محمد اوجاقی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، دانشکده علوم و فناوری های نوین،
گروه علوم سلولی مولکولیMoojaghi89@gmail.com
دکترطاهره ناجی، مدیرگروه علوم سلولی مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی

تخلیص آنتی بادیIgG

آنتی بادی‌ها پروتیئن هایی است که در سامانه ی ایمنی در پاسخ به مولکول های خارجی (آنتی ژن ها) که وارد بدن می شوند، به وسیله ی سلول های B لنفوسیت ساخته می شود.(۱, ۲) آنتی بادی به دو روش مونوکلونال و پلی کلونال فرآوری و تخلیص می شود. پاسخ ایمونولوژیکی به یک آنتی ژن هتروژن است و منجر به تولید رده های مختلف لنفوسیت می شود. آنتی بادی تخلیص شده به این شکل را آنتی بادی پلی کلونال می نامند. آنتی بادی پلی کلونال به عنوان آنتی بادی ثانویه نشاندار در سنجش ایمنی مفید است.(۳) اگر یک لنفوسیت B منفرد یک نوع آنتی بادی را تولید و ترشح کند، آنتی بادی از یک کلون B-cell ترشح می شود و یکسان است و یک منبع هموژن از آنتی بادی اختصاصی را فراهم می آورد که آنتی بادی مونوکلونال نام دارد. لنفوسیت B از طحال یا گره لنفی جانوران ایمن به دست می آید، ولی نیمه عمر آنها محدود است و بدین روی نمی توانند به مقدار کافی آنتی بادی تولید کنند. این چالش با تولید هیبریدوما حل شده که در آن لنفوسیت B به دست آمده با سلول های myeloma "فیوز "شده و یک رده سلولی مونوکلونال را تولید می کند(۱).

زمانی که آنتی بادی مونوکلونال کشف شد، بسیاری گمان می کردند که کاربرد آنتی بادی پلی کلونال محدود است. برای جبران این کاستی، پژوهش هایی همواره در کار بوده است. پیشرفت های تازه در سنتز پپتید فاز جامد کاربردهای آنتی بادی پلی کلونال در جاهایی که قبلا منحصر به آنتی بادی مونوکلونال بود، افزایش یافت. این پیشرفت منجر به تولید آنتی بادی پلی کلونال mono specific شد. تخلیص آن با کروماتوگرافی تمایلی انجام می شود و از آنتی ژن های پپتید کوتاه به عنوان نماینده یک اپی توپ استفاده می شود. این پپتیدها برای تولید پاسخ ایمنی خیلی اختصاصی در حیوان میزبان و کمک به تشخیص در آزمایشگاه های بالینی استفاده می شوند.(۱)

استفاده از آنتی بادی پلی کلونال به عنوان پذیرنده آنتی بادی به این دلیل است که آنتی سرم پلی کلونال(با خصوصیت ناهمگن بودن) دسته ای از اپی توپ های آنتی ژنیک را شناسایی می کند. پس تغییر روی تعدادی اپی توپ قابل توجه نیست. تمایل پیوند آنها در طیف وسیعی قرار می گیرد که از کمتر از 10^{-6}M تا 10^{-9}M است.پیوند آنتی بادی پلی کلونال به آنتی ژن خود در طیف وسیعی از(۹-٤)PH و غلظت نمک ۰-۱ مولار پایدار است. برعکس، آنتی بادی مونوکلونال به این تغییرات بسیار حساس است. همچنین در اثر اتصال با پروتیئن دیگر، تغییرات بعد از ترجمه، دما، PH و غلظت نمک احتمالا شکل فضایی تغییر می کند.

در مورد آنتی بادی پلی کلونال تغییر شکل فضایی به دلیل اینکه اپی توپ های مختلفی را می شناسد، نگرانی خاصی به وجود نمی آورد. (٤, ٥) آنتی بادی پلی کلونال با ایمونیزه کردن حیوان مناسب که اغلب پستاندار است تولید می شود. آنتی ژن به همراه ادجوان مناسب به حیوان تزریق می شود. (۱)نقش ادجوان در افزایش تولید آنتی بادی است. (۱) سرم حاوی انواع آنتی بادی ها با تمایل اتصال مختلف است. مولکول های آنتی بادی را بر اساس تفاوت هایی در ساختار نواحی C به کلاس ها و زیر کلاس هایی تقسیم می کنند.(٦, ۷)

روش های تخلیص پروتیئن که برای آنتی بادی می توان استفاده کرد شامل: ته نشاندن با نمک، salt fraction، کروماتوگرافی تمایلی، کروماتوگرافی تعویض یونی، کروماتوگرافی الک مولکولی،کروماتوگرافی meta-chelate، کروماتوگرافی جذب سطحی است.(۸) IgG حدود ۷۰٪ کل ایمونوگلوبین های سرم را شامل می شود. این آنتی بادی قوی ترین آنتی توکسین است و بیشترین نیمه عمر را دارد و به گونه ی مونومر است به همین دلیل در پژوهش ها مورد توجه قرار گرفته است.(٦) یک تکنیک مشترک برای تخلیص پروتیئن ها ته نشاندن با نمک است.(۷, ۹)

برای ته نشاندن پروتیئن نامحلول، باید تعداد باندهای هیدروژنی بین حلال و پروتیئن کاهش یابد. علاوه بر این غلظت زیاد نمک آب را از پروتیئن حذف می کند. بنابراین باندهای هیدروژنی را کاهش می دهد

و پروتیئن با احتمال بیشـــتری رسوب می کند. Salting out پلی پپتیدها در غلظت بالای نمک رخ می دهد.(۹) .

IgG ســـرم می تواند با آمونیوم سولفات $(NH_4)_2SO_4$ یا کاپریلیک اسید ته نشین شود. رسوب دادن نمکی روشی ارزان برای تخلیص آنتی بادی اســـت. کنترل PH مهم است زیرا پروتیئن ها کمترین حلالیـــت را در نقطه ایزوالکتریک خودشـــان دارنـــد. (۷) بـــرای مطالعه یا شکســـتن انتخابی ایمنوگلوبین از Ab fragmentation اســـتفاده می کنند. این کار با پروتئازهایی انجام می شـــود. پروتیئن های مشخص ســـاختار پروتیئن ایمونوگلوبین را می شکند.(۱۰) IgG در مجاورت با آنزیم پاپائین بر بالای باندهای دی سولفیدی بر ناحیه لولا اثر کرده و IgG را به ۳ قطعه مجزا می شـــکند که در نهایـــت دو قطعه Fab و یک قطعه FC خواهیم داشـــت. (٦) اگر از پپســـین برای تجزیه IgG استفاده شود پروتئولیز در قسمت دیســـتال ناحیه لولا رخ میدهد. این آنزیم بر زیر باندهای دی ســـولفیدی اثر کرده و یـــک قطعه $F(ab)'_2$ با ناحیه لولا(که دو ظرفیتی اســـت) و تعدادی قطعه تکه تکه شده FC را ایجاد می کند.(٦) ME ۲ (مرکاپتواتانول) یا DDT (دی تیوتریتـــول) که یک آنزیم احیا کننده اســـت، می تواند باندهای دی ســـولفیدی را احیا کرده و آنها را باز کند.(۱۰) یکـــی از انواع کروماتوگرافی که در تخلیص آنتی بادی نقش دارد کروماتوگرافی تمایلی می باشـــد. که اســـاس آن تمایل اتصـــال پروتیئن و لیگاندی که بـــا ماتریکس کروماتوگرافی جفت شـــده اســـت، به یکدیگر اســـت.(۱۱) پروتیئن A,G و L ســـه پروتیئن اصلی باکتریایی اســـت که پروتیئن A از اســـتافیلوکوکوس اورئوس و پروتیئن G از استرپتوکوک با ســـفاروز جفت می شـــوند.(۱۱) که ویژگی اتصال به قطعه FC آنتـــی بادی را دارند. در حالیکـــه پروتیئن L از Pepto-streptococcus magnus ویژگـــی اتصـــال به آنتی بادی را از طریق زنجیره ســـبک کاپا دارد.(۱۱, ۱۲) محدودیت های کروماتوگرافی تمایلی : PH پایین در مرحله شستشـــو که به ساختار پروتیئن آســـیب می زند و اینکه ممکن است FC به جایگاه های دیگر IgG بچسبد.(۸)

به طور معمول گران تریـــن روش کروماتوگرافی ایمنی تمایلی از روش های اولیـــه تخلیص آنتی بادی مونوکلونال اســـت(۱۳) که خلـــوص بالا، محصـــول بالا، اســـتفاده از محلول هـــای فیزیولوژیک و همچنیـــن توانایی جدا کردن آنتی بـــادی مطلوب از ایمنوگلوبین هـــای دیگر و همچنین تخلیص antibody fragmentation (Fab,ScFv) را دارد. (۸, ١٤)

کروماتوگرافی تعویض یونی

در ایـــن روش مولکـــول ها بر اســـاس تفـــاوت بار جدا می شـــوند. پروتیئن های باردار بـــه ماتریکس با بار مخالف می چســـبد و می توانند بـــا تغییر PH یا افزایش غلظت نمک شســـته شـــوند. این کروماتوگرافی ظرفیت بالا، resolution بالا، محصول خوب و غلظت مناســـبی را برای ما فراهم می آورد و ارزان اســـت. هر دو تبادلگر آنیون و کاتیون می توانند برای تخلیص مونوکلونال های مختلف استفاده شـــوند. در قدیم گروه های یونیزان دی اتیـــل آمینو اتیل exchanger (anion) و کربوکســـی متیل (cation exchanger) CM اســـتفاده می شـــدند. امروزه گروه های اسیدی یا بازی مثل (quaternary aminoethyl) یـــا (sulfopropyl) رایج اســـت زیرا ظرفیت بالای در PH های متنوع دارند.(۸, ١٤) chromatography IMAC شـــامل واکنش یون فلزی با پروتیئن اســـت، اما یکی از کاربردهای رایج واکنش یونهای نیکل با دنباله هیستیدین است. این روش برای گرفتن انواع پروتیئن های نوترکیب که غنی از هیستیدین است، استفاده می شود. اما برای اکثر IgG های آنتی بادی هم استفاده می شود. زیرا تجمعی از رزیدوهایی که در اتصال دومین CH۲,CH۳ وجود دارد.

نیـــکل بـــه ماتریکـــس از طریق عامل شـــلاته کننده کربوکســـیلیک متصل شـــده و مـــی تواند با هیســـتیدین هماهنگ شـــده و کمپلکسی تشـــکیل دهد،(۸, ۹, ١٤) : size exclution chromatography یـــا gel filtration ویژگـــی هایی دارد که از ســـایر روش ها متمایز شـــده اســـت. کاربرد آنها به دلیـــل resolution و capacity کم محدود اســـت. جدا کردن آنها بر اساس سایز است. این روش رایج ترین روش در تخلیص IgM اســـت، که در بین پروتیئن های ســـرم بزرگ ترین است و به راحتی از مولکول های کوچک تر جدا می شود(۸, ١٤)

HIC روشی قدرتمند در تخلیص انواع بیومولکول ها است. ایمنوگلوبین ها در مقایسه با اکثریت آلاینده ها دومین های هیدروفوبیک دارند. این تکنیک به دلیل ســـختی در فهم اصول در بسیاری از شـــرکت ها یا مراکز تحقیقاتی رایج نیســـت و از واکنش بین گروه های هیدروفوبیک در نقطه تماس که آب خارج می شـــود، نتیجه می شـــود. قدرت

این نیرو به هیدروفوبیســـیتی پروتیئن و بستر وابسته است. در این مکانیسم بســـتر هیدروفوبیک ضعیف است و نیاز به غلظت بالای نمک برای اتصال دارند، اما elution به سادگی با کم کردن غلظت نمک به دســـت مـــی آید. از طرف دیگر بســـتر هیدروفوبیک (مثلا فنیل) به آنتی بادیها پیوندمی شود. اما برای شستشو نیاز به افزایش حلال های ارگانیک دارد که ستقیما با قسمت هیدروفوبیک واکنش می دهد. محدودیت اصلی این روش، امکان «دناتوراســـیون» آنتی بادی در محل واکنش اســـت، که شـــاید در بر گیرنده ی بخش مهمی از ســـاختار آنتی بادی است که بیشـــتر جایگاه پیوند آنتی ژن اســـت که در مرحله شستشو برعکس می شود، یا استفاده از ماتریکس هیدروفوب به حداقل می رسد(۸)

با توجه به طیف وسیع تکنیک ها انتخاب روش مناسب ممکن است دشوار باشد. ولی با توجه به کاربرد نهایی آنتی بادی مانند: خلوص بالا یا حـــذف آلاینده های مخصوص، مقدار تخلیص(هزینـــه بســـتر در مقیاس کم بی اهمیت اســـت اما در مقیـــاس صنعتی تخمین هزینه ضروری اســـت.) و تعداد batch هـــای مورد نیاز می توان روش مناســـبی را برگزید. بیشترین استفاده در کروماتوگرافی تمایلی پروتیئن A است.

برای تخلیص قطعات آنتی بادی هم روش های متنوع وجود دارد. اما رایج ترین آن ها تکه های F(ab’)۲ است که به پروتیئن A و G پیوند می شوند. نتایج کروماتوگرافی تمایلی، بسیار شگفت انگیز است. پیشنهاد استفاده از کروماتوگرافی size exclution هم داده شده است. برای نمونه، superdex ۲۰۰ جداسازی قابل قبولی از قطعات مطلوب IgG و پپتیدهایی با وزن مولکولی کم را می دهد(۸)

منابع

.1 Howard GC, Bethell DR. Basic methods in antibody production and characterization: CRC Press; 2000.

.2 Iwai S. Preparation of Oligodeoxyribonucleotides Containing the Pyrimidine (6–4) pyrimidone Photoproduct by Using a Dinucleotide Building Block. Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry. 2013:4.56. 1-4.. 18.

.3 Hanly WC, Artwohl JE, Bennett BT. Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. Ilar Journal. 1995;37(3):93-118.

.4 Barazesh A, Majidi J, FALAH E, JAMALI R, Ghazanchaei A, ABD AZJ. Production of Polyclonal antibody against Giardia lamblia in rabbit. 2007.

۵- Maneian M, Esfahani SHZ, Akbari M, Kha-nahmad H, Masjedi M, et al. مانیان م, تولید آنتی‌بادی پلی کلونال علیه مولکول هورمون رشد نوترکیب انسانی و تهیه‌ی کیت ELISA برای اندازه‌گیری آن و مقایسه‌ی برخی شاخص‌های ارزش تشخیصی کیت با نوع تجاری. مجله دانشکده پزشکی اصفهان.31(247):1173-84.

.6 Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology: with STUDENT CONSULT Online Access: Elsevier Health Sciences; 2.014

.7 company sc. guid to purification of polyclonal antibodies.

.8 Shepherd P, Dean CJ. Monoclonal antibodies: A practical approach: Oxford University Press; 2000.

.9 Hale JE, Beidler DE. Purification of humanized murine and murine monoclonal antibodies using immobilized metal-affinity chromatography. Analytical biochemistry. 1994;222(1):29-33.

.10 Andrew SM, Titus JA. Fragmentation of immunoglobulin G. Current Protocols in Cell Biology. 2003:16.4. 1-.4. 0.

.11 healthcare G. affinity chromatography principle and method.

.12 tf s. thermo science pierce antibody production and purification technical. hand book.

.13 Vljayalakshmi M. Antibody purification methods. Applied biochemistry and biotechnology. 1998;75(1):93-102.

.14 Low D, O’Leary R, Pujar NS. Future of antibody purification. Journal of Chromatography B. 2007;848(1):48-63.

مشاهده ماهنامه تشخیص آزمایشگاهی به صورت کلیپ صوتی وتصویری

ازین پس صفحاتی از ماهنامه را به صورت کلیپ تصویر ی مشاهده کنید. دراین شماره طرح مربوط به تصا ویرص ۱۱ و آگهی شرکت های آریا فارمد(روی جلد)، من ، شوکا زیست و آرینا حیات دانش بیش ازآن چیزی است که درتصویرچاپ شده می بینید. گوشی همراه خودراپس از نصب نرم افزار(واقعیت افزوده) ازسایت ماهنامه، روی آن تصاویرقرار دهیدو کلیپ مربوطه را مشاهده کنید.