Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

A simple method for purification of mouse igg2a by ion exchange and affinity chromatography

Zahra Moradi Nebrin[1], Jafar Majidi[2*], Leili Aghebati Maleki[2], Tohid Kazemi[2], Jalal Abdolalizadeh[3], Somayeh Dadashi[2], Sadeg Eivazi[2], Majid Ahmadi[2], Naeemeh Majidi Zolbanin[4]

[1]International University of Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2]Departments of Immunology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[3]Immunology Laboratory, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz-Iran
[4]Pharmacology Departments, School of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
*Corresponding author; E-mail: Majidij@Tbzmed.ac.ir

Received: 2 August 2015 Accepted: 4 November 2015 First Published online: 9 December 2017
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 February-March; 39(6):74-80

Abstract

Background: Purified mouse IgG2a (a product that could be used in medical research) subclass could be used for animal immunization to production of polyclonal Antibody and to obtain hybridomas in Monoclonal Antibody Production Procedures. The goal of this study was to purify the mouse IgG2a.

Methods: In one step, Ion exchange chromatography was carried out for purification of mouse IgG and then in second step, ProA affinity chromatography was used for IgG2a purification .The chosen method for determination of purity was reduced and non-reduced SDS-PAGE. ELISA method was used for titer and isotype determination.

Results: Mouse Igs with a protein concentration of 27mg/ml (volume: 3CC) was applied on Ion exchange column. Purification by Ion exchange chromatography yielded about 28mg of mouse IgG. Eight mg mouse IgG2a was obtained by ProA affinity chromatography. In reduced SDS-PAGE analysis of purified antibody, two bands were seen in 25& 50 KDa MW positions. Isotype determination of purified mouse IgG2a with mouse isotyping Kit showed the presence of mouse IgG2a isotype with a kappa light chain in related fraction.

Conclusion: Purified mouse IgG2a subclass was obtained with purity more than 95%. Due to the obtained high purity we concluded that Ion exchange chromatography following by ProA affinity chromatography could be a suitable method for purification of mouse IgG subclasses with high quality. Our product is an economical and suitable product that takes a step towards self-sufficiency of the country.

Keywords: Affinity chromatography, IgG, MouseIgG2a, ProA, Ion exchange chromatography

How to cite this article: Moradi Nebrin Z, Majidi J, Aghebati Maleki L, Kazemi T, Abdolalizadeh J, Dadashi S, Eivazi S, Ahmadi M, Majidi Zolbanin N. [A simple method for purification of mouse igg2a by ion exchange and affinity chromatography]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 February-March;39(6):74-80. Persian.

© 2018 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

روشی ساده برای تخلیص ساب کلاس IgG2a موشی با کمک کروماتوگرافی تعویض یونی و افینیتی کروماتوگرافی

زهرا مرادی نبرین[۱]، جعفر مجیدی[۲]، لیلی عاقبتی ملکی[۲]، توحید کاظمی[۲]، جلال عبدالعلی زاده[۳]، سمیه داداشی[۲]، صادق عیوضی[۲]، مجید احمدی[۲]، نعیمه مجیدی ذوالبنین[۴]

[۱] شعبه ارس دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۲] گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۳] آزمایشگاه ایمونولوژی مرکز تحقیقات دارویی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۴] گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[*] ایمیل؛ نویسنده رابط: Majidij@Tbzmed.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۴/۵/۱۱ پذیرش: ۱۳۹۴/۸/۱۳ انتشار برخط: ۱۳۹۶/۹/۱۸
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. بهمن و اسفند ۱۳۹۶؛ ۳۹(۶): ۷۴-۸۰

چکیده

زمینه: هدف از این مطالعه تخلیص ساب کلاس IgG2a موش می باشد محصولی که برای ایمونیزاسیون حیوانات دیگر جهت تولید هیبریدوماها در پروسه تولید آنتی بادیهای مونو کلونال و تولید آنتی بادیهای پلی کلونال به کار می‌رود.

روش کار: در قدم نخست کروماتوگرافی تعویض یونی (Ion exchange chromatography) برای تخلیص IgG موش و در مرحله بعد افینیتی کروماتوگرافی با پروتئین A (ProA) برای تخلیص ساب کلاس IgG2a موش به کار برده شد. بعد از هر مرحله تخلیص روش الکتروفورز SDS-PAGE برای تایید خالص سازی به کار رفت. در مرحله آخر تایید ساب کلاس آنتی بادی خالص شده با کمک کیت تعیین ایزوتایپ صورت گرفت.

یافته ها: رسوب ایمونوگلوبولین های موشی با غلظت ۲۷ mg/ml به مقدار ۳ سی سی روی ستون افینیتی کروماتوگرافی Ion exchange برده شد. مقدار محصول IgG از ستون تعویض یونی (Ion exchange) ۲۸ میلی گرم و مقدار محصول IgG2a ستونProA ، ۸ میلی گرم بود. در نتایج الکتروفورز SDS-PAGE در حالت احیا دو باند در موقعیت وزن مولکولی ۲۵ و ۵۰ کیلودالتون(KDa) مشاهده شد. تعیین ایزوتایپ محصول به دست آمده وجود IgG2a با زنجیره سبک کاپا را تایید کرد.

نتیجه گیری: در این مطالعه محصول IgG2a با خلوص بالای ۹۵٪ به دست آمد. خلوص بالای محصول به دست آمده نشان می‌دهد که کروماتوگرافی تعویض یونی و به دنبال آن کروماتوگرافی با ProA روش مناسبی برای تخلیص ساب کلاسهای IgG موش با کیفیت و خلوص بالا می‌باشد. تولید این محصول مناسب و اقتصادی با درجه خلوص بالا قدمی به سوی استقلال کشور است.

کلید واژه ها : افینیتی کروماتوگرافی، IgG، IgG2a موشی، پروتئین A ، کروماتوگرافی تعویض یونی

نحوه استناد به این مقاله: مرادی نبرین ز، مجیدی ج ، عاقبتی ملکی ل، کاظمی ت، عبدالعلی زاده ج، داداشی س، عیوضی ص، احمدی م، مجیدی ذوالبنین ن. روشی ساده برای تخلیص ساب کلاس IgG2a موشی با کمک کروماتوگرافی تعویض یونی و افینیتی کروماتوگرافی. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۶؛ ۳۹(۶): ۷۴-۸۰

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

آنتی بادیها گلیکوپروتئین های محلولی هستند که برای تحقیق و آزمایش در اکثر زمینه های پزشکی و بیوتکنولوژی به کار برده شده‌اند. محصولات دارای درجه خلوص بالای آنتی بادیها در موارد متعدد برای حل مشکل در زمینه ایمونولوژی به کار می‌روند (۳-۱). کروماتوگرافی تعویض یونی سالهای طولانی برای تخلیص آنتی بادی به کار رفته است و بسته به بارالکترونی فاز ثابت دو روش تعویض یونی آنیونی و کاتیونی وجود دارد (۴). این روش به خاطر ظرفیت اتصال بالا و هزینه کم آن برای تخلیص پروتئین ها به کار می رود (۲). امروزه تخلیص آنتی بادی بیشتر با روش افینیتی کروماتوگرافی صورت می‌گیرد (۷-۵). افینیتی کروماتوگرافی مزیتهای زیادی دارد. چون روشی سریع و انتخابی برای به دست آوردن مقدار زیادی از پروتئین هاست و در اکثر موارد در همان مراحل اول تخلیص مورد استفاده قرار می‌گیرد (۸). افینیتی کروماتوگرافی با ProA یکی از سریع ترین روشها برای تخلیص آنتی بادیهاست که افینیتی بالایی برای اتصال به نواحی FC ایمونوگلوبولین های گونه های مختلف دارد (۹). ProA پروتئین دیواره سلولی باکتری Staphylococcus aureus است که نخستین بار توسط Verwey در سال ۱۹۴۰استخراج شد. این پروتئین با میل بالایی به IgG2a وIgG2b موش متصل می‌شود(۱۰،۱۱) و بالای ۸۰٪ از پروتئینهای مورد نظر موجود را استخراج کرده و در یک مرحله کار خلوص بالای ۹۹/۵٪ تولید می‌کند. در آزمایشگاه محل کار ما Aghebati و همکاران در سال ۲۰۱۳ و Eivazi و همکاران در سال۲۰۱۴ بعد از تخلیص با ProA محصولی با درجه خلوص مناسب به دست آوردند (۱۴-۱۲). هدف ما از این کار تخلیص ساب کلاس IgG2a موش می‌باشد. این محصول به طور گسترده به عنوان ایمونوژن برای ایمونیزاسیون حیوانات دیگر و برای ارزیابی تولید آنتی بادی در کیت الیزا کاربرد دارد. همچنین این محصول در روش افینیتی کروماتوگرافی با واسطه آنتی بادیها و در روش ایمونوادزوربشن immunosorbent برای خارج کردن آنتی بادیهای دارای کراس ری اکتیویتی به کار می‌رود (۵).

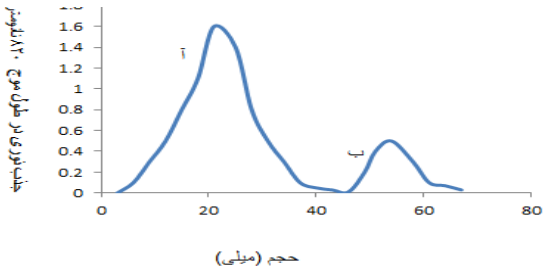
روش کار

از ۵۰ عدد موش Balb/c تحت بیهوشی با کتامین خونگیری انجام شد. سرم پولد خونهای جمع آوری شده جدا شده و سانتریفوژ (۱۵min،۱۵۰۰g) گردید. در همه مراحل کار غلظت پروتئین به کمک اسپکتوفتومتر (UV spectrophotometer) (pharmacia biotech) در ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد. بعد از اندازه گیری غلظت پروتئین سرم با بافر فسفات (PBS) در pH: ۷/۲ به نسبت ۱ به ۱ رقیق شد و ایمونوگلوبولین ها با نسبت مساوی از آمونیوم سولفات اشباع که به صورت قطره قطره روی Stirr به محلول اضافه شد رسوب داده شدند. بعد از سانتریفوژ، رسوب حاصل دو بار با محلول آمونیوم سولفات ۵۰٪ شست و شو داده و سانتریفوژ شد. رسوب نهایی درCC ۱/۵از بافرPBS حل شده و دوباره علیه بافر PBS (pH۷/۲) دیالیز انجام شد (۱۵). سپس رسوب پروتئینی دیالیز شده برای خالص سازی به ستون کروماتوگرافی تعویض یونی (pharmacia) باحجم 5 ml وارد شد. این ستون با بستر diethylaminoethyl (DEAE)-Sepharose در آزمایشگاه ساخته شد. و مقدار محلول عبور کننده از ستون در عرض یک دقیقه (Flow-rate)، (ml/min) ۰/۲۵ بود. بافر Equilibration (به تعادل رساندن ستون به طوریکه pH محلول ورودی به ستون با pH محلول خروجی برابر باشد) بافر تریس فسفات pH: ۸.۱ بود. Washing ستون (شستن آنتی بادیهای متصل نشده به ستون) در دو مرحله صورت گرفت که مرحله اول با بافر تریس فسفات pH: ۸.۱ و مرحله دوم با بافر تریس فسفات حاوی ۱۰۰ mM کلریدسدیم انجام شد. محلول جمع آوری شده از ستون در فراکشن هایی به حجم ml ۵ با هم مخلوط شد. روش انتخاب شده برای تایید خلوص محصول ستون روش الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات- پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) در حالت احیا (در یک اتاقک به صورت عمودی) بود. سپس محلول همه لوله ها مخلوط و با آمونیوم سولفات اشباع رسوب داده شد. رسوب حاصل در CC ۱/۵ از محلول PBS حل شده و بعد از دیالیز وارد ستون کروماتوگرافی با (pharmacia) ProA گردید. ابتدا ستون با محلول PBS با pH:۷/۲ شست و شو داده شده و سپس رسوب آنتی بادی تهیه شده در ستون لود شد. در قدم نخست IgG1 با محلول سدیم فسفات M ۰/۱ در pH: ۶، سپس IgG2a با بافر سیترات M ۰/۱ در pH: ۴/۵ از ستون جدا شدند. Flow-rate به کار رفته در این مرحلهml/min ۰/۵ بود. به این ترتیب IgG2a از بقیه آنتی بادیها جدا شد. برای تایید خلوص محصول ستون روش الکتروفورز SDS-PAGE در حالت احیا دوباره به کار رفت که همانند مرحله اول محلول پلی آکریل آمید باغلظت ۱۲٪ به کار برده شد. نمونه های آنتی بادی آماده شده با (Merck, Germany) ۲٪ SDS به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شده و سپس در هر ول به مقدار ۰/۲ میکروگرم لود شد. بعد از اتمام فرایند الکتروفورز و جداسازی آنتی بادیها، پروتئین های روی ژل با رنگ کوماسی بلو (Coomassie Brilliant Blue G 250) رنگ آمیزی گردید. بعد از تایید خلوص آنتی بادی باید حضور ساب کلاس مورد نظر در محصول به دست آمده تایید شود که این مرحله به کمک کیت تعیین ایزوتایپ الیزا (Thermo, USA) انجام شد. در این کیت چاهک های پلیت الیزا (ELISA: Enzyme linked Immunosorbent Assay) از قبل با آنتی بادی علیه زنجیره های سنگین آنتی بادیهای IgG1 ،IgG2a ،IgG2b ،IgG3 ،IgM ،IgA و آنتی بادی علیه زنجیره سبک کاپا (kappa) و لامبدا (lambda)

پوشانده شده بود. ابتدا مقدار ۵۰ میکرولیتر (µl) از IgG2a موشی تخلیص شده و سپس ۵۰ µl ازآنتی بادی ضد موشی کونژوگه با آنزیم HRP (HRP conjugated anti-mouse IgG) به ترتیب به هر ول اضافه شده و پلیت در دمای اتاق به مدت یک ساعت انکوبه شد. بعد از سه بار شست و شو ۷۵ µl از سوبسترای ترا متیل بنزیدین TMB به ولها اضافه گردید و پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در یک اتاقک تاریک انکوبه شد. سپس فرایند با اضافه کردن ۷۵ µl از محلول ۵٪ سولفوریک اسید متوقف شد. مقدار جذب نوری هر یک از ولها با ELISA Reader (STAT FAX 303+) در طول موج ۴۵۰ nm ثبت شد (۱۶).

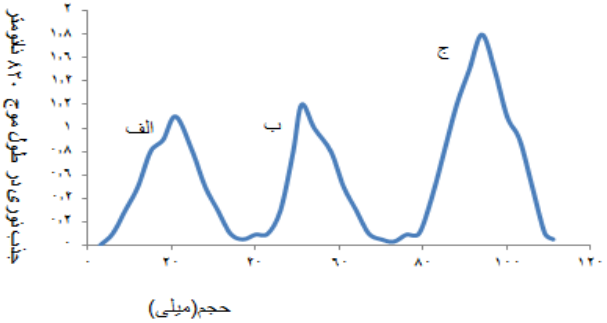
یافته ها

در این مطالعه منبع استخراج آنتی بادی سرم موشی بود که طی کروماتوگرافی تعویض یونی و سپس افینیتی کروماتوگرافی با ProA، ساب کلاس IgG2a از آن جدا شد. غلظت پروتئین سرم موش ۳۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر (mg/ml) و حجم آن ۳ سی سی بود که بعد از رسوب با آمونیوم سولفات مقدار ۳ سی سی با غلظت پروتئین ۲۷ mg/ml وارد ستون Ion exchange شد که در نهایت محصول تخلیص با این ستون ۲۸ mg از IgG موشی بود. الگوی کروماتوگرافی با ستون Ion exchange در شکل ۱ نشان داده شده است. در قدم نخست IgG توسط بافر تریس فسفات (pH: ۸.۱) از ستون خارج شده (آ) و سپس سایر پروتئین ها با بافر تریس فسفات حاوی ۱۰۰mM کلرید سدیم از ستون جدا شدند(ب).



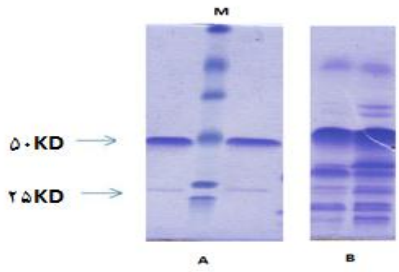
شکل ۱:تخلیص IgG موشی با روش کروماتوگرافی تعویض یونی

غلظت پروتئین (OD_{280}) نمونه لود شده در ستون کروماتوگرافی ProA، ۱۴mg/ml و حجم آن ۲CC بود که بعد از انجام کروماتوگرافیCC ۲ از IgG2a با غلظت ۴mg/ml حاصل شد. مراحل جداسازی آنتی بادیها از ستون ProA در شکل ۲ به صورت شماتیک نشان داده شده است. در این شکل پیک نخست (آ) جداسازی IgG3 و IgG هایی از ساب کلاس های دیگر که به ستون متصل نشده است را نشان می‌دهد. پیک دوم (ب) و پیک سوم (ج) به ترتیب نشان دهنده جداسازی IgG1 با بافر فسفات در pH:۶ و IgG2a با بافر سیترات سدیم در pH: ۴/۵ می‌باشند.

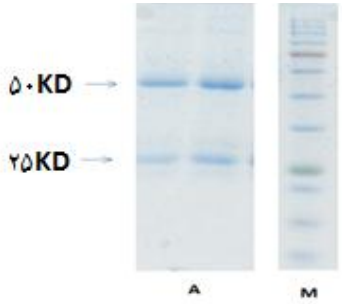


شکل ۲: جداسازی مرحله به مرحله ساب کلاس های IgG موشی از ستون ProA الف: جداسازیIgG3 و مواد متصل نشده به ستون با بافر PBSدر pH:۷/۲ ب: جدا سازی IgG1 از ستون با بافر سدیم فسفات در pH:۶ ج: جداسازی IgG2a با بافر سدیم سیترات در pH ۴/۵

در نتایج SDS-PAGE برای بررسی خلوص IgG حاصل از ستون تعویض یونی و IgG2a تخلیص شده با ستون ProA در حالت احیا یک باند مشخص در موقعیت وزن مولکولی ۵۰ KDa که مربوط به زنجیره سنگین IgG می‌باشد (شکل ۳و۴). درشکل ۳.A یک باند در موقعیت وزن مولکولی ۲۵KD که مربوط به زنجیره سبک IgG می‌باشد مشاهده شد. چند باند بسیار نزدیک به هم در موقعیت وزن مولکولی ۳۰-۲۵ KDa که مربوط به زنجیره سبکIgG2a می‌باشد در شکل ۴.A قابل مشاهده بود. وجود باندهای چندگانه دراین موقعیت ممکن است مربوط به دگلیکوزیلاسیون زنجیره های پروتئینی آنتی بادی در مراحل کار باشد.



شکل۳: نتایج SDS-PAGE آنتی بادی تخلیص شده با ستون کروماتوگرافی تعویض یونی



شکل۴: نتایج SDS-PAGE در شرایط احیا A; ساب کلاس IgG2a تخلیص شده با ستون کروماتوگرافی ProA :M مارکر با وزن مولکولی پایین

جدول ۱: نتایج تعیین ایزوتایپ ساب کلاس تخلیص شده در طول موج ۴۵۰nm

آنتی بادی از پیش کوت شده	Anti IgG1	Anti IgG2a	Anti IgG2b	Anti IgG3	Anti IgA	Anti IgM	Anti-Kappa	Anti-lambda
جذب نوری	۰/۱۱	۱/۷۴	۰/۱۶	۰/۱۳	۰/۱۱	۰/۱۳	۱/۸۵	۰/۱۵

نتایج تعیین ایزوتایپ آنتی بادی تخلیص شده که به وسیله کیت الیزای تعیین ایزوتایپ موشی انجام شد در جدول ۱ نشان داده شده است. طبق آنچه در نتایج مشخص است IgG2a تخلیص شده با Anti IgG2a (۱/۷۴) و با Anti-kappa chain (۱/۸۵) بالاترین جذب را نشان داد.

بحث

سرم موش و پستانداران دیگر منبع اقتصادی و مناسبی از آنتی بادیهاست که به طور گسترده برای اهداف تشخیص و درمان به کار می‌رود (۱۷). در سال ۱۹۷۹ RAYMOND Cet و همکاران ساب کلاس های IgG را از سرم بز و در سال ۱۹۸۹ J. Rousseaux و همکاران با روش کروماتوگرافی با ProA ساب کلاسها را از سرم رت جدا کردند (۱۹–۱۸). از وقتی که آنتی بادیها برای اهداف درمانی به کار رفته اند مطالعه روی موش نیز به منظور بررسی میزان تاثیر گذاری آنتی بادیها در درمان بیشتر از قبل مورد توجه قرار گرفته است (۲۲–۲۰). سرم موش در حالت عادی دارای مقدار قابل توجهی از ساب کلاس های IgG1، IgG2a، IgG2b و مقدار کمی از IgG3 می‌باشد.

در این مطالعه IgG موشی به کمک روش کروماتوگرافی تعویض یونی با درجه خلوص بالا به دست آمد. تخلیص پروتئین ها با این روش به pH و نوع بافر، قدرت یونی و flow rate فاز متحرک، بار موجود در فاز ثابت ستون و خصوصیات ذاتی پروتئین ها بستگی دارد. با تغییر یک یا همه این موارد در مرحله Elution می‌توان پروتئینهای متصل شده به فاز ثابت را به ترتیب قدرت اتصال انها به ستون به دست آورد که بهترین حالت تغییر قدرت یونی فاز متحرک و ایجاد یونهای بیشتر است (۱۴). در آزمایشگاه محل مطالعه ما این روش به خوبی پایه ریزی شده است (۱۶).

به نظر می‌رسد برای به دست آوردن پروتئین های مورد نظر با درجه خلوص بالا افینیتی کروماتوگرافی روشی سریع، ساده و از نظر صرفه جویی در زمان مقرون به صرفه باشد (۲۴–۲۳). ما با این روش محصول IgG2a موشی با درجه خلوص بالا را به دست آوردیم. در مطالعات منتشر شده ProA برای تخلیص و جداسازی ساب کلاس های IgG به کار رفته است اما در کار ما ابتدا IgG توسط کرماتوگرافی تعویض یونی با ستون Ion exchange از سایر کلاس های آنتی بادی جدا شد و سپس ساب کلاس IgG مورد نظر توسط ستون ProA از سایر ساب کلاس ها ایزوله گردید.

محصول تخلیص با این روش ۸ میلی گرم از IgG2a موشی بود که مقدار و میزان خلوص محصول در مقایسه با مطالعات منتشر شده، بیشتر است.

به منظور تخلیص آنتی بادیها، افینیتی کروماتوگرافی با ProA به علت سرعت بالا، بازدهی زیاد و استفاده چندین باره از ستون پک شده در طی دهه های اخیر بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (۴) در این روش با کاهش pH میتوان سایر ساب کلاس ها را هم به ترتیب از محلول جدا کرد. با توجه به مطالعات منتشر شده به خاطر انطباق pH جداسازی IgG2a با دیگر ساب کلاس-های IgG1 و IgG2b، تخلیص همه آنتی بادیهای IgG2a موجود در نمونه غیر ممکن می باشد (۲۴).

طبق نتایج SDS-PAGE در این مطالعه IgG2a موشی با خلوص بالای ۹۵٪ به دست آمد. در نتایج مربوط به SDS-PAGE وجود باندهای چندگانه در شکل ۴.A ممکن است مربوط به دگلیکوزیلاسیون زنجیره های پروتئینی آنتی بادی در مراحل کار باشد. نتایج به دست آمده در تعیین ایزوتایپ نشان دهنده حضور آنتی بادی از ساب کلاس IgG2a با زنجیره سبک کاپا در محصول به دست آمده می‌باشد. IgG2a تخلیص شده برای ایمونیزاسیون حیوانات در پروسه های تولید آنتی بادی مونوکلونال و پلی کلونال و در مراحل مختلف این پروسه‌ها برای شناسایی و ارزیابی محصول به دست آمده کاربرد دارد. تولید این محصول مناسب و اقتصادی با صرف مخارج کم، قدمی مهم در راه خودکفایی کشور است.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده و خلوص بالای محصول تولیدی می‌توان نتیجه گرفت که برای تخلیص ساب کلاسهای IgG موش روش کروماتوگرافی تعویض یونی و به دنبال آن ProA روش مناسبی می‌باشد بویژه در مواردی همچون ایمونیزاسیون که خلوص بالای محصول ضروری است.

قدردانی

حامی مالی این پروژه تحقیقاتی مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز می‌باشد. این مقاله بر اساس پایان نامه دوره کارشناسی ارشد نگارش شده است.

References

1. Majidi J, Abdolalizadeh J, Amirkhiz M, Majidi S. Production and purification of polyclonal antibody against bovine immunoglobulins in rabbits. *African Journal of Biotechnology* 2007; **6**(12): 1369-1372. doi: 10.3923/jbs.2008.683.686
2. Josic D, Lim Y-P. Analytical and preparative methods for purification of antibodies. *Food Technology and Biotechnology* 2001; **39**(3): 215-226.
3. Raju TS, Briggs JB, Borge SM, Jones AJ. Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology* 2000; **10**(5): 477-486. doi: 10.1093/glycob/10.5.477
4. Wongchuphan R, Tey BT, Tan WS, Subramanian SK, Taip FS, Ling TC. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G using anion exchangers. *Process Biochemistry* 2011; **46**(1): 101-107. doi: 10.1016/j.procbio.2010.07.023
5. Nikolayenko I, Galkin O, Grabchenko N, Spivak M. Preparation of highly purified human IgG, IgM, and IgA for immunization and immunoanalysis. *Ukrainica Bioorganica Acta* 2005; **2**(2): 3-11.
6. Hober S, Nord K, Linhult M. Protein A chromatography for antibody purification. *Journal of Chromatography B* 2007; **848**(1): 40-47. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.09.030
7. Hey C, Zhang C. Process Development for Antibody Purification from Tobacco by Protein A Affinity Chromatography. *Chemical Engineering & Technology* 2012; **35**(1): 142-148. doi: 10.1002/ceat.201100259
8. Erntell M, Myhre EB, Sjöbring U, Björck L. Streptococcal protein G has affinity for both Fab-and Fc-fragments of human IgG. *Molecular Immunology* 1988; **25**(2): 121-126. doi: 10.1016/0161-5890(88)90059-4
9. Mokst, Abrahmsenl, Nilsoon B, Hellman U, Sjoquist J, Uhlen M. Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. *European Journal of Biochemistry* 1986; **156**(3): 637-643. doi: 10.1111/j.1432-1033.1986.tb09625.x
10. Tu YY, James Primus F, Goldenberg DM. Temperature affects binding of murine monoclonal IgG antibodies to protein A. *Journal of Immunological Methods* 1988; **109**(1): 43-47. doi: 10.1016/0022-1759(88)90440-1
11. Ravi M, Sundara SS, Kumara KK, Paula Dpvsf. Screening , stabilization and expansion of secretory hybridomas in culture as a steady source of monoclonal antibodies (Mabs). *SRI Ramachndra* 2007; **16**: 32-38.
12. Maleki LA, Majidi J, Baradaran B, Abdolalizadeh J, Kazemi T, Maleki AA. Large Scale Generation and Characterization of Anti-Human CD34 Monoclonal Antibody in Ascetic Fluid of Balb/c Mice. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 2013; **3**(1): 211-216.
13. Maleki LA, Majidi J, Baradaran B, Abdolalizadeh J, Akbari AM. Production and characterization of murine monoclonal antibody against synthetic peptide of CD34. *Human Antibodies* 2013; **22**(1): 1-8. doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00485
14. Eivazi S, Majidi J, Maleki LA, Abdolalizadeh J, Yousefi M, Ahmadi M, et al. Production and Purification of a Polyclonal Antibody Against Purified Mouse IgG2b in Rabbits Towards Designing Mouse Monoclonal Isotyping Kits. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 2015; **5**(1): 109-113.
15. Ezzatifar F, Majidi J, Baradaran B, Maleki LA, Abdolalizadeh J, Yousefi M. Large Scale Generation and Characterization of Anti-Human IgA Monoclonal Antibody in Ascitic Fluid of Balb/c Mice. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 2015; **5**(1): 97-102.
16. Baradaran B, Majidi J, Abdolalizadeh J, Shahneh FZ. Mass-Production and Characterization of Anti-CD20 Monoclonal Antibody in Peritoneum of Balb/c Mice. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 2013; **3**(1): 109-113.
17. Verdoliva A, Pannone F, Rossi M, Catello S, Manfredi V. Affinity purification of polyclonal antibodies using a new all-D synthetic peptide ligand: comparison with protein A and protein G. *Journal of Immunological Methods* 2002; **271**(1): 77-88. doi: 10.1016/S0022-1759(02)00341-1
18. Duhamel RC, Meezan E, Brendel K. The pH-dependent binding of goat IgG1 and IgG2 to protein A-sepharose. *Molecular Immunology* 1980; **17**(1): 29-36. doi: 10.1016/0161-5890(80)90121-2
19. Rousseaux J, Picque M, Bazin H, Biserte G. Rat IgG subclasses: differences in affinity to protein A-Sepharose. *Molecular Immunology* 1981; **18**(7): 639-645. doi: 10.1016/0161-5890(81)90035-3
20. Pul R, Dodel R, Stangel M. Antibody-based therapy in Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2011; **11**(3): 343-357.
21. Zhang Z, Goldschmidt T, Salter H. Possible allelic structure of IgG2a and IgG2c in mice. *Molecular*

Immunology 2012; **50**(3): 169-171. doi: 10.1016/j.molimm.2011.11.006

22. Seabrook TJ, Iglesias M, Bloom JK, Spooner ET, Lemere CA. Differences in the immune response to long term Aβ vaccination in C57BL/6 and B6D2F1 mice. *Vaccine* 2004; **22**(29): 4075-4083. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.03.061
23. Arnau J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification* 2006; **48**(1): 1-13. doi: 10.1016/j.pep.2005.12.002
24. Richman D, Cleveland P, Oxman M, Johnson K. The binding of staphylococcal protein A by the sera of different animal species. *The Journal of Immunology* 1982; **128**(5): 2300-2305.