جرجانی حکیم سید اسماعیل
مقاله پژوهشی

تولید آنتی بادی بر ضد IgG انسانی در خرگوش: مقایسه دو روش تزریق داخل ماهیچه ای و زیر جلدی

وحید حبیب زاده عمران[۱]، هادی رستگار پور[۱]، وحید فتاحی[۲]، دکتر مریم میترا علمی[۳]، دکتر حمید رضا نوری[٤]، دکتر امراله مصطفی زاده[۵*]

۱. دانشجوی علوم آزمایشگاهی، عضو کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی بابل
۲.عضو کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بابل
۳.عضو هیئت علمی گروه بیوفیزیک، دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل
٤.عضو هیئت علمی گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل
۵. عضو هیئت علمی گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

چکیده

زمینه و هدف: *آنتی هیومن IgG آنتی بادی است که علیه IgG انسان در حیوانات آزمایشگاهی مختلف تولید می شود. در این تحقیق سعی شده است تا علاوه بر ساخت آنتی هیومن IgG ، روش های مختلف تزریق آنتی ژن که منجر به تولید بهینه آنتی هیومن گلوبولین می شود مورد بررسی قرار گیرد.*

روش بررسی: *آنتی بادی توسط روش رسوب دهی با سدیم سولفات از سرم انسان جدا گردید و سپس توسط کروماتوگرافی تعویض یونی با ستون حاوی ژل DEAE Sepharose CL-۶B تخلیص گردید. IgG تخلیص شده با ادجوانت کامل فروند مخلوط شد و به یک گروه سه تایی از خرگوش ها از طریق داخل ماهیچه ای (I.M.) تزریق گردید. گروه دیگری از خرگوش ها آنتی ژن را بصورت زیر جلدی (S.C.) دریافت کردند. بعد از تزریق اول، هر هفته آنتی ژن همراه ادجوانت ناقص فروند نیز به حیوانات تزریق شد. میزان آنتی ژن تزریقی ۱/۲ میلی لیتر از IgG تخلیص شده با غلظت ۵۱۱µg/ml بود. خونگیری از ورید خرگوش ها بعمل آمد و میزان آنتی هیومن گلوبولین تولید شده توسط روش SRID مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته ها: *نتایج حاصل از آزمایش SRID نشان داد که قطر هاله ایجاد شده توسط کمپلکس آنتی ژن - آنتی بادی در پلیت حاوی آنتی هیومن GgI که آنتی ژن آن به روش داخل ماهیچه ای به خرگوش ها تزریق شده بود نسبت به روش زیر جلدی بطور معنی داری (P<۰/۰۵) بیشتر می باشد. غلظت آنتی بادی تولید شده بر ضد IgG در روش I.M. معادل ۸۳/۴ میکروگرم بر میلی لیتر و در روش C.S. معادل ۷۲/۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر ارزیابی شد.*

نتیجه گیری : *نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که روش تزریق داخل ماهیچه ای IgG انسانی برای تولید آنتی بادی ضد آن نسبت به روش زیر جلدی بسیار موثرتر است.*

کلید واژه ها: *آنتی هیومن IgG، تزریق IM، تزریق SC ، ایمونودیفیوژن شعاعی یک طرفه (SRID).*

*نویسنده مسئول: دکتر امراله مصطفی زاده
نشانی: گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، مازندران
تلفکس: ۰۱۱۱-۲۱۹۷۶۶۷

مقدمه:

IgG فراوان ترین ایمونوگلوبولین در خون انسان است و تقریبا ۷۵ درصد آنتی بادی های سرم را تشکیل می دهند. بنابراین سرم می تواند بعنوان منبع اولیه بسیار معمول برای جداسازیIgG باشد. IgG انسانی یک گلیکوپروتئین با وزن مولکولی تقریبا ۱۶۰ kDa است که می تواند برای سایر گونه های حیوانی از جمله خرگوش آنتی ژن محسوب شود. معمولا آنتی ژنهایی با وزن مولکولی بیشتر از ۱۰۰ kDa آنتی ژنهای بسیار قوی در نظر گرفته می شوند که خوبی می توانند سیستم ایمنی را درجهت پاسخ های اختصاصی تحریک کنند (۱-۲). آنتی هیومن IgG آنتی بادی است که بر ضدIgG انسان در حیوانات آزمایشگاهی مختلف ساخته می شود. این آنتی بادی کاربردهای گسترده ای در آزمایشگاه های تشخیص طبی از جمله تست کومبس رایت، کومبس مستقیم و غیرمستقیم، الایزا، تکنیک های ایمونوفلورسنس و غیره دارد (۳-۴). معمولا این آنتی بادیها از شرکت های خارجی خریداری و استفاده می شوند. از آنجایی که آنتی بادی های بدست آمده از جمعیت های مختلف در شاخص های آلوتایپی با هم متفاوت می باشند (۵-۶)، لذا دور از انتظار نیست که جمعیت ایرانی دارای شاخص های آلوتایپی متفاوتی با سایر جمعیت ها باشد. بنابراین از نظر واکنش های ایمونولوژیک بسیار ارزشمند است که آنتی هیومن IgG مورد استفاده در تست های آزمایشگاهی اختصاصیت بالایی بر علیه شاخص های آلوتایپی جمعیت ایرانی داشته باشد. علاوه بر این از نظر اقتصادی بسیار با اهمیت خواهد بود که روش های مختلف تولید این آنتی بادی ها در کشور مورد بررسی و مطالعه بیشتر قرار گیرد که در نهایت بتواند منجر به تولید وسیع این آنتی بادیها در داخل کشور شود.

از روش های پیشنهادی جهت بدست آوردن سطوح بالاتر آنتی بادی، تزریق زیر جلدی و داخل ماهیچه ای آنتی ژن است (۷). در روش تزریق داخل ماهیچه ای، آنتی ژن به سرعت توسط جریان خون و سیستم لنفاوی جذب می شود باعث انتشار پاسخ های التهابی می شود بنابراین روشی مناسب برای ورود داروهایی با وزن مولکولی پائین به حساب می آید. در این روش مولکول های بزرگتر به صورت اولیه توسط سیستم لنفاوی جذب می شوند.

مزیت این روش نسبت به سایر روش های تزریق آنتی ژن این است که میزان بیشتری از آنتی ژن را می توان به داخل ماهیچه تزریق کرد که باعث دوام پروسه جذب و انتشار فرآورده آنتی ژن- ادجوانت می شود. روش تزریق زیر جلدی به علت سهولت در تزریق بیشتر مورد استفاده قرار می گیرد. در این روش، میزان جذب آنتی ژن توسط سیستم لنفاوی در تزریق اولیه کمتر است و میزان جذب بستگی به جریان خون ناحیه تزریق و فعالیت ماهیچه های زیرین دارد. نواحی دارای پوست سست به وسیله افزایش سطح تماس، موجب انتشار بیش تر کمپلکس ادجوانت-آنتی ژن می شود. در صورتی که آنتی ژن به داخل گردش خون جذب شود احتمال تحریک واکنش های آنافیلاکتیک وجود دارد. یکی از نقاط ضعف این روش این است که واکنش های التهابی در بدن پخش می شوند و معمولا در مکان تزریق باقی نمی ماند (۸-۹).

هدف از انجام این طرح برداشتن گامی بیشتر در جهت خودکفایی کشور با صرف کمترین هزینه اقتصادی در جهت تولید آنتی هیومن آنتی بادی است. لذا در این تحقیق سعی شده است تا علاوه بر ساخت آنتی هیومن IgG، روش های مختلف تزریق آنتی ژن که می تواند منجر به تولید کارآمدتر آنتی هیومن گلوبولین شود مورد بررسی قرار گیرند.

روش بررسی:

۱- جداسازی آنتی بادی از سرم انسان به روش رسوب دهی

ابتدا از حداقل ۱۰ نفر فرد سالم خونگیری بعمل آمد و سرم آنها جدا شد. پس از آن، حداقل ۵ میلی لیتر(ml) از سرم هر فرد برداشته شد و با هم مخلوط گردید تا یک مخزن سرمی برای ادامه کار تهیه شود. IgG از سرم انسان به روش رسوب دهی با سدیم سولفات جدا شد که برای این جداسازی مراحل ذیل دنبال شد (۱۰). ابتدا سرم مورد نظر به دمای ۲۵ درجه سانتی گراد رسانده شد و به آن ۹ گرم سدیم سولفات اضافه شدکه محلول (w/v) ۱۸درصد حاصل شد. محلول حاصله به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد و سپس ۳۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰×g سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصله در ml ۲۵ آب مقطر حل شد و دمای آن نیز به ۲۵ درجه سانتی گراد رسانده شد و سپس به آن ۲/۲ گرم سدیم سولفات اضافه شد که محلول ۱۴درصد (w/v) به دست می آمد. محلول بدست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و سپس با شرایط قبلی سانتریفیوژ گردید. رسوب بدست آمده از این مرحله این بار در ml ۱۵ آب مقطر حل گردید

و در پایان برای حذف نمک و املاح اضافی از محلول پروتئینی مورد نظر، توسط فسفات سالین (PBS) ۱۵ میلی مولار دیالیز صورت گرفت. پروسه دیالیز با استفاده کیسه دیالیزی با Cut off حدود ۱۲ kDa شرکت Millipore و بکار بردن ۱۵۰۰ ml از بافر PBS هر ۴ ساعت یکبار حداقل ۴ مرتبه تکرار شد.

۲- تخلیص IgG با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی

برای تخلیص IgG های حاصل از روش رسوب دهی، کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از ژل DEAE Sepharose CL-B (شرکت سیگما - آمریکا) صورت گرفت. برای انجام این کار ابتدا ستون کروماتوگرافی با طول ۲۰ سانتی متر با استفاده از ژل DEAE Sepharose 6B-CL آماده شد و سپس با بافر فسفات ۰/۰۷ مولار و pH ۶/۳ کالیبره شد. در مرحله بعد نمونه حاصل از دیالیز مرحله قبلی به تدریج به ستون اضافه شد و پس از آن ستون با حداقل دو برابر حجم خودش به کمک بافر شروع کننده شستشو داده شد و فراکسیون های خروجی آن که شامل IgG بودند جمع آوری شدند. در پایان برای بررسی حضور IgG در فراکسیون های مذکور، جذب نوری آنها در ۲۸۰ نانومتر قرائت گردید (۱۱).

۳- بررسی حضور IgG با روش الکتروفورز

برای بررسی حضور IgG و درصد خلوص آن در فراکسیون های جمع آوری شده، الکتروفورز نمونه ها با روش معرفی شده توسط Laemmli و همکارانش انجام شد (۱۲). بطور خلاصه باید ذکر شود که از ژل جداکننده (Separating gel) ۱۵ درصد آکریل آماید استفاده شد و همچنین بافر نمونه (Sample buffer) جهت الکتروفورز حاوی سدیم دو دسیل سولفات (SDS) بود که روش الکتروفورز مورد نظر را به SDS-PAGE تبدیل می کرد. پس از الکتروفورز، ژل حاوی آکریل آماید- بیسآکریل آماید توسط نیترات نقره برای مشاهده بانده های پروتئینی مورد نظر رنگ آمیزی شد.

۴- فرایند ایمونیزاسیون حیوانات

پس از الکتروفورز، فراکسیون هایی که دارای خلوص بالایی از IgG بودند، انتخاب شدند و غلظت آنها تعیین گردید. برای حساس کردن خرگوش ها غلظت ۱۱۵ µg/ml از IgG آماده شد و با حجم مشابهی از ادجوانت کامل فروند به خوبی مخلوط گردید.

برای این مطالعه شش راس خرگوش نر (۲/۵-۱/۵ کیلوگرم) و از نژاد سفید نیوزیلندی انتخاب شدند و به صورت تصادفی به دو گروه سه تایی تقسیم شدند. گروه اول دوز ابتدایی ۱/۲ میلی لیتری از آنتی ژن تهیه شده با غلظت ۱۱۵ µg/ml همراه ادجوانت کامل فروند را بصورت I.M در شش ناحیه نزدیک به هم (هر ناحیه ۲۰۰ میکرولیتر) در ماهیچه پا دریافت کردند. گروه دوم نیز همین مقدار از آنتی ژن را بصورت S.C شش ناحیه نزدیک به هم در پشت گردن دریافت کردند. در مرحله بعدی ایمونیزاسیون، هرکدام از گروه های حساس شده همان مقدار از آنتی ژن که با ادجوانت ناقص فروند مخلوط شده بود را بصورت هفتگی به مدت ۴ هفته دیگر نیز دریافت کردند. یک هفته پس از هر تزریق، خونگیری از ورید گوش خرگوش بعمل آمده و جدا سازی سرم نیز صورت گرفت. سرم تهیه شده از حیوانات در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد تا مراحل بعدی آزمایشات ذخیره شد.

۵- بررسی تولید آنتی بادی تولید شده بر ضد IgG با روش SRID

برای اندازه گیری میزان آنتی بادی تولید شده بر علیه IgG انسانی در سرم خرگوش های حساس شده از روش SRID (Single Radial Immunodefussion) که یک روش نیمه کمی است استفاده شد (۱۳). برای این کار در ابتدا محلول آگاروز ۲ درصد با استفاده از بافر PBS در شرایط دمایی بالا تهیه شد و سپس دما را به حدود ۴۰ درجه سانتی گراد کاهش دادیم و در مرحله بعدی IgG تخلیص شده به پلیت حاوی آگاروز افزوده شد. پلیت مورد نظر را در یک مکان کاملا مسطح و در شرایط دمایی نسبتا پائین قرار می دهیم. پس از پلیمریزه شدن آگارز، چندین حفره با قطر مشابه در پلیت ایجاد شد. در پایان، به تعدادی از این حفرات آنتی هیومن گلوبولین انسانی استاندارد با غلظت مشخص در کنار نمونه های سرم جدا شده از خرگوش های حساس افزوده شد. پلیت مورد نظر به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت تا واکنش بین آنتی ژن-آنتی بادی بر اساس واکنش های پرسیپیتاسیون انجام گیرد. پس از مشاهده حلقه های رسوبی اطراف هرکدام از حفرات موجود در ژل، قطرهای مربوطه خوانده شد و بر اساس غلظت نمونه های استاندارد و قطر حلقه های رسوبی ایجاد شده یک نمودار استاندارد تهیه شد تا براساس آن غلظت آنتی بادی تولید شده در سرم خرگوشی مشخص گردد.

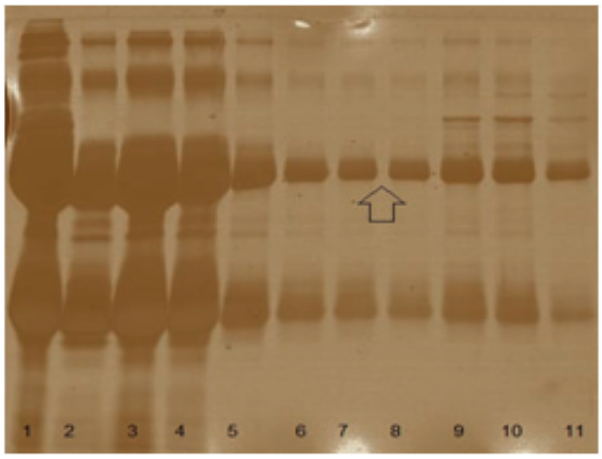
یافته ها:

۱- تخلیص IgG انسانی

پس از آنکه IgG به کمک سولفات سدیم بخوبی در نمونه سرم رسوب داده شد و سپس فرایند دیالیز در جهت خارج کردن مواد اضافی از محلول پروتئینی صورت گرفت، نمونه حاصل بر روی ستون ژل DEAE Sepharose CL-B بارگیری شد و با استفاده از بافر فسفات ستون شستشو داده شد و محتویات خروجی آن در حجم های ml ۱حداقل تا ml ۳۰ جمع آوری گردید. جذب نوری (OD) هر کدام از فراکسیون های جدا شده در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت گردید که نتایج آن در جدول شماره ۱ خلاصه شده است. علاوه بر این، برای بررسی خالص بودن IgG جدا شده در فراکشن های جمع آوری شده حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی، SDS-PAGE بر روی آنها صورت گرفت که نتایج آن در شکل-۱ گنجانده شده است. همانطور که در شکل نیز مشخص شده است دو مورد از فراکشن ها دارای IgG با خلوص بالایی نسبت به بقیه فراکشن ها بودند که از آنها بعنوان آنتی ژن برای حساس سازی حیوانات استفاده شد. با توجه به جذب های نوری به دست آمده، فراکسیون های شماره ۷ و ۸ با بشترین درجه خلوص با هم مخلوط گردیدند و غلظت نهایی IgG درآنها با توجه به ضریب خاموشی ۱/۳۶ بدست آمد که معادل ۱۱۵ g/mlμبود.

جدول-۱: جذب نوری فراکشن های جدا شده از کروماتوگرافی تعویض یونی

Fraction No.	OD ۲۸۰nm	Fraction No.	OD ۲۸۰nm	Fraction No.	OD ۲۸۰nm
۱	۲۰/۰۸	۱۱	۰/۰۹۰	۲۱	۰/۰۲۰
۲	۲۰/۰۷	۱۲	۰/۰۷۱	۲۲	۰/۰۱۸
۳	۲۰/۰۶	۱۳	۰/۰۵٤	۲۳	۰/۰۱۷
٤	۱/۰۷۵	۱٤	۰/۰٤۷	۲٤	۰/۰۱٦
٥	۱/۳۸۰	۱٥	۰/۰٤٦	۲٥	۰/۰۱٥
٦	۰/۲٦۰	۱٦	۰/۰۳۹	۲٦	۰/۰۱٤
۷	۰/۱٦۲	۱۷	۰/۰۳٤	۲۷	۰/۰۱٤
۸	۰/۱٥۱	۱۸	۰/۰۲۷	۲۸	۰/۰۱٤
۹	۰/۱۲۳	۱۹	۰/۰۲۱	۲۹	۰/۰۱۳
۱۰	۰/۱۱۳	۲۰	۰/۰۲۰	۳۰	۰/۰۱۳

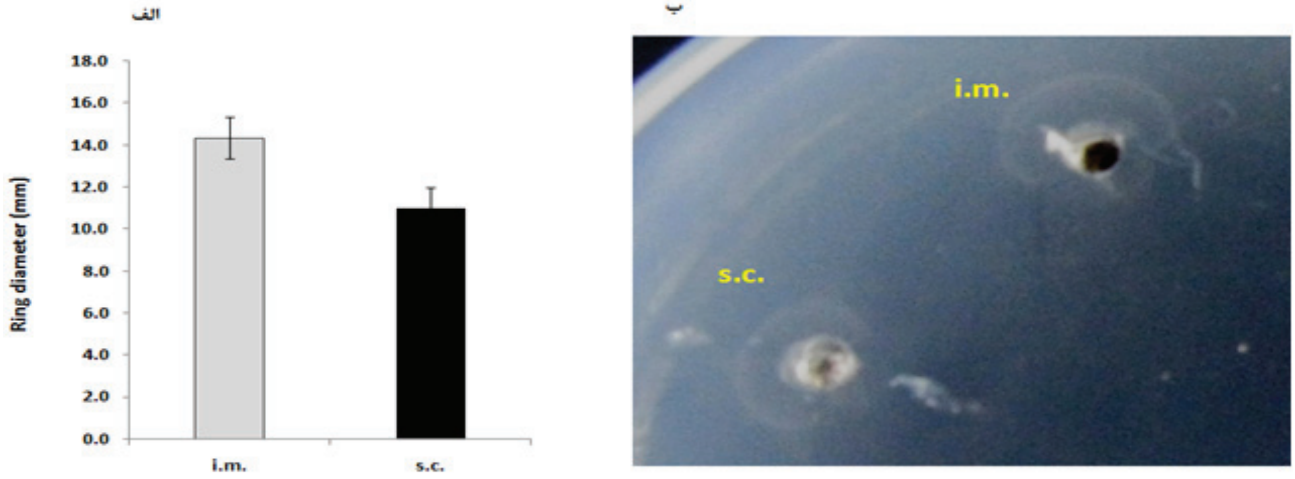


شکل۱) ژل پلی آکریل آماید رنگ آمیزی شده با نیترات نقره بعد از SDS-PAGE. لاین شماره ۱ نمونه سرمی است که فرایند تخلیص با کروماتوگرافی روی آن انجام نشده است (نمونه کنترل). برخی از فراکشن های جدا شده از کروماتوگرافی تعویض یونی از قبل فراکش شماره ۷ و ۸ همانطور که در ژل نیز مشخص است دارای خلوص بالاتری نسبت به سایر فراکشن ها بودند.

۲-تولید آنتی بادی بر ضد IgG انسانی در خرگوش به روش تزریق داخل ماهیچه ای

بعد از اینکه پلیت SRID تهیه شد و سرم های آماده شده از هرکدام از گروه ها که توسط دو روش متفاوت حساس شده بوند به چاهک های ایجاد شده در پلیت افزوده شدند، قطر حلقه رسوبی ایجاد شده بر حسب میلیمتر بعد از گذشت ۲۴ ساعت اندازه گیری شد. هر چند که این آزمایش هر هفته در طول مراحله ایمونیزاسیون انجام می شد اما همانطور که در شکل ۲- الف نیز آورده شده است نشان داده شد که بیشترین تیتر آنتی بادی در هفته ششم اتفاق افتاده است. نتایج حاصل از SRID نشان داد که روش I.M می تواند بطور معنی داری ($P<۰/۰۵$) نسبت به روش S.C در تولید آنتی بادی برعلیه IgG انسانی موفق تر عمل کند. شکل ۲- ب، نیز یکی از چاهک های پلیت SRID در پایان هفته ششم را به تصویر کشیده است که در آن بخوبی مشخص شده است که روش I.M میتواند نسبت به روش S.C در تولید آنتی بادی موفق تر عمل کند.

غلظت آنتی بادی تولید شده بر ضد IgG با توجه نمونه های استاندارد و رسم منحنی مربوطه سنجیده شد. با توجه به قطر هاله به دست آمده برای ۳ رقت متوالی از آنتی هیومن IgG با غلظت های ۲۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر که بعنوان استاندارد استفاده شده بود و قطر هاله ایجاد شده برای نمونه سرم در هفته ششم، غلظت آنتی بادی تولید شده در روش I.M معادل ۸۳/۴ میکروگرم بر میلی لیتر و در روش S.C معادل ۷۲/۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه گردید.



شکل ۲). بررسی حضور آنتی بادی بر علیه IgG در سرم خرگوش های شده.

الف) تزریق آنتی ژن بصورت I.M. در القای آنتی بادی موثرتر عمل کرده است. در هر گروه میانگین قطر هاله ایجاد شده برای سه نمونه به همراهSD آمده است که با استفاده از آزمونt-test مشخص گردید که میانگین قطر ایجاد شده در دو گروه دارای اختلاف معنی داری می باشد($P<0/05$). ب) پلیت SRID و مقایسه حلقه رسوبی ایجاد شده به دنبال تزریق عضلانی و زیرجلدی IgG انسانی به خرگوش

بحث و نتیجه گیری

سرم پلی کلونال را می توان از حیوانات ایمونیزه شده از قبیل خرگوش، بز یا گوسفند به دست آورد که شامل آنتی بادیهایی با ویژگیهای گوناگون برای اپی توپ های مختلف آنتی ژن می باشند (۱۴) ولی در گام نخست برای تولید آنتی بادیهای پلی کلونال بر علیه IgG انسانی نیازمند تهیه فراکسیون های غنی از IgG برای مرحله ایمونیزاسیون می باشیم. به دلیل تفاوت pH ایزوالکتریک ایمونوگلوبولین ها با سایر پروتئین های موجود در سرم، استفاده از تکنیک های کروماتوگرافی تعویض یونی روشی مناسب جهت جداسازی ایمونوگلوبولین ها می باشد (۱۵). در این پژوهش نیز به دلیل اینکه از بستر DEAE سفاروز استفاده شده است می تواند روش مناسبی جهت جداسازی IgG محسوب گردد. نتایج حاصل از جداسازی IgG از سرم تائید کننده این موضوع بود و نشان داده شد که IgG به میزان زیادی از سایر پروتئین های سرم قابل جداسازی می باشد. در اکثر مطالعات جهت بررسی خلوص محصول نهایی از SDS-PAGE استفاده می شود. در این مطالعه نیز بررسی خلوص نمونه های حاصل از کروماتوگرافی با استفاده از تکنیکSDS-PAGE نشان دادکه IgG در فراکسیون های ۷ و ۸ با خلوص بالایی به دست آمده است. همانطور که در شکل ۱ نیز مشخص شده بود ایمونوگلوبولین تخلیص شده در این فراکسیون ها فقط دو باند با وزن مولکولی ۲۷ و ۵۷ کیلو دالتون را ایجاد می کنند که می توان آنها را معادل زنجیره سبک و سنگین IgG در نظر گرفت.

بیش از ۷۰ سال است که از ادجوانت ها برای افزایش پاسخ های ایمنی نسبت به آنتی ژن در حیوانات استفاده می شود (۱۶).

از آنجائیکه ایمونوگلوبولین ها به فرم محلول وجود دارند، لذا برای پایداری آنها در بدن با ادجوانت مخلوط شده و بصورت زیرجلدی یا عضلانی به خرگوش تزریق گردیدند. جهت تحریک هر چه بیشتر سیستم ایمنی خرگوش و افزایش تیتر آنتی بادی تولیدی، تزریق اول با استفاده از ادجوانت فروند کامل و تزریق های یادآور بعدی با ادجوانت فروند ناقص انجام می شود (۱۷). ادجوانت فروند یک امولسیون آب در روغن است که آنتی ژن را در فاز مایع به کمک یک ماده امولسیون ساز وارد روغن پارافین سبک وزن می کند. به هنگام تزریق، این ماده باعث تولید و دوام آنتی بادیهای قوی می شود. این نوع ادجوانت، فروند ناقص نامیده می شود. اضافه کردن مایکوباکتریوم های مرده و خشک شده به فاز روغنی، ادجوانت فروند کامل را بوجود می آورد که می تواند ایمنی سلولی و هومورال راتحریک کند (۱۶). به منظور دستیابی به سرم غنی از آنتی ایمونوگلوبولین، خون گیری از خرگوش ها بعمل آمد و جهت ارزیابی آنتی ایمونوگلوبولین های بدست آمده تست انتشار شعاعی یک طرفه یا SRID انجام شد که در آن واکنش ناشی از آنتی ژن و آنتی بادی به صورت حلقه رسوبی نمایان می شود. نتایج تست SRID منجر به تشکیل یک حلقه رسوبی واضح ناشی از واکنش آنتی هیومن IgG تولید شده در خرگوش با IgG انسانی تخلیص شده گردید (شکل ۲- ب). آنالیز نتایج حاصل از تست SRID نشان داد که تزریق IgG انسانی به هر دو روش زیرجلدی و عضلانی به خوبی قادر به القای تولید آنتی بادیهای پلی کلونال می باشد، هر چند که مقایسه بین دو روش نشان داد که تزریق عضلانی می تواند نسبت به روش تزریق زیرجلدی آنتی ژن روش موثرتری برای تولید آنتی بادیهای پلی کلونال بر علیه IgG انسانی باشد.

مطالعات دیگری که در ایران نیز برای تولید آنتی بادی پلی کلونال بر علیه آنتی ژنهای مختلف از خرگوش استفاده شده بود نیز از تزریقات عضلانی یا زیر جلدی استفاده کرده بودند ولی در هیچکدام از آنها پتانسیل این دو روش برای تهیه آنتی بادی بر علیه آنتی ژنهای متفاوت مقایسه نشده بود. دکتر مجیدی و همکارانش آنتی بادی پلی کلونال بر علیه ایمونوگلوبولین های سگ، ژیاردیا لامبلیا و همچنین آنتی بادی بر علیه لنفوسیت های انسانی(ALG) تولید کرده بودند که در این مطالعات نشان داده بودند که تزریق آنتی ژن به صورت عضلانی یا زیرجلدی و یا داخل وریدی می تواند در تولید آنتی بادی موفق باشد (۱۸-۲۰).

هرچند که نتایج حاصل از تولید آنتی بادیهای پلی کلونال بر علیه IgG انسانی ما را تشویق به استفاده از روش تزریق داخل عضلانی برای تولید آنتی هیومن آنتی بادی حداقل در مورد حیواناتی مثل خرگوش می کند اما دلایل دیگری نیز می توان در جهت استفاده بیشتر این روش ذکر کرد.یکی از مزیت روش تزریق عضلانی این است که میزان بیش تری از آنتی ژن را می توان به داخل ماهیچه تزریق کرد.

در پایان نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که روش تزریق داخل ماهیچه ای IgG انسانی برای تولید آنتی بادی ضد آن نسبت به روش زیر جلدی بسیار موثرتر می باشد.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر، حاصل یک طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی بابل است، لذا نگارندگان مراتب قدردانی خویش را از زحمات مدیریت و کارشناسان آن مرکز اعلام می دارند.

References:

1.Cohen S, Milstein C: Structure and biological properties of immunoglobulins. Adv Immunol 1967; 7:1-89.
2.Norberg R: The immunoglobulin content of normal serum. Acta Med Scand 1967;181(4):485- 96.
3.Hancock DC, O'Reilly NJ: Production of polyclonal antibodies in rabbits. Methods Mol Biol 2005; 295:27-40.
4.Leenaars M, Hendriksen CF: Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. ILAR J 2005; 46(3):269-279.
5.Grubb R: Advances in human immunoglobulin allotypes. Exp Clin Immunogenet 1995; 12(3):191-197.
6.Jefferis R, Lefranc MP: Human immunoglobulin allotypes: possible implications for immunogenicity. MAbs 2009; 1(4):332-338.
7.Hendriksen C, Hau J: Production of polyclonal and monoclonal antibodies. In: Handbook of Laboratory Animal Science. 2 edn edn: Boca Raton; 2003: 391-411.
8.Nakazawa M, Mukumoto M, Miyatake K: Production and purification of polyclonal antibodies. Methods Mol Biol 2010, 657:63-74.
9.Sonezaki I: [Effect of injection route and adjuvant ratio in antigen emulsion on antibody production]. Hokkaido Igaku Zasshi 1986, 61(2):235-243.
10.Baines M, Thorp R: Purification of Immunoglobulin G (IgG). In: Immunochemichal Protocols. Edited by Manson M. Totowa: The Humana Press, Inc., ; 1992: 79-103.
11.Delves P: protein concentration by uv absorbance. In: Antibody Applications: Essential Techniques. John Wiley & Sons Ltd; 1995: 16-17.
12.Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970, 227(5259):680-685.
13.Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry 1965, 2(3):235-254.
14.Hanly WC, Artwohl JE, Bennett BT: Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry. ILAR J 1995, 37(3):93-118.
15.Grodzki AC, Berenstein E: Antibody purification: ion-exchange chromatography. Methods Mol Biol 2010, 588:27-32.
16.Stills HF, Jr.: Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. ILAR J 2005, 46(3):280-293.
17.Halliday LC, Artwohl JE, Hanly WC, Bunte RM, Bennett BT: Physiologic and behavioral assessment of rabbits immunized with Freund's complete adjuvant. Contemp Top Lab Anim Sci 2000, 39(5):8-13.
18.Barazesh A, Madjidi J, Fallah E, Jamali R, Ghazanchaei A, Abdolalizadeh J: Prodution of Polyclonal Antibody Against Giardia Lamblia in Rabbit Journal of Ilam University of Medical Sciences 2006, 14(4):26-32.
19.Majidi J, Pourtaghi H: Production of polyclonal antibody against dog immunoglobulin in rabitt. Pharmaceutical Sciences 1383, 2:7-12.
20.Majidi J, Abolfazlzadeh H, Bannazadeh A, Khameneh HJ, Baiaz B, Hanafi F, Majidi S: Production and Purification of Polyclonal Antibodies Against Human Lymphocytes (ALG). Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences 2007, 28(4):19.
21.Johansson EL, Bergquist C, Edebo A, Johansson C, Svennerholm AM: Comparison of different routes of vaccination for eliciting antibody responses in the human stomach. Vaccine 2004, 22(8):984-990.

جرجانی حکیم سید اسماعیل
Original Article

Anti-human immunoglobulin G antibody production in rabbits: Comparison of intramuscular and subcutaneous methods

Habibzadeh-Omran V[1], Rastgarpoor H[1], Fatahi V[2], Mitra-Alami M[3] (PhD), Noori HR[4] (PhD), Mostafazadeh A[5*] (PhD)

1.Student of Laboratory Sciences, Student Research Committee, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
2.Student Research Committee, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
3.PhD, Faculty Member, Department of Biophysics, School of Paramedicine , Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
4.PhD, Faculty Member, Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
5.PhD, Faculty Member, Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

Abstract

Background and objectives: Anti-human immunoglobulin G (IgG) antibody is produced against human IgG in various laboratory animals. The present study tried not only to produce anti-human IgG, but also to assess different antigen injection techniques leading to optimal production of anti-human globulin.

Methods: The antibody was separated from human serum using precipitation method with sodium sulfate. It was then purified through diethylaminoethyl Sepharose CL-6B ion exchange chromatography. The purified IgG was mixed with Freund's complete adjuvant and injected to two trios of rabbits either intramuscularly or subcutaneously. After the first injection, the animals received weekly injections of antigen with Freund's incomplete adjuvant. The dose of antigen in each injection was 1.2 ml of purified IgG with a concentration of 115 µg/ml. Venous blood samples were taken from all rabbits and the produced anti-human globulin was evaluated by single radial immunodiffusion (SRID).

Results: According to the results of SRID, the diameter of the halo created by the antigen-antibody complex was significantly higher in the plate containing anti-human IgG produced after the intramuscular injections than after subcutaneous injections. The concentrations of anti IgG antibody were 83.40 and 72.28 µg/ml in intramuscular and subcutaneous methods, respectively.

Conclusion: Our findings suggested that compared to subcutaneous injections, intramuscular injections of human IgG are significantly more effective in inducing the production of anti-human IgG antibody.

Keywords: Anti-Human IgG, Intramuscular Injection, Subcutaneous Injection, Single Radial Immunodiffusion (SRID).

*Corresponding Author: Amrollah Mostafazadeh (PhD)
Address: Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
Phone/Fax: +98 111 219 7667