تهیه آنتی‌بادی زنجیره سنگین پلی‌کلونال علیه پروتیین انتقال‌دهنده روی SLC39A6 و کاربرد آن در تست‌های تشخیصی

هاجرالسادات قادری[۱]، زهرا نورمحمدی[۱]، مهدی حبیبی انبوهی[۲]، فاطمه کاظمی لمعه دشت[۳]، مهدی بهدانی[۳و٤*]

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، تهران، ایران.
٤- مرکز تحقیقات بیماری‌های زئونوز، پژوهشکده شمال کشور، انستیتو پاستور ایران، آمل، ایران.

[*] نویسنده مسئول: تهران، خیابان پاستور، پلاک ٦۹، انستیتو پاستور ایران، ، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول‌های درمانی، بخش بیوتکنولوژی.
تلفن: ٦٤١١٢١٤٤-۰۲۱
E-mail: behdani@pasteur.ac.ir

چکیده

دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۱۵ ویرایش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۲ پذیرش: ۱٤۰۰/۰۳/۲۳ آنلاین: ۱٤۰۰/۰٤/۰۱

زمینه و هدف: پروتیین SLC39A6 (solute carrier family 39) یا LIV-1 یک پروتیین انتقال‌دهنده روی می‌باشد که در سرطان‌های استروژن مثبت مانند سرطان سینه بیان بیش‌ازحد دارد. افزایش بیش از حد غلظت روی می‌تواند محرک تقسیم سلولی نامنظم و سرطان و متاستاز شود. بنابراین مهار پروتیین‌های انتقالی روی می‌تواند در درمان سرطان موثر باشد. پروتیین LIV-1 می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر تشخیصی مناسب سرطان نیز در روش‌های آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرد. مطالعه حاضر جهت تهیه پلی‌کلونال آنتی‌بادی شتری برای شناسایی پروتیین LIV-1 در سطح سلول صورت گرفته است.

روش بررسی: مطالعه پژوهشی حاضر در انستیتو پاستور ایران، از مهر ۱۳۹۷ تا اسفند ۱۳۹۸ انجام شد. در ابتدا سازه ژنی بیانی حاوی LIV-1 انسانی تهیه و به باکتری *E.coli* BL21 انتقال داده شد و بیان این پروتیین با IPTG القا شد و سپس به‌وسیله ستون کروماتوگرافی تمایلی، پروتیین نوترکیب تخلیص گردید. سپس حیوان شتر یا استفاده از این پروتیین ایمن‌سازی شد. سرم حیوان ایمن شده جدا گردید و عملکرد پلی‌کلونال آنتی‌بادی در تست‌های تشخیصی الایزا وسترن بلات و فلوسیتومتری در شناسایی پروتیین LIV-1 مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که پروتیین LIV-1 به‌خوبی تخلیص شده است و شتر علیه این پروتیین ایمن شده است. با توجه به نتایج، وسترن بلات، الایزا و فلوسایتومتری نشان داده شد این سرم قابلیت اتصال و شناسایی پروتیین LIV-1 را دارا می‌باشد.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش نشان داده شد که آنتی‌بادی پلی‌کلونال شتری قابلیت استفاده در روش‌های آزمایشگاهی را دارد و می‌تواند برای تست‌های ایمونولوژی و کاربردهای درمانی مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: شتر، آنتی‌بادی زنجیره سنگین، پلی‌کلونال آنتی‌بادی، پروتیین انتقال‌دهنده روی.

مقدمه

پروتیین LIV-1 متعلق به خانواده Zip می‌باشد که به نام پروتیین تنظیم شونده با استروژن، ZIP6، Zrt و Irt-Like در انسان شناخته می‌شود، و در موش SLC36A6 نام دارد. پروتیین LIV-1 عنصر روی را از طریق غشا پلاسمایی به داخل سیتوزول منتقل می‌کند.[۱] در شرایط فیزیولوژیک این ناقل به فراوانی در اندام‌هایی مانند سینه، پروستات، جفت، کلیه، هیپوفیز و جسم پینه‌ای بیان می‌شود.[۱و۲] LIV-1 اولین بار در رده سلول سرطانی سینه به نام ZR-75-1 و به‌عنوان ژن القایی به‌وسیله استروژن شناسایی شد.[۳] تصور می‌شود که این پروتیین در بافت‌های غنی از هورمون، ازجمله سرطان سینه و رحم تحت تأثیر محرک‌های سلولی سبب توسعه تومور و متاستاز شود که این موضوع

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-10-19]

به نقش متالوپروتیینازی این پروتیین نسبت داده می‌شود.[۴] با توجه به تغییر الگوی زندگی عوامل خطرزا و الگوی جمعیتی ایران، انتظار می‌رود طی دهه‌های آینده بروز سرطان سینه در کشور به شدت افزایش یابد. در حال حاضر ۱۰۰۰۰ نفر در سال به این بیماری مبتلا می‌شوند که یک سوم آنها بر اثر این بیماری فوت می‌کنند.[۵]

بیشترین هزینه‌های درمان صرف سه نوع سرطان سینه، ریه و پروستات می‌شود که با پیشرفت بیمای هزینه‌ها افزایش یافته و در مراحل پایانی بیماری به بالاترین میزان خود می‌رسد.[۶] با توجه به هزینه‌های بالا، بلندمدت بودن طول دوره درمان و عوارض جانبی ناشی از این نوع درمان‌ها در زمینه درمان سرطان‌های سینه و پروستات لزوم تحقیق در روش‌های تشخیصی و درمانی جدید روشن می‌باشد.

یکی از ابزارهای تشخیصی در سرطان‌ها استفاده از روش‌های مبتنی بر آنتی‌بادی مثل الایزا، وسترن بلات و فلوسیتومتری می‌باشد. در سرم شترسانان نوع خاصی از آنتی بادی با عنوان آنتی‌بادی زنجیره سنگین (Heavy-chain antibody(HcAb وجود دارد که بر خلاف آنتی‌بادی‌های معمول پستانداران تنها از دو زنجیره سنگین تشکیل شده است و به‌طور طبیعی زنجیره سبک را ندارد. این آنتی‌بادی‌ها دارای خصوصیات فیزیولوژیک متفاوتی با آنتی‌بادی‌های معمول می‌باشند، از این‌رو استفاده از آنها می‌تواند برای تست‌های ایمونولوژی و کاربردهای درمانی مورد توجه قرار گیرد.[۷] هدف از تحقیق حاضر تهیه پلی‌کلونال آنتی‌بادی شتری علیه پروتیین LIV-1 می‌باشد.

روش بررسی

بیان نوترکیب و تخلیص پروتیین LIV-1: قطعه ژنی ناحیه خارج غشایی پروتیین نوترکیب LIV-1 (NCBI-Q13433) که پیش‌تر در پلاسمید pET-22 کلون شده بود (اطلاعات نشان داده نشده است) به باکتری *Escherichia coli* -BL21 با روش شوک حرارتی و CaCl2 ۰/۱ مولار ترانسفورم گردید. برای تخلیص پروتیین، ابتدا باکتری واجد سازه ژنی در حجم ۲۵۰ ml کشت داده شد و با ۰/۱ mmol Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) القا گردید. پس از ۱۲ساعت انکوباسیون در ۳۷ °C، پلت باکتری‌ها در بافر تریس- اوره ۸ mol (8M urea, 20mMTris-HCL, 500mM NaCl pH 8.0) و با استفاده از سونیکاتور (Sonicator) لیز شدند. لیزات سلولی سانتریفیوژ شد و سپس محلول رویی فیلتر گردید. محلول فیلتر شده بر روی ستون Ni-NTA ریخته شد. سپس با بافر شستشو (8M urea, 20mMTris-HCL, 500mM NaCl pH 6.3) شستشو داده شد به‌منظور اینکه پروتیین‌های با اتصال ضعیف‌تر از روی ستون حذف شوند. برای جدا کردن پروتیین نوترکیب از بافر جداکننده (8M urea, 20mM Tris-HCL, 500mM NaCl pH 4.5) استفاده شد. پروتیین تخلیص شده با استفاده از کیسه دیالیز با اندازه منافذ ۱۲ کیلودالتون و محلول نمک-فسفات Phosphate-buffered saline (PBS) اوره زدایی شد و خلوص پروتیین توسط Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) بررسی گردید. برای تأیید از وسترن بلات با آنتی‌بادی Anti-His tag استفاده شد.

ایمن‌سازی شتر: از یک شتر ماده ۷-۶ ماهه که تحت شرایط بهینه و در بخش علوم حیوانات مجتمع تحقیقاتی و تولیدی انستیتو پاستور ایران (کرج) نگهداری شد برای ایمن‌سازی استفاده شد. ایمن‌سازی شتر با شش بار تزریق پروتیین LIV-1 نوترکیب به فواصل هر دو هفته یک‌بار انجام شد. در هر بار تزریق ۱۰۰ µg از پروتیین به‌همراه ادجوانت فروند (Freund's adjuvant) استفاده شد. در تزریق اول از ادجوانت کامل فروند و در سایر تزریق‌ها از ادجوانت فروند ناقص استفاده شد. پیش از ایمن‌سازی و پیش از هر بار تزریق پروتیین از شتر خون‌گیری شد و سرم آن در فریزر ۲۰- °C نگهداری شد.

تخلیص آنتی‌بادی زنجیره سنگین پلی‌کلونال علیه LIV-1 از سرم شتر: جهت تخلیص IgG از ستون افینیتی (Affinity) کروماتوگرافی پروتیین A استفاده شد. ۵ ml از سرم شتر بر روی ستون سفاروز پروتیین A (GE Healthcare) ریخته شد و ستون با بافر نمک- فسفات ۲۰ mmol و pH 7 شستشو داده شد. برای جداسازی IgG ها از محلول نمکی ۰/۱۵ mol و ۰/۵۸٪ استیک اسید با pH 3.5 استفاده شد و بلافاصله pH با استفاده از محلول تریس یک مولار خنثی شد. میزان ٤ µg از IgG تخلیص شده به‌همراه بافر لودینگ به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شده و در حضور 2ME و عدم حضور 2ME در حجم نهایی ۱۰ µl در چاهک SDS-PAGE ریخته شده است.

استفاده از پلی‌کلونال آنتی‌بادی شتری در تشخیص LIV-1 با وسترن بلات: پروتیین نوترکیب LIV-1 در ژل ۱۵٪ SDS-PAGE ران

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-10-19]

شد و سپس به کاغذ نیتروسلولز انتقال یافت. کاغذ نیتروسلولز با شیر خشک ۲٪ و به‌مدت ١٦ ساعت در دمای ٤ °C انکوبه گردید. پس از شستشو کاغذ با بافر نمک–فسفات، سرم شتر پیش از ایمن‌سازی و پس آخرین ایمن‌سازی با رقت ۱/۲۰۰ در دمای اتاق به‌مدت یک ساعت انکوبه گردید. پس از شستشو با بافر نمک–فسفات Rabbit anti-Camel با رقت ۱/۲۰۰۰ اضافه و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. درنهایت پس از شستشو با بافر نمک- فسفات، Horseradish Peroxidase (HRP)-conjugate Anti Rabbit با رقت ۱/۱۰۰۰ اضافه شد و در دمای اتاق به‌مدت یک ساعت انکوبه شد. در نهایت و پس از شستشو، با محلول حاوی ٤- کلر و ١- نفتول رنگ‌آمیزی گردید.

تشخیص LIV-1 در الایزا با پلی‌کلونال آنتی‌بادی شتری: ۱۰۰ µl از غلظت ۱ µg/ml پروتیین نوترکیب LIV-1 در هر چاهک پلیت الایزا ریخته شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه گردید. برای بلاک کردن از شیرخشک ٤٪ به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق استفاده شد. از سرم شتر پیش از ایمن‌سازی و پس از پنج روز از آخرین ایمن‌سازی رقت‌های ۱/۱۰۰، ۱/۲۰۰، ۱/٤۰۰، ۱/۸۰۰، ۱/۱٦۰۰، ۱/۳۲۰۰، ۱/٦٤۰۰، ۱/۱۲۸۰۰ با محلول نمک–فسفات تهیه شد و به چاهک‌های مربوطه اضافه گردید و به مدت یک ساعت در ۳۷ °C انکوبه شد. پس از شستشو با بافر نمک–فسفات Rabbit anti-Camel با رقت ۱/۲۰۰۰ اضافه و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد، در مرحله بعد پس از شستشو با بافر نمک–فسفات رقت ۱/۱۰۰۰ از Goat Anti-Rabbit-Horseradish Peroxidase conjugate (HRP) اضافه شد و به‌مدت یک ساعت انکوبه شد. درنهایت محلول رنگ‌زا TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) اضافه شد و از اسیدسولفوریک ۲ نرمال به‌عنوان متوقف‌کننده استفاده گردید و جذب نوری در طول‌موج ٤٥۰ نانومتر خوانده شد.

تشخیص LIV-1 در فلوسایتومتری با پلی‌کلونال آنتی‌بادی شتری: سلول MCF-7 که رده سلولی سرطان سینه می‌باشد در محیط DMEM به‌همراه ۱۰٪ FBS، ۵٪ CO2 و دمای ۳۷ °C کشت داده شد. برای فلوسایتومتری تعداد ۳×۱۰^۵ سلول در لوله فلوسایتومتری ریخته شد و دو بار با محلول نمک- فسفات شستشو گردید. ۲ µg (در حجم ۱۰۰ µl) از آنتی‌بادی زنجیره سنگین پلی‌کلونال تخلیص شده به سلول‌ها اضافه گردید و به مدت یک ساعت بر روی یخ انکوبه شد. پس از شستشو ۱ µg از آنتی‌بادی Rabbit anti-Camel در حجم نهایی ۱۰۰ µl به سلول‌ها اضافه شد و بر روی یخ یک ساعت انکوبه گردید. در ادامه سلول‌ها شسته شده و ۲ µg از آنتی‌بادی Anti-Rabbit Fluorescein isothiocyanate conjugate (FITC) به سلول‌ها افزوده شد و انکوباسیون نیم ساعت روی یخ انجام شد. در نهایت سلول‌ها شسته شده و با دستگاه فلوسایتومتری Partec Cyflow, Sysmex, Japan مورد بررسی قرار گرفتند. به‌عنوان کنترل از آنتی‌بادی تجاری علیه LIV-1 (Sigma, USA) استفاده شد.

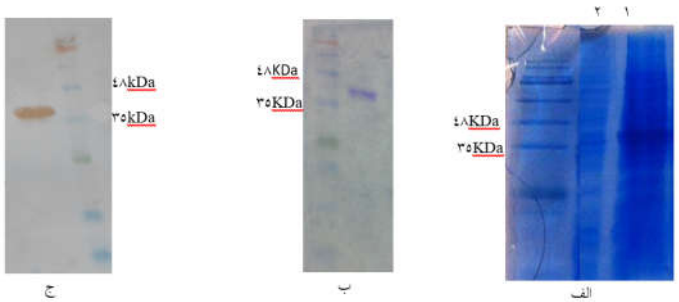
یافته‌ها

بیان نوترکیب پروتیین LIV-1: شکل ۱- الف بیان پروتیین در مقایسه با باکتری القا نشده را نشان می‌دهد. با توجه به وجود His-tag در انتهای پروتیین از روش افینیتی کروماتوگرافی نیکل برای تخلیص پروتیین استفاده شد. شکل ۱–ب نتیجه SDS-PAGE پروتیین تخلیص شده را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است پروتیین با خلوص بالایی در موقعیت حدود ٣٦ کیلودالتون قرارگرفته است. در ادامه پروتیین تخلیص شده با استفاده از Anti-His در وسترن بلات تایید شد (شکل ۱- ج) همچنین IgG های سرم شتر جداسازی گردید (شکل ۲).

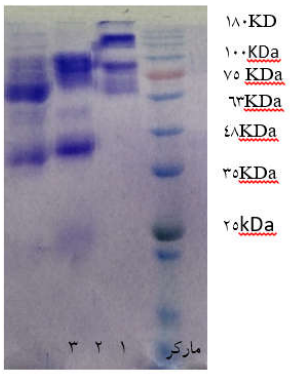
نتایج استفاده از پلی‌کلونال آنتی‌بادی شتری برای تشخیص LIV-1 با وسترن بلات: با توجه به این‌که در وسترن بلات سرم پیش از تزریق باندی مشاهده نشد و در وسترن بلات سرم آخرین تزریق باند موردنظر مشاهده شد، می‌توان نتیجه گرفت که پلی کلونال آنتی‌بادی شتری برای شناسایی آنتی‌ژن LIV-1 در روش وسترن بلات می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (شکل ۳).

نتایج استفاده از پلی‌کلونال آنتی‌بادی شتری برای تشخیص LIV-1 در الایزا: نتایج الایزا بیانگر توانایی این آنتی‌بادی در شناسایی پروتیین در روش الایزا می‌باشد (نمودار ۱). همچنین این نتایج نشان می‌دهد که شتر به خوبی در برابر این پروتیین ایمن شده است. همانطور که ملاحظه می‌گردد با کاهش نزولی رقت سرم، میزان جذب نوری نیز به همان نسبت کاهش داشته و نسبت به سرم پیش از تزریق جذب نوری تفاوت ۱ تا ۷ برابری در رقت‌های مختلف را نشان می‌دهد. نتایج استفاده از پلی‌کلونال آنتی‌بادی شتری برای تشخیص LIV-1 به روش فلوسایتومتری: با توجه به هیستوگرام

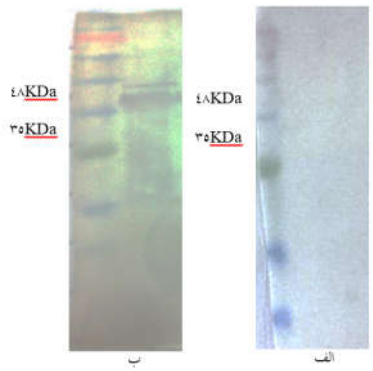
[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-10-19]



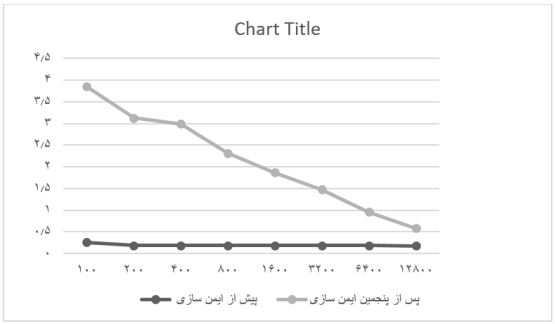
شکل ۱: بیان، تخلیص و تایید پروتیین LIV-1 نوترکیب. الف) نتایج بیان پروتیین نوترکیب ۱، باکتری القا شده با IPTG و ۲، باکتری القا نشده. ب) پروتیین تخلیص شده LIV-1 با کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از ستون Ni-NTA ج) وسترن بلات پروتیین LIV-1 تخلیص شده با Anti-His



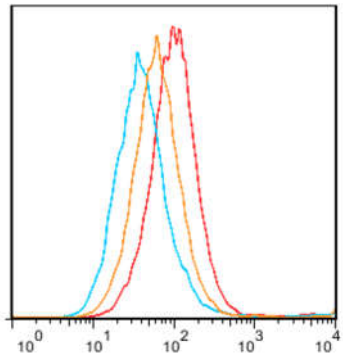
شکل ۲: ژل SDS-PAGE ایمنوگلوبولین‌های G تخلیص شده از سرم شتر ایمن شده. ۱، سرم شتر به همراه 2ME، ۲، IgG تخلیص شده به‌همراه 2ME، ۳، IgG تخلیص شده بدون 2ME در کنار مارکر پروتیینی



شکل ۳: وسترن بلات با پلی‌کلونال آنتی‌بادی شتری برای تشخیص پروتیین LIV-1. الف- سرم پیش از ایمن‌سازی. ب- سرم پس از ایمن‌سازی پنجم.



نمودار ۱: نتایج تست الایزا با استفاده از پلی‌کلونال آنتی‌بادی شتری برای تشخیص LIV-1.



شکل ٤: نتایج فلوسایتومتری سلول‌های MCF7 با استفاده از پلی‌کلونال آنتی‌بادی شتری علیه LIV-1. هیستوگرام آبی، سلول تیمار نشده با آنتی‌بادی، هیستوگرام نارنجی، سلول تیمار شده با آنتی‌بادی تجاری، هیستوگرام قرمز، سلول تیمار شده با پلی‌کلونال آنتی‌بادی شتری.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-10-19]

حاصل از بررسی سلول‌ها با دستگاه فلوسایتومتری که در شکل ٤ آمده است، نشان داده شد که آنتی‌بادی پلی کلونال شتری قادر است پروتیین LIV-1 را در سطح سلول شناسایی نماید. همچنین نشان داده شد که قابلیت پلی‌کلونال آنتی‌بادی شتری نسبت به آنتی‌بادی تجاری مورد استفاده در شناسایی پروتیین بیشتر بوده است.

بحث

علیرغم سال‌ها تحقیقات و همچنین صدها داده در زمینه مارکرهای توموری، تعداد مارکرهای توموری که برای استفاده در مقاصد پزشکی مورد تایید قرار گرفته‌اند ناچیز می‌باشد. از مزایای استفاده از تومور مارکرها می‌توان به جستجوی تومورمارکرها در بین جمعیت انسانی و شناسایی سرطان در مراحل اولیه اشاره کرد، همچنین از تومورمارکرها در شناسایی سرطان‌هایی که بدون علایم بالینی مشخصی هستند استفاده می‌شود.

روش معمول شناسایی سرطان تهیه بیوپسی از بافت به‌وسیله جراحی می‌باشد و تومور مارکر برای شناسایی سرطان استفاده نمی‌شود اما تومور مارکرها می‌توانند در زمانی که بیماران با علایمی شبیه سرطان مراجعه می‌نماید جهت بررسی اولیه مفید باشند و می‌توانند در شناسایی منشا اولیه تومور کمک‌کننده باشند.[۸]

عنصر روی به‌عنوان یکی از عناصر ضروری بدن در شرایط پاتولوژیک دارای تاثیرات دوگانه می‌باشد. در مطالعات مختلفی نشان داده شده است که افزایش روی می‌تواند سبب از بین رفتن سلول‌های سرطانی از طریق آپپتوز می‌شود، اما این افزایش دارای یک آستانه تحمل می‌باشد، زیرا نشان داده شده است که افزایش بیان پروتیین‌های انتقال دهنده روی مثل LIV-1 که سبب افزایش غلظت روی در داخل سیتوپلاسم می‌شود می‌تواند به تکثیر سلول‌های سرطانی و سپس متاستاز تومور منجر شود. در مطالعه‌ای شان دادند که در بیماران سرطان سینه که Estrogen receptor (ER) مثبت بودند میزان بیان LIV-1 افزایش می‌یابد.[۹] مطالعات نشان داده‌اند که LIV-1 یک نشانگر قابل‌اعتماد در سرطان‌هایی است که گیرنده استروژن مثبت می‌باشند.[۱۰و۱۱] در سال‌های بعد در بررسی‌های جدید مشخص شد این پروتیین می‌تواند در تنظیم کاهش بیان ژن‌های مرتبط با چسبندگی سلول مرتبط باشد، از این‌رو نقش این پروتیین در متاستاز سلول‌های سرطان مشخص شد.[۱۲] بررسی‌ها نشان دادند که پروتیین ZIP 7 (Zinc Transporter solute carrier7) روی را از شبکه آندوپلاسمی آزاد می‌کند و ممکن است برای فعالیت آنزیم تیروزین کیناز ضروری باشد و یافته‌های آنها در این زمینه نشان دادند که پروتیین ZIP7 می‌تواند به‌عنوان هدفی در درمان بیماری‌هایی مانند سرطان از طریق مهار تیروزین کیناز مفید باشد.[۱۳] همچنین مشخص شده است که پروتیین LIV-1 نامزد مناسبی برای روش درمانی Antibody drug conjugate (ADC) است زیرا بیان آن در سلول‌های سرطانی گسترده و در سلول‌های طبیعی محدود می‌باشد. در سال‌های اخیر مطالعات نشان داده‌اند که می‌توان از LIV-1 به‌عنوان ژنی برای تشخیص بالینی سرطان سینه لومینال تیپ A استفاده کرد.[۱٤]

تاکنون بیشتر مطالعاتی که بر روی آنتی‌بادی‌ها جهت شناسایی بیومارکرهای سرطانی و یا درمان انجام‌گرفته است از آنتی‌بادی‌های موشی یا خرگوشی استفاده‌شده است. در سال‌های اخیر مشخص‌شده است که استفاده از آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین شتری به‌دلیل خصوصیات فیزیولوژیک منحصر به فرد آن نیز می‌تواند مفید باشد.[۱۵]

در مطالعه حاضر ژن بخش خارج سلولی پروتیین LIV-1 در باکتری *E.coli* بیان شد و پروتیین خالص به وسیله کروماتوگرافی تمایلی با ستون Ni-NTA به‌دست آمد، سپس به شتر تزریق شده و سرم شتر به‌دست آمده سه روز پس از آخرین تزریق به‌وسیله تست‌های وسترن بلات و الایزا و فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که شتر برای پروتیین LIV-1 نوترکیب حاصل به‌خوبی ایمن‌سازی شده است. نتایج تست الایزا در ارتباط با ایمن‌سازی شتر با نتایج سایر مطالعات مشابهت داشت.[۱٦] در مطالعات جدید مشخص شده که ایمن‌سازی شتر با آنتی‌ژن نوترکیب نسبت به سلول قابلیت ایمن سازی بیشتری دارد، از این‌رو در مطالعه حاضر از آنتی‌ژن نوترکیب برای ایمنی‌زایی استفاده شد.[۱۷] در مطالعه‌ای دیگر نیز از شتر برای تهیه پلی‌کلونال آنتی بادی علیه گیرنده ۲ فاکتور رشد سلول‌های آندوتلیال عروق خونی استفاده کردند و نشان دادند که این آنتی‌بادی پلی‌کلونال قابلیت شناسایی آنتی‌ژن در تست الایزا را دارا می‌باشد.[۱۸]

در سال‌های اخیر مشخص شد که LIV-1 نامزد مناسبی به‌عنوان یک نشانگر در سرطان سینه است، بنابراین پلی‌کلونال آنتی‌بادی علیه LIV-1 می‌تواند برای شناسایی و تشخیص زودهنگام سرطان سینه با

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-10-19]

روش‌های تشخیصی مختلف استفاده شود.[٤]

سپاسگزاری: این مقاله بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "تهیه آنتی‌بادی مونوکلونال تک‌دومینی (نانوبادی) علیه پروتیین انتقال‌دهنده روی LIV-1" مصوب صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به شماره ۹٦۰۰۳٤۷٦ و حمایت مالی معاونت تحقیقات، فناوری و آموزش انستیتو پاستور ایران اجرا شده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند تا از تلاش‌های آقای احسان علی رحیمی و خانم دکتر نازلی ستوده تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. Taylor KM, Nicholson RI. The LZT proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters. *BBA-Biomembranes* 2003;1611(1-2):16-30.
2. Taylor KM, Morgan HE, Johnson A, Nicholson RI. Structure-function analysis of a novel member of the LIV-1 subfamily of zinc transporters, ZIP14. *FEBS Lett* 2005;579(2):427-32.
3. Manning DL, McClelland RA, Knowlden JM, Bryant S, Gee JM, Green CD, et al. Differential expression of oestrogen regulated genes in breast cancer. *Acta Oncol* 1995;34(5):641-6.
4. Kasper G, Weiser AA, Rump A, Sparbier K, Dahl E, Hartmann A, et al. Expression levels of the putative zinc transporter LIV-1 are associated with a better outcome of breast cancer patients. *Int J Cancer* 2005;117(6):961-73.
5. Rohani Rasaf M, Rohani Rasaf M, Rahimi F, Mehrazma M, Golmohammadi A, Motiedoost R, et al. Distribution of cancer incidence in districts and neighbourhoods of a number of Tehran districts in 1386. *Razi J Med Sci* 2011;18(89):34-45.
6. Pinder SE, Rakha EA, Purdie CA, Bartlett JM, Francis A, Stein RC, et al; Translational Subgroup of the NCRI Breast Clinical Studies Group. Macroscopic handling and reporting of breast cancer specimens pre- and post-neoadjuvant chemotherapy treatment: review of pathological issues and suggested approaches. *Histopathology* 2015;67(3):279-93.
7. 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(1-3):178-83.
8. Nagpal M, Singh S, Singh P, Chauhan P, Zaidi MA. Tumor markers: A diagnostic tool. *Natl J Maxillofac Surg* 2016;7(1):17-20.
9. McClelland RA, Manning DL, Gee JM, Anderson E, Clarke R, Howell A, et al. Effects of short-term antiestrogen treatment of primary breast cancer on estrogen receptor mRNA and protein expression and on estrogen-regulated genes. *Breast Cancer Res Treat* 1996;41(1):31-41.
10. Tozlu S, Girault I, Vacher S, Vendrell J, Andrieu C, Spyratos F, et al. Identification of novel genes that co-cluster with estrogen receptor alpha in breast tumor biopsy specimens, using a large-scale real-time reverse transcription-PCR approach. *Endocr Relat Cancer* 2006;13(4):1109-20.
11. Schneider J, Ruschhaupt M, Buness A, Asslaber M, Regitnig P, Zatloukal K, et al. Identification and meta-analysis of a small gene expression signature for the diagnosis of estrogen receptor status in invasive ductal breast cancer. *Int J Cancer* 2006;119(12):2974-9.
12. Yamashita S, Miyagi C, Fukada T, Kagara N, Che YS, Hirano T. Zinc transporter LIVI controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer. *Nature* 2004;429(6989):298-302.
13. Hogstrand C, Kille P, Nicholson RI, Taylor KM. Zinc transporters and cancer: a potential role for ZIP7 as a hub for tyrosine kinase activation. *Trends Mol Med* 2009;15(3):101-11.
14. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406(6797):747-52.
15. Rahbarizadeh F, Ahmadvand D, Sharifzadeh Z. Nanobody; an old concept and new vehicle for immunotargeting. *Immunol Invest* 2011;40(3):299-338.
16. Arezumand R, Mahdian R, Behdani M, Khanahmad H, Langari J, Namvarasl N, et al. Recombinant expression and purification of human placental growth factor 1 and specific camel heavy chain polyclonal antibody preparation. *Saudi J Biol Sci* 2014;21(1):35-9.
17. Homayouni V, Khanahmad H, Ganjalikhani-Hakemi M, Behdani M, Ghasemi P, Rezaei A. Stimulation of Camel Polyclonal Antibody against Human T cell Immunoglobulin and Mucin 3. Iran *J Biotechnol* 2017;15(3):166-71.
18. Behdani M, Karimipour M, Khanahmad SH, Asadzadeh N, Azadmanesh K, Khabiri A, et al. Production of camel polyclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2 and performance evaluation in ELISA test. 2011;35(2):93-8.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-10-19]

TUMJ Tehran University Medical Journal, July 2021; Vol. 79, No. 4: 274-280 Original Article

Preparation of heavy chain polyclonal antibody against zinc transporter SLC39A6 and its diagnostic application

Hajarossadat Ghaderi M.Sc.[1]
Zahra Noormohammadi Ph.D.[1]
Mahdi Habibi-Anbouhi Pharm.D. Ph.D.[2]
Fatemeh Kazemi-Lomedasht Ph.D.[3]
Mahdi Behdani Ph.D.[3,4*]

1- Department of Biology, Basic Science Unit, Tehran Sciences 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- Zoonosis Research Centre, North Research Center, Pasteur Institute of Iran, Amol, Iran.

*Corresponding author: Biotechnology Research Centre, Venom and Biotherapeutics Molecules Laboratory, Pasteur Institute of Iran, No. 69, Pasteur St., Tehran, Iran.
Tel: +98-21-64112144
E-mail: behdani@pasteur.ac.ir

Abstract

Received: 03 Feb. 2021 Revised: 10 Feb. 2021 Accepted: 13 Jun. 2021 Available online: 22 Jun. 2021

Background: SLC39A6 Protein (solute carrier family 39) or LIV-1 is a zinc transporter protein that is overexpressed in positive estrogen cancers such as breast cancer. The LIV-1 protein transfer zinc into the cytoplasm through the plasma membrane. Today it is known that just as a decrease in the concentration of zinc in the cell can cause cancer, an excessive increase in the concentration of zinc can also stimulate irregular cell division and caused cancer. Thus, inhibition of zinc transporter protein may play a role in preventing malignancies and metastasis. It can also be used as a diagnostic marker in the diagnosis of cancers in various laboratory methods. The present study was performed to prepare a polyclonal camel antibody for the detection of LIV-1 protein at the cell surface.

Methods: This study was started in the Pasture Institute of Iran in 2018 September and finished in February 2020. An expression construct containing the human LIV-1 gene was prepared and transferred to the *E.coli* BL21 by chemical (CaCl2) and heat shock method. The expression of the protein was induced by IPTG and then protein was purified by affinity (Ni-NTA) chromatography. After preparing recombinant protein one female camel was immunized, 6 times at two weeks intervals with Freund's adjuvant. After immunization, the isolated polyclonal antibody was evaluated by ELISA, western blotting and flow cytometry in the detection of LIV-1 protein.

Results: The result showed that LIV-1 protein was well purified and also the camel polyclonal antibody was able to detect LIV-1 protein in ELISA, western blot and also it can detect LIV-1 on the cell surface as shown by flow cytometry test.

Conclusion: In recent years, LIV-1 has been shown to be a good candidate as a marker in breast cancer, so polyclonal antibodies against LIV-1 can be used for early detection of breast cancer by various diagnostic methods. In this study, it has been shown that polyclonal camel antibodies can be used in laboratory methods and can be considered for immunological tests and therapeutic applications.

Keywords: camel, heavy chain antibody, polyclonal antibody, zinc transporter protein.

Copyright © 2021 Tehran University of Medical Sciences. Published by Tehran University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-10-19]