشد و توسعه سلول‌های آندوتلیال عروق خونی بوده و بیان این گیرنده در طی تشکیل عروق خونی جدید و نیز در فرآیند آنژیوژنز توموری افزایش می‌یابد و در عروق خونی طبیعی کاهش پیدا می‌کند (۷). در بسیاری از تومورهای سفت مثل ملانوما، پستان، سرطان کولون، کلیه، مثانه، تخمدان، پروستات و حتی در مولتیپل میلوما و لوسمی‌ها افزایش بیان VEGFR-2 گزارش شده است (۸). به این جهت این پروتئین می‌تواند هدف مناسبی برای درمان سرطان باشد. در برخی از پژوهش‌های علوم پایه از آنتی‌بادی علیه این آنتی‌ژن در تست‌های تشخیصی و تحقیقاتی استفاده می‌شود. ما در این پژوهش شتر را با آنتی ژن VEGFR-2 ایمن کردیم و پس از استخراج آنتی‌بادی پلی‌کلونال تک زنجیره‌ای کارکرد آن را در تشخیص آنتی‌ژن موجود در سطح سلول‌ها در تست Cell-based ELISA مورد ارزیابی قرار خواهیم داد. به این منظور از سه سلول زیر اسفاده می‌شود: (۱) سلول 293/KDR که سلول کلیه جنین انسان می‌باشد و بیان VEGFR-2 در سطح آن افزایش داده شده است، به نحوی که هر سلول در سطح خود $۲/۵\times۱۰^{۶}$ از این گیرنده را بیان می‌کند، (۲) سلول HUVECs که سلول آندوتلیال انسان بوده و در حالت معمول VEGFR-2 در سطح آن بیان می‌گردد و (۳) سلول A431 که سلول اپی‌تلیال انسان بوده و فاقد آنتی‌ژن VEGFR-2 می‌باشد.

مواد و روشها

ایمنوژن به کار رفته در این پژوهش بخش خارج سلولی گیرنده ۲ فاکتور رشد سلول‌های آندوتلیال عروق بود که به صورت نوترکیب از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich) خریداری شد.

در این پژوهش از ۲ شتر جوان نر ۶ ماهه استفاده شد. این شترها از نوع یک کوهانه و با نام علمی Camelus deromedaricus از روستای سفید کوه قم خریداری شده و تحت شرایط مناسب در مرکز تحقیقات علوم دامی کشور در کرج نگهداری شدند. برای ایمن‌سازی شترها از ۲۰ میکروگرم آنتی‌ژن VEGFR-2 به همراه $۱۰^{۶}$ سلول 293/KDR و

ادجوانت فروند استفاده شد. در تلقیح اول آنتی‌ژن به همراه ادجوانت کامل فروند (Sigma-Aldrich) و در تلقیح‌های بعدی از ادجوانت ناقص فروند (Sigma-Aldrich) استفاده شد. زمان‌های تلقیح با فواصل ۲-۳ هفته‌ای به ترتیب در روزهای ۰، ۲۱، ۴۲، ۶۳ و ۸۴ انجام شد. تزریق‌ها به صورت زیر پوستی در ناحیه کشاله ران و گردن شترها در نواحی که غدد لنفاوی فراوانی وجود دارند، انجام شد.

برای بررسی روند ایمن شدن، در هر بار پیش از تلقیح آنتی‌ژن، از ورید وداج گردنی شترها خون‌گیری شد. در تست الایزا آنتی‌ژن نوترکیب VEGFR-2 به میزان ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در ته پلیت الایزا قرار گرفت و توسط آلبومین گاوی عمل بلاکینگ انجام شد. پس از آماده‌سازی پلیت‌های الایزا، سرم شترها در رقت‌های ۱/۱۰۰ تا ۱/۱۲۸۰۰ با PBS (Phosphate Buffered Saline) آماده شده و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. پس از طی مدت زمان انکوباسیون ۱ ساعته و سه بار شستشو، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از Rabbit Anti-Camel با رقت ۱/۱۶۰۰۰ اضافه شد (این رقت در آزمایشگاه بهینه گردید که اطلاعات آن نشان داده نشده است) و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه گردید. چاهک‌ها سه مرتبه شستشو داده شده و به هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر Goat Anti-Rabbit HRP Conjugate (Sigma-Aldrich) با رقت ۱/۵۰۰۰ اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت انکوبه شد. پس از سه بار شستشو و اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر کونژوگه 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (Sigma-Aldrich) و متوقف کردن واکنش توسط اسید سولفوریک ۱ نرمال میزان جذب نوری هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد.

برای جداسازی آنتی‌بادی‌های تک زنجیره‌ای از ستون‌های افینیتی کروماتوگرافی پروتئین G و A استفاده شد. ۵ میلی لیتر سرم شتر بر روی ۵ میلی‌لیتر ستون سفاروز-پروتئین G (GE Healthcare) قرار گرفت و ستون توسط بافر فسفات ۲۰mM با PH7.0 شستشو گردید. برای الوشن IgG3 از محلول نمکی ۰/۱۵ M و اسید استیک ۰/۵۸٪ با PH 3.5 استفاده شد. سپس برای الوشن IgG1 از محلول ۰/۱ مولار Glycin-HCL با PH 2.7 استفاده گردید. برای جداسازی IgG2، بخش جذب نشده به ستون سفاروز-پروتئین G بر روی ۵ میلی‌لیتر ستون سفاروز-پروتئین A (GE Healthcare) قرار گرفت و پس از شستشو با بافر فسفات، برای الوشن از محلول نمکی ۰/۱۵ M و اسید استیک ۰/۵۸٪ با PH 4.5 استفاده شد.

روش SDS-PAGE با استفاده از ژل اکریلامید ۱۰ درصد و مطابق پروتکل استاندارد انجام شد. در این روش، آنتی‌بادی‌های تخلیص شده در دو حالت با عامل احیاء کننده 2ME و بدون عامل احیاء کننده 2ME بر روی ژل اکریلامید ران شدند.

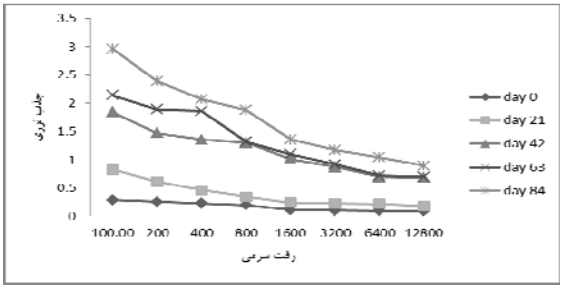
در تست الایزا با سلول، سلول‌های 293/KDR، HUVECs و A431 که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شده بود، به تعداد 10^5 عدد در هر چاهک در داخل پلیت‌های ۹۶ حفره‌ای الایزا به همراه محیط کشت DMEM+10% FBS قرار گرفتند و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند. پس از این مدت، تمام محیط کشت روی سلول‌ها خارج شده و به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر محلول فرمالدهید ۳/۷٪ اضافه شد. پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون و سه بار شستشو با PBS به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر ۱۰FBS٪ اضافه شد و به مدت ۱۶ ساعت در یخچال انکوبه گردید. پس از سه بار شستشو با PBS به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های سریال ۱/۱۰۰۰ تا ۱/۱۶۰۰۰ آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال زنجیره سنگین ضدVEGFR-2 که تخلیص شده‌اند اضافه گردید و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شد. بقیه مراحل به طور خلاصه شامل اضافه کردن Rabbit Anti-Camel و سپس Goat Anti-Rabbit HRP Conjugate (Sigma-Aldrich) و کونژوگه 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (Sigma-Aldrich) بود که مشابه تست الایزا که در قسمت قبل شرح داده شد، انجام گرفت.

چون آنتی‌سرم تجاری Anti-Camel در دسترس نمی‌باشد، این آنتی‌سرم در آزمایشگاه تهیه گردید. بدین منظور آنتی‌بادی‌های تک زنجیره‌ای با استفاده از ستون‌های افینیتی کروماتوگرافی پروتئین A و G از سرم شترها پیش از ایمن سازی جدا گردید. مقدار ۳۰۰ میکروگرم از آنتی‌بادی‌های تک زنجیره‌ای به همراه ادجوانت کامل و ناقص فروند در ۵ مرحله با فواصل زمانی ۲ هفته ای به دو سر خرگوش ماده ۳ ماهه (انستیتو پاستور ایران) به صورت زیر پوستی تلقیح گردید. پس از پایان ایمن‌سازی۱۰۰ میلی‌لیتر خون از قلب خرگوش‌ها گرفته شد و با استفاده از ستون پروتئین G آنتی‌بادی‌ها از سایر اجزاء سرم جداسازی گردیدند.

یافته‌ها

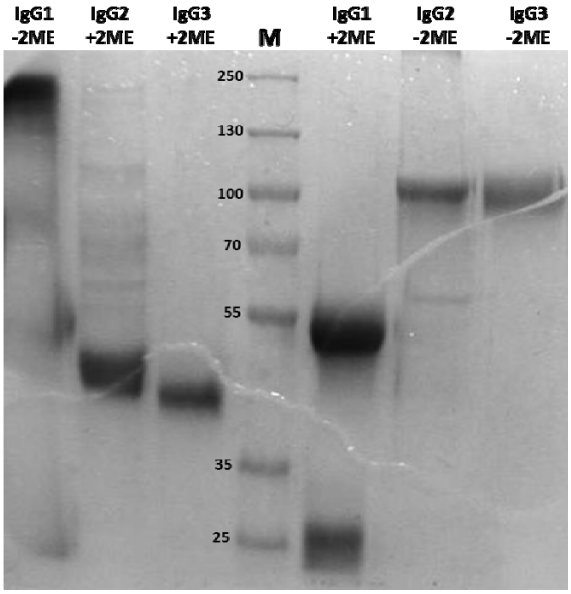
در بررسی روند ایمن‌سازی شترها، پیش از هر بار تلقیح آنتی‌ژن، از ورید وداج گردنی شترها خون‌گیری شد و سرم آنها جدا گردیده و تا زمان انجام تست الایزا در فریزر ۷۰- درجه

نگهداری شد. پس از آخرین تلقیح، سرم‌ها از فریزر خارج شده و بر روی آنها تست الایزا انجام گرفت. یکی از شترها نسبت به دیگری پاسخ‌های بهتری ایجاد کرده بود که نتایج مربوط به آن در شکل ۲ مشخص شده است. این شتر به خوبی با آنتی‌ژن ایمن شده و در روند ایمن‌سازی میزان پاسخ پس از تلقیح دوم رو به افزایش گذاشت. همان طور که در شکل ۲ مشخص است نسبت به روز صفر، بین ۶-۵ برابر تیتر آنتی‌بادی افزایش یافته است، به طوری که در رقت ۱/۱۲۸۰۰ نیز جذب نوری سه برابر روز صفر می‌باشد.

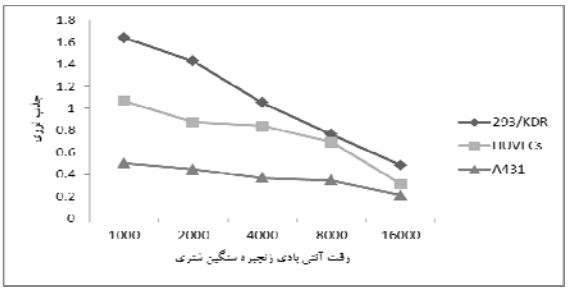


شکل ۲- نمودار روند ایمن‌سازی یکی از شترها با آنتی‌ژن VEGFR-2. محور افقی میزان رقت سرم شتر و محور عمودی میزان جذب نوری را نشان می‌دهد. پس از تزریق دوم آنتی‌ژن، پاسخ ایمنی بسیار مناسبی ایجاد شده و تیتر آنتی‌بادی افزایش چشمگیری پیدا نموده است.

تقریباً نیمی از آنتی‌بادی‌های شتری از نوع تک زنجیره‌ای بوده و بقیه شبیه آنتی‌بادی‌های سایر پستانداران می‌باشند. آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین همگی از نوع IgG2 و IgG3 هستند وآنتی‌بادی‌های معمولی از نوع IgG1 می‌باشند. آنتی‌بادی‌های IgG3 و IgG1 شتری به پروتئین G متصل می‌شوند، در حالی که IgG2 به پروتئین A اتصال پیدا می‌کند (۹). در این پژوهش، آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین از سرم شتری که پاسخ بهتری ایجاد کرده بود با استفاده از دو ستون افینیتی کروماتوگرافی A و G جدا گردیدند. برای اطمینان از روند جداسازی، بر روی آنتی‌بادی‌های تخلیص شده، SDS-PAGE گذاشته شد. همان طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، در حالتی که از عامل احیاء کننده 2-ME استفاده شد، آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین شتری وزنی کمتر از ۵۰ کیلو دالتون دارند، ولی زنجیره سنگین آنتی‌بادی‌های معمولی به علت وجود دومین CH1 وزنی بالای ۵۰ کیلو دالتون دارند. در صورتی که در SDS-PAGE از 2-ME استفاده نشود، آنتی‌بادی IgG1 که شبیه آنتی‌بادی‌های سایر پستانداران دارای دو زنجیره سبک و سنگین می‌باشد، وزنی حدود ۲۰۰ کیلو دالتون دارد، در حالی که آنتی‌بادی‌های IgG2 و IgG3 وزنی حدود ۱۰۰ کیلو دالتون دارند (شکل ۳).



شکل ۳- الگوی آنتی‌بادی‌های تخلیص‌شده شتری در SDS-PAGE. آنتی بادی های شتری پس از تخلیص توسط ستون های افینیتی کروماتوگرافی پروتئین A و G در دو شرایط با 2ME و بدون 2ME بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز گردیدند. IgG1 شتری شبیه آنتی بادی های سایر پستانداران دارای دو زنجیره می باشد و درحضور عامل احیا 2ME دو باند حدود ۵۰KD و ۲۵KD ایجاد می کند. IgG2 و IgG3 شتری تنها دارای زنجیره سنگین می باشند و درحضور عامل احیا 2ME تنها یک باند ایجاد می نمایند.



شکل ۴- نمودار جذب نوری در رقت‌های مختلف آنتی‌بادی زنجیره سنگین شتری در تست Cell-based ELIZA. سلول 293/KDR با داشتن تعداد بیشتری از VEGFR-2 در سطح خود بالاترین جذب نوری را در رقت‌های مختلف آنتی‌بادی ایجاد کرده است و در مقابل سلول A431 به علت عدم بیان VEGFR-2 حداقل جذب نوری را ایجاد نموده است.

همان طور که در شکل ۳ مشخص است، آنتی‌بادی‌های تک زنجیره‌ای به خوبی از سایر اجزای سرم جدا شده‌اند و مشخص است که روند تخلیص آنتی‌بادی‌ها با ستون‌های افینیتی کروماتوگرافی A و G به نحو مطلوبی صورت گرفته است.

در بررسی کارآیی آنتی‌بادی پلی‌کلونال در شناسایی VEGFR-2 سطح سلول، همان طور که در شکل ۴ مشخص است، سلول 293/KDR نسبت به سلول HUVECs جذب نوری بالاتری داشت و در مقابل سلول A431 جذب نوری کمتری را نشان داد. دلیل آن عدم حضور VEGFR-2 در سطح سلول است.

بحث

تفاوت در ساختار آنتی‌بادی‌ها، اولین تفاوت در سطح مولکولی بود که بین سایر پستانداران با شتر به عنوان یک حیوان خارق‌العاده و قابل تفکر پیدا شد. آنتی‌بادی‌های شتر بر خلاف آنتی‌بادی‌های سایر پستانداران فاقد زنجیره سبک بوده و از همودایمر زنجیره سنگین تشکیل شده است و به این جهت به آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین معروف می‌باشند (۲). این آنتی‌بادی‌ها با استفاده از ستون‌های افینیتی کروماتوگرافی A و G قابل جداسازی می‌باشند (۹). در مطالعات متعددی کارآیی آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین شتری در تشخیص و درمان بیماری‌ها گزارش شده است. در مطالعه قبلی گروه ما نشان داده شد که آنتی‌بادی‌های شتری ضد سم عقرب می‌توانند از مرگ موش‌هایی که سم عقرب به آنها تلقیح شده بود جلوگیری نماید (۱۰). همچنین در دو گزارش دیگر آنتی‌سرم بدست آمده از شتر توانایی خنثی نمودن سم مار و ویروس عامل بیماری پا و دهان در خوک به اثبات رسیده است (۱۱, ۱۲). در مطالعه دیگری از آنتی‌بادی‌های تک زنجیره شتری در درمان سرطان در مدل موشی استفاده گردید و کارآیی آن مورد تایید قرار گرفت (۱۳).

در این پژوهش، ما به دنبال جداسازی آنتی‌بادی‌های تک زنجیره‌ای علیه گیرنده فاکتور ۲ رشد سلول‌های آندوتلیال عروق خونی بودیم. این پروتئین یک گیرنده فاکتور رشد است که بیان آن در سطح سلول‌های آندوتلیال عروق خونی بافت توموری افزایش پیدا می‌نماید (۶). این افزایش بیان در تومورهای مختلفی گزارش شده است (۸) و این آنتی‌ژن، هدف بسیار مناسبی برای درمان تومورها می‌باشد، لذا پژوهش‌های مختلفی برای دستیابی به آنتی‌بادی درمانی علیه این گیرنده در حال انجام است (۱۴). ما در این پژوهش برای نخستین بار آنتی‌بادی شتری علیه VEGFR-2 تولید نمودیم و پس از جداسازی آنتی‌بادی‌های تک زنجیره‌ای کارآیی آنها را در شناسایی آنتی ژن در سطح سلول در تست الایزا نشان دادیم. آنتی‌بادی‌های تک زنجیره شتری به خوبی با شرایط به کار رفته جدا شدند و در SDS-PAGE نشان داده شد. همچنین این آنتی‌بادی‌ها قادرند به خوبی آنتی‌ژن VEGFR-2 را در سطح سلول‌ها شناسایی نمایند و نسبت به مقادیر متفاوت بیان آنتی‌ژن در سطح سلول نیز حساس می‌باشند.

با وجود معرفی آنتی‌بادی‌های منوکلونال، استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال در تست‌های تشخیصی مثل الایزا، وسترن بلاتینگ و فلوسیتومتری هنوز دارای کاربرد زیادی می‌باشد و در فهرست فروش بسیاری از شرکت‌ها وجود دارند. آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه VEGFR-2 می‌تواند در طراحی کیت الایزا برای تشخیص شکل محلول این پروتئین در سرم بیماران، استفاده در فلوسیتومتری برای تشخیص سلول‌های بیان کننده این گیرنده، انجام وسترن بلاتینگ و نیز ایمنوهیستوشیمی بر روی بافت‌ها مورد استفاده قرار گیرد. این پژوهش در فاز بعدی خود بر روی تهیه آنتی‌بادی منوکلونال شتری علیه این آنتی‌ژن تمرکز خواهد نمود و امیدواریم بتوانیم از آن در درمان بیماران سرطانی که دارای بیان بالایی از این گیرنده هستند، استفاده نماییم.

قدردانی و تشکر

از همکاری‌های صمیمانه همکاران در موسسه تحقیقات علوم دامی کشور خصوصاً جناب آقای پرویز روحی و نیز از مدیریت آموزش انستیتو پاستور ایران برای حمایت مالی از این طرح تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Nicholls H. The Camel Factor. New Scientist 2007; 196: 50-53.

2. Muyldermans S. Single domain camel antibodies: current status. J Biotechnol 2001; 74: 277-302.

3. Muyldermans S, Baral TN, Retamozzo VC, De Baetselier P, De Genst E, Kinne J, et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. Vet Immunol Immunopathol 2009; 128: 178-83.

4. Dolk E, van der Vaart M, Lutje Hulsik D, Vriend G, de Haard H, Spinelli S, et al. Isolation of llama antibody fragments for prevention of dandruff by phage display in shampoo. Appl Environ Microbiol 2005; 71: 442-50.

5. Harmsen MM, van Solt CB, van Zijderveld-van Bemmel AM, Niewold TA, van Zijderveld FG. Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy. Appl Microbiol Biotechnol 2006; 72: 544-51.

6. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signaling and therapeutic inhibition. Cell Signal 2007; 19: 2003-12.

7. Böldicke T, Tesar M, Griesel C, Rohde M, Gröne HJ, Waltenberger J, et al. Anti-VEGFR-2 scFvs for cell isolation. Single-chain antibodies recognizing the human vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2/flk-1) on the surface of primary endothelial cells and preselected CD34+ cells from cord blood. Stem Cells 2001; 19: 24-36.

8. Fine BA, Valente PT, Feinstein GI, Dey T. VEGF, flt-1, and KDR/flk-1 as prognostic indicators in endometrial carcinoma. Gynecol Oncol 2000; 76: 33-39.

9. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature 1993; 363: 446-48.

۱۰. بهدانی مهدی، حسینی نژاد چافی محمد، زینلی سیروس، کریمی پور مرتضی، خان احمد شهرضا حسین، قاسمی پوریا و همکاران. تولید آنتی سرم از شتر ایمن شده با ونوم عقرب همیسکورپیوس لپتوروس: ارزیابی اثر خنثی سازی آن در موش. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرداد ۱۳۸۹، شماره ۵، صفحات ۲۷۳-۲۶۸.

11. Harrison RA, Hasson SS, Harmsen M, Laing GD, Conrath K, Theakston RD. Neutralisation of venom-induced haemorrhage by IgG from camels and llamas immunised with viper venom and also by endogenous, non-IgG components in camelid sera. Toxicon 2006; 47: 364-68.

12. Harmsen MM, van Solt CB, Fijten HP, van Keulen L, Rosalia RA, Weerdmeester K, et al. Passive immunization of guinea pigs with llama single-domain antibody fragments against foot-and-mouth disease. Vet Microbiol 2007; 120: 193-206.

13. Cortez-Retamozo V, Backmann N, Senter PD, Wernery U, De Baetselier P, Muyldermans S, et al. Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. Cancer Res 2004; 64: 2853-57.

14. Argyriou AA, Giannopoulou E, Kalofonos HP. Angiogenesis and anti-angiogenic molecularly targeted therapies in malignant gliomas. Oncology 2009; 77: 1-11.