مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۲، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۳
صفحه: ۱۵۸۵-۱۵۷۷

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 22, No.5, Nov-Dec 2014
Pages: 1577-1585

تولید آنتی بادی منوکلونال در موش علیه مورفین بدون واکنش متقاطع با هرویین

سوسن کاشانیان[۱]، ملیحه پاکنژاد[۲]، علی شمس*[۳]

۱- کارشناس ارشد ایمنی شناسی پزشکی، پردیس بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
۲- استادیار گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، تهران، ایران
۳- استادیار گروه ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید و خدمات درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۲۷

چکیده

مقدمه: سنجش‌های ایمنی برای تشخیص و تعیین مقدار اپیوییدها در خون و سایر مایعات بیولوژیک بر مبنای آنتی‌بادی‌ها می‌باشد. در این مطالعه تولید آنتی‌بادی منوکلونال علیه مورفین مدنظر بود.

روش بررسی: تولید آنتی‌بادی منوکلونال علیه مورفین در موش طبق روش استاندارد هیبریدوما انجام گرفت. بدین منظور، پنج سر موش BALB/c ماده ۶ تا ۸ هفته‌ای با مشتق ۶- مورفین همی سوکسینات کونژوگه با آلبومین سرم گاوی کاتیونیزه شده ایمن‌سازی گردیدند. سلول‌های لنفوسیت B طحال موش‌های ایمن شده با سلول‌های میلومایی موشی (Sp2/0) با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول با یکدیگر ادغام شدند. سلول‌های هیبریدوما با رقیق سازی حد تک کلون و تکثیر داده شدند. کلاس و زیر کلاس آنتی‌بادی منوکلونال توسط کیت ایزواستریپ شرکت Roche تعیین شد. به منظور تخلیص آنتی‌بادی از افینیتی کروماتوگرافی پروتئینG استفاده گردید. افینیتی آنتی‌بادی به روش Beatty سنجیده شد. واکنش‌های متقاطع آنتی‌بادی تولیدی با مولکول‌های شبه مورفین تعیین گردید.

نتایج: از بین۳ کلون ترشح کننده آنتی‌بادی علیه مورفین-BSA بعد از سه بار رقیق‌سازی یک کلون مترشحه پایدار به دست آمد. کلاس آنتی‌بادی حاصل از نوع IgG2b و زنجیره سبک آن از نوع لامبدا (λ) بود. افینیتی آنتی‌بادی حاصل برای مورفین برابر با $۲/۸ \times ۱۰^{۹}\ M^{-1}$ بود. تیتر آنتی‌بادی در محیط رویی سول‌های هیبریدما ۱:۴۰۰ بود. این آنتی بادی هیچ واکنش متقاطعی با هرویین، نالوکسان، نالتروکسان و پاپاورین نشان نداد.

نتیجه‌گیری: آنتی‌بادی منوکلونال تولیدی علیه مورفین از افینیتی و ویژگی مناسبی برخوردار بود و با هرویین واکنش متقاطعی نشان نداد. بنابراین این آنتی‌بادی در طراحی روش‌های سنجش ایمنی برای تشخیص مورفین در مایعات بیولوژیک می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: مورفین، آنتی‌بادی منوکلونال، cBSA

*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۳۵-۳۸۲۰۳۶۸۲، پست الکترونیکی: alis743@yahoo.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-07]

مقدمه

مورفین یکی از مهمترین آلکالوییدهای تریاک است که در سال ۱۸۰۶ میلادی توسط Sertörner از تریاک جدا گردید. به علت خاصیت ضد درد از گذشته‌های دور به عنوان دارو استفاده می‌شده است. استفاده بی رویه از این دارو به منظور مقابله با پریشانی‌های جسمی و روحی وابستگی در افراد ایجاد می‌کند(۱).

روش‌های متفاوتی همچون کروماتوگرافی لایه نازک، کروماتوگرافی گازی، کروماتوگرافی با کارایی بالا و کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتری جرمی برای تشخیص و تعیین مقدار مورفین و سایر مواد مخدر و متابولیت‌های آن در نمونه‌های بیولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر روش‌های فوق که بر پایه کروماتوگرافی استوار است، از چند دهه قبل روش‌های سنجش ایمنی نیز در تشخیص این مواد بکار گرفته می‌شود. از میان روش‌های سنجش ایمنی می‌توان به رادیو ایمنواسی، کمی لومینسانت ایمنواسی، فلورسانس ایمنواسی، آنزیم ایمنواسی، آگلوتیناسیون لاتکس و ایمنوکروماتوگرافی اشاره کرد. در این روش‌ها دو جزء اصلی یعنی آنتی‌بادی و آنتی ژن حائز اهمیت فراوان بوده که خصوصیات آنها تعیین‌کننده خصوصیات سنجش از نظر حساسیت و ویژگی می‌باشد. آنتی‌بادی‌ها به طور وسیعی در شکل‌های مختلف به عنوان یک ابزار تشخیصی مورد استفاده قرار می‌گیرند. آنتی‌بادی‌ها به دو دسته پلی‌کلونال و منوکلونال تقسیم می‌شوند. آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال از مجموعه‌ای از آنتی‌بادی‌ها با ویژگی و خصوصیات متفاوت که علیه اپی‌توپ‌های مختلف یک آنتی‌ژن هستند، ساخته شده‌اند. به علت ناهمگونی آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال استفاده از آنها در روش‌های ایمونواسی محدودیت دارد. به همین علت آنتی‌بادی‌های منوکلونال در روش‌های تشخیص آزمایشگاهی موادی مانند مورفین مورد توجه هستند. در سال ۱۹۷۵ میلادی اصول پایه‌ای تکنیک هیبریدوما بوسیله Kohler و Millstein توصیف گردید. روش هیبریدوما هنوز هم به عنوان یک روش اصلی در تولید آنتی‌بادی منوکلونال مورد استفاده قرار می گیرد. سه ویژگی اساسی آنتی‌بادی‌های منوکلونال شامل یکنواختی، اختصاصی بودن و توانایی تولید بی‌نهایت، آنها را از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال متمایز نموده است(۲). این مطالعه با توجه به نیاز روزافزون کشور به آنتی‌بادی منوکلونال جهت تولید کیت‌های تشخیصی علیه مورفین و تولید آنتی‌بادی با کیفیت بالا از نظر ویژگی و میل ترکیبی انجام گرفت.

روش بررسی

با استفاده از روش Spector و همکاران، مشتق ۶- مورفین همی‌سوکسینات (6-MHS) تهیه شد(۳). pH این محلول روی ۵ تنظیم و محلول به مدت یک شب در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا عمل تبلور کریستال‌های 6-MHS انجام شود.

به منظور تهیه ایمنوژن بهتر، ابتدا آلبومین سرم گاوی (BSA) به آلبومین سرم گاوی کاتیونیزه (c-BSA) تبدیل و سپس مورفین به آن متصل گردید. برای کاتیونیزه کردن BSA از اتیلن دی‌امینِ (EDA) در حضور EDC: 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimide استفاده شد. به منظور تهیه cBSA ابتدا ۶۷ میکروگرم از BSA در ۲ میلی‌لیتر بافر PBS ۲۰ میلی‌مولار با ۷/۲pH حل شد و به آن ۲ میکروگرم EDC اضافه و به مدت یک شب انکوبه گردید. به منظور اتصال 6-MHS به c-BSA از دی متیل سولفوکساید استفاده گردید. با استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون G-25 مولکول‌های بزرگ یعنی کونژوگه cBSA-Morphine از مورفین آزاد، جدا شدند. برای محاسبه تعداد مورفین متصل شده بهcBSA و BSA از روش تغییر یافته Erlanger استفاده گردید(۴).

برای هر موش BALB/c ۶ تا ۸ هفته‌ای ماده غلظت مناسب از ایمنوژن cBSA-Morphine در PBS تهیه گردید(جدول ۱). این محلول با هم حجم خود با ادجوانت در داخل سرنگ امولسیون‌کننده به طور کامل مخلوط شد تا امولسیون شیری رنگ به وجود آید و تزریق طبق جدول ۱ صورت گرفت. تزریق‌های یادآور هر دو هفته یک بار انجام شد و آخرین تزریق ۴ روز قبل از ادغام سلول‌های لنفوسیت B و میلومایی بود.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-07]

جدول ۱: غلظت ایمنوژن، نوع ادجوانت در تزریقات با ایمنوژن در موش‌های BALB/c

تزریق ها	تزریق اول-روز صفر	تزریق دوم-روز ۱۴	تزریق سوم-روز ۲۸	تزریق دوم-روز ۴۲	آخرین تزریق روز ۵۲
غلظت ایمنوژن	۵۰gμ	۲۵μg	۲۵μg	۲۵μg	۱۰μg
نوع ادجوانت فروند	کامل	ناقص	ناقص	ناقص	بدون ادجوانت فروند و با PBS استریل

به منظور تعیین تیتر آنتی‌بادی درسرم موش‌های ایمن شده از روش الیزای غیرمستقیم استفاده شد، به طوری که ابتدا کنژوگه مورفین- BSA به کف چاهک‌های پلیت الیزا اتصال داده شد (Coating). بعد از کوتینگ، محلول ۵ درصد Skim milk به چاهک‌ها افزوده شد تا از اتصالات غیراختصاصی جلوگیری شود. بعد از شستشو، رقت‌های مختلف سرم موش ایمن شده به حفره‌ها افزوده شد. برای کنترل منفی از رقت‌های سرم موش غیرایمن استفاده گردید. مراحل بعدی روش الیزا با ایمونوگلوبولین ضدموشی متصل به آنزیم پراکسیداز ادامه پیدا کرد و جذب نوری چاهک‌ها درطول موج ۴۵۰ nm در دستگاه پلیت ریدر قرائت گردید.

سلول‌های میلومایی SP2/0 در محیط کشت RPMI کامل با ۱۰٪FBS و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین (Gibco) کشت داده شدند. سلول‌ها تا روز ادغام یا فیوژن در وضعیت رشد لگاریتمی نگهداشته شدند. برای تهیه لایه مغذی از صفاق موش سلول‌های ماکروفاژی گرفته شدند و در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند. برای فیوژن، حیوان با گاز CO_2 کشته و طحال آن در شرایط استریل خارج شد و سلول‌های لنفوسیت آن جدا و با سلول‌های SP2/0 مخلوط و سانتریفیوژ شد. به رسوب سلولی حاصله محلول PEG/DMSO اضافه شد و پس از سانتریفیوژ کردن با محیط حاوی HAT سوسپانسیون شده و در داخل پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای حاوی لایه تغذیه‌ای کشت داده شدند، پس از گذشت ۷ روز محیط این چاهک‌ها با محیط حاوی HT تعویض شد(۵). چاهک‌های حاوی کلون مشخص شدند و محیط رویی آنها برای وجود آنتی‌بادی علیه مورفین-BSA به روش الیزای غیرمستقیم غربالگری شدند.

از بین کلون‌های ترشح کننده آنتی‌بادی علیه مورفین -BSA، کلون‌های مترشحه پایدار که دارای تیتر بالا بودند، انتخاب و به منظور تک کلون‌سازی سه بار رقت‌سازی حد انجام گردید. پس از رقت‌سازی مناسب، سلول‌ها در داخل پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای طوری کشت داده شدند که در داخل هر چاهک یک سلول قرار گرفت. سپس کلون مورد نظر در داخل فلاسک‌های ۲۵ و ۷۵ سانتی‌متر مربع کشت داده شدند.

برای تعیین نوع آنتی بادی و یا نوع زنجیره سبک و سنگین آنتی‌بادی از کیت تعیین ایزوتایپ آنتی‌بادی (Roche- آلمان) استفاده گردید.

برای خالص کردن آنتی‌بادی در مایع رویی سلول‌های هیبریدوما ابتدا پروتئین‌های موجود در این مایع را با آمونیوم سولفات ۵۰٪ رسوب داده شد. سپس با ستون افنیتیی کروماتوگرافی پروتئین-G (سیگما-آلمان) طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده در دستور کار عمل تخلیص انجام گرفت.

افینیتی نشانگر قدرت برهم کنش بین یک جایگاه اتصال در مولکول آنتی‌بادی به آنتی‌ژن است و به صورت ضریب ترکیب یا Ka نشان داده می‌شود. برای تعیین افینیتی آنتی‌بادی علیه مورفین غلظت‌های مختلف از آنتی‌ژن BSA-Morphine در پلیت‌های الیزا کوت شد به طوری که نسبت دو غلظت متناوب یک عدد صحیح (n) باشد. ابتدا رقت‌های متفاوت از آنتی‌بادی تخلیص شده و سپس آنتی‌بادی ضدموشی متصل به HRP افزوده شد و با افزودن سوبسترا جذب نوری آنها تعیین شد. جذب نوری چاهک‌ها برحسب درصد محاسبه شد، سپس منحنی درصد اتصال (محور y) در مقابل غلظت آنتی‌بادی منوکلونال (محور X) برای هر غلظت از آنتی ژن رسم گردید. از روی منحنی، ۵۰٪ اتصال برای هر غلظت آنتی‌ژن محاسبه، سپس افینیتی آنتی‌بادی محاسبه گردید.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-07]

ویژگی آنتی‌بادی با بررسی واکنش‌های متقاطع (Cross Reaction) آن با مولکول‌های مشابه مورفین صورت می‌گیرد، ترکیبات شبه مورفینی مورد مطالعه در این تحقیق برای بررسی واکنش متقاطع عبارت بودند از: ۱-کدیین ۲- هرویین ۳- نالوکسون ۴- نالترکسون ۵- آپومورفین ۶- پاپاورین

برای بررسی واکنش متقاطع، طراحی الیزای غیرمستقیم رقابتی انجام گرفت. بدین صورت که ابتدا از روی منحنی چکربورد(Checkerbord) بهترین غلظت آنتی‌ژن، یعنی مورفین– BSA برای پوشش‌دهی پلیت‌ها و همچنین بهترین رقت سوپرناتانت کلون‌ها به دست آمد، سپس جهت طراحی الیزای رقابتی غیرمستقیم برای بررسی واکنش متقاطع آنتی‌بادی علیه مورفین با ترکیبات شبه مورفینی منحنی استاندارد آن رسم شد.

نتایج

حدود ۱۰ مولکول مورفین به گروه‌های آمینی هر مولکول BSA متصل شد در حالی که تعداد مورفین متصل شده به هر مولکول BSA کاتیونایز شده (cBSA) برابر ۳۰ بود.

جدول ۲ نتایج حاصل از تیتراسیون آنتی‌بادی پلی‌کلونال موش‌های ایمن شده با cBSA-Morphine را نشان می‌دهد. آنتی‌ژن کوت شده در چاهک‌های پلیت الیزا BSA-Morphine بود. نتایج نشان داد موش‌های ایمن شده در مقایسه با موش‌های غیرایمن تیتر آنتی‌بادی بالاتری دارند ($p<۰/۰۵$).

جدول ۲. تیتراسیون سرم موش ایمن

پروتئین کوت شده رقت سرم موش	Mor-BSA (OD)	BSA
۱:۵۰۰	۲/۳۵	۱/۱۲
۱:۱۰۰۰	۲/۲۰	۰/۰۲
۱:۲۰۰۰	۱/۹۴	-

جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر است

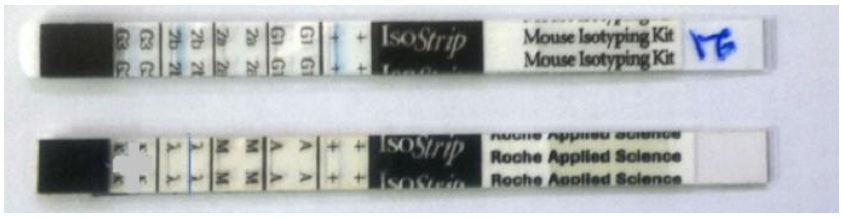
بهترین موش ایمن شده انتخاب و سلول‌های طحال آن با سلول‌های میلوما ادغام شدند. پس از غربالگری از بین ۲۰۰ چاهک تنها در ۳ چاهک علیه مورفین-BSA آنتی‌بادی تولید شده بود که این آنتی‌بادی‌ها با BSA واکنش نشان ندادند. نتایج در جدول ۳ آورده شده است.

جدول۳: میزان جذب ۳ کلون واکنش داده با Mor-BSA

شماره کلون معرف کوت شده	۱	۲	۳ OD	سوپرناتانت SP20
BSA	۰/۳۳	۰/۲۸	۰/۳۲	۰/۲۵
Mor-BSA	۳/۰۳	۳/۲۶	۲/۹۹	۰/۲۸

OD: جذب نوری

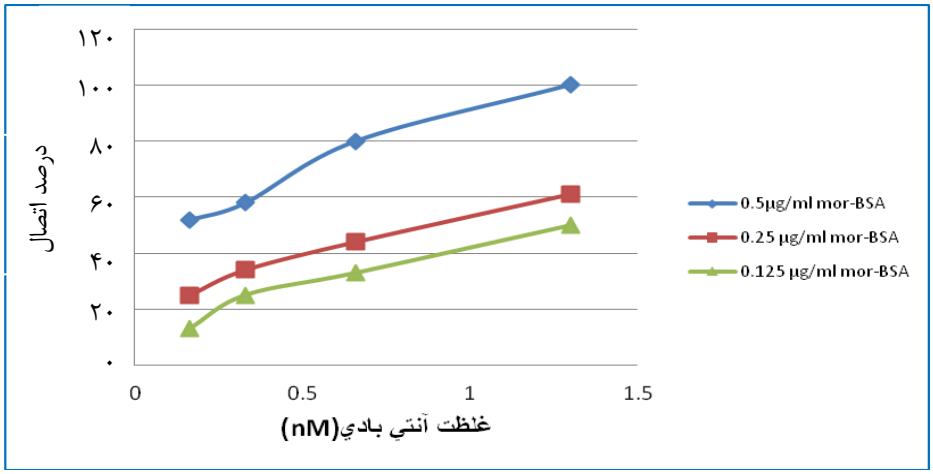
با استفاده از ایمونوکروماتوگرافی و کیت شرکت Roche کلاس، زیرکلاس و نوع زنجیره سبک آنتی‌بادی تولیدی تعیین شد. همانطور که در شکل ۱ ملاحظه می‌شود کلاس و زیرکلاس آنتی‌بادی منوکلونال از نوع IgG_2b بوده و زنجیره سبک آن از نوع لامبدا (λ) بود.



شکل ۱: کلاس و زیرکلاس و نوع زنجیره سبک آنتی بادی منوکلونال

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-07]

غلظت آنتی‌بادی تخلیص شده با روش برادفورد محاسبه شد که برابر با ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و یا ۱/۳ نانومولار بود. این غلظت بیشترین غلظت آنتی‌بادی و حداکثر جذب نوری را نشان داد و این جذب به عنوان درصد اتصال ماکزیمم (۱۰۰٪) در نظر گرفته شد و درصدهای اتصال در غلظت‌های دیگر آنتی‌بادی نسبت به غلظت حداکثری آن محاسبه گردید (نمودار ۱). بر اساس آنچه در قسمت منحنی‌های مربوط به درصد اتصال بر حسب غلظت آنتی‌بادی در نمودار ۱ رسم شده، افینیتی آنتی‌بادی برای مورفین برابر با $۲/۸ \times ۱۰^{۹}\ M^{-1}$ به دست آمد.



نمودار ۱: منحنی محاسبه افینیتی مربوط به آنتی‌بادی منوکلونال علیه مورفین

با استفاده از فرمول زیر میزان واکنش متقاطع آنتی‌بادی علیه مورفین با ترکیبات مشابه آن به دست آمد. این آنتی‌بادی برای مورفین نسبتا اختصاصی است و فقط با کدیین (۱۰۰٪) و آپومورفین (۱۶/۵٪) واکنش متقاطع دارد (جدول۴).

$$\text{درصد واکنش متقاطع} = \frac{\text{غلظتی از موردین که ۵۰٪ اتصال را ایجاد کرده}}{\text{غلظتی از ماده مشابه مورفین که ۵۰٪ اتصال را ایجاد کرده}} \times ۱۰۰$$

جدول ۴: درصد واکنش متقاطع آنتی بادی علیه مورفین با ترکیبات مشابه آن

ترکیبات شبه مورفینی	مورفین	کدیین	هرویین	نالترکسون	نالوکسون	آپومورفین	پاپاورین
درصد واکنش متقاطع با آنتی بادی	٪۱۰۰	٪۱۰۰	<٪۰/۰۵	<٪۰/۰۵	<٪۰/۰۵	٪۱۶/۵	<٪۰/۰۵

بحث و نتیجه‌گیری

بیش از ۴۰ نوع آلکالوئید در گیاه خشخاش شناخته شده است. فراوان‌ترین آلکالوئیدهای موجود در خشخاش مورفین، کدئین، تبائین، پاپاورین، نارکوتین و نوسکاپین می‌باشد(۶). از این میان مورفین با ۴۲ درصد کل آلکالوئیدها، مهمترین آنها از لحاظ فراوانی می‌باشد(۷). مورفین مانند سایر ضددردهای مخدر دارای توانایی بالقوه برای ایجاد وابستگی روحی و جسمی (اعتیاد) است(۸). از آنجا که مبارزه با مواد مخدر و اعتیاد یکی از اساسی‌ترین برنامه‌های هر کشوری است و شناسایی و درمان

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-07]

افراد معتاد بخشی از این برنامه را شامل می‌شود، بنابراین وجود یک روش سنجش مناسب برای تشخیص افراد معتاد امری ضروری است. امروزه یکی از روش‌های متداول تشخیص و تعیین مورفین سنجش‌های ایمنی است که یک جزء مهم آن آنتی‌بادی می‌باشد. با توجه به ویژگی‌های خاص آنتی‌بادی منوکلونال در این تحقیق اقدام به تهیه و تولید این نوع آنتی‌بادی علیه مورفین شد و سپس کاربرد این آنتی‌بادی برای طراحی الیزای رقابتی بررسی شد.

ایمن‌سازی موش‌ها با cBSA-Morphine انجام گرفت. برای ایمن‌سازی با هاپتن نیاز به حامل یا کریر می‌باشد. در این راستا می‌توان از حامل‌های مختلفی استفاده کرد که از آن جمله KLH, BSA, cBSA و ... می‌باشد(۹). BSA متداول‌ترین حامل در روش‌های تولید آنتی‌بادی منوکلونال است. این ماده حدود ۵۹ اسید آمینه لیزین در ساختار خود دارد که از طریق این اسید آمینه ها کنژوگاسیون با BSA را انجام می‌دهد.

برای ایمن‌سازی مناسب، بهترین نسبت هاپتن به کریر ۳۰-۱۵ مول هاپتن به یک مول حامل می باشد. در این مطالعه مشاهده شد، کنژوگاسیون ۶-مورفین همی سوکسینات به BSA با استفاده از EDC حدود ۱۰ می‌شود. به منظور افزایش نسبت هاپتن به کریر، برای تهیه ایمنوژن اقدام به تهیه cBSA شد. در این حالت گروه‌های COOH آسپارتات و گلوتامات با ترکیباتی مثل اتیلن دی آمین یا هگزان دی آمین به آمین نوع اول تبدیل شده، بار مثبت مولکول افزایش یافته، و PH ایزوالکتریک BSA از ۵ به حدود ۱۱ تغییر خواهد کرد(۱۰). این افزایش بار مثبت منجر به تحریک سریعتر سیستم ایمنی می شود(۱۱)، و همچنین افزایش این گروه‌های آمین آزاد، بازده اتصال هاپتن به آن را افزایش می‌دهد. نتایج بیانگر این بود که وقتی از cBSA به عنوان حامل استفاده شود نسبت هاپتن به کریر به۳۰ افزایش می‌یابد. نتایج حاصل از تیتراسیون آنتی‌بادی پلی‌کلونال سرم موش‌ها نشان‌دهنده این بود که موش‌ها با این کنژوگه cBSA-Morphine به بهترین نحو ایمن شده‌اند. ولی نکته قابل توجه اینکه به منظور تیتراسیون سرم موش‌ها، اگر از cBSA-Morphine برای چسباندن کف چاهک‌های الیزا استفاده می‌شد، به شدت به صورت غیراختصاصی، حتی در سرم موش غیرایمن، اتصال برقرار می‌شد (احتمالاً به علت تفاوت بار الکتریکی حاصل روی این کنژوگه و سرم موش‌ها). به علت این واکنش غیراختصاصی و همچنین به این علت که پیشنهاد می‌شود برای حذف اثر واکنش ایمنی حاصل از آنتی‌بادی‌هایی که علیه حامل هستند از کنژوگه هاپتن با کریر غیر از آنچه که برای ایمن کردن بکار رفته استفاده شود، برای تیتراسیون، از کنژوگه BSA-Morphine استفاده شد. همانطور که از نتایج مشخص است به طور قابل توجهی تفاوت مشهودی بین واکنش ایمنی آنتی‌بادی پلی کلونال با BSA-Morphine نسبت به BSA وجود دارد. مفهوم آن این است که در این موش‌ها کلون‌های بسیار زیادی وجود داشته است که علیه خود مورفین بوده‌اند. با توجه به اینکه اپی توپ‌های مربوط به هاپتن محدود هستند و در مقابل اپی توپ‌های کریر (که قسمت عمده ایمنوژن را تشکیل می‌دهد) ناچیز می‌باشند، باید آنتی‌بادی پلی کلونال تیتر بالایی علیه هاپتن داشته باشد که هنگام فیوژن بتواند از بین کلون‌های حاصل، کلون‌هایی علیه هاپتن به دست آید.

افینیتی این آنتی‌بادی به صورت الیزای غیرمستقیم، به روش Beatty انجام شد. از آنجایی که میل ترکیبی سنجیده شده برای کل BSA-Morphine است و با توجه به آنکه هیچگونه واکنشی با BSA وجود ندارد، پس این انتظار وجود دارد که میل ترکیبی با مورفین سنجیده شده باشد. افینیتی به دست آمده M^{-1} ۱۰^{۹} × ۲/۸ بود. با توجه به اینکه دامنه افینیتی‌های گزارش شده توسط دانشگاه کمبریج برای آنتی‌بادی‌های منوکلونالM^{-1}۱۰^{۹}-۱۰^{۶} است، نسبت به افینیتی آنتی‌بادی‌های منوکلونال، این آنتی‌بادی دارای میل ترکیبی بالایی می‌باشد.

از نظر ویژگی، این آنتی‌بادی تقریباً اختصاصی بوده و به جز با کدیین که ساختار بسیار نزدیکی به مورفین دارد (فقط – OH روی کربن ۳ مورفین متیله شده و گروه OCH3– را ایجاد کرده است)، عمدتاً با ترکیبات مشابه مورفین هیچگونه واکنش متقاطعی ندارد. بسیاری از آنتی‌بادی‌های تجاری و همچنین

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-07]

کیت‌های حاصل از آن نیز با کدیین واکنش متقاطع دارند و جهت تأیید نتایج مثبت تست نیاز به انجام سنجش‌های تأییدی مثل کروماتوگرافی لایه نازک(TLC) دارند. در مطالعه‌ای Sawada و همکاران، با استفاده از ایمنوژن ۶ همی سوکسینات مورفین متصل به BSA دوازده آنتی‌بادی منوکلونال علیه مورفین تهیه کردند. میزان افینیتی به دست آمده برای تولید آنتی‌بادی توسط آنها M^{-1} ۱۰^{۸}-۱۰^{۱۰} بود. همچنین آنتی‌بادی تولید آنها با کدیین واکنش متقاطع نشان داد(۱۲).

در مطالعه ای Li و همکاران آنتی بادی منوکلونال با صد درصد واکنش متقاطع با هرویین تهیه کردند(۱۳). Usagawa و همکاران موفق به ساخت ۶ آنتی‌بادی مونوکلونال علیه مشتق – N (4 آمینو بوتیل) نورمورفین متصل به BSA شدند. این آنتی‌بادی‌ها واکنش متقاطع ناچیزی با کدیین دارند. حساسیت الیزای رقابتی طراحی شده با یکی از این آنتی بادی ها تقریبا ۱۰۰ نانوگرم در میلی لیتر بدست آمده است(۱۴) در تحقیقی دیگر Yang و همکاران دوازده نوع آنتی‌بادی منوکلونال با دامنه افینیتی M^{-1} ۱۰^{۹}-۱۰^{۱۰} تهیه کردند. ایمونوژن بکار رفته مشتق ۶ مورفین همی سوکسینات متصل به BSA و اوآلبومین بود. حساسیت سنجش رقابتی به دست آمده با یکی از این کلون‌ها ۴۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر بود(۱۵).

در سنجش رقابتی غیرمستقیم (مشابه روش طراحی شده برای سنجش ویژگی آنتی‌بادی) حساسیت آنتی‌بادی تولیدی مطالعه حاضر در سرم ۲۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. با توجه به اینکه حساسیت کیت‌های سنجش مورفین در ادرار برای تشخیص اعتیاد ۳۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر می‌باشد، این میزان حساسیت برای اندازه‌گیری و یا تشخیص مورفین در ادرار مناسب است. در مطالعات مشابه دیگر آنتی‌بادی تولیدی علیه مورفین با مواد شبه مورفینی مانند هرویین نیز واکنش متقاطع داشتند که آنتی‌بادی تولید شده در مطالعه حاضر با هرویین هیچ واکنش متقاطعی نشان نداد که این نقطه قوت این مطالعه می‌باشد(۱۲،۱۵،۱۴).

در مجموع می‌توان گفت که آنتی‌بادی منوکلونال تولید در این مطالعه با پایداری مناسب، غلظت بالا، افینیتی و ویژگی قابل قبول می‌تواند در طراحی روش‌های سنجش ایمنی بکار گرفته شود.

References:

1- Sjøgren P, Thunedborg LP, Christrup L, Hansen SH, Franks J. ***Is development of hyperalgesia, allodynia and myoclonus related to morphine metabolism during long-term administration?: Six case histories.*** Acta Anaesthesiol Scand 1998; 42(9): 1070-5.

2- Kohler G, Milstein C. ***Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.*** Nature 1975; 256(5517): 495-7.

3- Spector S, Berkowitz B, Flynn EJ, Peskar B. ***Antibodies to morphine, barbiturates, and serotonin.*** Pharmacol Rev 1973; 25(2): 281-91.

4- Erlanger BF. ***Principles and methods for the preparation of drug protein conjugates for immunological studies.*** Pharmacol Rev 1973; 25(2): 271-80.

5- Dohmoto K, Hojo S, Fujita J, Yang Y, Ueda Y, Bandoh S, et al. ***The role of caspase 3 in producing cytokeratin 19 fragment (CYFRA21-1) in human lung cancer cell lines.*** Int J Cancer 2001; 91(4): 468-73.

6- Nielsen B, Roe J, Brochmann-Hanssen E. ***Oripavine--a new opium alkaloid. planta medical.*** J Med Plant Res 1983; 48(4): 205-6.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-07]

7- Pelletier SW. ***Alkaloids***: ***chemical and biological perspectives.*** Springer; 1996.

8- Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. ***Basic & clinical pharmacology: lange medical books.*** Toronto McGraw-Hill; 2001.

9- Hermanson GT. ***Bioconjugate techniques.*** London: Academic; 2008.

10- Apple RJ, Domen PL, Muckerheide A, Michael JG. ***Cationization of protein antigens. IV. Increased antigen uptake by antigen-presenting cells.*** J Immunol 1988; 140(10): 3290-5.

11- Hermanson GT. ***Bioconjugate techniques.*** Amsterdam: Academic Press; 2008.

12- Sawada J, Janejai N, Nagamatsu K, Terao T. ***Production and characterization of high-affinity monoclonal antibodies against morphine.*** Mol Immunol 1988; 25(9): 937-43.

13- Li L, Liu J, Zhu P, Xu JP, Fu N. ***Preparation of anti-morphine monoclonal antibodies with complete cross reactivity with heroin***. Di Jun Yi Da Xue Xue Bao.

14- Usagawa T, Itoh Y, Hifumi E, Takeyasu A, Nakahara Y, Uda T. ***Characterization of morphine-specific monoclonal antibodies showing minimal cross-reactivity with codeine.*** J Immunol Methods 1993; 157(1-2): 143-8.

15- Yang TB, Zhong P, Nie JL, Li JS, Qu LN, Li YH, et al. ***Preparation and identification of specific and high-affinity monoclonal antibodies against morphine.*** Hybridoma and Hybridomics 2002; 21(3): 197-201.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-07]

Production of Mouse Monoclonal Antibody against Morphine without Cross Reactivity with Heroin

Kashaninan S(MSc)[1], Paknejad M(PhD)[2], Shams A(PhD)[*3]

[1]*Department of Imonology, International Compus, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran*
[2]*Department of Biochemical, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[3]*Department of Imonology, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran*

Received: 29 Jan 2014 ***Accepted:*** 18 Sep 2014

Abstract

Introduction: Immunoassay procedures for detecting and determining opioids in blood and other biologic fluids are based on Monoclonal antibodies. In the present study, monoclonal antibody against Morphine was taken into account.

Methods: Hybridoma protocol was used in order to produce the monoclonal antibody against morphine in mice. For this purpose, five 6–8-week old female BALB/c mice were immunized with morphine C6-hemisuccinated derivative conjugated to cationized bovine serum albumin (cBSA). The spleens lymphocytes were fused with SP2/0 cells using polyethylene glycol (PEG). Hybridoma clones were subcloned by limiting dilution. Class and subclass of monoclonal antibody were determined using Roche isostrip test. Moreover, antibody was purified by protein G affinity chromatography and affinity was determined according to the method described by Beatty et al. Finally, the cross reaction of monoclonal antibody was determined with some structurally related molecules such as codeine and apomorphine.

Results: Among 3 hybridoma clones that reacted with the morphine-BSA, but not with BSA, after thrice limiting dilution, one stable hybridoma monoclon was obtained. The monoclonal antibody (MAb) was found to be of IgG_2b class and subclass and containing lambda light chain. The affinity of the MAb to morphine was obtained 2.8×10^9 M^{-1} by non competitive enzyme immunoassay. The titer of supernatant of cell culture medium was 1/400. The MAb was cross reacted with codeine (100%) and apomorphine (16.5%), though no reaction was observed with heroin, naloxone, naltrexone, and papavrin.

Conclusion: The study findings revealed that the produced antibody against morphine was comparable with other antibodies for specificity and affinity; therefore it is usable in design of diagnostic immunoassay in biologic fluids.

Keywords: cBSA; Monoclonal Antibody; Morphine

This paper should be cited as:
Kashaninan S, Paknejad M, Shams A. ***Production of mouse monoclonal antibody against morphine without cross reactivity with heroin***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2014; 22(5): 1577-85.

****Corresponding author: Tel: +98 35 38203682, Email: alis743@yahoo.com***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-07]